

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO RIO DE JANEIRO



Mario Ricardo da Silva Lima

**Papel do Design na engenharia de tecidos:
possíveis aplicações na bioimpressão 3D**

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Design da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Design.

Orientador: Prof. Jorge Roberto Lopes dos Santos

Coorientador: Prof. João Victor Azevedo M. Correia de Melo

Rio de Janeiro
Março de 2023



Mario Ricardo da Silva Lima

**Papel do Design na engenharia de tecidos:
possíveis aplicações na bioimpressão 3D**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Design da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Design. Aprovada pela comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Jorge Roberto Lopes dos Santos

Orientador

Departamento de Artes & Design – PUC-Rio

Prof. João Victor Azevedo M. Correia de Melo

Coorientador

Departamento de Artes & Design – PUC-Rio

Prof.^a Luiza Novaes

Departamento de Artes & Design – PUC-Rio

Prof.^a Rita Couto

Departamento de Artes & Design – PUC-Rio

Prof. Ricardo Cunha Michel

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof.^a Sara Gemini Piperni

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Rio de Janeiro, 31 de março de 2023

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Mario Ricardo da Silva Lima

Mestre em Design pela PUC-Rio em 2017. Graduou-se em Desenho Industrial – Habilitação em Projeto de Produto pela Universidade Federal do Rio de Janeiro em 2009 e em Desenho Industrial – Habilitação em Programação Visual pela Faculdade da Cidade em 2011. Atua profissionalmente nessas áreas do Design há 16 anos, atualmente é Designer na Fundação Cecierj. Membro do laboratório de BiodesignLab DASA/PUC e colaborador do grupo de pesquisas interdisciplinar Design e Formações de leitores em contextos culturais e pedagógicos da PUC-Rio.

Ficha Catalográfica

Lima, Mario Ricardo da Silva

Papel do Design na engenharia de tecidos : possíveis aplicações na bioimpressão 3D / Mario Ricardo da Silva Lima ; orientador: Jorge Roberto Lopes dos Santos ; coorientador: João Victor Azevedo M. Correia de Melo. – 2023.

168 f. : il. color. ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Artes e Design, 2023.

Inclui bibliografia

1. Artes e Design – Teses. 2. Design e tecnologia. 3. Bioimpressão 3D. 4. Biomateriais. 5. Engenharia de tecidos. I. Santos, Jorge Roberto Lopes dos. II. Melo, João Victor Azevedo M. Correia de. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Artes e Design. IV. Título.

CDD: 700

Dedico a Antônio Vieira, Salvador Vieira e Sonea Chaves.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meu orientador, Prof. Jorge Lopes, e ao meu coorientador, Prof. João Victor Azevedo, por todos os ensinamentos, apoio, suporte e confiança depositados durante o percurso desta pesquisa.

Agradeço aos meus familiares, sempre confiantes e prestativos em todos os momentos. Agradeço a Camila Cardoso, por todo o suporte, carinho, companheirismo e compreensão ao longo desse percurso.

Agradeço aos amigos de laboratório Gerson Ribeiro, Roberto Takao, Raphael Vinagre, Ronaldo Andrade, Vinicius Arcoverde, Thiago Barboza, Pedro Themoteo, Carlos Santigado Diaz e Victoria Gonçalves Broegger pela amizade e ajuda durante esses anos na pós-graduação.

Agradeço aos amigos Vittorio Lo Bianco, Fabio Rapello, Larissa Averbug, Vinicius Mitchell, Lícia Matos, Mariana Caser, Camille Moraes, Nubia Roma e aos demais companheiro de trabalho por todo o suporte e pelos momentos felizes ao longo desses anos.

Agradeço a Yana Gonzaga pela revisão de texto do anteprojeto e desta tese, e a Rosane Lira, pelo revisão do documento de qualificação.

Agradeço ao Prof. Heron Werner, por toda confiança e apoio ao longo dos anos.

Agradeço aos companheiros dos laboratórios NEXT e LINC-Design, especialmente Antonio Thiele e Lucas Brazil, pelo companheirismo e pelos inúmeros momentos de auxílio nessa jornada.

Agradeço à professora Sara Gemini Piperni e à pesquisadora Jéssica Dornelas pela parceria crucial para esta pesquisa.

Agradeço a Marcel Martins, Marisol Santos e a todos os envolvidos nos laboratórios da Unidade de Pesquisas Clínicas – HUAP/UFF e do Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional – CSS/UFRJ por todo o suporte, atenção e gentileza ao longo dos experimentos.

Agradeço aos membros do GEF/UFRJ pela parceria e prestatividade durante os experimentos. Agradeço também a Olga Araujo, do laboratório da COPPE/UFRJ, pela prestatividade e paciência no uso do microtomógrafo.

Agradeço aos professores Luiza Novaes, Rita Couto, Sara Gemini Piperni e Ricardo Michel pela presença e pelas contribuições na banca avaliadora desta pesquisa.

Agradeço aos professores e profissionais do departamento de Artes & Design da PUC-Rio pela permanente prestatividade para comigo.

Agradeço a PUC-Rio pelo suporte e infraestrutura fornecidos para a execução desta pesquisa de maneira qualificada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Lima, Mario Ricardo da Silva; Santos, Jorge Roberto Lopes dos. **Papel do Design na engenharia de tecidos: possíveis aplicações na bioimpressão 3D**. Rio de Janeiro, 2023. 168 p. Tese de Doutorado – Departamento de Artes & Design, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A tecnologia de bioimpressão 3D se tornou um importante recurso em pesquisas médicas no campo da engenharia de tecidos. Entretanto, apesar de essa tecnologia possuir grande convergência e demanda de competências do Design, o profissional designer ainda se encontra distante de tais trabalhos. Esta tese promove a investigação do papel que o Design pode desempenhar em pesquisas envolvendo o uso da bioimpressão 3D. A partir da revisão bibliográfica inicial e da compreensão acerca dos temas da engenharia de tecidos e de biomateriais, foram estabelecidas parcerias visando à execução de uma série de experimentos práticos. A partir da construção de uma bioimpressora *desktop* e posterior aquisição de uma bioimpressora profissional, foram realizados testes de configuração, calibragem e impressão de diferentes materiais viscosos, para uma melhor compreensão do processo de impressão dos biomateriais. Em parceria com o doutor Ronaldo Andrade, paralelamente se buscou solucionar a questão de simulação prática em treinamentos médicos, visando gerar modelos físicos semelhantes aos tecidos vivos. Por meio de uma parceria com o Grupo de Estudos do Fígado/UFRJ, e com o laboratório do Programa de Engenharia Nuclear, da COPPE/UFRJ, utilizou-se a microtomografia para gerar modelos tridimensionais virtuais que serviram de base para um software de visualização e para a impressão 3D de um fígado de rato. Da parceria com as pesquisadoras Sara Gemini e Jéssica Dornelas, foi possível realizar a impressão de construtos com esferóides celulares e a posterior análise via microscopia. Em nova rodada de experimentos, a biotinta desenvolvida foi aperfeiçoada e testada em diferentes formulações. Além de buscar avanços nos campos investigados, a presente tese buscar mostrar o papel interdisciplinar do Design e seu potencial agregador em pesquisas na área da Ciências Médicas e Biológicas, fugindo do lugar-comum em que o profissional muitas vezes é colocado.

Palavras-chave

Design e tecnologia; bioimpressão 3D; biomateriais; engenharia de tecidos.

Abstract

Lima, Mario Ricardo da Silva; Santos, Jorge Roberto Lopes dos (advisor). **Role of Design in tissue engineering: possible applications in 3D bioprinting**. Rio de Janeiro, 2022. 168 p. Tese de Doutorado – Departamento de Artes & Design, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

3D bioprinting technology has become an important resource in medical research, in the field of tissue engineering. However, although this technology has great convergence and demand for skills that Design has, the designer is far from such works. This thesis promotes the investigation of the role that Design can play in researches on the use of 3D bioprinting. From the preliminary bibliographic review and understanding of tissue engineering and biomaterials topics, partnerships were formed in order to develop a series of practical experiments. From the construction of a desktop bioprinter and subsequent acquisition of a professional bioprinter, configuration, calibration and printing tests of different viscous materials were carried out for a better understanding of the printing process of biomaterials. In partnership with Dr. Ronaldo Andrade, an attempt was also made to solve the issue of practical simulation in medical training, with a view to generating physical models similar to living tissue. Through a partnership with the Grupo de Estudos do Fígado/UFRJ, and the laboratory of the Nuclear Engineering Program at COPPE/UFRJ, microtomography was used to generate virtual three-dimensional models that served as the basis for a software for visualization and 3D printing of a mouse liver. In partnership with researchers Sara Gemini and Jéssica Dornelas, it was possible to print constructs with cellular spheroids and subsequently analyze them via microscopy. In a new round of experiments, the developed bioink was improved and tested in different formulations. In addition to seeking advances in the investigated fields, this thesis seeks to show the interdisciplinary role of Design and its aggregating potential in research in the Medical and Biological Sciences areas, escaping the commonplace in which the professional is often placed.

Keywords

Design and Technology; 3D bioprinting; biomaterials; tissue engineering.

Sumário

1 Introdução	12
2. Engenharia de tecidos, biomateriais e bioimpressão 3D	20
2.1. Engenharia de tecidos	20
2.1.1. Histórico	20
2.1.2. Células-tronco e cultivo tecidual	23
2.1.3. Engenharia de tecidos e Medicina regenerativa	26
2.1.4. <i>Organ-on-a-chip</i>	29
2.1.5. Descelularização de órgãos	31
2.1.6. Xenórgãos geneticamente modificados	32
2.2. Biomateriais	32
2.2.1. Histórico	33
2.2.2. Estado da arte	37
2.3. Bioimpressão 3D	39
2.3.1. Histórico	44
2.3.2. Técnicas de bioimpressão 3D	47
2.3.3. Biotintas	51
2.3.4. Desafios atuais	53
2.4. Considerações	56
3. O caminho da pesquisa: desenvolvimento através do Design	57
3.1. Paradigma da pesquisa	57
3.2. O desenvolvimento <i>através</i> do Design	58
3.2.1. O disciplinar, seu sufixo e seus prefixos	58
3.2.2. O caráter interdisciplinar do Design	60
3.2.3. Método científico e método do Design	61
3.2.4. O papel do designer na sociedade atual	64
3.2.5. Possibilidades	68
3.3. Caminhos da pesquisa	69
3.3.1. Revisão bibliográfica inicial e desbravamento teórico e prático dos temas da pesquisa	69
3.3.2. Práxis da pesquisa e desenvolvimento dos experimentos	73

3.4. Considerações	76
4. Experimentações com bioimpressão 3D e materiais	78
4.1. Desenvolvimento da bioimpressora 3D <i>desktop</i>	78
4.1.1. Primeira extrusora de seringa – <i>bowden</i>	80
4.1.2. Segunda extrusora de seringa – <i>direct</i>	84
4.2. Bioimpressora TissueStart	88
4.3. Impressão com diferentes materiais	93
4.3.1. Creme Nivea	94
4.3.2. Alginato	95
4.3.3. Gelatina	96
4.3.4. Silicone	98
4.4. Desenvolvimento de modelos de simulação e treinamento	100
4.4.1. Corte com bisturi	101
4.4.2. Uso de moldes em filamento flexível	101
4.4.3. Impressão 3D com silicone <i>shore A 8</i>	105
4.4.4. Tom silicons supervisionados	106
4.5. Considerações	108
5. Geração de modelo de fígado de rato bioimpresso	110
5.1. O GEF e suas pesquisas	110
5.2. Microtomografia de fígados de ratos	113
5.3. Impressão 3D	116
5.4. Microtomografia com contraste	117
5.5. <i>Software</i> de visualização	119
5.6. Considerações	120
6. Bioimpressão 3D de biotinta com esferoides fixados	122
6.1. Reuniões para delineamento dos experimentos	122
6.2. Uso do preenchimento giróide	123
6.3. BioenderTermo	124
6.4. Bioimpressão com alginato	126
6.5. Bioimpressão 3D de biotinta com esferoides	129
6.5.1. Preparação	129

6.5.2. Execução do experimento	131
6.6. Considerações	134
7. Desenvolvimento e bioimpressão 3D de biotintas com clorofila	136
7.1. Primeira rodada de experimentos	136
7.2. Segunda rodada de experimentos – 3 biotintas	140
7.3. Terceira rodada de experimentos	144
7.3.1. Impressão com alginato + CaCl ₂	144
7.3.2. Impressão com alginato + gelatina	147
7.3.3. Impressão com alginato + Pluronic	149
7.4. Considerações	151
8. Considerações	152
8.1. Percurso realizado	152
8.1.1. Experimento 1	153
8.1.2. Experimento 2	153
8.1.3. Experimentos 3 e 4	154
8.2. As duas trilhas da pesquisa	155
8.3. Pesquisa e cooperação inter e transdisciplinar	156
8.4. As contribuições da pesquisa	157
8.5. Perspectivas futuras	158
9. Referências bibliográficas	160

Any sufficiently advanced technology is indistinguishable from Magic.

Arthur C. Clarke,
Profiles of the Future: An Inquiry into the Limits of the Possible

1

Introdução

Esta pesquisa propõe a investigação do papel do Design na engenharia de tecidos e suas possíveis aplicações na bioimpressão 3D.

A bioimpressão 3D é uma tecnologia multidisciplinar em rápida evolução. Chua; Yeong (2015, p. vii) a definem como uma biofabricação aditiva de construtos¹ e tecidos tridimensionais funcionais, empregando biomateriais e células vivas a partir de modelos digitais pré-definidos. Essa tecnologia utiliza como base a manufatura aditiva (impressão 3D), processo em que um objeto tridimensional é construído camada por camada, de acordo com diferentes largura (eixo X), comprimento (eixo Y) e altura (eixo Z), por meio da lógica CAD/CAM² (**Figura 1.1**).

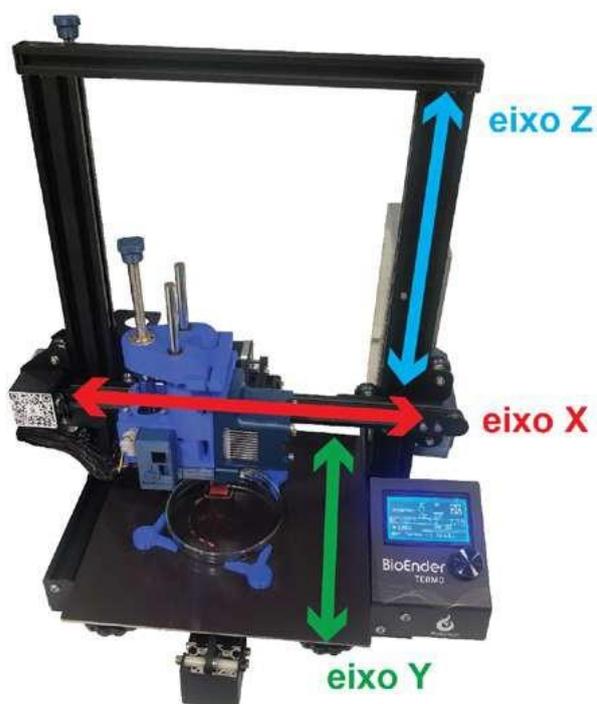


Figura 1.1 – Exemplo de bioimpressora 3D e seus 3 eixos de impressão.

A principal diferença da bioimpressão 3D em relação à impressão 3D tradicional advém dos materiais utilizados: as biotintas (*bioinks*, em inglês), compostos formados por *biomateriais* e células vivas.

Durante Conferência de consenso da Sociedade Européia para Biomateriais (*European Society For Biomaterials*), em 1986, um biomaterial foi definido como

¹ Nesta tese, um construto é uma estrutura bioimpressa em 3D a partir de um arquivo digital.

² CAD (*computer-aided design*), design/desenho auxiliado por computador e CAM (*computer-aided manufacturing*), fabricação auxiliada por computador.

“um material não-vivo utilizado em um dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas biológicos” (WILLIAMS, 1987). Ao longo do tempo, novas definições surgiram, juntamente com os avanços na área. Proponho, para o escopo desta pesquisa, a seguinte definição de biomateriais:

Os *biomateriais* são materiais sintéticos ou naturais, que podem ser utilizados em contato (contínuo ou intermitente) com sistemas biológicos, de maneira biocompatível³, a fim de restaurar, aperfeiçoar ou substituir a função de um tecido corporal ou órgão de tal sistema⁴ (RATNER, 2004; BAJPAI, 2016; HELMUS, TWEDEN, 1995).

Esses materiais podem ser empregados em dispositivos extracorpóreos, como lentes de contato e filtros de diálise, ou em dispositivos implantáveis, como próteses articulares, válvulas cardíacas, implantes dentários e marca-passos (**Figura 1.2**).

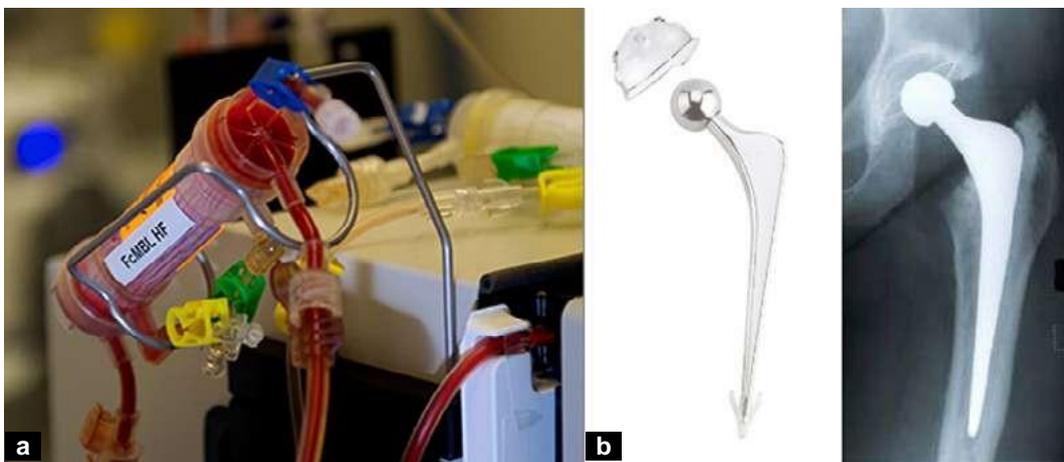


Figura 1.2 – Em (a), um filtro de diálise. Em (b), exemplo de prótese coxofemoral de metal e polietileno e o raio-x da prótese implantada. Fontes: (a) <https://wyss.harvard.edu/improved-sepsis-therapeutic-device/>. (b) <http://medicinadoquadril.com.br/site/proteses/>.

O termo *engenharia de tecidos* surgiu apenas na década de 1980, designando inicialmente as técnicas de manipulação de tecidos e órgãos, além da aplicação de próteses e biomateriais. Com os avanços da *medicina regenerativa*, campo que utiliza células, especialmente células-tronco, para o tratamento e a regeneração de tecidos e órgãos (MEYER, 2009), o próprio conceito de engenharia de tecidos evoluiu.

Atualmente, a engenharia de tecidos agrega diferentes disciplinas, buscando criar condições para o reparo e a substituição de tecidos e órgãos lesados.

³ A biocompatibilidade considera “a capacidade de um material de executar uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica” (WILLIAMS, 1987).

⁴ Essa definição exclui instrumentos cirúrgicos ou odontológicos, pois, apesar de expostos a fluidos corporais, não substituem ou aperfeiçoam a função de um tecido corporal ou órgão (AGRAWAL, 1998).

Fornecendo os elementos celulares requeridos, os fatores de proliferação e de diferenciação celular, a área visa produzir novos tecidos vivos que mimetizam as diferentes funções do corpo humano. Eles podem ser desenvolvidos a partir de células autólogas (do próprio paciente), alogênicas (de um doador), ou xenogênicas (de um animal de outra espécie) imunologicamente inativadas, revelando-se promissoras na recuperação de funções de tecidos e novas opções terapêuticas para doenças (RATNER, 2004, p. 712).

Na biomimética⁵, os pesquisadores observam diversos organismos biológicos (humanos e outros vertebrados, invertebrados e mesmo plantas) e buscam inspiração neles, procurando compreender seus mecanismos naturais e utilizar essas informações para o desenvolvimento de novas terapias celulares:

Numa sociedade acostumada a dominar ou “melhorar” a natureza, essa respeitosa imitação é uma abordagem inteiramente nova. [...] a Revolução Biomimética inaugura uma era cujas bases assentam não naquilo que podemos *extrair* da natureza, mas no que podemos *aprender* com ela (BENYUS, 2007, p. 10).

Com o aprimoramento do uso de biomateriais, juntamente com técnicas de obtenção e cultivos de células, a engenharia de tecidos se expandiu e, somada à biomimética e à impressão 3D, tornou possível a impressão de objetos tridimensionais constituídos de células vivas, os *construtos celulares* (*cell-laden constructs*), gerando tecidos tridimensionais vivos e funcionais (**Figura 1.3**).



Figura 1.3 – Modelo alveolar bioimpresso em hidrogel, contendo células sanguíneas, para simulação de atuação pulmonar (GRIGORYAN *et al.*, 2019). Fonte: <https://www.scientificamerican.com/article/can-3-d-printing-produce-lung-and-liver-tissue-for-transplants/>.

A biomimética e a impressão 3D estão presentes de modo amplo em pesquisas sobre biomateriais e engenharia de tecidos. Ainda que ambas estejam ligadas ao

⁵ Do grego *bios* (vida) e *mimesis* (imitação). Ciência que estuda modelos da natureza e, a partir deles, produz soluções para problemas humanos (BENYUS, 2007, p. 8).

Design, são raras as menções ao uso de suas metodologias ou ao profissional designer na maior parte das pesquisas encontradas, evidenciando sua baixa participação nesse tipo de pesquisa.

A figura a seguir destaca as áreas de conhecimento envolvidas no desenvolvimento de um biomaterial, encontrada em um livro sobre o tema. Nessa tabela, o designer é mencionado apenas na etapa “esterilização e embalagem” (Figura 1.4). Mesmo na etapa “Design do dispositivo”, são citados apenas médicos e engenheiros.

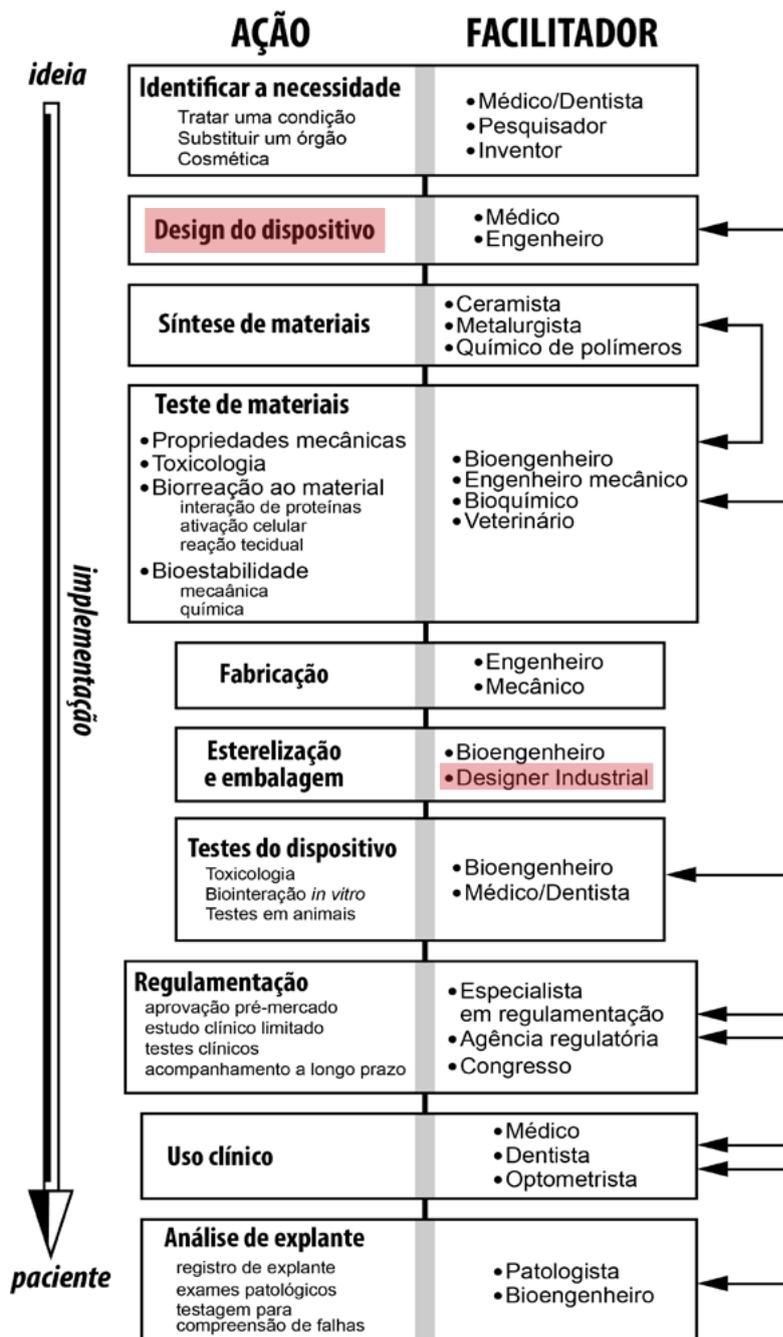


Figura 1.4 – Na imagem são apresentadas dez etapas do desenvolvimento de biomateriais, dentre as quais o designer aparece apenas em “esterilização e embalagem”. Fonte: Adaptado de Ratner (2004, p. 5).

De encontro ao exposto na figura anterior, considero que o designer, devido à sua natureza interdisciplinar, pode atuar de maneira eficiente como mediador e catalisador de diferentes saberes e, juntamente com seu pensamento projetivo, pode contribuir ao longo de todo o processo, contribuindo no desenvolvimento de novos entendimentos sobre bioimpressão 3D aplicados à engenharia de tecidos.

Em uma entrevista, Robert Langer, reconhecido pesquisador da área da engenharia de tecidos, expõe uma reflexão sobre o papel do Design:

Comecei a pensar, como engenheiro químico, talvez devêssemos pensar sobre Design. Talvez devêssemos fazer a pergunta: “O que você realmente quer em um biomaterial do ponto de vista da engenharia, do ponto de vista da química, do ponto de vista da biologia?” Então, poderíamos sintetizá-lo a partir de princípios básicos?⁶ (LANGER, 2009, p. 757).

Minha hipótese é que, a partir de estudos e pesquisas disponíveis e com a parceria de profissionais de diferentes áreas, o designer é capaz de contribuir, de maneira interdisciplinar e relevante, para a área da bioimpressão 3D. A questão norteadora desta pesquisa é: *Como o design pode contribuir, por meio da investigação exploratória interdisciplinar de Bioimpressão 3D, para o desenvolvimento de novos entendimentos acerca dessa tecnologia?* Esta pesquisa deve ser compreendida sob a perspectiva de Donald Schön (2000) de que os conceitos lógicos de “problema” e “solução” dão lugar às ideias de “situação” e “construção”, respectivamente (TABAK; FARBIARZ, 2012, p. 27).

O objetivo geral desta pesquisa, portanto, é a investigação do papel do Design na bioimpressão 3D de biomateriais aplicada à engenharia de tecidos. Com a metodologia do Design articulando diferentes áreas do saber, busco contribuir para novos entendimentos e avanços nelas. Para tal, o presente trabalho perpassou os seguintes objetivos específicos:

- traçar o estado da arte das pesquisas nas áreas de biomateriais, bioimpressão 3D e engenharia de tecidos;
- selecionar, dentre as pesquisas levantadas, as mais pertinentes ao desenvolvimento de bioimpressão 3D de biomateriais aplicada à engenharia de tecidos;
- estabelecer os experimentos a serem desenvolvidos, tendo como base as pesquisas selecionadas;
- realizar experimentos relacionados aos temas desta pesquisa;
- analisar os resultados obtidos com os experimentos executados.

⁶ No original: I started thinking, as a chemical engineer, maybe we should think about design. Maybe we should ask the question, “What do you really want in a biomaterial from an engineering standpoint, from a chemistry standpoint, from a biology standpoint?” Then, could we synthesize it from first principles?

Desse modo, o objeto desta pesquisa é a seleção de estudos em desenvolvimento nos campos de biomateriais, bioimpressão 3D e engenharia de tecidos. Por serem áreas promissoras e em constante evolução, muitos artigos são publicados em periódicos científicos de alta relevância, como *Science Direct* e *Nature Communications*, além de publicações frequentes em periódicos e em eventos específicos das áreas em questão.

Sobre biomateriais, busquei pesquisas envolvendo materiais sintéticos e naturais, com possibilidade de uso dos materiais ou mesmo de reprodução dos experimentos nos laboratórios disponíveis durante o desenvolvimento da tese.

Na área da bioimpressão 3D, o foco voltou-se para pesquisas que demonstram a *práxis* do uso de hardwares aplicando a lógica CAD/CAM, enquanto na engenharia de tecidos, voltou-se para pesquisas bem-sucedidas na produção de tecidos tridimensionais bioimpressos e passíveis de reprodução nos laboratórios disponíveis durante o desenvolvimento da tese.

Esta pesquisa qualitativa possui viés exploratório. Por mais que ela ocorra a partir de campos das ciências exatas e biológicas, está baseada no pensamento do Design, partindo, portanto, do fundamento de que “há uma relação dinâmica entre o mundo real e o sujeito, uma interdependência viva entre o sujeito e o objeto, um vínculo indissociável entre o mundo objetivo e a subjetividade do sujeito” (CHIZZOTTI, 2006, p. 79). Sua ação investigativa buscou ser dinâmica entre os fatos e sua interpretação, em um método de condução circular, na qual a coleta e a análise dos dados obtidos refinam a questão norteadora ou mesmo revelam novas perguntas no processo de investigação (SAMPIERI *et al.*, 2014).

O primeiro passo foi a realização de uma pesquisa bibliográfica, inicialmente analisando autores e artigos relevantes das áreas dos biomateriais, da bioimpressão 3D e da engenharia de tecidos. A exploração de novas pesquisas estendeu-se ininterruptamente no decorrer da construção da tese.

A partir de uma revisão inicial dessa literatura, o primeiro experimento foi definido e viabilizado – aquisição de material, montagem e execução. Após a execução do experimento, foi feita a análise dos resultados obtidos. Com as informações obtidas no primeiro experimento, ocorreu uma segunda revisão, mais focada, e a busca por novas pesquisas, seguidas de nova definição de rumos a serem tomados e da execução de um segundo experimento. Esse ciclo foi repetido em todos os experimentos, tornando os anteriores alicerces importantes para os seguintes. Cada experimento apresenta um conjunto de métodos particular, apresentado em seu respectivo capítulo. Em alguns momentos, devido a conjunturas (explicitadas nos capítulos), os experimentos foram simultâneos, aumentando assim as variáveis e a complexidade deles.

Ainda a respeito dos experimentos, é aceitável que o imprevisto e a possível falta de rigor científico tenham ocorrido em determinados momentos – a partir,

entretanto, de uma base de dados controlada. Apesar do viés exploratório, esta pesquisa utiliza uma série de experimentos controlados para validar suas questões.

O conhecimento prévio sobre impressão 3D – desde a concepção e a montagem do equipamento até a *práxis* do processo (montagem de *hardwares*, uso de *softwares*, elaboração de arquivos para uso e resolução de problemas envolvendo o processo de impressão) – foi aprimorado a partir do mestrado em Design, na PUC-Rio, e *a posteriori*. Durante o mestrado, também trabalhei a mediação entre diferentes campos do saber, já que minha dissertação envolvia os campos do Design e da educação, levando à interação com psicólogos, pedagogos, museólogos, professores, designers e engenheiros, além de contato direto com o público adulto e infantil.

No início desta investigação, contei com o suporte de médicos, uma biomédica e um farmacêutico. Contudo, o número de pessoas e competências envolvidas aumentou consideravelmente, enriquecendo ainda mais a pesquisa. Inicialmente o laboratório de minha linha de pesquisa era o NEXT (Núcleo de Experimentação Tridimensional), da PUC-Rio, que possui vasta experiência em manufatura aditiva, além de ter agregado o viés médico em suas linhas de pesquisa. Em 2021, numa parceria da PUC-Rio com o Instituto DASA, ocorreu a inauguração do BiodesignLab, laboratório que atualmente abriga minha pesquisa, oferecendo importante suporte para ela – como poderá ser constatado durante a leitura do texto.

De maneira resumida, segue a descrição dos capítulos da presente pesquisa:

- No Capítulo 1 – Introdução – apresento o tema e questão norteadora da pesquisa, o referencial teórico, o pressuposto, a hipótese e a justificativa, além do objeto, dos objetivos geral e específicos e da metodologia empregada.
- No Capítulo 2 – Biomateriais, engenharia de tecidos e bioimpressão 3D – exponho os temas da pesquisa, seus respectivos históricos e estados da arte.
- No Capítulo 3 – O caminho da pesquisa: desenvolvimento através do Design – apresento as características e as opções metodológicas, a justificativa da pesquisa como interdisciplinar e *através* do Design e traço o caminho percorrido.
- No Capítulo 4 – Experimentações com bioimpressão 3D e materiais –, detalho as experimentações com bioimpressoras 3D utilizando diferentes materiais e métodos.
- No Capítulo 5 – Geração de modelo de fígado de rato bioimpresso –, detalho os experimentos desenvolvidos envolvendo o escaneamento e impressão de um fígado de rato.
- No Capítulo 6 – Bioimpressão 3D de biotinta com esferoides fixados –, detalho o experimento envolvendo a bioimpressão 3D de hidrogel com esferóides celulares, desenvolvido em parceria com as pesquisadoras Sara Gemini e Jéssica Dornelas.

- No Capítulo 7 – Desenvolvimento e bioimpressão 3D de biotintas com clorofila – apresento as rodadas de experimentos executadas no LabNanoBiof com o auxílio do pesquisador Marcel Martins, utilizando diferentes biotintas e testando a clorofila como um marcador de fluorescência.
- No Capítulo 8 – Considerações – apresento as considerações sobre o processo da pesquisa, suas relações com o Design e a interdisciplinaridade e desdobramentos futuros.

2

Engenharia de tecidos, biomateriais e bioimpressão 3D

Neste capítulo, apresento um panorama sobre os temas abordados na pesquisa, alheios ao cotidiano do Design: engenharia de tecidos, biomateriais e bioimpressão 3D. Após apresentação, panorama da história e do estado da arte desses temas, exponho considerações acerca da escrita do capítulo.

2.1.

Engenharia de tecidos

Em 1987, o conceito de *engenharia de tecidos* foi formalmente introduzido na medicina, sendo definido como:

a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da vida para a compreensão fundamental das relações estrutura-função, em condições normais e patológicas, de tecidos de mamíferos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos (LANGER, VACANTI, 1993, p. 920).

Ligada aos biomateriais e à área de transplantes de tecidos e órgãos à época, a engenharia de tecidos evoluiu, juntamente com descobertas em relação ao estudo de células e tecidos.

2.1.1.

Histórico

Data do século XVI, na Itália, a descrição de uma prótese nasal, construída a partir de parte de um antebraço. Já no século XIX, a cirurgia dita *moderna* surgiu a partir da compreensão científica da teoria dos germes e contaminação, bem como da introdução de técnicas de esterilização. Somam-se a isso os avanços no uso de anestesia, o que possibilitou a evolução das técnicas cirúrgicas (VACANTI; VACANTI, 2007).

No século XIX, o cirurgião Johann Friedrich Dieffenbach realizou experimentos e estudos clínicos sobre transplantes em animais por meio de enxertos de pele, sendo considerado um dos pioneiros na prática de transplante moderno (MEYER, 2009, p. 8).

Em 1858, Rudolf Virchow descreveu que a cicatrização de tecidos dependia da proliferação celular. Em 1910, R. G. Harrison demonstrou, com sucesso, o crescimento ativo de células, tornando-se um marco na área (MEYER, 2009, p. 9). O cultivo *in vitro* (fora do corpo) tornou-se um pilar da engenharia de tecidos dita

clássica (FELL, 1972). Outro pilar a ser considerado, ligado à microcirurgia, é a elaboração de métodos de anastomose vascular (procedimento de ligação de dois ou mais vasos), por Alexis Carrel, em 1911, considerado o fundador do transplante de órgãos moderno (MEYER, 2009, p. 9).

Data de 1933 o primeiro transplante de rim de humano para humano, pelo cirurgião soviético Yu Yu Voronoy (1937), porém falhou rapidamente. Após anos de sucessivas tentativas em várias iniciativas pelo mundo, com alguns avanços, mas sem nenhum transplante bem-sucedido, em 1954 Joseph Murray utilizou o rim humano de um gêmeo idêntico ao paciente que iria recebê-lo, o qual venceu a barreira da rejeição (BARKER; MARKMANN, 2013). O sucesso da medicina de transplante, seja de células, tecidos ou órgãos, está intimamente ligado ao estado imunológico entre o enxerto e o hospedeiro. A ciência da imunomodulação e imunossupressão é, portanto, um aspecto crítico nas aplicações de engenharia de tecidos e na medicina regenerativa (MEYER, 2009, p. 9).

No início da década de 1970, W. T. Green produziu experimentos para gerar cartilagem usando uma técnica de cultura de condrócitos (tipo de célula presente no tecido cartilaginoso) semeados em um *scaffold* ósseo, apresentando importantes conceitos teóricos e práticos sobre o uso de células e *scaffolds* (MEYER, 2009).

Em artigo de 1982, Yannas *et al.* descreveram o desenvolvimento de uma membrana polimérica para tratamento de queimaduras de pele. Ela foi produzida em duas camadas: a superior, de silicone, e a inferior, porosa, de colágeno e glicosaminoglicano (GAG, componentes dos tecidos conjuntivos). A camada inferior é semeada com células autólogas do paciente antes de ser aplicada como enxerto na queimadura, apresentando resultado após quatro semanas (**Figura 2.1**).

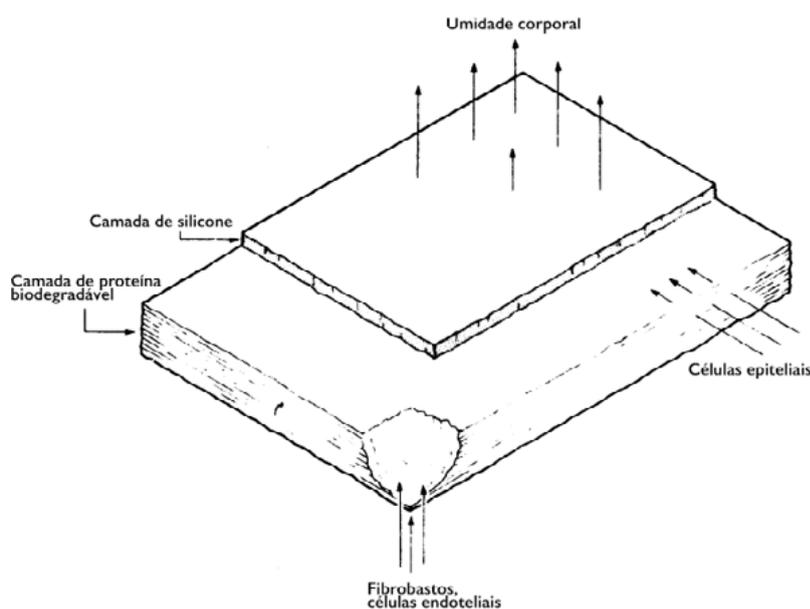


Figura 2.1 – Esquema do enxerto desenvolvido. Fonte: Adaptado de Yannas *et al.* (1982, p. 174).

Um ponto chave para a engenharia de tecidos ocorreu em 1993, na cooperação entre Joseph Vacanti e Robert Langer. No artigo publicado na revista *Science*, intitulado “Tissue Engineering” (1993), eles propuseram um conceito inovador para projetar *scaffolds*, que facilitava a semeadura e a proliferação de células. Em 1995, a Sociedade de engenharia de tecidos foi formada e, em 1996, foi lançada a revista *Tissue Engineering*, mesmo ano do encontro da Sociedade de engenharia de tecidos, nos Estados Unidos (NEREM, 2008).

Em 1997, Cao *et al.* ultrapassaram o ambiente acadêmico e se tornaram notícia mundial com seu artigo e sua foto emblemática do *Vacanti mouse/ear mouse* (**Figura 2.2**). O estudo avaliou a viabilidade da produção de cartilagem em forma de uma orelha humana, utilizando condrócitos semeados em um polímero sintético biodegradável, modelado no formato de uma orelha de uma criança de três anos (**Figura 2.3a**). Após semeadura, o construto foi implantado no dorso subcutâneo de um camundongo. Uma espécie de molde foi anexada na parte externa do dorso do animal por quatro semanas para ajudar na manutenção da forma do construto (**Figura 2.3b**).



Figura 2.2 – O camundongo com construto celular implantado, apelidado pelos cientistas de “Euriculosaurus”. Fonte: <https://www.newsweek.com/tissue-surgeon-ear-mouse-human-organs-transplant-cell-phones-666082>.

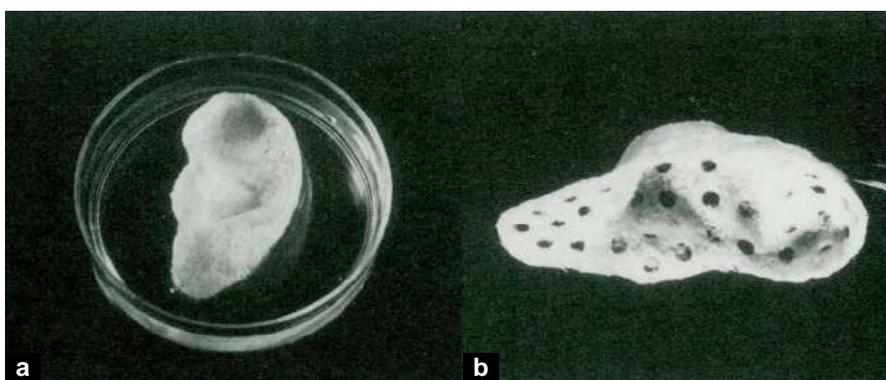


Figura 2.3 – Em (a), o molde polimérico contendo condrócitos semeados. Em (b), o stent externo. Fonte: Adaptado de Cao *et al.* (1997, p. 299).

Após 12 semanas as amostras colhidas e analisadas demonstraram a formação de uma cartilagem com estrutura similar à de uma aurícula infantil (CAO *et al.*, 1997).

A partir da popularidade dessa pesquisa e desse conjunto emblemático de fotografias do camundongo com orelhas em seu dorso, a engenharia de tecidos passou a ser considerada uma das mais promissoras tecnologias da biomedicina do século (MEYER, 2009). Com essa notoriedade, centros de pesquisa especializados e até mesmo empresas começaram a surgir, principalmente na produção de substitutos de pele (NEREM, 2008).

Em uma definição mais recente, a engenharia de tecidos é apresentada como a criação de novos tecidos vivos para a reconstrução terapêutica do corpo humano pela estimulação deliberada e controlada de células-alvo, selecionadas através de uma combinação sistemática de sinais moleculares e mecânicos (WILLIAMS, 2006). A engenharia de tecidos busca novas maneiras para reparar ou substituir tecidos lesados ou mesmo de produzir tecidos específicos para diferentes testes de fármacos ou doenças.

2.1.2.

Células-tronco e cultivo tecidual

Os tecidos engenheirados/cultivados são formados basicamente por três componentes (**Figura 2.4**):

- componente celular (células-tronco ou células diferenciadas);
- matriz extracelular (*Extracellular Matrix* ou *ECM*);
- fatores de crescimento.

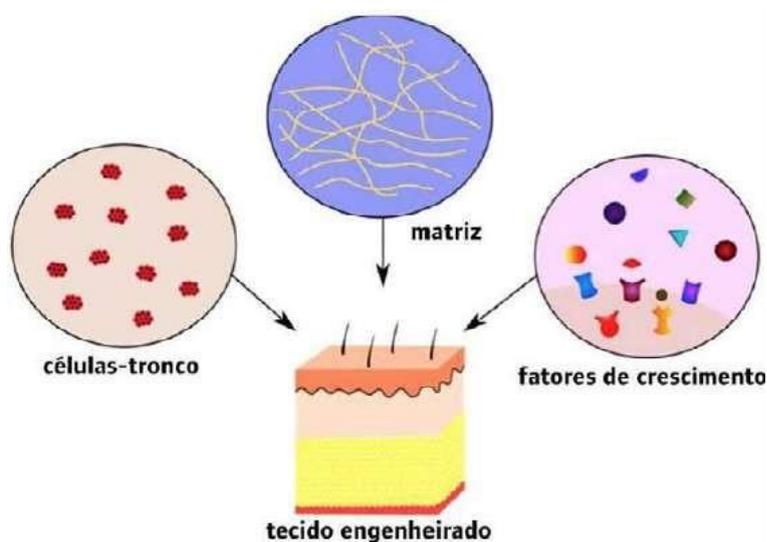


Figura 2.4 – Componentes essenciais para o cultivo de um tecido. Fonte: Levin *et al.* (2019, p. 30).

Células-tronco são uma categoria de células com potencial de diferenciação em células específicas de diferentes tecidos. Possuem capacidade de se autorrenovar, de se proliferar e de se diferenciar em outros tipos celulares, formando diferentes tecidos corpóreos (**Figura 2.5**). As células adultas, já diferenciadas, ainda podem ser utilizadas na engenharia de tecidos, mas as células-tronco permanecem como uma das principais fontes para tal área (LEVIN *et al.*, 2019).

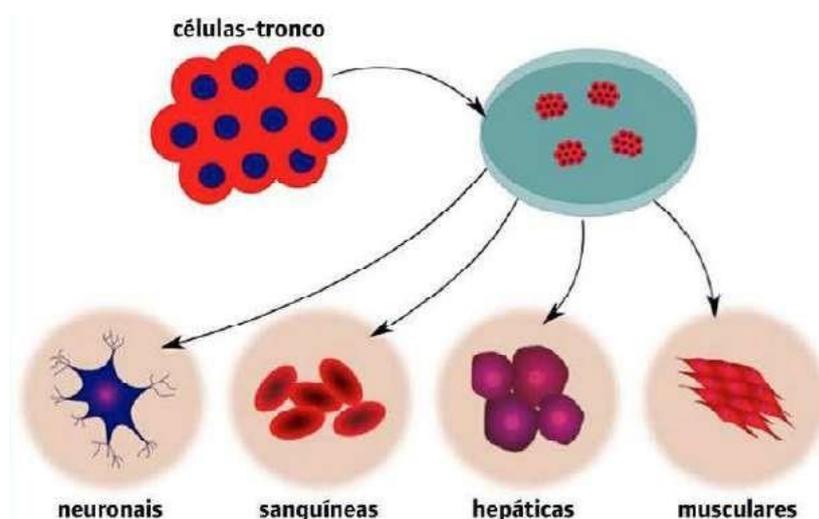


Figura 2.5 – Diferentes tipos de células geradas a partir de uma célula-tronco adulta. Fonte: Levin *et al.* (2019, p. 30).

As células-tronco podem ser pluripotentes, multipotentes ou pluripotentes induzidas (obtidas por cientistas em laboratório em 2007). As células-tronco embrionárias, obtidas do embrião em uma fase de desenvolvimento chamada de blastocisto¹, são pluripotentes, ou seja, podem proliferar indefinidamente *in vitro* sem se diferenciar, ou podem se diferenciar de acordo com condições específicas de cultivo (CARVALHO, 2001). Já as células-tronco adultas são multipotentes, pois não são capazes de se diferenciar em todos os tipos celulares. Atualmente, sabe-se que as células-tronco adultas estão presentes na maioria dos tecidos humanos, como cartilagens, músculos e tecido ósseo, entre outros (**Figura 2.6**).

¹ Cabe destacar aqui que existem questões bioéticas relacionadas às pesquisas com as células-tronco em relação ao *status* do embrião humano, ou seja, a partir de que momento no desenvolvimento ele pode ser considerado moralmente uma pessoa, arbitrado conforme julgamento moral, religioso, biológico ou legal. A dimensão jurídica da utilização dessas células é analisada através das diferentes legislações que regulam a matéria no Brasil e em outros países (MATIAS, 2019, p. 25).

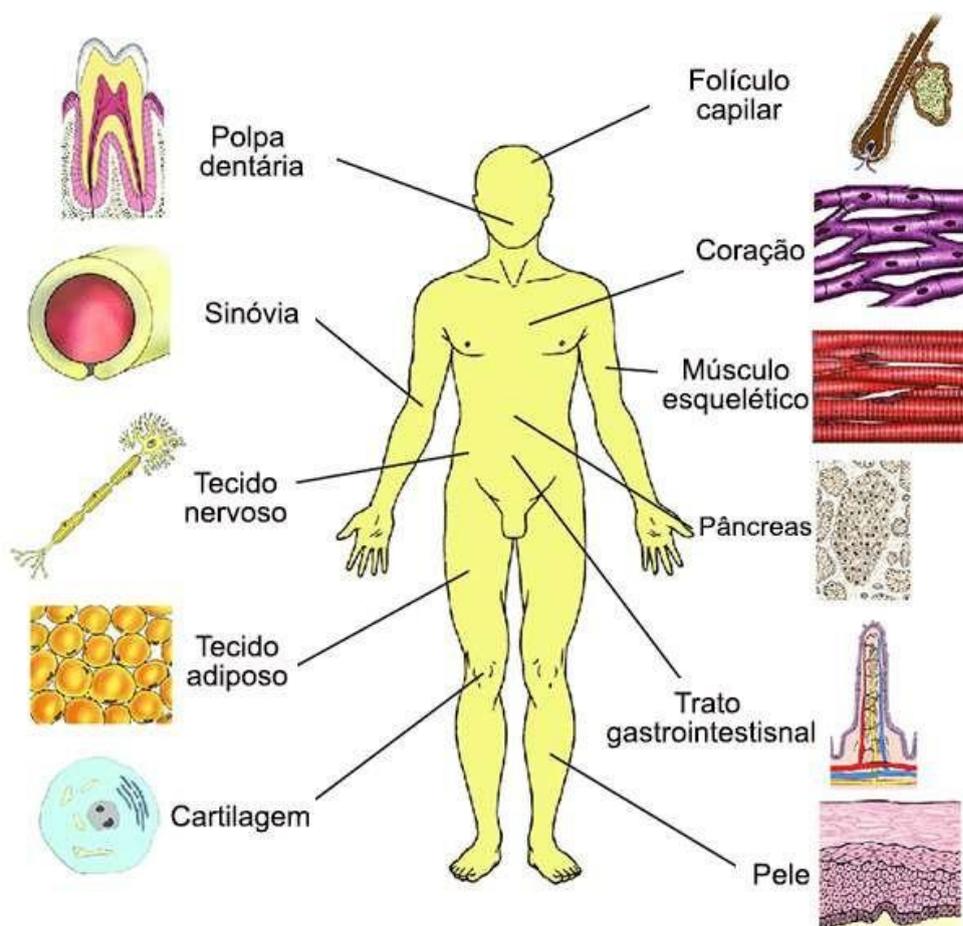


Figura 2.6 – Os diferentes tecidos do corpo com presença de células-tronco adultas. Fonte: Adaptado de Hodgkinson *et al.* (2009, p. 622).

As IPSc (*induced pluripotent stem cells*, células-tronco pluripotentes induzidas) se tornaram um marco na engenharia de tecidos. Desenvolvidas a partir de 2006, elas possuem características de células-tronco embrionárias, contudo são obtidas artificialmente em laboratório. Takahashi *et al.* (2007) utilizaram fatores de transcrição² para reprogramar células epiteliais em células-tronco pluripotentes. Além de reduzir a dependência do uso de células-tronco embrionárias (CTEs), possibilitaram a obtenção de “células embrionárias” de indivíduos específicos (**Figura 2.7**). Essa especificidade é potencialmente útil como modelo para estudos *in vitro* e também com possibilidades de aplicação terapêutica. Entretanto, persistem problemas práticos que limitam seu uso, incluindo suas propriedades inerentes de tumorigenicidade, imunogenicidade e heterogeneidade (YAMANAKA, 2020, p. 1).

² Os fatores de transcrição são proteínas que controlam quando, onde e como os genes serão transcritos, sendo a base para o controle da expressão gênica. Disponível em: <http://coral.ufsm.br/blg220/hide/transcricao3.htm>. Acesso em: 20. jan 2023..

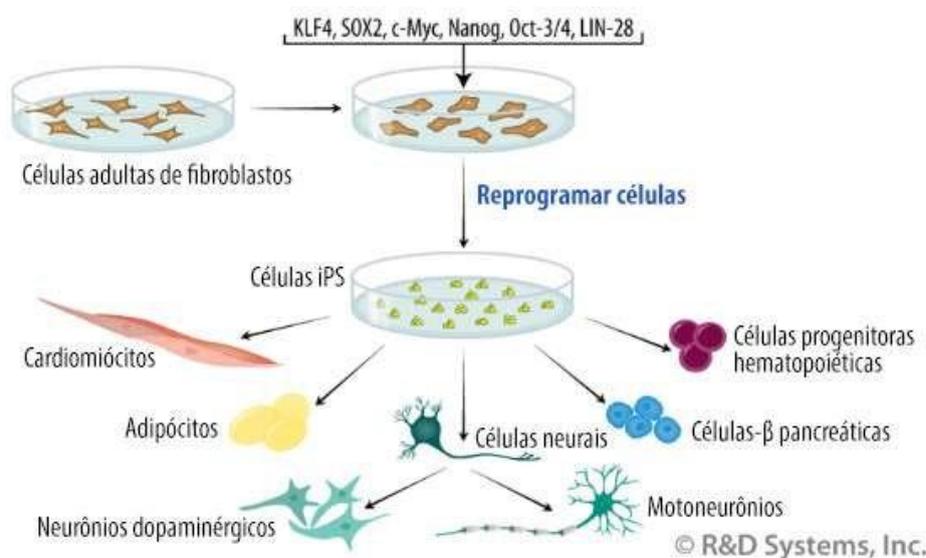


Figura 2.7 – Processo de obtenção de iPSc. Fonte: Adaptado de <https://www.rndsystems.com/resources/articles/differentiation-potential-induced-pluripotent-stem-cells>.

A matriz extracelular é formada por uma rede complexa de proteínas e cadeias de polissacarídeos secretados pelas células, variando de acordo com o tipo de tecido, fornecendo sustentação mecânica para as células e conferir propriedades estruturais específicas a cada tecido. Ela pode estar abundantemente presente no tecido em relação às células (como nos tecidos conjuntivos – ossos e tendões) ou escassa, por vezes formando apenas camadas finas, como as membranas basais de tecidos epiteliais³. Em tecidos engenheirados, os *scaffolds* desempenham idealmente o papel de molde, para que as células, posteriormente, produzam por si só a matriz do tecido desejado.

Os fatores de crescimento são substâncias compostas por moléculas biológicas (como proteínas e hormônios) produzidos por células e contidos na matriz extracelular, regulando e estimulando a proliferação e a diferenciação celular, estimulando o desenvolvimento dos tecidos (BAJPAJ *et al.*, 2017).

2.1.3.

