

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FELIPE CASTRO MENEZES

**ARCABOUÇOS POLIMÉRICOS PBAT 3D PRODUZIDOS ATRAVÉS DA
MODELAGEM POR DEPOSIÇÃO FUNDIDA (FDM) E MODIFICADOS
SUPERFICIALMENTE PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE
TECIDO ÓSSEO**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Porto Alegre, novembro de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FELIPE CASTRO MENEZES

**ARCABOUÇOS POLIMÉRICOS PBAT 3D PRODUZIDOS ATRAVÉS DA
MODELAGEM POR DEPOSIÇÃO FUNDIDA (FDM) E MODIFICADOS
SUPERFICIALMENTE PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE
TECIDO ÓSSEO.**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof^ª. Dra. Rosane Michele Duarte Soares
Orientadora

Prof. Dr. Daniel Eduardo Weibel
Coorientador

Porto Alegre, novembro de 2024.

CIP - Catalogação na Publicação

Menezes, Felipe Castro

Produção de arcabouços 3D de PBAT por impressão FDM modificados superficialmente para aplicação em engenharia de tecido ósseo / Felipe Castro Menezes.

-- 2024.

99 f.

Orientador: Rosane Michele Duarte Soares.

Coorientador: Daniel Eduardo Weibel.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. engenharia de tecido ósseo . 2. manufatura aditiva. 3. arcabouço 3D. 4. poli(butileno adipato-co-tereftalato). 5. modificação superficial. I. Soares, Rosane Michele Duarte, orient. II. Weibel, Daniel Eduardo, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Declaração de autoria e orientação

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (novembro/2017) e (novembro/2024), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Rosane Michele Duarte Soares e Coorientação do Professor Doutor Daniel Eduardo Weibel. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dra. Rosane Angélica Ligabue

Prof. Dr. Klester dos Santos Souza

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos

Prof. Dr. Luis Alberto Loureiro dos Santos

Prof^a. Dr.^a Rosane Michele Duarte Soares

Prof. Dr. Daniel Eduardo Weibel

Felipe Castro Menezes

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os meus familiares, principalmente a meus pais, minha esposa e minha filha, e a todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para meu sucesso em minha caminhada.

Agradecimentos

À minha mãe, Rosele Castro Menezes, e ao meu pai, Altair Macedo Menezes, pelo incentivo, apoio, compreensão, e amor durante todos os anos de criação e vivência. À minha irmã, Itiana Castro Menezes, por ser uma pessoa que sempre me espelhei profissionalmente e me apoia em toda minha trajetória. Aos meus familiares pelo apoio e amor durante minha caminhada. À minha esposa Gabriela Messias Miranda Menezes, por todo amor, companheirismo e ajuda em todo o processo do meu doutorado, bem como apoio emocional, no meu trabalho e nas minhas decisões profissionais. Dedico também, este trabalho, a minha filha, Helena Messias Menezes, que nasceu durante meu doutoramento e durante a pandemia do Covid-19, trazendo alegria, luz e amor à todos que convivem conosco. À minha orientadora Rosane Michele Duarte Soares pela orientação, colaboração e incentivo no meu trabalho e crescimento profissional. Aos meus amigos Letícia Feliciani, Cristhiane Valente, Guilherme Kretzmann Belmonte, Andressa Fernandes Pivato e Jean por terem participado desta grande etapa da minha vida, pelo apoio prestado e principalmente pela amizade durante esta caminhada. Aos colegas do Laboratório Poli-Bio, ao laboratório LAMAD e a professora Dr^a Rosane Angélica Ligabue, pelo suporte a análises, materiais e infraestrutura utilizados na PUCRS. Agradeço também a CAPES. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

Epígrafe

“Lembre-se:

Sua ansiedade não soluciona problema algum. Conheça um pouco mais de você mesmo e aprenda a não exigir de si ou dos outros aquilo que nem Deus espera ainda de você!”

(Preto velho Pai João de Aruanda)

Lista de trabalhos gerados a partir dos resultados descritos na tese

Menezes, F. C.; Scheibel, J. M.; Balbinot, G. S.; Miranda, G. M.; Leitune, V. C. B.; Collares, F. M.; Soares, R. M. D. Bioactive materials-coated polybutylene-adipate-*co*-terephthalate 3D-printed scaffolds for application in the bone tissues engineering., *Polymers for Advanced Technologies*. **2024**, Vol. 35, 4, 2024.

Felipe Castro Menezes; Guilherme K. Belmonte; Camila Leites Reginatto; Felipe Gonzatto Trindade; Dinara Jaqueline Moura; Daniel Eduardo Weibel; Rosane Michele Duarte Soares. Avaliação de viabilidade celular e índice de danos em protótipos poliméricos obtidos por impressão 3D, 2019, 15º Congresso Brasileiro de Polímeros. (Congresso, Apresentação de Trabalho).

Resumo

A engenharia de tecidos ósseos (ETO) é uma área que desenvolve arcabouços capazes de mimetizarem e repararem danos ao tecido ósseo. A manufatura aditiva, permite a fabricação de arcabouços 3D com variadas geometrias e propriedades, sendo que a técnica de modelagem por fusão e deposição (FDM) apresenta versatilidade e baixo custo. Uma das maneiras de se obter arcabouços que promovam adesão, proliferação e diferenciação celular, é modificar a superfície dos materiais. Neste trabalho utilizou-se a técnica FDM, com o filamento polimérico de poli(butileno adipato-*co*-tereftalato (PBAT), que é biocompatível e bioreabsorvível e têm apresentando características adequadas para ETO. Apesar desta característica, os polímeros sintéticos possuem baixo reconhecimento celular, necessitando de modificações. Para suprir esta necessidade, os arcabouços foram revestidos com hidroxiapatita (H), biovidro dopado com Nióbio (B) e/ou gelatina (G), pela técnica de imersão em solução aquosa. Os materiais foram analisados frente às suas características estruturais de grupamentos, morfológicas, térmicas, mecânicas, e biológicas com os ensaios de brometo de metil tiazolil difenil-tetrazólio (MTT), sulforodamina B (SRB) e vermelho de alizarina S. Foram produzidos arcabouços 3D de PBAT e a sua modificação da superfície, foi comprovada pelas micrografia de MEV-FEG com EDS e os grupamentos funcionais analisados por FTIR. A modificação não ocasionou mudanças na estabilidade térmica do polímero PBAT e houve um aumento no módulo de Young em mais de 1,5 vezes quando modificado, além de aumentar a tensão de compressão de $0,96 \pm 0,23$ MPa para o PBAT puro, para mais de 2 MPa dependendo da modificação aplicada. A porosidade do arcabouço de PBAT 3D, bem como de todos os materiais imersos se manteve em aproximadamente 60 %. Finalmente, todos os arcabouços demonstraram viabilidade celular pelos ensaios de MTT e SRB, sem diferença significativa, bem houve aumento de mineralização celular do PBG, PHG e PBH no ensaio de vermelho de alizarina S com células pré-osteoblásticas MC3T3-E1, quando em comparação ao material puro 3D de PBAT. Portanto, a modificação por imersão PBAT 3D com 2 componentes, demonstrou ser uma alternativa promissora para produção de biomateriais funcionais para ETO.

Palavras-chave: engenharia de tecidos ósseos, manufatura aditiva, arcabouço 3D, poli(butileno adipato-*co*-tereftalato), modificação superficial.

Abstract

Bone tissue engineering (BTE) is an area that develops scaffolds capable of mimicking and repairing damage to bone tissue. Additive manufacturing allows the fabrication of 3D scaffolds with varied geometries and properties, and the fusion deposition modeling (FDM) is a versatile and low cost technique. One way to obtain scaffolds that promote cell adhesion, proliferation and differentiation is to modify the surface of the materials. In this work, the FDM technique was used, with the polymeric filament of poly(butylene adipate-co-terephthalate (PBAT), which is biocompatible and bioresorbable and has presented characteristics suitable for ETO. Despite this characteristic, synthetic polymers have low cellular recognition, requiring modifications. To meet this need, the scaffolds were coated with hydroxyapatite (H), bioglass doped with Niobium (B) and/or gelatin (G), by immersion in aqueous solution technique. The materials were analyzed for their structural characteristics of groups, morphological, thermal, mechanical, and biological tests with methyl thiazolyl diphenyl tetrazolium bromide (MTT), sulforhodamine B (SRB) and alizarin red S. 3D PBAT scaffolds were produced and their surface modification was proven by SEM-FEG micrographs with EDS and the functional groups analyzed by FTIR. The modification did not cause changes in the thermal stability of PBAT polymer and there was an increase in Young's modulus of more than 1.5 times when modified, in addition an increasing in compressive stress from 0.96 ± 0.23 MPa for pure PBAT, to more than 2 MPa depending on the modification applied. The porosity of the 3D PBAT scaffold, as well as of all immersed materials, remained at approximately 60%. Finally, all scaffolds demonstrated cell viability by the MTT and SRB assays, with no significant difference, and there was an increase in cellular mineralization of PBG, PHG and PBH in the alizarin red S assay with pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells, when compared to the pure 3D PBAT material. Therefore, the immersion modification of 3D PBAT with two components proved to be a promising alternative to produce functional biomaterials for ETO.

Keywords: bone tissue engineering, additive manufacturing, 3D scaffold, poly(butylene adipate-co-terephthalate), surface modification.

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura do Osso. Adaptado de Iaquina M.R. e colaboradores ³³ e do site https://www.biologianet.com/histologia-animal/tecido-osseo.htm , acessado em 24 de novembro de 2023.....	4 -
Figura 2. Estrutura hierárquica com escala dos componentes ósseos. Adaptado de Wang e colaboradores. ³⁵	5 -
Figura 3. Células presentes na estrutura Óssea. Adaptado de Behzadi e colaboradores ³⁶ ..	5 -
Figura 4. Processo de remodelamento ósseo. Adaptado de Iaquina M.R. e colaboradores ³³ -	7 -
Figura 1. Adaptação de https://www.embarcados.com.br/imprimindo-o-mundo-em-uma-impressora-3d/ e https://3dprinterss.com/fused-deposition-modeling-3d-printer/ . Acessado em 20 de outubro de 2023.....	10 -
Figura 6. Orientação de construção: (a) Angulos Variados (b) Angulos determinados. Adaptado de Gao e colaboradores ⁵⁹	11 -
Figura 7. Orientações de camadas (a) 0° (b) 45° (c) 90° (d) -45°/45° ⁵⁹	11 -
Figura 8. Representação esquemática da modificação da espessura de camada. Adaptado de Ayrilmis Nadir. ⁵⁹	11 -
Figura 9. Estrutura química do PBAT.....	13 -
Figura 10. Estrutura química de um fragmento da cadeia alfa da gelatina. ⁷⁹	14 -
Figura 11. Estrutura da hidroxiapatita. ⁸⁷	15 -
Figura 2. Representação da estrutura de unidades tetraédricas de SiO ₄ e a formação de NBO's devido a modificação do modificador de estrutura Na ⁺ ¹	17 -
Figura 13. Mecanismo in vitro da ação de substratos cobertos por biovidro em SBF. Adaptado de Ratheesh e colaboradores ⁹⁵	18 -
Figura 3. Representação geométrica dos suportes poliméricos 3D: vista isométrica (A), vista superior (B), vista frontal (c).....	22 -
Figura 15. Esquema do processo envolvido na impressão de um material 3D em uma impressora de Modelagem por Fusão e Deposição (FDM).....	23 -
Figura 4. Amostras impressas com problemas em um dos testes realizados para adequação dos parâmetros definidos.....	24 -
Figura 17. Representação do processo de produção e modificação por imersão dos arcabouços 3D.....	25 -

Figura 18. Espectro de FTIR-ATR das nanopartículas de hidroxiapatita (H) utilizadas na modificação superficial dos suportes poliméricos 3D de PBAT.....	- 30 -
Figura 19. Espectro de FTIR-ATR da gelatina (G) utilizada na modificação superficial dos suportes poliméricos 3D de PBAT.....	- 31 -
Figura 20. Espectro de FTIR do Biovidro (B) utilizado na modificação superficial dos suportes poliméricos 3D de PBAT.	- 32 -
Figura 21. Espectros de FTIR dos suportes poliméricos 3D de PH (azul), PB (vermelho), PG (verde) e PBAT (preto).....	- 33 -
Figura 22. Espectros de FTIR dos suportes poliméricos 3D de PHG (vermelho), PBG (azul), PBH (verde) e PBAT (preto).....	- 35 -
Figura 23. Fotomicrografias obtidas por de MEV-FEG dos materiais aplicados a superfície da peça de PBAT 3D.....	- 36 -
Figura 24. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PBAT puro.	- 37 -
Figura 25. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PH e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos cálcio (azul), fósforo (vermelho) e oxigênio (amarelo).	- 38 -
Figura 26. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico de 3D de PB e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos cálcio (azul), fósforo (vermelho), oxigênio (amarelo), sódio (laranja) e silício (rosa).....	- 39 -
Figura 27. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PG e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos nitrogênio (verde) e oxigênio (amarelo).....	- 40 -
Figura 28. Imagens de reconstrução 3D das amostras, a),b),d) e f), e a segmentação das imagens realizada pelo plugin <i>weka segmentation</i> (c,e,g), na qual a cor preta na estrutura identifica o PBAT e o colorido representa os materiais depositados.	- 41 -
Figura 29. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PHG e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos cálcio (azul), fósforo (vermelho), oxigênio (amarelo) e nitrogênio (verde).	- 43 -
Figura 30. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PBG e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos cálcio (azul), fósforo (vermelho), silício (rosa), oxigênio (amarelo), sódio (laranja) e nitrogênio (verde).-	44

Figura 31. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PBH e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos Cálcio (Azul), Fósforo (vermelho), Silício (rosa), Sódio (laranja) e Oxigênio (Amarelo).....	- 45 -
Figura 32. Reconstrução 3D das amostras (a,b,d,f) e a segmentação das imagens realizada pelo plugin weka segmentation (c,e,g), com a cor preta na estrutura representando o PBAT, e o colorido representando os materiais depositados.	- 46 -
Figura 33. Análise da porosidade quantitativa dos suportes poliméricos 3D pela análise de MicroCT. ANOVA de uma via não apresenta diferença significativa entre as amostras testadas.	- 47 -
Figura 34. Ensaios das propriedades mecânicas do arcabouço puro de PBAT (P) e dos arcabouços modificados com gelatina (G), hidroxiapatita (H) e biovidro (B). Foram avaliados as propriedades de a) módulo de Young (E), e b) tensão de compressão (σ). Análise estatística ANOVA de uma via: grupos com mesma letra, não apresentam diferença significativa com pós teste de Tukey (valor de $p < 0,05$).....	- 49 -
Figura 35. Curvas TG e DTG dos reagentes utilizados no processo de modificação superficial: (a) PBAT; (b) gelatina; (c) biovidro e (d) hidroxiapatita.	- 50 -
Figura 37. Curvas de aquecimento (a) e resfriamento (b), dos arcabouços com deposição de 1 componente.	- 54 -
Figura 5. Curvas de TG e DTG dos arcabouços 3D modificados de PBAT: (a, b) PB, PH e PG - 1 componente; (c, d) PBG, PBH e PHG - 2 componentes.....	- 52 -
Figura 6. Curvas de aquecimento (a) e resfriamento (b), dos arcabouços com deposição de 1 componente.....	- 54 -
Figura 38. Curvas de aquecimento (a) e resfriamento (b), dos arcabouços com deposição de 2 componentes.....	- 54 -
Figura 39. Resultados de viabilidade celular SRB com células MC3T3-E1 para o arcabouços 3D depois de 72 h, PBAT puro, PG (PBAT + gelatina), PH (PBAT + hidroxiapatita), PB (PBAT + biovidro), PHG (PBAT + hidroxiapatita + gelatina), PBH (PBAT + biovidro + hidroxiapatita), e PBG (PBAT + biovidro + gelatina). Os dados são mostrados com valores médios \pm desvio padrão. ANOVA de uma via: amostras com letras diferentes apresentaram diferenças estatísticas utilizando pós teste Tukey ($p > 0,05$).....	- 55 -
Figura 40. Resultados dos ensaios MTT de células MC3T3-E1 depois de 72 h para os arcabouços 3D do PBAT puro, PG (PBAT + gelatina), PH (PBAT + hidroxiapatita), PB (PBAT + biovidro), PHG (PBAT + hidroxiapatita + gelatina), PBH (PBAT + biovidro + hidroxiapatita),	

e PBG (PBAT + biovidro + gelatina). ANOVA de uma via: não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre quaisquer grupos de análise..... - 56 -

Figura 41. Teste Vermelho de Alizarina para os arcabouços 3D do PBAT puro, PHG (hidroxiapatita + gelatina + PBAT), PBH (biovidro + hidroxiapatita + PBAT), e PBG (biovidro + gelatina + PBAT). ANOVA de uma via: grupos com letras diferentes apresentaram diferenças estatísticas utilizando pós teste Tukey ($p > 0,05$). - 57 -

Lista de tabelas

Tabela 1. Dimensões do modelo CAD dos suportes poliméricos de PBAT.	- 23 -
Tabela 2. Parâmetros de impressão dos suportes 3D.	- 24 -
Tabela 3. Propriedades mecânicas dos suportes 3D.....	- 49 -
Tabela 4. Dados analisados do TGA and DSC, na qual: T_i é a temperatura inicial de degradação, T_f é a temperatura final de degradação, T_m é a temperatura de fusão, ΔH_m entalpia de fusão, X_c é a taxa de cristalização, T_c é a temperatura de cristalização, ΔH_c é a entalpia de cristalização, e T_g é a temperatura de transição vítrea.	- 53 -

Listas de abreviaturas e siglas

ABS - acrilonitrila butadieno estireno

ACP - camada de fosfato de cálcio amorfo

ANOVA - Análise de variância unidirecional

B - biovidro

BA - 1,4 butanodiol e ácido adipico

BT – Butanodiol

BMPs - proteínas morfogenéticas ósseas

BMU - unidade multicelular básica

CAD - projeto assistido por computador

Col – Colágeno

c-HA - citrato de hidroxiapatita

DMSO - dimetilsulfóxido

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

EDS - espectroscopia de raios-X por dispersão de energia

E - módulo de Young

ETO - engenharia de tecido ósseo

FDM - modelagem por deposição fundida

FTIR-ATR - espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

G - gelatina

H – hidroxiapatita

HCA - camada de apatita hidroxilcarbonatada

MEV-FEG - microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

MH - minociclina

MTT - tiazolil difenil-tetrazólio

PBAT - poli(butileno adipato-*co*-tereftalato)

P - poli(butileno adipato-*co*-tereftalato)3D

PCL – policaprolactona

PDA - polidopamina

PDLLA - poli(D-L-ácido lático)

PLA - poli(ácido lático)

PLCL - poli(L-lactideo-*co*- ϵ -caprolactona)

PLGA - poli(ácido lático-*co*-ácido glicólico)

SBF – solução salina tamponada de fosfato

TGA - Análise termogravimétrica

TPU – poliuretano termoplástico

TRAP - isoenzima resistente a fosfatase ácida

PG - poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) + gelatina

PH - poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) + hidropatita

PB - poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) + biovidro

PBG - poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) + biovidro + gelatina

PBH - poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) + biovidro + hidropatita

PHG - poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) + hidropatita + gelatina

SRB - sulforodamina B

T_c - temperatura de cristalização

T_i - temperatura inicial de degradação

T_f - temperatura final de degradação

T_g - temperatura de transição vítrea

T_m - temperatura de fusão

X_c - taxa de cristalização

μCT - Microtomografia computadorizada de raios X

σ - tensão de compressão

ΔH_c - entalpia de cristalização

ΔH_m - entalpia de fusão

Sumário

1. Introdução	- 1 -
2. Revisão bibliográfica	- 4 -
2.1. Tecido ósseo, estrutura e remodelamento.....	- 4 -
2.2 Engenharia de tecido óssea (ETO)	- 7 -
2.3 Produção de arcabouços 3D e prototipagem rápida	- 8 -
2.4. Materiais utilizados na impressão 3D e na sua modificação	- 12 -
2.4.1 Poli(butileno adipato-co-tereftalato) (pbat)	- 12 -
2.4.2 Gelatina	- 13 -
2.4.3 Hidroxiapatita	- 15 -
2.4.4 Biovidro	- 16 -
2.4.5 Modificação superficial de arcabouços 3D.....	- 19 -
3. Objetivos	- 21 -
3.1. Objetivos específicos	- 21 -
4. Materiais e Métodos	- 22 -
4.1 Materiais	- 22 -
4.2 Fabricação do suporte polimérico 3D por FDM.....	- 22 -
4.3 Modificação superficial dos suportes poliméricos 3D	- 25 -
4.4 Caracterização dos suportes poliméricos 3D.....	- 26 -
4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) acoplada a espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS).....	- 26 -
4.4.2 Microtomografia computadorizada de raios X (μ ct)	- 26 -
4.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)-	27
-	
4.4.4 Análise termogravimétrica (TGA)	- 27 -
4.4.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	- 27 -
4.4.6 Ensaio mecânico de compressão.....	- 28 -
4.5 Análises biológicas	- 28 -
4.5.1 Análise de proliferação celular dos suportes 3D.....	- 28 -
4.5.2 Mineralização celular.....	- 29 -
4.6 Análise estatística	- 29 -
5. Resultados e discussões.....	- 30 -
5.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR).....	- 30 -

5.1.1 FTIR dos reagentes	- 30 -
5.1.2. FTIR dos suportes poliméricos 3D modificados superficialmente com apenas 1 componente	- 32 -
5.1.3 FTIR dos suportes poliméricos 3D modificados superficialmente com a combinação de 2 componentes.....	- 34 -
5.2 Características morfológicas dos suportes poliméricos 3D com superfície modificada	- 36 -
5.2.1 MEV-FEG dos reagentes	- 36 -
5.2.3 MEV-FEG, mapeamento elementar dos suportes poliméricos 3D com 1 componente e reconstrução 3D de imagens analisadas por μ ct.	- 37 -
5.2.4 MEV-FEG, mapeamento elementar dos suportes poliméricos 3D com 2 componentes e reconstrução 3D de Imagens analisadas por μ ct	- 42 -
5.3 Porosidade dos suportes poliméricos 3D	- 47 -
5.4 Propriedades mecânicas dos suportes poliméricos 3D modificados	- 48 -
5.5 Estabilidade térmica.....	- 50 -
5.5.1 Estabilidade térmica dos reagentes puros	- 50 -
5.5.2 Estabilidade térmica dos suportes poliméricos 3D modificados	- 51 -
5.6 Viabilidade celular dos suportes 3D	- 54 -
6 Conclusões	- 58 -
7 Referências Bibliográficas	- 59 -
8. Perspectivas Futuras	- 78 -

1. Introdução

Com o crescimento populacional e da expectativa de vida, um maior número de problemas relacionados ao tecido ósseo tem surgido e, conseqüentemente, aumentado o uso de substitutos ósseos, os quais ainda podem provocar dificuldades clínicas como fraturas, tumores e infecções.² Nos procedimentos clínicos já utilizados para a inserção de substitutos ósseos, o auto enxerto é o principal, sendo caracterizado pela transferência de um tecido, órgão, ou parte do indivíduo para outra parte do mesmo indivíduo. Além deste, há o aloenxerto, o qual provém de um doador da mesma espécie do receptor, e o xenotransplante, que se utiliza um material de uma espécie diferente. Estes procedimentos apresentam limitações, como a falta de disponibilidade de tecido em regiões grandes, dor e podendo ocorrer infecções.³

Para superar estes desafios, pesquisas de novos biomateriais com propriedades compatível ao tecido e com menos complicações à saúde do paciente têm sido realizadas. A área de estudos que tem como objetivo a fabricação de biomateriais que apresentem capacidade de mimetizar o ambiente adequado, degenerar e/ou substituir o tecido lesionado é a engenharia de tecido ósseo (ETO)^{4,5}. Estes materiais devem apresentar biocompatibilidade, permitir que ocorra a osteogênese, osteocondutividade e osteoindução. Também é importante obter estruturas e geometrias adequadas, com porosidade e propriedades mecânicas similares a estrutura óssea desejada.^{2,5}

Vários métodos de produção de estruturas tridimensionais (3D) têm sido estudados na literatura. Dentre estes temos a eletrofição⁶, evaporação de solvente-lixiviação⁷, liofilização⁸, espuma por gás⁸, etc. Além deste, como destaque temos a fabricação aditiva ou prototipagem rápida, também conhecida como impressão 3D.

A técnica de modelagem por deposição fundida (FDM) é um dos tipos de prototipagem rápida e é baseada na extrusão de um polímero fundido. É uma tecnologia simples que não necessita de solvente, permitindo a fabricação de peças com baixo custo, ampla aplicação e processamento rápido.⁹ Esta técnica, têm como princípio a deposição repetitiva de material, formando as respectivas camadas e estruturas previamente construídas de um projeto assistido por computador (CAD).¹⁰ Dentre os materiais comerciais utilizados para fabricação em FDM temos o poli(ácido láctico) (PLA), acrilonitrila butadieno estireno (ABS), poliuretano termoplástico (TPU) e policaprolactona (PCL). Um grupo de polímeros em destaque na ETO, são os poliésteres, como PCL¹¹, poli(ácido láctico) PLA¹², poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)¹³ e poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) (PBAT)^{14,15}.

O polímero biodegradável PBAT é um copoliéster linear composto de dois tipos de dímeros, sendo sua parte rígida (BT) uma unidade de éster retida de butanodiol e do monômero

ácido tereftálico, e a parte flexível (BA) consistindo dos monômeros 1,4 butanodiol e ácido adipico.¹⁶ Este biopolímero é promissor nesta área de pesquisa, e sobretudo não há filamento de FDM comerciais do mesmo. Apresenta boas propriedades mecânicas, processabilidade e biocompatibilidade, porém como todo polímero sintético, apresenta baixo reconhecimento celular.¹⁷ Para superar limitações como esta, pode-se realizar modificações deste biomaterial após sua impressão.

O osso é um material compósito constituído de uma fase inorgânica de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e uma fase orgânica constituída majoritariamente por colágeno tipo I e água. Além disso, os nanocristais uniformes de fosfato de cálcio estão arranjados entre as fibras de colágeno formando uma estrutura organizada. As principais funções deste tecido incluem: locomoção, promover estrutura suporte e proteção de tecidos moles, armazenamento de cálcio, fosfato e da medula óssea.^{18,19} Neste contexto, uma característica importante do biomaterial ósseo é a presença de materiais inorgânicos que tenham a capacidade de mimetizar o osso e seus componentes. Sendo assim, um dos materiais biocerâmicos amplamente estudado é a hidroxiapatita, devido a sua biocompatibilidade, bioatividade e similaridade química com o mineral presente no osso.²⁰

Outro material bioativo que apresenta relevância nesta área de estudo são os biovidros (B), que são materiais baseados em sílica sintética que possui a habilidade de se ligar ao osso e formar uma camada de apatita biologicamente ativa na superfície.²¹ Os biovidros apresentam capacidade osteogênica, taxa de degradação controlável e atóxica, a qual é dependente da sua estrutura química. Além disso servem de suporte ao crescimento celular e auxiliam no reparo de locais lesionados.²¹ O Biovidro original, chamado Bioglass®45S5, é um vidro derivado de fusão com quatro componentes (46,1% SiO_2 , 24,4% Na_2O , 26,9% CaO e 2,6% P_2O_5 , em mol).²¹ Ele tem sido utilizado em muitos procedimentos clínicos como reparo de defeitos ósseos periodontais, reconstrução de defeitos maxilofaciais, cirurgia da coluna vertebral e reposição óssea. Como exemplo, temos a incorporação de B em *scaffolds* de PCL ou poli(D-L-ácido láctico) PDLA, melhorando o crescimento celular e a atividade funcional.^{22,23}

No entanto, ainda que o B e H apresentem potencial osteogênico, somente estes materiais podem não ser suficientes para permitir a melhor mimetização e regeneração do tecido lesionado. Desta maneira vários autores vêm desenvolvendo biomateriais que combinam materiais orgânicos e inorgânicos, ambos presentes na estrutura óssea.²⁴ Dentre os orgânicos utilizados, pode-se destacar o biopolímero natural gelatina, que é uma proteína obtida pela hidrólise alcalina ou ácida do colágeno. Além disso, a gelatina é um material biocompatível que apresenta baixos níveis, ou quase nenhum, de citotoxicidade, permite um melhor reconhecimento celular em comparação a compostos sintéticos e mimetiza a parte orgânica que

compõe o osso.¹² Westhauser e colaboradores observaram que amostras 3D de vidro bioativo 45S5 apresentaram uma melhora na formação óssea quando o biomaterial foi recoberto superficialmente com a gelatina, devido a melhor interação celular obtida, criando um efeito sinérgico entre os dois materiais²⁵.