Engenharia de tecidos e Medicina regenerativa

No final da década de 1990, juntamente com a crescente atividade de pesquisas com células-tronco, surgiu o termo *medicina regenerativa* da comunidade da engenharia de tecidos. As fronteiras entre engenharia de tecidos e medicina regenerativa não são rigidamente definidas na literatura em geral e, em muitos casos, elas são mencionadas juntas. No entanto, convencionou-se que a engenharia de tecidos fornece um

³ Disponível em: <https://www.sanarmed.com/matriz-extracelular>. Acesso em: 12. jan 2023.

conjunto de ferramentas que podem ser usadas na medicina regenerativa – porém, esta engloba métodos e estratégias que vão além daquela (BADYLAK *et al.*, 2008, p. 8).

A medicina regenerativa inclui duas estratégias principais. Na primeira abordagem, chamada de *terapia celular*, uma suspensão de células é injetada diretamente no tecido danificado ou na circulação sanguínea do paciente, a fim de substituir células danificadas do tecido, para assim reconstituir sua integridade e função. A segunda abordagem passou a ser denominada *engenharia de tecidos* e, nela, as células são combinadas com uma matriz tridimensional e/ou fatores de crescimento para produzir um construto semelhante ao tecido, geralmente fora do corpo do paciente, substituindo partes perdidas ou danificadas do tecido, ou mesmo órgãos inteiros (**Figura 2.8**).

Um importante diferencial entre as duas abordagens é que a terapia celular, por si só, não é suficiente para regenerar defeitos teciduais críticos, ou mesmo substituir órgãos inteiros. Portanto, a abordagem da engenharia de tecidos se apresenta como estratégia mais promissora (SCHMITT *et al.*, 2012, p. 2).

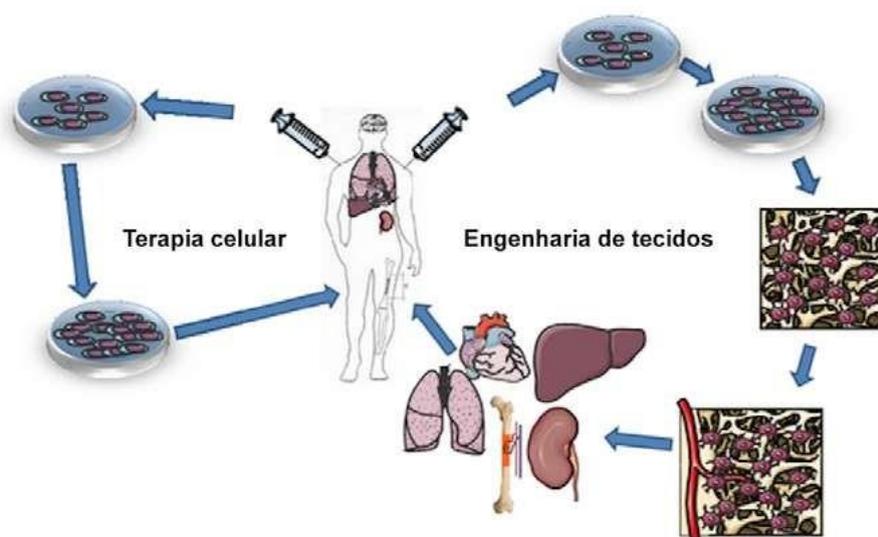


Figura 2.8 – As duas estratégias de aplicação de células-tronco na medicina regenerativa. As células-tronco são isoladas do paciente (autólogas) ou de outros doadores (alogênicas). As células são expandidas *in vitro* e aplicadas diretamente no paciente para substituir as células perdidas (“terapia celular”), ou semeadas em *scaffolds* tridimensionais (“engenharia de tecidos”) e no tipo de célula exigido. O tecido produzido é posteriormente implantado na lesão do paciente. Fonte: Adaptado de Schmitt *et al.* (2012, p. 2).

As células para a produção dos tecidos podem ser adquiridas em bancos de células (empresas certificadas⁴, que possuem rígido controle de qualidade) para

⁴ O BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro) por exemplo, possui certificações do INMETRO, BCNET, BPL e CTNBIO. Disponível em: <https://bcnj.org.br/>. Acesso em: 12. mar 2023..

experimentos ou podem ser autólogas (extraídas do próprio paciente) – nos casos em que o tecido será implantado neles, evitando assim a rejeição do organismo.

Essas células são colocadas em um meio de cultura ou em um arcabouço tridimensional que desempenha a função de matriz extracelular e, quando necessário, são adicionados os fatores de crescimento. Para garantir que elas possuam ambiente e temperatura controlados para um crescimento favorável, o construto celular é cultivado em uma incubadora.

Dentro da incubadora, o uso de um biorreator fornece ao construto celular tridimensional condições otimizadas para o seu crescimento (como a redução da quantidade de meio de cultura usado e o aumento da área de adesão superficial para a célula), transporte bioquímico (como oxigênio e fatores de crescimento) e estímulos mecânicos (como tensão/compressão e tensão de cisalhamento), quando necessário, mimetizando condições que o tecido cultivado teria *in vivo* (**Figura 2.9**). As condições de um biorreator afetam a viabilidade e a proliferação celular, o conteúdo e a arquitetura da matriz extracelular dos tecidos. Os primeiros biorreatores apenas bombeavam o meio de cultura com nutrientes para os tecidos. Posteriormente, evoluíram para propiciar o crescimento de válvulas, vasos sanguíneos e cartilagens (RABKIN, 2022).

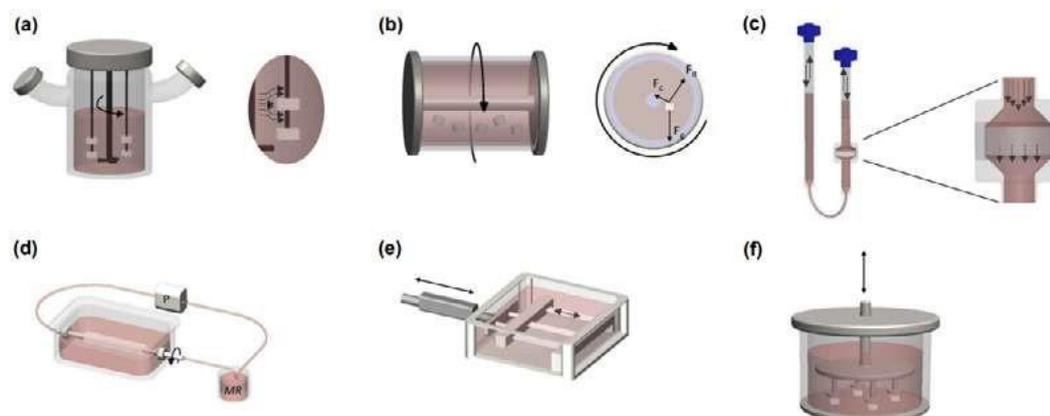


Figura 2.9 – Exemplos de biorreatores para aplicações de engenharia de tecidos. (a) Em biorreatores de balão giratório, a suspensão de células/meio de cultura é misturada em torno dos *scaffolds* suspensos. (b) A velocidade de rotação em biorreatores de vasos de parede rotativa permite que o construto permaneça em estado de queda livre através do meio de cultura. (c) Os biorreatores de perfusão exploram o fluxo direto do meio através dos poros do *scaffold* 3D. (d–f) Biorreatores especializados foram desenvolvidos para aplicar condições mecânicas específicas em construtos de diferentes aplicações, como (d) deformação radial induzida por fluxo luminal pulsátil (P=bomba, MR=reservatório de meio de cultura), (e) alongamento cíclico e (f) compressão dinâmica. Esquemas gerados por C. Turrisi. Fonte: Adaptado de Asnaghi *et al.* (2014, p. 394).

Além da aplicação do tecido cultivado para uso em pacientes, a engenharia de tecidos pode ter aplicações de diagnóstico, em que tecido é desenvolvido

in vitro e usado para testar a absorção e os efeitos metabólicos de fármacos, além da toxicidade e patogenicidade deles (**Figura 2.10**) (MEYER, 2009).



Figura 2.10 – Placa de 12 poços contendo tecidos bioimpressos em 3D para teste de fármacos. Fonte: <https://ncats.nih.gov/pubs/features/3d-bioprinting>.

Em geral, os tecidos gerados e utilizados na engenharia de tecidos são relativamente finos, avasculares ou com pouca vascularização, essencialmente não innervados e cujas funções são determinadas em especial pelas propriedades biomecânicas de sua matriz extracelular. O foco principal da engenharia de tecidos tem ocorrido na pesquisa básica, utilizando células e pequenos animais em detrimento a abordagens clínicas com animais de grande porte – mais custosas e escassas (IKADA, 2006). O desenvolvimento de novas abordagens e a evolução de novas técnicas, como as listadas a seguir, trouxeram potenciais avanços para a área.

2.1.4.

Organ-on-a-chip

Os *organ-on-a-chips* (OoCs) são dispositivos microfluídicos que, a partir de microcanais e câmaras em escala micrométrica, permitem a cultura de células em um microambiente que replica as funções-chaves de órgãos e fornecem modelos precisos para simular interações célula-célula e célula-matriz (**Figura 2.11**). Combinando avanços na engenharia de tecidos e em microfabricação, os OoCs ganharam interesse como uma plataforma experimental de última geração para investigar a fisiopatologia humana e o efeito de medicamentos e de terapias no organismo (LEUNG *et al.*, 2022).

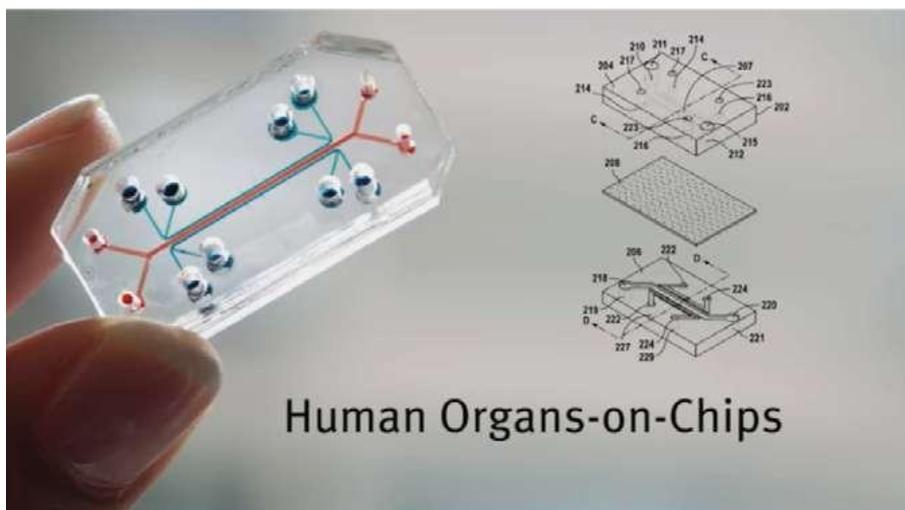


Figura 2.11 – Exemplo de um *organ-on-a-chip* com diferentes microcanais. Fonte: <https://youtu.be/0jf6Tor9WtA>.

Esses dispositivos são selados, estéreis e produzidos em material biocompatível e translúcido, permitindo assim o monitoramento e a análise visual e em tempo real das células. A microcâmara é conectada a vários microcanais podendo fornecer nutrientes, bactérias, vírus ou produtos químicos. Também podem ser empregados estímulos mecânicos e elétricos nas células, que podem ser utilizados para o desenvolvimento de medicamentos, a modelagem de doenças e a medicina personalizada. Em sistemas mais sofisticados, diferentes chips podem se conectar, formando sistemas fechados, como um *body-on-a-chip* (SUNG *et al.*, 2018, p. 1) (**Figura 2.12**).



Figura 2.12 – Diferentes chips ligados, formando um sistema fechado. Fonte: <https://newatlas.com/body-on-chip-lab-grown-micro-organs/51648/>.

2.1.5. Descelularização de órgãos

Apesar de ainda estar em fase inicial de pesquisas, a descelularização de órgãos e tecidos proporciona grande possibilidade de uso em terapias e estudos científicos. Ela pode ser utilizada em amostras humanas – de um cadáver ou de transplante rejeitado – ou de um animal doador com tamanho e anatomia compatíveis, como o suíno. A técnica de descelularização é um processo que consiste na remoção das células de um tecido ou órgão por métodos físicos, químicos ou enzimáticos, deixando a estrutura composta de matriz extracelular (*ECM*) intacta (**Figura 2.13**). Essa estrutura “oca” pode então ser usada como base para o repovoamento e o cultivo de células, minimizando o risco de rejeição (RODRIGUES *et al.*, 2018). A descelularização tem sido amplamente utilizada na engenharia de tecidos para produzir modelos tridimensionais de tecidos e órgãos para estudos biológicos e aplicações terapêuticas.

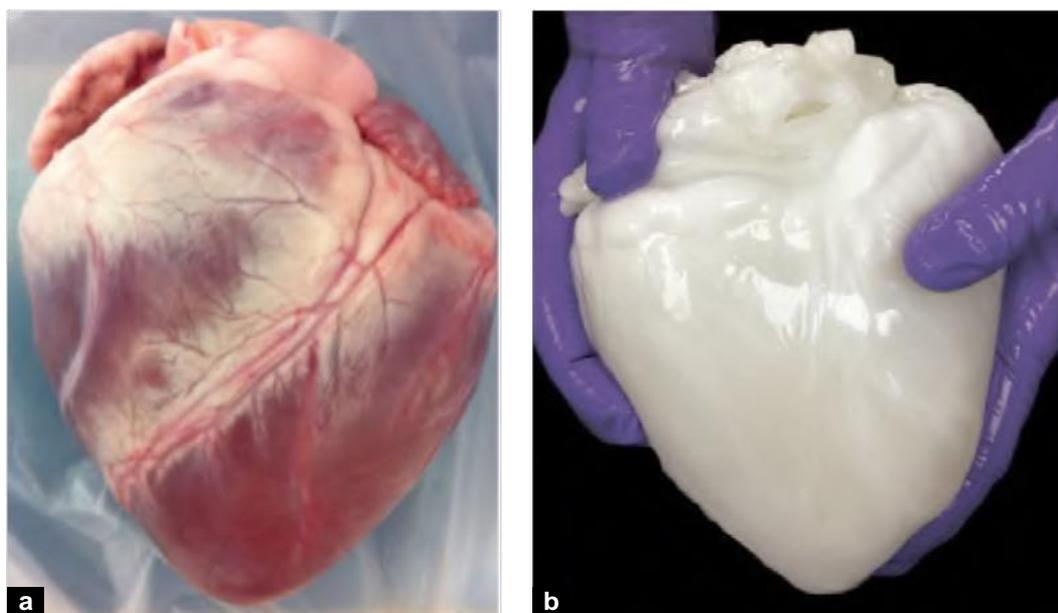


Figura 2.13 – Um coração suíno antes e depois do processo de descelularização. A coloração branca indica que, após a lavagem, apenas o colágeno e outras substâncias de tecido conjuntivo permaneceram, preservando a arquitetura anatômica original do órgão e sua vascularização. Fonte: http://www.cardio-research.com/_rsrc/1479814136114/cardiac-extracellular-space/.

2.1.6.

Xeno-órgãos geneticamente modificados

Em outra linha de atuação, em janeiro de 2022 ocorreu o primeiro xeno-transplante de coração de um suíno para um humano, na Escola de Medicina da Universidade de Maryland, nos Estados Unidos. O receptor do órgão foi um homem de 57 anos, em estágio terminal de uma doença cardíaca e que não era elegível para um transplante convencional. O coração de porco – fornecido pela empresa de medicina regenerativa Revivicor – passou por dez modificações genéticas: três genes relacionados à rejeição imunológica foram removidos e foram inseridos seis genes humanos e um gene para controlar o crescimento do tamanho do coração (WANG *et al.*, 2022).

Após dois meses do transplante, o paciente faleceu. Uma das possíveis causas apontadas foi a infecção por um vírus suíno, demonstrando falha na triagem de tal agente antes do transplante. No entanto, os porcos ainda são considerados uma potencial fonte ideal para xenotransplantes, por terem órgãos em tamanho e forma similares aos humanos e por serem menos propensos a transmitir patógenos que os primatas, por exemplo.

2.2.

Biomateriais

Como mencionado na Introdução, proponho a seguinte definição de biomateriais, a partir das propostas de Bajpai *et al.* (2016), Helmus; Tweden (1995) e Ratner (2004): materiais sintéticos ou naturais que podem ser utilizados em contato (contínuo ou intermitente) com sistemas biológicos, de maneira biocompatível, a fim de restaurar, aperfeiçoar ou substituir a função de um tecido corporal, ou órgão de tal sistema. Eles podem ser metálicos, cerâmicos ou poliméricos, utilizados geralmente para aplicações em contato com o corpo/tecido biológico (externa e internamente), a fim de reparar, substituir ou estimular o crescimento de tecidos vivos. Para atender tais aplicações, eles devem possuir os seguintes requisitos mínimos, de acordo com Bajpai *et al.* (2016, p. 40):

- ser biocompatíveis, não tóxicos e não carcinogênicos, causar pouca ou nenhuma ativação do sistema imunológico;
- ser quimicamente estáveis e resistentes à corrosão;
- ser capazes de suportar tensões grandes e variáveis no ambiente altamente corrosivo que é o corpo humano;
- ser passíveis de fabricação em diferentes formas e tamanhos.

2.2.1. Histórico

A interação de materiais não biológicos no corpo humano pode ser identificada desde a pré-história: os restos mortais do “Homem de Kennewick”, de cerca de 9 mil anos atrás, apresentavam um pedaço de ponta de lança cravado em seu quadril (Figura 2.14a). Por estar aparentemente curado e, portanto, ter passado a tolerar tal peça em seu organismo, o objeto pode ser considerado, segundo Ratner (2004), um implante involuntário.

Além desse caso, existem evidências do uso de fios para sutura de feridas aplicados em restos mortais, com mais de 30 mil anos (SCOTT, 1983), conforme encontradas nas civilizações egípcia – utilizando o linho como material – e grega – utilizando fios metálicos (RATNER, 2004). Já sob o viés da biomimética, em 1881, o cientista Étienne-Jules Marey descreveu o projeto de um coração artificial (Figura 2.14b).



Figura 2.14 – Em (a), o osso do quadril do “Homem de Kennewick”, com o pedaço de ponta de lança cravado e cicatrizado. Em (b), o esquema do coração artificial, por Étienne-Jules Marey. Fontes: (a) http://www.tribaltribune.com/news/article_aa38c0c2-f66f-11e6-9b50-7bb1418f3d3d.html. (b) Adaptado de Ratner (2004, p. 10).

A investigação e o desenvolvimento dos biomateriais ocorreram de maneira conjunta com avanços na biologia celular e molecular, na ciência e na engenharia de materiais, além da compreensão cada vez maior das interações entre os materiais e o organismo vivo (RATNER, p. 709). O desenvolvimento de biomateriais para cirurgias e implantes evoluiu através de três estágios, sobrepostos ao longo do tempo (Figura 2.15) (HENCH; POLLAK, 2002).

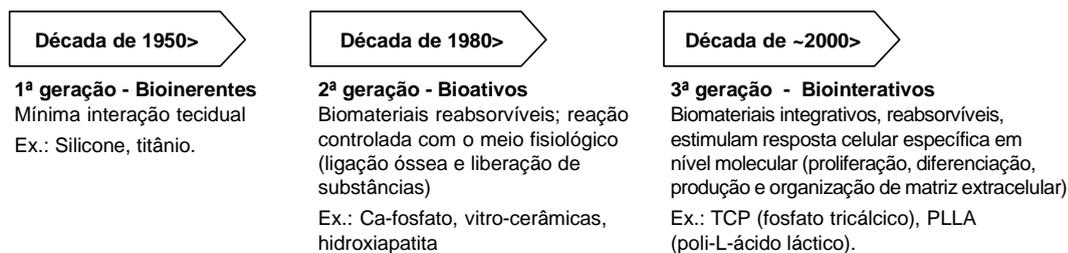


Figura 2.15 – Esquema com as 3 gerações de biomateriais: inertes (com mínima interação tecidual), bioativos (capazes de provocar uma reação controlada nos tecidos) e biointerativos (capazes de promover a regeneração dos tecidos). Fonte: Adaptado de Rabkin; Schoen (2002, p. 307).

O objetivo do desenvolvimento inicial de biomateriais e de seu uso em uma ampla variedade de aplicações era alcançar uma combinação adequada de propriedades funcionais que correspondesse adequadamente às do tecido substituído, sem resposta danosa por parte do hospedeiro.

A primeira geração de biomateriais (a partir da década de 1950) fazia uso de materiais industriais, que não foram desenvolvidos especificamente para o uso médico pretendido e que eram amplamente disponíveis, porém eram *bioinertes* (provocavam resposta mínima no organismo hospedeiro). Suas escolhas ocorreram pela combinação de propriedades físicas específicas para o uso clínico. Polímeros, como o poliuretano e o silicone exemplificam alguns dos primeiros biomateriais, cuja formulação foi estudada e modificada de acordo com princípios de engenharia e de biologia, voltados para aplicação médica (HENCH; POLLAK, 2002). Exemplo de aplicação dessa geração de materiais são os implantes mamários de silicone (**Figura 2.16**) e o primeiro coração artificial em poliuretano utilizado em um implante (**Figura 2.17**).

Enquanto os polímeros sintéticos possuíam boa resistência mecânica e forma e degradação ajustáveis, sua compatibilidade celular era pobre. Já os polímeros de origem natural possuíam a vantagem do reconhecimento biológico por parte das células, auxiliando na adesão e no desempenho das funções celulares. Porém, em geral, as propriedades mecânicas dos polímeros naturais eram inferiores e eles tinham oferta limitada, o que os tornava insumos dispendiosos (BAJPAJ *et al.*, 2016, p. 149).



Figura 2.16 – Exemplo de implante de silicone de primeira geração, produzido pela empresa Dow Corning, de 1964 a 1968. Fonte: <https://www.drlicksman.com/breast-surgery/evolution-implants/>.

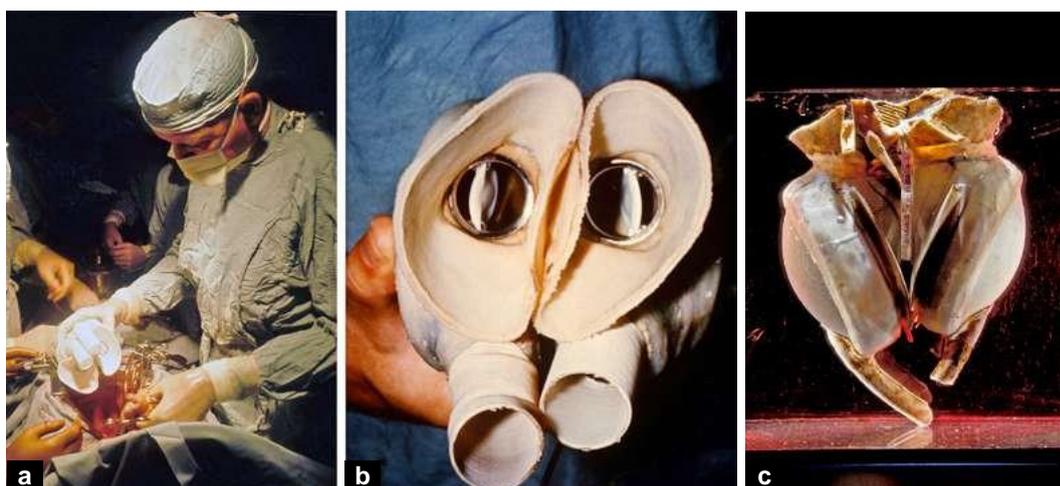


Figura 2.17 – Em 1969, foi implantado em um humano o primeiro coração artificial completo produzido em poliuretano, desenvolvido por Denton Cooley e Domingo Liotta (RATNER, 2004). Em (a), o Dr. Denton Cooley durante a cirurgia de implante do coração artificial, em (b), destaque para as válvulas sintéticas e em (c), a vista frontal dele. Fontes: (a, b) [https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223\(17\)30174-5/fulltext](https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223(17)30174-5/fulltext). (c) https://americanhistory.si.edu/collections/search/object/nmah_688682.

Biomateriais de segunda geração já eram denominados *bioativos*, ou seja, buscavam provocar reações controladas nos tecidos em que eram implantados, a fim de induzir vantagens terapêuticas nos organismos hospedeiros. Na década de 1980, estavam presentes em cirurgias ortopédicas e odontológicas (biovidros e biocerâmicas) e em contraceptivos de liberação controlada (RATNER, p. 709). Um exemplo é a Zircônia, uma biocerâmica capaz de se biointegrar ao tecido ósseo quando ocorre uma degradação química no biomaterial, gerando a formação de

tecido no entorno do implante e eliminando espaços. Na osseointegração, o que ocorre é a ancoragem do implante em uma interface direta e sem comprometimento de suas funções (**Figura 2.18**) (YAZDANI *et al.*, 2018).

A segunda geração também incluiu o desenvolvimento de *biomateriais reabsorvíveis* pelo organismo, com taxas variáveis de degradação, de acordo com a aplicação desejada. Dessa maneira, o próprio tecido do hospedeiro vai se regenerando e ocupando o espaço deixado pelo implante, progressivamente, acabando por substituí-lo. Um exemplo, em uso clínico desde 1974, é a sutura biodegradável ou absorvível, composta de poli (ácido glicólico) – PGA.



Figura 2.18 – Diferença entre osseointegração e biointegração. Fonte: Adaptado de Yazdani *et al.* (2018, p. 554).

Os biomateriais de terceira geração passaram a ser desenvolvidos no nível molecular, pensados sob medida para aplicações específicas, destinando-se a estimular reações altamente precisas (HENCH; POLLAK, 2002). Ideias vindas da biologia e da ciência dos materiais passaram a ser mais exploradas. Os *biomateriais inteligentes* (*smart biomaterials*) começaram a ser desenvolvidos para produzirem respostas específicas a diferentes estímulos, como incidência de luz, mudança de pH ou temperatura, estresse mecânico ou estímulo molecular (**Figura 2.19**). Seu desenvolvimento contempla novas arquiteturas, bem como maior controle sobre massa molar (*MW*, de *molecular weight*) e distribuição de massa molar (*MWD*, de *molecular weight distribution*) (BAJPAI, 2016).



Figura 2.19 – Exemplos de respostas de polímeros inteligentes a estímulos externos. Fonte: Adaptado de Ratner (2004, p. 107).

2.2.2.

Estado da arte

Enquanto o campo estabelecia seus princípios e ideias fundamentais, ainda na década de 1960, conceitos relacionados às células e suas funções – como fatores de crescimento e expressão celular – eram observações controversas ou simplesmente ainda não descobertas (RATNER, 2004, p. 18). Com o estabelecimento e o avanço da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa, tornou-se imperativo o desenvolvimento de materiais específicos para aplicações nessa área.

As características programáveis desses materiais possibilitam aplicações importantes para a engenharia de tecidos, como dispositivos implantados para liberação de substâncias terapêuticas e desenvolvimento *scaffolds*⁵ (arcabouços) para cultivo de células (BAJPAI *et al.*, p. 12).

Sistemas de liberação de fármacos (*drug delivery systems*) são produzidos com biomateriais personalizados, carregados com medicamentos específicos e programados para se dissolverem em quantidade e tempo pré-determinados. Com o uso desses dispositivos, os tratamentos se tornam mais individualizados e com o fornecimento contínuo de dosagem quando necessário (TIWARI *et al.*, 2012, p. 2) (**Figura 2.20**).

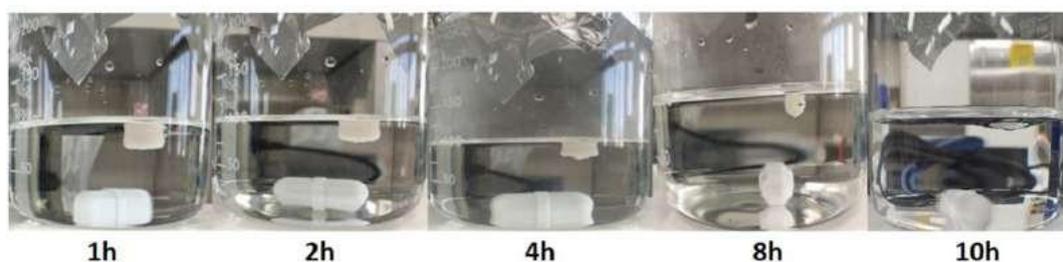


Figura 2.20 – Estudo para comprimido oral de ação no estômago, a partir de biomaterial produzido com teofilina associada à hidroxipropilcelulose. A sequência mostra o processo de diluição do sistema ao longo de 10 horas. Fonte: Giri *et al.* (2020, p. 9).

⁵ Nesta tese será utilizado o termo em inglês, como ocorre em diversos artigos e eventos nacionais.

Os *scaffolds* são estruturas artificiais e temporárias, usadas para fornecer um microambiente 3D viável para que células possam proliferar, se diferenciar e gerar o tecido desejado (**Figura 2.21**). Eles devem ser capazes de suportar a formação de tecidos tridimensionais, permitindo a fixação e a migração de células, a circulação de fatores bioquímicos e de nutrientes. Para atingir tais objetivos, os biomateriais para um *scaffold* devem atender a alguns requisitos específicos (BAJPAI *et al.*, p. 128):

- possuir biocompatibilidade e toxicidade aceitáveis e capacidade de viabilizar o desenvolvimento e a proliferação celular;
- possuir propriedades mecânicas correspondentes às do tecido a ser cultivado ou suficientes para proteger as células de danos de compressão ou de tração apropriados sem afetá-las;
- possibilitar a construção em formas complexas que possuam porosidade adequada (a alta porosidade e um diâmetro de poro otimizado são necessários para facilitar a fixação de células e a difusão de nutrientes na estrutura);
- serem biodegradáveis, absorvidos pelo próprio tecido cultivado ao longo do tempo, eliminando assim a necessidade de remoção cirúrgica;
- mimetizar a matriz extracelular nativa do tecido a ser cultivado.



Figura 2.21 – Exemplo de *scaffold* bioimpresso em 3D com células do tecido cartilaginoso a ser posteriormente implantado em um coelho. Fonte: <https://timesofindia.indiatimes.com/home/science/chennai-doctors-scientists-grow-ear-in-lab/articleshow/62805995.cms>.

Atualmente, existem empresas especializadas em insumos laboratoriais específicos, disponibilizando inclusive biomateriais personalizados para o tipo de célula ou o tipo de tecido a ser trabalhado (**Figura 2.22**).

The screenshot shows the Sigma-Aldrich website interface. At the top, there is a search bar with the text "Insira o nome do produto, número da remessa, número do lote etc." and a search icon. Below the search bar, the product "TissueFab® bioink" is displayed. The product is identified by the SKU "906913" and the brand "Sigma-Aldrich". The product name "TissueFab® bioink" is prominently displayed, followed by a star rating of five stars and "(0)" reviews. The product description includes "Alg(Gel)ma -Vis/525 nm" and a list of synonyms: "GelMA-Alginate bioink, Gelatin methacrylate, Gelatin methacryloyl, Bioink, Alginate, Sodium alginate, Gelatin methacrylamide". A table below the product details shows the following information:

Documentos	SKU	Tamanho da embalagem	Disponibilidade	Preço	Quantidade
SDS COO/COA Folha de especificação	906913-1EA	1 EA	✔ Previsão de entrega em 25 de julho de 2022	R\$ 3.274,00	<input type="text" value="1"/> <input type="button" value="-"/> <input type="button" value="+"/>

Figura 2.22 – Exemplo de site que comercializa biomaterial com viabilidade celular para produção de *scaffolds*. Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/906913/>.

2.3.

Bioimpressão 3D

No passado, a compreensão da formação, das funções e das patologias de tecidos e órgãos dependia predominantemente da cultura 2D de células. Entretanto, por sua falta de complexidade, o ambiente 2D não consegue reproduzir fielmente as condições equivalentes àquelas as quais as células e tecidos são submetidos *in situ*, em sua morfologia e nas interações célula-célula e célula-matriz (CHO *et al.*, 2019).

Modelos animais foram empregados como alternativa para essa carência, por sua semelhança quanto à morfologia e às interações celulares e teciduais e por estarem presentes “em estoque volumoso” para uso em testes fármacos em ambiente pré-clínico. Apesar de os testes em cobaias animais oferecerem resultados plausíveis, ainda ocorriam discrepâncias: cerca de 50% dos medicamentos que passavam nos testes pré-clínicos se mostravam tóxicos para os seres humanos (CHO *et al.*, 2019). Houve um desejo cada vez maior de eliminar gradualmente o uso de cobaias animais, devido aos altos custos, à má tradução dos testes para aplicações clínicas, às preocupações éticas (BEGLEY, 2012) e à pressão da sociedade.

Modelos de tecido 3D *in vitro* fornecem uma excelente alternativa para culturas de células 2D tradicionais e testes em animais (CHO *et al.*, 2019). Nas abordagens tradicionais de fabricação 3D, os biomateriais são pipetados em placas de

poços como gotículas ou inseridos em moldes, resultando em arquiteturas internas desorganizadas (CROOK, 2020).

É nesse contexto que a bioimpressão 3D se apresenta como solução: ela oferece a possibilidade de construção de tecidos 3D ou modelos de órgãos complexos, de forma replicável e automatizada, por meio da deposição espacial de várias células e biomateriais em diferentes arquiteturas e formatos (**Figura 2.23**).

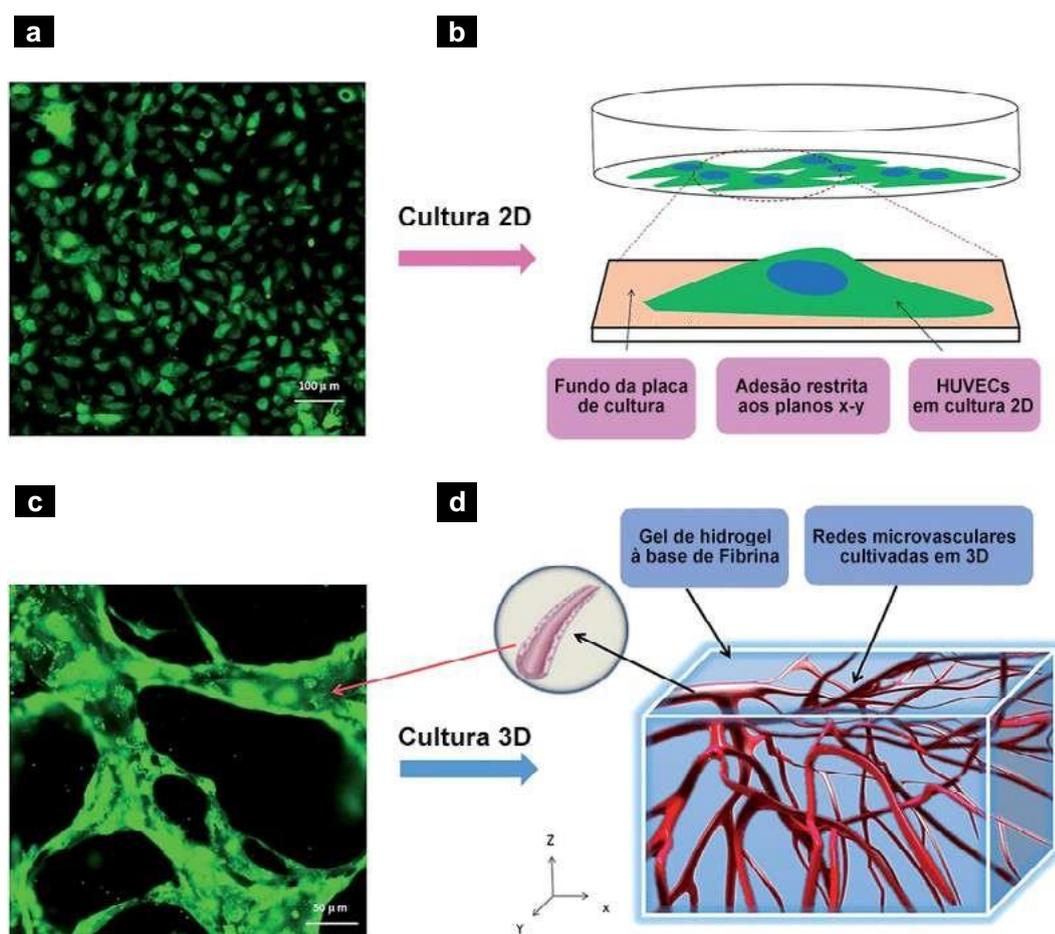


Figura 2.23 – Culturas 2D versus 3D de células. Em (a), imagem de microscopia confocal de HUVECs⁶ cultivadas em 2D. Em (b), diagrama esquemático da cultura 2D: HUVECs anexadas ao fundo da placa de petri. Em (c), imagem de microscopia confocal da rede microvascular 3D. Em (d), diagrama esquemático da cultura de HUVECs 3D: microvasos gerados em *scaffold* à base de fibrina. Fonte: Adaptado de Li *et al.* (2017, p. 56110).

A bioimpressão 3D pode ser definida como um processo de transferência auxiliado por computador para deposição simultânea de células vivas e biomateriais, com uma organização prescrita, predominantemente de sobreposição camada por

⁶ Do inglês *human umbilical vein endothelial cells*, células endoteliais de veia umbilical humana.

camada⁷ para a fabricação de construtos para engenharia de tecidos, Medicina regenerativa ou outros estudos (MIRONOV *et al.*, 2009; OZBOLAT, 2015). As principais vantagens da tecnologia de bioimpressão 3D incluem (CHUA *et al.*, 2015, p. 12):

- produção replicável e em escala de produtos derivados da engenharia de tecidos;
- precisão no posicionamento tridimensional de diferentes tipos de células simultaneamente;
- possibilidade de tecidos com alto nível de densidade celular serem bioimpressos e cultivados;
- possibilidade de construtos celulares com espessuras maiores serem vascularizados;
- impressão/dispersão de células *in situ*.

Segundo Mironov *et al.* (2006), o processo de bioimpressão 3D pode ser dividido em três etapas principais: pré-processamento, processamento (impressão real) e pós-processamento (**Figura 2.24**).

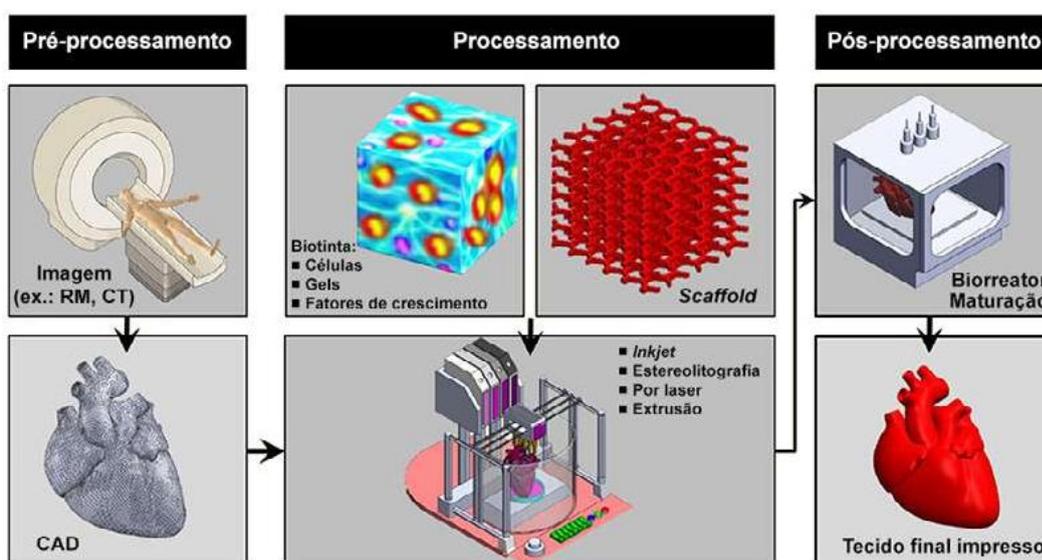


Figura 2.24 – Esquema das etapas principais de bioimpressão 3D. Fonte: Adaptado de Ramadan *et al.* (2021, p. 3).

No *pré-processamento*, é gerado um modelo virtual 3D do tecido ou órgão a ser impresso. A partir das tecnologias CAD e do uso de imagens de exames labora-

⁷ Existem outras formas de bioimpressão 3D, como a deposição segmento-a-segmento e de eixos X, Y, e Z simultâneos.

toriais como tomografias, ressonâncias magnéticas ou PETscan, tornou-se possível desenvolver modelos tridimensionais com precisão micrométrica (que equivale à milésima parte do milímetro) dos construtos a serem impressos (**Figura 2.25**).

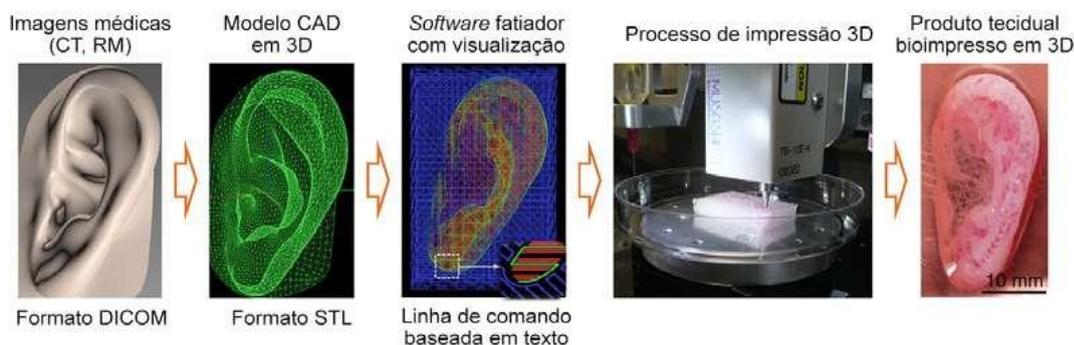


Figura 2.25 – Exemplo de processo de bioimpressão 3D a partir de imagem em formato DICOM. Fonte: Adaptado de Kang *et al.* (2016, p. 313).

No *processamento* ocorre a deposição da biotinta pela bioimpressora 3D, que possui uma série de características e particularidades – que serão detalhadas nos capítulos dos experimentos práticos. O sistema de bioimpressão 3D consiste em três componentes principais (OZBOLAT, 2015, p. 4):

- *hardware*;
- *software*;
- meio de transferência das células/biotinta.

O *hardware*, ou equipamento, possui normalmente três eixos – X, Y e Z (em bioimpressoras a laser, possui apenas o eixo Z), além do controle de extrusão. É controlado pelo *software* chamado de fatiador (*slicer*), que controla os movimentos e velocidade nos três eixos, além do fluxo de extrusão do material. O *meio de transferência* equivale ao filamento das impressoras 3D modelo FDM⁸, pois é nele que estarão as células ressuspensas na biotinta a ser impressa. Geralmente é utilizado dentro de uma seringa com agulha, facilitando, assim, sua preparação fora do sistema.

No *pós-processamento*, logo após ser impresso, o construto deve passar pelo processo de proliferação celular, remodelação e maturação do tecido em um biorreator específico (**Figura 2.26**). Entretanto, o construto pode ser implantado diretamente em um corpo vivo, caso o objetivo final seja a regeneração de um tecido doente ou danificado – nesse caso, o corpo vivo pode ser considerado como um biorreator, onde ocorre a supracitada remodelação e geração de tecidos (OZBOLAT, 2015, p. 4).

⁸ *Fused Deposition Modeling*, modelagem por fusão e deposição.



Figura 2.26 – Maturação de vasos bioimpressos compostos por células do músculo liso da aorta suína (esquerda) em um biorreator de perfusão (direita). Fonte: Norotte *et al.* (2009, p. 5915).

Alguns autores adotam mais etapas no processo de bioimpressão 3D, como Loai *et al.* (2019) (**Figura 2.27**) e Murphy; Atala (2014) (**Figura 2.28**). Porém, em ambos os casos, as três etapas principais se mantêm, sendo desmembradas em mais etapas no pré ou pós-processamento.

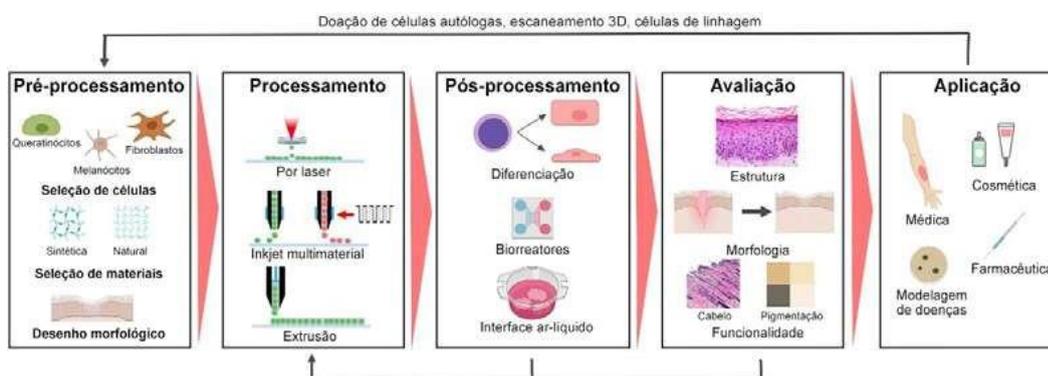


Figura 2.27 – Esquema das etapas de bioimpressão de pele: No *pré-processamento* as células escolhidas para a aplicação são cultivadas *in vitro* para atingir o volume necessário. Os polímeros para a formulação da biotinta são escolhidos de acordo com a aplicação desejada. O modelo 3D da pele impressa é desenvolvido. No *processamento*, usando uma das abordagens de impressão disponíveis, o construto celular é bioimpresso. No *pós-processamento* pode ser necessário alguma etapa adicional antes que a pele esteja pronta para uso, como diferenciação de células-tronco, crescimento em um biorreator ou maturação de células em uma interface ar-líquido. Na *avaliação* o construto é avaliado antes da aplicação: análise de estrutura, morfologia e função. Para algumas aplicações, iterações dessas três etapas podem ser necessárias – processamento, pós-processamento e avaliação. Na *aplicação* o construto é usado em sua aplicação pretendida, como tratamento de feridas, produção de modelo de doenças *in vitro*, testes cosméticos e testes farmacêuticos. Fonte: Adaptado de Loai *et al.* (2019, p. 7).

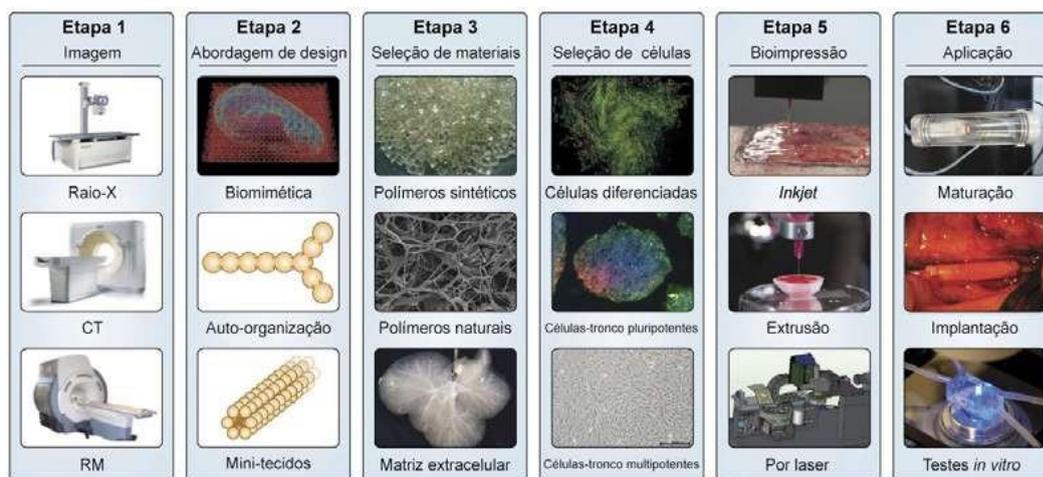


Figura 2.28 – Esquema de bioimpressão com 6 etapas, dando maior ênfase no *pré-processamento*. A 1ª etapa é a obtenção do arquivo de imagem de um exame. Na 2ª etapa, a partir do modelo gerado pela imagem, é desenvolvido um modelo 3D e definida a estratégia para a produção do construto. Nas etapas 3 e 4, os materiais e os tipos celulares para a biotinta são selecionados. A etapa 5 é o processamento em si e, na etapa 6, ocorre o pós-processamento e a posterior aplicação. Fonte: Adaptado de Murphy; Atala (2014, p. 774).

2.3.1.

Histórico

A bioimpressão foi demonstrada pela primeira vez por Klebe, em 1988, como tecnologia de cito-escrita (*cyto-scribing*), um método de microposicionamento de produtos biológicos, incluindo colágeno e fibronectina, realizado com uma impressora jato de tinta Hewlett Packard (HP) adaptada (**Figura 2.29**).



Figura 2.29 – Em (a) cartucho de tinta adaptado para receber a biotinta. Em (b) impressão da palavra “fibronectin” com biotinta e em (c) visão de microscópio mostrando as células na impressão. Fonte: Adaptado de Klebe (1988, p. 365-366).

Em 1996, Forgacs e colaboradores chegaram à conclusão de que a tensão superficial aparente do tecido era a manifestação macroscópica da adesão molecular entre as células, fornecendo, assim, uma medida quantitativa para a coesão dos tecidos (HE *et al.*, 2022).

Em 1999, Odde e Renn utilizaram um processo de bioimpressão a laser, demonstrando que células podiam ser posicionadas em padrões tridimensionais, possibilitando o desenvolvimento de tecidos com anatomias complexas (OZBOLAT *et al.*, 2017).

Em 2002, a primeira tecnologia de bioimpressão baseada em extrusão foi relatada por Landers *et al.*, que mais tarde foi comercializada sob o nome “3D-Bioplotter” (HE *et al.*, 2022) pela Envision-Tec, fabricante de impressoras 3D tradicionais (THAYER *et al.*, 2020).

Em 2003, o grupo de trabalho de Thomas Boland, na Universidade de Clemson, desenvolveu uma bioimpressora baseada em uma impressora a jato de tinta HP, em que as células foram bioimpressas e padronizadas com sucesso (OZBOLAT *et al.*, 2017). Esse sistema conseguiu padronizar a biotinta – já formada por células, meio de cultura e fatores de crescimento. Melhorias adicionais no sistema e na composição da biotinta permitiram a deposição de células dentro de hidrogéis biológicos mais viscosos, possibilitando, assim, a fabricação de estruturas tridimensionais. No ano seguinte, o mesmo grupo implementou a bioimpressão de células com uma impressora SLA (HE *et al.*, 2022).

A primeira empresa de bioimpressão 3D, Organovo, fundada em 2007, buscava desenvolver e comercializar modelos de tecidos para testes de medicamentos e modelos de doenças. Ainda em 2007, a RegenHu foi fundada na Suíça, com foco em sistemas de bioimpressão 3D por extrusão. Outras empresas trouxeram novos métodos de bioimpressão, como a deposição assistida por laser, comercializada pela Poietis (THAYER *et al.*, 2020).

Em 2009, o grupo de Norotte *et al.* produziu tecido vascular bioimpresso sem o uso de *scaffolds* (HE *et al.* 2022), numa abordagem de bioimpressão pelo posicionamento individual de esferóides celulares em padrões, com posterior fusão entre eles – resultando em tecidos com maior espessura (THAYER *et al.*, 2020).

Em 2012, Skardal *et al.* realizou testes de bioimpressão *in situ* em modelos animais. No mesmo ano, avanços em modelos bioimpressos, como cartilagem articular e fígado artificial, surgiram. Em 2015, a tecnologia coaxial foi adotada por Gao *et al.*, possibilitando a fabricação de uma estrutura tubular.

Em 2016, Pyo *et al.* utilizaram a tecnologia de impressão DLP na bioimpressão. No mesmo ano, um modelo de cartilagem foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Anthony Atala, usando uma impressora de tecido-órgão integrada (*ITOP*, em inglês). Em 2019, Noor *et al.* produziram um coração de escala reduzida perfusável e, alguns meses depois, a bioimpressão de corações humanos de colágeno em várias escalas, com base no método FRESH, foi alcançada por Lee *et al.* (HE *et al.*, 2022).

Enquanto os sistemas de bioimpressão 3D eram lançados no mercado após seu desenvolvimento inicial, o alto custo das máquinas era um limitador para que a tecnologia se tornasse mais acessível.

Aqui entra em cena o movimento *maker*⁹, apoiado em três pilares comuns: programação, engenharia e design. Aproveitando-se do maior acesso a peças e ferramentas tecnológicas (como placas microcontroladoras e motores de passo), aliado à facilidade da troca de informações proporcionada pela internet, os *makers* – como são chamados os adeptos ao movimento – criaram ambientes criativos em que são idealizados, desenvolvidos e prototipados os mais diversos projetos.

Cabe destacar dois projetos de extrema relevância para a popularização da impressão 3D e, conseqüentemente, para a bioimpressão 3D: RepRap¹⁰ e Fab@Home¹¹. A RepRap (desde 2004) é uma impressora 3D montada a partir de um kit contendo predominantemente peças plásticas (**Figura 2.30a**). Dessa forma, é possível produzir outras impressoras a partir de um exemplar da mesma, além de ser uma das duas primeiras impressoras 3D de código aberto. A outra é justamente a Fab@Home (2005-2012), a primeira impressora 3D multimaterial disponível para o público (**Figura 2.30b**). Ela possui seu projeto de construção detalhado disponível e utiliza, inicialmente, seringas para extrusão de diferentes materiais.

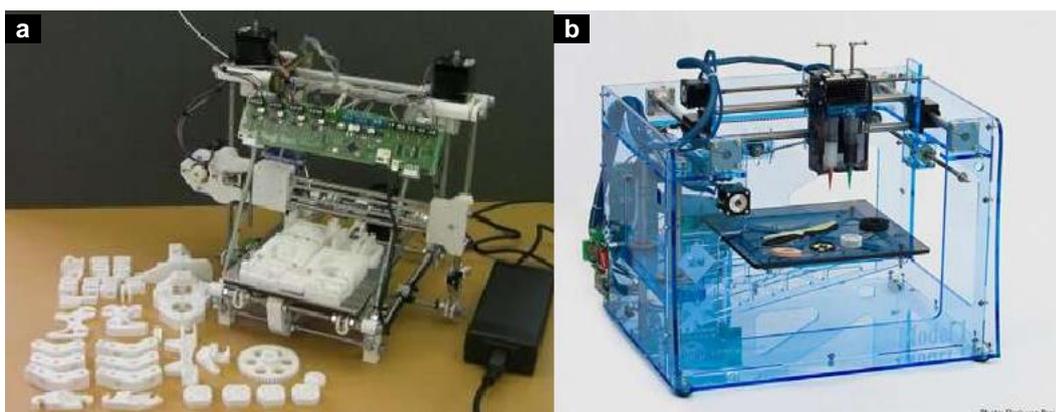


Figura 2.30 – Em (a), uma RepRap montada e as partes plásticas de seu kit impressas. Em (b), uma atualização do primeiro modelo da Fab@Home, contendo duas seringas para extrusão. Fontes: (a) <https://www.flickr.com/photos/uniofbath/12069178226>. (b) Floris van Breugel.