Poucos trabalhos de impressão com PBAT foram descritos na literatura. Ulbrich e seus colaboradores imprimiram arcabouços 3D utilizando filamentos de PBAT e o compósito PBAT/biovidro obtido via extrusão.²⁶ O compósito apresentou um aumento na habilidade de promover mineralização celular e promoveu formação óssea nos testes *in vivo*, sem nenhum problema de toxicidade sistêmica no local onde foi aplicado, demonstrando ser um material seguro para aplicações biomédicas.

A bioatividade de uma superfície é muito importante para que o material possa estimular a proliferação e diferenciação de células mesenquimais. Quando a superfície de suportes bioativos ósseos possui padrões de adesão celular, seu papel nos processos subsequentes de ancoragem e diferenciação celular são acelerados.²⁷

Dentre as técnicas para modificação superficial de suportes poliméricos 3D destaca-se o recobrimento por imersão, na qual se pode utilizar um amplo espectro de materiais na superfície destas peças. Com este tipo de modificação é possível a criação de estruturas mais complexas e materiais com características que mimetizam e regeneram os tecidos lesionados.^{28,29} Martin e colaboradores³⁰ fabricaram suportes de PLA 3D e os revestiram com colágeno tipo I, minociclina (fármaco antibacteriano) e citrato-hidroxiapatita utilizando a técnica *dip coating*, a fim de promover um suporte com diversas funcionalidades para engenharia óssea. He e colaboradores³¹ também utilizaram esta técnica para depositar colágeno tipo I em poli(L-lactideo-co- ϵ -caprolactona) (PLCL) e observaram o aumento da hidrofiliabilidade do material, bem como o melhoramento da proliferação celular de condrócitos em relação ao polímero puro.

Devido aos inúmeros requisitos necessários para se obter materiais biocompatíveis, com características morfológicas, mecânicas e físico-químicas que se assemelhem ao tecido estudado, é necessário a utilização de materiais com diferentes componentes, que possam suprir essas deficiências em comparação aos seus materiais puros.

Nesse contexto, este trabalho visa a produção de arcabouços 3D poliméricos de PBAT, via impressão FDM, e sua posterior modificação superficial através da técnica de imersão. A modificação superficial deste material foi realizada utilizando o polímero natural gelatina e as cargas inorgânicas de hidroxiapatita e biovidro com nióbio. Desta forma, pretendeu-se produzir um biomaterial híbrido com amplo espectro e que abarque propriedades adequadas para mimetização do tecido ósseo e sua posterior regeneração.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Tecido ósseo, estrutura e remodelamento.

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado e não é homogeneamente sólido, mas sim um organizado de células ósseas vivas dispostas em um meio biomineral³². A sua composição é de aproximadamente 30 % de segmentos orgânicos, e 70% de segmentos inorgânicos. Quase a totalidade da parte orgânica (≈ 90 %) é de colágeno tipo I, com outros 10 % sendo provenientes de outras proteínas, lipídios e moléculas proteoglicanas, osteopontina e outros compostos da matriz óssea. Já a parte inorgânica é formada por cristais de hidroxiapatita, fase mineral do osso de fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com estrutura hexagonal, que se organiza paralelamente ao longo do eixo das fibras de colágeno por auto montagem das hélices triplas do mesmo.¹⁸ A estrutura óssea pode ser visualizada nas Figuras 1 e 2.

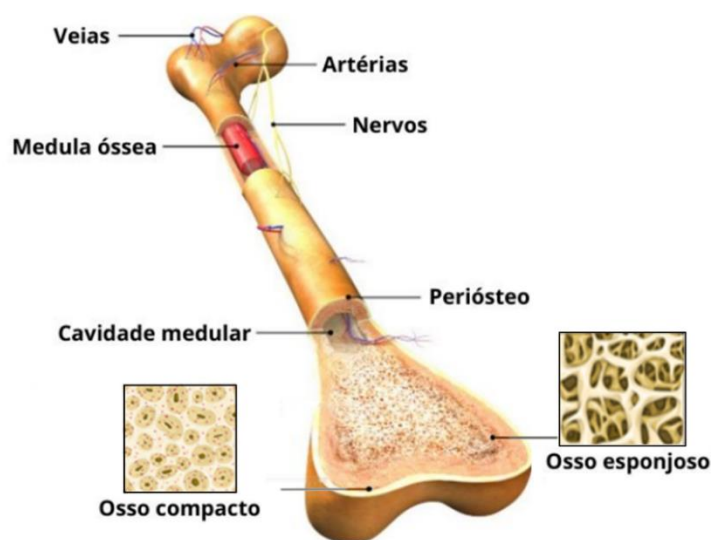


Figura 1. Estrutura do Osso. Adaptado de Iaquina M.R. e colaboradores³³ e do site <https://www.biologianet.com/histologia-animal/tecido-osseo.htm>, acessado em 24 de novembro de 2023.

As proteínas na matriz extracelular do osso também podem ser proteínas estruturais (colágeno e fibronectina) e proteínas com funções especializadas, como as que regulam o diâmetro das fibrilas de colágeno, moléculas sinalizadoras, fatores de crescimento, como enzimas, entre outras funções. A quantidade relativa de cada um destes constituintes varia com a idade, local, gênero, e estado de saúde.³⁴

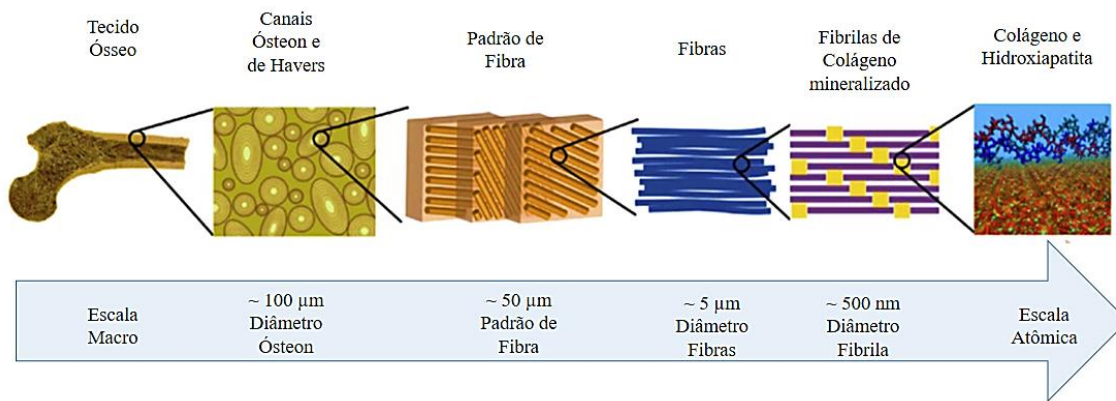


Figura 2. Estrutura hierárquica com escala dos componentes ósseos. Adaptado de Wang e colaboradores.³⁵

Este tecido apresenta inúmeras funções importantes, como ser suporte mecânico e servir de proteção a outros tecidos, participar da formação local de ligações musculares, ligamentos, tendões, armazenamento de cálcio, fosfato e medula óssea.¹⁹ A matriz extracelular é um ambiente com diversos componentes e funções, otimizado para a residência das células que além de fornecer apoio estrutural, é um canal de comunicação célula-célula e repositório de fatores de crescimento.³⁴ O osso apresenta três tipos diferentes de células em sua composição: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, que podem ser visualizados na Figura 3.

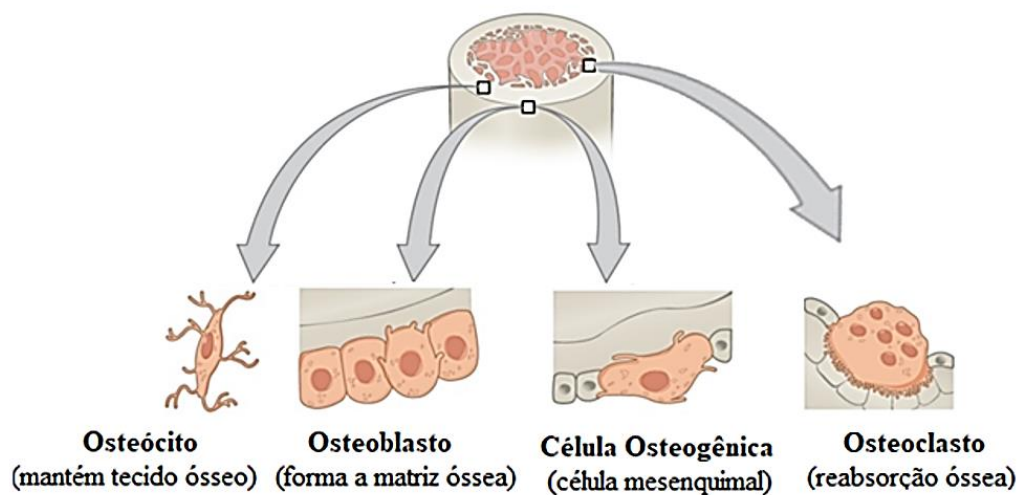


Figura 3. Células presentes na estrutura Óssea. Adaptado de Behzadi e colaboradores³⁶.

Os osteoblastos mononucleados são derivados de células osteoprogenitoras de origem mesenquimal na medula óssea e em outros tecidos e responsáveis pela formação do osso. As células precursoras se diferenciam e se proliferam para osteoblastos antes da formação óssea, estimulados por proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Essas células são responsáveis por

crescimento ou remodelação óssea. Além disso, seus papéis são a síntese, deposição e mineralização dos matriz óssea, produzindo uma mistura de proteínas chamada osteóide. Os osteócitos são as células derivadas dos osteoblastos, sendo o tipo celular mais abundante no tecido ósseo e descritos morfológicamente como forma de estrela. Eles servem de instrumento para desintegrar a matriz óssea através da osteólise osteocística.³⁶

Os osteoclastos multinucleados são derivados de precursores hematopoiéticos, sendo a principal célula envolvida no processo chamado de reabsorção óssea, uma vez que liberam enzimas e ácidos capazes de dissolver e digerir minerais no osso.^{37,38} Elas também são responsáveis pela intensa síntese de enzimas lisossômicas, principalmente a isoenzima resistente fosfatase ácida (TRAP, do inglês *Tartrate-resistant acid phosphatase*). É relatado que a TRAP é um marcador do fenótipo do osteoclasto, cisteína protienases, por exemplo, catepsinas degradadoras de colágeno, conhecidas por degradar o colágeno.³⁹ As células de revestimento são células inativas de osteoblastos que ficam da superfície do osso. Elas possuem importante papel na reabsorção e formação óssea, na diferenciação dos osteoclastos bem como na homeostasia de cálcio.³²

O osso apresenta um processo complexo de remodelamento que é necessário para cura de fraturas e adaptação mecânica do uso esquelético. Este processo é visualizado na Figura 4 e ocorre seguindo algumas fases que são coordenadas pelas suas células, que juntas formam uma estrutura básica anatômica chamada unidade multicelular básica (BMU). O remodelamento pode ocorrer em duas etapas, a primeira em que há formação óssea por osteoblastos seguido de células denominadas osteoclastos que realizam a reabsorção do osso, atingindo uma massa de tecido óssea equilibrada de maturidade fisiológica.⁴⁰ A primeira fase de reabsorção. Na qual os osteoclastos são recrutados e remodelam o local escavando o local, pode ocorrer em um período de 2 a 4 semanas. Após isto, estas células podem se diferenciar nos osteoblastos, na fase chamada fase reversa. Nesta nova fase, de 2 a 4 meses, os osteoblastos maduros depositam uma matriz orgânica que se tornará mineralizada.⁴¹ O equilíbrio envolvido na reabsorção óssea e formação de novo tecido é de extrema importância, pois o desbalanceamento pode indicar osteoporose (perda óssea)⁴² ou osteopetrose⁴³ (ganho ou acúmulo ósseo).

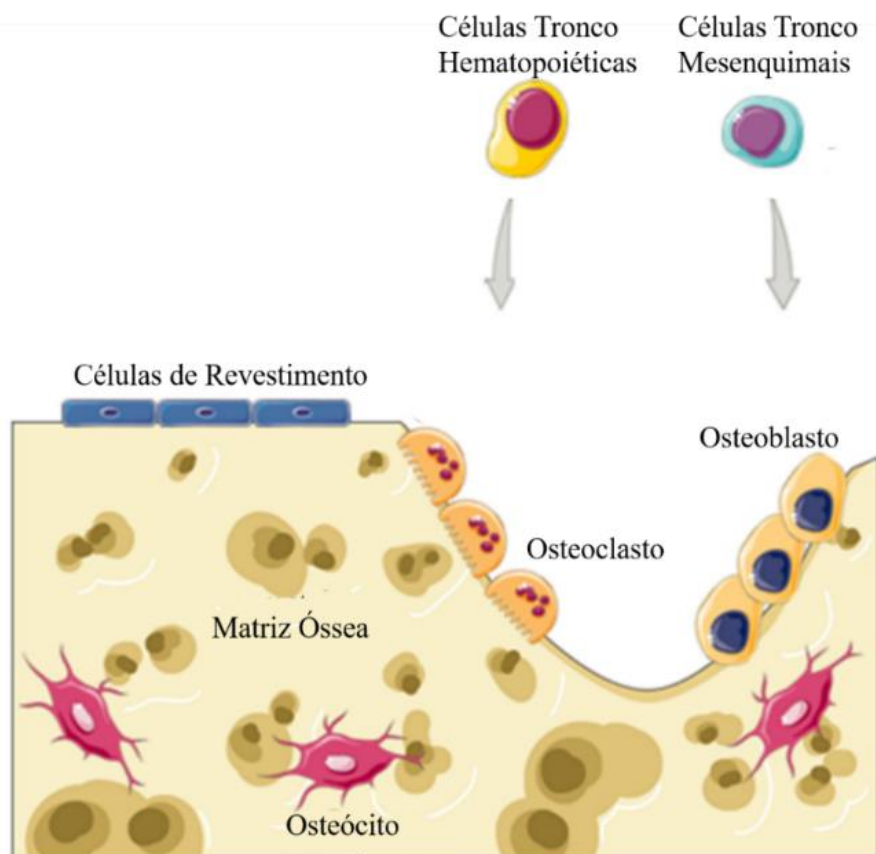


Figura 7. Processo de remodelamento ósseo. Adaptado de Iaquina M.R. e colaboradores³³

2.2 Engenharia de tecido óssea (ETO)

Um dos problemas de se tratar as fraturas ósseas, são que muitas fraturas grandes segmentares requerem operação ortopédica. Atualmente, os defeitos ósseos são curados pelos métodos de autoenxerto, aloenxertos e substitutos ósseos biocompatíveis, osteointegrativos (intensa comunicação entre o tecido do hospedeiro e o substituto ósseo), osteocondutivo (a habilidade do material de ser colonizado pelas células ósseas e sangue hospedeiro) e osteoindutivo (induzir as células mesenquimais a se diferenciar nas células do tecido ósseo). Os enxertos ósseos têm sido utilizados em diversos processos clínicos, para uma melhora na regeneração e reparação do osso. Os procedimentos clínicos atuais como os auto enxertos e aloenxertos, apresentam algumas limitações e deficiências, como complicações clínicas para o reparo e regeneração óssea.⁴⁴

O procedimento clínico mais utilizado ainda atualmente é o auto enxerto, operação em que consiste na transferência de um tecido, órgão ou parte dele para outra parte do corpo do mesmo indivíduo, pois os materiais são histocompatíveis e não imunogênicos, possuindo todas as propriedades básicas necessárias para o enxerto ósseo. Este procedimento apresenta inúmeros problemas, podendo resultar em lesão e morbidades no local do doador, assim como

problemas de dor crônica, sangramento, inflamação e infecção. Além disto, este procedimento é inviabilizado pela falta de disponibilidade quando há necessidade de se utilizar maiores volumes de materiais.⁴

Os aloenxertos são o segundo procedimento mais comum nos enxertos ósseos. Ele envolve o transplante de tecido ósseo de outra pessoa (sem ser o próprio paciente), normalmente de um cadáver. Este procedimento possui risco de imunorreações e transmissão de infecções.⁴ Como alternativa aos métodos de enxerto relatados, a pesquisa de materiais na engenharia de tecidos ósseos têm atraído atenção nas últimas décadas. Este campo de pesquisa têm objetivo de criar materiais que melhorem a reparação e regeneração óssea, sendo uma alternativa aos métodos de enxerto e os problemas causados por este processo.⁴⁵

A seleção dos materiais para produção de matrizes tridimensionais é de fundamental importância pois as propriedades finais do material, dependem das características dos materiais originais. Deseja-se que os biomateriais utilizados na engenharia de tecido óssea possuam uma superfície que suporte a adesão, proliferação, migração e crescimento celular, além de possuir outros requisitos físico e químicos.⁴⁶ Visando a obtenção de materiais com essas características, blendas dos poliméricos e cerâmicos se tornaram bons candidatos a serem utilizados na ETO, pois apresentam características de ambos os materiais e se assemelham ao osso, que é um material compósito, formado por parte orgânica (fibras de colágeno) e cristais inorgânicos de hidroxiapatita.⁴

2.3 Produção de arcabouços 3D e prototipagem rápida

Os suportes ou arcabouços para a área de engenharia de tecidos são materiais que devem apresentar biocompatibilidade, bioatividade e suporte mecânico adequado, além do que, devem mimetizar as propriedades da matriz extracelular do tecido, provendo ao local, um ambiente favorável para que as células possam aderir, proliferar e se diferenciar no tecido lesionado^{47,48}. Para produzir a partir da técnica de impressão 3D, os materiais devem possuir boas propriedades reológicas e térmicas para permitir uma impressão adequada, ser biocompatível, apresentar propriedades mecânicas compatíveis com a aplicação, boa cinética de degradação e produtos de degradação não tóxicos⁴⁹⁻⁵¹.

As estruturas tridimensionais são produzidas por diversas técnicas como, evaporação de solvente e lixiviação⁵², espuma por gás⁵³, liofilização, eletrofiação⁵⁴, fiação úmida⁵⁵ (*wet spinning*) e impressão 3D⁵⁶, ou a combinação destas técnicas. Porém, estes métodos podem possuir algumas desvantagens, tais como uso de solventes orgânicos, longo tempo de produção e pouca reprodutibilidade nas estruturas 3D fabricadas, como por exemplo porosidade irregular

na estrutura.⁵⁷ Dentro da área de fabricação de estruturas tridimensionais, a impressão 3D se destaca, permitindo o controle da arquitetura dos arcabouços 3D.

A técnica de impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva, é uma tecnologia que permite a produção de estruturas de alta complexidade estrutural de acordo com a necessidade específica de um paciente. O design e fabricação dos materiais é baseado em imagens teciduais, as quais normalmente são obtidas com ajuda de técnicas médicas de imagens como tomografia computadorizada e ressonância magnética. Devido a possibilidade de controlar as características dos materiais impressos, como a geometria, orientação de camadas e porosidade, bem como utilizar diversos materiais naturais, sintéticos e/ou biológicos, tornaram a impressão 3D de grande relevância para a comunidade científica.⁵⁸ Apesar de apresentar grande potencial, possui algumas limitações, como a velocidade de impressão e a resolução das impressoras. Além disso, é de extrema complexidade a produção de materiais que apresentem características específicas e adequadas ao corpo humano nas suas condições fisiológicas ideais.

Podemos dividir em quatro grupos as principais tecnologias de fabricação aditiva: métodos baseados em extrusão, em fusão de partículas, métodos induzidos por luz (fotopolimerização) e impressão a jato de tinta.⁵⁸ Neste trabalho, utiliza-se a técnica de impressão que utiliza extrusão, denominada modelagem por fusão e deposição (FDM). Esta manufatura aditiva utiliza um material na forma de um filamento sólido (1,50 e 1,75 mm de diâmetro) que é fundido e extrudado, criando o modelo 3D, camada por camada. O filamento é enrolado e extrudado usando um sistema motorizado de roletes de pressão, passando pelo bico quente com temperatura de até 230°C ou maiores, dependendo do modelo de impressora 3D, e sendo solidificado em uma mesa coletora. O filamento extrudado passa pelo bico de impressão e segue um caminho pré-determinado nos eixos X, Y e Z que forma produzidos em *softwares* de design 3D auxiliado por computador. Os materiais utilizados normalmente, são polímeros que podem fluir, ou seja, se fundir, e se solidificar rapidamente na mesa coletora após resfriamento e formação do desenho projetado. O nível de resolução da localização do bico de 25 µm no plano X e Y é atingido com dimensões de linha e espessura da camada de 200–500 µm, determinada pelo diâmetro do bico. Este tipo de impressão pode ser visualizado na Figura 5.

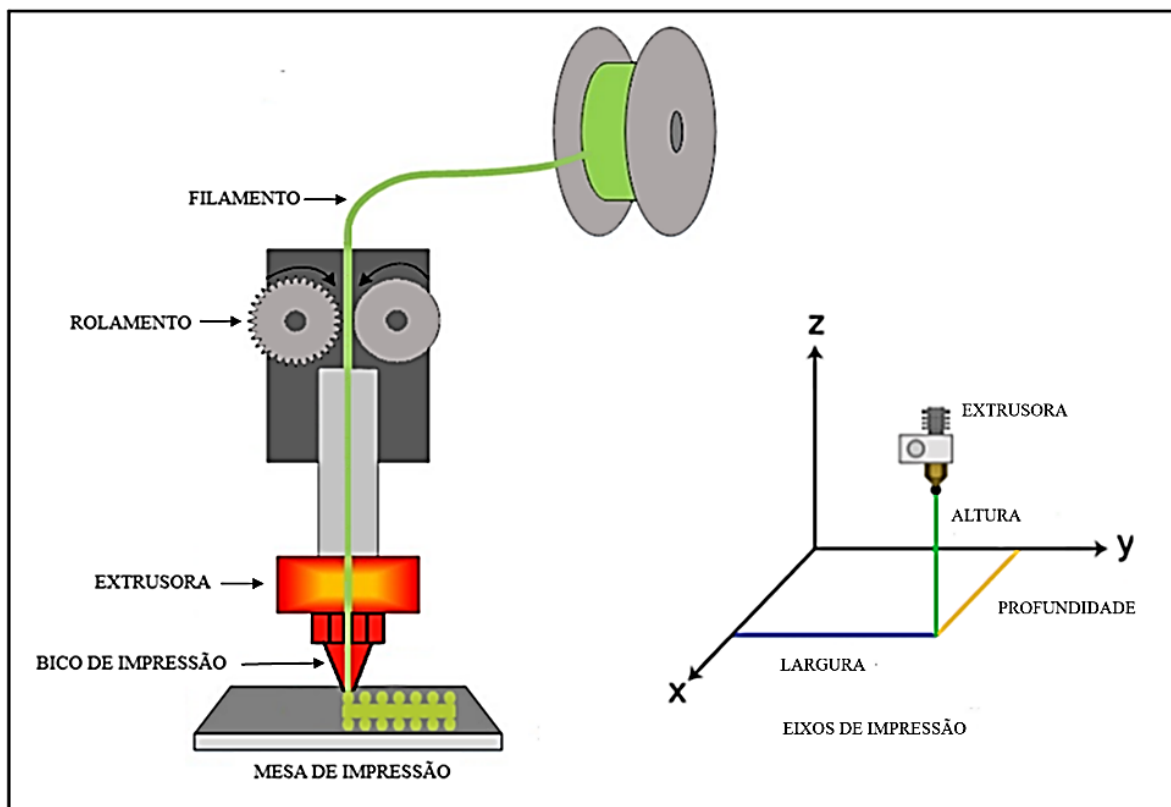


Figura 8. Adaptação de <https://www.embarcados.com.br/imprimindo-o-mundo-em-uma-impressora-3d/> e <https://3dprinterss.com/fused-deposition-modeling-3d-printer/>. Acessado em 20 de outubro de 2023.

Dentro dos parâmetros de processo, podemos citar alguns comuns, espaçamento de ar, orientação de construção, densidade de preenchimento, padrão de preenchimento, espessura de camada, ângulo e largura de arraste e velocidade de impressão.

A orientação de impressão de construção representa qual é a direção que será gerado o modelo na plataforma coletora. A modificação deste componente pode modificar as propriedades mecânicas finais do material impresso. O ângulo z de construção normalmente é o principal fator para propriedades de tensão mecânica, sendo a orientação de 0° a preferencial, como demonstrado na figura 6^{59,60}.

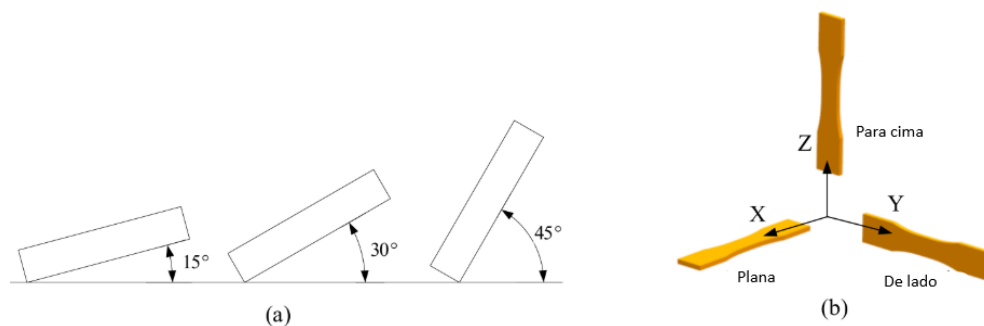


Figura 9. Orientação de construção: (a) Angulos Variados (b) Angulos determinados. Adaptado de Gao e colaboradores ⁵⁹.

A orientação de arraste, de fibra ou camada, representa a variação do ângulo x na plataforma. Barros R.R, em seu estudo da variação angular das camadas, utilizando como polímero extrudado PBAT, comprovou que a propriedade mecânica é afetada por este parâmetro. O módulo de elasticidade e a tensão máxima diminuiram com o aumento da orientação angular usada, de 15°, 30°, 45°, 60° 75° e 90° ⁶¹.

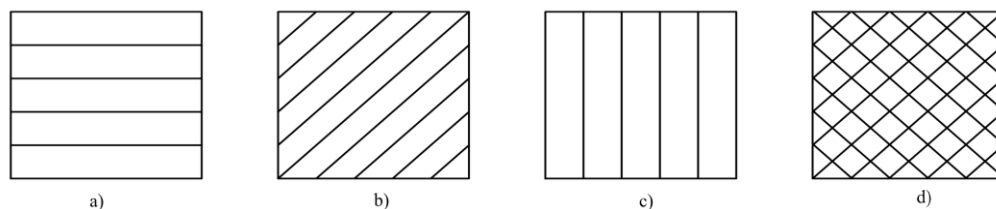


Figura 10. Orientações de camadas (a) 0° (b) 45° (c) 90° (d) -45°/45° ⁵⁹.

Juntamente com as mencionadas acima, a altura da camada (espessura de camada), pode ser modificada, sendo menor que o diâmetro de bico de extrusão (Figura 8).

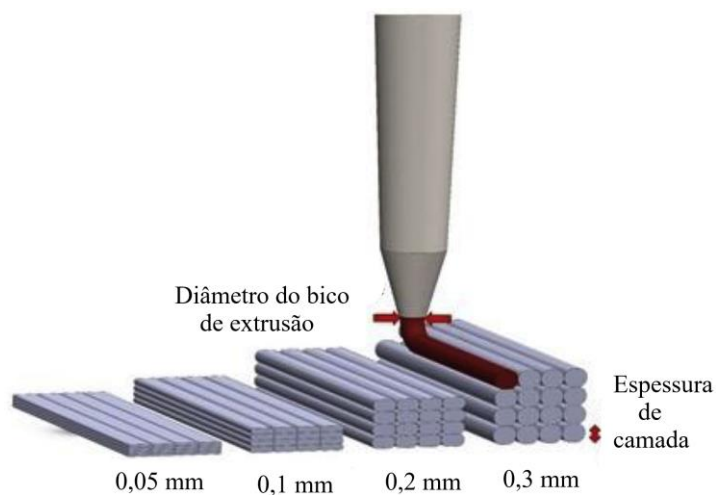


Figura 11. Representação esquemática da modificação da espessura de camada. Adaptado de Ayirmis Nadir. ⁵⁹

Ayirmis Nadir em seu trabalho, verificou que o aumento da espessura de camada diminui o ângulo de contato de sua amostra, de 76,6 ° com uma camada de 0,05 mm para 64,5 ° com 0,3 mm. Outro parâmetro analisado e verificado, foi a rugosidade da superfície, que

aumentou com o aumento da camada. Quando se modifica a velocidade de impressão, normalmente verifica-se que geralmente há uma velocidade ótima, entre 15 a 20 mm/s, e que quanto mais rápido, menor a qualidade de impressão, pois não há tempo de o polímero se solidificar adequadamente, além de causar instabilidade na impressora em velocidades muito altas.⁶² Corte e colaboradores ao imprimir filamentos de PCL, verificaram que o aumento da velocidade de impressão do material, ocasionou grumos na amostra impressa, obtendo uma morfologia com poros não homogêneos formados.⁶² Além disso, outros fatores como propriedade mecânica e porosidade do material também são modificados com o aumento da velocidade de impressão, como descrito por Kamer e colaboradores⁶³. Eles verificaram que o aumento de 20 e 40 mm/s para 60 mm/s ocasionou o aumento da porosidade da amostra de PLA impressa, bem como diminuição das propriedades mecânicas de força de tensão.