O objetivo de ambos os projetos era criar uma impressora versátil, de baixo custo, aberta e “hackeável”, buscando acelerar a inovação da tecnologia e sua maior incorporação por *makers* e consumidores em geral. A partir da democratização de tais projetos, pesquisadores começaram a construir suas próprias bioimpressoras

⁹ Em inglês, ele é comumente chamado de Maker Movement ou DIY – Do-It-Yourself – Movement (Movimento FVM – faça você mesmo).

¹⁰ “REPLICating RAPid-prototyper”, traduzido como “prototipagem rápida replicável”. Disponível em: <https://reprap.org>. Acesso em: 20. jan 2023.

¹¹ Fab at home, traduzido como “fabricação em casa”. Disponível em: <https://www.creativemachineslab.com/fabhome.html>. Acesso em: 20. jan 2023.

3D *desktop* em laboratório, seja por meio de variações de sistemas de *open source* seja pela customização de modelos comercialmente disponíveis, como MakerBot e Ultimaker (projetos altamente influenciados pelos supracitados).

Os pesquisadores começaram a eliminar a demanda por máquinas de milhares de dólares, ao demonstrar que a substituição da cabeça de extrusão de uma impressora 3D tradicional por um sistema de extrusão por pressão de êmbolo em seringa, ou sistema de extrusão pneumática, poderiam obter resultados semelhantes. Essa democratização da tecnologia alimentou uma nova indústria de bioimpressoras 3D de baixo custo e acessíveis, que foram desenvolvidas e refinadas pelos pesquisadores e pelo campo como um todo. Paralelamente, novas áreas de pesquisa foram desenvolvidas em torno das biotintas, contando com empresas como Cellink e Allevi, nos EUA, e TissueLabs, no Brasil (THAYER *et al.*, 2020).

2.3.2.

Técnicas de bioimpressão 3D

Dentre as diferentes técnicas de bioimpressão 3D, três são mais utilizadas, com variações dentro de cada técnica e diferentes características (**Tabela 2.1**).

	<i>Inkjet</i>	Extrusão	Por laser ou luz
Atuador	Temperatura ou tensão elétrica	Pressão	Laser ou feixe de luz
Viscosidade da biotinta	Baixa	Alta	Variável
Integridade mecânica e estrutural	Baixa	Alta	Baixa
Velocidade de impressão	Rápida	Lenta	Média
Resolução	Alta (0.5–50µm)	Moderada (cerca de 200µm)	Alta (cerca de 1µm)
Viabilidade celular	70–90%	45–98%	>95%
Custo	Baixo	Médio	Alto

Tabela 2.1 – Principais técnicas de bioimpressão 3D e suas características. Fonte: Adaptado de Ruiz-Alonso *et al.* (2021, p. 3).

A seguir, apresento as três técnicas, com ênfase na extrusão, utilizada nos experimentos desta tese.

2.3.2.1. Droplet/Inkjet

Na bioimpressão por *droplet/inkjet*, gotículas são depositadas de maneira organizada e sem o contato direto entre o meio emissor e o receptor. Esse gotejamento pode ser ativado por meio de atuadores piezoelétricos ou térmicos (**Figura 2.31**).

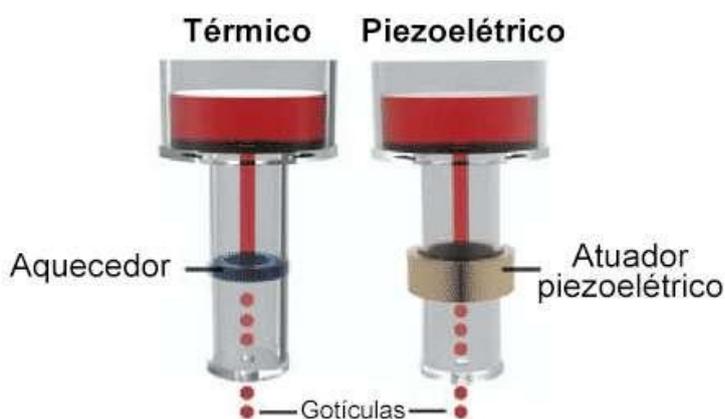


Figura 2.31 – Esquemas de impressão *droplet*. Fonte: Adaptado de Jeong *et al.* (2020, p. 3).

Ela pode ser classificada em três subcategorias: jato de tinta contínuo, gotejamento sob demanda e jato eletrohidrodinâmico (HE *et al.*, 2022, p. 65).

2.3.2.2. Projeção a *laser* ou feixe de luz

A bioimpressão baseada em projeção a *laser* solidifica biomateriais fotosensíveis para formar construtos com alta precisão formal. Seu uso mais comum é na impressão de *scaffolds* sem células para serem semeados posteriormente (**Figura 2.32**).

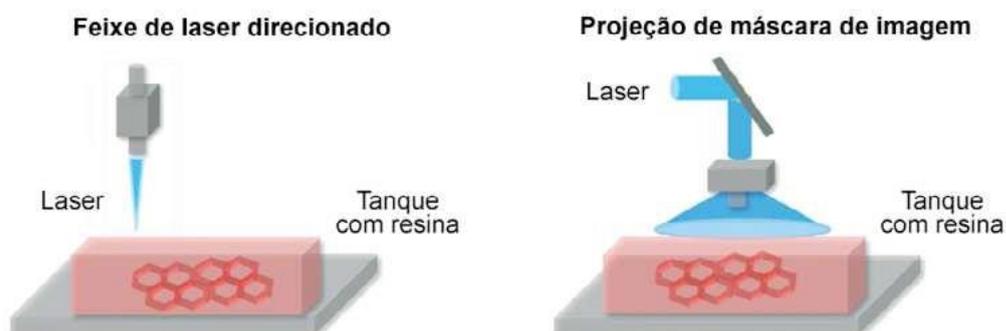


Figura 2.32 – Esquemas de impressão a laser. Fonte: Adaptado de Cui *et al.* (2016, p. 2).

Atualmente, pela tecnologia DLP, pesquisas já apresentaram resultados positivos na impressão de construtos a partir de hidrogéis fotossensíveis contendo células (HE *et al.*, 2022, p. 118).

2.3.2.3.

Extrusão

A bioimpressão por extrusão é o método mais utilizado, compatível com uma grande quantidade de biomateriais existentes, que são aplicados como filamentos viscosos. O sistema de extrusão pode ser pneumático, por pistão/êmbolo ou por parafuso/fuso (HE *et al.*, 2022) (**Figura 2.33**). No método de bioimpressão por microextrusão, a biotinta contendo as células é depositada sob a forma de filamento cilíndrico viscoso, sendo depositada de maneira similar ao que ocorre com filamentos plásticos, camada por camada. Normalmente, são utilizadas seringas para armazenar a biotinta, e a extrusão pode ser direta, indireta (pelo sistema FRESH¹², uma forma de impressão suportada em hidrogel), ou coaxial (quando um tubo secundário é ligado à seringa principal).

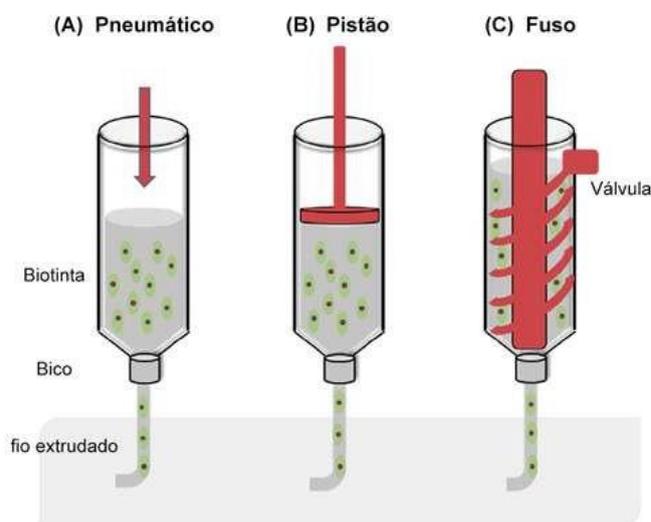


Figura 2.33 – Diferentes tipos de extrusão. Fonte: Adaptado de Boularaoui *et al.* (2020, p. 3).

No método de extrusão direta, o hidrogel compatível com essa técnica é bioimpresso diretamente na placa de cultura. No método FRESH, a biotinta é depositada em um recipiente contendo uma solução viscosa de suporte, auxiliando na manutenção da forma do construto impresso (**Figura 2.34**).

¹² *Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels*, traduzido como “Incorporação reversível de forma livre de hidrogéis suspensos”. Disponível em: <https://www.allevi3d.com/fresh/>. Acesso em: 20. jan 2023..

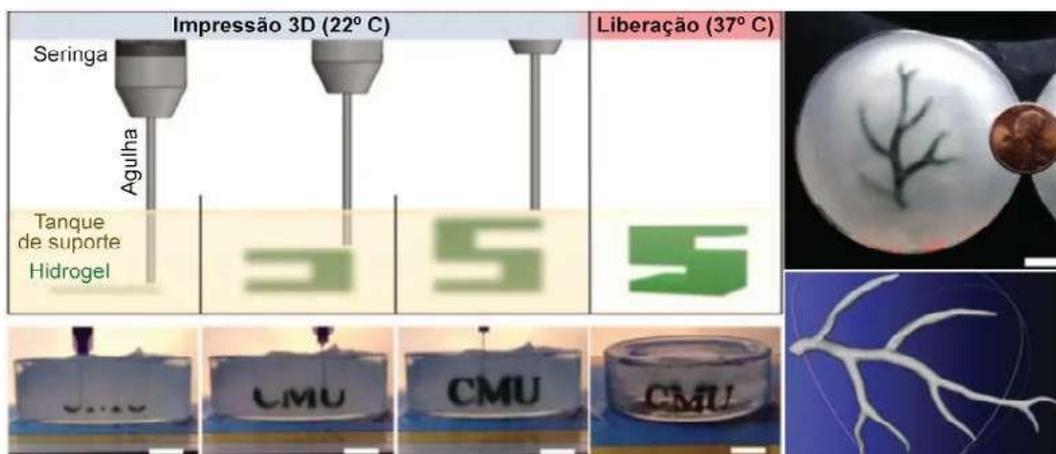


Figura 2.34 – Exemplo de impressão pelo método FRESH. Fonte: Adaptado de Hinton *et al.* (2015, p. 2).

Diferentes hidrogéis e outras substâncias podem fazer parte da formulação da solução de suporte, servindo de meio nutritivo e/ou de ator de reticulação¹³ do construto impresso (por exemplo, para impressão de alginato de sódio pode-se utilizar um hidrogel contendo cloreto de cálcio, a fim de ocorrer a reticulação iônica). Após a maturação do construto, o gel de suporte pode ser removido por ação térmica ou química (**Figura 2.35**).

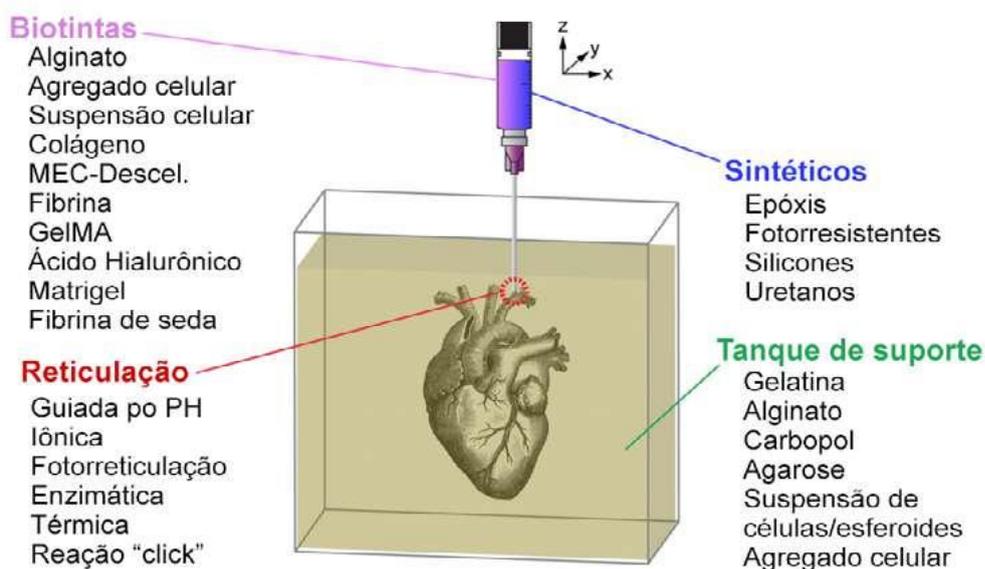


Figura 2.35 – Exemplos de materiais que podem ser utilizados no método FRESH, além de diferentes tipos de reticulação possíveis via recipiente de suporte. Fonte: Adaptado de Shiwarski *et al.* (2021, p. 6).

¹³ A reticulação polimérica é um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por ligações formando uma rede polimérica tridimensional, processo também conhecido como *crosslinking* (formação de ligações cruzadas). A reticulação pode ser de natureza química ou física (ligações iônicas). De uma maneira geral, com o aumento da reticulação, as estruturas tendem a perder sua fluidez e se tornam mais rígidas (adaptado de LAMY *et al.*, 2008, p. 232).

O sistema de bioimpressão por extrusão pode conter mais de uma seringa extrusora, permitindo, assim, a impressão de diferentes tipos celulares no mesmo construto. Apesar da tecnologia de microextrusão ser versátil, sua resolução geralmente passa de 100 μ m, maior em comparação com outras técnicas de bioimpressão (PANDEY *et al.*, 2018).

2.3.3.

Biotintas

Uma biotinta (*bioink*) é o equivalente biológico à tinta de impressora de papel ou ao filamento de uma impressora 3D de plástico, empregando materiais biológicos para gerar as estruturas 3D. As biotintas são normalmente compostas por materiais de suporte estrutural e células vivas, mas também podem incluir moléculas bioativas como fatores de crescimento. O tipo de biomaterial mais comumente utilizado na formulação de biotintas para bioimpressão 3D são os hidrogéis, polímeros com alto teor de água em sua composição e que podem ser reticulados para formar um gel estrutural de suporte para as células proliferarem, mimetizando assim a matriz extracelular (**Figura 2.36**).



Figura 2.36 – Exemplo de biotintas bioimpressas: alginato, agarose, quitosana, fibroína de seda, colágeno, gelatina, ácido hialurônico, fibrina e Matrigel. Fonte: Adaptado de Cho *et al.* (2019, p. 33).

A escolha do biomaterial para formar a base da biotinta é crucial para uma impressão bem-sucedida e para a posterior formação dos tecidos engenheirados (SKELDON *et al.*, 2018).

O desempenho das biotintas pode ser medido pelos seguintes fatores:

- printabilidade;
- biocompatibilidade;
- propriedades mecânicas;
- estabilidade estrutural;
- biodegradabilidade.

A *printabilidade* de uma biotinta é determinada pelas propriedades reológicas¹⁴ do biomaterial, compreendendo seu escoamento e sua capacidade de manter a integridade estrutural após a bioimpressão. A deposição bem-sucedida e eficiente da biotinta depende em grande parte de sua viscosidade e da homogeneidade da solução. Uma biotinta muito viscosa forçará altas tensões de cisalhamento sobre o células, além de poder ocasionar o entupimento da bioimpressora. Por outro lado, uma biotinta com baixa viscosidade resultará em um construto com má definição devido ao fluxo de impressão (SKELDON *et al.*, 2018, p. 6).

A *biocompatibilidade* na bioimpressão refere-se à influência positiva e controlável na estrutura de componentes biológicos e funcionais. Esses efeitos incluem a interação com o tecido endógeno ou sistema imunológico, dando suporte à atividade celular apropriada e promovendo os fatores de crescimento, cruciais para o desenvolvimento do construto. A atividade biológica da biotinta é um aspecto chave para torná-la adequada para a viabilidade celular e a formação de tecidos. A noção de biocompatibilidade na bioimpressão 3D mudou gradualmente de biotintas que não causam reações adversas ao construto para biotintas que permitam passivamente ou produzam ativamente efeitos desejados no construto (HE *et al.*, 2022, p. 44-45; SKELDON *et al.*, 2018, p. 4-5).

As *propriedades mecânicas* demandam que a biotinta reticulada seja forte o suficiente para manter o construto e a implantação subsequentes (HE *et al.*, 2022). Elas podem ser medidas usando o módulo de cisalhamento, dado em Pascals (Pa) ou quilopascals (kPa). A rigidez do tecido desejado é uma característica biológica a ser levada em conta: ela varia de menos de 1 kPa para tecido nervoso, a mais de 100 kPa em tecidos ósseos. Quando comparados com a rigidez de polímeros utilizados comumente nas culturas de tecidos (TCPs; 1 GPa ou 1 000 000 kPa), tais construtos

¹⁴ A *reologia* é o ramo da física que estuda a deformação e o escoamento da matéria, que abrange o escoamento plástico de sólidos e o escoamento de líquidos viscoelásticos. Disponível em: <https://www.infopedia.pt/dicionarios/lingua-portuguesa/reologia>. Acesso em: 20 fev. 2023.

produzidos acabam tendo suas propriedades alteradas (particularmente de células de tecidos de baixa rigidez, como fígado ou cérebro). Com uma riqueza de pesquisas mostrando os efeitos do aumento da rigidez tecidual em tecidos como o fígado, o design da biotinta deve ser cuidadosamente adaptado para corresponder ao tecido endógeno e saudável. Isso pode ser alcançado por seleção de material, modificação e parâmetros de reticulação (SKELDON *et al.*, 2018, p. 3).

A *estabilidade estrutural* é crucial para o processo de bioimpressão: biotintas de baixa viscosidade tendem a se espalhar, comprometendo a estrutura do construto impresso. A resolução da estrutura também pode ser comprometida por conta de reticulação imperfeita: a falta de reticulação pode causar espalhamento da estrutura, enquanto a sobrerreticulação pode resultar em delaminação das camadas da estrutura impressa. A biotinta ideal deve ter viscosidade suficiente para não se espalhar após a deposição, e seu método de reticulação deve ser controlado. Ela também deve possuir resistência mecânica suficiente para que as camadas iniciais impressas suportem as camadas posteriores sem colapsar ou comprometer a estrutura (SKELDON *et al.*, 2018, p. 3-4).

O destino ideal da maioria dos *scaffolds* para tecidos bioimpressos transplantados é a degradação, paralelamente à integração das células e à regeneração do tecido alvo. As propriedades de *biodegradação* das biotintas são uma característica chave ao considerar tecidos a serem implantados. Há um equilíbrio a se atingir entre degradação muito rápida – resultando em perda de células e inflamação potencial – e falta de degradação – que pode dificultar a regeneração tecidual. Muitas vezes a biodegradabilidade pode ser ajustada alterando as propriedades dos componentes da biotinta e seus procedimentos de reticulação (SKELDON *et al.*, 2018, p. 4).

2.3.4.

Desafios atuais

Uma das principais características das tecnologias atuais de bioimpressão é a baixa precisão dos construtos em comparação com tecidos/órgãos naturais. Outra desvantagem comum é a baixa velocidade na impressão de estruturas complexas, dificultando o aumento de escala na produção dos construtos.

A vascularização adequada nos construtos celulares é um fator chave na bioimpressão 3D. A construção eficaz de uma rede vascular de perfusão e a promoção de sua vascularização por estimulação mecânica e/ou química são a base da fabricação biológica de construções em escala. Esse é um ponto que ainda precisa de muita pesquisa e avanços. Outros desafios incluem o desenvolvimento de biotintas e das técnicas de bioimpressão, fontes de aquisição de células, construção de biorreatores e mesmo questões éticas (HE *et al.*, 2022, p. 46).

No início de 2021, a empresa de manufatura aditiva 3D Systems, juntamente com a United Therapeutics, afirmou ter obtido um progresso significativo no desenvolvimento de *scaffolds* pulmonares em tamanho real e vascularizados, de maneira rápida e em escala de definição micrométrica (**Figura 2.37**). Entretanto, desde o anúncio, nada foi publicado ou apresentado.



Figura 2.37 – Imagem apresentada juntamente com o anúncio da 3D Systems, apresentando o que parece um construto celular vascularizado de um pulmão. Fonte: <https://www.3dsystems.com/press-releases/3d-systems-announces-breakthrough-bioprinting-technology-and-expansion-0>.

A bioimpressão coaxial tornou-se um recurso cada vez mais popular na bioimpressão por extrusão, especialmente na área de biofabricação/vascularização de vasos sanguíneos. Sua maior vantagem é a capacidade de construir estruturas tubulares hierárquicas com propriedades biológicas/mecânicas ajustáveis (**Figura 2.38**). Hidrogéis com boa biocompatibilidade tendem a apresentar resistência mecânica insuficiente, e a bioimpressão coaxial pode resolver parcialmente o problema, com sua estrutura *core-shell* (núcleo-casca): os materiais do núcleo garantem a biocompatibilidade, enquanto os materiais da casca fornecem resistência mecânica ou vice-versa. Materiais de sacrifício no núcleo também podem ser usados para a bioimpressão satisfatória de estruturas tubulares ocas (HE *et al.*, 2022, p. 47).

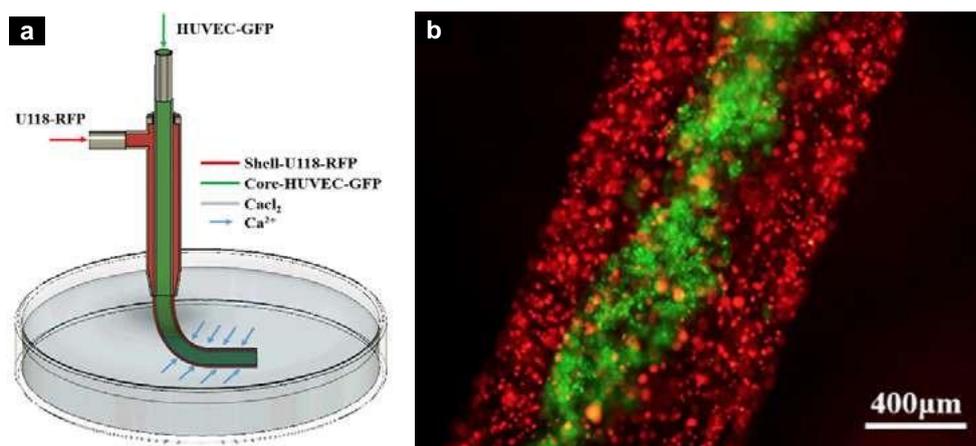


Figura 2.38 – Em (a), esquema de bioimpressão coaxial *core-shell*, com o uso de diferentes tipos celulares nas partes interna e externa do filamento. Em (b), a imagem da microscopia, mostrando as diferentes células posicionadas. Fonte: Adaptado de Wang *et al.* (2021, p. 6).

A Litografia Axial Computadorizada (*Computed Axial Lithography*, em inglês) é uma tecnologia derivada da impressão DLP, apresentada pela primeira vez em 2019. Diferentemente do que ocorre na impressão DLP, o recipiente de material fotopolimerizável gira em torno de um eixo, e cada projeção de imagem se propaga através do material de um ângulo diverso. Assim, as exposições de diferentes ângulos fornecem dose de energia suficiente para a reticulação do material na geometria desejada (**Figura 2.39**). Após uma rotação de 360° do contêiner, estruturas 3D complexas são impressas com sucesso (HE *et al.*, 2022, p. 119-122).

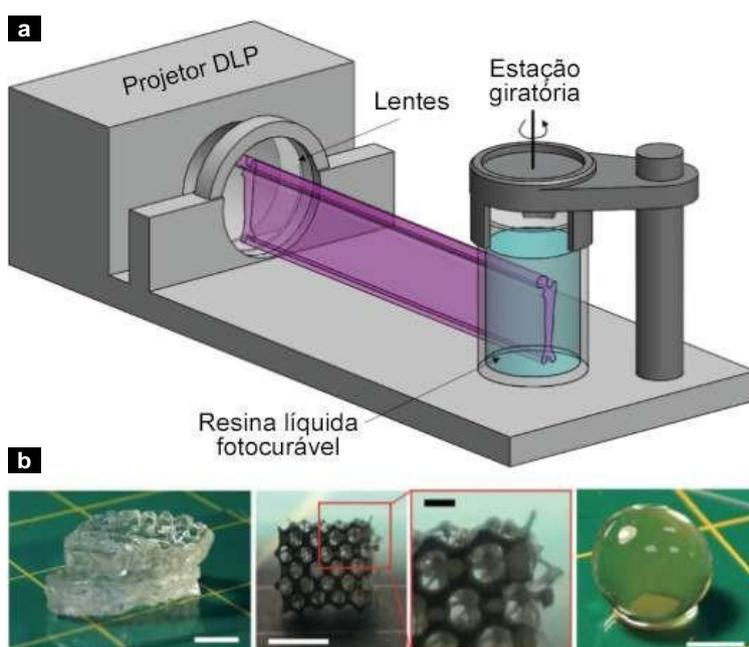


Figura 2.39 – Em (a), esquema do sistema de bioimpressão por Litografia Axial Computadorizada. Em (b), exemplos de construtos bioimpressos com essa tecnologia. Fonte: Adaptado de He *et al.* (2022, p. 121).

2.4.

Considerações

Este capítulo possui dupla função: apresentar, da maneira mais expositiva e ampla possível, os temas que estão alheios ao “lugar comum” do Design e, por si só, apresentar-se como parte da justificativa desta tese. Cabe ao designer se apropriar, de forma mais assertiva possível, dos conhecimentos correlatos aos projetos nos quais se engaja. Além de tal atitude ser facilitadora na condução deles, a tradução de tais conhecimentos, inclusive graficamente, auxilia no diálogo com os profissionais de diferentes campos do saber envolvidos. A escrita deste capítulo buscou ser também um exemplo disso.

A partir da base de conhecimento estruturada neste capítulo, o próximo aprofunda a discussão sobre o papel do designer nos dias atuais, a justificativa e os caminhos da presente pesquisa. No decorrer dos relatos sobre os experimentos práticos, alguns temas específicos serão aprofundados, conforme o que se apresentou em cada situação.

3

O caminho da pesquisa: desenvolvimento através do Design

Neste capítulo, apresento as características e as opções metodológicas da pesquisa, além de justificá-la como uma pesquisa interdisciplinar e *através* do Design. Também traço o caminho percorrido nela, narrando minha trajetória ao longo do período do doutorado.

3.1.

Paradigma da pesquisa

A presente pesquisa possui abordagem qualitativa. Em vez de apresentar, desde o início, hipóteses prontas a serem validadas (ou refutadas) de forma quantitativa, permite a construção de perguntas e hipóteses ao longo do processo de coleta e análise de dados. Dessa maneira, dá-se margem à descoberta de quais são as questões da pesquisa mais importantes ou mesmo à revelação de novas perguntas para, então, refiná-las e respondê-las. Na pesquisa qualitativa “a ação investigativa se move dinamicamente em ambas as direções: entre os fatos e sua interpretação, de forma circular” (SAMPIERI *et al.*, 2014, p. 7).

A proposta metodológica é que, por meio de uma série de experimentos esquematizados e executados sequencialmente (sempre levando em conta a bioimpressão 3D como foco prático principal), surjam respostas aos questionamentos iniciais e às novas perguntas geradas ao longo do processo. Por isso, considero esta uma pesquisa de caráter exploratório – pois busca explicações e entendimentos acerca de um “tema pouco explorado, sendo difícil a formulação e operacionalização de hipóteses” (OLIVEIRA, 2018, p. 65) – com desdobramento em experimentos controlados em situação de laboratório, com o aporte teórico de métodos experimentais – em que as variáveis são manipuladas de maneira preestabelecida e seus efeitos suficientemente controlados e conhecidos, estabelecendo relações de causa e efeito entre variáveis.

[...] uma pesquisa exploratória requer um planejamento de certa forma mais flexível que a pesquisa de campo, ou a pesquisa experimental para construção de dissertações e teses. Esse tipo de pesquisa requer um consistente levantamento bibliográfico, análise de documentos, observações de fatos, fenômenos (OLIVEIRA, 2018, p. 65-66).

Os instrumentos de pesquisa utilizados, de maneira circular, foram: levantamento bibliográfico, pesquisa de materiais e observação em laboratório dos experimentos.

3.2.

O desenvolvimento *através* do Design

Tomando como base Christopher Frayling (1993), considero esta uma pesquisa *através do Design*, uma abordagem científica que tira proveito dos *insights* únicos obtidos através da prática do Design, a fim de fornecer uma melhor compreensão de questões complexas e orientadas para o futuro no campo (GODIN; ZAHEDI, 2014). Na proposição de Findelli (2004), pesquisadores *através do Design* desenvolvem novos produtos, experimentam novos materiais, processos etc. A proposta da tese é estruturar e realizar, de maneira prática e colaborativa com profissionais das ciências médicas e biológicas, experimentos envolvendo a bioimpressão 3D com o uso de células. Dessa forma, busco “atravessar” os diferentes saberes que circundam a tecnologia de bioimpressão 3D. Pela investigação interdisciplinar, via método do Design, busco articular arte, ciência e tecnologia, assim como pensado originalmente na Bauhaus.

Entretanto, em minha concepção, o Design é um método para mediar diferentes saberes, e não um detentor deles. As lacunas de conhecimento têm que ser preenchidas pelo trabalho colaborativo e interdisciplinar entre distintos profissionais, a fim de ampliar os horizontes de pesquisa com entendimentos diversos e heterogêneos. A tese apresenta também uma crítica aos designers “disciplinares”, herméticos em seu próprio campo, que, ao supervalorizarem o que é *método*, pensam ser o Design um fim em si mesmo – uma ação que acaba por enfraquecê-lo.

3.2.1.

O disciplinar, seu sufixo e seus prefixos

Com a hiperespecialização do conhecimento, fenônemo que foi se aprofundando ao longo de séculos, a sociedade passou a valorizar cada vez mais o especialista, indivíduo que busca saber cada vez mais sobre cada vez menos. Como complementa Hilton Japiassu:

O desenvolvimento da especialização, com todos os seus inegáveis méritos, dividiu o território do saber. Cada especialista ocupou, como proprietário privado, seu minifúndio de saber onde passou a exercer, de modo ciumento e autoritário, seu minipoder (2006, p. 1).

Segundo o autor, *disciplina* é um “conjunto específico de conhecimentos com características próprias no campo do ensino, da formação, dos métodos, dos mecanismos e dos materiais” (JAPIASSU, 2006., p. 5), sendo *disciplinaridade* a “exploração científica especializada de determinado domínio homogêneo de estudo” (1976, p. 72).

A partir dessa premissa, Japiassu apresenta os possíveis graus sucessivos de cooperação e de coordenação crescentes das disciplinas, conforme **Tabela 3.1** a seguir:

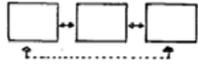
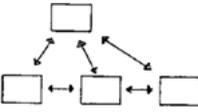
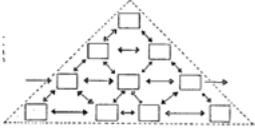
	Descrição geral	Tipo de sistema	Configuração
Multidisciplinaridade	Gama de disciplinas que propomos simultaneamente, mas sem fazer aparecerem as relações que podem existir entre elas.	Sistema de um só nível e de objetivos múltiplos; nenhuma cooperação.	
Pluridisciplinaridade	Justaposição de diversas disciplinas situadas geralmente no mesmo nível hierárquico e agrupadas de modo a fazer aparecer as relações existentes entre elas.	Sistema de um só nível e de objetivos múltiplos; cooperação, mas sem coordenação.	
Interdisciplinaridade	Axiomática comum a um grupo de disciplinas conexas e definida no nível hierárquico imediatamente superior, o que introduz a noção de finalidade.	Sistema de dois níveis e de objetivos múltiplos; coordenação procedendo do nível superior.	
Transdisciplinaridade	Coordenação de todas as disciplinas e interdisciplinas do sistema, sobre a base de uma axiomática geral.	Sistema de níveis e objetivos múltiplos; coordenação com vistas a uma finalidade comum dos sistemas.	

Tabela 3.1 – Graus sucessivos de cooperação e de coordenação crescente das disciplinas. Fonte: Adaptado de Japiassu (1976, p. 73-74).

Na contemporaneidade, os problemas complexos da sociedade demandam o desenvolvimento de saberes igualmente complexos. Para isso, Japiassu (2006) defende que os diferentes saberes desmembrem suas barreiras, estabelecendo uma “comunicação fecunda” entre si, em uma cooperação minimamente interdisciplinar:

nos reconhecemos diante de um empreendimento interdisciplinar todas as vezes que ele conseguir incorporar os resultados de várias especialidades, que tomar de empréstimo a outras disciplinas certos instrumentos e técnicas metodológicos, fazendo uso dos esquemas conceituais e das análises que se nos encontram diversos ramos do saber, a fim de fazê-los integrarem e convergirem, depois de terem sido comparados e julgados (JAPIASSU, 1976, p. 75).

O papel da interdisciplinaridade é o de lançar pontes, ligando assim as fronteiras previamente estabelecidas dos saberes. Para tal, essa colaboração ocorre em três fases:

- a troca de informação mútua, em que cada campo do saber/especialista considera o outro como exterior a si;
- a entrevista das questões colocadas pelos diferentes campos;
- a tomada de consciência coletiva das questões desenvolvidas.

Para o autor, é nas fronteiras das disciplinas que se esboçam as colaborações mais sólidas (JAPIASSU, 1976, p. 92).

3.2.2.

O caráter interdisciplinar do Design

Sem adentrar na morfologia, ou mesmo na conceituação do ato projetual, utilizo Adrian Forty (2007) para afirmar que o profissional designer surge “oficialmente” durante a primeira Revolução Industrial, a partir da demanda das fábricas por uma produção seriada, homogênea e de qualidade uniforme.

Enquanto a cerâmica foi uma indústria artesanal, como era em Staffordshire até o final do século XVIII, a forma de um produto era, com toda probabilidade, decidida pelo homem que o fazia. Porém, quando a manufatura foi dividida em processos realizados por diferentes trabalhadores, foi necessário adicionar mais um estágio, o da preparação de instruções para os vários operários: na verdade, um estágio de design (FORTY, 2007, p. 50).

Nessa época, o papel desempenhado pelo designer era desenvolver não apenas novos produtos, mas modos de fabricação que atendessem aos requisitos dessa nova escala de produção. Para tal tarefa, o profissional foi se apropriando de conhecimentos de diferentes áreas, como “da fisiologia, do grupo das ciências da natureza; da matemática, que faz parte das ciências formais; da estética, do conjunto de ciências humanas etc.” (BOMFIM, 1997, p. 28).

Isso posto, arrisco-me a considerar o fazer design uma atividade interdisciplinar desde seus primórdios. Com essa natureza epistemológica tão ligada à

prática, o designer acaba por atuar como mediador de diferentes áreas do saber para desempenhar suas funções. Como complementa Bomfim, “o Design abre mão de tentar construir um corpo teórico próprio, em troca dos conhecimentos de disciplinas diversas, combinando-as de modo particular em cada situação específica” (1997, p. 30). Em *Rethinking Design Education*, Alain Findeli apresenta um diagrama, traduzindo o que seria a proposta original da Bauhaus, já no século XX, uma estrutura interdisciplinar de ensino envolvendo arte, ciência e tecnologia (**Figura 3.1**) (FINDELI, 2001, p. 8).

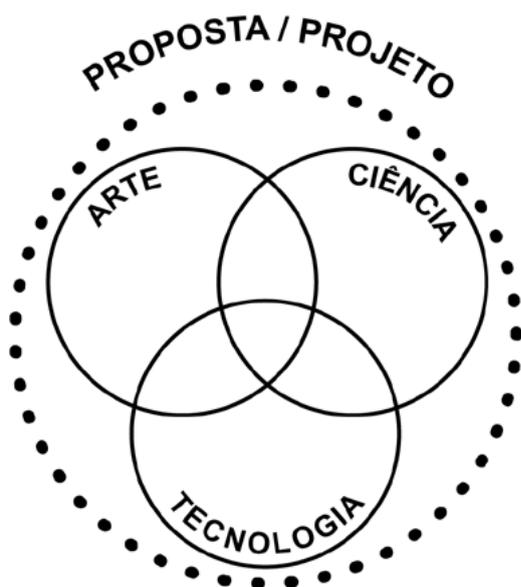


Figura 3.1 – Diagrama de proposta/projeto de como seria o ensino da Bauhaus: Conjugando arte, ciência e tecnologia. Fonte: Adaptado de Findeli (2001, p. 8).

Para além do caráter interdisciplinar, o Design também está intrinsecamente ligado ao ato projetual: em inglês, “design” é verbo (ação) e substantivo (nomeação). Como essa *práxis* (união dialética entre teoria e prática), preferencialmente interdisciplinar, impacta o processo de Design? E de que maneira tem ocorrido essa especulada interdisciplinaridade?

3.2.3.

Método científico e método do Design

Em 1982, Nigel Cross publicou o artigo e, posteriormente, o livro *Designerly ways of knowing*, em que indica o Design como uma possível terceira área da educação – as outras duas seriam a educação em Ciências e educação em Artes. O autor apresenta dados interessantes sobre estudos de observação e a forma como os designers atuam.

Em suas publicações, Cross apresenta estudos realizados por Bryan Lawson (1979), que compararam a estratégia utilizada por cientistas e designers para resolução de problemas. A partir de um arranjo de cubos com duas cores e um conjunto de regras (algumas das quais não divulgadas inicialmente), foram apresentados os problemas a serem solucionados, tanto para estudantes de pós-graduação em Arquitetura quanto para estudantes de pós-graduação em Ciências. Os grupos apresentaram diferentes estratégias para a resolução dos problemas.

Enquanto o grupo de cientistas explorava sistematicamente as combinações possíveis, buscando alguma regra fundamental para a resolução do problema, os arquitetos procuravam soluções diversas, até encontrarem aquela que fosse a mais aceitável. Embora os cientistas estivessem mais focados na busca das regras, por meio da tentativa de soluções, os arquitetos também tangenciavam tais regras. “Eles aprenderam sobre o problema através de tentativas de criar soluções, ao invés de deliberada e separadamente estudar o problema em si”¹ (LAWSON, 2005, p. 44). Essas experiências sugerem que, normalmente, cientistas tendem a buscar a solução de problemas por meio de *análise*, enquanto os designers tentam resolvê-los através da *síntese* (**Tabela 3.2**). O foco dos designers seria *gerar soluções*, enquanto o dos cientistas envolveria, primariamente, a *compreensão* do que está posto. Não que exista uma maneira correta a ser seguida, mas claramente são processos mentais diferentes.

Profissional	Estratégia	Sistemática
Cientistas	Buscar as regras que regem o problema.	Análise
Designers	Focar primeiro em soluções para o problema.	Síntese

Tabela 3.2 – Diferença entre cientistas e designers.

O método de Design “duplo diamante”, lançado pelo Design Council², em 2004, e o método científico hipotético-dedutivo (LAKATOS; MARCONI, 1996), utilizado no campo da biomedicina³ (GONTIJO, 2019), por exemplo, possuem estrutura similar (**Tabela 3.3** e **Figura 3.2**).

¹ No original: They learned about the problem through attempts to create solutions rather than through deliberate and separate study of the problem itself.

² Disponível em: <https://www.designcouncil.org.uk/news-opinion/what-framework-innovation-design-councils-evolved-double-diamond>. Acesso em 9. mar 2022.

³ Disponível em: <https://blog.faculdadeserradourada.com.br/alis/a-metodologia-cientifica-no-curso-de-biomedicina>. Acesso em: 9. mar 2022.

Etapa	Método hipotético-dedutivo	Método duplo diamante
1	Definição do problema	Desafio
2	Levantamento de dados	Descoberta
3	Elaboração de pelo menos uma hipótese que explique o problema	Definição
4	Criação de experiência em ambiente controlado, com a finalidade de testar as hipóteses	Desenvolvimento
5	Análise e interpretação dos dados obtidos pelo teste	Entrega
6	Elaboração de novas hipóteses.	Resultados.

Tabela 3.3 – Comparativo entre as etapas entre os métodos hipotético-dedutivo e duplo diamante.

MÉTODO HIPOTÉTICO-DEDUTIVO



MÉTODO DUPLO DIAMANTE



Figura 3.2 – Interpretação esquemática-visual do método hipotético-dedutivo em similaridade com o método duplo diamante.

Ao se compararem ambos, nota-se uma menor rigidez na atribuição das etapas do método de Design em relação ao método científico de exemplo – o que não deveria se traduzir em menor rigor na execução das etapas em si (PUGH, 1991, p. 69). Antes do “problema” (primeira etapa do método científico), temos a etapa de “descoberta”, um olhar mais amplo perante a situação, ante o problema especificamente definido.

Trazendo essa comparação para o objeto desta tese, o profissional designer não precisa necessariamente elencar os problemas a serem solucionados. Ele pode, após compreender a sistemática que envolve os temas – direta e indiretamente –, investigar processos e técnicas diversas que auxiliem no desenvolvimento da pesquisa. Ele não pode se ater a reproduzir e aferir situações pré-determinadas – “É impossível conceber uma ideia de projeto que não seja a crítica de um tipo que exista, de tipos que existam” (ARGAN, 1993, p. 2) – mas sim transgredir o contexto atual e gerar novas situações. Esse pode ser o paradigma que possibilita ao Design ser um facilitador da inovação em campos “clássicos” do saber. Como afirma Simon Herbert, “As ciências naturais estão preocupadas com como as coisas são”⁴ (1969, p. 114), ou seja, buscam sistemas, padrões e cálculos lógicos que expliquem os fenômenos, o “mecanismo” que os rege; “[...] O Design, por outro lado, está preocupado com como as coisas deveriam ser”⁵ (1969, p. 114), por meio de artefatos ou técnicas para atingir objetivos, focando no “uso” dos fenômenos.

Poderíamos questionar se as formas de raciocínio que são apropriadas para as Ciências Naturais também são adequadas para o Design. Pode-se supor que a introdução do verbo “deveria” pode requerer regras adicionais de inferência, ou modificação das regras já embutidas na lógica declarativa⁶ (HERBERT, 1969, p. 115).

Invertendo a ordem do raciocínio, como a modificação ou a inserção de regras adicionais de inferências promovidos pelo “deveria ser” impacta um projeto ou pesquisa no campo das ciências?

3.2.4.

O papel do designer na sociedade atual

O tema desta tese de doutorado gerou, desde o início do processo, surpresa e indagações de vários interlocutores, desde profissionais e acadêmicos das ciências

⁴ No original: The natural sciences are concerned with how things are.

⁵ No original: Design, on the other hand, is concerned with how things ought to be.

⁶ No original: We might question whether the forms of reasoning that are appropriate to natural science are suitable also for design. One might well suppose that introduction of the verb “should” may require additional rules of inference, or modification of the rules already imbedded in declarative logic.

médicas e biológicas – o que já era, de certa forma, esperado –, até pares do campo do Design – de uma maneira mais expressiva do que inicialmente se imaginava. Essas indagações colocavam em dúvida, por exemplo, a capacidade do designer em assimilar conceitos e práticas dos campos apresentados ao longo da tese – como se ele fosse um profissional “disciplinado”: um frasco já repleto de água, sendo os conhecimentos de outras áreas uma espécie de óleo, sem capacidade para adição ou convergência de outros conhecimentos. Surpreendentemente, esse questionamento também foi exposto por parte do campo do Design, assim como foi imposta uma ideia de atuação limitada, isto é, de mera produção de artefatos de auxílio para tais pesquisas, em vez da participação do designer na integridade do processo.

Como a natureza do Design é marcada pela interdisciplinaridade, por que uma pesquisa interdisciplinar, em um tema que já faz uso de técnicas familiares ao campo do Design, causa tanta resistência nos agentes dos campos externos, como nas ciências médicas e biológicas, e no próprio campo do Design? Em *Projeto e Revolução*, Iraldo Matias (2014) apresenta algumas análises que ajudam no entendimento de como o Design tem sido visto a partir de uma lógica puramente capitalista e míope, que afeta a percepção da sociedade sobre a atuação do designer e mesmo a noção do profissional acerca de sua própria ocupação.

O autor expõe certas fragilidades na produção teórica do Design, voltadas para o tecnicismo e a prática da profissão, cerrando os olhos para todo o contexto social e histórico que a influencia. O autor cita Bomfim, quando este afirma que o desenvolvimento de produtos ocorre “em função daquilo que a *sociedade determina*, tendo em vista as necessidades de seus membros” (1995, p. 4, *apud* MATIAS, 2014, p. 32). Que sociedade é essa? Como se dá tal determinação? Estaria, então, o designer fadado a se “disciplinar” de acordo com a vontade de certos grupos? Apoiando-se nesse processo, Matias complementa:

Os novos fetichismos engendrados pela produção capitalista toyotizada encontraram um solo fértil no Design, sendo enormemente potencializados pelas novas técnicas de projeção. O Design é subsumido a um momento do Marketing, do Branding, assumindo-se enquanto puro instrumento de competitividade capitalista (MATIAS, 2014, p. 47-48).

A partir dessa percepção do *status* de “capatazismo” que o Design tem se incumbido na sociedade, é fácil compreender a noção limitante que profissionais de outras áreas têm do profissional designer. Por outro lado, em relação ao Design em si, os próprios cientistas começam a percebê-lo como ferramenta com potencial para além do aspecto estético e agregador de valor. Resgato novamente a fala de Robert Langer, pesquisador do MIT na área de biomateriais, demonstrando entusiasmo com o Design em uma entrevista:

Comecei a pensar, como engenheiro químico, talvez devêssemos pensar sobre Design. Talvez devêssemos fazer a pergunta: “O que você realmente quer em um biomaterial do ponto de vista da engenharia, do ponto de vista da química, do ponto de vista da biologia?” Então, poderíamos sintetizá-lo a partir de princípios básicos? (LANGER, 2009, p. 757).

Esse “Design” ao qual Langer se refere está muito à frente do mero desenho formal/estético. A necessidade a ser suprida é a do desenvolvimento de novos materiais, processos e sistemas, englobando uma área de atuação muito maior – e muito menos confortável para os profissionais “clássicos”.

A partir do contato com pesquisas recentes sobre engenharia de tecidos, no *V Workshop de Bioengenharia e Reparo Tecidual do ICB/UFRJ*, ocorrido em 2019, pude perceber que o “método do Design”, bastião de profissionais do campo, pode ser considerado como parte de várias pesquisas apresentadas, entretanto sem a presença do profissional designer atuando nelas.

A **Figura 3.3** apresenta um *slide* da apresentação sobre “Controle do Comportamento Celular pela Topografia dos Materiais”. Esta pesquisa busca compreender como células nervosas se comportam e se reproduzem em diferentes matrizes geométricas topográficas. Além do uso de formas geométricas tridimensionais, o pesquisador também experimentou maneiras de produzir as estruturas topográficas de titânio – inclusive utilizando a impressão 3D como uma das opções, descartada em detrimento à produção por desbaste com ácidos.

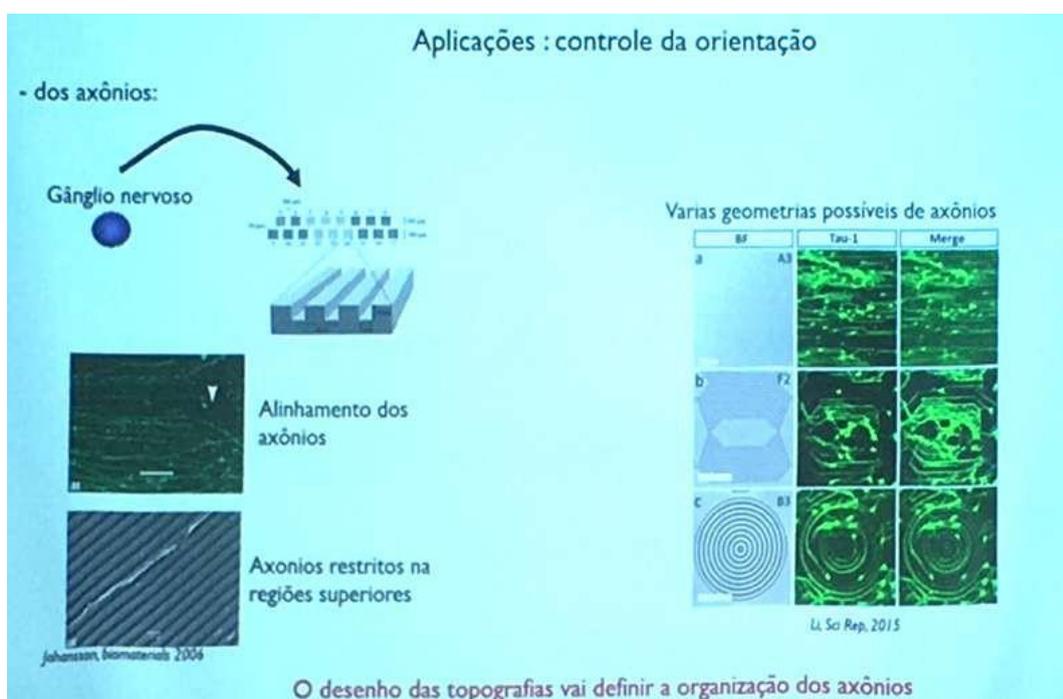


Figura 3.3 – Imagem da apresentação de Pablo Rougerie (ICB/UFRJ) “Controle do Comportamento Celular pela Topografia dos Materiais”.

Já a **Figura 3.4** mostra um *slide* da apresentação “Avaliação de biocompatibilidade de membranas de PLGA eletrofiadas para aplicação em lesões de mucosa oral”, em que a pesquisadora precisava de microfios poliméricos com uma certa espessura como parte do experimento. O *slide* apresenta o método desenvolvido para a produção dos fios nas especificações necessárias.

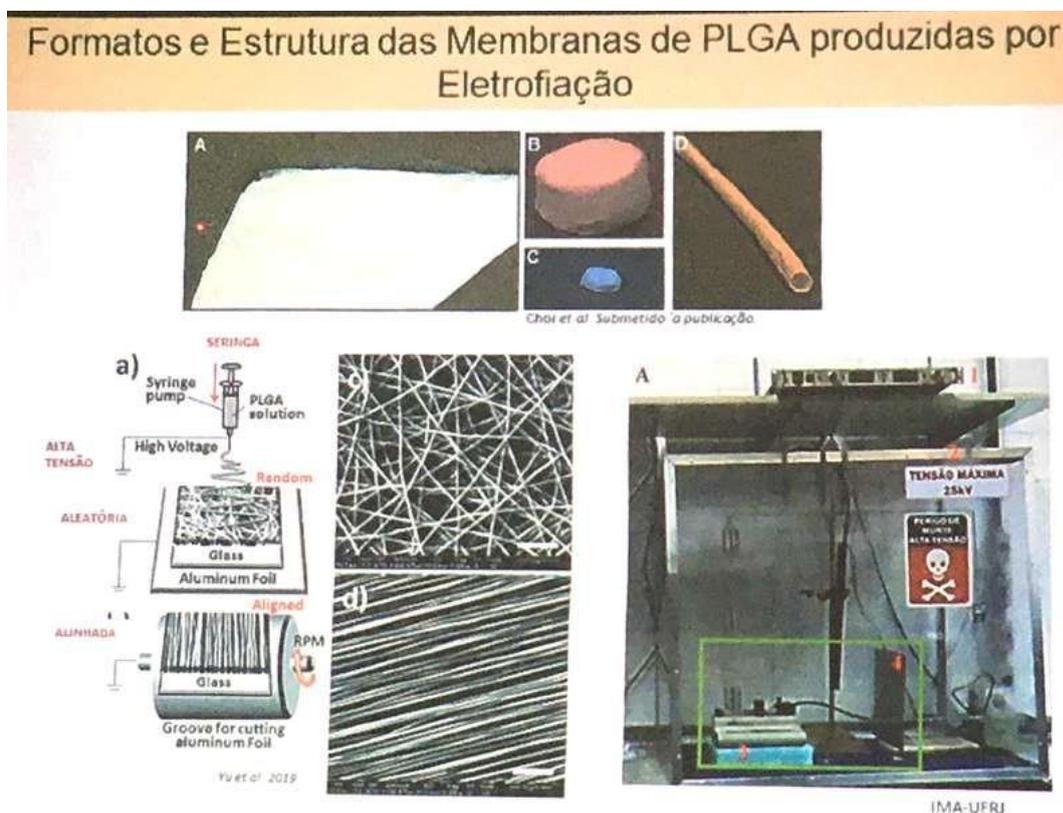


Figura 3.4 – Imagem da apresentação de Ana Chor (ICB/UFRJ) “Avaliação de biocompatibilidade de membranas de PLGA eletrofiadas para aplicação em lesões de mucosa oral”.

Esses dois exemplos mostram que existem profissionais das ciências biológicas e médicas que não se prendem aos paradigmas limitantes das disciplinas, mas sim buscam a criação de métodos de produção e influências de outras áreas para agregarem e “destravarem” suas pesquisas.

Por outro lado, parte do campo do Design parece querer se fechar e se verticalizar ainda mais – obviamente não em sua totalidade, mas esse movimento aparece com certo destaque no meio acadêmico-literário do campo. O Design tenta ser Ciência e Filosofia, em vez de buscar ampliar o alcance de seu método, saindo do paradigma “produção-produto” para “sistema-uso”, por exemplo. Logicamente, sempre haverá espaço para o designer projetista “clássico”. A fotografia não extinguiu a pintura e outras formas de representação, mas, quando sua tecnologia se tornou digital, ela pôde se popularizar e estar muito mais acessível, além de ter sua

utilidade ampliada no cotidiano do ser humano. Da mesma forma, o profissional designer deve buscar essa maior amplitude em sua atuação, oferecendo mais benefícios para a sociedade, entendendo-se como parte dela (FINDELI, 2001).

3.2.5.

Possibilidades

Em *Para além do pensamento abissal: das linhas globais a uma ecologia de saberes* (2007), Boaventura de Sousa Santos apresenta o conceito de “pensamento abissal”, separador e excludente, oriundo da divisão entre o Velho e o Novo Mundo na era colonial e que permanece de maneira cognitiva na sociedade. Apesar de o texto não falar especificamente em Design, e sim da ciência moderna e do conhecimento em geral, é possível traçar paralelos com o campo, principalmente ao se pensar em como romper com essa maneira “tradicional” de ser designer. Prontamente, é notória a coincidência na passagem: “a tarefa crítica que se avizinha não pode ficar limitada à geração de alternativas [**termo recorrente no método do Design**]. Ela requer, de facto, um pensamento alternativo de alternativas” (SANTOS, 2007, p. 20, grifo meu).

Ele traz como solução uma *ecologia dos saberes* – o reconhecimento da pluralidade de conhecimentos heterogêneos (sendo apenas um deles a ciência moderna). Nela, cruzam-se conhecimentos e ignorâncias, tendo esquecimento e desaprendizagem como etapas da aprendizagem (SANTOS, 2007, p. 25). Roland Barthes, ainda na década de 1970, já discursava sobre a ideia de “esquecimento”:

Há uma idade em que se ensina o que se sabe; mas vem em seguida outra, em que se ensina o que não se sabe: isso se chama *pesquisar*. Vem talvez agora a idade de uma outra experiência, a de *desaprender*, de deixar trabalhar o remanejamento imprevisível que o esquecimento impõe à sedimentação dos saberes, das culturas, das crenças que atravessamos (1977, p. 44).