Desta maneira, verifica-se que os parâmetros controlados como a espessura de camada, ângulo da deposição, o espaço entre o arraste, altura entre as camadas, resolução da impressão e a velocidade de impressão do material, são característica que determinam a qualidade da impressão final com seus poros, morfologia determinado no projeto CAD, além de também ser dependente das propriedades reológicas do material termoplástico a ser extrudado.⁶⁴

2.4. Materiais utilizados na impressão 3D e na sua modificação

2.4.1 Poli(butileno adipato-co-tereftalato) (pbat)

Dentre os polímeros utilizados na impressão 3D, os polímeros biodegradáveis vêm se destacando por apresentarem características importantes para a engenharia de tecidos, como biocompatibilidade, e muitas vezes biodegradabilidade, não toxicidade de seus produtos de degradação⁴⁹. Os polímeros biodegradáveis podem ser divididos em duas categorias: polímeros naturais e polímeros sintéticos. Os polímeros naturais podem ser tanto de origem vegetal quanto animal e, em sua maioria, estão em grande abundância na natureza. Alguns exemplos: celulose, amido, ácido hialurônico, alginato, quitina, gelatina^{65,66}.

Dentre os polímeros sintéticos, um dos poliésteres utilizados na área médica que tem se destacado é o poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) (Figura 9), que é um copoliéster sintético e biodegradável de origem fóssil. O PBAT é preparado por reação de transesterificação, apresentando cadeia linear composta por dois dímeros. A sua parte rígida (BT) é uma unidade éster retida de butanodiol e monômero ácido tereftálico, enquanto a parte flexível (BA) consiste dos monômeros 1,4-butanodiol e ácido adípico.¹⁶

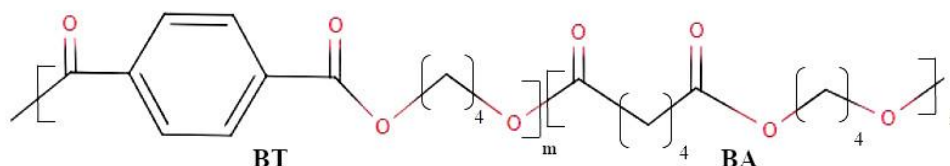


Figura 12. Estrutura química do PBAT.

Atualmente, o PBAT é utilizado nas mais variadas aplicações, como materiais para embalagem (sacolas de lixo, embalagens de comida e filmes de enrolar)⁶⁷ e no campo biomédico na engenharia de tecidos^{15,68}. Este polímero apresenta como uma de suas principais características a flexibilidade e alto alongamento de ruptura, apresentando módulo de Young de 20-35 MPa, força de tensão de 32-36 MPa, e alongamento de ruptura (aproximadamente 700 %) maior que outros poliésteres como o poli(ácido láctico) e poli(succinato de butileno).⁶⁹

Seu processo de degradação ambiental depende das condições ambiente com umidade, bem como da sua estrutura química. Este processo pode acontecer simultaneamente ou não, por ação de enzimas secretadas por microrganismos como bactérias, fungos e algas presentes no meio ambiente, e o processo de despolimerização por cisão das cadeias poliméricas por vias de hidrólise química ou degradação térmica, sendo que os possíveis intermediários formados são metabolizados pelos microrganismos.^{70,71}

Este polímero normalmente apresenta sua utilização com outros componentes que em conjunto melhoram suas propriedades em dada aplicação. Vasconcellos e colaboradores, produziram compósitos por eletrofiação de PBAT/nanohidroxiapatita/grafeno para aplicação óssea. A utilização dos componentes hidroxiapatita e nanofibras de grafeno (5 m/m %) melhorou a formação óssea lamelar *in vivo*, aumentando a densidade radiográfica e rigidez após implantação em comparação ao polímero puro⁷². Compósitos em impressão 3D também vem sendo relatados na literatura como uma opção de material que contenha várias características necessárias. Ulbrich e colaboradores fabricaram suportes de PBAT/vidro bioativo com nióbio (90/10 m/m %) e demonstraram um aumento na mineralização *in vitro* e diferenciação celular após 14 e 21 dias.⁷³

2.4.2 Gelatina

A gelatina (G) é uma polipeptídeo solúvel em água que apresenta características como excelente biocompatibilidade, não imunogênica, biodegradável e possui boa disponibilidade comercial a baixos custos em comparação ao colágeno.^{74,75} Sua obtenção ocorre através da

hidrólise parcial do colágeno nativo, que é a proteína estrutural mais abundante encontrada na pele, tendões, cartilagens e ossos de animais vivos.⁷⁶

Existem dois tipos de gelatina obtidas através de processos de hidrólise distintos: a gelatina tipo A (processo ácido), que apresenta ponto isoelétrico em 9 e tipo B (processo básico), com ponto isoelétrico 5. Na hidrólise, grupos amida da aspargina e glutamina na molécula de colágeno tipo I são hidrolisados a grupos carboxilas e resultam em grupos residuais aspartato e glutamato na molécula de gelatina.⁷⁷

Por serem obtidas de métodos diferentes, ambas apresentam diferenças em sua composição de aminoácidos, padrões de polipeptídios, turbidez, resistência e rigidez da gelatina e propriedades de espumar.⁷⁸ Além disso, gelatina obtida de porcos ou bovinos têm sido estudados na área de engenharia de tecidos devido à similaridade estrutural humana, enquanto os provenientes de peixes apresentam algumas diferenças em suas repetição que estão em menor quantidade. Possuem menor temperatura de fusão, baixa temperatura de gelificação, menor estabilidade térmica e maior viscosidade. A estrutura da gelatina (Figura 10) é apresentada abaixo.

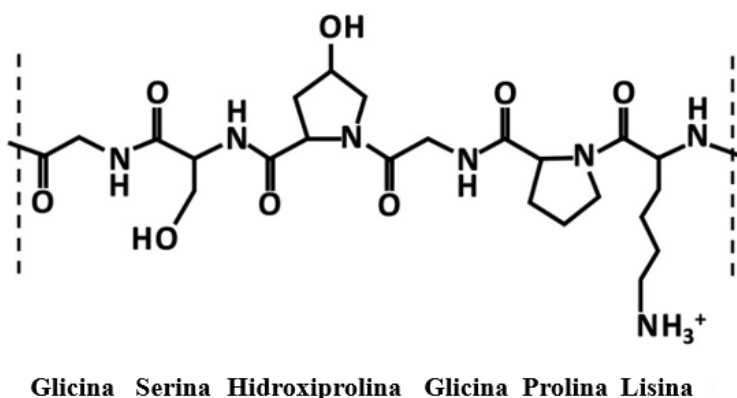


Figura 13. Estrutura química de um fragmento da cadeia alfa da gelatina.⁷⁹

Diversos trabalhos utilizam a gelatina por sua similiaridade ao colágeno (componente da matriz extracelular), baixa toxicidade e alta hidrofiliçidade, o que é essencial e uma alternativa aos polímeros sintéticos, os quais geralmente são hidrofóbicos. Arcabouços de PLGA puro e PBAT/Gelatina foram obtidos com um dispositivo de eletrofiação. Este material quando adicionado de gelatina diminuiu o ângulo de contato de $102 \pm 6,7^\circ$ do PLA para $31 \pm 4,8^\circ$, aumentando sua hidrofiliçidade e por consequencia melhorando a adesão e crescimento celular.⁸⁰ Compósitos de gelatina e β -tricálcio fosfato em solução aquosa, foram produzidos em uma bioimpressora 3D no estudo de Jeong e colaboradores⁸¹, o compósito com gelatina/ β -

tricálcio (60/40 m/m %) apresentou força de compressão similar ao osso esponjoso, como boa atividade celular, bem como induziu a formação óssea sem respostas inflamatórias.

2.4.3 Hidroxiapatita

Vários materiais cerâmicos têm sido utilizados na área de engenharia óssea, sendo a hidroxiapatita sintética, um material inorgânico, que vêm sendo amplamente estudado devido à similaridade com o mineral constituinte do osso natural.⁸² A parte mineral do osso, é composta por componentes de fosfato de cálcio, na qual majoritariamente se encontra na forma de hidroxiapatita (65-75%). Além disso, apresenta como características fundamentais, a biocompatibilidade, bioatividade, além de ser osteocondutivo (capacidade de servir de arcabouço para a migração de células ósseas), osteoindutivo (capacidade de induzir a célula mesenquimal, a se diferenciar em uma célula formadora de osso, um osteoblasto).^{20,83} A hidroxiapatita (H) é um material cerâmico de fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e possui estequiometria exata de Ca/P de 1,67. A estrutura da hidroxiapatita é mostrada na Figura 11.

A estabilidade das fases de fosfato de cálcio são dependentes da presença do meio em que são utilizados. Na temperatura corporal de 37 °C, apenas duas fases são estáveis, o fosfato de dicalcio dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), e a hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], que ocorrem em pHs ácidos menores que 4,2 e maiores que 4,2 respectivamente.²⁰ A hidroxiapatita é utilizada como implante de varias formas, granular⁸⁴, microesferas⁸⁵, porosas^{84,86}. Uma aplicação muito utilizada é o revestimento de implantes metálicos, melhorando a sua biocompatibilidade⁸⁵. Além disso, a sua utilização promove o crescimento de um novo tecido através do mecanismo de osteocondução, sem apresentar problemas de toxicidade sistêmica ou local, e sem inflamação.

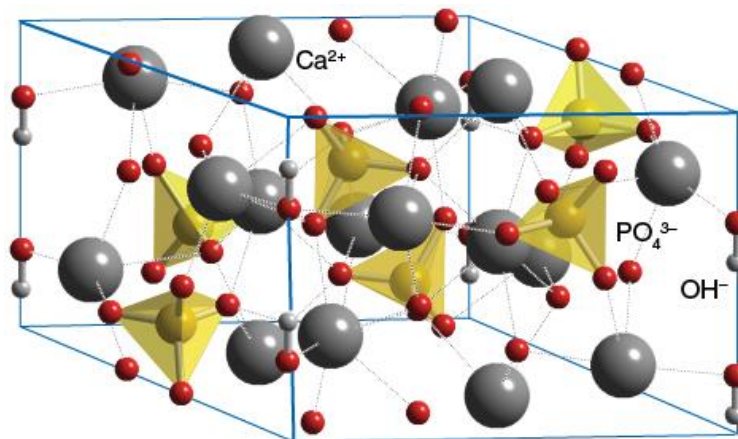


Figura 14. Estrutura da hidroxiapatita.⁸⁷

A biocompatibilidade de alguns polímeros ou metais pode ser melhorada realizando o revestimento destes materiais com hidroxiapatita que apresenta estabilidade química e osteocondutividade.⁸⁸ A literatura tem demonstrado a sua utilização juntamente com polímeros, formando compósitos com propriedades superiores ao polímero e ao material inorgânico puro.

Dubienko realizou a preparação de materiais impressos via impressão FDM de PLLA com várias porcentagens de HA na matriz polimérica (12,5, 25 e 50 % m/m de HA no polímero de PLLA).⁵⁶ Isto fez com que as propriedades mecânicas do material 3D como módulo de Young fossem aumentadas de 2468 ± 237 MPa até 8111 ± 714 MPa com o arcabouço de PLLA/H 50/50. Li e colaboradores, modificaram a superfície de um suporte 3D impresso de PLA com ponicina, gelatina e hidroxiapatita via imersão direta. O ensaio de viabilidade de coloração vivo/morto demonstrou a melhora de adesão celular comparado ao PLA. Além disso, houve melhora na atividade enzimática como indicador de osteocondutividade com o ensaio de alcalino fosfatase e melhora na deposição de cálcio nas amostras modificadas através do ensaio corante de alizarina S.⁸⁹ Outro estudo, realizado por Cestari e colaboradores, demonstrou que amostras de PCL impressos contendo bio-HA obtiveram uma melhor resposta na atividade metabólica e proliferação celular quando em comparação ao PCL puro.⁹⁰

2.4.4 Biovidro

Os vidros bioativos são um grupo de materiais biocompatíveis e inorgânicos que são baseados em sílica sintética. A característica de biocompatibilidade se deve ao fato de que o material apresenta a habilidade de fazer ligação com o osso através da formação de uma camada de apatita carbonatada na superfície óssea.²⁴ O primeiro vidro bioativo foi feito por Hench em 1969, sendo estudado no início da década de 70 e aplicado em diversas áreas clínicas como *scaffolds* na engenharia de tecidos, enxerto ósseo, e revestimento de materiais dentários. Este novo material tinha a característica de apresentar uma ligação efetiva com o hospedeiro, diferente dos metais e polímeros inertes que se utilizavam normalmente.⁹¹ Existem vários biovidros que apresentam composições estruturais diferentes, e por consequência, isso influencia as taxas de recuperação óssea e as respostas celulares ao biomaterial utilizado.

O tipo de biovidro mais investigado, chamado Bioglass®45S5, é um silicato bioativo que apresenta em sua mistura a proporção dos componentes de 46,1 % de dióxido de silício SiO₂, 24,4 % de óxido de sódio Na₂O, 26,9 % de óxido de cálcio CaO e 2,6 % de pentóxido de fósforo P₂O₅ em mol.²¹ Ele tem sido utilizado em muitos procedimentos clínicos, incluindo reparo de defeitos ósseos periodontais, reconstrução de defeitos maxilofaciais, cirurgia da coluna vertebral e reposição óssea. Este material provoca a deposição de uma camada de apatita

na sua superfície, e o mecanismo se deve a liberação de íons da sua matriz quando entram em contato com o meio. Além disso, estes íons também participam da regulação da atividade celular no local, como os estímulos osteogênicos das células osteoblásticas ⁹².

O biovidro apresenta uma estrutura 3D (Figura 12) formada por uma rede de SiO₂, na qual o silício é tetracoordenado com o oxigênio, formando uma rede tridimensional tetraédrica, e cada tetraedro é associado com uma ponte de oxigênio. A adição de componentes a SiO₂, como no caso do Bioglass®, modificam a estrutura, os íons constituintes como o Na⁺ e Ca²⁺ induzem a ligação de não ponte entre átomos de oxigênio (NBO's), ou seja, o oxigênio não fica ligado totalmente a dois átomos de silício. ⁹³

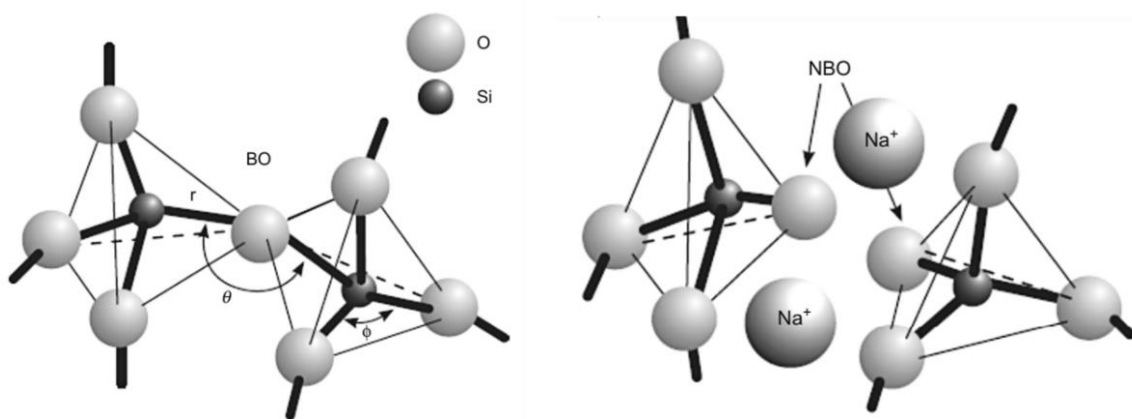
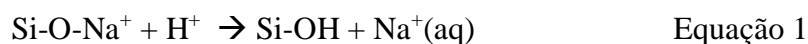


Figura 15. Representação da estrutura de unidades tetraédricas de SiO₄ e a formação de NBO's devido a modificação do modificador de estrutura Na⁺ ¹.

De acordo com Hench⁹⁴ (1971), a formação da camada carbonatada de H é resultado de várias reações que podem ser visualizadas nas equações abaixo, e ocorre na superfície do biovidro no local do implante. Inicialmente há uma troca rápida de íons de H⁺ ou H₃O⁺ com os íons Na⁺ e Ca⁺ provenientes do biovidro. Além disso na superfície do vidro também ocorre a reação de hidrólise dos grupos de sílica, formando Si-OH devido a rápida troca iônica.



O consumo de íons H⁺ aumenta o pH da solução, permitindo que mais Si-OH sejam formados na superfície do biovidro, devido ao ataque a rede de Si-O₂ e dissolução da sílica na forma de Si(OH)₄. Haverá também a reação de condensação e polimerização da camada amorfa rica em SiO₂ na superfície do vidro empobrecido com íons Na⁺ e Ca²⁺. Juntamente com a contínua dissolução da camada de SiO₂, ocorre a migração dos íons Ca²⁺ e (PO₄)³⁻ desta camada

e da solução, formando uma camada de fosfato de cálcio amorfo (ACP) na superfície da camada rica em SiO_2 . A camada ACP ainda incorpora os íons $(\text{OH})^-$ e $(\text{CO}_3)^{2-}$ da solução, formando uma camada de apatita hidroxilcarbonatada (HCA).²⁴ O mecanismo in vitro da ação dos substratos cobertos por biovidro pode ser visualizada abaixo, na figura 13.

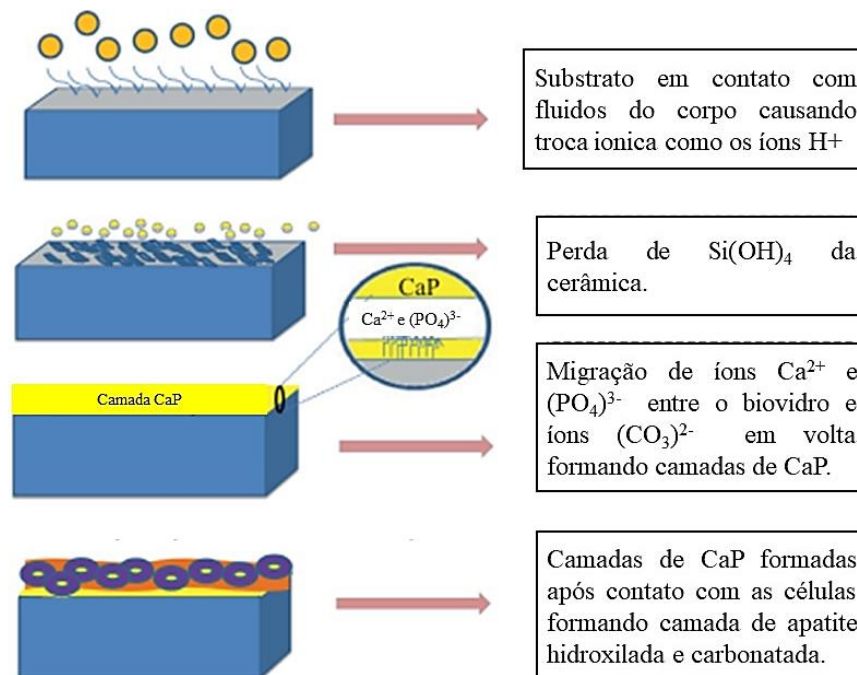


Figura 16. Mecanismo in vitro da ação de substratos cobertos por biovidro em SBF. Adaptado de Ratheesh e colaboradores⁹⁵.

A composição de cada biovidro modifica a regulação celular promovida, uma vez que também modifica a liberação de seus íons, afetando a sua bioatividade e ocasionando uma recuperação específica no tecido adicionado.⁹⁶ Desta maneira, inúmeros estudos com modificações e incorporações de novos íons na estrutura do B são realizadas. Dentre estes, estão o Magnésio⁹⁷, Cobre^{97,98}, Zinco^{97,99} e Nióbio^{100,101}, influenciando os mecanismos de recuperação e o metabolismo do osso.

O metal nióbio e seu íon, têm sido estudado na área biomédica recentemente. Este elemento, apresenta grande abundância de reservas no país, representando 98 % das reservas mundiais¹⁰². René Olivares-Navarrete e colaboradores obtiveram melhores resultados de bioatividade com o recobrimento de superfícies de aço inoxidável com nióbio em comparação com seu metal puro, relatando maior adesão, proliferação e atividade metabólica celular¹⁰³. Além disso, Balbinot e colaboradores¹⁰¹, fabricaram biovidro com incorporação de nióbio na forma de pó e de arcabouços porosos 3D, demonstrando que a incorporação deste metal na matriz do biovidro pelo método sol-gel, aumentou a mineralização localmente após 14 dias em comparação com o biovidro puro. Isto indica que a presença deste composto promove uma

melhor regeneração. Adicionalmente, Balbinot¹⁰⁴ e colaboradores produziram membranas de PBAT/biovidro com nióbio via *casting*, as quais promoveram melhor a proliferação de células mesenquimais MC3T3-E1 e aumentaram a diferenciação celular e a mineralização em comparação com membranas sem biovidro.

2.4.5 Modificação superficial de arcabouços 3D.

A modificação superficial de arcabouços tridimensionais (3D) é um recurso essencial no desenvolvimento de biomateriais para a engenharia de tecidos. Os arcabouços são usados como estruturas de suporte temporárias para crescimento celular e tecidual, e suas propriedades físicas, químicas e biológicas devem ser apropriadas para adesão, proliferação e diferenciação celular. A superfície do arcabouço é crucial para que estas propriedades sejam adquiridas, de modo que polímeros os biodegradáveis normalmente utilizados como PLA, PCL ou PBAT, necessitam de posterior modificação, pois apresentam estruturas hidrofóbicas e apresentam falta de um grupo de reconhecimento celular para interagir com as moléculas bioativas do tecido.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Além disso, a topografia da superfície pode promover ou inibir a adesão e a proliferação celular, dependendo do design escolhido na impressão 3D, técnica que permite a preparação de superfícies com características estruturais definidas e ajustas.

A funcionalização química é um dos métodos mais comuns, onde grupos funcionais são adicionados à superfície do material para melhorar a biocompatibilidade ou introduzir funcionalidades específicas, como a ligação de moléculas bioativas^{108,109}. Dentre os métodos utilizados frequentemente, podemos citar o plasma¹¹⁰ e a radiação ultravioleta UV¹¹¹, modificando seletivamente as propriedades de superfície, como hidrofobicidade, carga e a rugosidade do material. A incorporação de biomoléculas como proteínas, peptídeos ou fatores de crescimento diretamente na superfície do arcabouço é uma abordagem inovadora, sendo a imobilização química por ligações covalentes¹¹¹ ou a adsorção física¹¹², principalmente com métodos de imersão, são os métodos mais comuns para incorporação. A presença de moléculas bioativas pode melhorar a adesão celular e a diferenciação, aumentando assim a velocidade de regeneração e a eficácia do arcabouço. Tabatabaei e colaboradores, modificaram peças 3D de PCL com incorporação de beta tricálcio fosfato, exposição a plasma de N₂/O₂ e posterior imersão em soluções de colágeno. Esta modificação permitiu o aumento da absorção de água e proteínas, bem como melhora significativa na proliferação e adesão celular de osteoblastos, devido as sequências grupos amino presentes na estrutura que promovem ligação com as células.¹¹³

Outro estudo de modificação foi relatado por Chi Minghan e colaboradores, no qual estruturas de PLA 3D foram recobertas de polidopamina (PDA) por meio da técnica de imersão formando um filme que agiu como uma plataforma para a posterior adesão a cargas de nanohidroxiapatita. Estas alterações geraram uma superfície com maior rugosidade, bem como aumentaram a degradabilidade do polímero recoberto em comparação ao puro, por meio da degradação da superfície dos arcos em solução salina tamponada de fosfato (SBF) por 28 dias.⁴⁸ Também foi verificado que compósitos 3D de PLA/PBAT, produzidos por técnica de lixiviação, obtiveram uma melhora na biomineralização utilizando a técnica de imersão em Polidopamina (PDA) e solução tampão SBF, bem como na propriedade osteogênica de células de osteoblastos humanas (MG-63), utilizando os ensaios de MTT para citotoxicidade e vermelho de alizarina S¹¹⁴.

Em resumo, avanços recentes no campo de modificação superficial de arcos 3D permitiram melhorar estruturas de biomateriais inovadores. A modificação superficial de arcos 3D é um campo em desenvolvimento que impacta a chamada funcionalidade dos tratamentos de engenharia de tecido. Deste modo, a medida que as técnicas e novas pesquisas se desenvolvam, os arcos 3D modificados desempenharão um papel maior na área de regeneração óssea, oferecendo inovadores e eficazes tratamentos de reparação de tecido.

3. Objetivos

Desenvolvimento de arcabouços poliméricos funcionais de PBAT produzidos através da técnica de manufatura aditiva, pelo processo de modelagem de deposição fundida (FDM) em uma impressora 3D.

3.1. Objetivos específicos

- Desenvolver arcabouços poliméricos 3D através da técnica de modelagem por deposição fundida utilizando o polímero PBAT;
- Modificar a superfície dos suportes poliméricos 3D por meio da deposição de HA, BA e GE, de maneira isolada (1 componente), ou em conjunto de 2 destes componentes (1:1) ao mesmo tempo e em proporções iguais (1 % m/v);
- Investigar as propriedades morfológicas, estruturais, térmicas e mecânicas dos suportes produzidos, com e sem modificação superficial;
- Avaliar a dispersão dos materiais depositados nas estruturas 3D fabricadas;
- Investigar as propriedades biológicas dos suportes 3D escolhidos mediante ensaios *in vitro* de citotoxicidade, biocompatibilidade, proliferação e diferenciação celular.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

Poli (butileno adipato-*co*-tereftalato) (PBAT) (Ecoflex® F Blend C1200) na forma de *pellets* fornecido pela BASF Corporation (Florham Park, NJ, USA), densidade de $1,27 \text{ g cm}^{-3}$ a 23° C e índice de fluidez $13 \text{ g } 10^{-1} \text{ min}$ ($190^\circ \text{ C} / 2,16 \text{ kg}$). Hidroxiapatita nanopó $\geq 97\%$ tamanho de partícula ($< 200 \text{ nm}$ (BET)) (Sigma Aldrich). Biovidro (B) produzido e fornecido pelo Laboratório de Materiais Dentários (LAMAD-UFRGS) sob patente de número BR 102018006848-2 A2, apresentando composição nas seguintes proporções (em mol): 0,1 a 2 % de pentóxido de nióbio (V) (Nb_2O_5), 20 a 50 % de SiO_2 , 20 a 50 % de CaO , 20 a 35 % de NaO , e 1 a 3 % de P_2O_5 . Gelatina (GE) de pele bovina tipo B (força do gel ~ 225 bloom) (Sigma Aldrich). Meio de cultura essencial mínimo alfa (α -MEM, Thermo Fisher Scientific), soro bovino fetal (Thermo Fisher Scientific), penicilina 1% (Thermo Fisher Scientific), Sulfadamina B 0.4% (Sigma Aldrich), formaldeído 10% (Sigma Aldrich), solução aquosa de vermelho de alizarina S (Sigma Aldrich), ácido tricloroacético 50% (Dinâmica) e ácido acético (Dinâmica).

4.2 Fabricação do suporte polimérico 3D por FDM

Para a fabricação do suporte polimérico 3D de PBAT, inicialmente foi realizada a modelagem computacional da peça utilizando o software CAD (projeto assistido por computador) SolidWorks® 2017. O modelo digital é apresentado na Figura 14 com orientação de camada 0 - 90° .

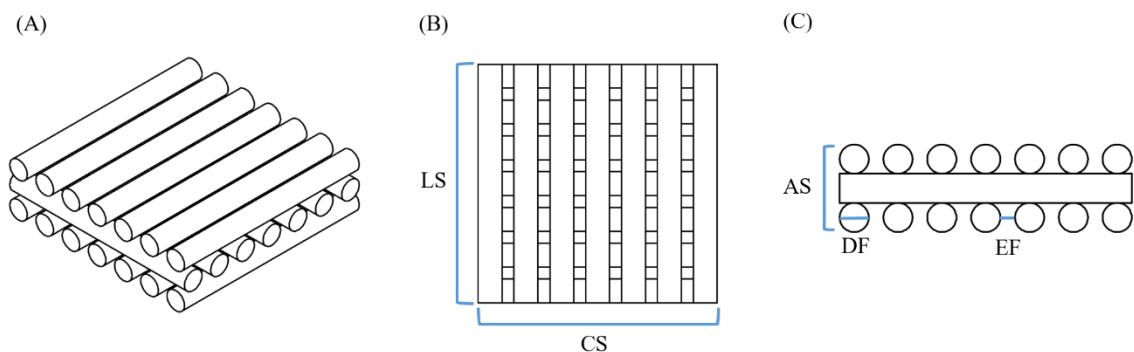


Figura 17. Representação geométrica dos suportes poliméricos 3D: vista isométrica (A), vista superior (B), vista frontal (c).