A *desaprendizagem* é fundamental para o designer que, nascido sob a tutela da produção industrial, tenta compreender-se na sociedade atual e soltar-se das amarras limitantes da atuação meramente pró-mercado, saindo da prática conformista da profissão. Por meio da cooperação interdisciplinar, o designer pode utilizar todo seu arcabouço teórico e prático, somado a sua sistemática de síntese, trabalhando nas fronteiras e pontos de contato entre diversos campos de saber, buscando assim

uma síntese entre os métodos utilizados, as leis formuladas e as aplicações propostas. No limite, diria que implica uma renúncia, se não ao desejo de domínio pelo saber, pelo menos à manipulação totalitária do discurso da disciplina. É dessa forma

que o saber se torna um fato humano e interrogador, expondo-se como uma figura provisória oriunda do trabalho histórico da interpretação, ao invés de congelar-se num esquema absoluto, resultando da conquista do espírito dogmático (JAPIASSU, 2006, p. 5).

O profissional designer precisa entender que pode agregar mais à sua atividade, ao não se restringir apenas no binômio forma/função. Ele deve buscar se apropriar, também, do desenvolvimento de novas tecnologias e técnicas e, principalmente, compreender as questões sociais as quais pode agregar, a fim de buscar beneficiar a sociedade como um todo.

3.3.

Caminhos da pesquisa

3.3.1.

Revisão bibliográfica inicial e desbravamento teórico e prático dos temas da pesquisa

Inicialmente, a pesquisa seria ligada à área da robótica macia; por esse motivo o foco inicial da revisão bibliográfica enveredou para o tema de biomateriais. Entretanto, ainda no primeiro ano de doutorado, tomei conhecimento de um número considerável de pesquisas envolvendo o cultivo celular no estado do Rio de Janeiro, além de pesquisas e empresas de bioimpressão 3D no Brasil. Dessa maneira, o que parecia apenas uma pequena possibilidade, talvez em uma eventual temporada no exterior, tornou-se o foco prático da tese: a bioimpressão 3D com biotintas.

Ainda na fase de anteprojeto, duas pesquisas se destacaram por suas temáticas e resultados.

A primeira, *Soft material for soft actuators* (MIRIYEV *et al.*, 2017), apresenta um material compósito, que combina propriedades elásticas de uma matriz polimérica com a mudança de volume pela transição líquido-vapor ocorrida em seu interior a partir de descargas elétricas. Esse material combina alta tenacidade e alta tensão com baixa densidade. Seu custo é extremamente baixo (cerca de 3 centavos de dólar por grama) e possui fabricação simples a partir da mistura de PDMS (poli-dimetilsiloxano, um elastômero derivado do silicone) e de etanol (com temperatura de evaporação a 78.4° C) (**Figura 3.5**).

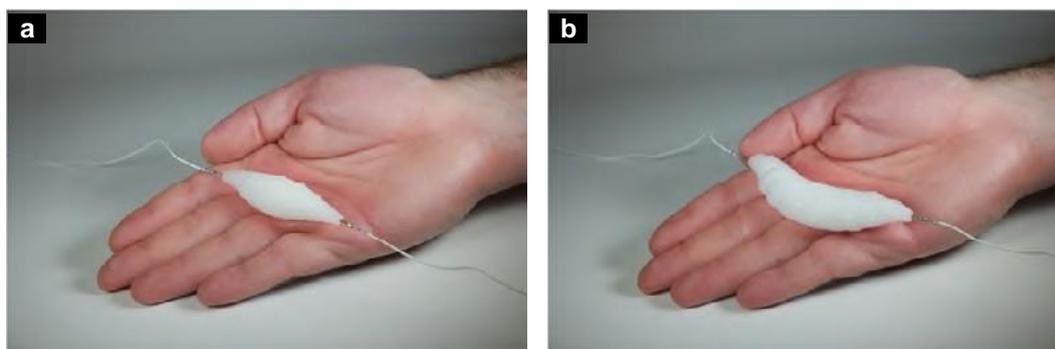


Figura 3.5 – Músculo artificial macio produzido a partir do material. Em (a), em sua forma natural. Em (b), expandido após descarga elétrica (8V, 1A). Fonte: Miriyev *et al.* (2017, p. 2).

Apesar de focada em robótica macia, a pesquisa faz uso de um biomaterial e, em uma segunda etapa (MIRIYEV *et al.*, 2019), posterior ao anteprojeto, passou a utilizar a impressão 3D para a deposição dos biomateriais em camadas (**Figura 3.6**).

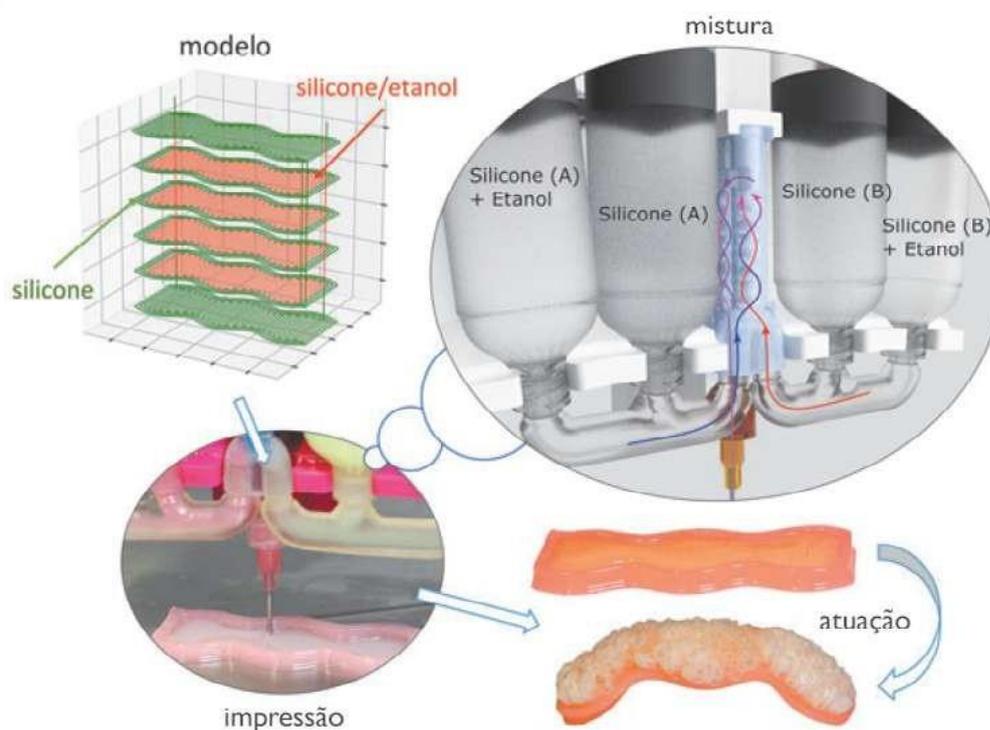


Figura 3.6 – Esquema do processo de impressão 3D dos silicões e compósitos utilizados na pesquisa, utilizando uma impressora de extrusão de materiais viscosos por meio de agulha. Fonte: Adaptado de Miriyev *et al.* (2019, p. 309).

A segunda pesquisa destacada no anteprojeto, *Biohybrid robot powered by an antagonistic pair of skeletal muscle tissues* (MORIMOTO *et al.*, 2018), apresentou um robô bio-híbrido que possui estrutura impressa em 3D, além de atuadores bio-impressos em 3D (a partir de células de mioblastos⁷ de ratos) ativados eletricamente. A partir de um sistema de par antagonístico de músculos atuadores (como ocorre com o bíceps e o tríceps humanos), os pesquisadores conseguiram retardar o tempo de encurtamento do tecido vivo e realizar algumas ações de manipulação com o robô (**Figura 3.7**).

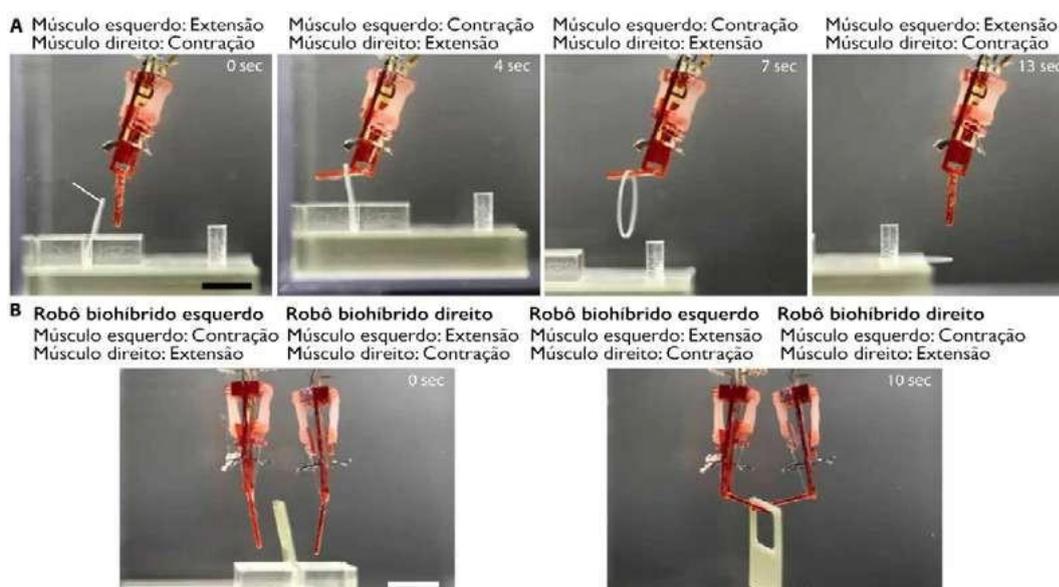


Figura 3.7 – Em (a), um robô executando a tarefa de “pick and place” por meio de contrações seletivas dos atuadores. Em (b), a mesma operação executada por dois robôs em conjunto. Fonte: Adaptado de Morimoto *et al.* (2018, p. 7).

A partir dos artigos citados, busquei na literatura fontes sobre biomateriais. Além de artigos de revistas científicas específicas, como a *Biomaterials*, os livros *Smart biomaterial devices: polymers in biomedical sciences* e *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* foram importantes fontes balizadoras para o entendimento do tema.

A compreensão sobre a engenharia de tecidos ocorreu a partir de artigos científicos – muitos ligados diretamente à bioimpressão 3D –, e dos livros *Principles of Tissue Engineering* e *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, que trouxeram importante arcabouço teórico e histórico do campo do saber.

⁷ Célula embrionária que se converte em fibra muscular estriada. Disponível em: <https://www.dicio.com.br/mioblasto/>. Acesso em: 9 fev. 2022.

Para me aprofundar sobre a bioimpressão 3D, os livros *3D bioprinting: modeling in vitro tissues and organs using tissue-specific bioinks* e *Cell Assembly with 3D Bioprinting* foram importantes fontes, além de inúmeros artigos, como os escritos por Ozbolat, *Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation* e *Evaluation of bioprinter technologies*.

Além de livros e artigos, a internet possibilitou o acesso a vários vídeos – entre palestras e demonstrações práticas – e à descrição de projetos envolvendo a tecnologia de bioimpressão 3D e seus temas correlatos.

Na questão prática, pude conhecer a impressão 3D utilizando seringa para extrusão (**Figura 3.8a**) pela primeira vez, ainda na fase de anteprojeto, no laboratório do professor Ricardo Michel, do Instituto de Química da UFRJ, em dezembro de 2018. Também tive o primeiro contato com o alginato de sódio, hidrogel muito utilizado na bioimpressão 3D (**Figura 3.8b**).

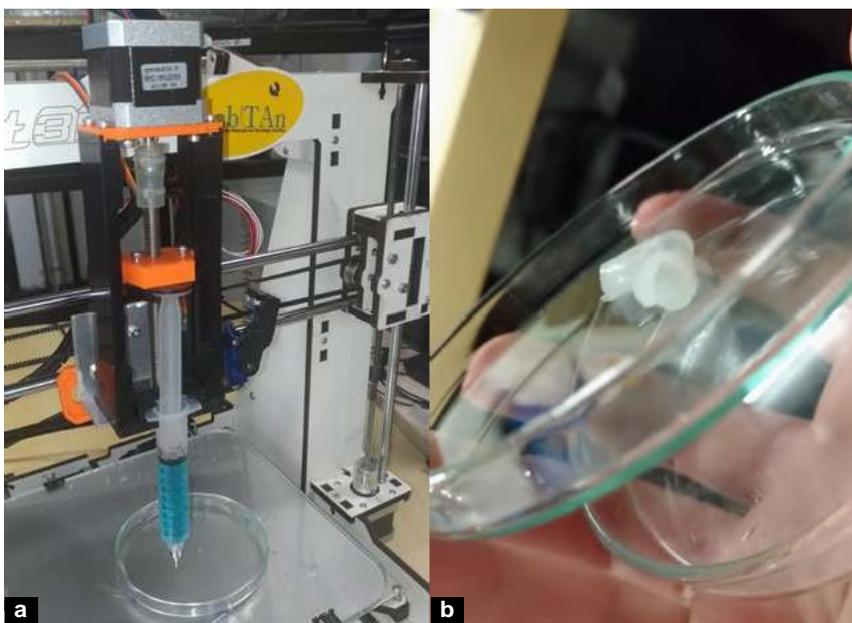


Figura 3.8 – Em (a), a impressora 3D com extrusora de seringa. Em (b), um tubo de alginato impresso.

Já durante o doutorado, um evento extremamente impactante para minha pesquisa foi o *V Workshop de Bioengenharia e Reparo Tecidual*, ocorrido de 22 de outubro a 01 de novembro de 2019, na UFRJ. Nele ocorreram mais de vinte palestras relacionadas, principalmente, à engenharia de tecidos. Além de aprender sobre o tema e descobrir diversas pesquisas e laboratórios na UFRJ que faziam uso de células-tronco, tive acesso a pesquisas que já utilizavam a tecnologia de impressão 3D. Por meio de uma delas – da professora Leandra Baptista – tive a oportunidade de conhecer o laboratório do INMETRO/UFRJ, que lida com células, em Xerém, e ter contato com uma bioimpressora profissional, a Regemat (**Figura 3.9**).



Figura 3.9 – Bioimpressora 3D Regemat, no INMETRO/UFRJ, em Xerém.

Posteriormente, entre 10 e 11 de fevereiro de 2020, também estive presente no 2º *Workshop de Bioimpressão e engenharia de tecidos no Rio de Janeiro*, ocorrido na UFRJ em Xerém. Nesse evento tomei conhecimento de empresas nacionais envolvidas na área, entre elas a BioEdtech⁸ e a 3DBS⁹, que produzem bioimpressoras 3D no país.

3.3.2.

Práxis da pesquisa e desenvolvimento dos experimentos

A partir dessa primeira fase de desbravamento dos temas da pesquisa, a metodologia da tese foi sendo delineada: seriam realizados experimentos temáticos, cada um possuindo uma literatura específica e uma curva de aprendizado. Cada experimento realizado deveria se tornar alicerce para o que seria executado no experimento seguinte. Dessa maneira, a apropriação dos temas alheios ao Design ocorreria de maneira gradual e adaptada à realidade da infraestrutura de cada etapa.

Ainda no primeiro ano de doutorado, em 2019, iniciei a construção de uma bioimpressora 3D *desktop* a partir de projetos e artigos encontrados na internet. À época, ainda estava aprendendo sobre os biomateriais e as biotintas, bem como sobre o processo de funcionamento da extrusão de fluidos, repleto de particularidades em relação à extrusão de filamentos.

⁸ Disponível em: <https://www.bioedtech.com.br/>. Acesso em: 10 fev. 2023.

⁹ Disponível em: <http://www.3dbiotechnologiessolutions.com/>. Acesso em: 10 fev. 2023.

No segundo semestre de 2019, visando realizar experimentos com células, realizei o primeiro contato com o laboratório do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas da UFRJ, que tinha experiência no uso de células-tronco. Foi a partir desse contato que eu soube do *V Workshop de Bioengenharia e Reparo Tecidual*, mencionado anteriormente. Depois de alguns encontros com os doutorandos do laboratório, um projeto de experimento começou a se desenhar, envolvendo a bioimpressão 3D tubular para estudos sobre o intestino. Desde então, já se deslumbrava o uso de uma bioimpressora com 2 módulos de extrusão, possibilitando assim a impressão de paredes interna e externa, com diferentes biotintas. No início de 2020, após termos conhecido a empresa 3DBS no *2º Workshop de Bioimpressão e engenharia de tecidos no Rio de Janeiro*, iniciamos conversas sobre adquirir uma bioimpressora 3D profissional, que possuísse mais módulos de impressão. A proposta do experimento principal estaria delimitada para 2020.

Entretando, em março de 2020 – no meu segundo ano de doutorado –, teve início a pandemia de COVID-19 no Brasil. O período de quarentena tornou proibitivo o funcionamento pleno de diversos laboratórios e, dessa forma, tanto a parceria quanto as negociações para a compra da máquina que estavam sendo firmadas até então não prosperaram. O início da pandemia também impediu o curso de disciplinas externas sobre polímeros e biomateriais, a serem realizadas no IMA (Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano) da UFRJ, outro revés.

Os percalços causados pela COVID-19 remodelaram a estrutura pensada inicialmente para os experimentos: a impossibilidade de parceria com outros laboratórios impedia, pelo menos à época, que os experimentos fizessem uso de células-tronco. Dessa maneira, contando com o eventual fim da pandemia, busquei focar no uso das bioimpressoras 3D e em testes de impressão de materiais. A incerteza acerca da possibilidade de certos experimentos ocorrerem também gerou a necessidade de se pensar em experimentos derivados, que acabaram ocorrendo de maneira simultânea.

Um fator diferencial para a pesquisa foi a inauguração do BiodesignLab PUC/DASA, ocorrida oficialmente em março de 2021. A parceria PUC/DASA, que já envolvia a presença de médicos do grupo no programa de pós-graduação em Design, contribuiu para uma melhor infraestrutura de espaço e de equipamentos, oferecendo um suporte extremamente relevante para a execução dos experimentos da pesquisa. Em janeiro de 2021, antes mesmo da inauguração oficial do laboratório de Biodesign, foi adquirida uma bioimpressora 3D profissional, a TissueStart, da empresa TissueLabs. Com ela foi possível realizar experimentos com maior precisão e eficácia, dando assim um salto de qualidade nas impressões.

Em fevereiro de 2021, assisti, de forma *online*, ao curso *Bioedtech Pharma and Cosmetics Innovation Week*, entre 23 e 26 de fevereiro, e tive contato mais aprofundado com o processo de calibragem e o uso de uma bioimpressora 3D, além de parâmetros

sobre os hidrogéis e o uso das células nas biotintas. Nele, também ocorreram palestras sobre pesquisas em andamento na área de engenharia de tecidos que utilizavam a bioimpressão 3D. O curso foi ministrado pela equipe da empresa nacional BioedTech, que também produzia bioimpressoras 3D.

Em junho de 2021, a partir de um contato obtido com o Dr. Ronaldo Andrade, médico especialista em transplantes de fígado e membro BiodesignLab, iniciou-se uma parceria com membros do GEF (Grupo de Estudos do Fígado), da UFRJ, que possibilitou a execução de experimentos até então fora do radar. Essa parceria almejava bioimprimir um construto celular tridimensional baseado em um fígado de rato, utilizando diferentes tipos celulares. Além de ministrar palestra sobre a bioimpressão 3D para o grupo de estudos, tive contato ao vivo com o processo de descelularização de fígados – coincidentemente, um dos temas de palestra do *V Workshop de Bioengenharia e Reparo Tecidual*. Durante o experimento, a ser detalhado no Capítulo 5, surgiu o interesse do BiodesignLab em adquirir um modelo de bioimpressora com 4 módulos, a V4, recém-lançado à época pela BioEdTech. O uso de 4 módulos independentes traria possibilidades consideráveis de inovação e convergia para o alvo da parceria com o GEF. A bioimpressora foi comprada, com previsão de entrega para o final de 2021. Entretanto, ainda como consequência da pandemia de COVID-19, que ainda afetava as cadeias produtivas globais, a entrega foi postergada para início de 2022.

Já em 2022, após os avanços do experimento descrito no Capítulo 5, ocorreu a entrega da bioimpressora de 4 módulos, porém, com um novo revés: ela não se encontrava em condições de uso e, após uma série de falhas, o modelo foi descontinuado. Como consequência, também perdeu força a parceria com o GEF.

Ainda no primeiro semestre de 2022, fui convidado para ministrar uma palestra sobre bioimpressão 3D e a indústria farmacêutica, no CRF-SP (Conselho Federal de Farmácia de São Paulo). Nesse período também recebi convite para escrever um capítulo sobre bioimpressão 3D e possibilidades para a medicina fetal no livro *3D Physical and Virtual Models in Fetal Medicine*, dos autores Heron Werner, Gabriele Tonni e Jorge Lopes Dos Santos, juntamente com Gabriel Liguori, um dos fundadores da TissueLabs. Também foi no primeiro semestre que realizei a qualificação de minha tese.

Envolto pelas adversidades e incertezas descritas, no final do primeiro semestre de 2022, busquei novos contatos para parcerias, visando a novos experimentos. Com a ajuda do biomédico Thiago Barboza, que participava à época do BiodesignLab, e de Antônio Thiele, antigo colaborador do NEXT, fui apresentado à professora Sara Gemini Piperni, fundadora do Laboratório de Biotecnologia Bioengenharia e Biomateriais Nanoestruturados (LaB&N) da UFRJ, e à bióloga Jéssica Dornelas, da Unidade de Pesquisas Clínicas do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUPE), da UFF. Ambas já possuíam atuação sólida em pesquisas

com células-tronco, esferoides celulares e biomateriais. Esta viria a se tornar a parceria derradeira para experimentos da pesquisa.

Logo após a apresentação das pesquisadoras, uma outra impressora foi disponibilizada para uso, a BioEnderTermo, enquanto um novo modelo seria desenvolvido no lugar da V4. Também foi firmada uma cooperação entre a empresa e o BiodesignLab, prevendo consultoria para a pesquisa em temas nos quais não houvesse conflito de interesse. Paralelamente ao delineamento de novos experimentos, foquei esforços no domínio do uso da BioenderTermo – bioimpressora que, apesar de posuir apenas um módulo, trazia possibilidades quanto ao controle de temperatura da extrusora e da mesa de impressão. Junto com a consultoria da BioedTech, ocorreu um novo salto de qualidade nos construtos impressos, agora já com maior domínio de uso do alginato de sódio.

A partir desse domínio da nova máquina e de uma série de reuniões com Sara e Jéssica, um novo experimento foi programado para ser executado no Hospital Universitário Antônio Pedro. Realizado em agosto de 2022, esse foi o primeiro experimento que utilizava células – no caso, esferoides celulares fixados. Diante dos resultados obtidos, foi possível compreender melhor as variáveis envolvidas, já pensando nas etapas seguintes. Antes da nova rodada de experimentos, fui convidado para ministrar uma palestra no Congresso Científico HUPE (Hospital Pedro Ernesto), da UERJ, sobre bioimpressão 3D no painel “Inovação na pesquisa e assistência médica”.

Para a nova rodada de experimentos, fui apresentado para o engenheiro químico Marcel Martins, parceiro de Sara e Jéssica em pesquisas científicas, e foi disponibilizado o uso do Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional, da professora Priscila Finotelli, na faculdade de Farmácia da UFRJ. Com as interações entre os diferentes campos de saber dos membros do grupo, somadas à infraestrutura disponível, foi possível um novo salto nos experimentos, como será exposto do Capítulo 7. Essa nova rodada durou até o final de 2022, quando a nova bioimpressora 3D foi entregue, não havendo tempo para inseri-la no processo.

Decidi, então, encerrar esta etapa do trabalho – inclusive com apoio dos outros membros do grupo criado, por julgarem que já havia avanços significativos a serem documentados.

3.4.

Considerações

Este capítulo trouxe a definição da estrutura da pesquisa, sendo qualitativa e exploratória, por tratar de um tema ainda recente – a bioimpressão 3D – tanto para o campo do Design quanto para os campos do saber em geral. Confiando no caráter interdisciplinar do Design e em sua capacidade de potencializar o intercâmbio de

diferentes disciplinas, busquei “atravessar” diferentes campos do saber, conjugando-os a fim de obter êxito no desenvolvimento dos experimentos.

Também discorri sobre a justificativa e a relevância dessa temática ser abordada em uma tese de Design. O decorrer da pesquisa e, principalmente, a escrita final da tese trouxeram à luz uma peculiaridade: ela possui duas “trilhas” simultâneas. Um dos caminhos, mais técnico, envolve os experimentos com a bioimpressão 3D e a confecção de biotintas para tal, agregando diferentes atores e saberes no processo. O outro, mais existencial, abrange a busca por um outro papel do designer na sociedade, uma resignificação do “fazer Design”, também de forma colaborativa.

Um panorama cronológico, com acontecimentos relevantes no decorrer do doutorado, fez-se necessário, principalmente pelo evento da pandemia de COVID-19, que trouxe uma série de revéses e desafios. Essa descrição do caminho da pesquisa também se apresenta como uma possibilidade diferencial, já que o Design se encontra “nalgum” lugar entre as ciências, entre elas, as humanas.

A partir da base de conhecimento estruturada nos capítulos até aqui, os próximos, contendo os experimentos práticos, aprofundarão temas específicos, conforme o que se apresentou em cada situação.

4

Experimentações com bioimpressão 3D e materiais

Neste capítulo apresento, inicialmente, o processo de construção de uma bioimpressora *desktop* a partir de um kit de impressora 3D de filamento. Após os primeiros testes com esse equipamento, o laboratório BiodesignLab DASA/PUC adquiriu um modelo profissional, a TissueStart, da empresa Tissue Labs. Com essa máquina, pude alcançar melhores parâmetros de calibração de impressão, além de realizar testes com diferentes materiais. Também foi o primeiro momento de ensinar, na prática, a impressão com materiais viscosos para diferentes pesquisadores.

4.1.

Desenvolvimento da bioimpressora 3D *desktop*

Ainda na revisão bibliográfica inicial, foi possível encontrar projetos de customização de impressoras 3D em bioimpressoras. Como exposto no Capítulo 2, o movimento *maker* exerceu grande influência no mercado de bioimpressoras 3D. Dessa maneira, havia referencial teórico e prático sobre o assunto (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3).

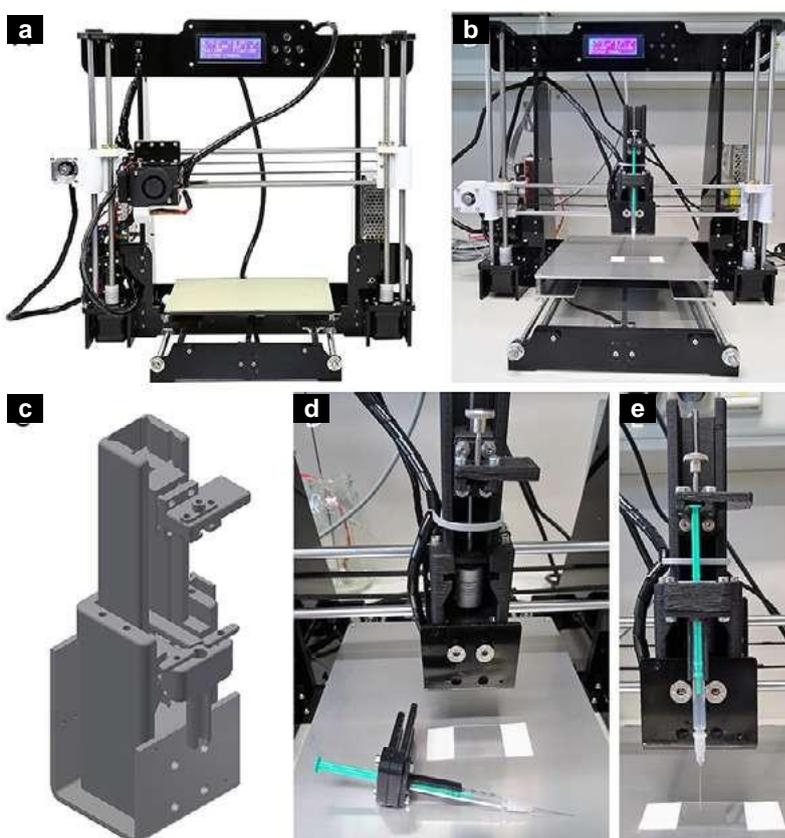


Figura 4.1 – Impressora 3D de seringa a partir de uma impressora 3D *desktop* modelo *Prusa*. Fonte: Kahl *et al.* (2019, p. 3).

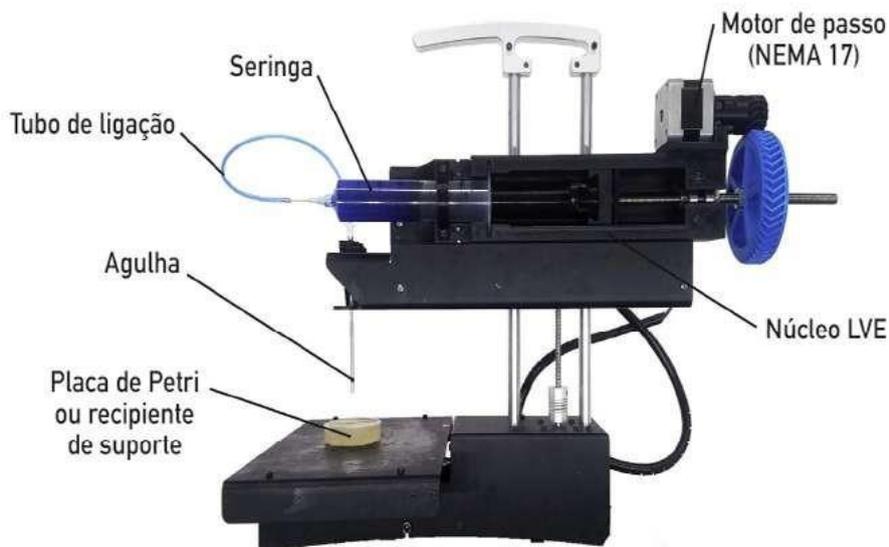


Figura 4.2 – Impressora 3D de seringa a partir de uma impressora 3D *desktop* modelo *Printrbot*.
Fonte: Adaptado de Pusch *et al.* (2018, p. 50).

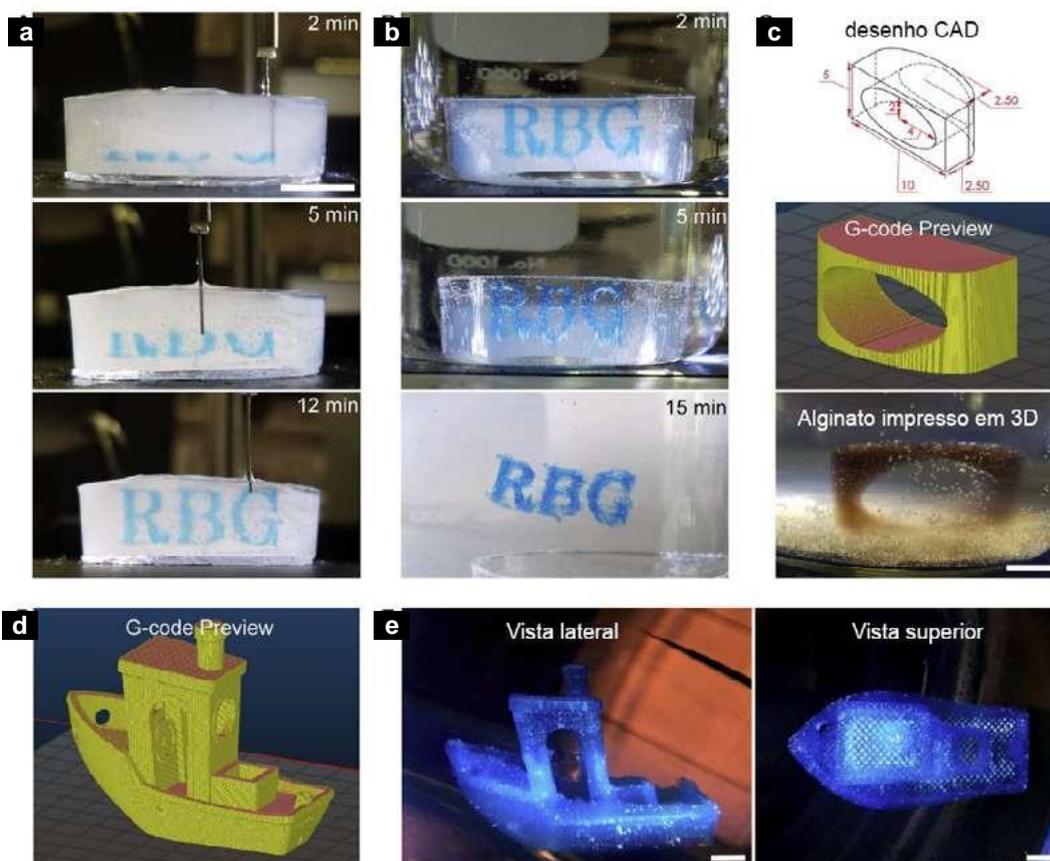


Figura 4.3 – Resultados obtidos com o modelo *Printrbot* adaptado. Fonte: Adaptado de Pusch *et al.* (2018, p. 60).

A bioimpressora 3D *desktop* foi pensada a partir de um kit de montagem de impressora 3D que havia adquirido, ainda na caixa. O modelo é o K86 (também

chamado Mix G3 e KunPrinter), baseado no projeto RepRap e com várias partes impressas em plástico (**Figura 4.4**)

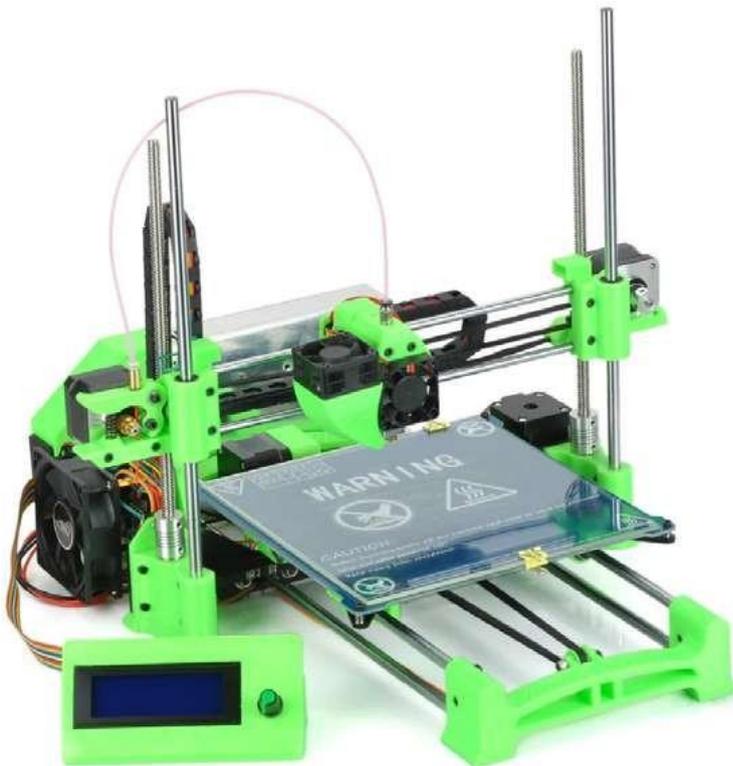


Figura 4.4 – Exemplo de impressora 3D modelo K86, montada. Fonte: <https://pt.aliexpress.com/item/32558880551.html?gatewayAdapt=glo2bra>.

4.1.1.

Primeira extrusora de seringa – *bowden*

Por se tratar de um modelo menos robusto, diferente dos utilizados nos projetos encontrados inicialmente, foi feita a escolha por uma extrusora no sistema *Bowden*, em que as partes de maior peso não ficam junto ao bico de extrusão (no caso, a agulha), o que diminui o comprometimento do movimento do eixo X. Esse sistema também minimiza o gotejamento residual ao fim de cada ciclo de camada de impressão, pois a seringa não precisa ficar na posição vertical.

Entre os projetos encontrados, foi escolhido o *Syringe Pump – Automatic dispensing of liquids*¹, pois possuía menos itens não impressos, simplificando o processo de produção e alteração de peças (**Figura 4.5**). Tal projeto não foi concebido para uso em impressora 3D e tampouco utilizava medidas no padrão nacional de seringas, o que demandou alterações no projeto (**Figura 4.6**).

¹ Disponível em: <https://www.drdflo.com/pages/Projects/Syringe-Pump.html>. Acesso em: 12 abr. 2022.

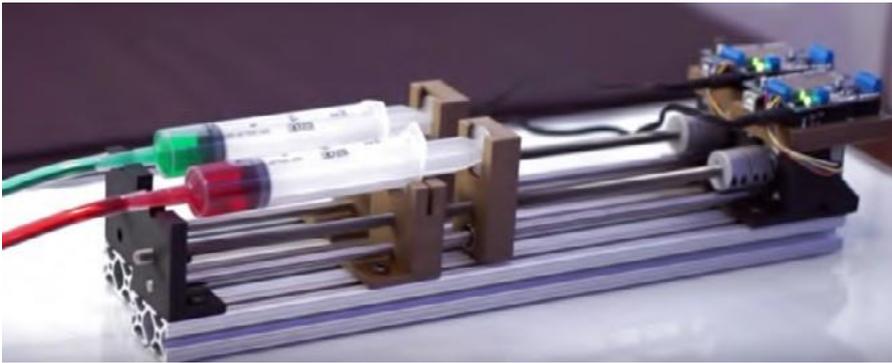


Figura 4.5 – Projeto de dispersão de líquidos, utilizando peças impressas em 3D. Fonte: <https://hackaday.com/2017/02/26/diy-syringe-pump-saves-big-bucks-for-hackers-lab/>.

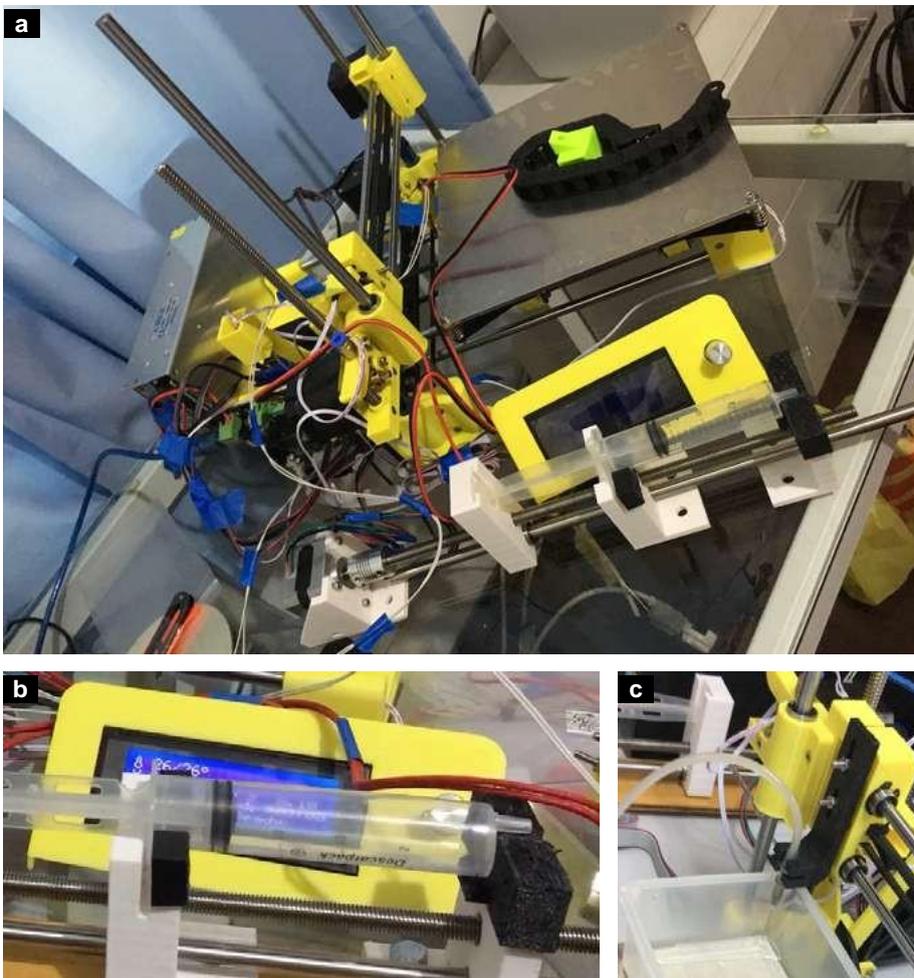


Figura 4.6 – (a) Impressora K86 e primeiro teste de funcionamento da extrusora de seringa *bowden*. (b) peças impressas para adaptar a extrusora às medidas de seringa nacionais, em filamento preto. (c) suporte para a seringa do sistema *bowden*, impressa em filamento preto.

No primeiro teste com a extrusora de seringa foi utilizado gel fixador de cabelo, por ele possuir viscosidade similar aos hidrogéis usados na bioimpressão e ter custo baixo de aquisição. Os testes serviram para melhor entendimento dos

parâmetros do *software* da impressora 3D a serem modificados para o uso da extrusora de seringa, como fluxo, velocidade e diâmetro de extrusão (**Figura 4.7**).



Figura 4.7 – Impressão de teste com gel fixador de cabelo. Apesar da forma inicial correta, a velocidade de impressão e a falta de estrutura do material ocasionaram o colapso do modelo.

O segundo teste, ocorrido no Instituto Nacional de Tecnologia, com o auxílio do professor Ricardo Michel, do Instituto de Química da UFRJ, utilizou como materiais o alginato de sódio + bicarbonato de potássio (presente no medicamento LuftaGastroPRO) diluído em água destilada (proporção 1:4) e o cloreto de cálcio diluído em água destilada (proporção de 1:10). Primeiramente, o alginato de sódio + bicarbonato de potássio + água destilada foi impresso diretamente da seringa para a bandeja da impressora mas, por conta da baixíssima viscosidade da mistura, a forma impressa colapsou rapidamente (**Figura 4.8**). Na ocasião, pensei ser necessário adicionar um espessante na fórmula da tinta, como a goma xantana (espessante alimentício).



Figura 4.8 – Impressão da mistura de alginato de sódio + bicarbonato de potássio com água destilada, sem obtenção de uma forma definida.

Sabendo que, ao entrar em contato com o cloreto de cálcio, o alginato de sódio + bicarbonato de potássio se torna alginato de potássio (que possui maior

estabilidade dimensional), foi realizado outro teste. A mistura do alginato foi colocada na seringa e, em um recipiente de suporte, foi adicionado o cloreto de cálcio + água destilada (**Figura 4.9**). Entretanto, como não havia o controle da altura do nível do cloreto de cálcio, a tinta contendo alginato reagiu com o suporte sem haver a criação de camadas, criando um impresso amorfo.



Figura 4.9 – Em (a) materiais utilizados no experimento. Em (b) impresso amorfo resultante da impressão no recipiente contendo a mistura de água destilada + cloreto de cálcio.

Em consulta posterior ao professor Michel, foi apresentada a solução para esse entrave, com o uso de *vasos comunicantes* (**Figura 4.10**), por meio de um reservatório contendo cloreto de cálcio + água destilada, fixado no eixo X da impressora, e de uma mangueira ligando esse reservatório ao recipiente na bandeja de impressão. Dessa maneira, o nível da solução subiria de acordo com a elevação do eixo Z da impressora, permitindo que as primeiras camadas do alginato fossem reticuladas. Também impedia que as camadas mais recentes não entrassem em contato com a solução, facilitando assim a adesão com novas camadas. Esse processo, entretanto, não chegou a ser testado.

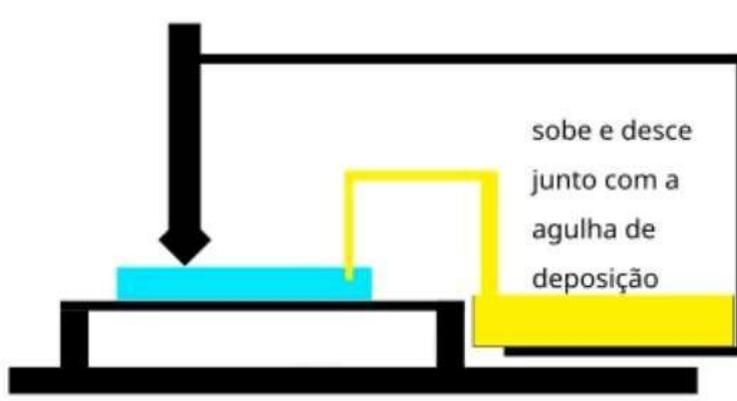


Figura 4.10 – Esquema de vasos comunicantes: o reservatório fixado no eixo X (em amarelo) preenche gradualmente o recipiente na bandeja de impressão (em azul), à medida que a seringa é elevada no eixo Z, alinhado com a última camada impressa. Fonte: arquivo pessoal do professor Ricardo Michel.

A primeira rodada de experimentos serviu para entender melhor a calibragem da extrusora de seringa e as vantagens e desvantagens do modelo *bowden*. Apesar de diminuir consideravelmente o gotejamento residual, o sistema produzia com frequência bolhas nos tubos, o que compromete seriamente os construtos impressos. A distância entre a seringa e a agulha de saída também resultava em um esforço maior do motor para empurrar o êmbolo da seringa, forçando-o excessivamente.

Outro fator importante nos experimentos foi o uso de materiais diferentes nos testes, expondo a necessidade de aprofundamento na teoria e na prática relacionadas à impressão 3D de fluidos e de materiais viscosos.

4.1.2.

Segunda extrusora de seringa – *direct*

A partir dos resultados obtidos nos testes com a primeira extrusora, optei por utilizar uma extrusora de seringa modelo *direct* (em que a seringa está ligada diretamente à agulha, perpendicular à mesa de impressão). Novamente, após busca por modelos na internet, foi escolhido o projeto *Simple Syringe Pump*², também por ser composto, em sua maioria, por peças impressas em plástico (**Figura 4.11**).

² Disponível: em <https://www.thingiverse.com/thing:866904>. Acesso em: 13 ago. 2021.

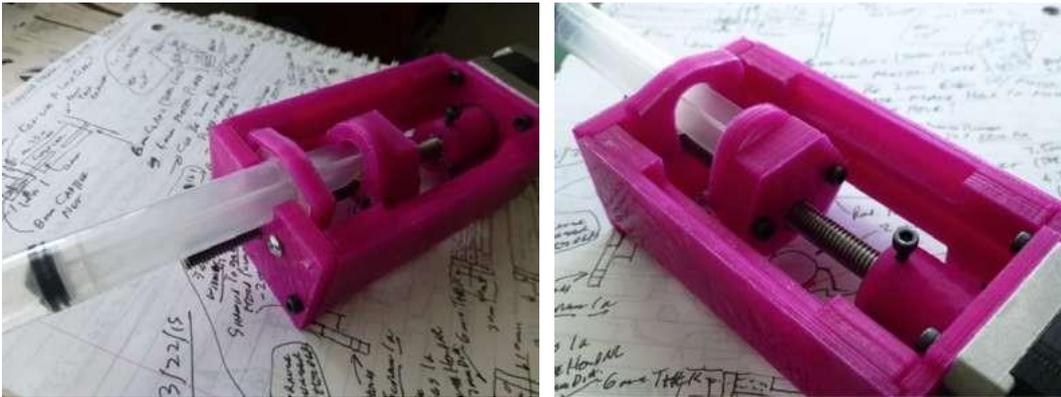


Figura 4.11 – Imagens do projeto *Simple Syringe Pump*. Fonte: <https://www.thingiverse.com/thing:866904>.

Esse projeto, conforme relatado pelo professor Mitchel, também foi a base para a extrusora desenvolvida em seu laboratório e vista em 2018 (porém sem registro fotográfico à época) e, assim como o modelo do professor, precisou ser modificado para atender ao modelo de seringa nacional de 10 ml. O projeto 3D também foi modificado para facilitar a inserção e a retirada de seringas, diminuindo a quantidade de peças, e para fixar a extrusora na estrutura da impressora K86 (**Figura 4.12**).

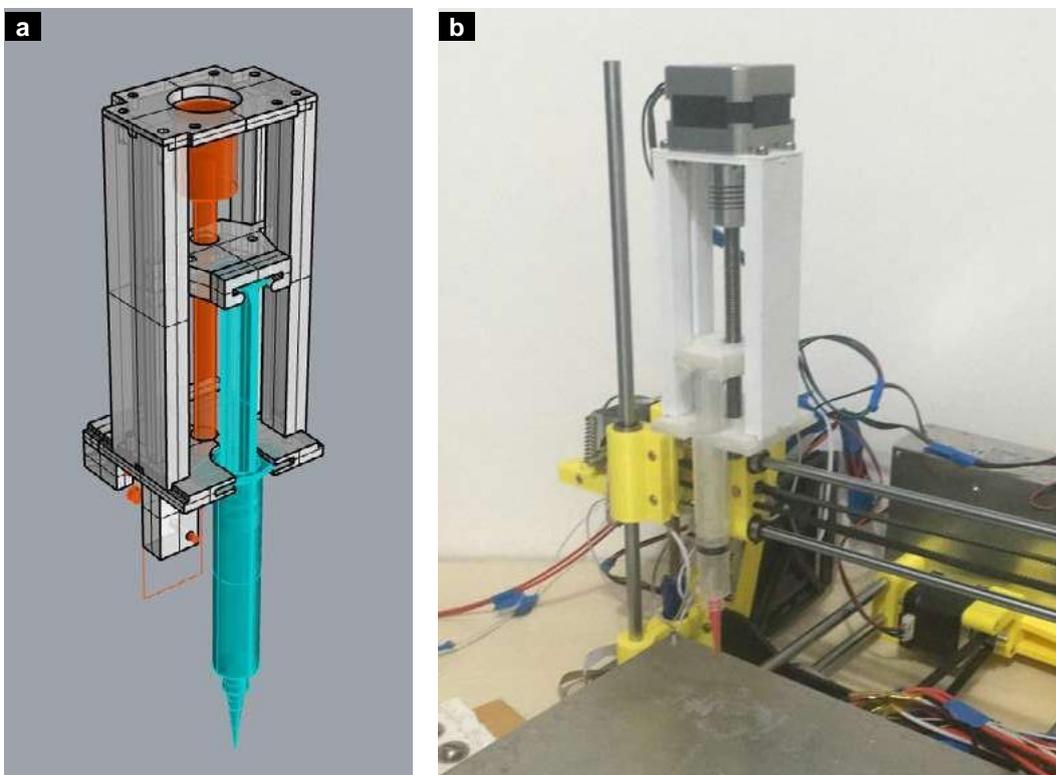


Figura 4.12 – Em (a), modelo 3D customizado para seringa nacional. Em (b), modelo impresso instalado na impressora K86.

Após assistir a vídeos sobre o tema e a partir de literatura específica, passei a utilizar o creme Nivea para os experimentos, pois ele é considerado como padrão de calibragem na bioimpressão por suas propriedades reologia e printabilidade – como elasticidade, viscosidade e plasticidade (PATXON *et al.*, 2017). Os testes com a extrusora de seringa *direct* geraram modelos com certa fidelidade e estabilidade geométrica graças ao creme Nivea (**Figura 4.13**).

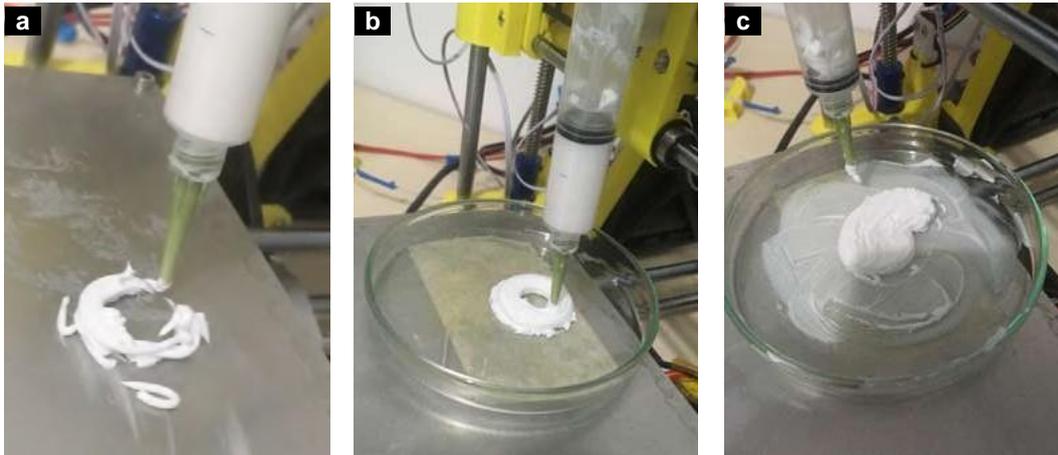


Figura 4.13 – Em (a), a primeira impressão com o creme Nivea, ainda buscando o melhor parâmetro de fluxo do material. Em (b), um modelo impresso de um anel. Em (c), o modelo de uma orelha.

Cabe, desde já, apresentar os três tipos de agulha utilizados nos experimentos (**Figura 4.14**):

- agulhas de haste curta: utilizadas em impressões regulares e no sistema FRESH com recipientes de baixos (como placa de petri);
- agulhas de haste longa: utilizadas em impressões no sistema FRESH com recipientes altos (como béquer);
- ponteiros: utilizadas em impressões regulares.

Também passou a ser adotado o uso da abreviação G (de *Gauge*) ao se fazer referência ao calibre das agulhas. Foi estabelecido como padrão o uso de seringas com bico *Luer Lock*, por possuírem encaixe do canhão de ponteiros e agulhas por meio de rosca – oferecendo menor chance de soltura da seringa em relação ao padrão *Luer Slip* (**Figura 4.15**). O bisel das agulhas utilizadas é sempre reto, diferente da maioria daquelas vendidas nas farmácias e lojas de artigos médicos em geral.

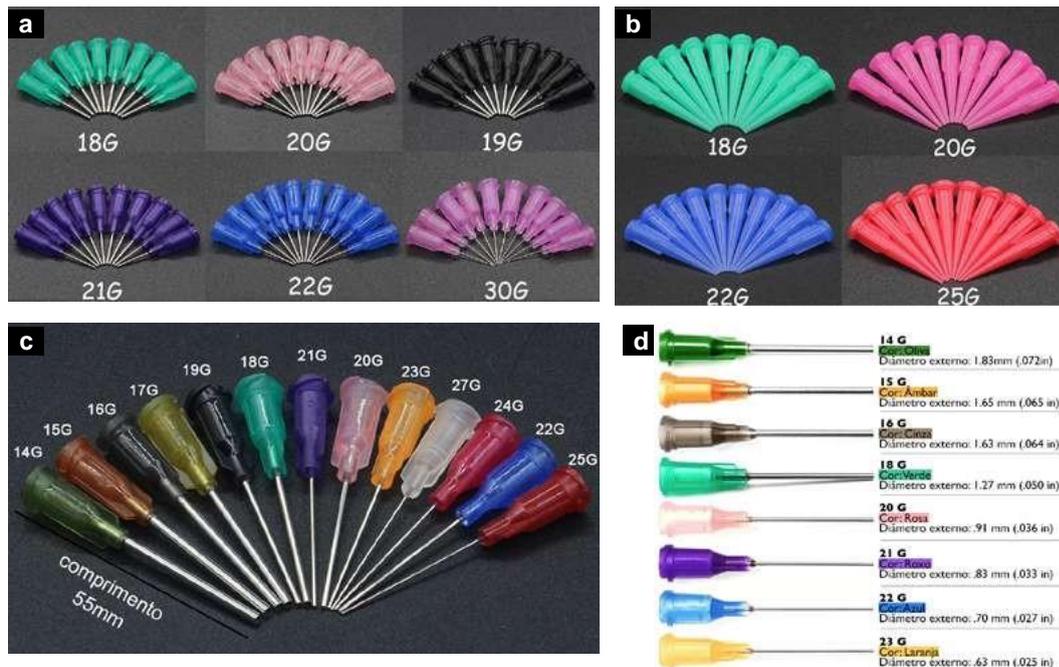


Figura 4.14 – Em (a), diferentes agulhas curtas. Em (b), agulhas longas. Em (c), ponteiros e, em (d), tabela com os calibres de seringas em G e suas respectivas cores (existe variação de cor/espessura entre os produtos nacionais e importados). Fontes: (a, b, c) Adaptado de <https://pt.aliexpress.com/store/3679002?spm=a2g0o.detail.1000007.1.2df3755duH48yu>. (d) Adaptado de <https://pt.aliexpress.com/item/33054644711.html>.