As dimensões presentes no projeto 3D podem ser visualizadas na Tabela 1. As dimensões empregadas para a para fabricação do modelo CAD foram escolhidas com base na literatura de modo que sua estrutura tridimensional pudesse fornecer os requisitos necessários para área de tecidos óssea, ou seja, obter propriedade mecânica adequada para servir como suporte na área a ser aplicada^{61,115,116}. Além disso é necessário que as estruturas tenham poros com diâmetro de no mínimo 100 μm e porosidade maior que 40-60 % para permitir o crescimento celular, difusão de nutrientes e metabólitos, migração celular bem como permitir uma vascularização do tecido em crescimento¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Tabela 1. Dimensões do modelo CAD dos suportes poliméricos de PBAT.

Geometria do suporte	Tamanho(mm)
Espaçamento entre filamentos depositados (EF)	0,5
Diâmetro dos filamentos depositados (DF)	1
Altura do suporte 3D (AS)	3
Comprimento do suporte 3D (CS)	10
Largura do suporte 3D (LS)	10

Foi projetado em nosso laboratório o modelo CAD como descrito acima, transformado em um documento *.STL para ser impresso na impressora do tipo modelagem por fusão e deposição 3D CL1 (Cliever), utilizando o software de impressão Cliever Studio. As etapas a partir do filamento para produção dos suportes poliméricos 3D pelo método FDM podem ser visualizadas no esquema apresentado na Figura 15.

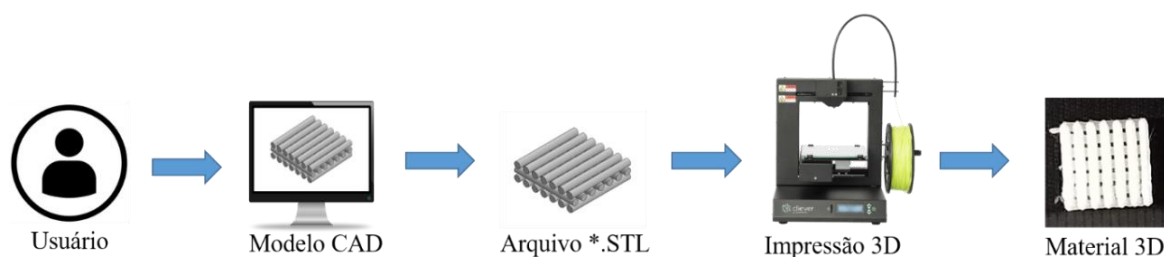


Figura 18. Esquema do processo envolvido na impressão de um material 3D em uma impressora de Modelagem por Fusão e Deposição (FDM).

Para o processo de impressão 3D foram utilizados filamentos produzidos por extrusão utilizando *pellets* de PBAT. Para este processo, foi utilizada uma extrusora dupla rosca co-rotante Haake H-25, modelo Rheomex PTW 16/25, L/D 25, matriz com L/D = 3 (Polylabsystem, Karlsruhe, Alemanha), rotação de 150 rpm a uma taxa de alimentação de 10

g.min⁻¹, mantendo a temperatura de 130-140 °C na zona de alimentação. O filamento foi resfriado em uma banheira de água e tracionado por sistema de rotores para se atingir a espessura de 1,75 mm apropriada para a impressora utilizada.

Durante o processo desenvolvimento da peça impressão 3D, foram realizados inúmeros ensaios na impressão 3D, como demonstrado na Figura 16, que contém peças com diferentes tipos de problemas na impressão em um dos vários testes realizados. Desta maneira, variou-se os parâmetros de impressão 3D disponíveis no software Cliever Studio, como velocidade de impressão, temperaturas de extrusão, espessura entre camadas, entre outros, até se obter um material que apresentasse as melhores condições possíveis de impressão com o polímero PBAT.

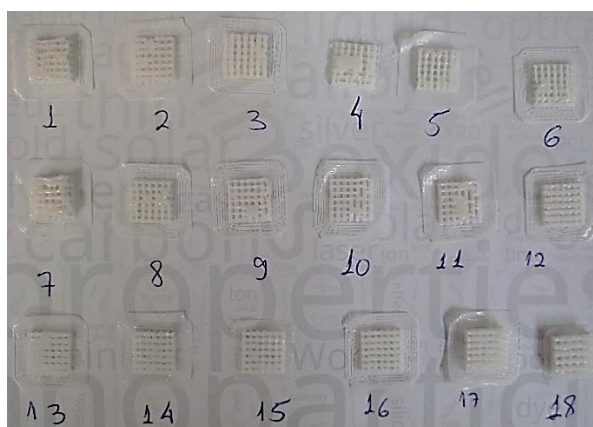


Figura 19. Amostras impressas com problemas em um dos testes realizados para adequação dos parâmetros definidos.

Os parâmetros utilizados na impressão dos suportes neste trabalho podem ser visualizados na Tabela 2. Os parâmetros utilizados foram obtidos em laboratório com a otimização do processamento das peças na impressora Cleaver.

Tabela 2. Parâmetros de impressão dos suportes 3D.

Densidade (%)	1%
Espessura das paredes	1
Diâmetro do bico (mm)	0,3
Altura entre camadas (mm)	0,15
Espessura da base (Camadas)	1
Espessura do topo base (Camadas)	1
Velocidade de impressão (%)	70%
Diâmetro do filamento (mm)	1,75
Temperatura de extrusão (°C)	150
Temperatura da bandeja - 1ª camada (°C)	30
Temperatura da bandeja - demais camadas (°C)	30

4.3 Modificação superficial dos suportes poliméricos 3D

O esquema do processo de modificação superficial dos suportes de PBAT 3D (P) pode ser visualizado na Figura 17. Este processo foi realizado pelo método de revestimento por imersão, por meio da imersão das peças obtidas em soluções aquosas (H_2O deionizada) de gelatina (G), hidroxiapatita (H) e biovidro (B), em concentrações de 10 mg/mL (m/V) de cada componente, sob agitação magnética lenta e temperatura de 50 ° C por 24 h. As concentrações utilizadas para o processo de imersão foram adaptadas da literatura.¹²⁰ A modificação superficial foi classificada de acordo com a quantidade de componentes depositados nos suportes. Os suportes 3D modificados com apenas 1 componente foram denominados de PG, PH e PB. Os suportes modificados com 2 componentes simultaneamente foram denominados PBH, PBG e PHG. Após este procedimento, todas as amostras foram secas em estufa a 50 ° C por 24 h e armazenadas em dessecador.

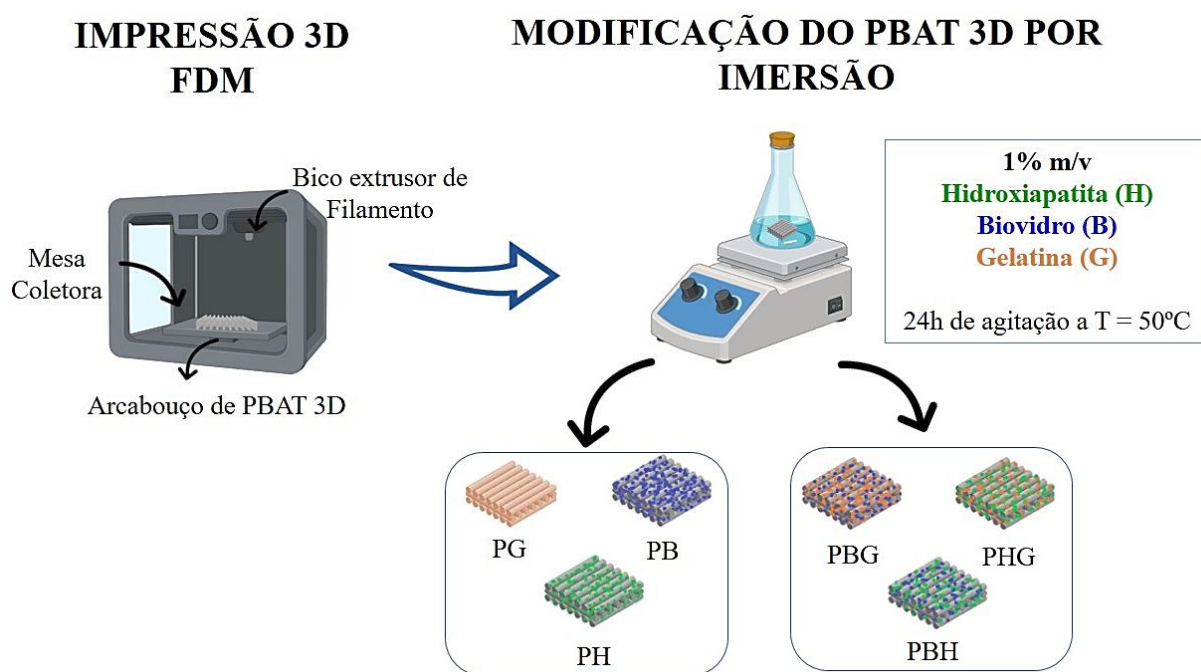


Figura 20. Representação do processo de produção e modificação por imersão dos arcabouços 3D.

4.4 Caracterização dos suportes poliméricos 3D

4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) acoplada a espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS)

A morfologia e composição elementar superficial dos suportes 3D foram avaliadas por MEV-FEG acoplado a EDS em um microscópio *FEI Inspect F50* equipado com espectrômetro (e com detector de desvio de silício (SDD, Apollo SDD, EDAX® products). Imagens dos suportes 3D foram obtidas no modo de elétrons secundários (SE), operando com um potencial de aceleração de feixe de 20 keV. As amostras foram previamente metalizadas com ouro. As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Para avaliar e comprovar a deposição superficial de hidroxiapatita, biovidro e gelatina nos suportes realizou-se o mapeamento elementar dos suportes. As dimensões do suporte 3D de PBAT puro foram obtidas a partir da análise das imagens de MEV-FEG no programa computacional Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) por meio da realização de 100 medidas, com objetivo de comparar as dimensões do suporte 3D obtido por FDM com as dimensões projetadas no modelo 3D desenvolvido no SolidWorks.

4.4.2 Microtomografia computadorizada de raios X (μ CT)

A morfologia interna e externa tridimensional dos suportes 3D foram analisadas em um microtomógrafo de raios X (μ CT) (SMX-90 CT; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) disponível no Laboratório de Materiais Dentários (LAMAD) da Faculdade de Odontologia da UFRGS. O scanner operou a 60 kV e 100 mA (0,5 mm Al filter), gerando imagens com 1024 x 1024 pixels de resolução e 4800 números de visualizações. Para cada amostra, a avaliação foi feita de 300 a 400 fatias. A partir desta análise, a porosidade (%) dos suportes foi avaliada com o auxílio do software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Também foi realizada a reconstrução 3D das amostras utilizando o software ImageJ/Fiji, e o uso do plugin *weka segmentation*, uma ferramenta de classificação e segmentação de imagens com aprendizado de máquina de algoritmos (*machine learning*).

4.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As características estruturais dos suportes 3D foram avaliadas por FTIR em um espectrômetro FT-IR Spectrum One Spectrometer da Perkin Elmer Instruments, equipado com o acessório de refletância atenuada total universal (UATR), no intervalo de comprimento de onda de 4000 a 530 cm^{-1} utilizando 4 varreduras. A análise foi realizada no Laboratório de Espectroscopia da Escola Politécnica/PUCRS.

4.4.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos suportes 3D foi avaliada por análise termogravimétrica em um equipamento de modelo SDT Q600 (TA Instruments). Foi realizada uma rampa de aquecimento no intervalo de temperaturas de 25 a 600°C a uma taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹, sob atmosfera inerte de nitrogênio (100 mL/min). A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT) do Instituto de Química da UFRGS.

Na literatura, a análise termogravimétrica é utilizada para estimar a quantidade de substância imobilizada por adsorção na superfície de matrizes poliméricas e inorgânicas¹²¹⁻¹²⁵. Além disso, vale ressaltar que a perda de massa até 200°C não foi contabilizada uma vez que nessa região ocorre perda de água (umidade) das amostras.

4.4.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise do comportamento térmico das amostras foi realizada por DSC em calorímetro (TA Instruments, modelo Q20, EUA). A medição foi realizada no modo calor/resfriamento/aquecimento a uma taxa de 10°C.min⁻¹, sendo aquecida da temperatura ambiente até 200°C com uma isoterma de 5 min, resfriada até -50°C com uma isoterma de 5 min, e aquecido novamente até 200°C, sob atmosfera de nitrogênio (vazão de 50 mL.min⁻¹). A temperatura de fusão foi determinada na segunda etapa de aquecimento. A cristalinidade das amostras foi calculada usando a seguinte fórmula: $X_c = (\Delta H_m / \Delta H_{m100}) \times 100$, onde, ΔH_{m100} é o calor de fusão teórico do PBAT contendo 100% de fase cristalina (114 J.g⁻¹)¹²⁶. A análise DSC foi realizada no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica do Instituto de Química (UFRGS).

4.4.6 Ensaio mecânico de compressão

O comportamento mecânico dos suportes poliméricos 3D foi avaliado em um ensaio de compressão uniaxial com método adaptado da literatura ¹²⁴, utilizando a Máquina Universal (LLOYD Instruments). As amostras utilizadas apresentavam dimensões de 1 x 1 x 1 cm e foram analisadas em quadruplicatas. Neste ensaio, foram utilizadas uma célula de carga de 5 kN e uma velocidade de compressão de 1 mm.min⁻¹ até uma deformação de 30 % da peça. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Industrial da Escola Politécnica/PUCRS.

4.5 Análises biológicas

Para estas análises foi utilizado células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 (Banco de Células do Rio de Janeiro- Rio Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em Meio de Cultura Dubellco Modificado (α -MEM), suplementado com 1 % de Penicilina e 10 % de Soro Fetal Bovino (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) em estufa a 37°C e 5 % de CO₂ com troca de meio de cultura a cada 2-3 dias. Todos os ensaios biológicos foram realizados no laboratório de materiais dentários (LAMAD) da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

4.5.1 Análise de proliferação celular dos suportes 3D

O ensaio de viabilidade celular por Sulforodamina B (SRB) foi feito com método indireto. Os extratos foram produzidos com as amostras 10 x 10 x 3 mm imersas por 24 h em α -MEM. As amostras utilizadas foram esterilizadas com peróxido de hidrogênio. As células foram semeadas com uma densidade de 5 x 10³ células por poço em placas de 96 poços e tratadas com o meio extraído por 72 h. Após este período, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50 % (Dinâmica, Indaiatúba, São Paulo, Brasil) e coradas com SRB 0,4 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em 1 % de ácido acético. A camada de células foi suspensa em Tris(hidroximetil)aminometano 10 % e realizada a leitura da absorbância em cada poço em um leitor de microplacas a 560 nm (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, USA). Os resultados obtidos foram normalizados para os valores obtidos nos poços onde as células foram tratadas apenas com meio de cultura e a partir disso foram obtidos o valor da porcentagem de células viáveis em cada grupo.

Foi também realizado o ensaio de viabilidade MTT na qual os meios condicionados foram produzidos conforme descrito no ensaio do SRB. As células foram semeadas na mesma concentração em placas de 96 poços e tratadas com os extratos por 68 h. Ao fim deste período,

as células foram lavadas com PBS e uma solução de 0,5 mg.ml⁻¹ de solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi adicionada aos poços. As placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 4 h para que as células metabolizem o MTT e para que o período de 72 h de análise se complete. Após a incubação, uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizada para dissolver os cristais formados pelo metabolismo do reagente MTT, sendo possível realizar a leitura da absorbância em cada poço em um leitor de microplacas a 570 nm (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, USA). Os resultados obtidos foram normalizados para os valores obtidos nos poços onde as células foram tratadas apenas com meio de cultura (controle) e a partir disso foram obtidos o valor da porcentagem de células viáveis em cada grupo.

4.5.2 Mineralização celular

A coloração com vermelho de alizarina S foi usada para avaliar a diferenciação de células MC3T3-E1. As amostras (10 mm x 10 mm x 3 mm altura; n = 3) foram imersas em meio de cultura por 24 h para extração. As células MC3T3-E1 foram cultivadas em meio osteogênico suplementado com 0,0023 g.mL⁻¹ de β-glicerofosfato e 0,05 mg.mL⁻¹ de L-ascorbato na densidade celular de 2 x 10⁴ em placas de 24 poços. O tratamento foi realizado por 7, 14 e 21 dias. Após cada ponto de tempo, os poços foram lavados com PBS e corados com solução de 2% de vermelho de alizarina S (Sigma Aldrich, St, Louis, E.U.A.) por 20 min. As imagens foram tiradas com uma câmera com ampliação de 5x e analisadas em software de imagem (ImageJ National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). A porcentagem da área mineralizada em cada poço foi calculada considerando a medição da área de intensidade vermelha limiarizada. O mesmo limiar foi usado para todas as imagens. A porcentagem dos nódulos mineralizados em cada poço foi normalizada para os valores encontrados nos poços tratados com α-MEM puro (controle).

4.6 Análise estatística

Análise de variância unidirecional (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram utilizadas para análise de dados de viabilidade celular, propriedades mecânicas e porosidade. Foi utilizado ANOVA bidirecional para a mineralização celular no teste Vermelho de Alizarina S. Todas as análises foram realizadas com significância de 5%.

5. Resultados e discussões

5.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)

5.1.1 FTIR dos reagentes

No espectro de FTIR das nanopartículas de hidroxiapatita (H) (Figura 18), os modos vibracionais típicos dos grupamentos PO_4^{3-} e OH^- podem ser observados. Bandas características de OH podem ser visualizadas nas regiões de 3572 e 632 cm^{-1} , referentes a ligação de hidrogênio O-H em modo tração e liberação de íons OH ligados a hidrogênio, respectivamente. As bandas características de fosfato (PO_4^{3-}) foram observadas nas regiões de 602 e 567 cm^{-1} , correspondente aos modos vibracionais ν_4 do dobramento angular O-P-O dos fosfatos, e em 1087 , 1028 e 962 cm^{-1} , correspondente ao estiramento ν_1 relacionado às ligações P-O dos fosfatos de cálcio.¹²⁷⁻¹²⁹

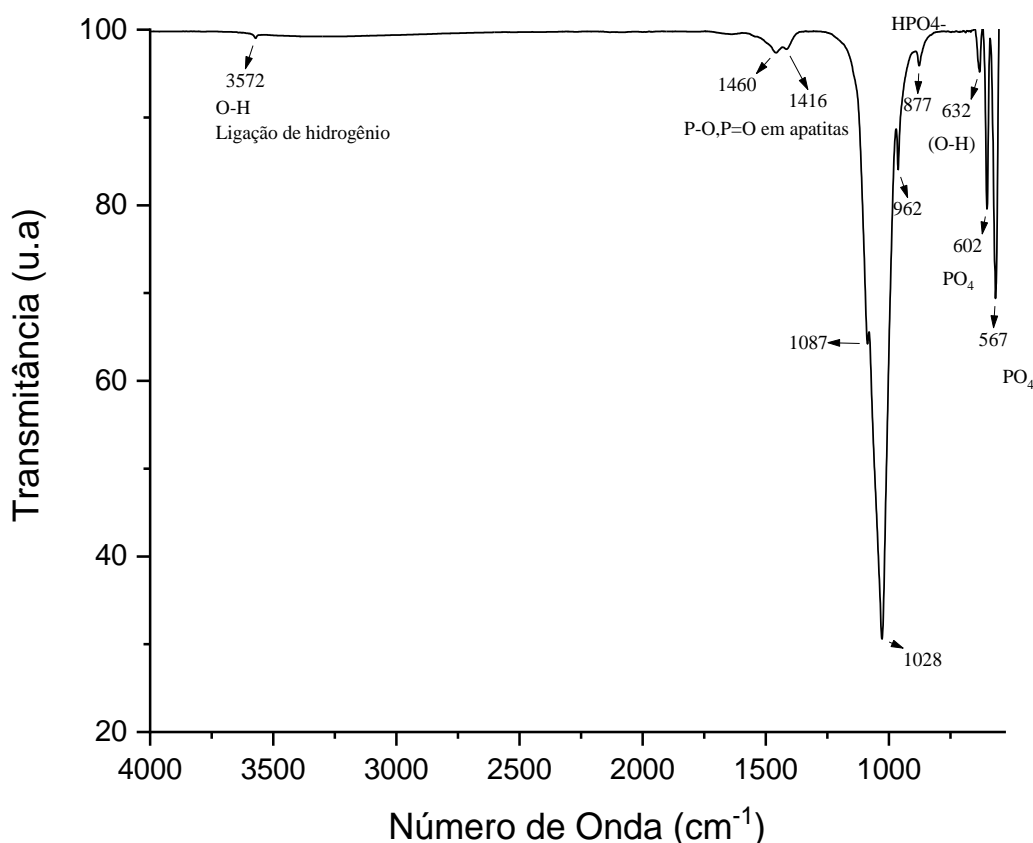


Figura 21. Espectro de FTIR-ATR das nanopartículas de hidroxiapatita (H) utilizadas na modificação superficial dos suportes poliméricos 3D de PBAT.

No espectro FTIR da gelatina (G), Figura 19, as bandas características como ligação amida A (3279 cm^{-1}), estiramento C=O de grupos carboxil (1734 cm^{-1}), estiramento da ligação C-O na amida I (1633 cm^{-1}), ligação N-H e estiramento vibração C-N na amida II (1529 cm^{-1}) e amida III (1233 cm^{-1}) puderam ser visualizadas.^{130,131}

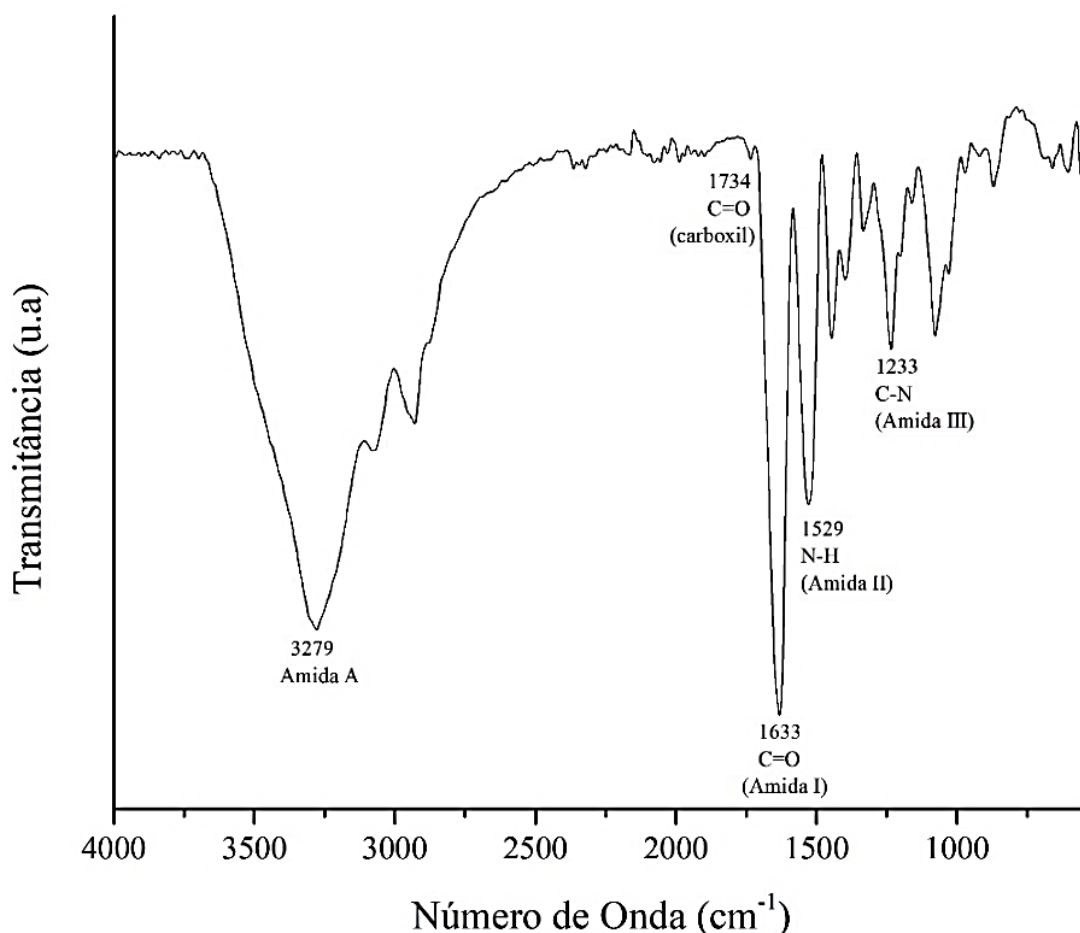


Figura 22. Espectro de FTIR-ATR da gelatina (G) utilizada na modificação superficial dos suportes poliméricos 3D de PBAT.

No espectro de FTIR do biovidro (B) (Figura 20), as bandas características do material foram visualizadas nas regiões de 568 cm^{-1} , correspondente à ligação de ponte Nb-O-Nb, e 849 cm^{-1} , referente ao estiramento colinear Nb-O-Nb.^{132,133} Além disso, pode-se observar as bandas dos grupos fosfatos (PO_4^{3-}) cristalinos nas regiões de 614 e 656 cm^{-1} , e bandas de estiramento da ligação Si-O-Si em SiO_4^{4-} em 710 cm^{-1} , a qual é típica de silicatos cristalinos. Bandas relacionadas majoritariamente ao estiramento de grupos Si-O foram observadas em 1026 e 1068 cm^{-1} , porém na mesma região há uma sobreposição com grupos fosfato PO_4^{3-} . As bandas em 1412 e 1483 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento e impurezas de carbonato CO_3^{2-} ,

provenientes da reação de origem do biovidro. Por fim, as bandas correspondentes aos grupos hidroxilas (O-H), relacionados a água na estrutura do BG, foram encontradas em 3063 e 1616 cm^{-1} .^{134,135}

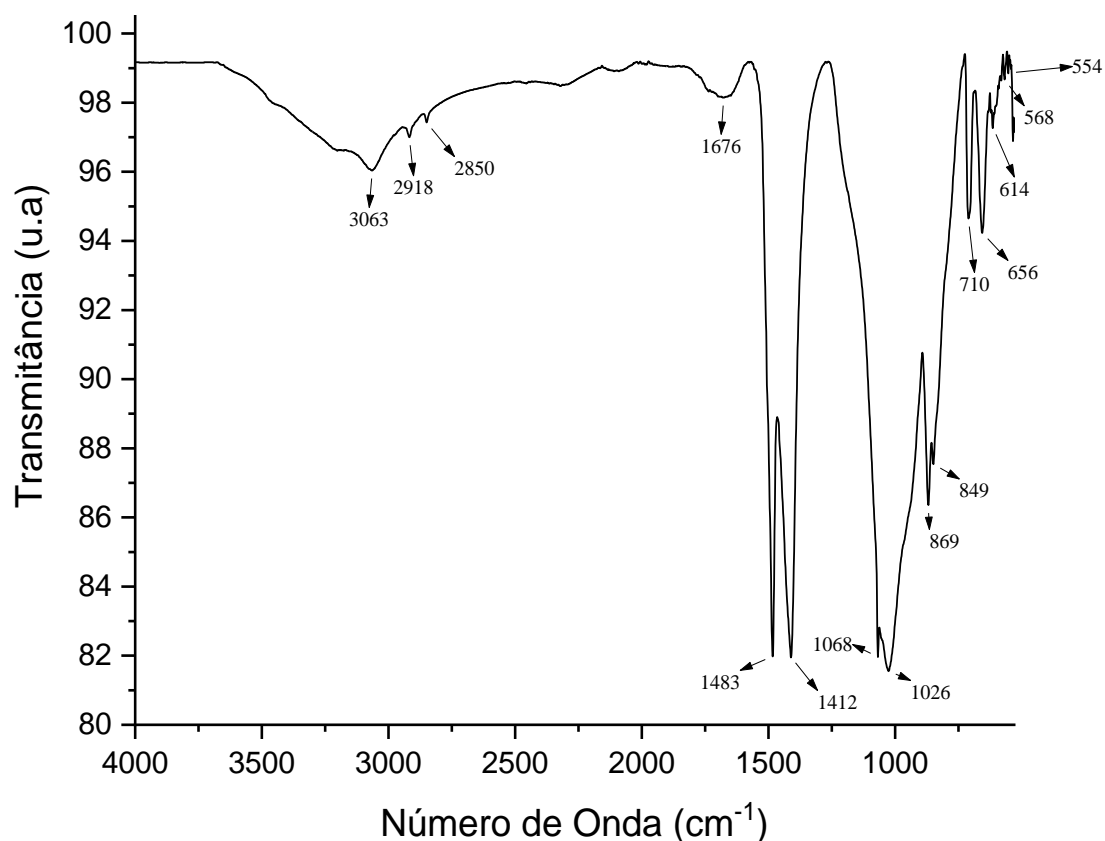


Figura 23. Espectro de FTIR do Biovidro (B) utilizado na modificação superficial dos suportes poliméricos 3D de PBAT.

5.1.2. FTIR dos suportes poliméricos 3D modificados superficialmente com apenas 1 componente

Os espectros de FTIR dos suportes 3D de PH, PB, PG e PBAT são apresentados na Figura 21. No espectro de FTIR do suporte 3D de PBAT é possível observar a presença das bandas características do PBAT não processado, tais como estiramento assimétrico da ligação C-H das frações alifático-aromático em 2951cm^{-1} ; estiramento simétrico C-H em 2869cm^{-1} , aos grupos carbonila C=O da ligação éster em 1710cm^{-1} ; estiramento C-O das ligações éster em 1268cm^{-1} ; estiramento C-O-C das ligações éster em 1247cm^{-1} ; e vibrações dos grupos metilenos ($-\text{CH}_2-$) em 727cm^{-1} .^{126,136,137}

No espectro de FTIR do suporte 3D de PH, foi observada a presença das bandas principais do PBAT em 2959cm^{-1} (C-H), 1715cm^{-1} (C=O) da ligação éster, 1268cm^{-1} (C-O) e

727 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$). As bandas de hidroxila referentes a hidroxiapatita podem ser encontradas em 3573 e 634 cm^{-1} . Além disso, as bandas referentes as ligações P-O do fosfato podem ser visualizadas em 1086, 1019 e 962 cm^{-1} . No entanto, foi observado um pequeno deslocamento das bandas fosfato (PO_4^{3-}) para números de onda mais baixos (562 e 599 cm^{-1}) em relação a hidroxiapatita pura, indicando que há interação entre a hidroxiapatita e o PBAT¹³⁸. Também foi observado deslocamento da banda correspondente ao estiramento C=O do PBAT para números de onda mais alto (1710 para 1716 cm^{-1}), o que pode ser atribuído à formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos OH da hidroxiapatita e a ligação éster C=O do PBAT¹³⁸.

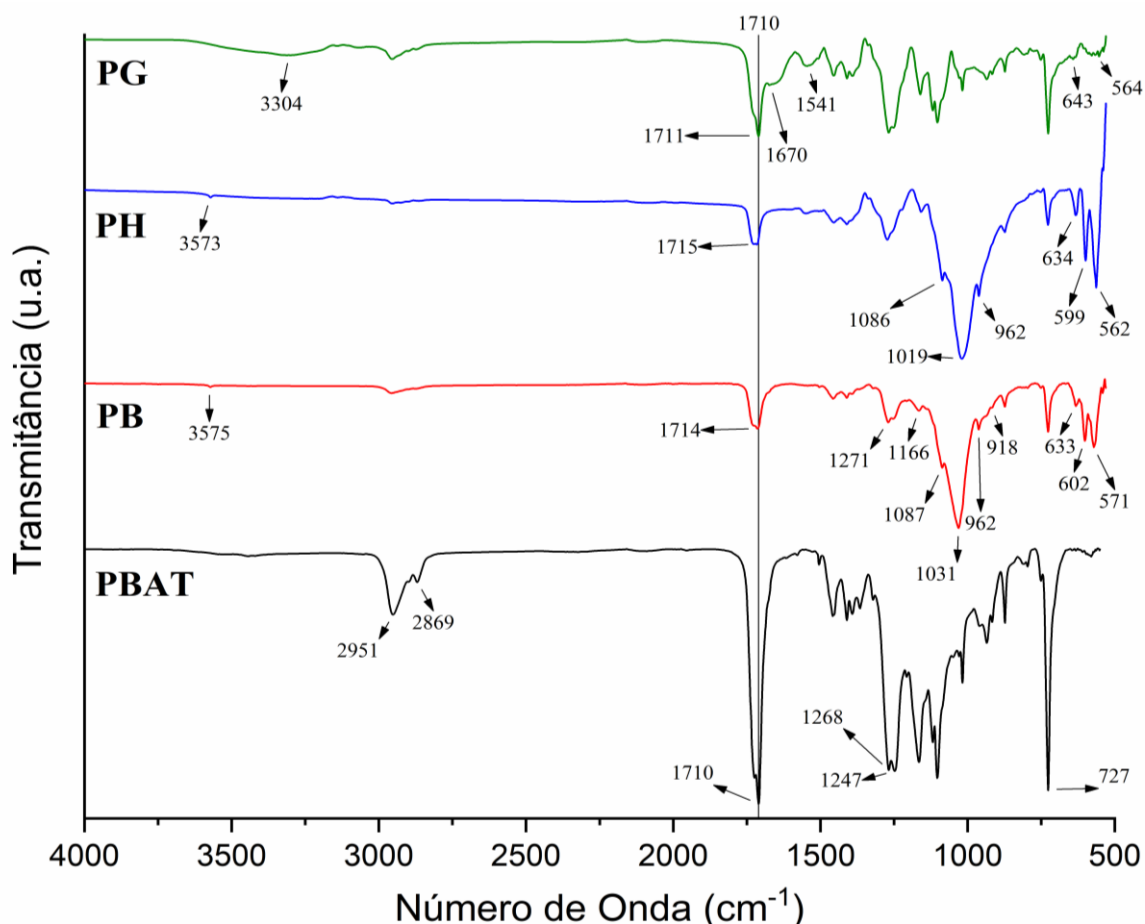


Figura 24. Espectros de FTIR dos suportes poliméricos 3D de PH (azul), PB (vermelho), PG (verde) e PBAT (preto).

No espectro de FTIR dos suportes 3D de PB também foram encontrados as bandas características do PBAT em 2955 e 2874 cm^{-1} (C-H), 1714 cm^{-1} (C=O de éster), 1271 cm^{-1} (C-O), 1253 cm^{-1} (C-O-C) e 726 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$). Essas bandas foram relatadas por Ulbrich em seu trabalho, com bandas em 1150/1270 cm^{-1} relativos as vibrações C-O em polímero de PBAT com 10% de biovidro.²⁶ Bandas características de OH do biovidro foram observadas em 3575 e 633 cm^{-1} . Bandas dos grupos fosfatos (PO_4^{3-}) foram observadas em 571 e 602 cm^{-1} .

referentes à ligação Si-O são visualizadas na região de 1100 a 1000 cm^{-1} .²⁶ As bandas em 1457 e 1410 cm^{-1} são atribuídos ao estiramento e impurezas de carbonato CO_3^{2-} , e em 874 cm^{-1} atribuído a ligação CO_3^{2-} .^{139,140} Por fim, foi observada uma banda em 918 cm^{-1} , característica da ligação colinear Nb-O-Nb.¹⁴¹

No espectro de FTIR dos suportes 3D de PG podem ser visualizadas as bandas características da gelatina em 3304 cm^{-1} correspondente ao estiramento N-H da ligação amida, 1670 cm^{-1} referente ao estiramento C=O (amida I), 1541 cm^{-1} correspondente à ligação N-H (amida II), 643 cm^{-1} referente à ligação N-H fora do plano de amida secundária, e 564 cm^{-1} correspondente à ligação N-H.¹²⁷

A partir da análise dos espectros de FTIR dos suportes 3D com 1 componente isoladamente depositado, pode-se verificar que a modificação superficial alterou as características estruturais dos materiais, demonstrando que a deposição de 1 componente na superfície do suporte 3D de PBAT pelo método de recobrimento por imersão foi efetiva.

5.1.3 FTIR dos suportes poliméricos 3D modificados superficialmente com a combinação de 2 componentes

Os espectros de FTIR dos suportes poliméricos 3D de PHG, PBH, PBG e PBAT são apresentados na Figura 22. PHG apresentou as principais bandas características da matriz, bem como dos 2 componentes depositados. Observou-se a ligação C=O de éster em 1714 cm^{-1} proveniente da matriz de PBAT, enquanto as bandas de OH e dos grupos fosfato da hidroxiapatita foram encontrados em 3571 cm^{-1} , 632 cm^{-1} e 602 cm^{-1} , respectivamente. Já as ligações químicas presentes na gelatina foram observadas em 3288 cm^{-1} , correspondente ao estiramento N-H, em 1644 cm^{-1} , referente estiramento C=O (amida I), e em 1540 cm^{-1} , correspondente à ligação N-H (amida II). O deslocamento observado na banda relativa ao estiramento C=O (1710 cm^{-1} para 1714 cm^{-1}) pode ser atribuída à formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos OH da hidroxiapatita e a ligação C=O de éster do PBAT. Luo Y. e colaboradores obtiveram resultados similares de FTIR ao criar suportes de alginato/gelatina via impressão 3D e deposição de hidroxiapatita por mineralização *in situ*, identificando bandas de P-O do grupo fosfato em 604 cm^{-1} .¹²⁴

No espectro de FTIR do suporte 3D de PBG forma observadas bandas em 1711 cm^{-1} , referente à ligação C=O de éster do PBAT, em 3571 e 634 cm^{-1} , correspondente à banda de OH, em 1018 cm^{-1} , referente à ligação Si-O-Si, e em 634 e 563 cm^{-1} referente aos grupos fosfato. A ligação N-H (amida II) foi observada em 1559 cm^{-1} enquanto o estiramento N-H foi observado em 3288 cm^{-1} .

O suporte 3D de PBH apresentou as principais bandas características da matriz e dos componentes inorgânicos depositados: em 1718 cm^{-1} , correspondente à ligação C=O de éster; em 1268 , 1157 , 634 e 565 cm^{-1} , correspondentes aos grupos fosfatos. No entanto, na região de 1100 a 1000 cm^{-1} há uma sobreposição das ligações Si-O e dos grupos fosfato. O deslocamento da banda referente ao estiramento C=O do PBAT (1710 cm^{-1} para 1718 cm^{-1}) pode ser atribuída à formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos OH da hidroxiapatita e a ligação C=O de éster do PBAT.

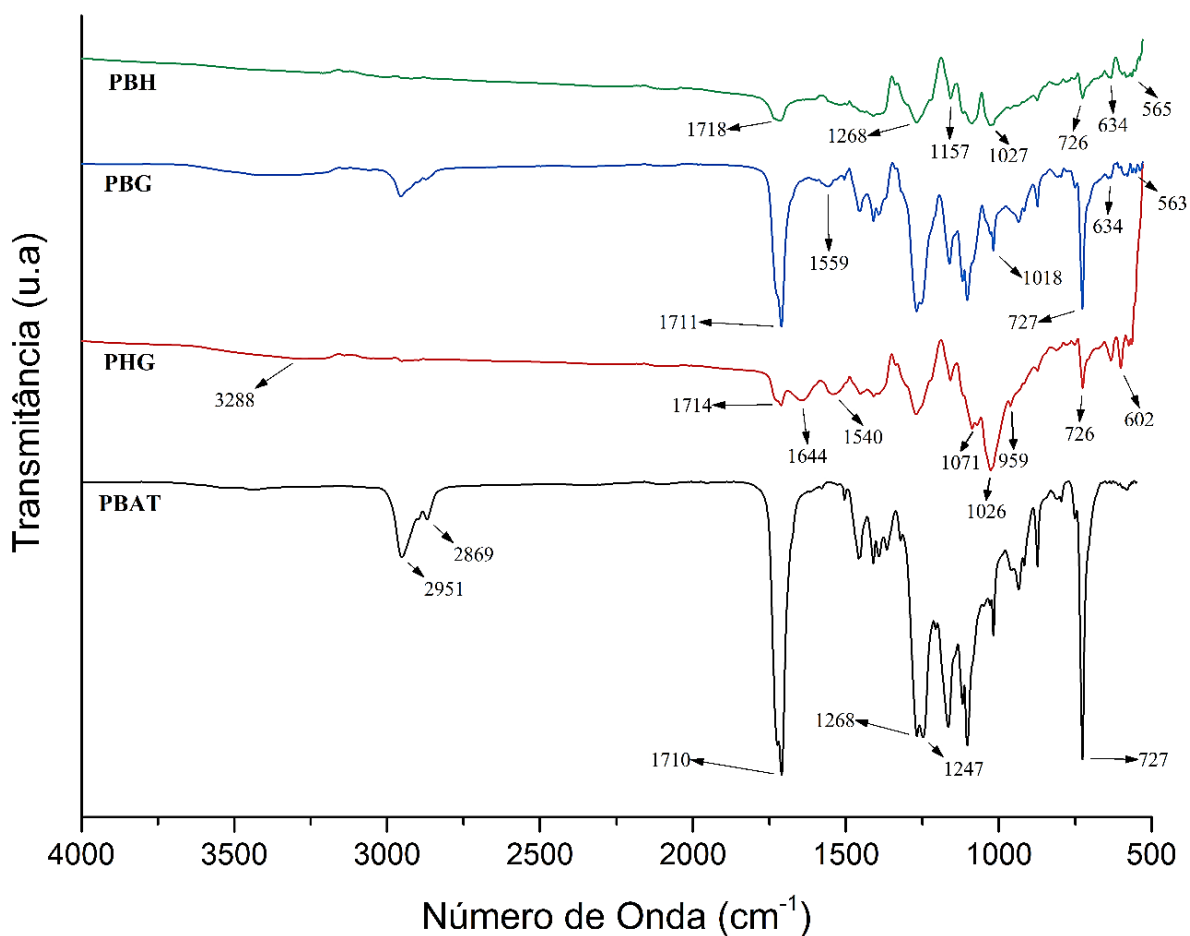


Figura 25. Espectros de FTIR dos suportes poliméricos 3D de PHG (vermelho), PBG (azul), PBH (verde) e PBAT (preto).

A partir da análise dos espectros de FTIR dos suportes 3D com 2 componentes depositados simultaneamente, pode-se verificar as bandas características dos materiais, demonstrando que a deposição de 2 componentes na superfície do suporte 3D de PBAT pelo método recobrimento por imersão foi efetiva, bem demonstrar que a mesma ocorreu por interações físicas entre os componentes utilizados (H, B e G) e a superfície do suporte.

5.2 Características morfológicas dos suportes poliméricos 3d com superfície modificada

5.2.1 MEV-FEG dos reagentes

A Figura 23 apresenta as imagens obtidas por de MEV-FEG dos materiais aplicados (gelatina, biovidro e hidroxiapatita) na modificação superficial da peça de PBAT 3D. Tanto o biovidro quanto a hidroxiapatita demonstraram tendência de aglomeração entre suas partículas.

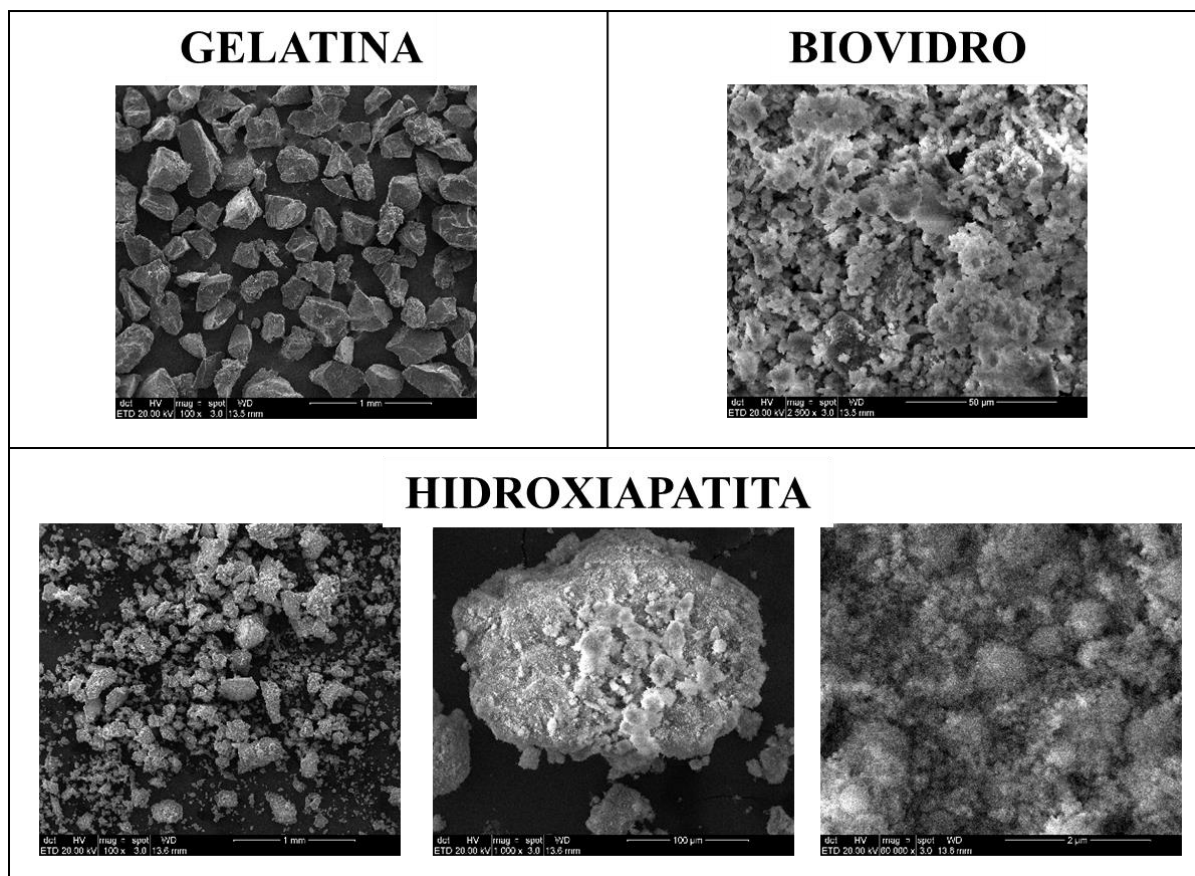


Figura 26. Fotomicrografias obtidas por de MEV-FEG dos materiais aplicados a superfície da peça de PBAT 3D

A Figura 24 apresenta as fotomicrografias de MEV-FEG do suporte 3D de PBAT processado via FDM, o qual apresentou um espaçamento entre filamentos de $505 \pm 77 \mu\text{m}$ (Projetado de $500 \mu\text{m}$) e diâmetro dos filamentos de 683 ± 92 (Projetado de $1000 \mu\text{m}$). As dimensões obtidas para o suporte 3D de PBAT impresso apresentaram valores diferentes daqueles projetadas no software, e isto pode ser atribuído à resolução da impressora utilizada. De acordo com a literatura^{142,143}, é necessário que um biomaterial apresente macroporosidade acima de $100 \mu\text{m}$ para facilitar os processos de osteogênese e angiogênese. Poros

interconectados podem promover uma melhor circulação de fluidos corpóreos, nutrientes e oxigênio, bem como a migração celular. Além disso, a microporosidade pode melhorar a osteoindução de suportes, principalmente por apresentar uma maior área superficial, provendo mais locais de adsorção proteicas e de permeabilidade.^{142,143} Estruturas macroporosas que contenham tamanho de poros iguais a $\approx 500 \mu\text{m}$ são consideradas adequadas para a engenharia de tecido, uma vez que a faixa ideal de tamanho de poros para esta aplicação varia de 300 a 1000 μm . Devido a isto, a arquitetura do *scaffold* é de suma importância, pois deve favorecer a osteogênese permitindo a vascularização e o transporte de nutrientes para o crescimento do tecido.^{144,145}

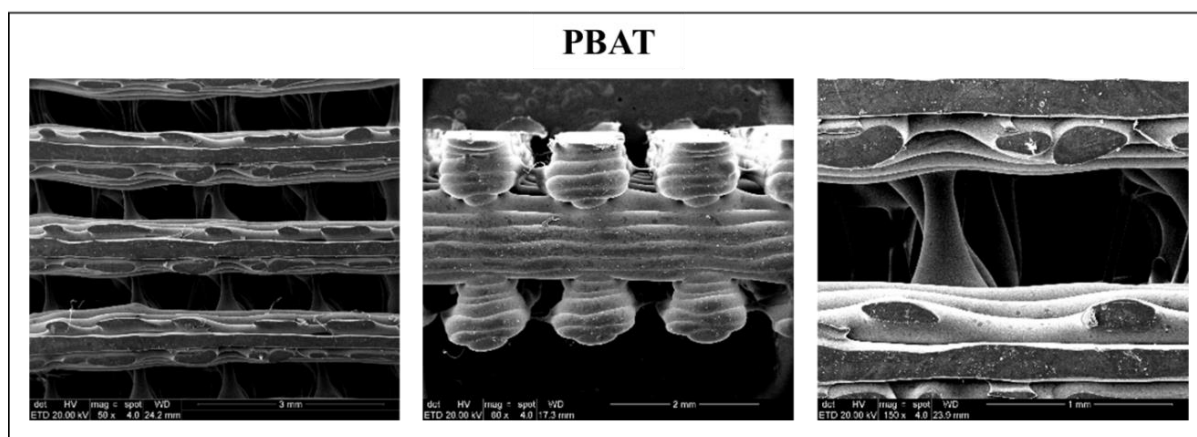


Figura 27. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PBAT puro.

5.2.3 MEV-FEG, mapeamento elementar dos suportes poliméricos 3D com 1 componente e reconstrução 3D de imagens analisadas por μCT .

Na Figura 25 são apresentadas as imagens de MEV-FEG e do mapeamento elementar do suporte 3D de PH. É possível observar que a deposição superficial com hidroxiapatita foi realizada de maneira uniforme ao longo da peça, se mostrando presente também em regiões internas da peça como demonstrado na imagem de mapeamento de todos os componentes atômicos juntos. Yongxiang Luo e colaboradores¹²⁴, depositaram camadas de nanoapatita de maneira uniforme por deposição *in situ* em suportes 3D de alginato/gelatina, a qual foi comprovada devido a presença de picos característicos de Ca e P nos espectros de EDS. Adicionalmente, os autores também observaram que a nanoapatita depositada estimulou a proliferação e diferenciação osteogênica, bem como aumentou a adsorção de proteínas na superfície.

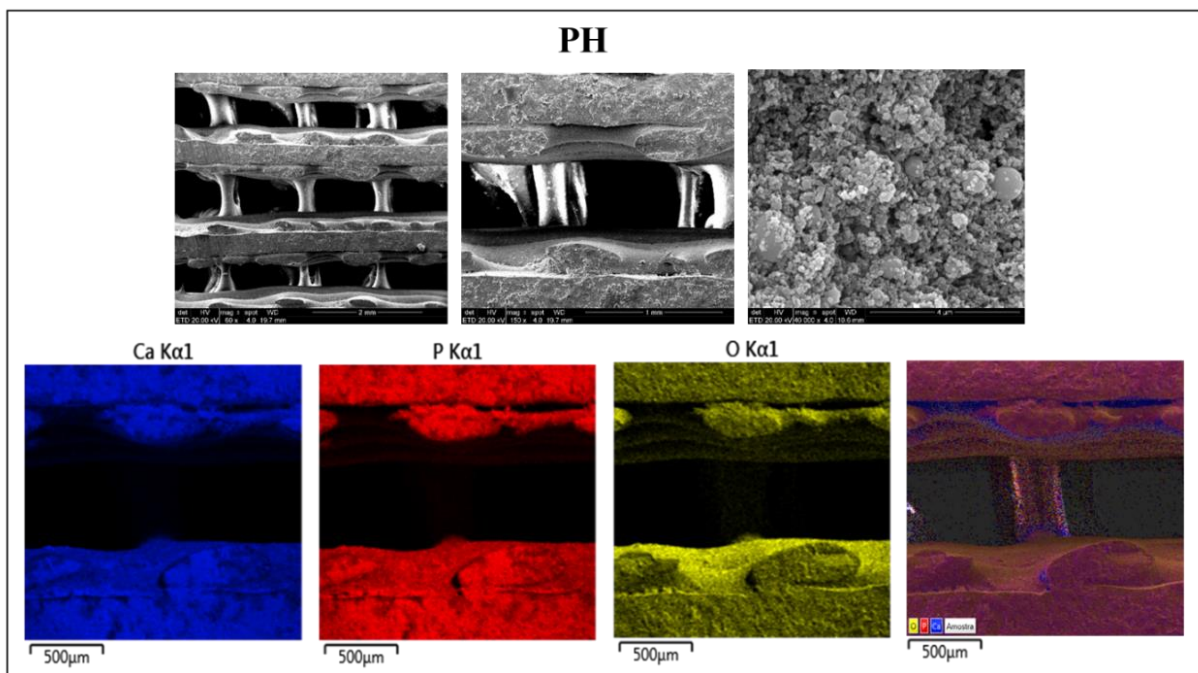


Figura 28. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PH e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos cálcio (azul), fósforo (vermelho) e oxigênio (amarelo).

A deposição de biovidro ativo na superfície do suporte 3D de PB pode ser visualizada na Figura 26. A análise microscópica comprova a deposição deste biomaterial em toda a superfície do suporte, e o mapeamento elementar confirma a presença do biovidro. No entanto, percebe-se que há a presença de aglomerações de biovidro nas camadas que foram criadas via FDM que apresentam irregularidades, já que a peça é feita camada por camada. Fathi A. e colaboradores, fabricaram suportes 3D de compósitos de PCL e biovidro modificado (PCL/BG) via técnica FDM. Os autores utilizaram um biovidro multicomponente dopado de estrôncio (Sr) ou cobalto (Co). A adição dos biovidros levou uma melhora na resistência à compressão dos suportes, bem como aumento a hidrofiliicidade deles (96,6° para PCL puro e 76° para PCL/BG). A porosidade dos suportes obtidos pelos autores foi de 25%. A análise de MEV dos suportes demonstrou que a rugosidade da superfície dos suportes de PCL/BG aumento quando comparado ao suporte de PCL puro, atribuído às inclusões de biovidro projetando-se do polímero, bem como às aglomerações das partículas desse material inorgânico. Além disso, foi observado que os macrocanais do suporte apresentavam o tamanho de $\approx 400 \mu\text{m}$. A análise de EDS detectou os íons de C, Si, Ca, P, O, Sr e Co no suporte de PCL/BG demonstrando a presença dos biovidros modificados e como estes materiais estavam dispersos na superfície. Os resultados dos ensaios *in vitro* realizados revelaram que os suportes 3D baseados em

compósitos de PCL/BG modificados eram biocompatíveis, bem como confirmaram que eles eram substratos adequados para a adesão e proliferação de células de osteosarcoma MG-63.¹⁴⁶ Apesar de o suporte 3D de PCL/BG obtido Fathi e colaboradores apresentar biovidro no bulk (além da superfície), os resultados referentes a morfologia superficial deste suporte apresentam similaridade com os resultados de morfologia superficial obtidos neste trabalho para o suporte polimérico 3D de PB, no qual o PBAT teve sua superfície modificada pela deposição de biovidro por imersão.