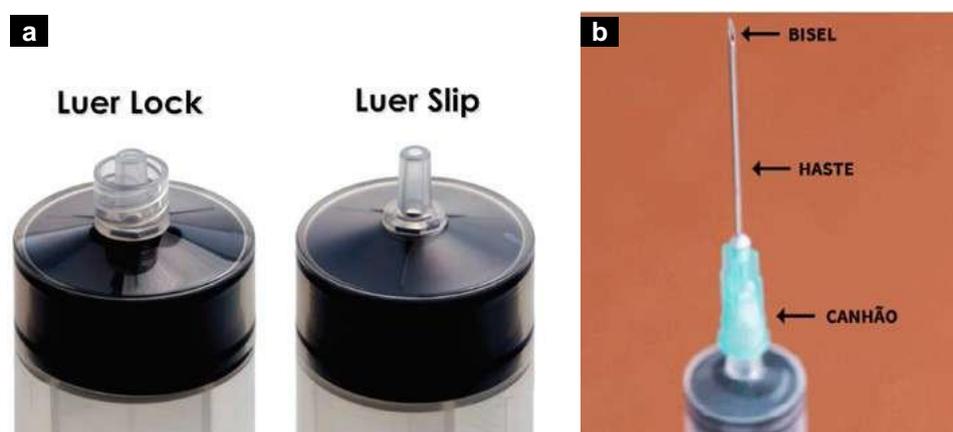


Figura 4.15 – Em (a), os diferentes tipos de encaixe em seringas. Em (b), a nomenclatura das partes de uma agulha. Fontes: (a) <https://indavidas.com.br/diferenca-entre-as-seringas-luer-lock-e-luer-slip/>. (b) <https://blog.maconequi.com.br/tipo-de-agulha/>.

Para esse experimento foram utilizadas ponteiros em vez de agulhas, por oferecerem menor resistência ao êmbolo devido a sua forma cônica. Os diferentes calibres das ponteiros trouxeram novamente o desafio da calibragem no *software*. Logo após a realização dos primeiros testes com a segunda extrusora, o BidesignLab DASA/PUC-Rio adquiriu uma bioimpressora modelo TissueStart.

4.2. Bioimpressora TissueStart

A bioimpressora 3D TissueStart, da empresa brasileira TissuLabs, foi produzida especificamente para uso em laboratório de bioimpressão. Sua construção prevê o uso em capelas de fluxo laminar (equipamentos que visam proteger os experimentos de contaminação por bactérias e fungos). Ela possui guias lineares nos eixos, ao invés de barras rosqueadas, o que proporciona maior precisão nos movimentos dos eixos X e Y. Por ser um modelo específico para laboratórios, sua área de impressão é reduzida, comparada a impressoras 3D de filamento. Ela possui espaço para duas seringas, que funcionam de modo independente ou simultâneo (**Figura 4.16**). O *software* de fatiamento é o RepetirHost³, com um *plug-in* proprietário da TissueLabs.

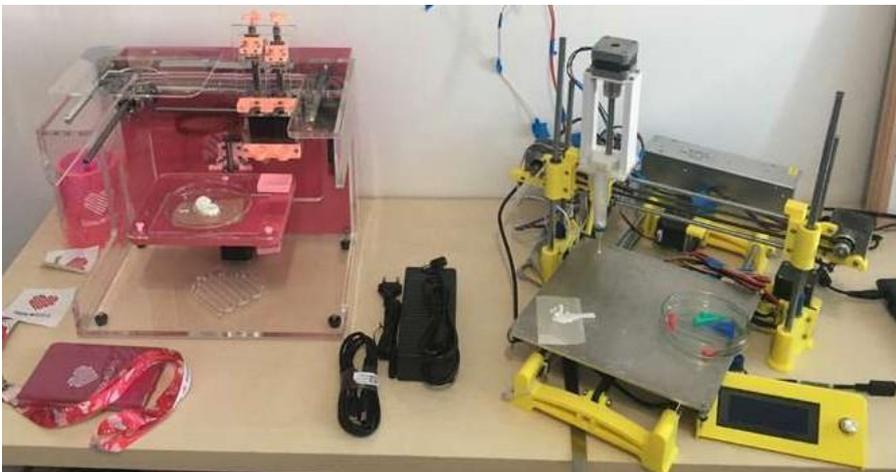


Figura 4.16 – A TissueStart ao lado da K86 adaptada.

Os primeiros testes, utilizando tintas que vieram com a máquina, demonstraram a superioridade na resolução dessa máquina em relação a K86 adaptada (**Figura 4.17**).

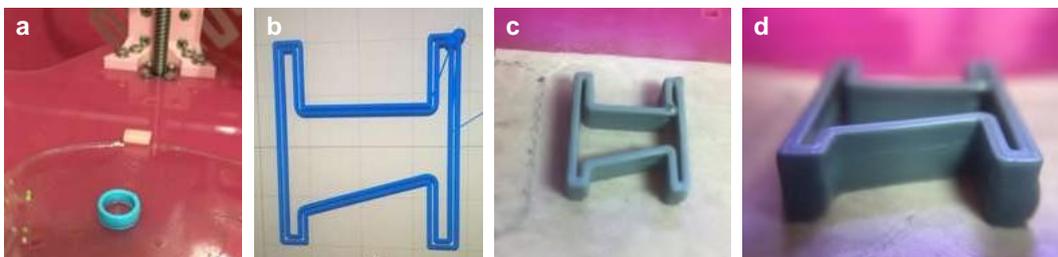


Figura 4.17 – Em (a), teste de um tubo impresso. Em (b), modelo 3D gerado para calibragem. Em (c), modelo impresso visto de cima. Em (d), modelo impresso visto por lente macro, mostrando a qualidade de impressão no eixo Z.

³ Disponível em: <https://www.repetier.com/>. Acesso em 2 out. 2019.

O teste seguinte fez uso do método de impressão suportada em hidrogel para gerar formas mais complexas sem a necessidade de suportes (**Figuras 4.18 e 4.19**).

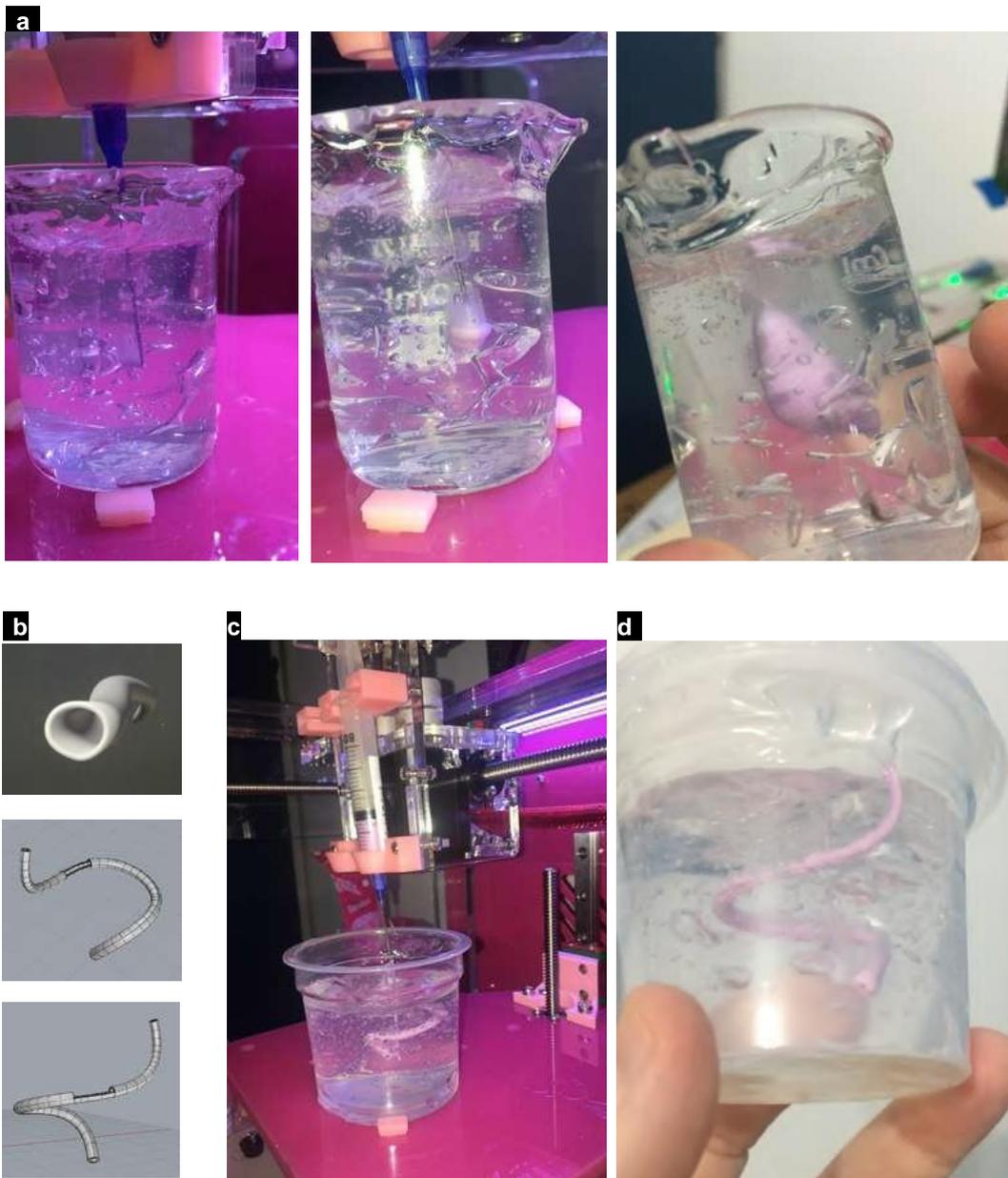


Figura 4.18 – Em (a), processo de impressão de modelo de mini fígado no método de impressão suportada em hidrogel. Em (b), modelo 3D gerado para testar a resolução de estruturas tubulares. Em (c) e (d), estrutura tubular simulando um vaso, impressa na TissueStart.



Figura 4.19 – Modelo impresso de nariz a partir de arquivo fornecido junto da TissueStart.

Desses testes iniciais, pôde-se observar o superaquecimento dos motores de extrusão, quando colocados em períodos superiores a uma hora. Outra questão foi o uso de agulhas com calibres mais finos, superiores a 20G. Nesses casos, além do superaquecimento dos motores devido à maior pressão necessária para extrudar o material, ocorreu deformação das peças da bioimpressora.

O teste seguinte buscou a melhor maneira de se imprimir com duas seringas de maneira simultânea na TissueStart. O domínio dessa forma de uso seria crucial para experimentos futuros utilizando células por possibilitar a impressão de construtos celulares com paredes interna e externa, por exemplo. Apesar de alcançar alguma semelhança com os modelos 3D, a impressão com duas seringas nessa máquina desperdiçava muito material. A falta de uma elevação da seringa no eixo Z, quando não estando em uso, causa a colisão entre os diferentes materiais, misturando as tintas e, impossibilitando, a princípio, o uso dela nesse tipo de impressão (**Figura 4.20**).



Figura 4.20 – Modelo de teste utilizando as tintas fornecidas junto da TissueStart. Apesar da forma impressa ser semelhante ao modelo 3D, o desperdício de material inviabilizava o uso com células.

Nesse momento dos testes, eu já havia iniciado as conversas com os doutorandos do laboratório da pós em Ciências Morfológicas da UFRJ, direcionando, desde então, os modelos 3D a partir do tecido do cólon intestinal, foco de pesquisa de um dos estudantes (**Figura 4.21a**). Após diversos testes de calibragem, um modelo com parede interna e externa foi gerado em 3D para vislumbrar a aplicação de duas seringas na bioimpressão de vasos com parede interna e externa (**Figura 4.21b**). O uso de duas tintas com características levemente diferentes (a tinta translúcida era ligeiramente mais líquida que a azul) gerou uma reação entre elas, fazendo a tinta translúcida ser absorvida pela tinta azul. Além disso, ocorreram algumas falhas na impressão (por conta de velocidade e calibragem de retração da tinta na troca de seringas), gerando desperdício de material (**Figura 4.21c**).

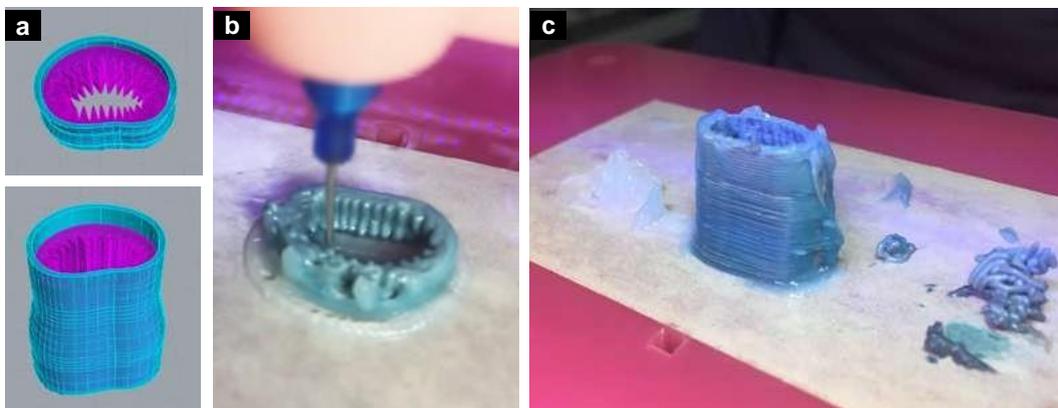


Figura 4.21 – Em (a), modelo 3D gerado, simulando a estrutura com paredes externa (lisa) e interna (com vilosidades). Em (b), início da impressão, mostrando a simulação de vilosidades da parede interna. Em (c), modelo impresso com duas tintas nas paredes interna e externa e o material desperdiçado.

Apesar desses entraves e do desperdício de material, o teste provou ser possível a impressão de um construto com paredes interna e externa, além de formas complexas, mesmo em escala reduzida, nas impressões.

Buscando diminuir o gotejamento e o conseqüente desperdício de material, além de aumentar a área útil de impressão ao estreitar a distância entre as agulhas, desenvolvi uma peça semelhante ao *Mixtrusor*, a qual que vem junto com a TissuStart. O *Mixtrusor* liga as duas seringas em uma agulha, possibilitando a mistura das tintas para uso simultâneo (**Figura 4.22a**). Também é possível o uso alternado das seringas, porém ocorrendo a contaminação entre elas durante as trocas de tinta (**Figura 4.22b**). Dessa maneira, é possível criar construtos com diferentes camadas na vertical, mas um modelo com paredes interna e externa ficaria prejudicado pela mistura constante das tintas.

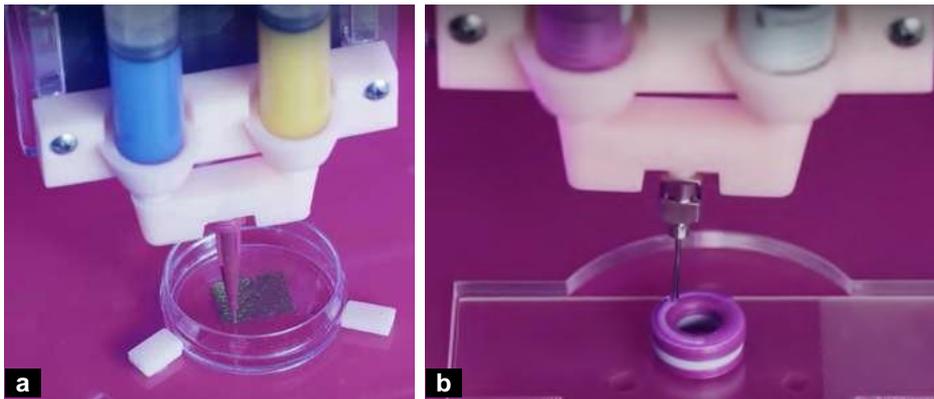


Figura 4.22 – Em (a), o Mixtrisor misturando as tintas. Em (b), o uso independente de cada tinta, porém ocorrendo mistura durante a troca. Fonte: <https://www.tissuelabs.com/tissuestart>.

Na modelagem 3D, vislumbrei duas formas para os canais entre as seringas e as agulhas acopladas, optando pelo canal mais retilíneo – a partir da indicação de uma engenheira mecânica – por ele oferecer menor resistência em relação ao canal curvo. Após a modelagem, as peças foram impressas em resina, pois esse tipo de impressão possui maior resolução em relação à impressão com filamento. Vários formatos foram testados, chegando finalmente na versão 4a. A peça foi batizada de TissueDual (**Figura 4.23**).

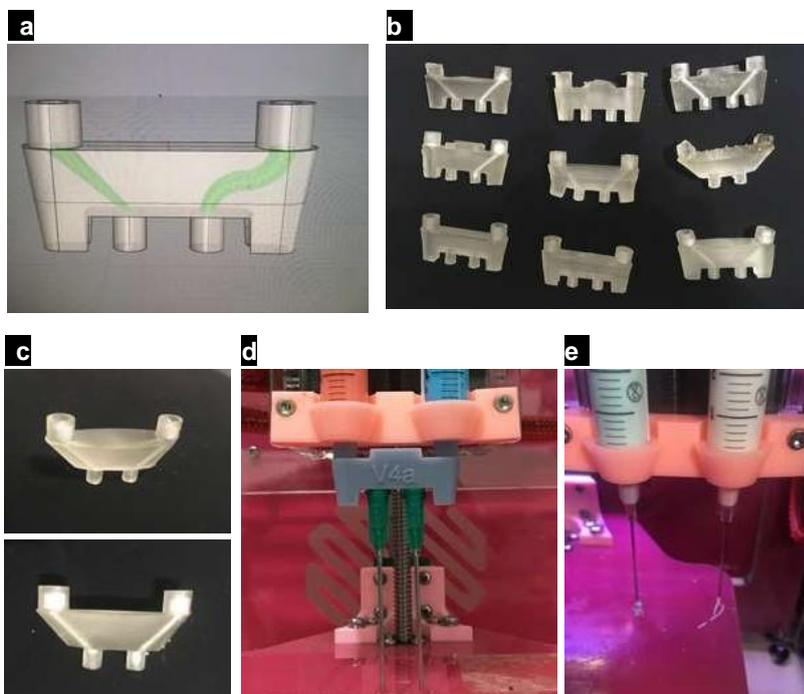


Figura 4.23 – Em (a), modelo 3D com duas possibilidades de canais. Em (b), impressões de teste de versões da TissueDual. Em (c), peça impressa com sucesso para primeiro teste prático, utilizando canal reto. Em (d), modelo final, TissueDual V4a. Em (e), imagem da distância entre seringas sem a peça, para comparação.

Com a TissueDual desenvolvida, foram realizados testes com impressão direta e no método de impressão suportada em hidrogel, com certo sucesso no quesito desperdício de material, pois a curvatura do canal interno atuava diminuindo o gotejamento residual nas agulhas (**Figura 4.24**). Esses testes foram realizados com creme Nivea tingido com tinta guache para melhor visualização das duas diferentes tintas.

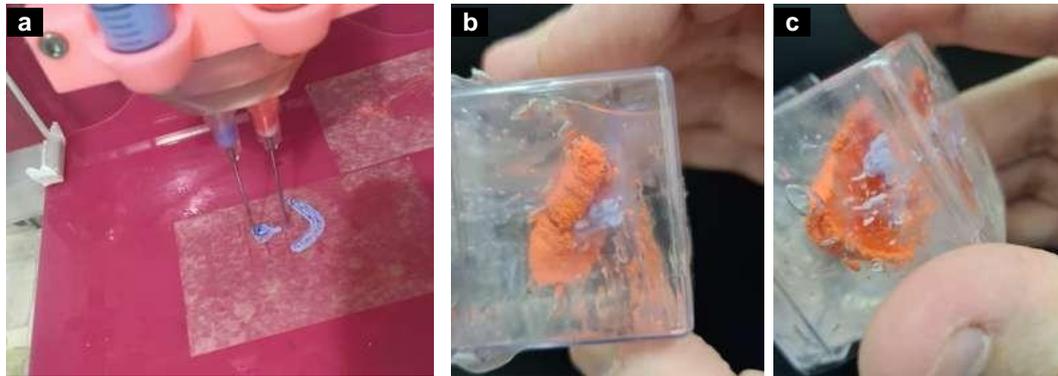


Figura 4.24 – Em (a), primeiro teste com a TissueDual. Em (b, c), impressão com a TissueDual no método de impressão suportada em hidrogel.

A bioimpressora TissueStart possui um *plug-in* proprietário para uso no fatiador RepetierHost, apesar de ser possível utilizá-la em outros fatiadores. Esse uso, porém, mostra-se limitado, pois alguns recursos da máquina não são passíveis de controle fora do *plug-in* – como o controle de fluxo simultâneo das seringas com o Mixtrusor e a luz de LED, por exemplo. Para o uso independente de cada seringa, foram utilizados outros fatiadores, como o PrusaSlicer.

4.3.

Impressão com diferentes materiais

Neste subcapítulo, apresento os experimentos com diferentes materiais utilizando a TissueStart. Por causa da pandemia de COVID-19, as parcerias com laboratórios com pesquisas de células não puderam ser levadas adiante. Essa situação mudou a pesquisa para uma rota alternativa, sem deixar de lado a busca pela prática da bioimpressão. O uso desses materiais converge com a proposta de bioimpressão, por serem hidrogéis das mesmas famílias dos utilizados para a formulação de biotintas – apesar de os materiais utilizados terem aplicações predominantemente alimentícias, sendo vendidos em escala comercial.

4.3.1. Creme Nivea

Como exposto anteriormente, o creme Nivea (**Figura 4.26**) é considerado um material padrão para calibração de bioimpressoras. Devido ao seu custo e a sua facilidade de aquisição, foi o material mais utilizado nos testes e desempenhou o papel de calibração inicial de todas as máquinas adquiridas. A partir de diversos testes de calibragem, foi possível estabelecer um padrão mínimo de qualidade geométrica para os construtos (**Figura 4.25**). Para seu tingimento, foram utilizados corantes para chocolate, por serem lipossolúveis (**Figura 4.26**).

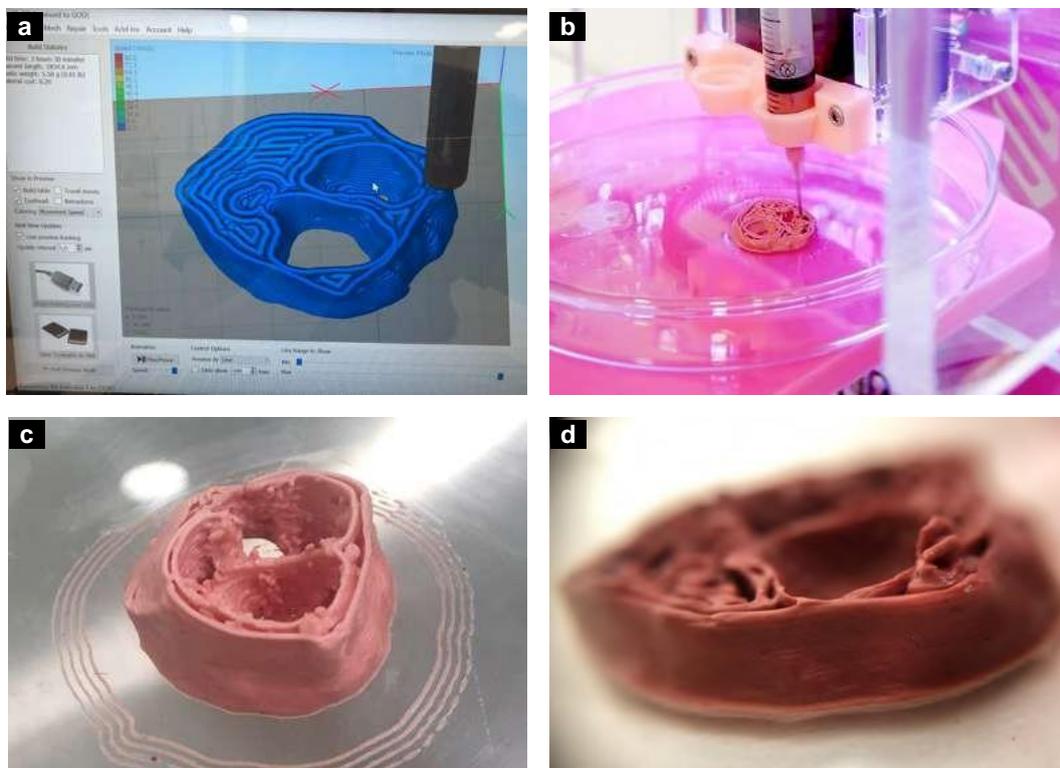


Figura 4.25 – Em (a), o arquivo 3D fatiado no *software*. Em (b), o processo de impressão na TissueStart. Em (c), o modelo impresso. Em (d), fotografia macro, de outra impressão, mostrando a parede do construto e as camadas sobrepostas.



Figura 4.26 – Tintas preparadas com creme Nivea e corantes lipossolúveis para chocolate.

4.3.2.

Alginato

O alginato é um hidrogel amplamente utilizado na bioimpressão, por sua printabilidade e viabilidade celular, e também na odontologia, para a obtenção de moldes dentários (por ser hipoalergênico), em cosméticos e na indústria alimentícia, conferindo aos alimentos propriedades de textura, como espessamento, aderência, emulsificação, gelificação ou volume⁴. Ele é comumente extraído de algas marrons, mas também pode ser encontrado em bactérias.

Os primeiros testes, em parceria com o doutorando do BiodesignLab Pedro Timótheo, foram realizados com alginato alimentício, tingido com corantes alimentícios a base de algas (**Figura 4.27**). Foi possível observar que o tempo em que a estrutura se mantém antes de colapsar é muito curto, já que o alginato precisa ser banhado com solução de íons divalente (como o cloreto de cálcio) para que ocorra a sua reticulação, tornando-o mecanicamente estável.

⁴ Disponível em: <https://revista-fi.com/artigos/todos/os-alginatos-e-suas-multiplas-aplicacoes>. Acesso em 14 mar. 2023.



Figura 4.27 – Apesar da excelente printabilidade, o alginato não manteve sua forma, desfazendo-a ainda durante a impressão.

Alguns procedimentos foram aventados, como o uso de sprays com cloreto de cálcio na peça durante a impressão das camadas ou o uso de impressão suportada em hidrogel contendo cloreto de cálcio.

4.3.3.

Gelatina

A gelatina é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno, presente principalmente nos tecidos conjuntivos do corpo. É amplamente utilizada na indústria alimentícia e farmacêutica para a produção de cápsulas gelatinosas, por exemplo. Na bioimpressão pode ser utilizada como biotinta contendo células (podendo ser misturada com outro hidrogel, como o alginato) ou mesmo como material de suporte, no método FRESH.

Apesar de hidrofílica, a gelatina é relativamente insolúvel em água fria. Para sua solução, é preciso aumentar a temperatura da água de 30° C a 35° C. Essa solução sofre gelificação⁵ quando resfriada, formando assim um gel termorreversível⁶.

Nesse experimento foi utilizada gelatina alimentícia sem sabor, além de corante alimentício a base de algas. Assim como no preparo de gelatina para consumo, foi feita a mistura do pó em água em temperatura ambiente. Após 30 segundos da solução aquecida no microondas, ela foi colocada na geladeira por 30 minutos para ocorrer a gelificação.

⁵ Transformar-se em gel. Disponível em: <https://www.infopedia.pt/dicionarios/lingua-portuguesa/gelificar>. Acesso em: 13 jan. 2023.

⁶ Disponível em: https://aditivosingredientes.com/upload_arquivos/201603/2016030276280001459276636.pdf. Acesso em: 13 jan. 2023.

Inicialmente, foi feito um teste em molde para entender a viscosidade e a tenacidade da estrutura já gelificada (**Figura 4.28a**). Percebeu-se também que, após algumas semanas na geladeira, tais exemplares se tornavam totalmente rígidos (**Figura 4.28b**)

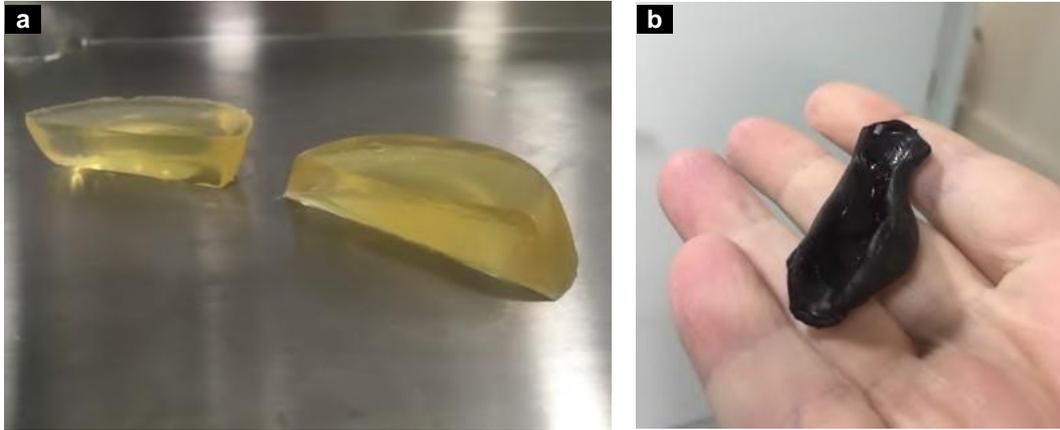


Figura 4.28 – Em (a), teste com gelatina e, em (b), modelo solidificado após período na geladeira.

Na impressão com a TissueStart, ocorreu o mesmo que com o alginato: pela falta de controle de temperatura, a tinta se mostrava pouco viscosa, colapsando rapidamente. Outro ponto em comum entre ambos os materiais era a solidificação após alguns dias, formando espécies de filmes plásticos (**Figura 4.29**).



Figura 4.29 – Testes com alginato e gelatina, após período em temperatura ambiente.

A gelatina alimentícia ainda seria utilizada em mais um experimento, mostrado adiante.

4.3.4. Silicone

O silicone é um polímero sintético, amplamente utilizado na indústria biomédica em implantes, desde a década de 1940, devido às suas excelentes propriedades mecânicas e sua biocompatibilidade. Os polímeros de silicone são versáteis e podem ser formulados em vários tipos de materiais distintos, incluindo elastômeros, géis, adesivos e muito mais, dependendo da aplicação pretendida (ZARE *et al.*, 2021). Utilizado industrialmente, pode conter vários aditivos ou cargas, incluindo corantes, antioxidantes, aditivos reguladores de textura, bem como moldicidas, fungicidas e bactericidas.

Para o teste inicial, foi empregada a borracha de silicone platina, da marca Siquinol⁷. Ela é utilizada em moldes alimentícios, com dureza *shore* A30 (**Figura 4.30**) e mistura por adição dos componente A + B, com proporção indicada 1:1. Antes mesmo da bioimpressão, foram testadas diferentes proporções, a fim de se obterem diferentes durezas. Quanto maior a concentração do componente B em relação ao componente A, menos rígida era a borracha final (**Figura 4.31**).

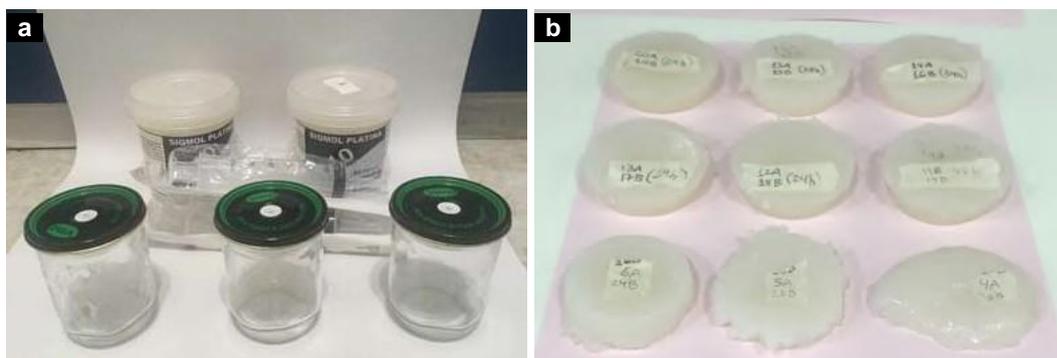


Figura 4.30 – Em (a), materiais caseiros utilizados. Em (b), diferentes proporções de mistura dos componentes A e B, resultando em diferentes graus de dureza.

⁷ Disponível em: https://siquiplas.mercadoshops.com.br/MLB-1010564281-borracha-de-silicone-platina-siquinol-platina-d-10-_JM. Acesso em: 13 jan. 2023.

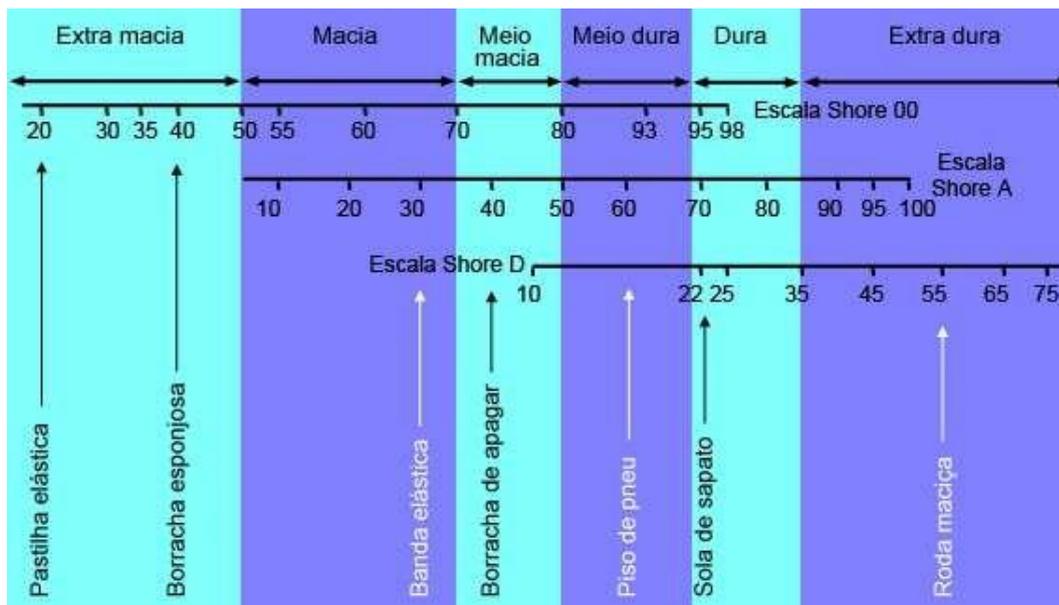


Figura 4.31 – Gradação *shore* de dureza de borrachas. Fonte: <https://www.ctborracha.com/borracha-sintese-historica/propriedades-das-borrachas-vulcanizadas/propriedades-fisicas/propriedades-mecanicas/dureza/>.

O primeiro teste do silicone, na proporção 6A + 24B, foi impresso na cor natural, utilizando gel de cabelo para a impressão suportada (**Figura 4.32a**). Apesar da necessidade de calibragem na máquina, foi possível perceber certa fidelidade formal e a fusão das camadas acima do esperado.

No segundo teste foi adicionado corante mineral vermelho “xadrez” (óxido de ferro) em pó para maior realce da forma pela cor. Como não ocorreu a polimerização, pensou-se à época que seria por causa do corante, o que forçou o abandono dessa estratégia (**Figura 4.32b**). Entretanto, posteriormente se descobriu a necessidade de se misturarem vigorosamente os 2 componentes antes de ser realizada a mistura, para que a polimerização ocorresse normalmente.



Figura 4.32 – Em (a), impressão de teste do silicone, na TissueStart. Em (b), impressão de partes de uma orelha, com silicone + corante.

A partir da experimentação com silicone, surgiu a oportunidade de um experimento correlato, descrito a seguir.

4.4.

Desenvolvimento de modelos de simulação e treinamento

Durante a pandemia de COVID-19, enquanto não havia perspectivas concretas de pesquisas envolvendo células, surgiu a oportunidade de colaborar com o médico Ronaldo de Oliveira Andrade (especialista em transplantes de fígado e mestrando no BiodesignLab) para desenvolvimento de opções de modelos de simulação e treinamento para cirurgias e suturas. Apesar de não ser o foco da pesquisa, esse experimento possibilitou o uso de modelos 3D a partir de exames de imagem, além do teste de diferentes materiais a fim de alcançar maior fidelidade para os modelos físicos de simulação.

Os exemplos trazidos por Ronaldo possuíam dureza similar ao tecido humano⁸, além de diferentes formas, porém seu preço era elevado, além de serem escassos no mercado (**Figura 4.33**). Ele comentou que, em alguns casos, são usadas esponjas de louça para treino de sutura, por falta de material.

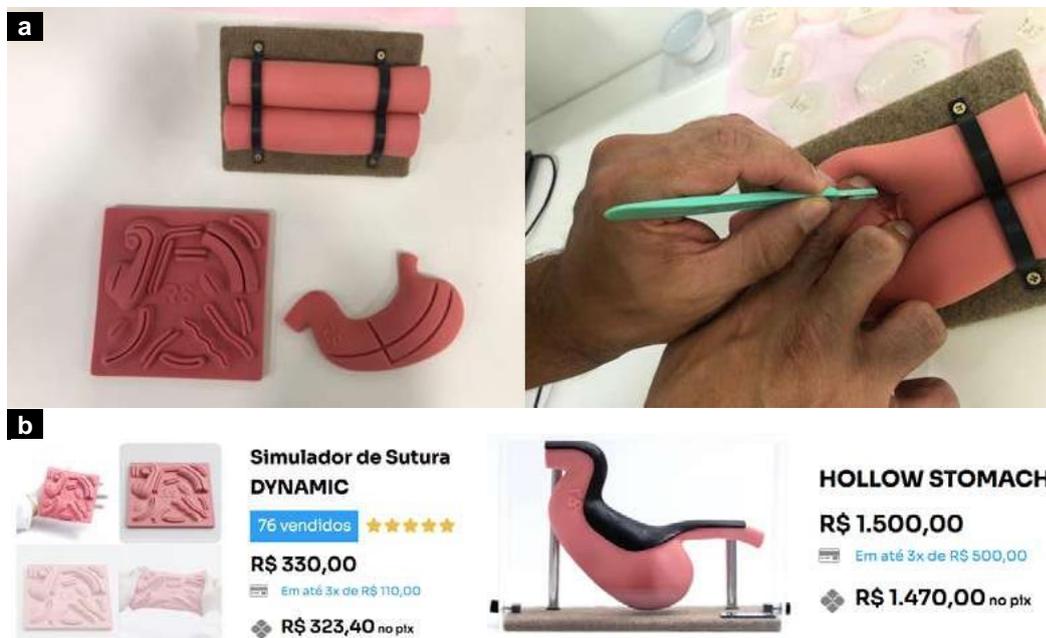


Figura 4.33 – Em (a), modelos comerciais disponíveis no mercado e, em (b) exemplos de preços. Fonte (b): <https://rssm.com.br/loja/>.

⁸ Disponível em: <https://rssm.com.br/loja/>. Acesso em 20 out. 2022.

A partir da premissa de simular o tecido humano, buscamos testar diferentes materiais quanto ao toque e ao corte com bisturi, aproveitando a expertise prática do médico.

4.4.1.

Teste de corte com bisturi

A partir do teste de corte nas amostras de silicone com diferentes durezas produzidas anteriormente, percebemos que aquele material ainda estaria distante de simular o tecido muscular humano (entretanto vislumbrou-se um caminho em relação à simulação de cartilagens). Também foram utilizadas amostras de kombucha (com a ajuda do doutorando do BiodesignLab Pedro Themoteo), que também se mostraram longe da textura necessária (**Figura 4.34**).



Figura 4.34 – Teste com as amostras de silicone e kombucha.

4.4.2.

Uso de moldes em filamento flexível

Buscando fidelidade formal, uma opção pensada foi utilizar moldes impressos com filamento flexível. A partir de um arquivo 3D gerado de um exame real de paciente, imprimimos um molde, no qual inserimos gelatina com corante alimentício e, depois, colocamos na geladeira para a gelificação. Inicialmente o molde foi impresso em tamanho reduzido para testar a desmoldagem e a fidelidade geométrica (**Figura 4.35**).

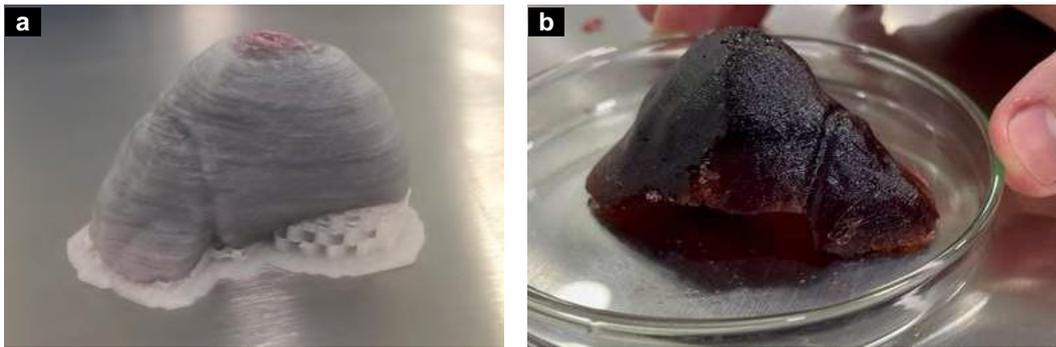


Figura 4.35 – Em (a), o molde impresso em filamento flexível carregado com a gelatina. Em (b), o modelo extraído.

Novamente a amostra foi submetida ao teste de corte pelo doutor Ronaldo e, dessa vez, ela parecia um pouco mais fiel ao almejado (**Figura 4.36**).

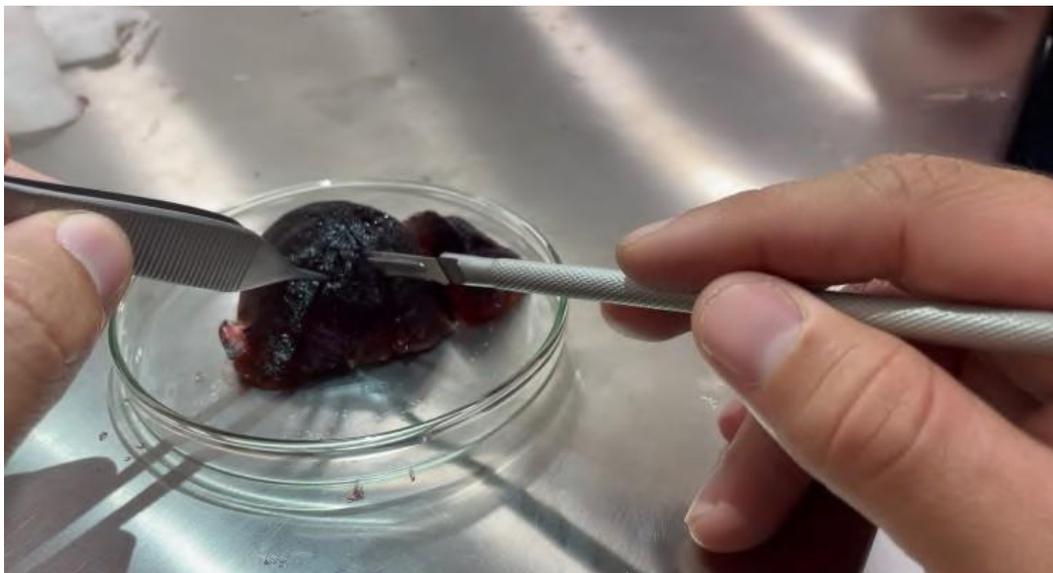


Figura 4.36 – Teste de corte com bisturi no modelo em gelatina.

A partir desse parecer, optamos por gerar um molde maior, em um tamanho mais próximo ao de um fígado humano (**Figura 4.37**) para verificar o desempenho da gelatina em um modelo volumetricamente maior.



Figura 4.37 – Molde sendo produzido, molde pronto e retirada do modelo em gelatina.

Novamente foi realizado o teste de corte. Apesar de a textura se assemelhar mais com o tecido muscular do que com outros materiais, o médico relatou a necessidade de uma maior dificuldade inicial para o corte (o fígado possui uma cápsula fibrosa, de natureza diferente dos cordões celulares que o compõem internamente), algo que não ocorria no modelo de gelatina (**Figura 4.38**).



Figura 4.38 – Apesar de geometricamente fiel, o modelo em gelatina a partir de molde não emulava fielmente o tecido humano.

Outra questão do modelo em gelatina era sua fragilidade e o curtíssimo período para uso, pois em temperatura ambiente ele rapidamente se liquefazia.

Outra opção tentada foi a resina flexível, utilizada em impressoras DLP (**Figura 4.39**). Caso o *shore* da resina se aproximasse do presente no tecido humano, haveria ainda a vantagem de a impressão DLP possibilitar a criação de vasos internos no modelo. Entretanto, os vasos não saíam impressos de maneira satisfatória nos primeiros testes, além da dureza do modelo se mostrar maior até que a das amostras de silicone. Por isso, essa opção foi rapidamente descartada.



Figura 4.39 – Teste de modelo com resina flexível. Não possuía resolução para os vasos internos e não se assemelhava a um tecido vivo em sua dureza.

A partir dessa rodada de testes, voltamos a pensar no silicone como material, dessa vez adquirindo um para molde, endurecido por meio de catalisador, com *shore* A 8-12⁹. Foi utilizado inicialmente o molde em tamanho reduzido do fígado, para mais um teste de corte (**Figura 4.40**). Nesta etapa, contei com a colaboração do bolsista PIBIC Carlos Santiago Diaz, graduando em Engenharia de Materiais.

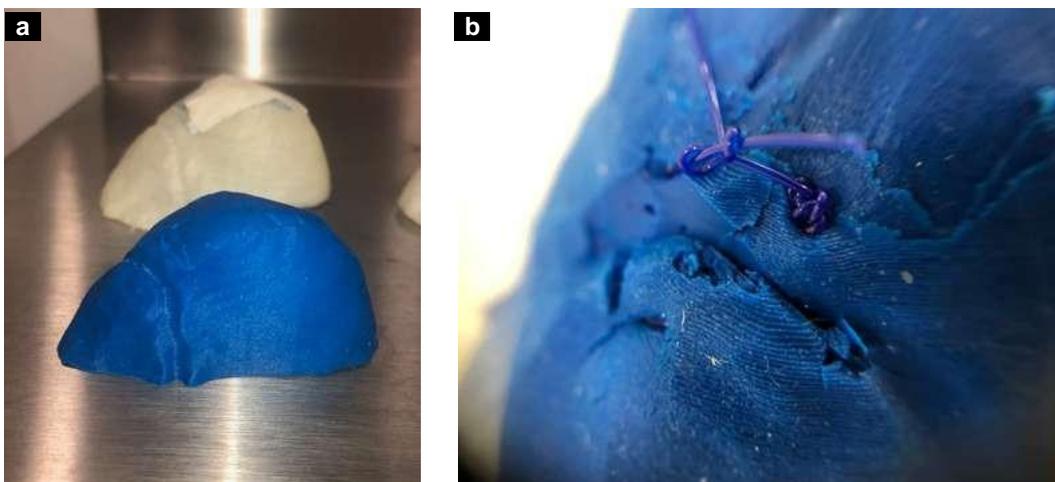


Figura 4.40 – Em (a), modelo em silicone *shore* A 8 (azul, padrão de fábrica) a partir de molde impresso em filamento flexível. Em (b), foto aproximada do teste de sutura com linha cirúrgica após corte com bisturi.

O teste mostrou que, dentre os materiais testados, o silicone com *shore* A 8 possuía maior semelhança ao corte, inclusive possibilitando o treinamento de

⁹ Disponível em: https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-2223368575-borracha-de-silicone-com-cat-siqmol-6008-_JM#reco_item_pos=1&reco_backend=machinalis-seller-items-pdp&reco_backend_type=low_level&reco_client=vip-seller_items-above&reco_id=d419b3b0-6647-4f32-b6b7-50b744f77bf2. Acesso em: 20 jan. 2023.

sutura sem que o modelo rompesse. A partir dessa resposta, prosseguimos para a impressão com esse silicone.

4.4.3.

Impressão 3D com silicone *shore A 8*

Primeiramente foram impressas formas simples (pirâmides), por meio da impressão suportada em gel, para calibração da máquina para o novo material (**Figura 4.41**). Essa calibração se faz necessária, pois cada tipo de material, mesmo silicone, possui viscosidades diferentes, além de algumas questões, como a adesão entre camadas ter que ser ajustada por meio de parâmetros como velocidade e fluxo.



Figura 4.41 – Testes iniciais com o silicone *shore A 8*.

Após ajustes na calibração, foi possível conseguir imprimir modelos com alguma semelhança geométrica, porém longe da qualidade esperada (**Figura 4.42**).

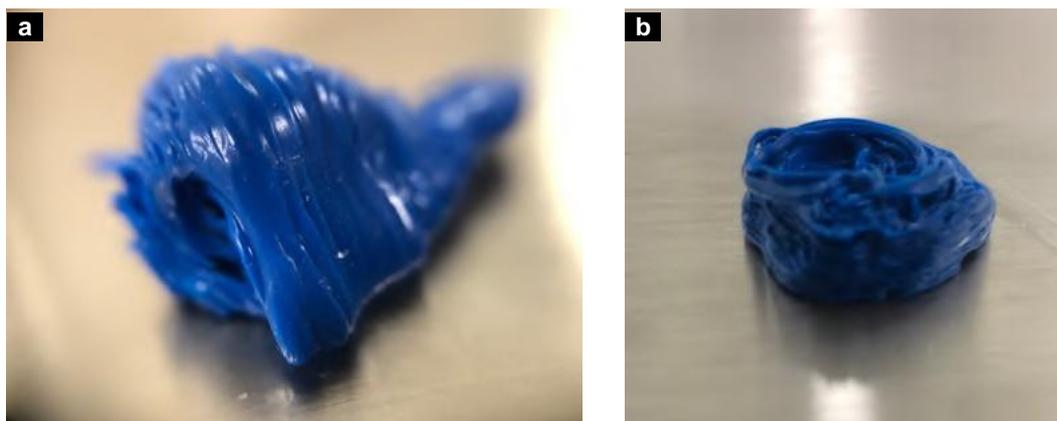


Figura 4.42 – Em (a), modelo de um nariz impresso em tamanho reduzido. Em (b), uma seção de aorta impressa com o silicone *shore A 8*.

Com o andamento dos experimentos com o GEF e, posteriormente, com as pesquisadoras Sara Gemini e Jéssica Dornelas, os testes passaram a ser realizados pela aluna de língua portuguesa da PUC, Victoria Gonçalves Broegger, sob minha supervisão.

4.4.4. Testes com silicones supervisionados

O primeiro passo foi apresentar Victoria à tecnologia de bioimpressão e suas possibilidades, além da prática de imprimir (**Figura 4.43**).

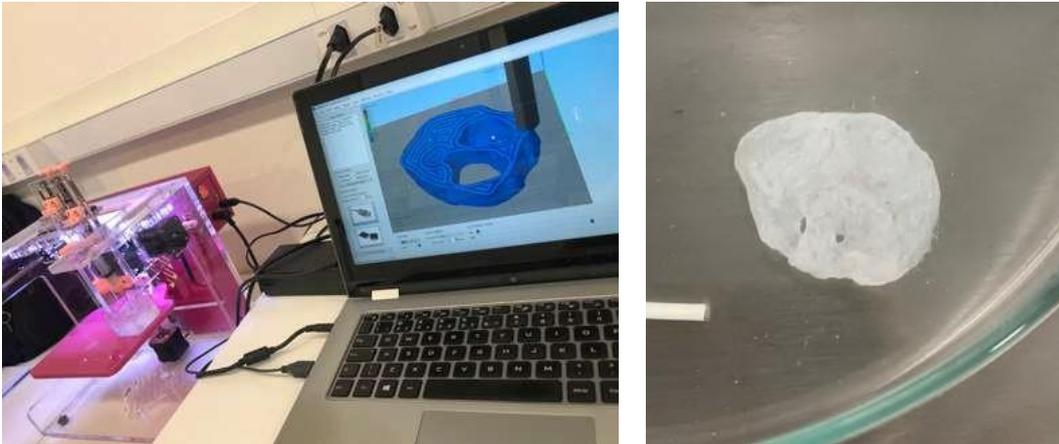


Figura 4.43 – Apresentação da impressão com silicone e modelo impresso em silicone alimentício.

Após acompanhar o processo de algumas impressões, ela rapidamente dominou o software de fatiamento e a maneira de preparar os silicones, focando na calibração dos parâmetros de impressão. Além do silicone azul, realizamos novos testes com o silicone alimentício (**Figura 4.44**).

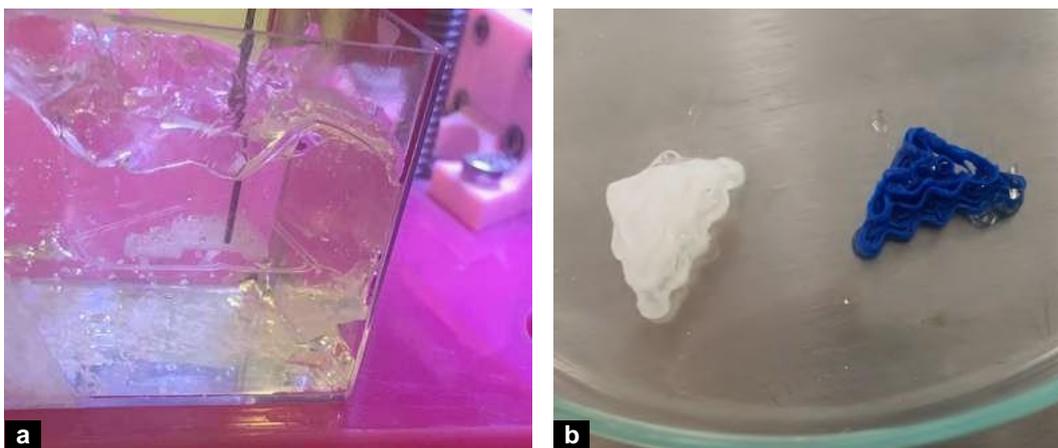


Figura 4.44 – Em (a), novos testes de impressão suportada em gel com silicone alimentício. Em (b), resultados obtidos pela aluna Victoria com os silicones alimentício e azul.

Também realizamos testes com silicones utilizados para vedação – um à base d'água e outro um silicone acético. De início foi feito o teste manualmente para verificar a viscosidade e o tempo de cura do material (**Figura 4.45**).

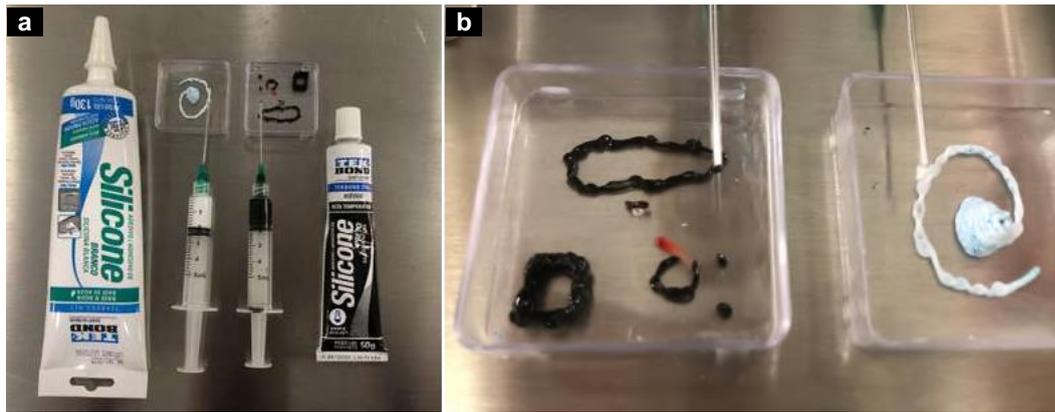


Figura 4.45 – Em (a), os produtos utilizados. Em (b), os testes com seringa realizados manualmente.

O silicone acético possuía uma viscosidade elevada, correndo o risco de danificar a bioimpressora, além de produzir um odor forte. Já o silicone branco mostrou boa viscosidade, além de manter sua geometria e sua estabilidade após endurecer. Por serem materiais mais viscosos e que endureciam em temperatura ambiente, não foi necessário usar o método suportado em gel (**Figura 4.46**).

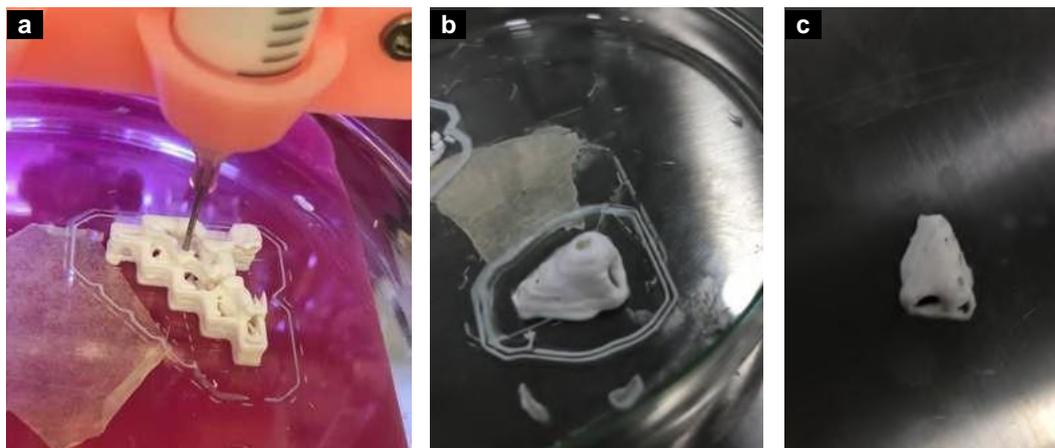


Figura 4.46 – Em (a), primeiro teste de impressão com o silicone à base d'água. Em (b, c), um modelo de nariz posteriormente impresso.

Os testes vislumbraram o silicone como um material promissor tanto para modelos físicos quanto para bioimpressões por ser biocompatível. Entretanto, as bioimpressoras não foram projetadas pensando nesse material especificamente. Após buscas na internet, foram encontrados modelos de impressora com extrusoras específicas para uso com silicones industriais ou certificados para dispositivos médicos, da marca francesa Lynxter¹⁰ (**Figura 4.47**).

¹⁰ Disponível em: <https://lynxter.fr/en/product/professional-industrial-3d-printers/>. Acesso em: 3 fev. 2023.

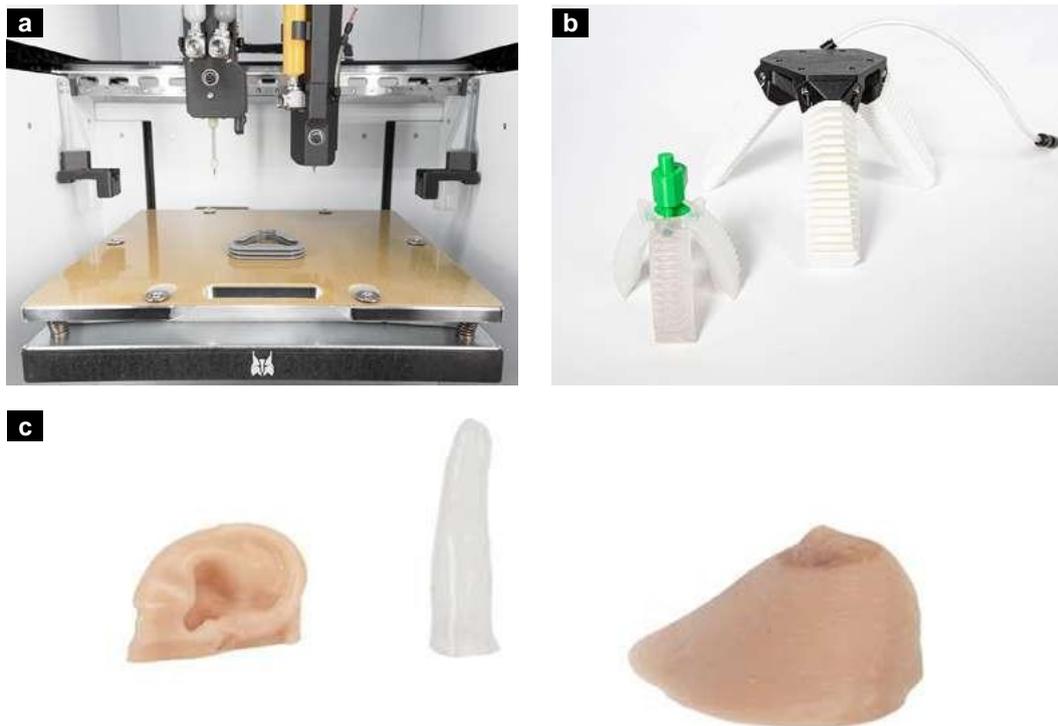


Figura 4.47 – Em (a), o interior do modelo IDEX, com extrusora própria para misturar silicones bi-componentes. Em (b), impressões em silicone para soft robotics. Em (c), modelos impressos com silicone próprio para dispositivos médicos. Fontes: <https://filament2print.com/gb/industrial/2032-lynxter-s300x-3dprinter.html>.

Após a descoberta dessa máquina, um primeiro contato foi feito com a empresa. Os experimentos com silicone cessaram com o retorno da aluna Victoria para a Dinamarca, ao mesmo tempo em que o experimento com as pesquisadoras Sara e Jéssica avançava.

4.5.

Considerações

Os primeiros contatos práticos foram cruciais para guiar os experimentos futuros. Uma série de questões que não estavam no escopo inicial vieram à tona, como a necessidade prévia de calibragem para qualquer situação envolvendo biotintas, pois cada mistura de materiais traria propriedades diferentes para a impressão. Questões como dimensão dos modelos e tempo máximo de impressão das máquinas também foram evidenciadas.

Entre o início do experimento com o kit da impressora K86 e o uso da extrusora de seringa *direct*, teve início a pandemia de COVID-19 no Brasil. Dessa maneira, as tentativas de parceria com laboratórios que faziam uso de células em suas pesquisas foram interrompidas. A partir da aquisição da TissueStart, já no segundo

ano da pandemia, ainda não havia a certeza do uso de células no percurso da tese. A partir dessa indefinição, a pesquisa passou a focar no uso de diferentes materiais e nas aplicações da bioimpressora 3D, ainda visando à experimentação com o uso de células no futuro.

A sistemática do Design contribuiu para a descoberta e o desenvolvimento de equipamentos e acessórios, assim como para a exploração tecnológica dos materiais. O uso direcionado dos equipamentos possibilitou a ampliação dos entendimentos e a consciência estabelecida de recursos envolvidos na bioimpressão 3D.

A rodada de experimentos com diversos materiais mostrou a necessidade de aprofundamento sobre o tema, além da familiarização com matérias-primas próprias da bioimpressão, como o alginato, sem deixar de lado a experimentação fora do lugar comum. Novas possibilidades surgiram como temáticas para o laboratório, como o uso de silicones para impressão de modelos médicos, além da apresentação da tecnologia de forma prática para diferentes personagens fora do campo do Design.

No próximo capítulo descrevo o processo do experimento realizado em parceria com o GEF, da UFRJ.

5

Geração de modelo de fígado de rato bioimpresso

Neste capítulo, apresento os experimentos realizados em parceria com o GEF (Grupo de Estudos do Fígado)¹, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF/UFRJ), coordenado pela professora Regina Goldenberg. O plano inicial envolvia o uso de células para a bioimpressão de um fígado de rato, utilizando o modelo de bioimpressora com 4 módulos. O projeto não chegou a ser concluído, mas o processo trouxe enorme enriquecimento para a pesquisa.

5.1.

O GEF e suas pesquisas

De acordo com o site, o grupo atua em pesquisas básico-clínicas, realizando desde estudos de doenças hepáticas à bioengenharia de tecidos e órgãos. O GEF domina o desenvolvimento de células-tronco de pluripotência induzida (*induced pluripotent stem cells* – iPSc) e de técnicas como o cultivo celular tridimensional.

O primeiro contato ocorreu com os membros Ricardo Martins Santos (graduando em Medicina) e Marlon Lemos (doutorando em Biofísica). Ambos estão envolvidos em estudos sobre a descelularização de fígados para uso em transplantes. O grupo produz fígados bioartificiais, principalmente de ratos, mas também já fez uso de órgãos suínos, além do uso de fígados humanos descartados para transplantes.

A partir da primeira reunião, em que traçamos como meta a bioimpressão de um construto com vários tipos celulares a partir de um fígado de rato, marcamos uma visita ao Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, na UFRJ, onde ocorrem as pesquisas do GEF. A visita foi riquíssima, sendo a primeira vez que presenciei o cultivo de células IPS ao vivo (**Figura 5.1**), além de ter um panorama dos equipamentos necessários para um laboratório de cultivo celular (**Figura 5.2**).

¹ Disponível em: https://beacons.ai/gef_ufrj. Acesso em: 20 jan. 2023.



Figura 5.1 – Fotos da visita ao GEF. Em (a), a capela de fluxo laminar utilizada, em uma sala separada e restrita. Em (b), o manuseio de células dentro do fluxo. Em (c), a visualização de células diferenciadas em células cardíacas, em microscópio com tela.

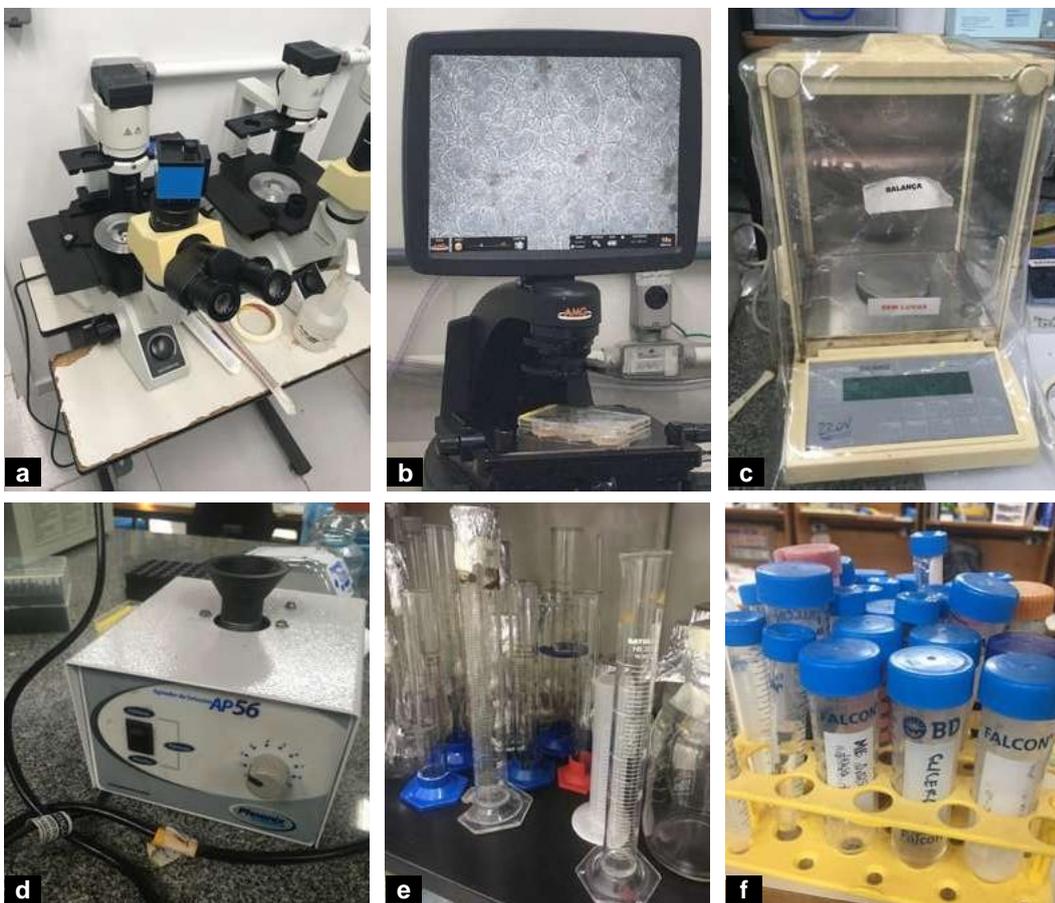


Figura 5.2 – Em (a, b), diferentes tipos de microscópios. Em (c), uma balança semi-analítica. Em (d), um misturador vórtex para tubos Falcon. Em (e), provetas para medição de líquidos. Em (f), tubos Falcon de diferentes capacidades.

Na visita, também fui apresentado a um fígado de rato durante o processo de descellularização, compreendendo melhor como ocorria (**Figura 5.3**).



Figura 5.3 – Em (a), o fluxo onde estava ocorrendo a lavagem dos detergentes usados na descellularização do fígado a partir de uma bomba. Em (b), o detalhe do fígado já descellularizado, com a coloração branca.

Logo após a visita ao laboratório, fui convidado para dar uma palestra sobre bioimpressão 3D para os membros do GEF (**Figura 5.4**), que ocorreu de forma on-line devido à pandemia de COVID-19.

Reunião do Grupo Fígado
28/06, às 12h. Tema:

Impressão e Bioimpressão 3D

MSc. Mario Ricardo da Silva Lima
Laboratório de BIODESIGN - PUC-Rio

Graduação em Desenho Industrial
Habilitação em Programação Visual (Centro Universitário da Cidade)
Habilitação em Projeto de Produto (UFRJ)

Mestre em Design (PUC-Rio)
Colaborador do Grupo de Pesquisa Design na Leitura de Sujeitos e Suportes em Interação (LINC-Design)

Doutorando em Design (PUC-Rio)
Laboratório NEXT (Núcleo de Experimentação Tridimensional)

Link da reunião:
<https://meet.google.com/zha-ztxh-pdm>

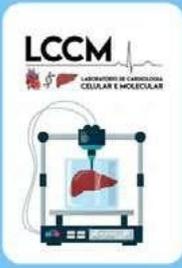



Figura 5.4 – Convite da palestra para o GEF.

Como primeiro passo para a meta de imprimir um construto celular baseado no fígado humano, decidimos utilizar a microtomografia para obter o modelo 3D em detalhes do órgão.

5.2.

Microtomografia de fígados de ratos

A microtomografia computadorizada, também denominada *microCT*, é uma técnica usada para a avaliação de amostras e materiais que utiliza o princípio físico da atenuação de raios X para formação de imagens bidimensionais e tridimensionais em alta resolução. Seu uso requer mínimas preparações da amostra e ela é considerada uma técnica não destrutiva, ou seja, não ocasiona danos ao material avaliado (QUEIROZ *et al.*, 2019).

O microtomógrafo é um equipamento robusto em dimensões, possuindo uma câmara fechada, onde a amostra é inserida em uma plataforma giratória para receber os raios e gerar as imagens sequenciais (**Figura 5.5**).

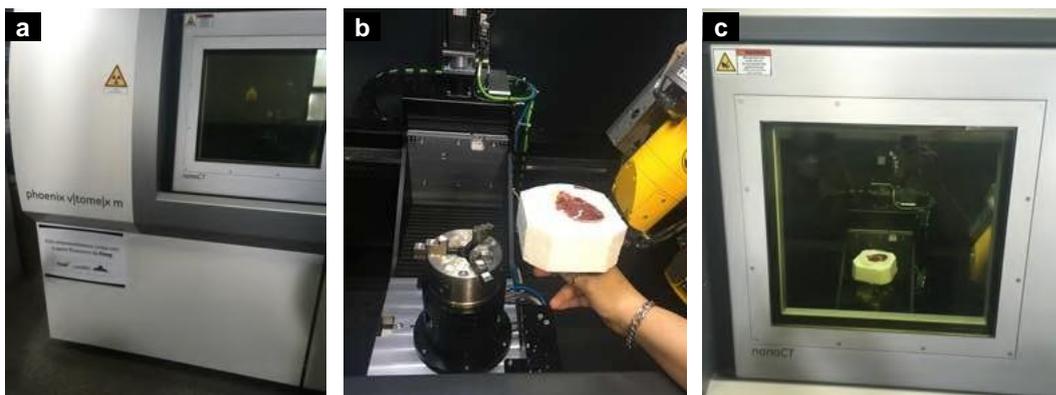


Figura 5.5 – Em (a), a parte externa do equipamento. Em (b), o posicionamento da amostra na plataforma giratória. Em (c), a amostra posicionada sendo escaneada.

O equipamento é controlado por um console, possuindo software próprio para o processamento (formato DICOM²) e o pós-processamento das imagens, gerando arquivos tridimensionais, como o STL (**Figura 5.6**).

² *Digital Imaging and Communications in Medicine* – Comunicação de Imagens Digitais na Medicina. Esse formato garante que as imagens de diagnóstico obtidas possam ser lidas por qualquer aparelho no formato digital.

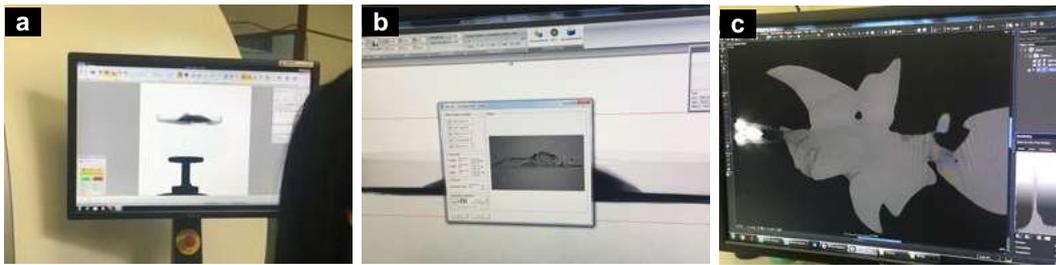


Figura 5.6 – Em (a), *software* de controle do microtomógrafo. Em (b), *software* de processamento da imagem e, em (c), visualização de corte.

O NEXT e o BiodesignLab já possuíam experiências prévias com esse equipamento para geração de arquivos em 3D, o que facilitou no processo. Por meio do professor da COPPE/UFRJ, Ricardo Tadeu, conseguimos utilizar o microtomógrafo do Programa de Engenharia Nuclear, com o auxílio da professora Olga Oliveira.

Para o primeiro uso do equipamento, os pesquisadores do GEF levaram duas amostras de fígado de rato – um fígado saudável, como controle, e outro descelularizado (**Figura 5.7**). A ideia era poder comparar as estruturas das amostras, principalmente em relação à vascularização.

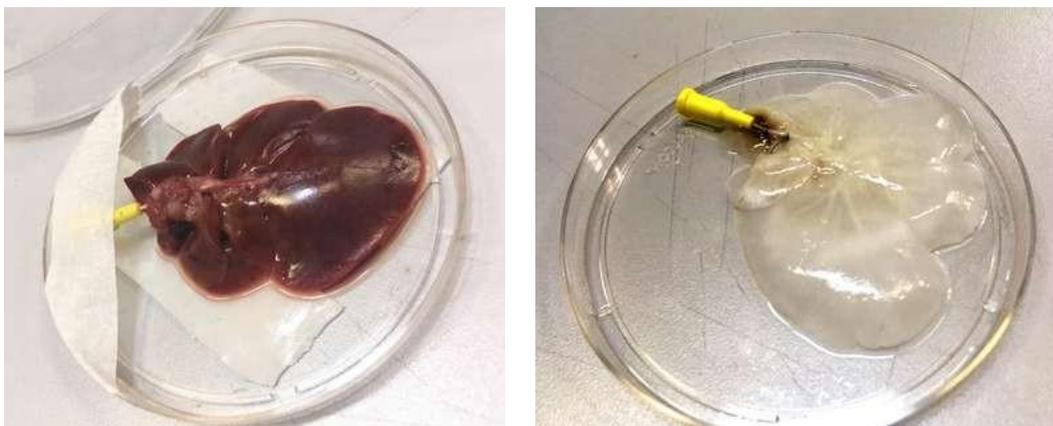


Figura 5.7 – Amostras de fígado saudável e descelularizado de rato para a microtomografia.

Por causa do movimento de rotação do eixo no microtomógrafo, as amostras precisavam ser imobilizadas para não gerar ruído nas imagens. O escaneamento da amostra de controle possibilitou a construção de um modelo com alta fidelidade geométrica. Houve um pequeno ruído, causado pela cânula inserida em um vaso do fígado que, mesmo não sendo de material metálico, produziu um contraste nas imagens (**Figura 5.8**). Apesar disso, o pós-processamento no arquivo 3D foi simples (**Figura 5.9**).

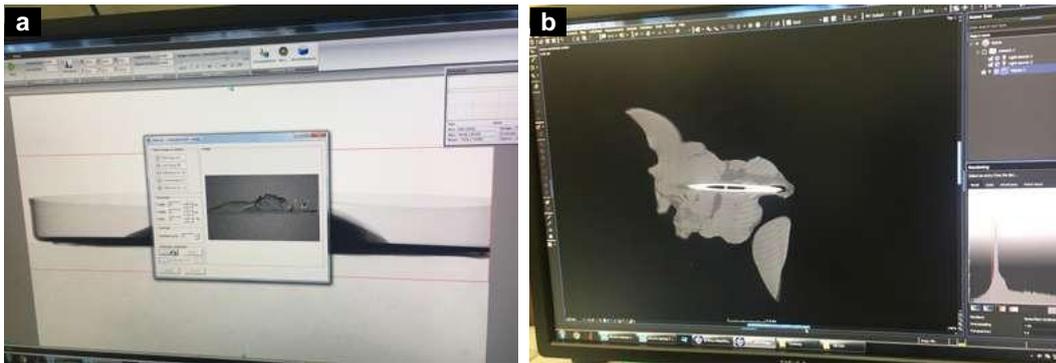


Figura 5.8 – Em (a), a prévia em 3D do software do microtomógrafo. Em (b), o contraste luminoso causado pela câmara na amostra.

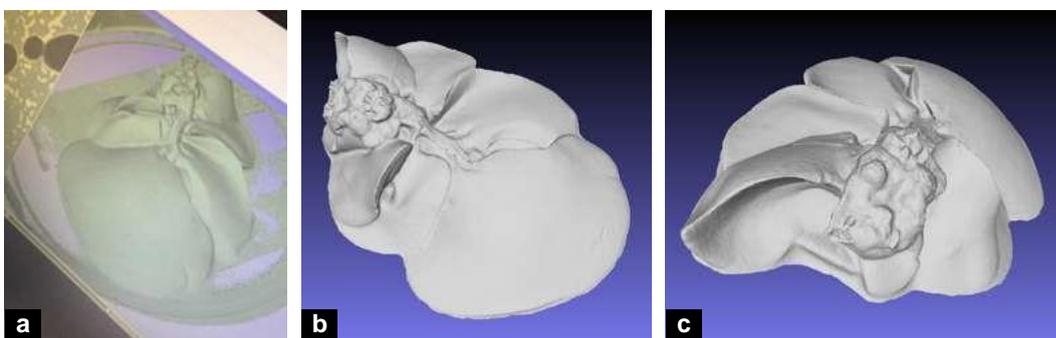


Figura 5.9 – Em (a), modelo STL inicial gerado pelo software do microtomógrafo. Em (b, c), diferentes vistas do arquivo pós-processado.

Já na amostra descelularizada, por ter menos rigidez estrutural em relação ao controle (possuindo uma estrutura quase gelatinosa), optamos por colocá-la em uma base de isopor, ação comum no escaneamento com o microtomógrafo. Ao longo do tempo de escaneamento – 30 minutos –, o isopor absorveu grande parte do líquido da amostra, deixando-a praticamente sem volume (**Figura 5.10**).

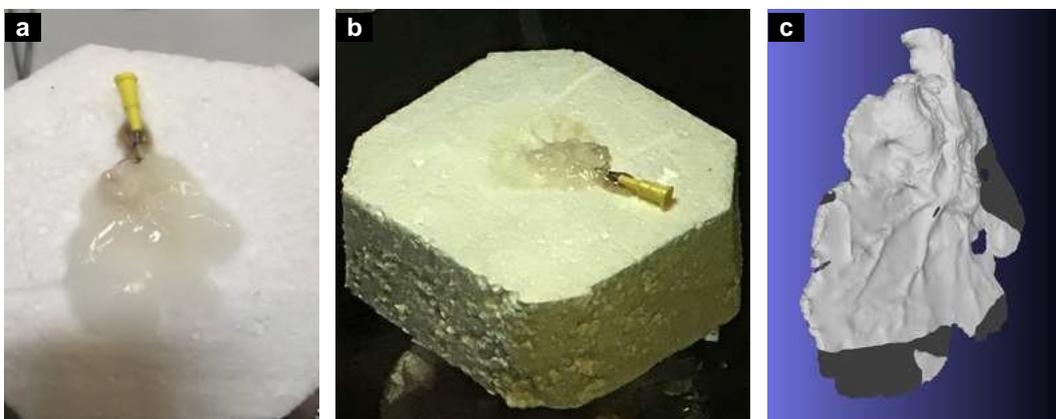


Figura 5.10 – Em (a), amostra descelularizada antes e, em (b), depois do escaneamento. Em (c), o modelo 3D gerado.

Apesar da perda de volume, os vasos internos maiores foram preservados. Foi realizado o pós-processamento do modelo 3D no software Blender³. Com o modelo 3D tratado, disponibilizei o arquivo sob forma de PDF interativo e no site de visualização de modelos 3D, Sketchfab⁴ (**Figura 5.11**). Dessa forma, os pesquisadores conseguiriam manipular o arquivo em 3D sem a necessidade de um software próprio, podendo analisar a amostra.

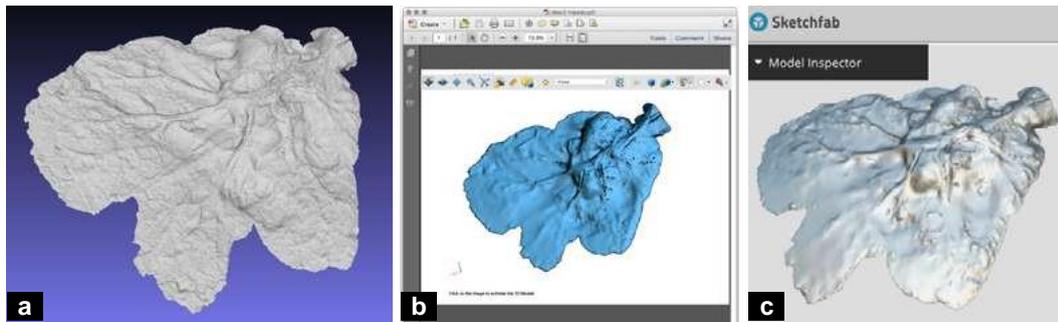


Figura 5.11 – Em (a), o modelo 3D tratado. Em (b), o PDF interativo. Em (c), o modelo para visualização via website.

5.3.

Impressão 3D

Decidimos então fazer a impressão 3D a partir do modelo em 3D do fígado de controle, para melhor visualização dele. Foram utilizadas resinas cristal e flexível, impressas em uma impressora DLP (**Figura 5.12**).



Figura 5.12 – Modelo físico impresso em 3D com resina cristal e resina flexível a partir do modelo virtual gerado pela microtomografia.

³ Software gratuito em <https://www.blender.org/>.

⁴ Disponível em: <https://sketchfab.com/3d-models/desc2-tratado-81572d19734e408d84f36b06b-b8126a1>. Acesso em: 20 jan. 2023.

Pensando na futura bioimpressão, utilizei também a TissueStart para realizar um modelo impresso do fígado de controle com creme Nivea (Figura 5.13).

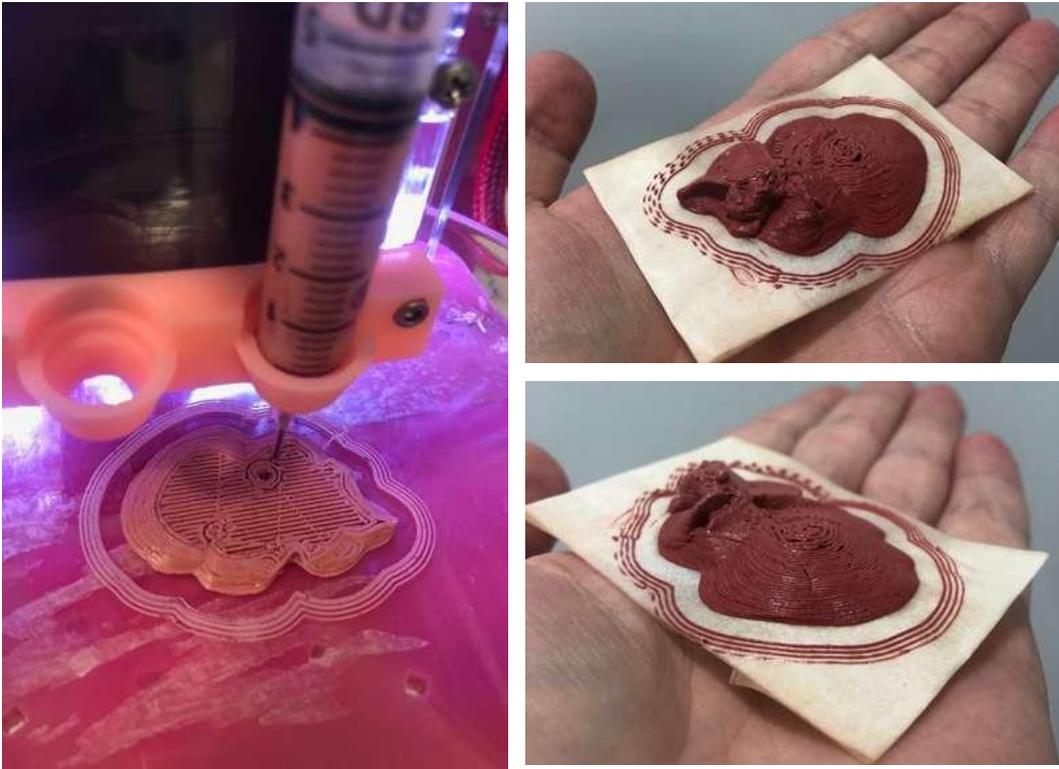


Figura 5.13 – Processo de impressão e modelo impresso do fígado de rato com creme Nivea e corante para chocolate.

Com a validação formal do modelo microtomografado, mas sem podermos aproveitar o modelo descelularizado, decidimos utilizar novamente o microtomógrafo.

5.4.

Microtomografia com contraste

Para essa nova tentativa de escaneamento, os pesquisadores sugeriram o uso de contraste a fim de conseguirem captar os vasos do órgão. A amostra foi fixada na placa de patri com agarose⁵, evitando assim o problema de ressecamento ocorrendo na primeira tentativa (Figura 5.14).

⁵ A agarose é um polissacarídeo que é isolado e purificado a partir do ágar ou de algas marinhas que contêm ágar. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/products/chemistry-and-biochemicals/biochemicals/agarose>. Acesso em: 20 jan. 2023.



Figura 5.14 – Amostra de fígado descelularizado com contraste e fixado na placa petro com agarose.

Adicionalmente, foi utilizada uma cobaia viva para o escaneamento de um fígado saudável de rato em sua posição original no corpo, já que o primeiro fígado acabou ficando com uma das partes retas por conta da placa de petri (**Figura 5.15**). Para a amostra viva, também foi ministrado iodo como contraste.

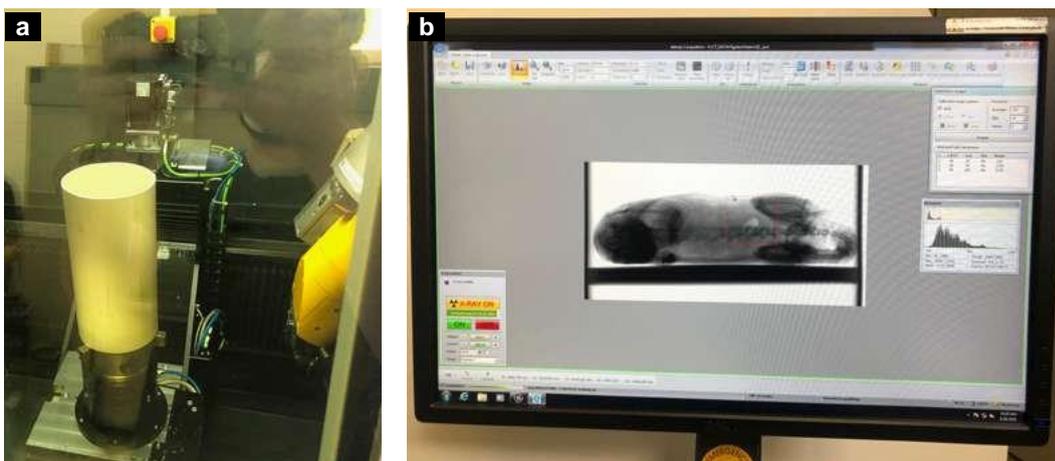


Figura 5.15 – Em (a), a cobaia posicionada dentro do tubo de PVC, para se manter imóvel durante o escaneamento. Em (b), a prévia do arquivo tridimensional obtido.

Em nenhum dos escaneamentos o iodo funcionou como deveria. Com o contraste, os vasos deveriam aparecer opacos (em preto), gerando assim espaços negativos no modelo 3D. Ao invés disso, os vasos ficaram marcados em branco (**Figura 5.16a**). Já na cobaia viva, aparentemente o iodo ficou estacionado nos pulmões, que não eram o alvo do escaneamento (**Figura 5.16b**).

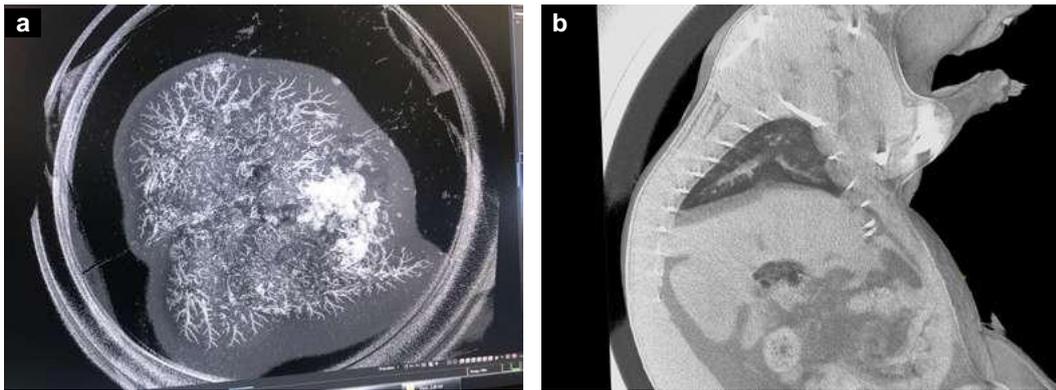


Figura 5.16 – Em (a), imagem geradas do fígado descellularizado, sem a marcação esperada do iodo, que deveria deixar os vasos pretos. Em (b), imagem da cobaia viva, em que o iodo aparentemente ficou concentrado no pulmão.

Uma das possibilidades aventadas para os vasos terem aparecido em branco é a presença de ar, com o iodo apenas vedando o sistema.

5.5.

Software de visualização

Após a microtomografia não gerar os resultados esperados mesmo depois de duas tentativas, o arquivo DICOM da cobaia foi aproveitado em um *software* de visualização em tempo real, produzido na Engine Unreal⁶. O *software* autoexecutável contava com divisão em camadas correspondente a tecido, ossos e órgãos específicos (**Figura 5.17**) e, para o seu desenvolvimento, os membros do BiodesignLab Gerson Ribeiro e Vinicius Arcoverde, além do biomédico Thiago Barboza, foram de extrema importância, atuando na segmentação e na preparação da aplicação para uso.

⁶ Uma Engine é um conjunto de ferramentas de criação para desenvolvimento de jogos, visualização arquitetônica e automotiva, criação de conteúdo linear de cinema e televisão, produção de eventos ao vivo e transmissão, treinamento e simulação e outros aplicativos em tempo real. Disponível em: <https://www.unrealengine.com/pt-BR/faq>. Acesso em: 20 jan. 2023.

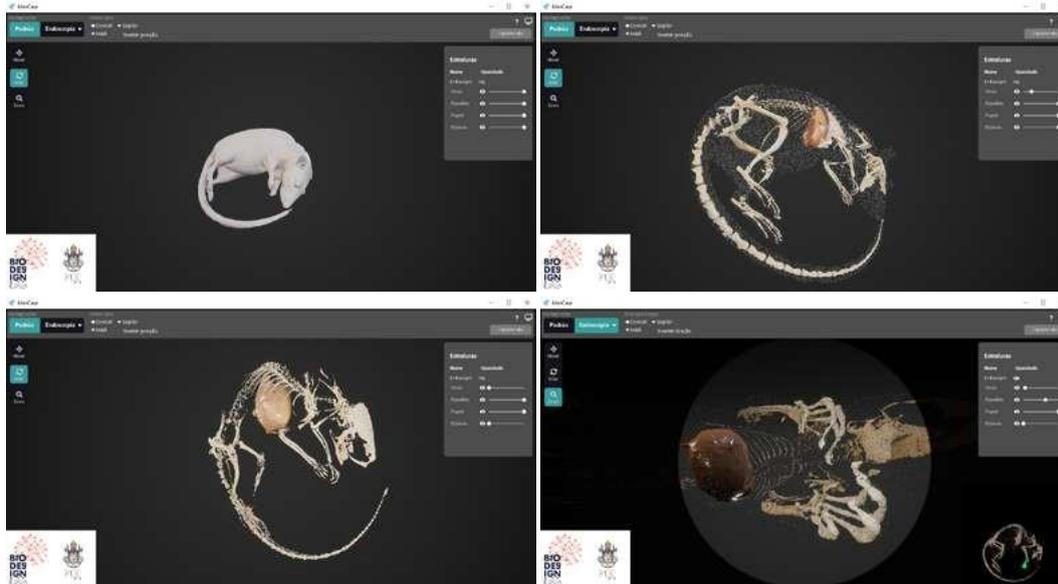


Figura 5.17 – Imagens do software de visualização em tempo real da cobaia.

Por meio do visualizador, é possível escolher quais partes do animal ficam visíveis (estrutura óssea e pele), e verificar os pulmões e o fígado, todos com controle de opacidade. O software foi disponibilizado para os membros do GEF para auxílio em eventuais aulas.

Após esses experimentos e com a demora e os revéses ocorridos em relação ao modelo de bioimpressora com 4 módulos, a parceria com o GEF acabou suspensa.

5.6. Considerações

Neste capítulo apresentei a primeira parceria externa para um experimento, que na verdade foi uma sequência de ações com um propósito definido. Poderia inclusive chamá-lo de projeto, pois envolvia o desenvolvimento de um produto (o construto celular) a partir de uma série de ações e etapas. Apesar de não ter sido concluído, trouxe uma série de novas informações.

Já na primeira visita ao laboratório onde o GEF está instalado, tive novas percepções tanto acerca do ambiente laboratorial quanto do processo de cultivo celular. O que se pensava ser algo extremamente restrito – física e financeiramente – e distante, mostrou-se acessível e, de certa forma, abundante (devido ao número de laboratórios atuando com cultivo celular, pensando apenas no CCS da UFRJ).

Os membros do GEF foram extremamente solícitos, apresentando as principais linhas de pesquisa, os equipamentos utilizados e alguns processos, como o cultivo de IPSs e a descelularização de órgãos – todos apresentados na prática.

Nesse experimento, perpassei toda a etapa de pré-processamento da bioimpressão 3D, conjugando diferentes tecnologias para o aperfeiçoamento da geração dos modelos 3D a serem impressos, além de avanços na qualidade do processo de bioimpressão.

Outro ponto importante desse experimento foi a cooperação de diferentes laboratórios e campos do saber: durante o processo estiveram presentes os campos do Design, da Medicina, da Biotecnologia, da Engenharia Nuclear e da Biomedicina, através das técnicas de modelagem e impressão 3D, segmentação de imagens, programação, microtomografia, extração e descelularização de órgãos.

A meta estabelecida – de impressão de um construto com 4 tipos celulares – mostrou-se bastante ousada, visto que até então não havia sido realizada nenhuma impressão com células. Outro ponto de aprendizado foi em relação à documentação fotográfica e escrita dos experimentos, além do uso da nuvem para armazenamento e troca de quaisquer informações, pois isso agilizava os processos, criando automaticamente um repositório. Essa prática também se mostrou importante em relação aos revéses ocorridos, prontamente documentados.

6

Bioimpressão 3D de biotinta com esferoides fixados

Neste capítulo, apresento o percurso para a realização de experimentos realizados em parceria com a professora Sara Gemini Piperni e com a pesquisadora Jéssica Dornelas, envolvendo o uso de esferoides celulares fixados na bioimpressão 3D.

6.1.

Reuniões para delineamento dos experimentos

Como exposto anteriormente, a reunião inicial foi marcada por Thiago Barborza e Antônio Tiele (coincidentemente foram duas reuniões marcadas separadamente, no mesmo dia, ambas com a professora). Para a reunião, Sara Gemini convidou a pesquisadora Jéssica Dornelas, com quem já desenvolvia estudos envolvendo células.

Sara Gemini Piperni é biotecnologista, graduada pela Universidade de L'Aquila – Itália, Mestre em Biotecnologia Celular e Molecular e Doutora em Biotecnologia, pela mesma instituição. Atualmente é professora titular do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), na UFRJ e, recentemente, fundou o Laboratório de Biotecnologia Bioengenharia e Biomateriais Nanoestruturados (LaBeN).

Jéssica Dornelas é bióloga, graduada pela UNIRIO, e Mestre em Ciência e biotecnologia pela UFF. Atualmente é CEO da empresa NanoOnco3D, em cooperação tecnológica com a Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC) do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUPE), da UFF, atuando em pesquisas sobre triagem de nanossistemas e ativos para a produção de novos medicamentos e cosméticos.

Ainda na primeira reunião, ficou decidido com as pesquisadoras que teríamos encontros virtuais semanais, visando delinear o primeiro experimento, além de uma visita ao BiodesignLab.

O primeiro passo foi acertar a calibração, ainda da TissueStart, para a impressão de um construto que pudesse ser cultivado em uma placa de seis poços (cada poço possui cerca de 34 mm de diâmetro). Foram testadas algumas formas, verificando a que traria melhor fluxo para o processo de impressão do construto (**Figura 6.1**).

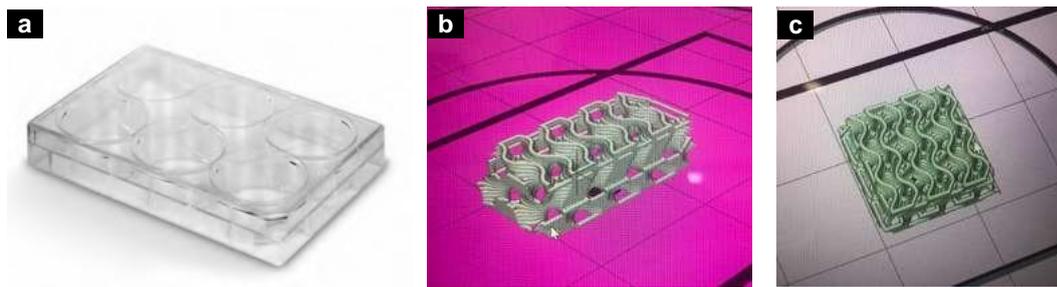


Figura 6.1 – Em (a), placa de 6 poços, para cultivo celular. Em (b, c), diferentes formatos testados. Fonte (a): <https://www.forlabexpress.com.br/consumiveis/placa-para-cultivo-de-celulas-6-pocos-fundo-chato-kasvi>.

6.2.

Uso do preenchimento giróide

A partir dessa etapa, todos os modelos passaram a ser impressos com o preenchimento (*infill*) giróide. Na impressão 3D, existem diferentes padrões para o preenchimento das peças produzidas. Eles visam, além da economia de material e tempo de impressão, trazer ganhos de resistência e de estética para as peças (**Figura 6.2**).

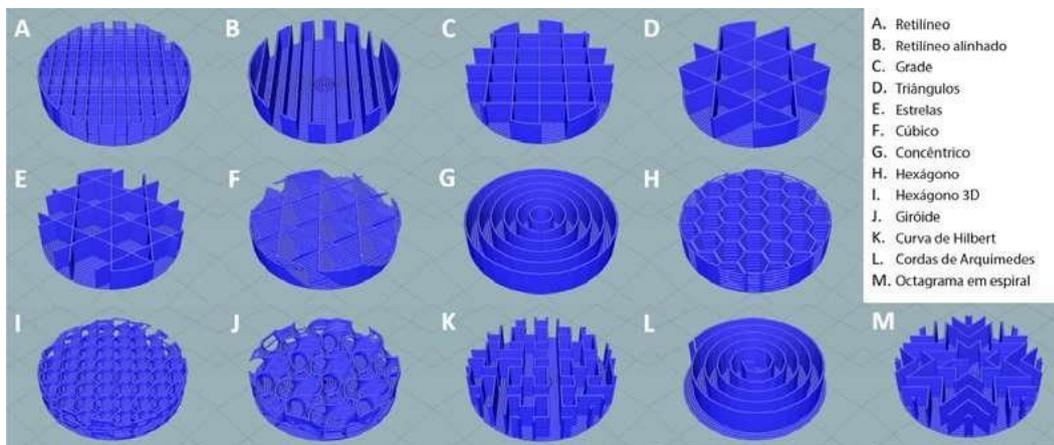


Figura 6.2 – Diferentes tipos de preenchimentos disponíveis nos softwares de fatiamento para impressão 3D. Fonte: Adaptado de <https://www.allevi3d.com/infill-options-in-slic3r/>.

Na bioimpressão 3D de construtos celulares, de maneira diferente do que foi pensado no capítulo passado, o construto precisa ser produzido de forma vazada. Isso é fundamental para a pós-produção, etapa em que ele é levado para um biorreator e em que ocorrerão as trocas de nutrientes via meio de cultura, para garantir a manutenção e viabilidade das células. Um construto hermético impedirá que os nutrientes alcancem as partes internas, impedindo assim a nutrição, a proliferação e a diferenciação celular. Para a bioimpressão 3D, a impressão de perímetros e bases são desabilitadas, o que gera a impressão de um modelo com o preenchimento escolhido na forma do objeto.

Para tal, o preenchimento giróide é altamente indicado. Sua estrutura natural única é caracterizada pela ausência de linhas retas, além de ser uma superfície mínima triplamente periódica (TPMS)¹. Sua forma ondulada, com camadas diferentes entre si formadas por linhas que não se cruzam, forma uma estrutura com alta porosidade (imprescindível para a distribuição de nutrientes do construto), além de conferir propriedades isotrópicas² ao construto (GERMAIN *et al.*, 2018) (**Figura 6.3**).

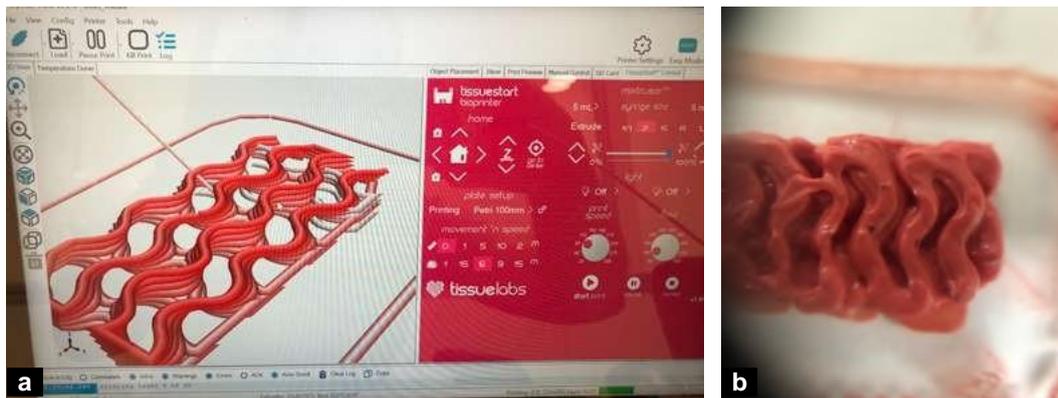


Figura 6.3 – Em (a), visualização do construto utilizando o preenchimento giróide. Em (b), teste de impressão com creme Nivea.

6.3.

BioenderTermo

Logo após o início dos testes com o preenchimento, foi entregue a BioenderTermo (**Figura 6.4**), baseada na impressora 3D Ender 3, da Creality. Esse modelo possui módulo de extrusão de seringa, com possibilidade de resfriamento a 5° C e aquecimento a 37° C (temperatura utilizada em biorreatores para o cultivo celular), além de um dispositivo de emissão UV embutido. A mesa de impressão pode ser aquecida até 60° C. Essas funcionalidades possibilitam o uso de hidrogéis termorresponsivos³, cujos experimentos serão apresentados posteriormente. Junto com a impressora, foram entregues amostras de materiais utilizados para bioimpressão, da marca Sigma-Aldrich: alginato de sódio, gelatina de pele bovina e Pluronic F-127.

¹ TPMS são “superfícies contínuas que não se interseccionam, que possuem a curvatura média igual a zero, sua área superficial é minimizada localmente de modo que se entrelaçam no espaço 3D, delimitando o volume em um número finito de ‘labirintos’” (DECKER; FRANTZ, 2022, p. 477).

² “Os materiais isotrópicos demonstram a mesma resistência e propriedades do material, independentemente da direção em que estão sujeitos a cargas ou tensões”. Disponível em: <https://www.wevolver.com/article/understanding-the-gyroid-infill-in-3d-printing>. Acesso em: 20 fev. 2023.

³ Os hidrogéis termorresponsivos sofrem alteração em seu volume ou estado físico a partir de mudanças de temperatura..

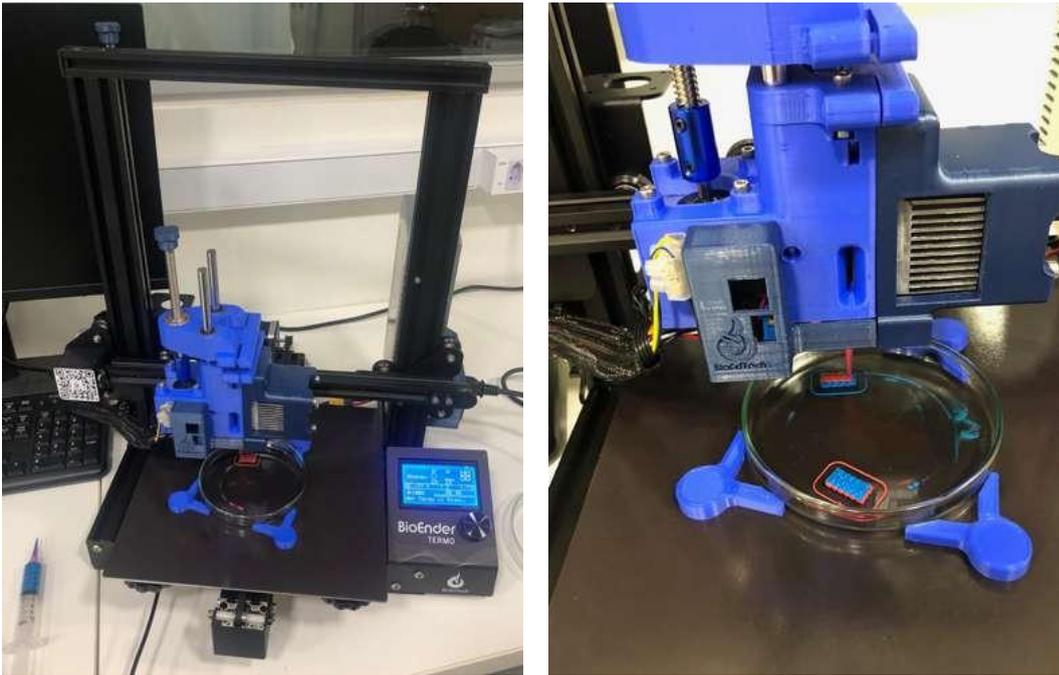


Figura 6.4 – Bioender Termo e detalhe da extrusora.

Foi indicado pela fabricante o uso do software de fatiamento PrusaSlicer⁴, também gratuito. A partir de então, os experimentos visando à impressão com células foram feitos na BioenderTermo, utilizando o PruscaSlicer. Os testes iniciais de calibração com creme Nivea ofereceram rapidamente resultados satisfatórios, orindos da facilidade da bioimpressora 3D (**Figura 6.5**).

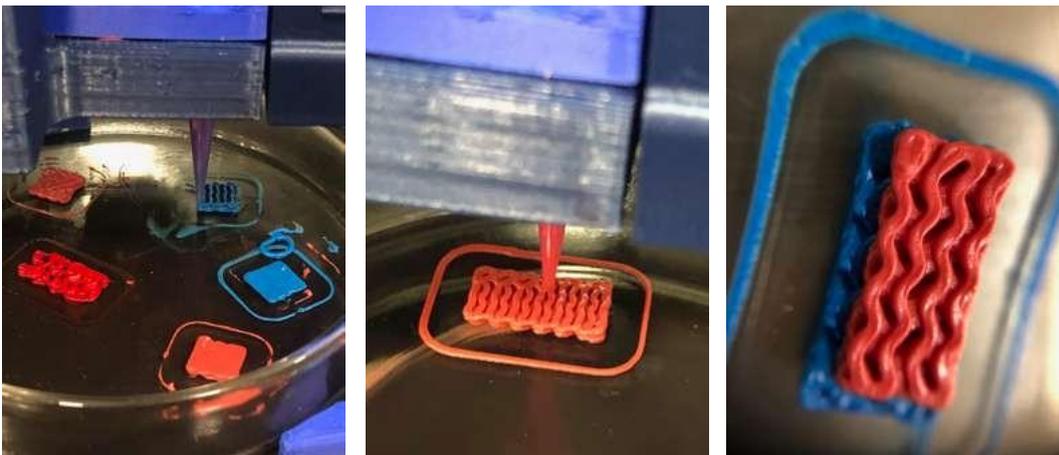


Figura 6.5 – Diferentes testes de calibração com a BioenderTermo.