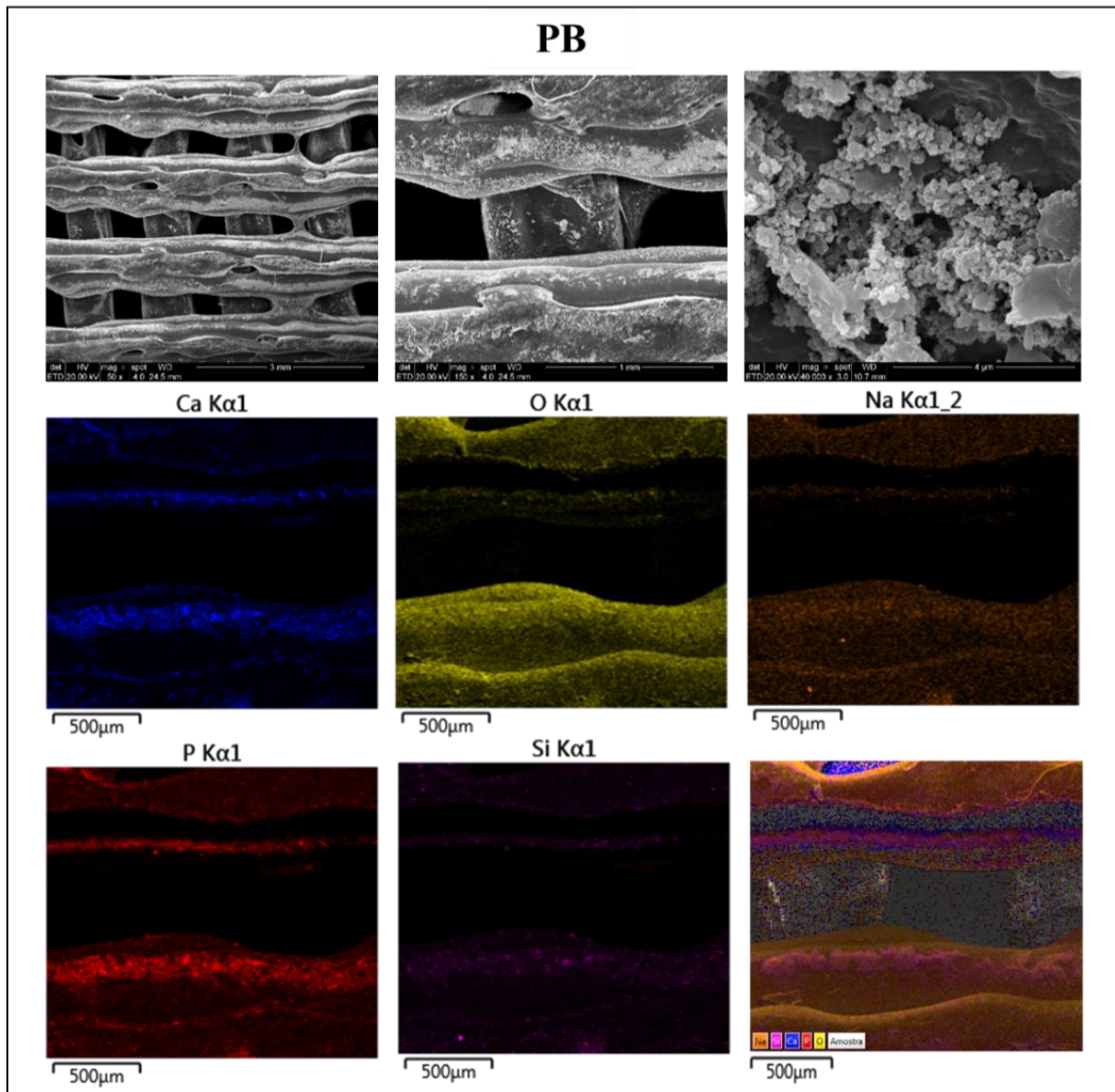


Figura 29. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico de 3D de PB e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos cálcio (azul), fósforo (vermelho), oxigênio (amarelo), sódio (laranja) e silício (rosa).

Na Figura 27 são apresentadas as imagens de MEV-FEG e do mapeamento elementar do suporte 3D de PG. Diferentemente dos suportes de PH e PB, não há presença de aglomeração

de gelatina na superfície do suporte PG. No entanto, uma fina camada de gelatina foi criada na superfície da peça, sendo que seus elementos constituintes, nitrogênio e oxigênio, foram identificados no mapeamento elementar obtido por MEV-FEG/EDS.

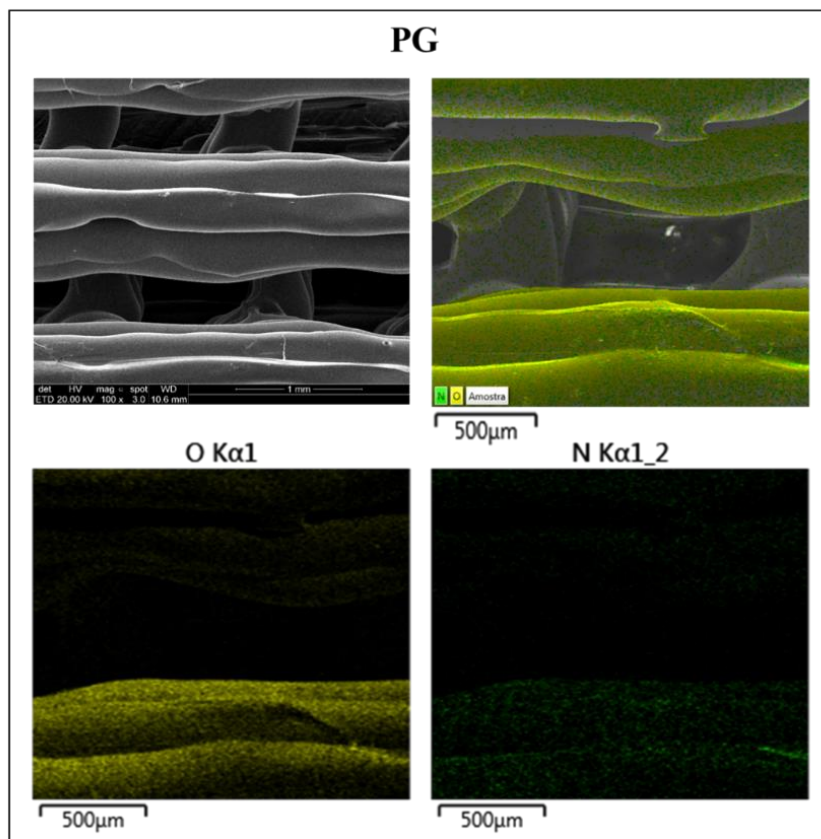


Figura 30. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PG e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos nitrogênio (verde) e oxigênio (amarelo).

O recobrimento com polímeros de origem natural, já foi descrito na literatura, visando a melhora das propriedades dos materiais, tais como hidrofiliabilidade e adesão celular. Isto pode ser visto no trabalho de Young He e colaboradores, no qual suportes 3D de poli(L-lácteo- ϵ -caprolactona) (PLCL) foram recobertos com colágeno tipo I. Os autores observaram uma redução discreta nas propriedades mecânicas, bem como melhora significativa da hidrofiliabilidade em relação ao PLCL puro. Além disso, através da análise de MEV, os autores demonstraram que a deposição superficial do colágeno foi realizada no PLCL, mantendo a sua estrutura praticamente igual ao polímero puro 3D. Também houve a verificação que a deposição não reduziu a porosidade da peça, bem como não afetou a sua estrutura externa. Os resultados do ensaio de MTT demonstraram que a proliferação celular de condrócitos articulares de coelho

foi melhor no suporte modificado em comparação ao suporte puro. Por fim, a morfologia celular destas células após 1 dia de cultura foi melhor para o suporte de PLCL modificado com gelatina³¹.

No presente trabalho, através da análise dos dados por *Weka segmentation* no software FIJI, podemos verificar que a gelatina se deposita majoritariamente na superfície, como se criasse uma película ao redor do PBAT. O biovidro, por sua vez, apesar de ser um componente inorgânico, apresenta hidrofiliçidade, o que faz com que se deposita em maior quantidade na superfície do arcaço, quando comparado à desposição de hidroxiapatita. Essa afinidade com água permitiu que o Biovidro se dispersa-se melhor na solução aquosa. O resultado desta deposição pode ser visualizada na Figura 28, com imagens reconstruídas pelo software ImajeJ.

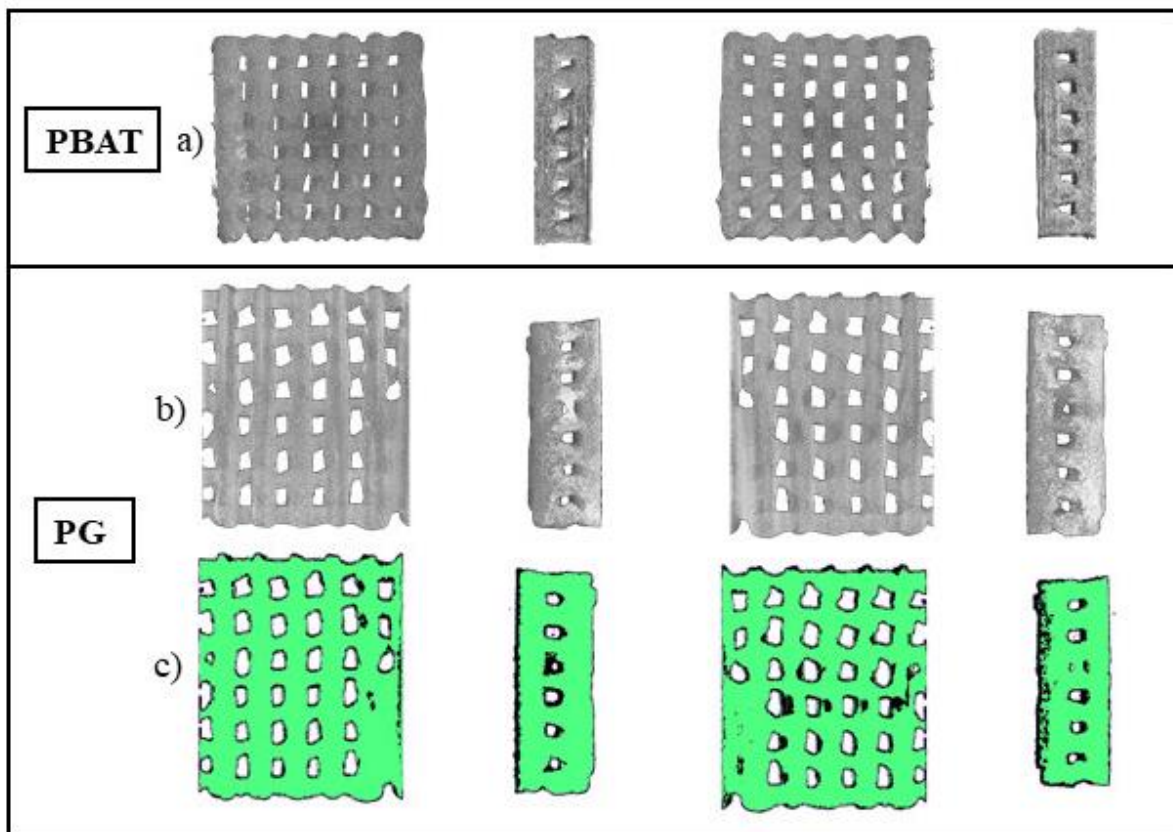


Figura 31. Imagens de reconstrução 3D das amostras, a),b),d) e f), e a segmentação das imagens realizada pelo plugin *weka segmentation* (c,e,g), na qual a cor preta na estrutura identifica o PBAT e o colorido representa os materiais depositados.

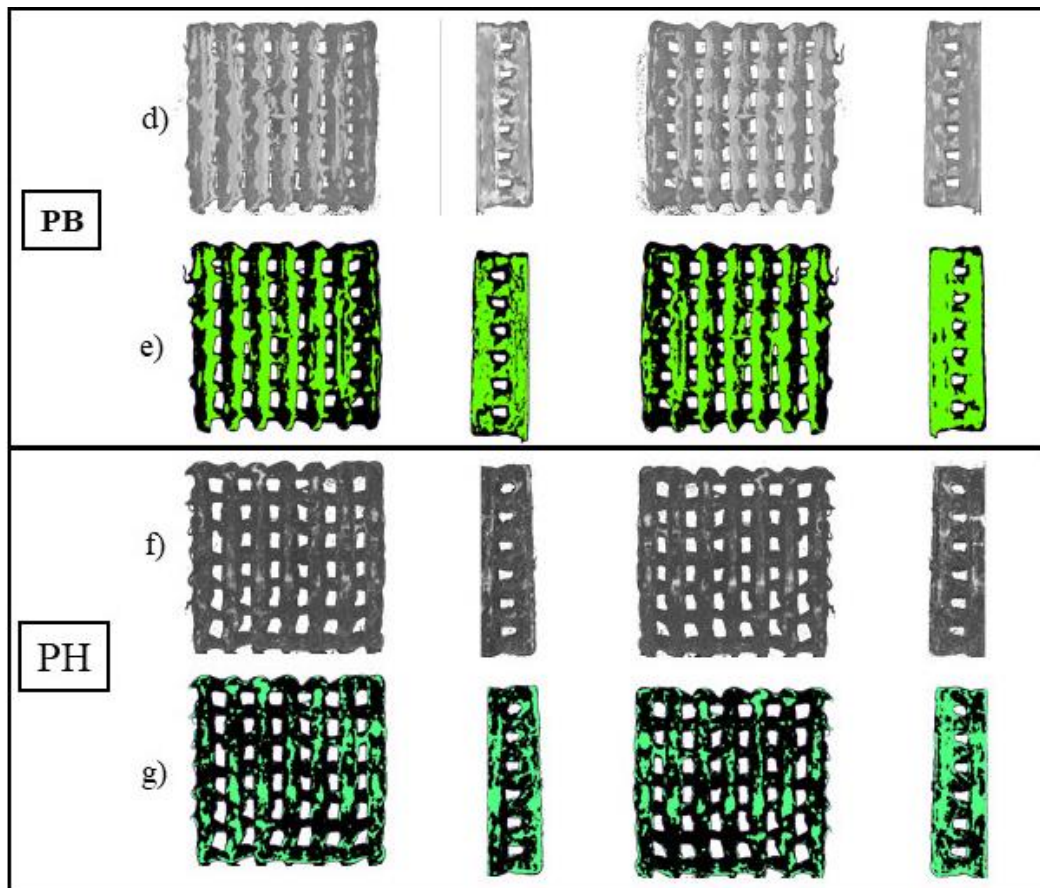


Figura 28. Imagens de reconstrução 3D das amostras, a),b),d) e f), e a segmentação das imagens realizada pelo plugin *weka segmentation* (c,e,g), na qual a cor preta na estrutura identifica o PBAT e o colorido representa os materiais depositados.

5.2.4 MEV-FEG, mapeamento elementar dos suportes poliméricos 3D com 2 componentes e reconstrução 3D de Imagens analisadas por μ CT

Na Figura 29 são apresentadas as imagens de MEV-FEG e do mapeamento elementar da deposição de hidroxiapatita e gelatina no suporte 3D de PHG. A partir destas imagens, observa-se que foi possível realizar uma deposição simultânea dos componentes hidroxiapatita e gelatina, e que a peça apresentou um recobrimento em quase totalidade do suporte de PBAT por ambos os materiais.

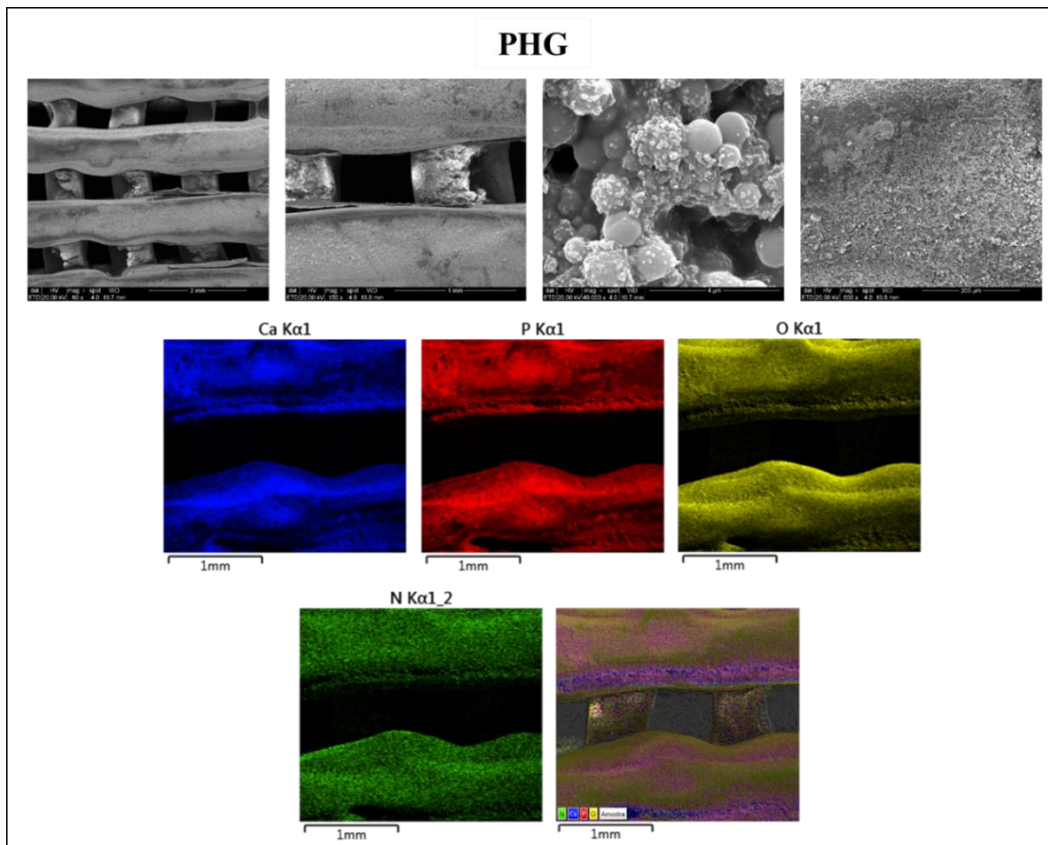


Figura 32. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PHG e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos cálcio (azul), fósforo (vermelho), oxigênio (amarelo) e nitrogênio (verde).

A análise de EDS comprovou essa deposição por meio da identificação dos átomos constituintes de ambas as substâncias de recobrimento (N, Ca, P, O). V. Martin e colaboradores¹⁴⁴ obtiveram resultados similares após a deposição superficial de colágeno, hidrocloreto de minociclina e citrato hidroxiapatita via *dip-coating*. Os autores também observaram que a superfície do suporte 3D apresentou um recobrimento homogêneo de colágeno e de hidrocloreto de minociclina, bem como a presença de pequenas aglomerações hidroxiapatita, sendo que todos esses componentes foram observados no mapeamento elementar obtido por EDS.

Na Figura 30, as imagens mostram a presença de biovidro e gelatina no suporte 3D de PBG. Igualmente ao suporte de PHG, as imagens de MEV de PBG também comprovam que a deposição simultânea de biovidro e gelatina na superfície da peça de PBAT. Entretanto, também se verifica pequenas aglomerações de biovidro entre as camadas formadas durante a confecção da peça. A análise de EDS comprova a deposição e corrobora com as fotomicrografias obtidas por MEV.

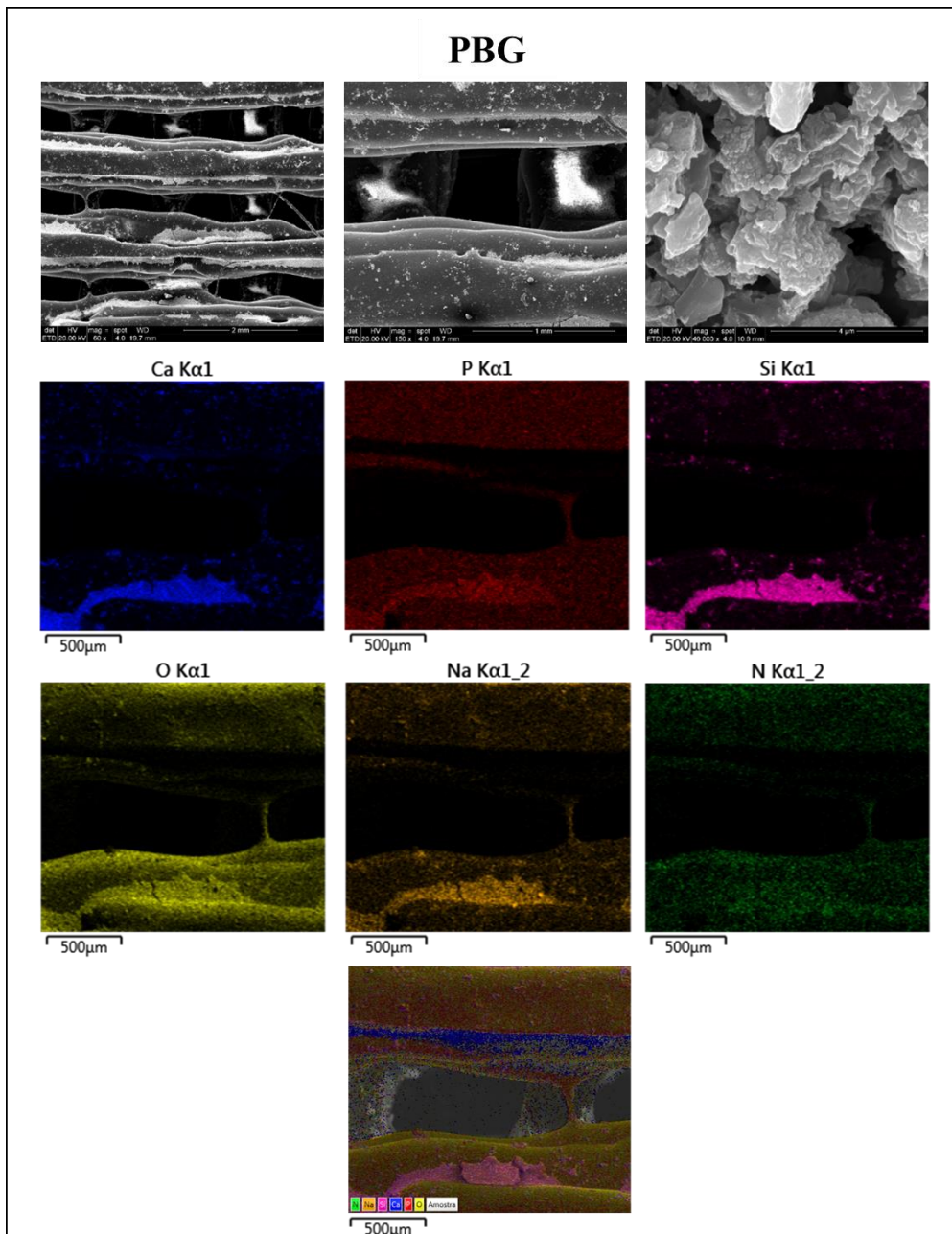


Figura 33. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PBG e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos cálcio (azul), fósforo (vermelho), silício (rosa), oxigênio (amarelo), sódio (laranja) e nitrogênio (verde).

Na Figura 31, pode ser visualizada a presença de biovidro e hidroxiapatita no suporte 3D de PBH, a qual foi comprovada também através do mapeamento elementar. Neste caso, além da deposição simultânea dos materiais verificou-se que o biovidro e a hidroxiapatita estão localizados em toda a superfície da peça 3D, de forma homogênea.

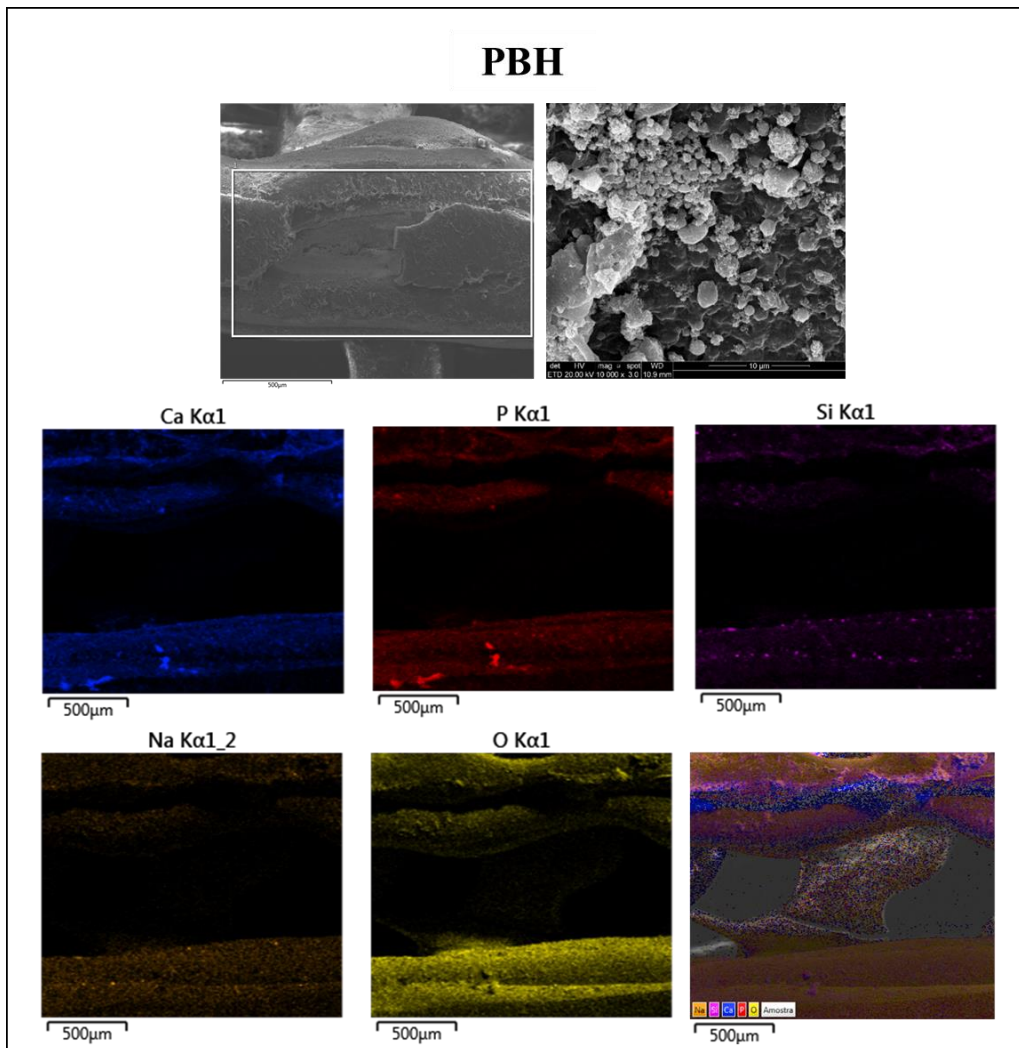


Figura 34. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG do suporte polimérico 3D de PBH e do mapeamento elementar obtidas por EDS, onde são mostrados os elementos Cálcio (Azul), Fósforo (vermelho), Silício (rosa), Sódio (laranja) e Oxigênio (Amarelo).

Para os materiais com 2 componentes, a análise dos dados e imagens dos fatiamentos realizados pela técnica de microtomografia computadorizada também foi realizada. Apesar de não ter sido possível diferenciar qual dos dois materiais estão na superfície do arcaço, ou seja, conseguir separar a estrutura principal impressa de PBAT de outro componente diferente, podemos inferir qual a distribuição destes no material 3D. Na Figura 32, é demonstrado a estrutura 3D, bem como as segmentações realizadas.

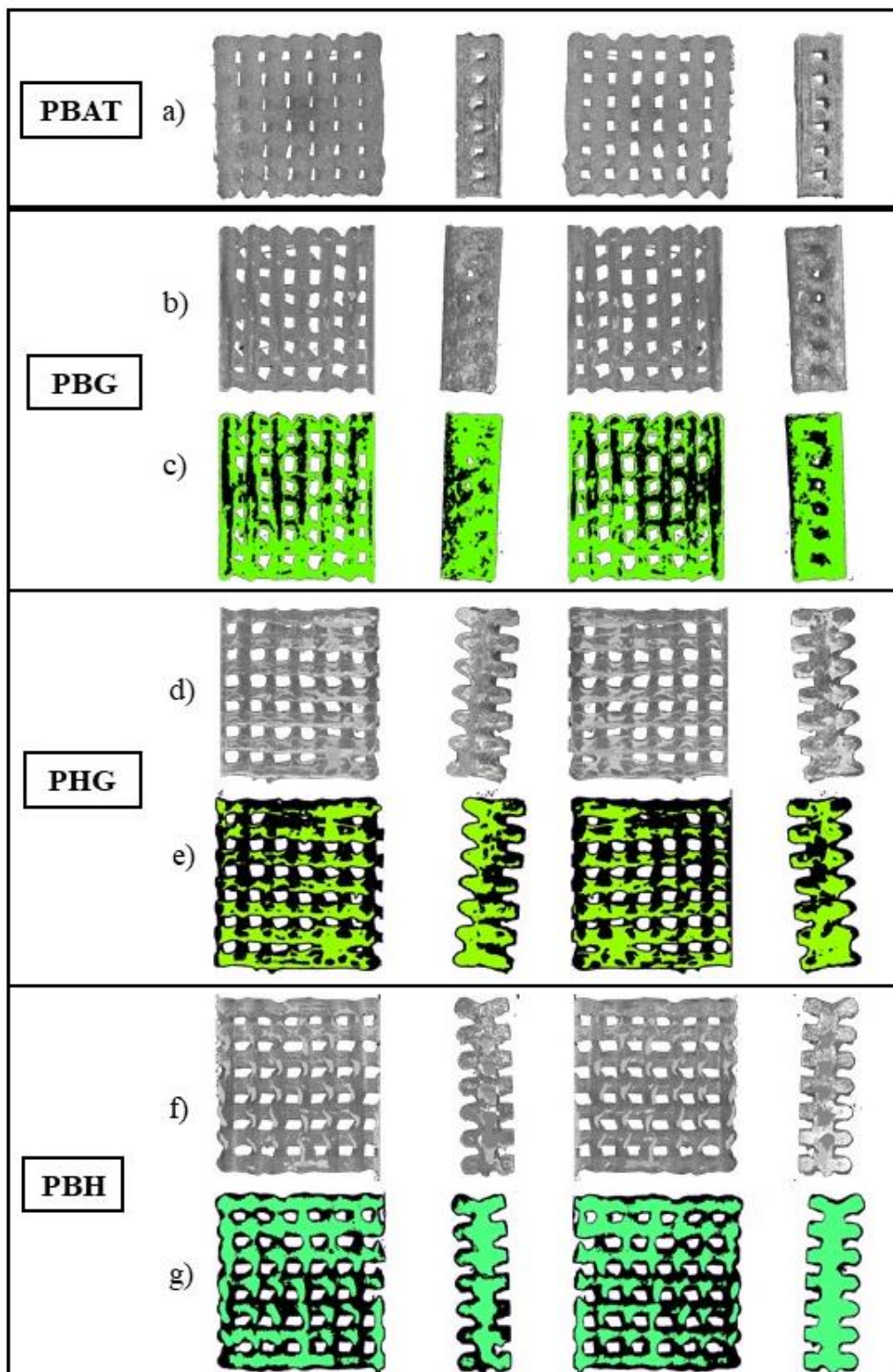


Figura 35. Reconstrução 3D das amostras (a,b,d,f) e a segmentação das imagens realizada pelo plugin weka segmentation (c,e,g), com a cor preta na estrutura representando o PBAT, e o colorido representando os materiais depositados.

5.3 Porosidade dos suportes poliméricos 3D

As porosidades dos suportes poliméricos 3D (Figura 33) foram de 57 ± 6 % (PBAT), 52 ± 2 % (PB), 57 ± 7 % (PH), 60 ± 3 % (PG), 60 ± 1 % (PBH), 63 ± 5 % (PBG) e 61 ± 1 % (PHG), não apresentando diferença significativa entre todos arcaouços. Para fins de comparação, o osso cortical apresenta porosidade de 5 a 15%, enquanto o osso trabecular apresenta um amplo espectro de 40% a 95% ¹⁴⁷.

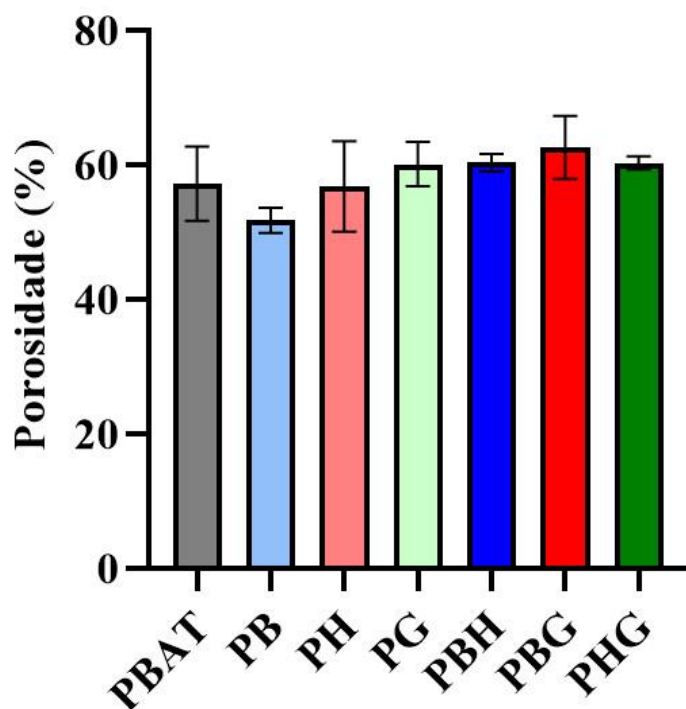


Figura 36. Análise da porosidade quantitativa dos suportes poliméricos 3D pela análise de MicroCT. ANOVA de uma via não apresenta diferença significativa entre as amostras testadas.

No trabalho de Yong He e colaboradores¹⁴⁸, foi avaliado a porosidade de suportes 3D de PLCL modificados por meio do depósito de colágeno tipo I (PLCL/COLI) em sua superfície. Os resultados do estudo demonstraram que porosidade não alterou significativamente após a deposição de colágeno (84.7 ± 1.7 %) em comparação com PLCL puro (86.7 ± 1.8 %). Os autores atribuíram a porosidade mais alta da amostra pura à separação de fases do suporte durante o processo de moldagem realizado pela técnica de formação por derretimento (*melt-forming technique*). Martin e colaboradores realizaram modificações multifuncionais em suportes 3D de PLA pela deposição de colágeno (Col), minociclina (MH) e citrato de hidroxiapatita (cHA) por *dip coating*. As porosidades estimadas para os arcaouços obtidos foram 56,5 % (PLA puro), 55,4 % (PLA-Col-MH) e 57,1% (PLA-Col-MH-cHA).¹⁴⁴

Em geral, o tamanho de poro e porosidade atuam por meio de pelo menos 3 mecanismos. Primeiro, o tamanho de poros e a porosidade regulam o fluxo de fluidos e o transporte de massa

dentro dos poros do suporte. Dependendo do tamanho dos poros e da porosidade do suporte, a permeabilidade do suporte poroso e, portanto, a velocidade do fluido será diferente. Em estudos *in vitro*, altas velocidades de fluxo significa que a célula tem menos tempo para aderir à superfície do suporte. Portanto, a eficiência da semente celular pode diminuir com tamanhos de poros maiores. Em estudos *in vivo*, o transporte de oxigênio, nutrientes e excretas por meio de difusão ocorrerá mais facilmente quando os tamanhos de poros são maiores. Esta pode ser a razão pela qual a maioria dos estudos *in vivo* apresentam melhor resultados para a regeneração do tecido ósseo com o uso de suportes que apresentem tamanhos de poros maiores que 300 μm ^{145,149}.

A partir das imagens obtidas por MEV-FEG e dos resultados de porosidade, é possível verificar que os componentes utilizados foram depositados na superfície do PBAT, deixando mais “livre” os macroporos do suporte, uma vez que a porosidade obtida para os suportes poliméricos 3D modificados apresentou poucas variações nos valores, estão todas muito próximas do valor de porosidade do suporte de PBAT puro.

5.4 Propriedades mecânicas dos suportes poliméricos 3D modificados

Os resultados do ensaio mecânico de compressão demonstraram que todas as amostras modificadas superficialmente apresentaram diferenças significativas no módulo de Young (E) quando comparado com a peça de PBAT pura. A adição de biovidro, hidroxiapatita ou gelatina no arcabouço de PBAT afetou significativamente o módulo de Young em comparação ao PBAT puro ($17 \pm 0,76$ MPa), com PB ($32 \pm 2,1$), PH ($28 \pm 2,9$ MPa) e a peça PG ($27 \pm 2,7$ MPa). A adição de dois compostos simultaneamente, mostrou resultados similares de aumento significativo de módulo de Young ou compressão em comparação ao arcabouço puro. Ao analisarmos a força de compressão, seu valor aumentou de forma significativa quando houve deposição de 1 ou dois componentes, em comparação ao PBAT puro. (Figura 33).

Embora a deposição tenha sido realizada de maneira homogênea, a superfície dos suportes e a porosidade não foi afetada, nota-se que houve uma maior densidade das fibras produzidas (*struts* de 1 mm), sem modificar o “bulk polimérico” e interior da peça. A deposição dos minerais sobre as pequenas falhas da impressão pode ser o fator de contribuição para melhora das propriedades mecânicas. A relação entre a deposição superficial e a modificação na propriedade mecânica, também foi observada por Y. Luo e colaboradores ao realizar ensaios mecânicos em suportes 3D de alginato/gelatina recobertas com nanopartículas de hidroxiapatita. As peças mineralizadas foram modificadas com soluções de concentração de 0,1

M e 0,5 M de Na_2HPO_4 com imersão em CaCl_2 e obtiveram uma pequena melhoria na força de compressão (20.7 ± 4.7 MPa for 0.1 M e 23.9 ± 1.5 MPa para 0.5 M) em comparação com seu padrão com 18.8 ± 5.8 MPa. Já o módulo de Young aumentou significativamente, de 62 ± 5.8 MPa para 119 ± 26 (0,1 M) e 135 ± 36 MPa (0,5 M) com a modificação da superfície¹²⁴.

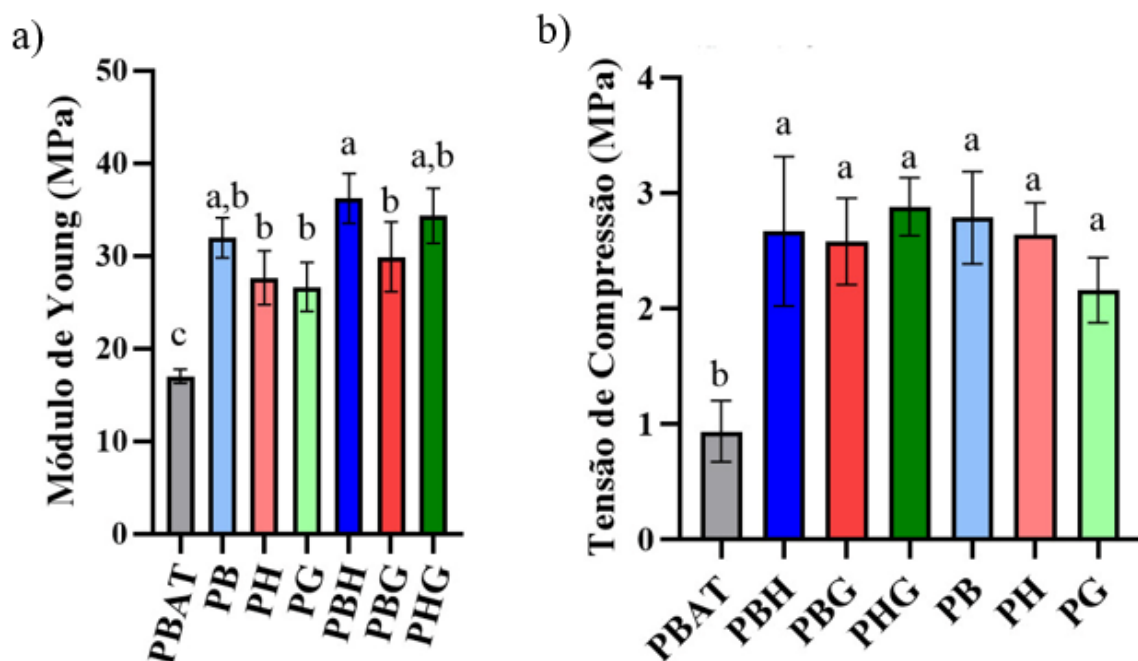


Figura 37. Ensaios das propriedades mecânicas do arcabouço puro de PBAT (P) e dos arcabouços modificados com gelatina (G), hidroxiapatita (H) e biovidro (B). Foram avaliados as propriedades de a) módulo de Young (E), e b) tensão de compressão (σ). Análise estatística ANOVA de uma via: grupos com mesma letra, não apresentam diferença significativa com pós teste de Tukey (valor de $p < 0,05$).

Tabela 3. Propriedades mecânicas dos suportes 3D

Peças 3D	Módulo de Young de compressão (MPa)	Tensão de compressão (MPa)
PBAT	$17 \pm 0,76$	$0,96 \pm 0,23$
PB	$32 \pm 2,1$	$2,75 \pm 0,33$
PH	$28 \pm 2,9$	$2,44 \pm 0,46$
PG	$27 \pm 2,7$	$2,27 \pm 0,32$
PBH	$36 \pm 2,7$	$2,80 \pm 0,59$
PBG	$30 \pm 3,8$	$2,51 \pm 0,33$
PHG	$34 \pm 2,9$	$2,89 \pm 0,21$

5.5 Estabilidade térmica

5.5.1 Estabilidade térmica dos reagentes puros

A estabilidade térmica dos suportes poliméricos 3D modificados, PBAT puro e dos materiais reagentes puros (gelatina, biovidro e hidroxiapatita) foi avaliada por análise termogravimétrica. As curvas TG/DTG dos reagentes puros são apresentadas na Figura 35. A amostra de biovidro (Fig.35 c) apresentou 3 estágios de degradação, sendo que no primeiro ($\approx 6\%$ no intervalo de 48 a 149 °C e $T_{\text{máx}} = 98$ °C) e segundo estágio de degradação ($\approx 6\%$ no intervalo de 149 a 219 °C e $T_{\text{máx}} = 178$ °C) ocorrem perdas de massa relacionadas à água livre adsorvida na estrutura, condensação de grupos silanóis presentes na superfície das partículas e grupos etanóis.¹⁵⁰ O terceiro estágio de degradação ($\approx 4\%$ no intervalo de 276 a 448 °C e $T_{\text{máx}} = 380$ °C) pode ser associado a decomposição de grupos alcóxi e nitratos residuais da reação do biovidro¹⁵¹. Além disso, a derivada indica um quarto estágio, observado entre 500 a 664 °C com $T_{\text{máx}} = 626$ °C e que está relacionado à fase de cristalização do vidro.¹⁵¹⁻¹⁵³

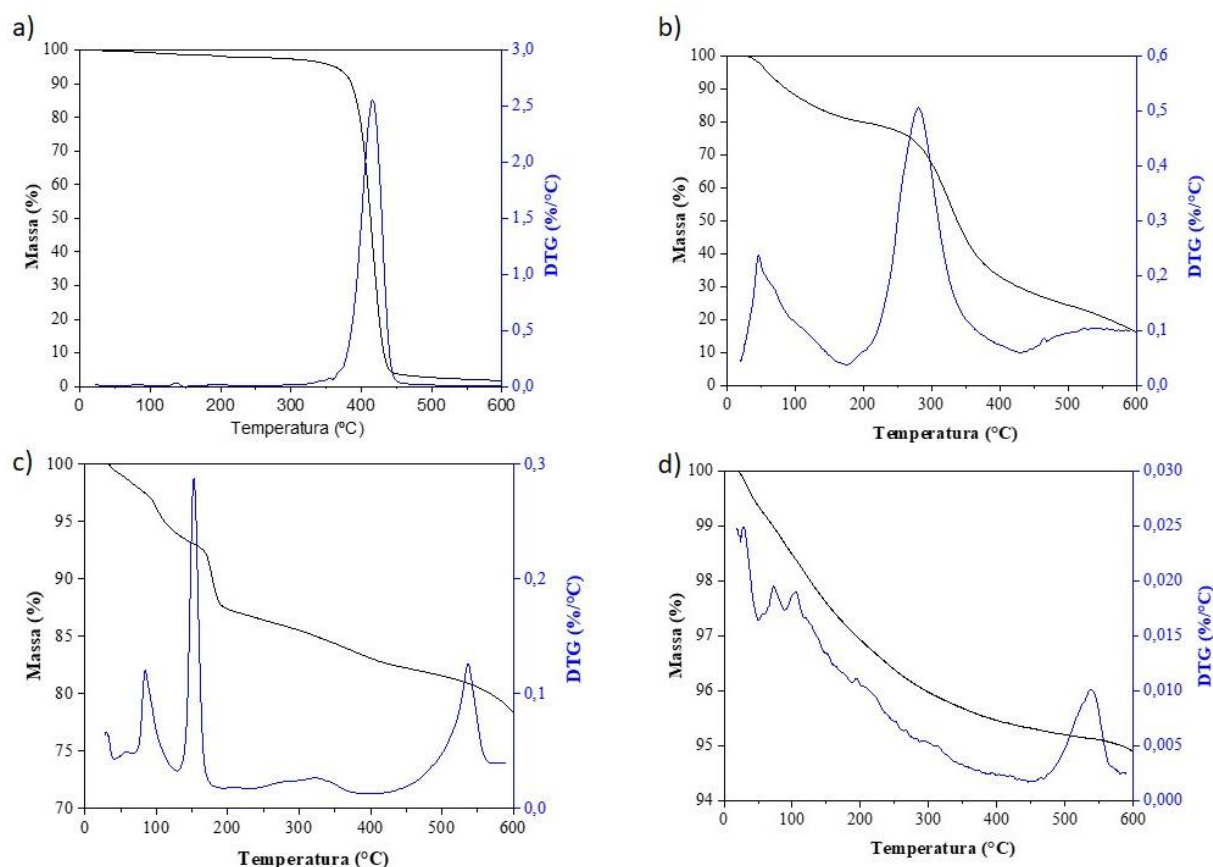


Figura 38. Curvas TG e DTG dos reagentes utilizados no processo de modificação superficial: (a) PBAT; (b) gelatina; (c) biovidro e (d) hidroxiapatita.

A gelatina foi avaliada na forma de pó, para o qual foram observados dois estágios de degradação em sua DTG (Fig. 35b). No primeiro estágio ocorre uma perda de massa ($\approx 12\%$ no intervalo de 23 a 200 °C e $T_{m\acute{a}x} = 54$ °C) relacionada à perda de água adsorvida na estrutura.¹⁵⁴ Já no segundo estágio de degradação ocorre uma perda de massa ($\approx 55\%$ no intervalo de 200 a 500 °C e $T_{m\acute{a}x} = 327$ °C) relacionada à degradação das cadeias proteicas e à ruptura das ligações peptídicas da gelatina.^{154,155} Ran e colaboradores¹⁵⁶, analisaram por TGA compósitos de gelatina e hidroxiapatita com diferentes concentrações também observaram um comportamento de degradação térmica similar, com dois estágios de degradação, entre 25-200 °C relacionado a água adsorvida e em 250-400 ° relacionado a degradação polimérica da gelatina.

Na amostra de hidroxiapatita (Fig. 35d) observou-se 2 estágios de degradação, sendo o primeiro estágio ($\approx 4,7\%$ no intervalo de 23 a 500 °C) referente a perda de massa de água presente na superfície da hidroxiapatita. Além disso, o segundo estágio de degradação ($\approx 0,8\%$ no intervalo de 530 a 700 °C e $T_{m\acute{a}x} = 627$ °C) que pode ser indicio da evaporação, dessorção e queima de solvente residual etanol de uma fabricação das nanoparículas.¹⁵⁷ O suporte de PBAT (Fig. 35d) apresentou somente um estágio de degradação de 333 °C a 460 °C com temperatura máxima de degradação ($T_{m\acute{a}x}$) em 416 °C e perda de massa de $\approx 94\%$, corroborando com trabalhos prévios da literatura.^{158,159}

5.5.2 Estabilidade térmica dos suportes poliméricos 3D modificados

As curvas TG/DTG relativas aos suportes 3D modificados são apresentadas na Figura 36. Não foram observadas alterações na estabilidade térmica do PBAT 3D após a deposição de 1 ou 2 componentes. Juntamente com os resultados obtidos pelo MEV-FEG, EDS e FTIR, isto pode ser uma indicação de que há apenas uma pequena camada de material depositado nos arcabouços por impressão 3D.

Na literatura, a análise termogravimétrica é utilizada em alguns trabalhos para a estimativa da substância imobilizada por adsorção, na superfície de matrizes poliméricas e inorgânicas.¹²¹⁻¹²⁴ Desta forma, foi possível estimar a quantidade de massa depositada na superfície da peça comparando ao PBAT 3D, utilizando os valores de resíduo no final da corrida de TGA. A quantidade de material depositado pode influenciar na formação de camadas de apatita quando testada *in vivo* e também permitir uma maior adesão de proteínas. Isto foi relatado por Yongxiang Luo e colaboradores¹²⁴ que produziram arcabouços 3D a partir de biotintas de alginato/gelatina em diferentes concentrações (0,1 M e 0,5 M de Na_2HPO_4). Os autores realizaram a deposição de hidroxiapatita na superfície dos *scaffolds* por *dip coating*,

utilizando uma solução 1 M de CaCl_2 , ou seja, a formação dessa camada ocorreu por biomineralização *in vitro*. Os autores estimaram por TGA que as quantidades de hidroxiapatita no *scaffolds* mineralizados foram de 2,8% (0,1 M) e 8,5% (0,5 M). Ambos as deposições obtiveram melhores resultados de adsorção de proteína nos suportes em comparação ao suporte puro, porém maiores quantidades de proteínas foram adsorvidas utilizando a solução de 0,5 M pois se obteve uma maior quantidade de mineral depositado.

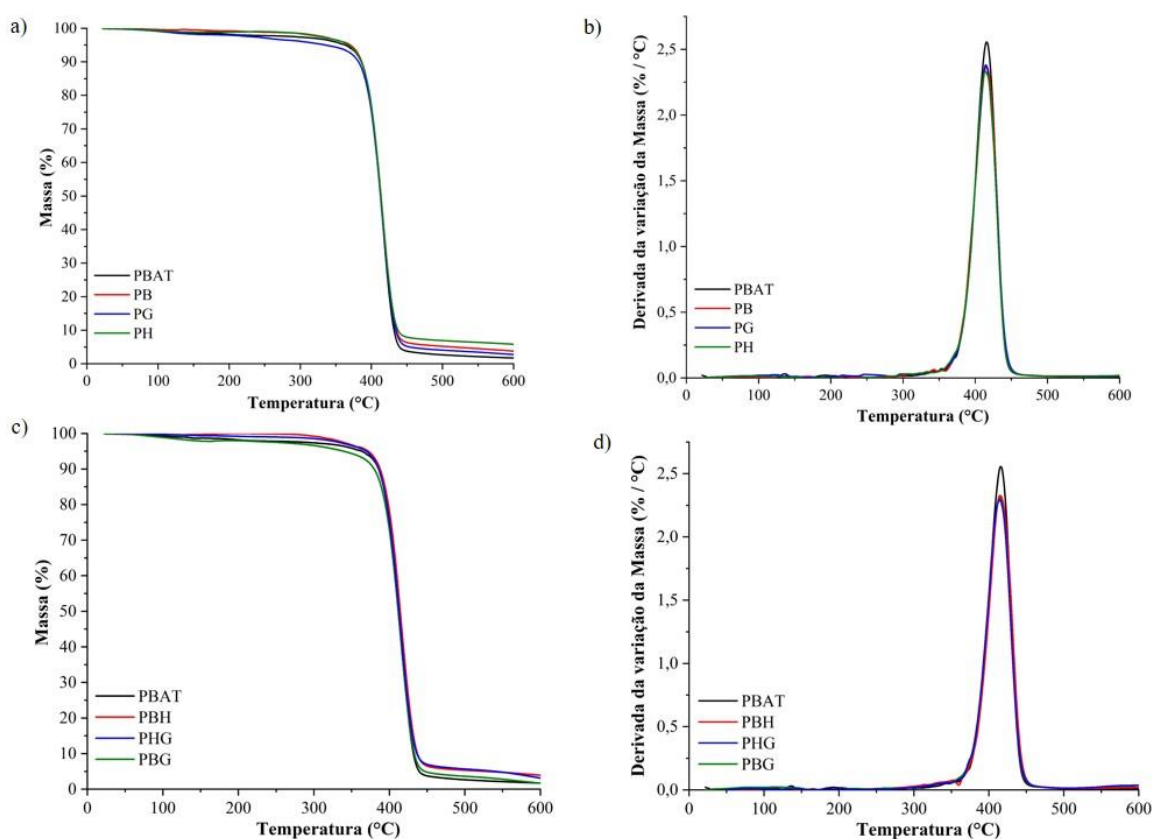


Figura 39. Curvas de TG e DTG dos arcabouços 3D modificados de PBAT: (a, b) PB, PH e PG - 1 componente; (c, d) PBG, PBH e PHG - 2 componentes.

O depósito de 2 componentes simultaneamente ocasionou a variação da massa de 1,7 para 3,8 % (m/m). A deposição de 2 componentes pode ser sinérgica e de efeito positivo em ensaios celulares. V. Martin e colaboradores³⁰, produziram suportes multifuncionais de PLA com deposição superficial de colágeno (Col), minociclina (MH) e citrato de hidroxiapatita. Eles concluíram que houve um aumento da afinidade celular nos suportes de PLA-Col-MH-cHA scaffolds em comparação ao PLA-Col. Isto foi demonstrado pela morfologia celular mais alongada, maior número de ligações extracelulares e aumento da atividade cito fisiológica. De maneira geral, os resultados apresentados, indicam que não houve mudanças na decomposição

de todas as amostras, indicando que a deposição nas amostras, não alterou a estabilidade térmica das amostras.

A análise de DSC e seus resultados são mostradas nas Figuras 37 e 38 e na Tabela 4. Os principais eventos térmicos e transições foram pouco afetados pela deposição dos componentes. A temperatura de fusão se manteve basicamente constante quando adicionados 1 componente ao arcabouço, porém a porcentagem de cristalinidade foi levemente afetada quanto ao PBAT puro (13,6 %). A adição de componentes não modificou a T_{max} comparado ao arcabouço isoladamente. A diminuição verificada na T_i para o PG, PHG, PBG, é um indicio da gelatina presente na superfície da amostra que começa a se degradar em aproximadamente 200 °C, perdendo quase % de sua massa inicial.

Tabela 4. Dados analisados do TGA and DSC, na qual: T_i é a temperatura inicial de degradação, T_f é a temperatura final de degradação, T_m é a temperatura de fusão, ΔH_m entalpia de fusão, X_c é a taxa de cristalização, T_c é a temperatura de cristalização, ΔH_c é a entalpia de cristalização, e T_g é a temperatura de transição vítrea.

Amostras	TGA				DSC					
	T_i (°C)	T_f (°C)	T_{max} (°C)	Resíduo em 600 °C (%)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_g (°C)
PBAT	359,6	461,3	415,7	1,7	130,5	15,5	13,6	91,2	21,1	-30,1
PB	359,3	455,6	415,9	3,8	130,5	13,4	11,8	91,6	19,7	-31,6
PH	350,1	459,1	413,8	5,8	131,3	12,9	11,3	92,3	17,9	-32,8
PG	349,0	466,7	414,7	2,4	130,7	12,41	10,8	92,2	20,2	-33,4
PBG	348,3	462,0	415,0	1,7	123,6	13,31	10,2	92,9	16,1	-31,4
PHG	351,0	465,3	414,4	3,1	127,4	11,6	11,6	92,0	19,1	-33,2
PBH	358,3	463,3	414,5	3,8	127,9	14,3	12,5	93,6	18,3	-30,9

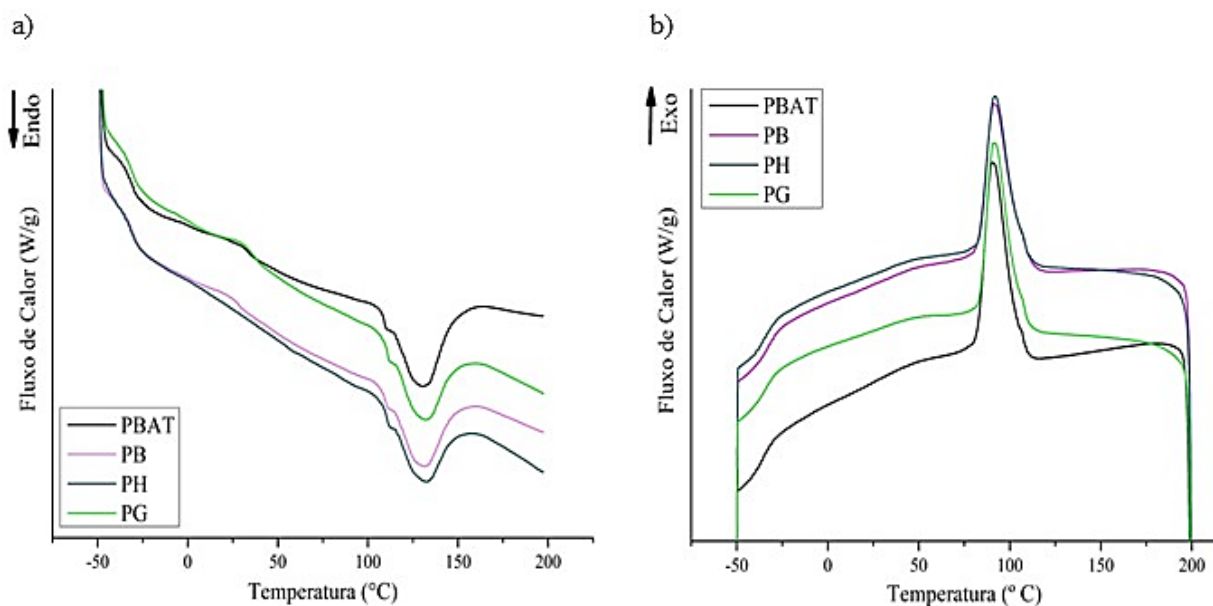


Figura 40. Curvas de aquecimento (a) e resfriamento (b), dos arcabouços com deposição de 1 componente.