Junto com a nova bioimpressora, foi firmado um acordo de consultoria com a BioedTech, o que gerou avanços, principalmente na impressão com alginato.

⁴ Disponível em: https://www.prusa3d.com/page/prusaslicer_424/. Acesso em: 20 fev. 2023.

6.4.

Bioimpressão com alginato

A consultoria indicou o artigo “Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability” (PAXTON *et al.*, 2017), para auxiliar na bioimpressão com alginato. O artigo avalia a printabilidade de diferentes hidrogéis e formulações por meio da formação de fibras e avaliação reológica.

Para os testes com alginato, foram preparadas diferentes soluções de alginato em PBS⁵, com concentrações de 4% a 10% p/v (peso/volume), que foram pré-reticuladas com soluções de cloreto de cálcio (CaCl₂), em concentrações de 0,0% a 2% p/v, em uma proporção de mistura de 7:3 em volume. As amostras foram então armazenadas a 37 °C por 24 horas e transferidas para seringas de 1 ml antes do teste. As amostras impressas foram imediatamente submersas em solução de CaCl₂ 2% p/v por 30 segundos e posteriormente lavadas em H₂O.

O artigo apresenta uma tabela, contendo o resultado dos testes com as diferentes misturas de concentrações (**Tabela 6.1**). Nela, as células sombreadas indicam a formação de fibras impressas, e o texto indica por quanto tempo as fibras foram depositadas antes de se fundir. As amostras consideradas não imprimíveis são indicadas em branco (muito líquido) ou cinza escuro (muito sólido).

		Concentração de CaCl ₂ (p/v)				
		0.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
Concentração de Alginato (p/v)	4%			1 s	5 s	
	6%		1 s	3 s	5+s	
	8%		3 s	5+s		
	10%		5 s			

Tabela 6.1 – Teste de formação de fibras e deposição de camadas com diferentes concentrações de alginato e CaCl₂. As misturas foram preparadas na proporção de volume de 7 (alginato) para 3 (CaCl₂). Fonte: Adaptado de Paxton *et al.* (2017, p. 7).

Entre as duas amostras ‘imprimíveis’ (em cinza médio), o artigo aponta que a de 8%/1% (concentração de alginato p/v / concentração de CaCl₂ p/v) possuía

⁵ Solução salina tamponada com fosfato.

consistência mais suave, por causa da menor concentração de CaCl_2 , tornando-a a amostra mais adequada para impressão. O uso de CaCl_2 já na formulação da tinta, pré-reticulando-a por 24 horas, facilita o processo de impressão, abrindo mão da necessidade de táticas de reticulação em tempo real, sendo necessário apenas o banho de CaCl_2 logo após a impressão do construto.

A fim de explorar prontamente as propriedades dessa nova formulação de alginato com CaCl_2 , utilizei os materiais e equipamentos disponíveis, fora de padrões laboratoriais (**Figura 6.6**).



Figura 6.6 – Em (a), CaCl_2 (de uso geral) e alginato (fruto de doação, fora de validade) utilizados nas formulações. Em (b), as amostras nas proporções 8% para alginato (tingido com corante alimentício a base de algas) e 1% para cloreto de cálcio. Em (c), a seringa contendo a tinta misturada, após 24 horas. Em (d), presença de inúmeras bolas na tinta.

O primeiro teste de impressão com a BioenderTermo já demonstrou a eficácia dessa nova formulação, apresentando um construto com firmeza estrutural. Entretanto, as fibras impressas ficaram muito grossas e, quando receberam o banho de CaCl_2 a 2%, os furos do construto praticamente sumiram (**Figura 6.7**).

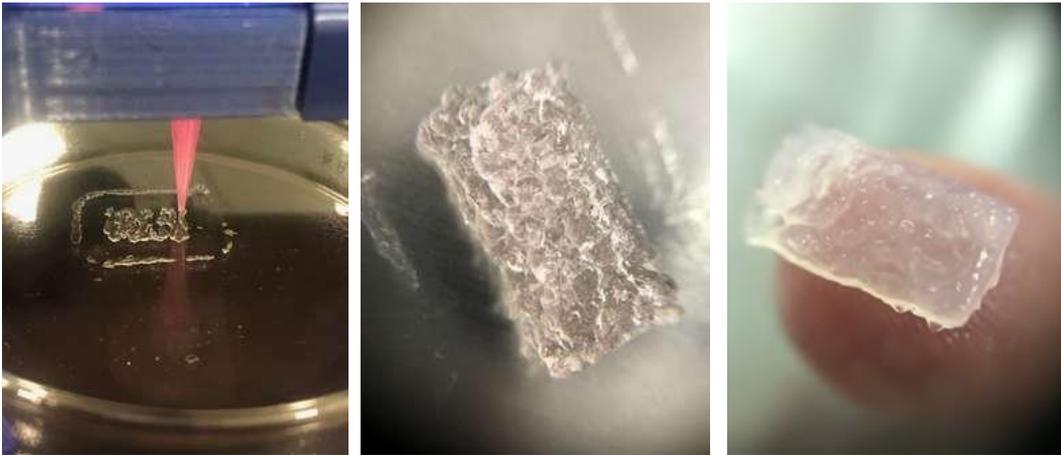


Figura 6.7 – Primeiro teste de impressão com a fórmula 8% 1%, gerando um construto firme que, ao receber o banho de CaCl_2 se tornou praticamente sólido.

Mais alguns testes foram realizados, aumentando as dimensões do modelo e diminuindo o fluxo de impressão, para assim gerar fibras mais finas e aumentar a porosidade do construto (**Figura 6.8**). Convencionou-se o uso de ponteira com 20G, pois ela possibilitava impressão com resolução ótima sem o risco de obstruir a passagem de esferoides celulares (com aproximadamente $600\ \mu\text{m}/0,6\text{mm}$), por possuir diâmetro interno de $900\ \mu\text{m}/0,9\text{mm}$. Também foram realizados testes com modelo cilíndrico, buscando menor tempo de impressão (**Figura 6.9**).

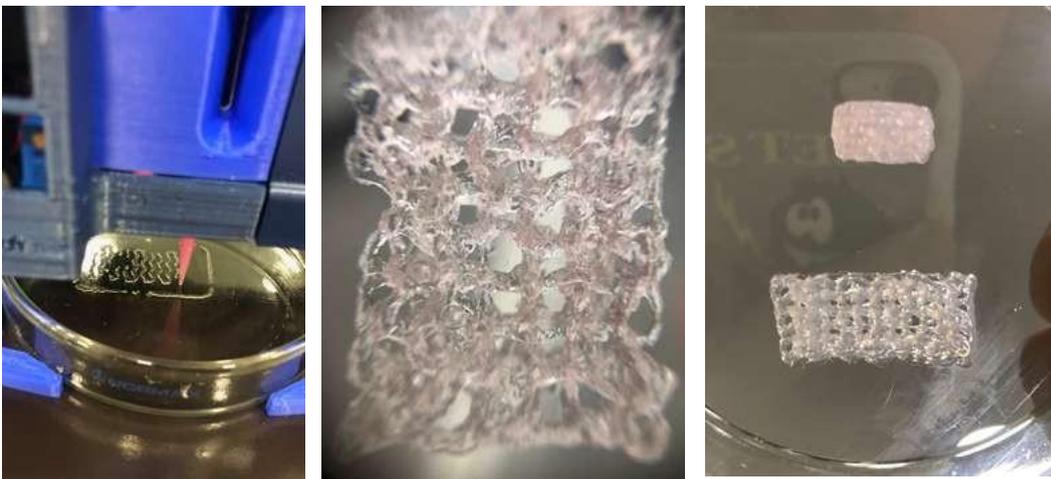


Figura 6.8 – Após novas tentativas, o construto de alginato apresentou uma maior porosidade em relação ao primeiro impresso.

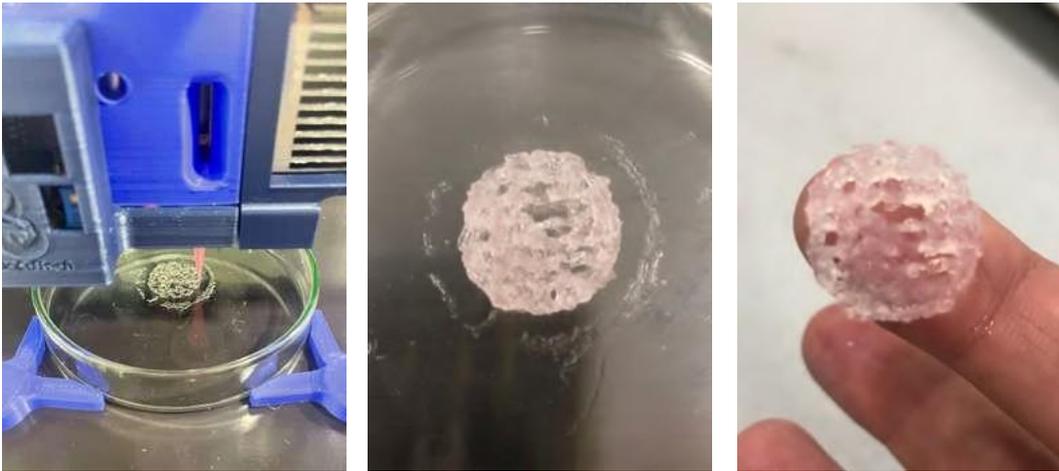


Figura 6.9 – Impressão de modelo em formato cilíndrico.

6.5. Bioimpressão 3D de biotinta com esferoides

6.5.1. Preparação

Com o sucesso inicial dos testes com alginato 8% 1%, o grupo passou a planejar uma bioimpressão 3D utilizando esferoides compostos por células SAOS 2 (osteossarcoma diferenciado) fixadas⁶ e marcados com Faloidina (marcador fluorescênte de fibras de actina). Esferoides são agregados celulares que se auto-organizam quando cultivados em superfícies não adesivas, preservando as interações célula-célula e o fenótipo específico do tecido de origem (DE MELO *et al.*, 2021) (**Figura 6.10**).



Figura 6.10 – Etapas na formação dos esferoides. Agregação celular: células individuais próximas umas às outras, de maneira não organizada. Acumulação de proteínas: as células mais próximas umas das outras. Compactação do esferoide: a formação do esferoide completo com a adesão entre as células (MEDRADES, 2021). Fonte: Adaptado de Han; Kwon; Kim (2021, p. 3).

⁶ A *fixação* é um processo químico pelo qual tecidos biológicos são preservados da decomposição, cessando reações bioquímicas. O propósito da fixação é a preservação do material biológico o mais próximo ao seu estado natural. Disponível em: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Fixa%C3%A7%C3%A3o_\(histologia\)](https://pt.wikipedia.org/wiki/Fixa%C3%A7%C3%A3o_(histologia)). Acesso em: 20 fev. 2023.

Eles são uma opção mais eficiente que o cultivo 2D de células, pois promovem uma melhor atividade metabólica, viabilidade celular, estabilidade morfológica e capacidade de diferenciação celular. A bioimpressão 3D pode potencializar essas propriedades, produzindo construtos tridimensionais contendo esferoides espacialmente organizados (BANERJEE *et al.*, 2022).

Pensando em uma futura impressão com esferoides contendo células vivas, o grupo decidiu testar o uso de meio de cultura (DMEM⁷) já na biotinta, visando a uma melhor viabilidade celular. O uso do meio de cultura desde o primeiro teste seria importante para verificar possíveis alterações na printabilidade de biotinta. Também foi utilizado um alginato da marca Sigma-Aldrich, na validade (**Figura 6.11**).

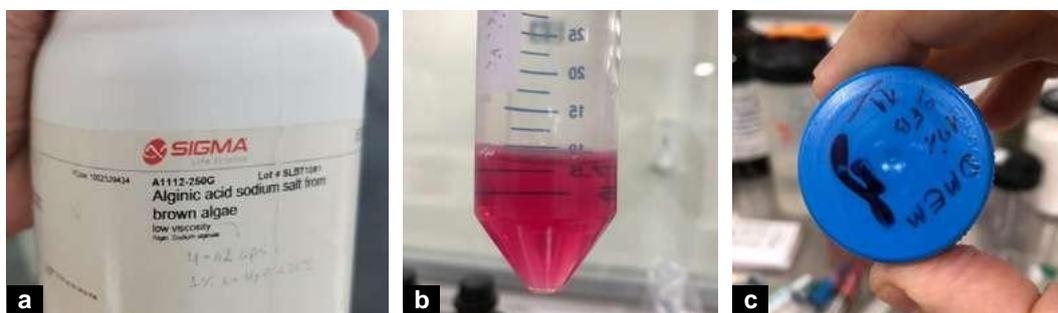


Figura 6.11 – Em (a), o alginato utilizado no teste a seguir. Em (b,c), a amostra de DMEM usada nas soluções, no lugar de água destilada.

O teste com essa formulação gerou um hidrogel de baixa printabilidade. A causa mais provável é o alginato, pois, posteriormente, percebeu-se que se tratava de um lote de baixa viscosidade (**Figura 6.12**).

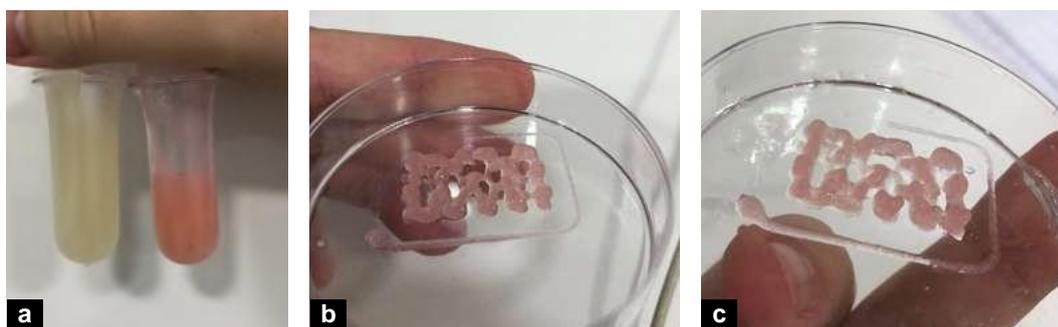


Figura 6.12 – Em (a), mistura de alginato sem DMEM e com DMEM. Em (b,c), a tentativa de impressão com a tinta contendo DMEM e alginato de baixa viscosidade.

⁷ O Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) é uma modificação do meio Eagle Basal (BME), sendo este desenvolvido por Harry Eagle para atender às necessidades nutricionais específicas de certos subtipos de células HeLa e de fibroblastos mamíferos normais. Disponível em: <https://exodocientifica.com.br/meio-mem-dmem/>. Acesso em: 20 fev. 2023.

Com a necessidade de uma série de equipamentos para a execução do experimento de maneira precisa, ele foi executado no laboratório da Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC) do Hospital Universitário Antonio Pedro (HUPE), da UFF, com a supervisão de Jéssica Dornelas.

A proposta inicial era realizá-lo em dois dias: no primeiro, seria preparada a biotinta e, no segundo dia, seria feita a bioimpressão. Dessa forma, o tempo para a formulação de alginato com CaCl_2 pré-reticular seria de cerca de 24 horas. Entretanto, já no primeiro dia, fomos informados de que não seria possível o retorno no dia seguinte, o que levou a improvisos para a realização do experimento.

6.5.2.

Execução do experimento

Este seria o primeiro experimento realizado com rigor laboratorial, portanto o primeiro a fazer uso de insumos menos acessíveis.

Como os esferoides utilizados foram de células ósseas (SAOS 2 – osteossarcoma diferenciado), decidimos incluir na biotinta a Hidroxiapatita carbonatada (CHA), pois ela é o principal componente da parte inorgânica óssea, representando de 50% a 70% do peso seco dos ossos. Seu uso em *scaffolds* tem produzido efeitos benéficos relacionados à diferenciação osteogênica⁸ de células-tronco (WENZ *et al.*, 2016). De acordo com o WENZ *et al.*, a proporção de 1% de CHA na biotinta se mostra ideal.

Para a posterior visualização em microscópio, decidimos adicionar uma molécula fluorescente, a *curcumina*, substância natural retirada da cúrcuma (também conhecida como açafrão-da-terra), como corante da biotinta. As pesquisadoras propuseram seu uso na proporção de 0,1% com base na consulta ao engenheiro químico Marcel Martins.

A partir do resultado do teste realizado com o alginato *low-viscosity*, para este experimento utilizamos a amostra de alginato (Sigma-Aldrich W201502) recebida juntamente da BioenderTermo. Também foi utilizado CaCl_2 dihidratado de uso laboratorial (**Figura 6.13**).

⁸ Processo pelo qual células-tronco se diferenciam em células do tecido ósseo.



Figura 6.13 – Em (a), manipulação do CaCl_2 com espátula. Em (b), amostras de CHA, curcumina e alginato W201502. Em (c,d), pesagem das amostras com balança semianalítica.

A formulação da biotinta foi a seguinte:

1. Em 4ml de DMEM (meio de cultura) foram adicionados, na ordem:
 - 0,32g alginato W201502 (em banho maria, facilitando a diluição do alginato)
 - 0,08g CHA
 - 0,004g curcumina
2. Em seguida, foram adicionados cerca de 15 esferoides com uma pipetadora, seguido do uso de uma espátula fina para a mistura, de forma a minimizar a desestruturação deles.
3. Posteriormente foram adicionados 1,71ml de CaCl_2 a 1% diluído em água deionizada.
4. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 4 min à rotação 1300 rpm para a remoção de bolhas.

O processo foi realizado com uso de pipetadoras para maior precisão. O resultado foi uma biotinta com viscosidade aparentemente viável, aproximando-se do Creme Nivea (**Figura 6.14**).

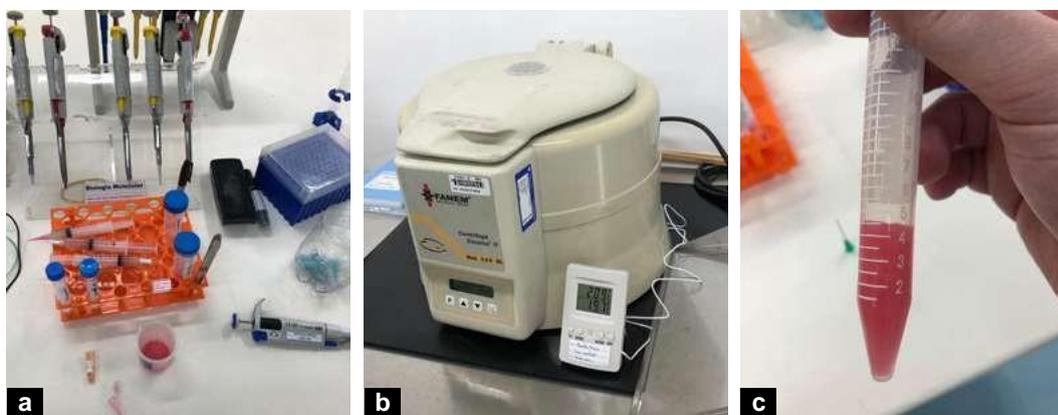


Figura 6.14 – Em (a), bancada com as amostras e pipetadoras utilizadas. Em (b), a centrifuga utilizada para remoção das bolhas. Em (c), a biotinta após a centrifugação.

Como exposto anteriormente, não foi possível esperar as 24 horas de pré-reticulação do alginato com CaCl_2 , sendo esse tempo reduzido para cerca de 3 horas. Também devido à limitação de tempo, optei por imprimir o modelo cilíndrico. A impressão ocorreu com falhas, havendo necessidade de pausas esporádicas para ajuste manual do construto com o escoamento da tinta. A impressão durou cerca de 1 hora e 10 minutos (**Figura 6.15**).

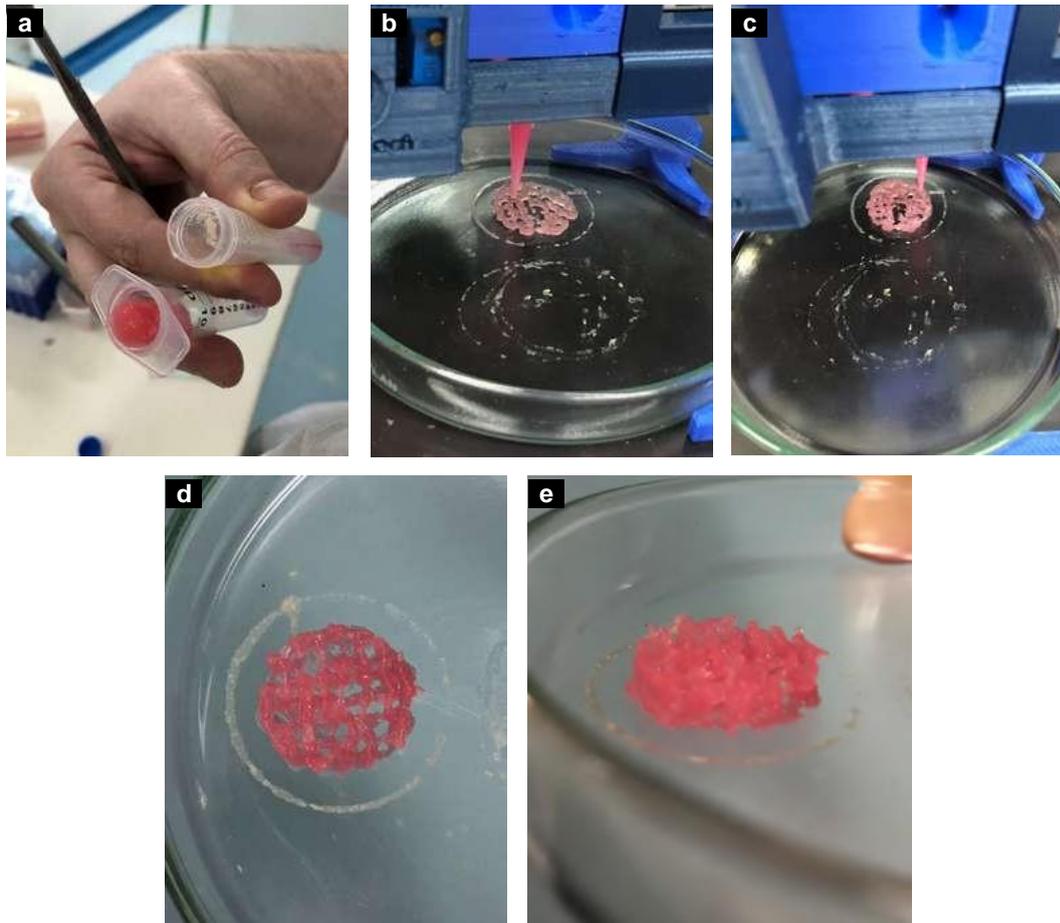


Figura 6.15 – Em (a), o carregamento da seringa de 10ml com a biotinta. Em (b,c), o processo de impressão, evidenciando as falhas no construto. Em (d,e), o construto impresso.

Uma das possibilidades para o comportamento da biotinta foi justamente a falta de tempo para a ação do CaCl_2 na reticulação dela. Após o banho com CaCl_2 a 2% e posterior lavagem com água destilada (**Figura 6.16**), o construto foi entregue para visualização via microscopia confocal.

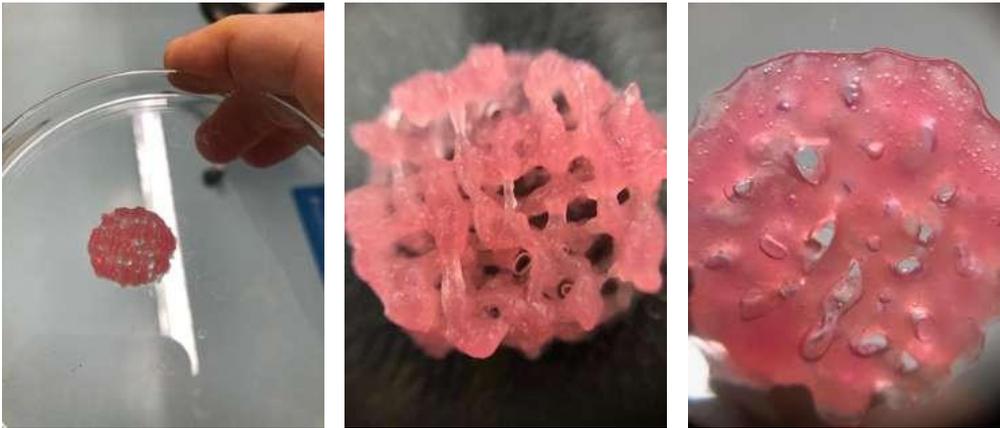


Figura 6.16 – Imagens do construto após o banho com CaCl_2 para finalizar a reticulação do alginato.

Com a microscopia confocal, é possível visualizar a reconstrução tridimensional da topografia das amostras através de imagens em alta resolução agrupadas. Na amostra enviada, foi possível encontrar apenas um esferoide no construto, marcado em vermelho. A curcumina e a CHA deveriam aparecer em verde, porém não é possível distingui-las. A curcumina não cumpriu a função pensada de marcar a estrutura do hidrogel no espaço (**Figura 6.17**).



Figura 6.17 – Visualização, a partir de microscópio confocal, de um esferoide no construto.

6.6.

Considerações

A parceria com as pesquisadoras Sara Gemini e Jéssica Dornelas se mostrou bastante assertiva e frutífera. Houve avanço significativo, culminando na primeira bioimpressão 3D com células. Também foi a primeira experiência realizada com

rigor e equipamentos laboratoriais, gerando uma série de procedimentos a serem levados em consideração.

A cooperação com diferentes áreas possibilitou o refinamento das características do construto, especialmente geométricas, visando à otimização do pós-processamento da bioimpressão 3D.

Ao mesmo tempo que mostrou um caminho a ser seguido nos próximos passos em relação à biotinta, o experimento descrito exigiu uma série de novos requisitos. O tempo correto de pré-reticulação da formulação de alginato com CaCl_2 foi fundamental, pois sem ele não era possível alcançar uma boa printabilidade da tinta. A necessidade de os testes serem realizados com os equipamentos e insumos adequados e de forma sistemática também ficou clara. Mostrou-se necessária, ainda, uma maior atenção aos corantes usados, de maneira a possibilitar uma melhor visualização por meio de microscopia. Em paralelo, a BioenderTermo se revelou uma bioimpressora eficaz e de fácil manuseio durante o experimento.

As informações levantadas serviram de base para a estruturação das rodadas seguintes de experimentos, apresentadas no próximo capítulo.

Desenvolvimento e bioimpressão 3D de biotintas com clorofila

Neste capítulo, apresento as últimas rodadas de experimentos, esquematizadas a partir dos resultados apresentados no Capítulo 6. Nelas, além da continuidade da parceria com Sara Gemini e Jéssica Dornelas, contei também com o apoio do engenheiro químico Marcel Martins, que já desenvolve projetos em conjunto com as pesquisadoras. Para sanar a questão do uso de equipamentos e oferecer maior rigor para essas rodadas, conseguimos a autorização para utilizar o Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional (LabNanoBiof), da professora Priscila Finotelli, na Faculdade de Farmácia/UFRJ. Também contei com o auxílio da bolsista de Biomedicina Marisol Santos durante os experimentos.

A partir dos resultados obtidos no último experimento realizado, decidimos focar nossa estratégia no aperfeiçoamento das biotintas. Precisávamos chegar a um padrão de reologia que pudesse ser replicado sem grandes ajustes – que podem decorrer de fatores como mudança de marca ou lote de insumos, por exemplo.

Outro fator ponderado foi em relação à visualização do construto impresso em microscopia. Para conseguir marcar o hidrogel e ter uma visualização da estrutura geral do construto, decidimos testar o uso de clorofila¹ na formulação e, para marcar a CHA, optamos pela curcumina².

7.1.

Primeira rodada de experimentos

O primeiro passo foi testar a luminescência dos marcadores escolhidos: curcumina e clorofila. Para isso, foram realizados testes com esferas de alginato marcados com ambos os corantes, imersos em CaCl_2 , formando as esferas que foram então analisadas na microscopia de epifluorescência (**Figura 7.1**).

¹ “A clorofila é o pigmento que confere a cor verde às folhas. Isso ocorre devido a sua absorção principalmente de luz nos comprimentos de onda violeta e azul bem como no vermelho. A absorção da luz azul excita a clorofila a um estado energético mais elevado que a absorção de luz vermelha, pois a energia dos fótons é maior quando seus comprimentos de onda são menores”. Disponível em: <https://ensinopraticodebotanica.furg.br/fisiologia/experimento-05.html>. Acesso em: 20. jan 2023.

² A curcumina é um dos três pigmentos curcuminóides encontrados na cúrcuma, apresentando fluorescência amarela sob luz ultravioleta.

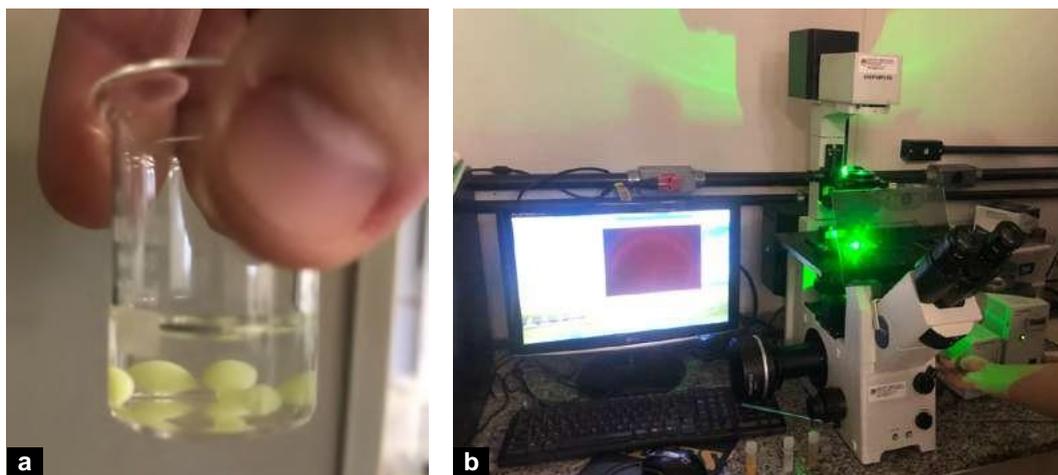


Figura 7.1 – Em (a), as esferas de alginato marcadas com clorofila. Em (b), um microscópio de epifluorescência.

Os resultados da microscopia apresentaram a curcumina com marcação proeminente. Já a clorofila apresentou uma marcação fraca, que servia ao propósito de marcação espacial do hidrogel no construto, sem interferir na visualização de outras partículas e dos esferoides (**Figura 7.2**).

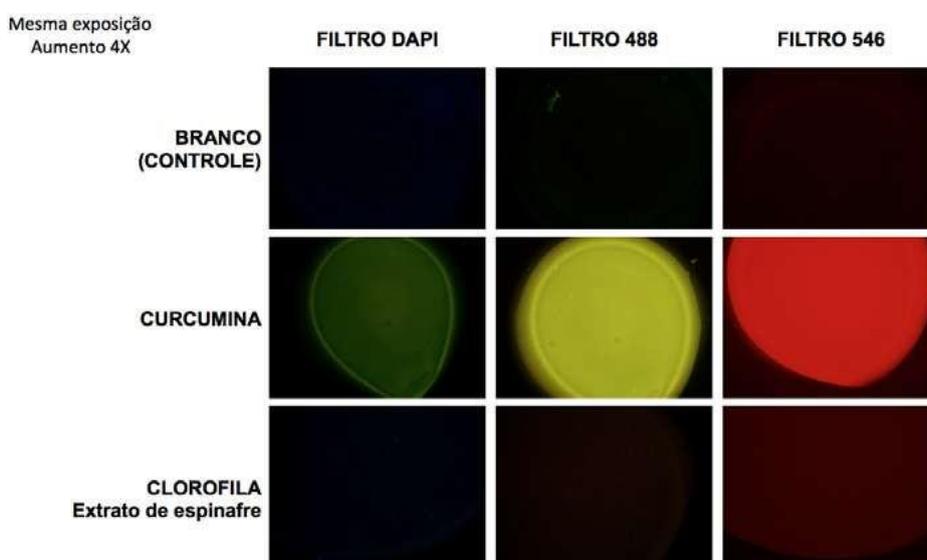


Figura 7.2 – Luminescência dos marcadores utilizados nas esferas de alginato.

A partir desse resultado, iniciamos a preparação da biotinta para impressão do construto.

A mistura com clorofila foi produzida por mim, em casa, a partir de 4g de folhas de espinafre *babyleaf* (sem o talo) adicionadas a 40 ml de água destilada, passada em mixer doméstico e posteriormente coada com 2 filtros: um filtro usado para pó de café e um filtro qualitativo laboratorial para retenção de partículas (**Figura 7.3**).



Figura 7.3 – Em (a), as folhas de espinafre. Em (b), as amostras de água destilada com clorofila.

Para marcar a CHA com a curcumina, realizamos o processo de *impregnação por evaporação de solvente*. Primeiramente foi adicionado acetona ao pó de cúrcuma, para extrair os curcuminóides (fluoróforo natural), que são praticamente insolúveis em água, porém possui boa solubilidade em solventes orgânicos. O processo de extração em solvente foi realizado com auxílio de um sonicador. Após a extração, o sólido remanescente foi decantado e o sobrenadante filtrado (membrana 0,22 μm), resultando em um extrato de curcumina em acetona, livre de particulados. Em uma capela química, a CHA foi depositada em placa de petri e submetida a aquecimento (70° C), enquanto o extrato de curcumina foi gotejado sobre a matriz adsorvente. Nestas condições a curcumina é adsorvida na CHA e a acetona é eliminada por evaporação, resultando em um pó amarelado (CHA + curcumina). Para garantir que não houvesse excesso de curcumina na CHA, o sólido resultante foi ressuspenso em água e foram realizadas algumas lavagens sob aplicação de ultrassom, até o sobrenadante se apresentar incolor. O resultado é um pó homogêneo com coloração amarelada, resultante da incorporação de curcumina na CHA (**Figura 7.4**).

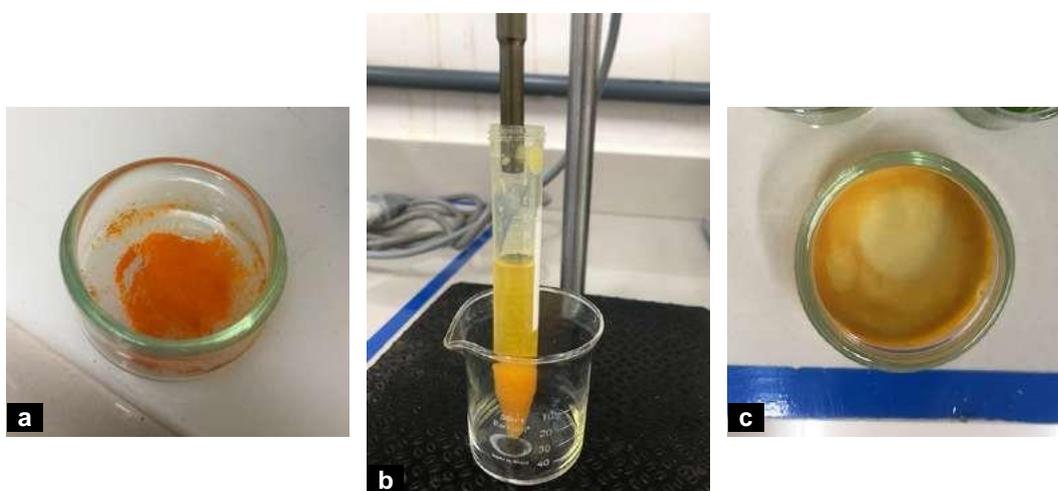


Figura 7.4 – Em (a), a curcumina em pó. Em (b), a solução de curcumina com acetona. Em (c), a CHA marcada com a curcumina após a evaporação da acetona.

A biotinta foi produzida com base no artigo de Paxton *et al.* (2017), conforme descrito a seguir:

1. Em 3,5ml de água destilada com clorofila foram adicionados, na ordem:
 - 0,28g de alginato *low viscosity*³ (utilizando plataforma aquecida a 30%)
 - 0,047g de CHA+ curcumina (1%, visando à biotinta final de 5ml)
2. Posteriormente foram adicionados 1,5ml de CaCl₂ a 1% diluído em água destilada com clorofila.

A mistura final ficou com cerca de 4ml, considerando as perdas com o aquecimento (pois na plataforma disponível não havia opção de temperatura constante) e a própria diferença entre volumes após a reticulação do alginato com CaCl₂. Para esse teste, foi utilizado o alginato *low viscosity*, e o tempo de pré-reticulação foi reduzido, pois seria apenas um teste para visualização. Durante a impressão, foi preciso aumentar o fluxo, elevando a 120% e após, gradualmente, a 140%, e diminuir a velocidade da impressão a 75% do padrão (**Figura 7.5**).

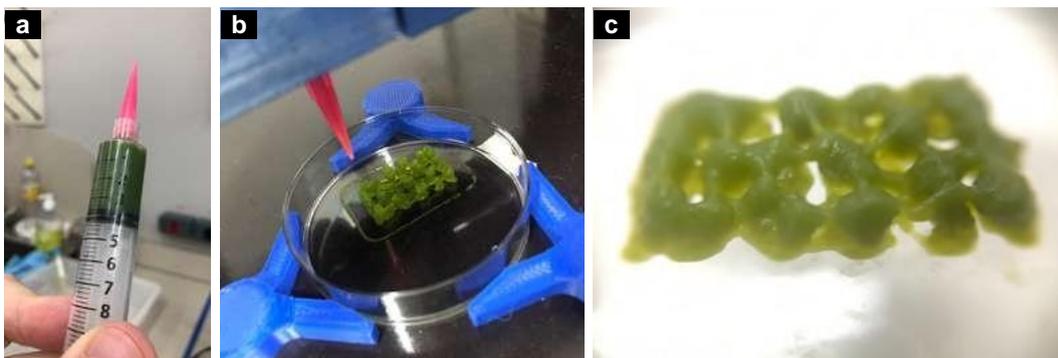


Figura 7.5 – Em (a), seringa carregada com a biotinta. Em (b), a impressão irregular. Em (c), o construto impresso após o banho de CaCl₂ a 2%.

A microscopia epifluorescente do construto apresentou resultados satisfatórios, delimitando o hidrogel nas imagens (**Figura 7.6**).

³ Sigma-Aldrich A1112 – Low viscosity.

IMPRESSÃO
Aumento 4X

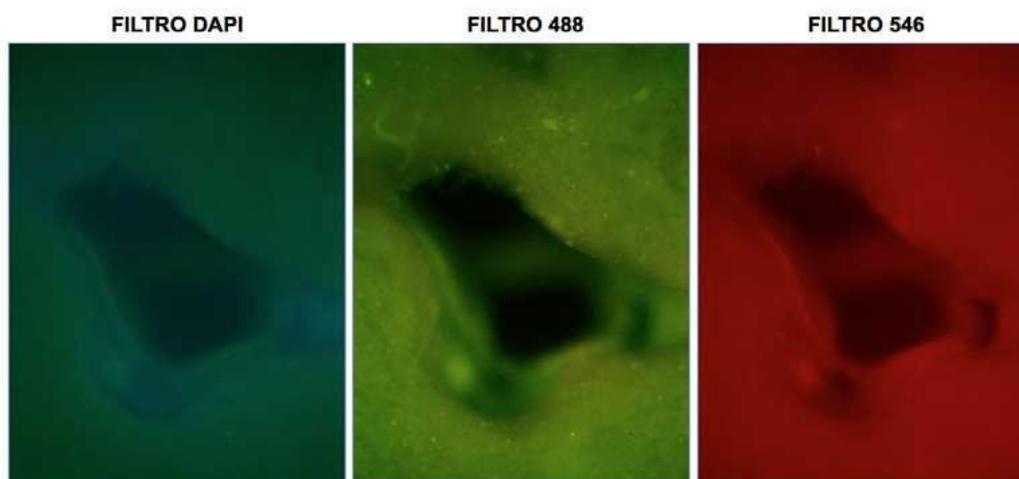


Figura 7.6 – Resultado da microscopia epifluorescente em diferentes filtros.

7.2.

Segunda rodada de experimentos – 3 biotintas

Para a nova rodada de experimentos, realizada em dois dias seguidos, optei por utilizar ao máximo o tempo disponível no laboratório e as amostras entregues junto da BioenderTermo.

Além da formulação de alginato⁴ + CHA + CaCl₂ (desta vez utilizando o alginato recebido com a BioenderTermo) e ainda usando como base o artigo de Paxton *et al.* (2017), produzimos uma biotinta de alginato + gelatina de pele bovina + CHA. De acordo com Li *et al.*, (2018), a biotinta de alginato + gelatina alcança maior resolução e precisão em comparação com biotintas com alginato pré-reticulado. Além disso, segundo SONAYE *et al.* (2022), a gelatina pode fornecer melhor adesão celular à biotinta contendo alginato e melhorar sua bioatividade.

Também produzimos uma biotinta de alginato + Pluronic F-127, utilizando como base o artigo “3D Bioprinting Using a Templated Porous Bioink” (ARMSTRONG *et al.*, 2016). Nele, os autores apontam que o Pluronic atua como um estabilizador da biotinta, por gelificar quando aquecido (funcionando de maneira inversa à gelatina). Além disso, ele também se torna um material de sacrifício, sendo dissolvido e tornando o construto de alginato poroso, o que facilita a difusão de nutrientes.

Todas as biotintas foram produzidas com água destilada adicionada de clorofila, e toda CHA utilizada foi marcada com curcumina (**Figura 7.7**).

⁴ Sigma-Aldrich W201502.



Figura 7.7 – Béqueres com as amostras das 3 biotintas preparadas no primeiro dia.

Por se tratar de um teste inicial com o material Pluronic F-127, optamos por não adicionar CHA nessa biotinta. Seguem abaixo as **Tabelas 7.1, 7.2 e 7.3** criadas para a realização das formulações:

Alginate W201502 8% + CHA/Curcumina 1% + CaCl₂ 1% (solução de 2ml + 0,85ml - proporção 7:3)	
ALG 0,16g (8%) diluída em 2ml + CHA 0,02g (2%)	[misturar a 30° C]
+	
CaCl ₂ (1%) utilizados 0,85ml	[misturar a temp. ambiente]
=	
Solução ALG-CaCl ₂ -CHA	[misturar a temp. ambiente]
Impressão	Pós-impressão
Extrusora e mesa na temp. ambiente	Banho de CaCl ₂ 2% por 10 segundos e banho de H ₂ O

Tabela 7.1 – Mistura de alginato com cloreto de cálcio.*A proporção de CHA na solução final não é exata pelo volume final ser menor que a soma dos 2 volumes iniciais.

Alginate low viscosity 4% + CHA/Curcumina 1% + Gelatina 20% (solução de 1ml + 1ml)	
ALG 0,04g (4%) diluída em 1ml + CHA 0,02g (1%*)	[misturar a 30° C]
+	
GEL 0,20g (20%) diluída em 1ml	[misturar a 30° C]
=	
Solução ALG-GEL-CHA	[misturar a 30° C]
Impressão	Pós-impressão
Extrusora a 37° C e mesa a 10° C	Banho de CaCl ₂ 2% por 30 segundos e banho de H ₂ O

Tabela 7.2 – Mistura de alginato com gelatina.*CHA foi misturado somente com ALG, gerando a proporção final de CHA 1% para solução de 2ml.

Alginato <i>low viscosity</i> 6% + Pluronic 13% (solução de 2ml)	
ALG 0,12g (6%) diluída em 1ml +	[misturar a 30° C]
PLU 0,26g (13%) diluída em 1ml =	[misturar a 5° C]
Solução ALG-PLU 6%-13%	[misturar a 5° C, depois 2h em geladeira e 10 min em temp. ambiente pré uso]
Impressão	Pós-impressão
Extrusora a 24° C e mesa a 37° C	Banho de CaCl ₂ 2% por 30 segundos e banho de H ₂ O

Tabela 7.3 – Mistura de alginato com Pluronic.

Para a diluição do Pluronic, foi utilizada uma placa de petri maior, contendo gelo e água, para diminuir a temperatura. Usou-se essa mesma estratégia para a placa onde seria impressa a formulação com gelatina (**Figura 7.8**).

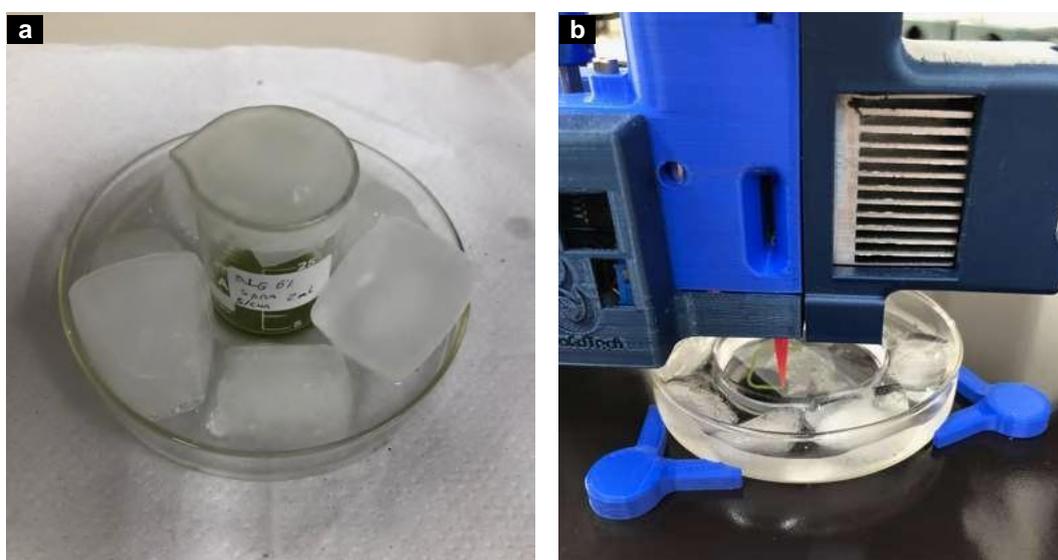


Figura 7.8 – Em (a), a placa de petri com gelo para a mistura do Pluronic. Em (b), a placa de petri com gelo na mesa da bioimpressora, tendo uma placa menor fixada no centro para a impressão da biotinta com gelatina.

Antes da impressão, as biotintas passaram por centrifugação de cerca de 3500 RPM por 10 segundos⁵ para remoção de bolhas.

⁵ O tempo de uso foi reduzido pois o equipamento desgastava a base do êmbolo das seringas utilizadas.

A primeira biotinta testada continha gelatina, material que gelifica em baixas temperaturas e se liquefaz em altas. A extrusora foi aquecida a 37° C, conforme informado no artigo, e a bandeja se aproximou dos 10° C. Entretanto, a biotinta se tornou rapidamente muito gelificada, não formando camadas e inviabilizando a impressão.

Prontamente, por conta do tempo, iniciamos a impressão da biotinta contendo alginato com CaCl_2 , (**Figura 7.9**). Para esse teste, a temperatura da extrusora foi colocada em 30° C, enquanto a bandeja permaneceu na temperatura ambiente (cerca de 24° C). Ao longo da impressão, o fluxo teve que ser aumentado gradativamente a 125% e a 133%.

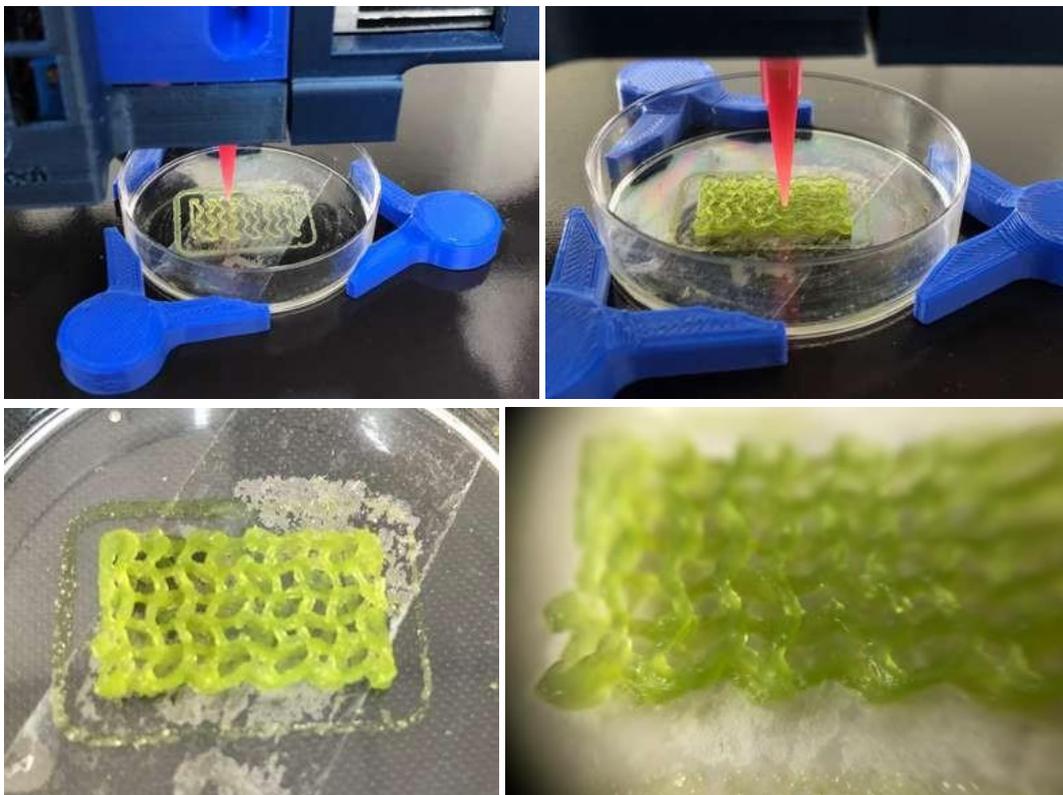


Figura 7.9 – Processo de impressão da biotinta de alginato com CaCl_2 .

Mesmo após a reticulação com o banho de CaCl_2 a 2%, a trama permaneceu espaçada e com homogeneidade satisfatória (**Figura 7.11**).



Figura 7.10 – Construto após o banho de CaCl_2 a 2%.

Essa foi a impressão de construto com o melhor resultado formal obtido durante os experimentos, alcançando uma fidelidade geométrica em relação ao modelo 3D pouco vista, mesmo em inúmeros artigos consultados sobre o tema.

O teste com o alginato + Pluronic não foi realizado. O Pluronic possui comportamento inverso ao da gelatina: ele se liquefaz em baixas temperaturas e gelifica em temperatura ambiente. Porém, mesmo após deixar a formulação fora da geladeira, a mesma manteve sua forma líquida, o que inviabilizou a impressão.

7.3.

Terceira rodada de experimentos

Para a terceira rodada, além de produzirmos uma biotinta de alginato + CaCl_2 contendo esferoides fixados (para a visualização na microscopia confocal), testamos duas novas formulações de biotintas, com gelatina de pele bovina e Pluronic – nessas duas, sem fazer uso da clorofila, de hidroxiapatita ou de esferoides.

A insistência nessas formulações se deu pelas possibilidades que elas traziam, juntamente com as capacidades de controle de temperatura da BioenderTermo, além da gelatina e do Pluronic serem substâncias muito utilizadas na bioimpressão, aparecendo com frequência em novos artigos. Especificamente sobre o Pluronic, causou estranheza a não gelificação da biotinta. Para esse novo teste, não foi incluída a clorofila na formulação, para tentarmos emular ao máximo o artigo usado como referência.

7.3.1.

Impressão com alginato + CaCl_2

A biotinta utilizou a mesma proporção da segunda rodada, aumentando o volume da biotinta. Também foram adicionados os esferoides celulares fixados, antes da pré-reticulação com CaCl_2 . Segue a **Tabela 7.4** gerada:

Alginato W201502 8% + CHA/Curcumina 1% + CaCl ₂ 1%	
(solução de 5,5ml - proporção 7:3) - estocada por 24 horas	
ALG 0,32g (8%) diluída em 4ml + CHA 0,04g (2%)* [misturar a 30° C]	
+	
40 esferoides em meio aquoso – 0,5ml	[misturar a temp. ambiente]
+	
CaCl ₂ (1%) utilizados 1,7ml	[misturar a temp. ambiente]
=	
Solução ALG-CaCl ₂ -CHA	[misturar a temp. ambiente]
Impressão	Pós-impressão
Extrusora e mesa na temp. ambiente	Banho de CaCl ₂ 2% por 10 segundos e banho de H ₂ O

Tabela 7.4 – Nova mistura de alginato com cloreto de cálcio. *A proporção de CHA na solução final não é exata, pelo volume final ser menor que a soma dos 2 volumes iniciais.

Para a mistura do alginato ocorrer a 30° C, utilizamos a mesa aquecida da BioenderTermo, já que a plataforma aquecida disponível não possibilitava essa precisão (**Figura 7.11a**). A solução da biotinta obtida tinha 5,5ml (**Figura 7.11b**).

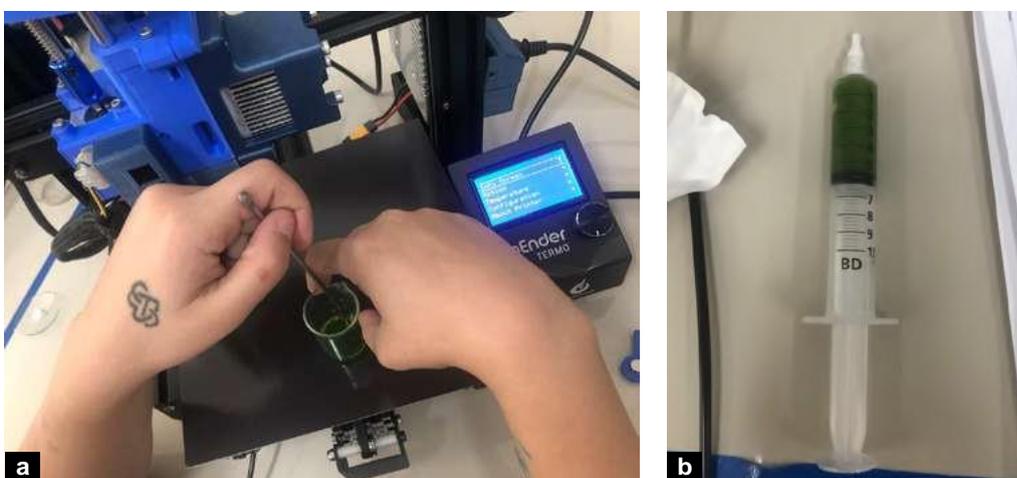


Figura 7.11 – Em (a), a bolsista Marisol Santos utilizando a mesa aquecida da BioenderTermo para misturar o alginato na clorofila. Em (b), a seringa carregada com a biotinta.

No início da primeira tentativa de impressão do alginato + CaCl₂ a biotinta apresentou comportamento similar à produzida com alginato *low viscosity*, ou seja, com pouca printabilidade (**Figura 7.12a**). Como essa biotinta estava carregada com os esferoides, testamos aquecê-la com a mesa aquecida um pouco mais, até torná-la visualmente mais viscosa. Tal procedimento foi realizado levando em conta as

possíveis perdas de água por evaporação na mistura anterior, utilizando a plataforma aquecida. Posteriormente, descobri que a extrusora da bioimpressora estava apresentando problemas, não realizando a extrusão contínua em baixas velocidades e fluxos, o que certamente também afetou as impressões. Mesmo assim, foi possível imprimir um construto com fidelidade ao modelo 3D, aumentando o fluxo na impressora para cerca de 140%. (**Figura 7.12b,c**)

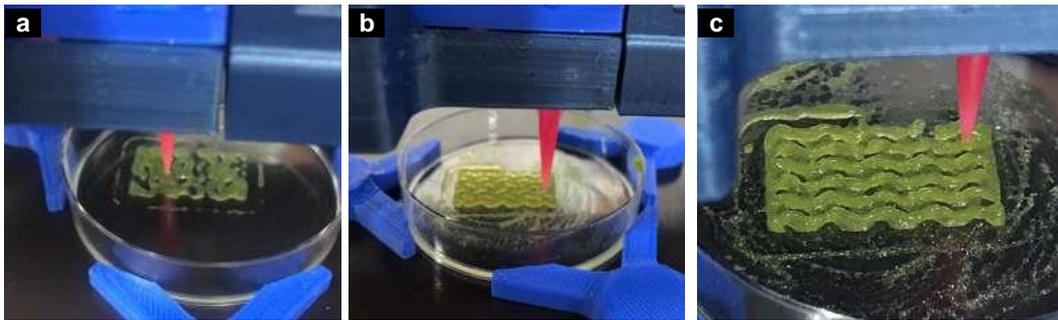


Figura 7.12 – Em (a), a impressão inicial. Em (b,c), o processo de impressão após aquecer o hidrogel até se tornar mais viscoso.

Após a impressão e o banho com CaCl_2 , o construto foi enviado para a microscopia confocal (**Figura 7.13**).

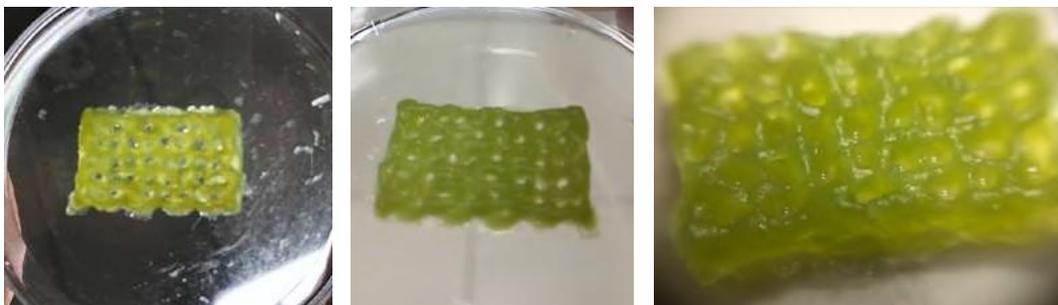


Figura 7.13 – Construto impresso após o banho com CaCl_2 .

A microscopia confocal conseguiu mostrar novamente um esferoide, além de partículas que podem ser de CHA com curcumina. Também foi possível identificar o hidrogel, com a coloração mais fraca, conforme desejávamos (**Figura 7.14**).

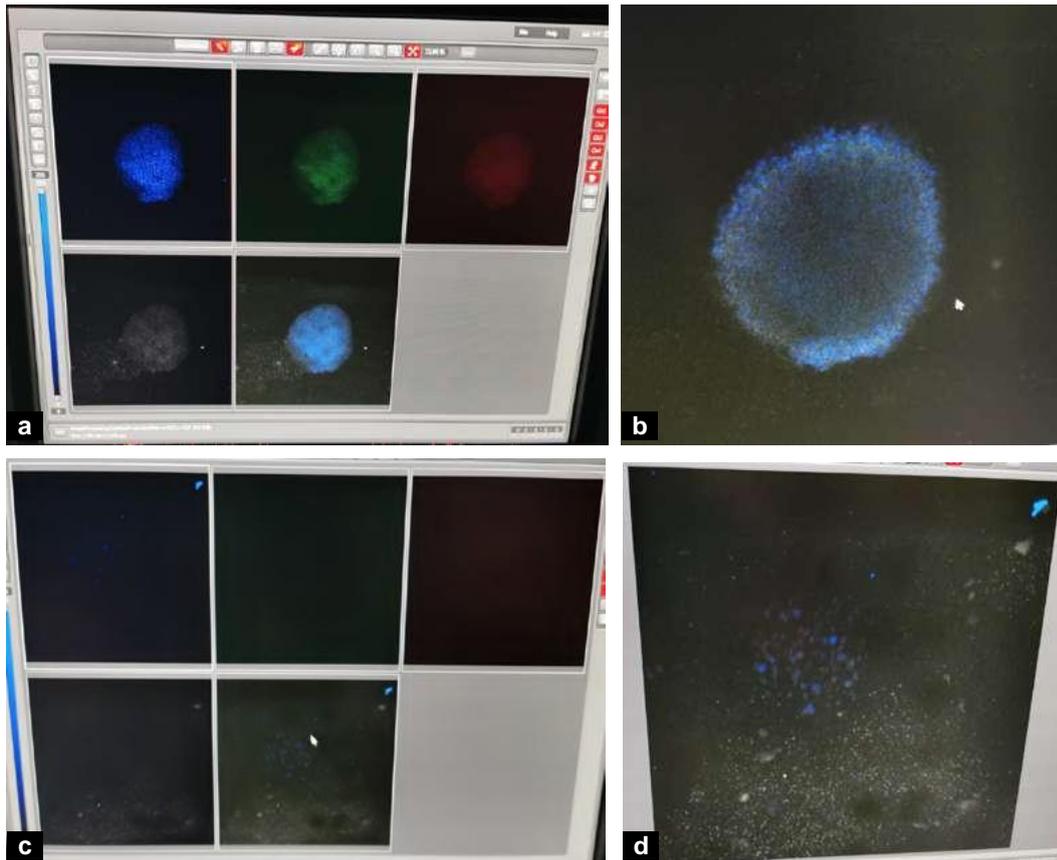


Figura 7.14 – Microscopia confocal do construto impresso. Em (a,b), o esferoide marcado com DAPI, fluorescendo em diversos feixes de luz. Em (c,d), partículas (em azul) encontradas no hidrogel (verde acinzentado).

7.3.2.

Impressão com alginato + gelatina

A partir do artigo “Tuning Alginate-Gelatin Bioink Properties by Varying Solvent and Their Impact on Stem Cell Behavior“ (LI *et al.*, 2018), testamos a formulação alginato 8% + gelatina 20%, na proporção 1:2, conforme **Tabela 7.5** a seguir:

Alginate W201502 8% + Gelatina 20% (solução de 1,5ml + 3ml)	
ALG 0,12g (8%) diluída em 1,5ml +	[misturar a 30° C]
GEL 0,6g (20%) diluída em 3ml =	[misturar a 30° C]
Solução ALG-GEL	[misturar a 30° C]
Impressão	Pós-impressão
1ª: Extrusora a 15° C e mesa a 11° C	Banho de CaCl ₂ 2% por 30 segundos
2ª: Extrusora a 40° C e mesa a 25° C	e banho de H ₂ O

Tabela 7.5 – Nova formulação de biotinta alginato + gelatina.

Na primeira tentativa, com a extrusora a 15° C e mesa a 11° C, a impressão se iniciou normalmente, porém logo depois ocorreu um vazamento, possivelmente a partir do entupimento da tinta na ponteira (**Figura 7.15**).

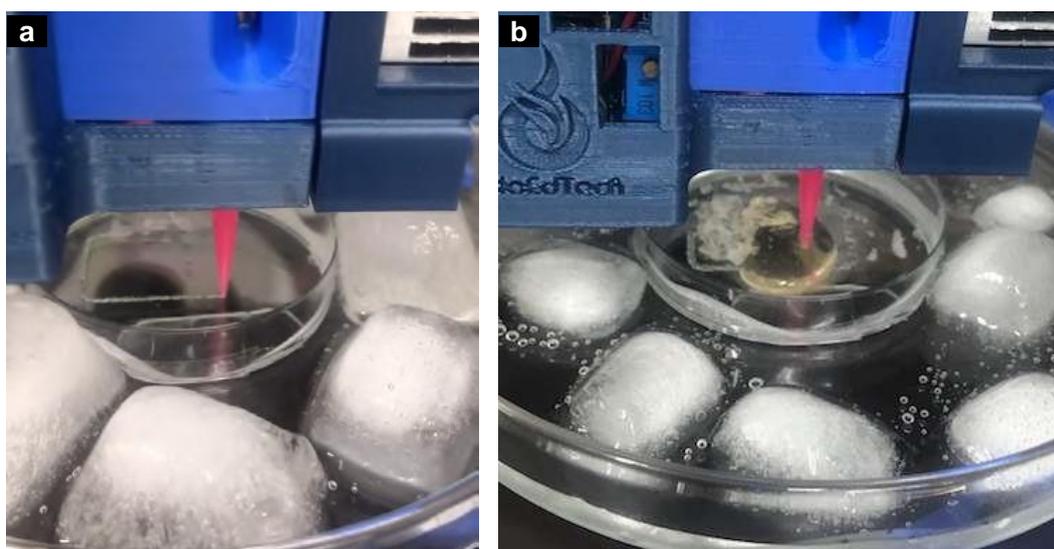


Figura 7.15 – Em (a), início da impressão. Em (b), momento do vazamento da biotinta, gelificada.

Para a segunda tentativa, busquei aumentar a diferença de temperaturas, colocando a extrusora a 40° C e mesa na temperatura ambiente (25° C). O fluxo precisou ser elevado a 144% do padrão (provavelmente devido ao problema no motor de extrusão).

Apesar da impressão aparentemente não estar satisfatória, após o banho de CaCl₂ foi possível visualizar uma estrutura com trama aberta e fibras definidas, mostrando o potencial dessa formulação (**Figura 7.16**).

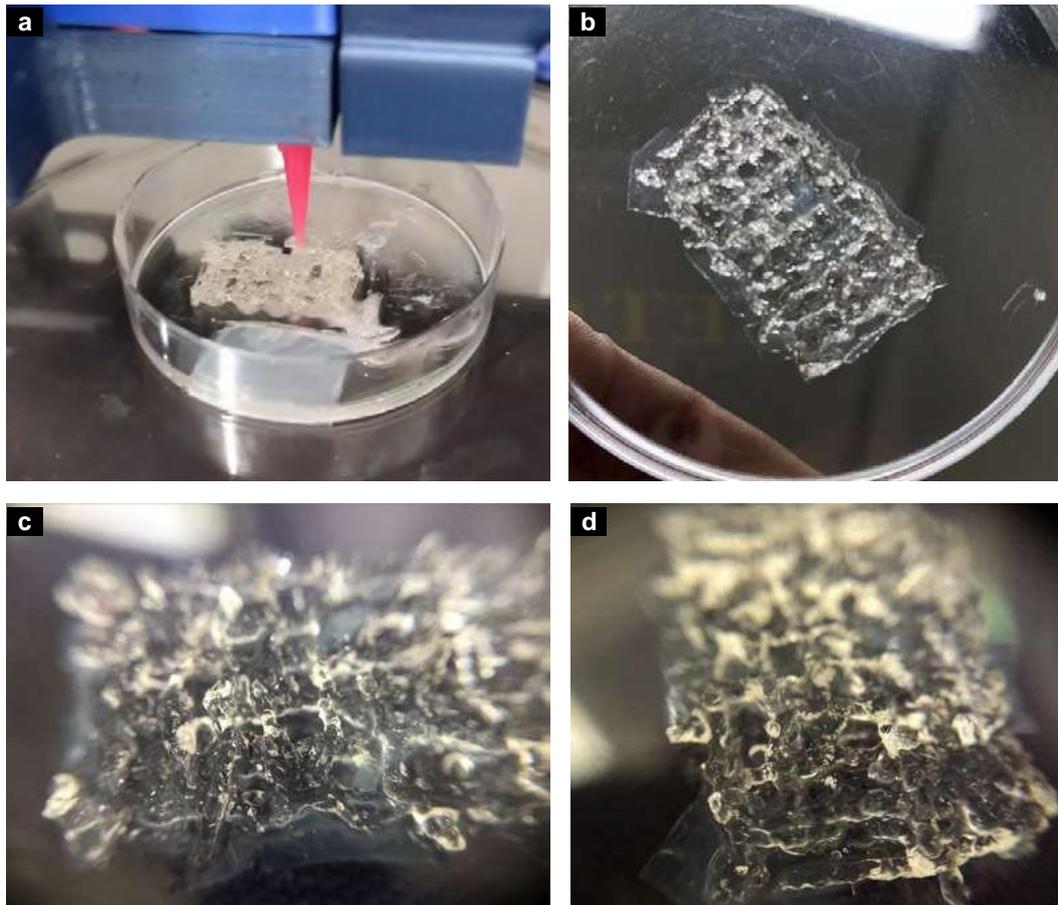


Figura 7.16 – Em (a), processo de impressão da biotinta de alginato + gelatina. Em (b, c, d), construto após o banho de CaCl_2 .

7.3.3.

Impressão com alginato + Pluronic

Para a nova formulação com o Pluronic mantivemos como base ARMSTRONG *et al.* (2016), porém sem adicionarmos a clorofila, utilizando somente água destilada para a solução. Segue a **Tabela 7.6** gerada para essa nova formulação:

Pluronic 13% + Alginato W201502 6% (solução de 1,92ml)	
PLU 0,25g (13%) diluída em 1,92ml +	[misturar a 10° C]
ALG 0,115g (6%) =	[misturar a 10° C]
Solução PLU-ALG 13%-6%	[estocar a 5° C por 1hr e depois temp. ambiente]
Impressão	Pós-impressão
Extrusora a 37° C e mesa a 47° C	Banho de CaCl ₂ 2% por 30 segundos e banho de H ₂ O

Tabela 7.6 – Nova formulação de alginato + Pluronic.

Nessa formulação e nas condições descritas, a biotinta agiu conforme o esperado, adquirindo aspecto viscoso em temperatura ambiente e gelificando ainda mais quando aquecida. Para a impressão, mantivemos a extrusora aquecida a 37° C e a mesa a 47° C (**Figura 7.17**)

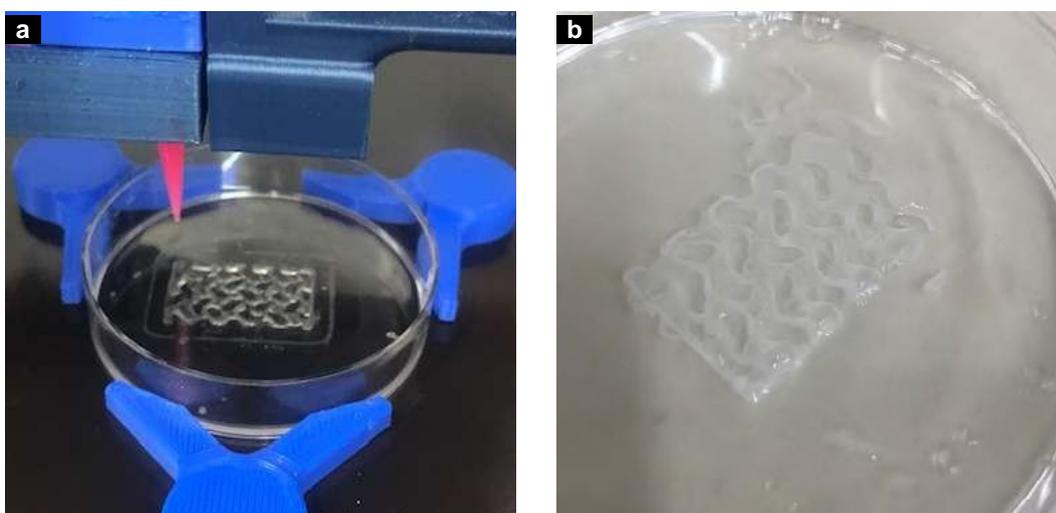


Figura 7.17 – Em (a), construto impresso a partir de biotinta de alginato + Pluronic. Em (b), o construto após o banho de CaCl₂.

A impressão apresentou excelente formação de fibra e fidelidade em relação ao modelo 3D e ligação entre as camadas. Entretanto, após o banho de CaCl₂, o construto não alcançou o aspecto de dureza de outras biotintas (mais emborrachado), sendo facilmente partido.

A biotinta com Pluronic mostrou potencial de uso, sendo necessários mais testes relacionados às temperaturas utilizadas na extrusora e na mesa de impressão.

7.4.

Considerações

Após os experimentos supracitados, decidimos encerrar os experimentos para a tese e dialogar sobre as informações obtidas.

Um dos pontos a ser abordado foi em relação aos esferoides nos construtos. Nas ocasiões em que foram levados para a microscopia confocal, apenas um esferoide foi encontrado em cada construto. Uma das possibilidades aventadas (além da necessidade utilizarmos uma concentração maior) era a de que os esferoides estivessem se concentrando na parte superior da biotinta – logo, no final da seringa. Para verificar essa hipótese, é possível imprimir a biotinta por completo, em linhas sequenciais. Dessa forma é possível verificar onde se encontram os esferoides ao longo de toda a biotinta.

Em relação à clorofila, a proposta é que seu uso seja feito com maior rigidez, pois a maceração da folha de espinafre traz outros elementos junto, como a celulose, que afetam a reologia da biotinta. O processo de liofilização⁶ chegou a ser executado em uma amostra de água destilada + clorofila de folhas de espinafre, para uso futuro com maior precisão.

Também foi aventada novamente a possibilidade do testes com meios de cultura diferentes na biotinta, já pensando na impressão com células vivas e posterior cultura em biorreator.

O uso contínuo de um laboratório equipado somado à adição de mais profissionais participando dos experimentos possibilitou o ganho enorme de experiência teórica e prática sobre a bioimpressão e assuntos correlatos.

Esse experimento conjugou a otimização geométrica com os avanços na printabilidade das biotintas, possibilitando a bioimpressão de construtos com fidelidade formal e adequação material.

Por meio de novos artigos sobre bioimpressão (objetos desta pesquisa), os experimentos passaram a focar na formulação das biotintas e suas respectivas printabilidades – sem deixar de levar em consideração aspectos importantes para a bioimpressão com células vivas. Nesse quesito, os experimentos alcançaram resultados expressivos, com construtos geometricamente fiéis aos modelos 3D e apropriados para posterior cultura em biorreator, visando a nutrição, a proliferação e a diferenciação celular.

⁶ A liofilização é um processo de sublimação da água de um determinado produto, ou seja, que faz com que a água congelada vá direto do estado sólido para o gasoso, sem passar pelo líquido. Disponível em: <https://biotechtown.com/blog/liofilizacao/>. Acesso em: 20 fev. 2023.

8

Considerações

Neste capítulo, apresento as considerações sobre o processo da pesquisa. Além da análise do percurso realizado, trago reflexões acerca das duas trilhas identificadas no processo de escrita: o caminho mais técnico e prático, relacionado aos experimentos visando a bioimpressão 3D com células; e o caminho mais filosófico e existencial, na busca da ressignificação do “fazer Design”, ambos sustentados pela interdisciplinaridade.

Dessa maneira, busco responder à questão norteadora desta pesquisa, “Como o design pode contribuir, por meio da investigação exploratória interdisciplinar de Bioimpressão 3D, para o desenvolvimento de novos entendimentos dessa tecnologia?” e apontar os desdobramentos alinhados.

8.1.

Percurso realizado

A pandemia de COVID-19 influenciou negativamente o desenvolvimento da pesquisa, dada a paralisação quase total nas atividades em laboratórios de universidades. A impossibilidade de parcerias com pesquisas envolvendo células atingiu um dos principais pilares da pesquisa, entendida desde o início como de cooperação interdisciplinar.

Dividindo os experimentos temporalmente, as “Experimentações com bioimpressão 3D e materiais” duraram praticamente 3 anos, justamente devido à situação supracitada. O experimento com o GEF/UFRJ durou pouco menos de um ano (já no 3º ano de doutorado), simultâneo com as experimentações. Já os experimentos com células ocorreram em pouco mais de seis meses – até a primeira impressão com esferóides no HUAP foram três meses, além de cerca de três meses até o último experimento no LabNanoBiof/UFRJ.

Pensando nos experimentos realizados, tracei um paralelo entre cada experimento e as etapas presentes do método duplo diamante (**Figura 8.1**).

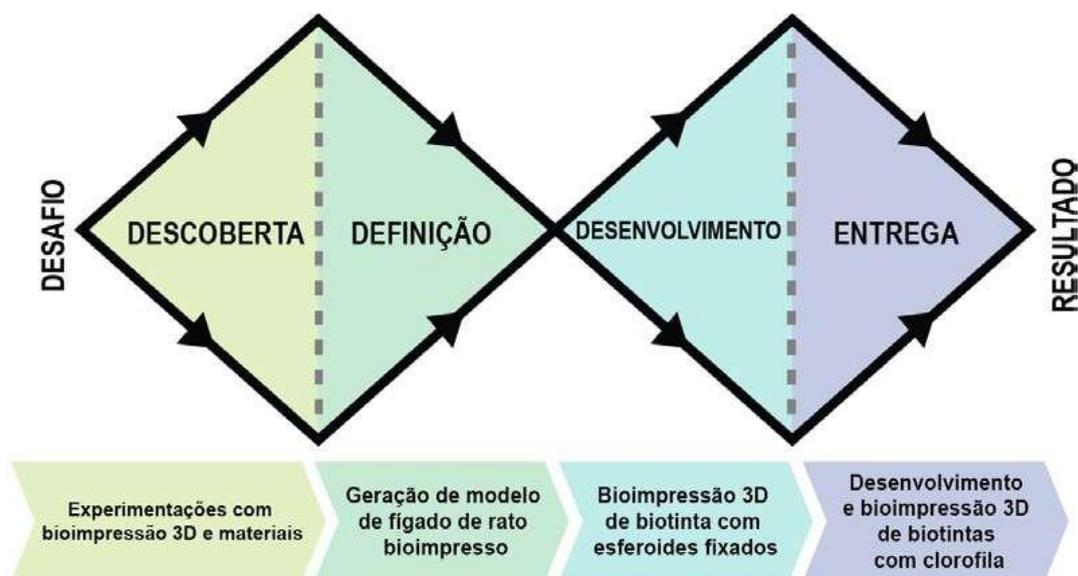


Figura 8.1 – Paralelo traçado entre as etapas do método duplo diamante e os experimentos realizados na tese.

8.1.1.

Experimento 1

As “Experimentações com bioimpressão 3D e materiais” caracterizaram a fase de primeira **descoberta**. Nela foram desvendados os primeiros requisitos e restrições relacionados à bioimpressão 3D e suas particularidades – ou seja, ao “projeto”. A partir dessa imersão nos diferentes campos de saber e nas novas práticas por meio de uso das bioimpressoras, foi possível estabelecer metas, mesmo que ousadas e impraticáveis dadas as condições – porém não totalmente irrealizáveis. As experimentações se prolongaram muito mais do que o previamente planejado, também pela possível necessidade de mudança da pesquisa como um todo, por conta da COVID-19. A partir da percepção de que a pandemia poderia durar muito mais do que o imaginado inicialmente, essas experimentações poderiam trazer caminhos alternativos – como ocorreu em relação aos modelos de simulação e treinamento.

Mesmo sendo o primeiro experimento, diversas interações com profissionais de outras áreas ocorreram, entre elas química, engenharia química, farmácia, medicina e ciências biológicas.

8.1.2.

Experimento 2

A partir do início da vacinação em território nacional, foi possível retomar a tentativa de parceria com laboratórios, apesar de uma série de res-

trições ainda vigentes. Nesse contexto, a “Geração de modelo de fígado de rato bioimpresso” em parceria com o GEF, grupo que já atuava com manipulação e cultura celular, trouxe uma certa **definição** em relação às metas para os experimentos. Já levando em conta as etapas de bioimpressão – pré-processamento, processamento e pós-processamento – vislumbramos a confecção de um construto com diferentes tipos de células, a partir de um modelo 3D gerado por exame de microCT. Nesse experimento já houve maior rigor quanto às amostras e análises. Essa experiência viria a refinar ainda mais as metas de experimentos seguintes, trazendo-os um passo atrás, para uma realidade exequível com maior facilidade. Nesse experimento, novamente ocorreram colaborações com profissionais de diferentes áreas, como medicina e biotecnologia, engenharia nuclear, biomedicina e segmentação de imagens DICOM.

Durante esse experimento ocorreram minhas primeiras palestras externas sobre bioimpressão 3D para os membros do GEF – divulgando a tecnologia e suas possibilidades – e para o Conselho Regional de Farmácia de São Paulo, CRF-SP – apresentando um panorama geral da tecnologia e avanços específicos relacionados ao campo farmacêutico. Ainda nesse período ocorreu o convite e a escrita de um capítulo do livro *3D Physical and Virtual Models in Fetal Medicine*, com Gabriel Liguori. No capítulo, além de apresentar a bioimpressão 3D e suas principais vantagens, pudemos conjecturar suas possíveis aplicações na medicina fetal.

Com a suspensão da parceria com o GEF, a pesquisa necessitou de readequação. As experimentações continuavam, como citado acima, mas era necessária uma nova rodada de experimentos, a partir dos novos requisitos e restrições adquiridos até então, para que a própria tese e seu percurso mantivesse seu sentido.

8.1.3.

Experimentos 3 e 4

A busca por uma nova parceria se focou ainda mais na prática da bioimpressão 3D. O objetivo era claro, inclusive verbalizado dessa forma: a meta era bioimprimir com células, buscando auxiliar pesquisas vigentes por meio da tecnologia de bioimpressão 3D. A essa altura já havia acumulado experiência prática no uso de bioimpressoras e arcabouço teórico sobre os temas correlatos, faltando a síntese de ambos. Os experimentos, “Bioimpressão 3D de biotinta com esferoides fixados” e “Desenvolvimento e bioimpressão 3D de biotintas com clorofila”, divididos nesta tese em dois capítulos, podem ser entendidos também como um único experimento em várias rodadas, contemplando as fases de **desenvolvimento** e **entrega** do método duplo diamante. Todo o processo com as pesquisadoras Sara Gemini e Jéssica Dornelas – e, posteriormente, também com o engenheiro

químico Marcel Martins – foi extremamente assertivo e focado em análise dos resultados obtidos e preparação para novas rodadas. Nesses experimentos, o rigor laboratorial foi levado ao ápice na pesquisa, a meta de bioimpressão com células foi alcançada e logo refinada para o aprimoramento da biotinta a ser utilizada. Novos fatores, como uso de corantes e visualização na microscopia, foram finalmente trazidos para o escopo da pesquisa, assim como a experiência intensiva no uso de equipamentos e práticas laboratoriais.

Aqui, a cooperação ocorreu com os pesquisadores do grupo já formado, pesquisadores do UPC e do LabNanoBiof, envolvendo os campos de farmácia, biologia, biotecnologia, biomedicina e engenharia química.

Especialmente na parceria firmada para esses experimentos ocorreu a maior sinergia e troca de experiências e conhecimento, principalmente utilizando grupo de mensagens e reuniões por videoconferência. A relação não soava como uma consultoria, mas sempre com a percepção de **cooperação** em prol de um projeto, com discussões horizontais, estando cada ator a par do todo.

Nesse período, fui convidado a palestrar no Congresso Científico HUPE (Hospital Pedro Ernesto), da UERJ, apresentando a tecnologia de bioimpressão 3D no painel “Inovação na pesquisa e assistência médica”, e também concedi entrevista para o portal da FAPERJ¹, juntamente com meu orientador, apresentando a bioimpressão 3D e suas possibilidades.

8.2.

As duas trilhas da pesquisa

A percepção de duas trilhas na pesquisa apareceu já na etapa de qualificação do doutorado, com uma colocação de um membro da banca acerca de duas leituras/camadas da tese:

- designer como co-gerenciador em pesquisas de bioimpressão 3D;
- novos papéis do design no mundo – ressignificar a profissão.

Dado que essa noção se acentuou durante a escrita final, busco então refletir sobre elas. A pesquisa certamente começou pela primeira trilha, focada na prática da bioimpressão 3D pelo designer, a partir da percepção de uma lacuna a ser facilmente preenchida por esse profissional que já lida com impressão 3D, por seu *know-how* de modelagem 3D e execução dos equipamentos. Um possível diferencial ocorre em relação a como seria esse preenchimento. Poderia ser simplesmente como um prestador de serviço, alocado para desenvolver uma tarefa específica no

¹ Disponível em: <https://www.faperj.br/?id=241.7.0>. Acesso em: 20 fev. 2023.

processo de bioimpressão (como gerar um modelo 3D solicitado, por exemplo). A escolha, entretanto, foi realmente a de um papel de cooperação horizontal no processo, buscando o domínio da sistemática do uso da bioimpressão 3D, e não apenas de etapas específicas, alienadas do todo.

Creio que é a partir dessa premissa que a outra trilha começa a se apresentar de forma mais evidente: a ressignificação da profissão. A ideia de um olhar sistemático e mais amplo acerca de questões impostas não é nova no campo do Design, muito menos a relação do campo com novas tecnologias apresentadas. Porém, uma parcela do mundo acadêmico e profissional mantém a visão do designer como um “resolvedor” de problemas, alguém para lidar com partes específicas de um processo. A tese buscou refutar essa visão, trazendo o designer como ator presente e atuante em todas as etapas do processo de bioimpressão 3D, contribuindo intelectualmente para tal.

Outro ponto existencial da tese vem justamente do que seria apresentado como resultado dos experimentos. Analisando na escrita final, torna-se fácil imaginar a busca por um novo produto (uma biotinta, por exemplo) ou mesmo um serviço (a patente de uma nova terapia), o que agregaria o viés mercadológico para a pesquisa. O foco, entretanto, foi o de buscar novos entendimentos e avanços sobre a bioimpressão 3D, sempre focando na cooperação de saberes e nos ganhos que a interdisciplinaridade traz para os campos envolvidos, mostrando a amplitude de atuação do “fazer Design”.

8.3.

A pesquisa e cooperação inter e transdisciplinar

Trago novamente as três fases da colaboração interdisciplinar, segundo Japiassu (1976, p. 92):

- a troca de informação mútua, em que cada campo do saber/especialista considera o outro como exterior a si;
- a entrevisão das questões colocadas pelos diferentes campos;
- a tomada de consciência coletiva das questões desenvolvidas.

Trazendo à reflexão os últimos dois experimentos, com as pesquisadoras Sara Gemini e Jéssica Dornelas, considero tais fases estiveram presente nas na cooperação. A peculiaridade ocorreu pelo caráter assertivo dos membros e pelo uso intensivo do espaço laboratorial, num processo de *conhecer pelo fazer* (BENSAUDE-VINCENT, 2009, p. 369-370).

O principal choque de diferenças entre os profissionais veio da minha postura “designer” em alguns momentos. Talvez pela prática de busca por referên-

cias variadas e atípicas, visando a geração de alternativas, procurava maximizar as tentativas e variáveis a serem experimentadas. Isso vai de encontro com as premissas experimentais, que visam justamente o controle das variáveis a fim de analisar as relações “puras” entre as variáveis de interesse, sem contaminação de outras (SAMPIERI, 2014, p. 162). Foi necessário compreender que era preciso dosar os momentos exploratórios, de “abertura” de variáveis, com os momentos de afunilar e reduzir as variáveis em prol de resultados específicos. Como aponta Japiassu:

a interdisciplinaridade requer equilíbrio entre amplitude, profundidade e síntese. A amplitude assegura uma larga base de conhecimento e informação. A profundidade assegura o requisito disciplinar e/ou conhecimento e informação interdisciplinar para a tarefa a ser executada. A síntese assegura o processo integrador (1976, p. 65-66).

Ouso afirmar que, a partir das reflexões acerca da interação entre os pesquisadores e do resultado da pesquisa, a mesma perpassou pela transdisciplinaridade. Segundo Japiassu (2006), ela

Pode atravessar as disciplinas e visa à criação de um campo de conhecimentos onde seja possível existir um novo paradigma ou um novo modo de coexistência e diálogo entre os filósofos e os cientistas, com os esquemas nocionais devendo circular da filosofia às ciências naturais e humanas, sem que haja nenhuma hierarquia entre esses diversos modos de problematização e experimentação (p. 6).

O “Manifesto da transdisciplinaridade”² também traz dois artigos que corroboram a afirmação acima, trazendo a noção de “atravessamento” presente nesta pesquisa:

Artigo 3: A transdisciplinaridade é complementar à abordagem disciplinar, faz emergir do confronto das disciplinas novos dados que as articulam entre si e nos fornece uma nova visão da natureza e da realidade. Não busca o domínio de várias disciplinas, mas a abertura de todas àquilo que as **atravessa** e ultrapassa.

Artigo 4: A pedra angular da transdisciplinaridade reside na unificação semântica e operativa das acepções “**através**” e “além” das disciplinas (JAPIASSU, 2006, p. 8, grifo meu).

8.4.

As contribuições da pesquisa

Como inovação advinda da tese, destaco o uso da clorofila como corante em construtos celulares bioimpressos. O fato de sua fluorescência ser baixa poderia ser considerado uma falha em outras situações, mas para a visualização do

² *Charte de la transdisciplinarité*. Disponível em: <https://ciret-transdisciplinarity.org/chart.php>. Acesso em: 20 jan. 2023.

hidrogel no construto impresso essa característica atendeu perfeitamente a um requisito proposto.

A possibilidade do designer atuar ao longo de todo o processo em pesquisas envolvendo a bioimpressão 3D, co-gerenciando e dialogando com diferentes atores e campos do saber, em um diálogo horizontal e colaborativo, foi comprovada, apresentando uma outra maneira de “fazer Design”.

A pesquisa também impactou o laboratório do PUC-Rio onde está inserida, o BiodesignLab, sendo a vanguardista do tema. Além de um espaço próprio dentro do laboratório, a tecnologia de bioimpressão se notabilizou, trazendo novas perspectivas dentro dele, expostas adiante.

Um aspecto que não estava previsto, mas que naturalmente surgiu no decorrer da pesquisa, foi o do designer como um divulgador da tecnologia de bioimpressão 3D. Por ser um tema ainda pouco difundido fora de círculos específicos, mesmo nos campos das ciências médicas e biológicas, e por ter um caráter disruptivo, surgiu a demanda por comunicação sobre o tema. Ao longo do período do doutorado foram ministradas palestras para públicos fora do campo do Design, como farmacêutica (CRF-SP) e medicina (HUPE/UERJ), além de palestra e entrevista para o meio acadêmico (GEF e FAPERJ). O designer, por seu método que envolve a síntese de ideias, juntamente com a expertise em tradução gráfica de assuntos, pode ser um importante ator para a divulgação e a circulação científica de novas tecnologias. Somando isso à mediação de diferentes saberes, é possível ao designer traçar diferentes paralelos e cruzamentos entre assuntos, produzindo uma abordagem de divulgação atraente.

A partir dessas contribuições e das considerações apresentadas ao final dos capítulos considero, portanto, que minha hipótese “a partir de estudos e pesquisas disponíveis e com a parceria de profissionais de diferentes áreas, o designer é capaz de contribuir, de maneira interdisciplinar e relevante, para a área da bioimpressão 3D” foi confirmada pela tese.

8.5.

Perspectivas futuras

O ciclo de experimentos final apresentado serviu de base para propostas de projetos do grupo formado. Novos experimentos já foram pensados, visando o aperfeiçoamento da biotinta e a bioimpressão de esferóides contendo células vivas, para a formação de tecidos. Chegando-se nessa etapa, certamente uma nova gama de variáveis e de possibilidades se apresentará – a exemplo do uso da clorofila na biotinta, visando resolver uma questão até então não imposta. A partir da etapa alcançada, três caminhos possíveis de atuação já foram propostos:

- desenvolvimento de biocurativos;
- medicina personalizada com células tumorais;
- regeneração óssea.

A sala de cultivo e bioimpressão 3D de células do laboratório BiodesignLab DASA/PUC-RJ, contendo infraestrutura, equipamentos e pessoal treinado para tal, já teve sua criação aprovada. Isso possibilita não apenas a continuidade de meus experimentos, mas que outros alunos possam desenvolver projetos e pesquisas na área.

Avizinha-se também uma parceria com o laboratório Saúde 3D, do HUPE/UERJ, que já busca uma área focada em bioimpressão 3D.

A parceria com a Bioedtech se mantém, com novas possibilidades oriundas da máquina de dois módulos, entregue e ainda não explorada.

Referências bibliográficas

ARGAN, G. C. A história na metodologia do projeto. **Revista Caramelo**, nº 6. São Paulo: FAU/USP, 1993.

ARMSTRONG, J. P. K. *et al.* 3D Bioprinting Using a Templated Porous Bioink. **Adv Healthc Mater**; 5:1724–1730, 2016. doi: 10.1002/adhm.201600022.

ASNAGHI, M. A. *et al.* Bioreactors. **Tissue Engineering**, 393–425, 2014. doi: 10.1016/b978-0-12-420145-3.00012-2.

BADYLAK, S. F.; RUSSELL, A. J.; SANTIN, M. **Introduction**: History of regenerative medicine. *Strategies in regenerative medicine*, 1-13. New York: Springer-Verlag, 2009. doi: 10.1007/978-0-387-74660-9_1.

BAJPAI, A. K. *et al.* **Smart biomaterial devices**: polymers in biomedical sciences. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 242 p, 2016.

BANERJEE, D. *et al.* Strategies for 3D bioprinting of spheroids: A comprehensive review, **Biomaterials**, Volume 291, 121881, 2022. ISSN 0142-9612. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121881>.

BARKER, C. F.; MARKMANN, J. F. Historical overview of transplantation. *In: Cold Spring Harb Perspect Med*. 3(4):a014977, Apr 1, 2013. doi: 10.1101/cshperspect.a014977.

BARTHES, R. **Aula**: aula inaugural da Cadeira de Semiologia Literária do Colégio de França. ed.14. São Paulo: Cultrix, 2004.

BEGLEY, C.G.; ELLIS, L. M. Drug development: raise standards for preclinical cancer research. **Nature**, 483, (7391), p. 531-533, 2012. doi: <https://doi.org/10.1038/483531a>.

BENSAUDE-VINCENT, B. The Chemists' Style of Thinking. **Berichte zur Wissenschaftsgeschichte**, 32, 365-378, 2009. doi: <https://doi.org/10.1002/bewi.200901385>.

BENYUS, J. M. **Biomimética**: inovação inspirada pela natureza. 3. ed. São Paulo: Cultrix, 2007.

BOMFIM, G. A. **Metodologia para Desenvolvimento de Projetos**. João Pessoa: Universitária/UFPB, 1995.

BOMFIM, G. A. Fundamento de uma teoria transdisciplinar do design: morfologia dos objetos de uso e sistema de comunicação. *In: Estudos em Design*, 1997, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Associação de Ensino de Design do Brasil, 1997.

BOULARAOUI, S. *et al.* An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. *Bioprinting*, 20, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00093>.

BRITISH DESIGN COUNCIL. **What is the framework for innovation?** Design Council's evolved double diamond. 2019. Disponível em: <https://www.designcouncil.org.uk/news-opinion/what-framework-innovation-design-councils-evolved-double-diamond>. Acesso em: 6 ago 2020.

CAO, Y. *et al.* Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 100(2), 297–302, 1997. doi: 10.1097/00006534-199708000-00001.

CARVALHO, A. C. C. Células-tronco: a medicina do futuro. *Ciência Hoje*, v.29, n.172, p.26-31, 2001.

CHIZZOTTI, A. **Pesquisa qualitativa em ciências humanas e sociais**. 3. ed. Petrópolis: Vozes, 2006.

CHO, D.W. *et al.* **3D bioprinting**: modeling in vitro tissues and organs using tissue-specific bioinks. Cham: Springer, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-32222-9. ISBN: 978-3-030-32221-2.

CHUA, C. K.; YEONG, W. Y. **Bioprinting**: principles and application. Singapura: World Scientific, 2015.

CROOK, J. M. **3D Bioprinting**: Principles and Protocols. 1st Ed: Springer, 2020.

CROSS, N. Designerly Ways of Knowing. *Design Studies*, v. 3, n. 4, p. 221-227, 1982.

CUI, H. *et al.* 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, 6(1), 1601118, 2016. doi: 10.1002/adhm.201601118.

DE MELO, B. A. G. *et al.* 3D culture models to study SARS-CoV-2 infectivity and antiviral candidates: From spheroids to bioprinting, *Biomedical Journal*, Volume 44, Issue 1, p. 31-42, 2021. ISSN 2319-4170. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.11.009>.

DECKER, L. H.; FRANTZ, J. C. Análise compressiva do preenchimento giroide em peças fabricadas por fdm. **Revista UNIFEDE Edição Tecnologias: Engenharia, Produção e Construção**, v. 1 n. 27, 2022.

FELL, H. B. **Tissue culture and its contribution to biology and medicine**. *J Exp Biol* 57:1–13, 1972.

FINDELI, A. Rethinking Design Education for the 21st Century: theoretical, methodological and ethical discussion. **Design Issues**, v. 17, n. 1, p. 5-17, 2001.

_____. La recherche-projet: une méthode pour la recherche en design. *In: Symposium de recherche sur le design*, Bâle, Suíça, 2004.

FORTY, A. **Objetos de desejo: design e sociedade desde 1750**. São Paulo: Cosac Naify, 2007.

FRAYLING, C. Research in Art and Design. **Royal College of Art Research**, v.1, n. 1, 1993.

GERMAIN, L. *et al.* 3D-printed biodegradable gyroid scaffolds for tissue engineering applications, **Materials & Design**, Volume 151, p. 113-122, 2018. ISSN 0264-1275. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.04.037>.

GIRI, B.R. *et al.* Fabrication of Intragastric Floating, Controlled Release 3D Printed Theophylline Tablets Using Hot-Melt Extrusion and Fused Deposition Modeling. **Pharmaceutics**. 12, 77. 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010077>.

GODIN, D.; ZAHEDI, M. Aspects of Research through Design: A Literature Review. *In: Proceedings of the Design Research Society Conference 2014*, Umeå, Suécia, 16–19 Jun, 2014.

GONTIJO, A. A Metodologia Científica no curso de Biomedicina. **Blog ALIS**. 9 ago. 2019. Disponível em: <https://blog.faculdadeserradourada.com.br/alis/a-metodologia-cientifica-no-curso-de-biomedicina>. Acesso em: 6 dez. 2020.

GRIGORYAN, B. *et al.* Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. **Science**, 364(6439), p. 458-464, 2019. doi: [10.1126/science.aav9750](https://doi.org/10.1126/science.aav9750).

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer Cell Int** 21, 152, 2021. doi: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8>.

HE, Y.; GAO, Q.; JIN, Y. **Cell Assembly with 3D Bioprinting**. John Wiley & Sons, 2022. 368 p. ISBN 3527347968, 9783527347964.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. Materials Selection. *In: **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering***, Part A, v.1, p. 27-59, 1995.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science**. 295(5557):1014-7, Feb 8, 2002. doi: 10.1126/science.1067404. PMID: 11834817.

HINTON, T. J. *et al.* Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. **Science Advances**, vol. 1, no. 9, October 2015.

HODGKINSON, T.; YUAN, X. F.; BAYAT, A. Adult stem cells in tissue engineering. **Expert Rev Med Devices**, (6), 621–40, 2009. doi: 10.1586/erd.09.48.

IKADA, Y (editor). Chapter 4 - Challenges in tissue engineering. **Interface science and technology**. Vol. 8. p. 423–62, Elsevier, 2006.

JAPIASSU, H. O espírito interdisciplinar. **Cadernos EBAPE.BR**. vol. IV, n.3, out. 2006, p. 1-9. Disponível em: <https://www.ebape.fgv.br/cadernosebape>. Acesso em: 21 jan. 2023.

_____. **Interdisciplinaridade e patologia do saber**. Rio de Janeiro: Imago, 1976.

JEONG, H. J. *et al.* 3D Bioprinting Strategies for the Regeneration of Functional Tubular Tissues and Organs. **Bioengineering**. 7. 32. 2020. doi: 10.3390/bioengineering7020032.

KAHL, M. *et al.* Ultra-Low-Cost 3D Bioprinting: Modification and Application of an Off-the-Shelf Desktop 3D-Printer for Biofabrication. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 7, 2019. doi: 10.3389/fbioe.2019.00184.

KANG, H.-W. *et al.* A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. **Nature Biotechnology**, 34(3), 312–319, 2016. doi: 10.1038/nbt.3413.

KLEBE, R. Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues. *In: **Experimental Cell Research***. 179(2), 362–373, 1998. doi: 10.1016/0014-4827(88)90275-3.

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. de A. **Fundamentos de metodologia científica**. 5. ed. São Paulo: Atlas, 2003.

LAMY, R. *et al.* Reticulação do colágeno corneano com radiação ultravioleta e riboflavina para tratamento do ceratocone: resultados preliminares de um estudo brasileiro. **Rev Bras Oftalmol.**, v. 67, n. 5, p. 231-235, 2008.

LANGER, R. S. A Conversation with Robert Langer: Pioneering Biomedical Scientist and Engineer. **ACS Nano**, 2009, 3 (4), p. 756-761. April, 2009.

LAWSON, B. **How Designers Think: The Design Process Demystified.** ed.4. Oxford; Burlington, MA: Elsevier/ Architectural Press, 2005.

_____. Cognitive strategies in architectural design. **Ergonomics** v. 22, n. 1, p. 59-68, 1979.

LEVIN, G. *et al.* **Medicina Regenerativa e Engenharia de tecidos.** 14. 26-32. 2019.

LEUNG, C. M.; de HAAN, P.; RONALDSON-BOUCHARD, K. *et al.* A guide to the organ-on-a-chip. **Nat Rev Methods Primers** 2, 33, 2022. doi: <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6>.

LI, Y. *et al.* Functional human 3D microvascular networks on a chip to study the procoagulant effects of ambient fine particulate matter. **RSC Advances.** 7, 2017. 56108-56116. 10.1039/C7RA11357A.

LI, Z.; HUANG, S.; LIU, Y. *et al.* Tuning Alginate-Gelatin Bioink Properties by Varying Solvent and Their Impact on Stem Cell Behavior. **Sci Rep** 8, 8020, 2018. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26407-3>.

LOAI, S. *et al.* Clinical Perspectives on 3D Bioprinting Paradigms for Regenerative Medicine. **Regen Med Front.** 1:e190004, 2019. doi: <https://doi.org/10.20900/rmf20190004>.

MATIAS, D. P. *et al.* A ética no uso de células tronco revisão de literatura. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 25, n. 2, p. 25-32, 2019.

MEDRADES, J. Bioimpressão para o transplante de órgãos. **Revista Blog do Profissão Biotec**, v.8, 2021. Disponível em: <<https://profissaobiotec.com.br/bioimpressao-para-transplante-orgaos/>>. Acesso em: 20 fev. 2023.

MEYER, U. The history of tissue engineering and regenerative medicine in perspective. *In*: U. MEYER, U.; JÖRG, H.; WIESMANN, H. P.; MEYER, T. (Eds.). **Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine**, p. 5-12. Leipzig, Germany: Springer Berlin Heidelberg, 2009. doi: 10.1007/ 978-3-540-77755-7.

MIRIYEV, A.; STACK, K.; LIPSON, H. Soft material for soft actuators. **Nat. Commun.** 8, 2017.

MIRIYEV, A. *et al.* Additive Manufacturing of Silicone Composites for Soft Actuation. **3D Printing and Additive Manufacturing**, 6(6), 309–318, 2019. doi: 10.1089/3dp.2019.0116.

MIRONOV, V. *et al.* Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. **Biofabrication** 1, 022001, 2009 (2).

_____.; REIS, N.; DERBY, B. Bioprinting : a beginning. **Tissue Engineering** 12 (4), 631e634, 2006.

MORIMOTO, Y.; ONOE, H.; TAKEUCHI, S. Biohybrid robot powered by an antagonistic pair of skeletal muscle tissues, **Science Robotics**, 2018.

MURPHY, S. V.; ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature Biotechnology**, 32(8), 773–785, 2014. doi: 10.1038/nbt.2958.

NEREM, R. N. An Introduction. *In*: POLAK, J.; MANTALARIS, S.; HARDING, S. (Eds.), **Advances in Tissue Engineering**. p. 3–12, 2008. Singapore: Imperial College Press.

NOROTTE, C. *et al.* Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. **Biomaterials**, 30(30), 5910–5917, 2009. doi: 10.1016/j.biomaterials.200.

OLIVEIRA, M. M. de. **Como Fazer Pesquisa Qualitativa**. 7. ed. Petrópolis, RJ: Vozes, 2018.

OZBOLAT, I. T. Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation. **Trends in Biotechnology** 33, (7), 395e400, 2015.

_____.; MONCAL, K. K.; GUDAPATI, H. Evaluation of bioprinter technologies. **Additive Manufacturing**, 13, 179–200, 2017. doi: 10.1016/j.addma.2016.10.003.

PANDEY, L.; ROY, A.; SAXENA, V. 3D printing for cardiovascular tissue engineering: A Review. **Materials Technology**. 33, 2018. doi: 10.1080/10667857.2018.1456616.

PAXTON, N. *et al.* Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. **Biofabrication**, 9(4), 2017, 044107. doi: 10.1088/1758-5090/aa8dd8.

PUSCH, K.; HINTON, T. J.; FEINBERG, A. W. Large volume syringe pump extruder for desktop 3D printers. **HardwareX**, 3. 2018, p. 50.

QUEIROZ, P. *et al.* Microtomografia Computadorizada: Princípios de Funcionamento e Utilização em Amostras Biológicas. **Enciclopédia Biosfera**, 2019. 16. 1073-1091. doi: 10.18677/EnciBio_2019A90.

RABKIN, E.; SCHOEN, F. J. Cardiovascular tissue engineering. *In: Cardiovascular pathology*, 11(6), 305–317, 2022. doi: 10.1016/s1054-8807(02)00130-8.

RAMADAN, Q.; ZOUROB, M. 3D Bioprinting at the Frontier of Regenerative Medicine, Pharmaceutical, and Food Industries. **Frontiers in Medical Technology**, vol. 2, 2021. doi: 10.3389/fmedt.2020.607648.

RATNER, B. D. **Biomaterials science**: an introduction to materials in medicine. Academic Press, 2004.

ROBERT, L.; J. P. VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, 1993, vol. 260, p. 920-941, 1993.

RODRIGUES, I. C. *et al.* Cardiac tissue engineering: current state-of-the-art materials, cells and tissue formation. **Einstein**, 16(3):eRB4538, São Paulo, 2018. doi: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082018RB4538>.

RUIZ-ALONSO, S. *et al.* Current Insights into 3D Bioprinting: An Advanced Approach for Eye Tissue Regeneration. **Pharmaceutics**, 13(3), 308, 2021. doi: 10.3390/pharmaceutics13030308.

SAMPIERI, R. H.; COLLADO, C. F.; LUCIO, P. B. **Metodología De La Investigación**. 6. ed. México D.F.: McGraw-Hill, 2014.

SCHMITT, A. *et al.* Application of Stem Cells in Orthopedics. **Stem cells international**. 394962. 2012. doi: 10.1155/2012/394962.

SCOTT, M. 32,000 years of sutures. **NATNEWS**; 20(5): 15-7, 1983.

SHIWARSKI, D. J. *et al.* Emergence of FRESH 3D printing as a platform for advanced tissue biofabrication. **APL bioengineering**, 5(1), 010904, 2021. doi: <https://doi.org/10.1063/5.0032777>.

SKELDON, G.; LUCENDO-VILLARIN, B.; SHU, W. Three-dimensional bioprinting of stem-cell derived tissues for human regenerative medicine. **Phil. Trans. R. Soc. B**, 373: 20170224, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2017.0224>.

SONAYE, S. Y. *et al.* Extrusion 3D (Bio)Printing of Alginate-Gelatin-Based Composite Scaffolds for Skeletal Muscle Tissue Engineering. **Materials**, 15, 7945, 2022. doi: <https://doi.org/10.3390/ma15227945>.

SUNG, J. H. *et al.* Recent advances in body-on-a-chip systems. **Analytical Chemistry**, 2018. doi: 10.1021/acs.analchem.8b05293.

TABAK, T; FARBIARZ, J. L. **(Não) resolução de (não) problemas**: contribuições do Design para os anseios da educação em um mundo complexo. 99 f. Dissertação (Mestrado em Design) – Departamento de Artes e Design, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2012.

TAKAHASHI, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v.131, p.1-12, 2007.

THAYER, P.; MARTINEZ, H.; GATENHOLM, E. History and Trends of 3D Bioprinting. **3D Bioprinting**, 3–18. 2020. doi: 10.1007/978-1-0716-0520-2_1.

TIWARI, G. *et al.* Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, 2(1), 2, 2012. doi: 10.4103/2230-973x.96920.

VACANTI, J.; VACANTI, C. A. The History and Scope of Tissue Engineering. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. P. (Eds.), **Principles of Tissue Engineering**. 3 ed., p. 3–6. Elsevier Academy Press, 2007.

VORONOV, U. Blocking the reticuloendothelial system in man in some forms of mercuric chloride intoxication and the transplantation of the cadaver kidney as a method of treatment for the anuria resulting from the intoxication [in Spanish]. *In: Siglo Med.* 97: 296. 1937.

YAMANAKA, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. **Cell Stem Cell**, 27(4):523-531, 2020. doi: 10.1016/j.stem.2020.09.014.

YANNAS, I. *et al.* Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. **Science**, 215(4529), 174–176, 1982. doi: 10.1126/science.7031899.

YAZDANI, J. *et al.* A short view on nanohydroxyapatite as coating of dental implants. *In: Biomedicine & pharmacotherapy*. 105, 553–557, 2018.

WANG, W. *et al.* First pig-to-human heart transplantation. **The Innovation** 3(2), 100223, 2022.

WANG, X. *et al.* Coaxially Bioprinted Cell-Laden Tubular-Like Structure for Studying Glioma Angiogenesis. **Front. Bioeng. Biotechnol.** 9:761861, 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.761861.

WENZ, A. *et al.* Hydroxyapatite-modified gelatin bioinks for bone bioprinting. **BioNanoMaterials**, 17(3-4), 2016. doi: 10.1515/bnm-2015-0018.

WILLIAMS, D. F. To engineer is to create: The link between engineering and regeneration. *In: Trends Biotechnol*; 24:4–8, 2006.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials. *In: Progress in biomedical engineering* [Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials]. v. 4, n. 6, p. 49-59. Ed DF Williams. Amsterdam: Elsevier, 1987.

ZARE, M. *et al.* Silicone-based biomaterials for biomedical applications: antimicrobial strategies and 3D printing technologies. **J Appl Polym Sci**. 2021; 138(38):50969.