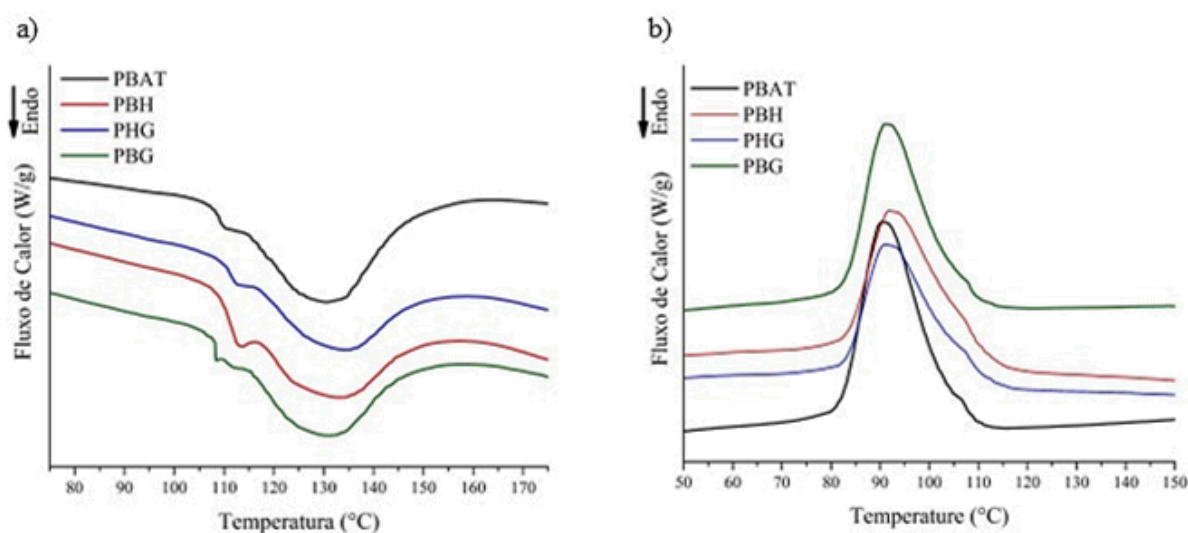


Figura 41. Curvas de aquecimento (a) e resfriamento (b), dos arcabouços com deposição de 2 componentes.

5.6 Viabilidade celular dos suportes 3D

Os dados do ensaio de viabilidade celular realizados pelo ensaio SRB (Figura 39) demonstrou que todas as amostras obtiveram uma viabilidade celular acima de 50 %, mostrando não serem citotóxicas. Comparando as amostras entre si, as amostras de PBAT obtiveram diferenças significativas quando em comparação com o suporte PB e PG de um componente, porém se mantiveram viáveis. O ensaio celular de SRB, realizado pelo grupo de estudo de Ulbrich⁷³ em PBAT puro e compósitos de PBAT/10 % de biovidro, demonstrou que ambas as

estruturas têm viabilidade celular em linhagem pré-osteoblástica MC3T3-E1. Um sistema de nanofibras com diferentes quantidades de gelatina foi estudado por Nie e colaboradores¹⁷, demonstrando a melhora na compatibilidade celular, com maior crescimento e diferenciação celular em células endoteliais.

O suporte PBH obteve diferenças significativas com todos os suportes de um só componente (PB, PH e PG), demonstrando que a utilização de ambos os componentes de hidroxiapatita e biovidro melhorou a viabilidade celular. O PBG também obteve maior viabilidade em relação ao PB e PG. Teixeira, B. N. e colaboradores¹⁶⁰ realizaram ensaio vivo/morto para ver a viabilidade celular em amostras de PLA modificadas com colágeno e dopamina em 7 dias. Verificou-se uma maior proliferação nas amostras com colágeno e com dopamina em comparação a amostra não modificada.

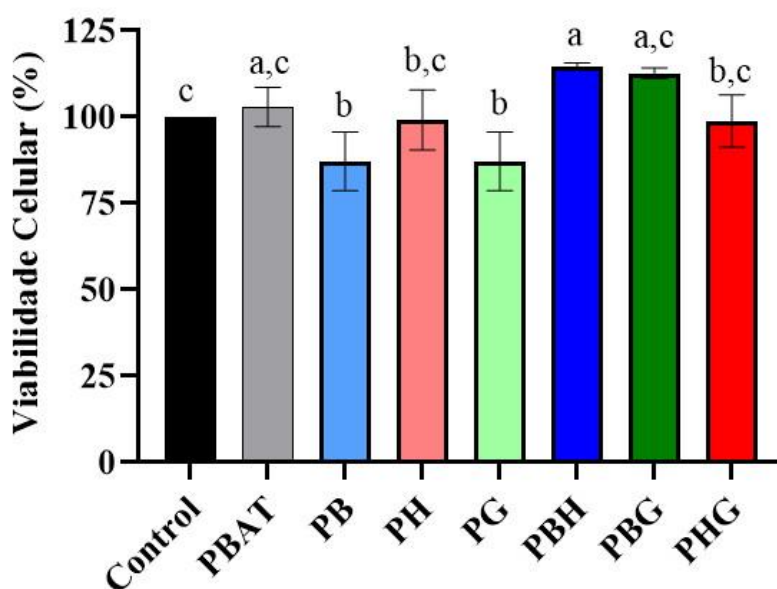


Figura 42. Resultados de viabilidade celular SRB com células MC3T3-E1 para o arcabouços 3D depois de 72 h, PBAT puro, PG (PBAT + gelatina), PH (PBAT + hidroxiapatita), PB (PBAT + biovidro), PHG (PBAT + hidroxiapatita + gelatina), PBH (PBAT + biovidro + hidroxiapatita), e PBG (PBAT + biovidro + gelatina). Os dados são mostrados com valores médios \pm desvio padrão. ANOVA de uma via: amostras com letras diferentes apresentaram diferenças estatísticas utilizando pós teste Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados do ensaio de viabilidade MTT (Figura 40) demonstraram que todas as obtiveram uma boa viabilidade celular, comparada ao controle (100 % de viabilidade) e não apresentaram diferenças significativas na proliferação celular. Isto corrobora com os dados da literatura, confirmando que o PBAT é um biomaterial atóxico biodegradável, assim como a

hidroxiapatita, gelatina e biovidros. O trabalho de Fukushima e colaboradores ¹⁶¹ com PBAT e nanocompósitos, demonstraram a ausência de citotoxicidade do PBAT puro em ensaio com fibroblastos, por um período de 24, 96 e 168 h. Também realizou-se ensaios em osteoblastos, permitindo o crescimento celular, seja puro ou junto com nanocompósitos como montmorilonita e sepiolita. Resultados similares foram encontrados por Fathi, A. e colaboradores ¹⁴⁶, que fabricaram compostos via impressão 3D de Policaprolactona (PCL) e misturas de PCL com vidros bioativos. Os seus ensaios de viabilidade MTT, demonstraram que ambos os materiais são viáveis e não apresentaram diferenças significativas após 24h de incubação. Apesar disso, outros resultados como adesão celular de células MG-63 mostram uma melhora quando adicionado o biovidro.

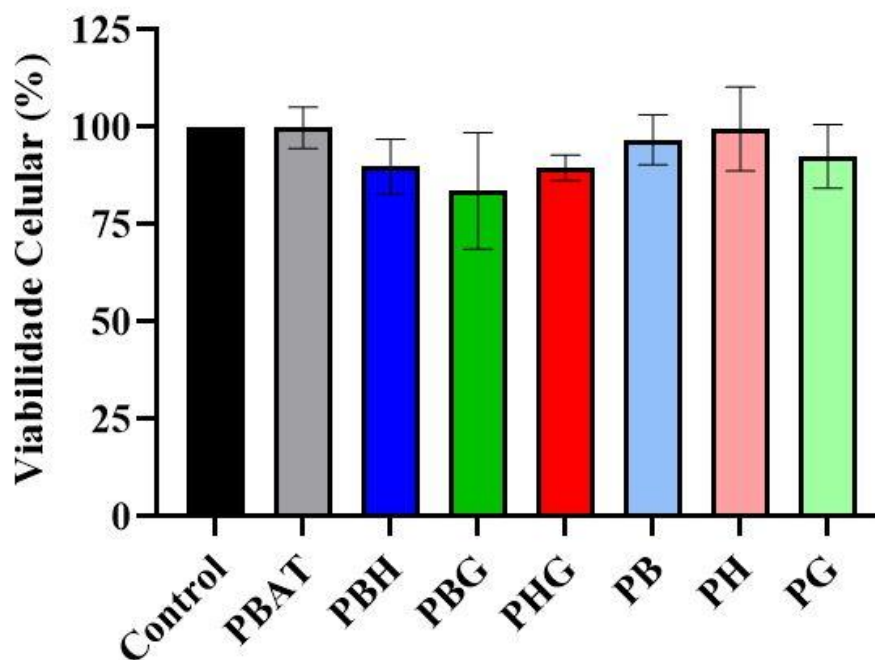


Figura 43. Resultados dos ensaios MTT de células MC3T3-E1 depois de 72 h para os arcabouços 3D do PBAT puro, PG (PBAT + gelatina), PH (PBAT + hidroxiapatita), PB (PBAT + biovidro), PHG (PBAT + hidroxiapatita + gelatina), PBH (PBAT + biovidro + hidroxiapatita), e PBG (PBAT + biovidro + gelatina). ANOVA de uma via: não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre quaisquer grupos de análise.

Os resultados obtidos com o teste Vermelho de Alizarina (Figura 41) demonstraram que as amostras PBG, PBH e PBG aumentaram a diferenciação pré-osteoblasticas comparado com o arcabouço 3D de PBAT puro. Isto se verifica após 14 e 21 dias, verificado pelo aumento da área mineralizada. O efeito positivo ao se adicionar biovidro com nióbio na mineralização celular foi previamente descrito por Balbinot e colegas. Este grupo encontrou um aumento na

porcentagem de mineralização de membranas de compósito de PBAT quando em comparação ao material puro⁹⁶. Wang e colaboradores¹⁶² compararam em seus estudos materiais de PLA e compósitos de PLA com nanohidroxiapatita, e observaram um aumento considerável nos nódulos de cálcio (porcentagem de área mineralizada) do compósito. Wang ainda realizou ensaios *in vivo* que demonstraram que o crescimento de tecido ósseo com nanohidroxiapatita e PLA foi maior que o puro PLA.

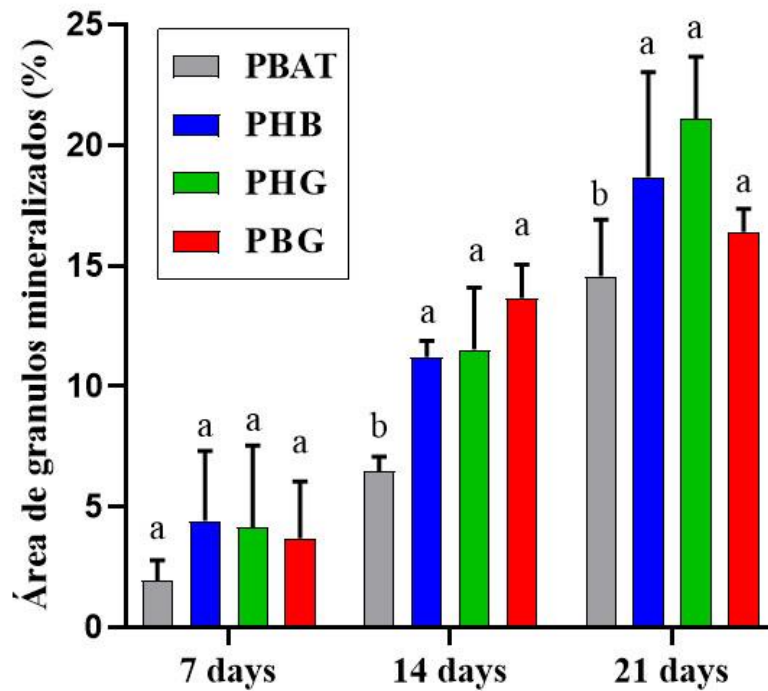


Figura 44. Teste Vermelho de Alizarina para os arcabouços 3D do PBAT puro, PHG (hidroxiapatita + gelatina + PBAT), PBH (biovidro + hidroxiapatita + PBAT), e PBG (biovidro + gelatina + PBAT). ANOVA de uma via: grupos com letras diferentes apresentam diferenças estatísticas utilizando pós teste Tukey ($p > 0,05$).

Trabalho com mais de um componente, como o realizado por Jun Liu e colaboradores, demonstraram que os osteoblastos do compósito de PCL com gelatina, hidroxiapatita e um silicato com magnésio denominado Atapulgita, obtiveram maior secreção de depósitos de cálcio extracelular em suas análises do corante vermelho de alizarina.¹⁶³ Neste trabalho, de maneira geral, percebe-se que quando adicionados 2 componentes, seja o sistema PBG, PBH ou PBH, temos um efeito sinérgico e benéfico em comparação ao PBAT puro, sendo um indicativo de que estes materiais são promissores e possam ser testado futuramente em testes *in vivo* de regeneração óssea.

6 Conclusões

Os arcabouços poliméricos de PBAT foram produzidos pela técnica de impressão 3D de modelagem por deposição fundida (FDM). As dimensões obtidas da amostra PBAT 3D foram próximas as dimensões do modelo digital criado no SolidWorks® (2017). Além disso, foi possível modificar a superfície das peças 3D através da deposição dos materiais gelatina, hidroxiapatita e biovidro utilizando o método de imersão em solução aquosa, depositando 1 componente isoladamente ou 2 simultaneamente. A modificação superficial não alterou a porosidade do material, sendo este resultado um fator positivo, uma vez que este parâmetro é essencial para proliferação celular e diferenciação osteogênica, bem como uma boa taxa de permeação de nutrientes celulares.

Por meio da caracterização topográfica e análise estrutural dos suportes poliméricos 3D modificados, foi constatado que em todos os casos houve o depósito dos materiais isoladamente ou simultaneamente na superfície das peças 3D. Os resultados referentes às propriedades térmicas demonstraram que a estabilidade térmica dos suportes 3D se manteve constante, apresentando as características do polímero de PBAT após as modificações superficiais.

Os resultados obtidos pela análise de viabilidade celular MTT e SRB demonstraram que os suportes 3D modificados e puro não causaram efeitos adversos, indicando que esses materiais não são citotóxicos e todos eles podem ser utilizados na área de engenharia de tecidos ósseo. Além disso, a mineralização celular demonstrou que a utilização dos componentes de gelatina, hidroxiapatita e biovidro, com adição simultânea de 2 destes, aumentou a área mineralizada em comparação ao PBAT puro.

Desta maneira, podemos concluir que a adição de bicomponentes ao material impresso 3D polimérico, viabilizou a construção de arcabouços com propriedades mecânicas e biológicas adequadas para o emprego na engenharia de tecido ósseo. No entanto, para resultados mais aprofundados com estudos *in vivo* necessitam ser realizados visando compreender o mecanismo destes componentes quando em contato com o tecido ósseo.

7 Referências

1. Aguiar, H.; González, P.; Serra, J. *Bioactive Glass Structure and Solubility*, Second Edi.; Elsevier Ltd., 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100936-9.00002-2>.
2. Koons, G. L.; Diba, M.; Mikos, A. G. Materials Design for Bone-Tissue Engineering. *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5* (8), 584–603. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2>.
3. Polo-Corrales, L.; Latorre-Esteves, M.; Ramirez-Vick, J. E. Scaffold Design for Bone Regeneration. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14* (1), 15–56. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127>.
4. Amini, A. R.; Laurencin, C. T.; Nukavarapu, S. P. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *40* (5), 363–408. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10>.
5. Moghaddam, A.; Bahrami, M.; Mirzadeh, M.; Khatami, M.; Simorgh, S.; Chimehrad, M.; Kruppke, B.; Bagher, Z.; Mehrabani, D.; Khonakdar, H. A. Recent Trends in Bone Tissue Engineering: A Review of Materials, Methods, and Structures. *Biomed. Mater.* **2024**, *19* (4). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ad407d>.
6. Storti, E.; Roso, M.; Modesti, M.; Aneziris, C. G.; Colombo, P. Preparation and Morphology of Magnesium Borate Fibers via Electrospinning. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2016**, *36* (10), 2593–2599. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2016.02.049>.
7. Turnbull, G.; Clarke, J.; Picard, F.; Riches, P.; Jia, L.; Han, F.; Li, B.; Shu, W. 3D Bioactive Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Bioact. Mater.* **2018**, *3*, 278–314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>.
8. B. Subia, J. K. and S. C. K. *Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications*, Daniel Ebe.; 2010.
9. Do, A.; Khorsand, B.; Geary, S. M.; Salem, A. K. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. **2015**, 1742–1762. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500168>.
10. Yuan, B.; Zhou, S.-Y.; Chen, X.-S. Rapid Prototyping Technology and Its Application in Bone Tissue Engineering. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2017**, *18* (4), 303–315. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600118>.
11. Liu, D.; Nie, W.; Li, D.; Wang, W.; Zheng, L.; Zhang, J.; Zhang, J.; Peng, C.; Mo, X.; He, C. 3D Printed PCL/SrHA Scaffold for Enhanced Bone Regeneration. *Chem. Eng. J.* **2019**, *362* (September 2018), 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.015>.

12. Ashwin, B.; Abinaya, B.; Prasith, T. P.; Chandran, S. V.; Yadav, L. R.; Vairamani, M.; Patil, S.; Selvamurugan, N. 3D-Poly (Lactic Acid) Scaffolds Coated with Gelatin and Mucic Acid for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *162*, 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.157>.
13. Jose, M. V.; Thomas, V.; Johnson, K. T.; Dean, D. R.; Nyairo, E. Aligned PLGA/HA Nanofibrous Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2009**, *5* (1), 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.019>.
14. dos Santos Silva, A.; Rodrigues, B. V. M.; Oliveira, F. C.; Carvalho, J. O.; de Vasconcellos, L. M. R.; de Araújo, J. C. R.; Marciano, F. R.; Lobo, A. O. Characterization and in Vitro and in Vivo Assessment of Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate)/Nano-Hydroxyapatite Composites as Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. Polym. Res.* **2019**, *26* (2), 53. <https://doi.org/10.1007/s10965-019-1706-8>.
15. De Castro, J. G.; Rodrigues, B. V. M.; Ricci, R.; Costa, M. M.; Ribeiro, A. F. C.; Marciano, F. R.; Lobo, A. O. Designing a Novel Nanocomposite for Bone Tissue Engineering Using Electrospun Conductive PBAT/Polypyrrole as a Scaffold to Direct Nanohydroxyapatite Electrodeposition. *RSC Adv.* **2016**, *6* (39), 32615–32623. <https://doi.org/10.1039/c6ra00889e>.
16. Kijchavengkul, T.; Auras, R.; Rubino, M.; Selke, S.; Ngouajio, M.; Fernandez, R. T. Biodegradation and Hydrolysis Rate of Aliphatic Aromatic Polyester. *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95* (12), 2641–2647. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.018>.
17. Nie, J.; Jin, C.; Liu, Y.; Du, J.; Chen, S.; Zheng, Y.; Lou, B. PBAT/Gelatin Hybrid Nanofibers Based on Post-Double Network Bond Processing as a Promising Vascular Substitute. *RSC Adv.* **2022**, *12* (34), 21957–21967. <https://doi.org/10.1039/d2ra02313j>.
18. Boskey, A. L. Bone Composition: Relationship to Bone Fragility and Antiosteoporotic Drug Effects. *Bonekey Rep.* **2013**, *2* (447), 1–11. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.181>.
19. Florencio-Silva, R.; Sasso, G. R. D. S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M. J.; Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
20. Gomes, D. S.; Santos, A. M. C.; Neves, G. A.; Menezes, R. R. A Brief Review on

- Hydroxyapatite Production and Use in Biomedicine. *Ceramica* **2019**, *65* (374), 282–302. <https://doi.org/10.1590/0366-69132019653742706>.
21. Magri, A. M. P.; Fernandes, K. R.; Ueno, F. R.; Kido, H. W.; da Silva, A. C.; Braga, F. J. C.; Granito, R. N.; Gabbai-Armelin, P. R.; Rennó, A. C. M. Osteoconductive Properties of Two Different Bioactive Glass Forms (Powder and Fiber) Combined with Collagen. *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *423*, 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.06.152>.
 22. Mateos-timoneda, J. W. M. A. Fibronectin Immobilization on to Robotic-Dispensed Nanobioactive Glass Polycaprolactone Scaffolds for Bone Tissue Engineering Fibronectin Immobilization on to Robotic-Dispensed Nanobioactive Glass / Polycaprolactone Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **2015**, No. August. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1745-5>.
 23. Blaker, J. J.; Gough, J. E.; Maquet, V.; Notingher, I.; Boccaccini, A. R. In Vitro Evaluation of Novel Bioactive Composites Based on Bioglass®-Filled Polylactide Foams for Bone Tissue Engineering Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2003**, *67* (4), 1401–1411. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.20055>.
 24. Khurshid, Z.; Husain, S.; Alotaibi, H.; Rehman, R. *Novel Techniques of Scaffold Fabrication for Bioactive Glasses*; Elsevier Ltd., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102196-5.00018-5>.
 25. Westhauser, F.; Senger, A. S.; Obert, D.; Ciraldo, F. E.; Schuhladen, K.; Schmidmaier, G.; Moghaddam, A.; Boccaccini, A. R. Gelatin Coating Increases in Vivo Bone Formation Capacity of Three-Dimensional 45S5 Bioactive Glass-Based Crystalline Scaffolds. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2019**, *13* (2), 179–190. <https://doi.org/10.1002/term.2780>.
 26. Ulbrich, L. M.; Balbinot, G. de S.; Brotto, G. L.; Leitune, V. C. B.; Soares, R. M. D.; Collares, F. M.; Ponzoni, D. 3D Printing of Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) (PBAT)/Niobium Containing Bioactive Glasses (BAGNb) Scaffolds: Characterization of Composites, in Vitro Bioactivity, and in Vivo Bone Repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2022**, *16* (3), 267–278. <https://doi.org/10.1002/term.3276>.
 27. Visser, R.; Rico-Illanos, G. A.; Pulkkinen, H.; Becerra, J. Peptides for Bone Tissue Engineering. *J. Control. Release* **2016**, *244*, 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.10.024>.

28. Reiter, T.; Panick, T.; Schuhladden, K.; Roether, J. A.; Hum, J.; Boccaccini, A. R. Bioactive Materials Bioactive Glass Based Scaffolds Coated with Gelatin for the Sustained Release of Icaritin. *Bioact. Mater.* **2019**, *4* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.10.001>.
29. Kwon, G.; Gupta, K. C.; Jung, K.; Kang, I. Lamination of Microfibrous PLGA Fabric by Electrospinning a Layer of Collagen- Hydroxyapatite Composite Nanofibers for Bone Tissue Engineering. *Biomater. Res.* **2017**, *21* (11), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40824-017-0097-3>.
30. Martin, V.; Ribeiro, I. A.; Alves, M. M.; Gonçalves, L.; Claudio, R. A.; Bettencourt, A. F. Engineering a Multifunctional 3D-Printed PLA-Collagen-Minocycline-NanoHydroxyapatite Scaffold with Combined Antimicrobial and Osteogenic Effects for Bone Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *101* (November 2018), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.056>.
31. He, Y.; Liu, W.; Guan, L.; Chen, J.; Duan, L.; Jia, Z.; Huang, J.; Li, W.; Liu, J.; Xiong, J.; Liu, L.; Wang, D. A 3D-Printed PLCL Scaffold Coated with Collagen Type I and Its Biocompatibility. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/5147156>.
32. Ansari, M. Bone Tissue Regeneration: Biology, Strategies and Interface Studies. *Prog. Biomater.* **2019**, *8* (4), 223–237. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z>.
33. Iaquinta, M. R.; Mazzoni, E.; Bononi, I.; Rotondo, J. C.; Mazziotta, C.; Montesi, M.; Sprio, S.; Tampieri, A.; Tognon, M.; Martini, F. Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7* (November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00268>.
34. Hwang, M. P.; Subbiah, R.; Kim, I. G.; Lee, K. E.; Park, J.; Kim, S. H.; Park, K. Approximating Bone ECM: Crosslinking Directs Individual and Coupled Osteoblast/Osteoclast Behavior. *Biomaterials* **2016**, *103*, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.052>.
35. Wang, W.; Yeung, K. W. K. Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review. *Bioact. Mater.* **2017**, *2* (4), 224–247. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.
36. Behzadi, S.; Luther, G. A.; Harris, M. B.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Nanomedicine for Safe Healing of Bone Trauma: Opportunities and Challenges. *Biomaterials* **2017**, *146*, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.005>.

37. Capulli, M.; Paone, R.; Rucci, N. Osteoblast and Osteocyte: Games without Frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *561* (May), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003>.
38. Sasaki, T. Differentiation and Functions of Osteoclasts and Odontoclasts in Mineralized Tissue Resorption. *Microsc. Res. Tech.* **2003**, *61* (6), 483–495. <https://doi.org/10.1002/jemt.10370>.
39. Mitra, J.; Tripathi, G.; Sharma, A.; Basu, B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Role of Surface Patterning on Osteoblast Response. *RSC Adv.* **2013**, *3* (28), 11073. <https://doi.org/10.1039/c3ra23315d>.
40. Bolamperti, S.; Villa, I.; Rubinacci, A. Bone Remodeling: An Operational Process Ensuring Survival and Bone Mechanical Competence. *Bone Res.* **2022**, *10* (1). <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00219-8>.
41. Horne, W. C.; Duong, L. T.; Sanjay, A.; Baron, R. Regulating Bone Resorption: Targeting Integrins, Calcitonin Receptor, and Cathepsin K. *Princ. Bone Biol. Vol. 1-2, Third Ed.* **2008**, 221–236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00031-8>.
42. Drake, M. T.; Clarke, B. L.; Lewiecki, E. M. The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis. *Clin. Ther.* **2015**, *37* (8), 1837–1850. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.06.006>.
43. Sobacchi, C.; Schulz, A.; Coxon, F. P.; Villa, A.; Helfrich, M. H. Osteopetrosis: Genetics, Treatment and New Insights into Osteoclast Function. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2013**, *9* (9), 522–536. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.137>.
44. Ribas, R. G.; Schatkoski, V. M.; Larissa, T.; Rossi, B.; Menezes, C. De; Stegemann, C.; Marcel, D.; Leite, G. Current Advances in Bone Tissue Engineering Concerning Ceramic and Bioglass Scaffolds: A Review. *Ceram. Int.* **2019**, No. June, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.096>.
45. Ramachandran, K.; Gouma, P.-I. Electrospinning for Bone Tissue Engineering. *Recent Pat. Nanotechnol.* **2008**, *2* (1), 1–7.
46. Tetteh, G.; Khan, A. S.; Delaine-Smith, R. M.; Reilly, G. C.; Rehman, I. U. Electrospun Polyurethane/Hydroxyapatite Bioactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering: The Role of Solvent and Hydroxyapatite Particles. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2014**, *39*, 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.06.019>.
47. Zhu, T.; Zhou, H.; Chen, X.; Zhu, Y. Recent Advances of Responsive Scaffolds in Bone

- Tissue Engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11* (November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1296881>.
48. Chi, M.; Li, N.; Cui, J.; Karlin, S.; Rohr, N.; Sharma, N.; Thieringer, F. M. Biomimetic, Mussel-Inspired Surface Modification of 3D-Printed Biodegradable Polylactic Acid Scaffolds with Nano-Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10* (September), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.989729>.
 49. Selim, M.; Mousa, H. M.; Abdel-Jaber, G. T.; Barhoum, A.; Abdal-hay, A. Innovative Designs of 3D Scaffolds for Bone Tissue Regeneration: Understanding Principles and Addressing Challenges. *Eur. Polym. J.* **2024**, *215* (June), 113251. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.113251>.
 50. Hu, X.; Lin, Z.; He, J.; Zhou, M.; Yang, S.; Wang, Y.; Li, K. Recent Progress in 3D Printing Degradable Polylactic Acid-Based Bone Repair Scaffold for the Application of Cancellous Bone Defect. *MedComm - Biomater. Appl.* **2022**, *1* (1), 1–27. <https://doi.org/10.1002/mba2.14>.
 51. Dubey, A.; Vahabi, H.; Kumaravel, V. Antimicrobial and Biodegradable 3D Printed Scaffolds for Orthopedic Infections. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2023**, *9* (7), 4020–4044. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c00115>.
 52. Sola, A.; Bertacchini, J.; D’Avella, D.; Anselmi, L.; Maraldi, T.; Marmioli, S.; Messori, M. Development of Solvent-Casting Particulate Leaching (SCPL) Polymer Scaffolds as Improved Three-Dimensional Supports to Mimic the Bone Marrow Niche. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *96* (November 2018), 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.086>.
 53. Chen, Y.; Li, Y.; Wang, X.; Mo, X.; Chen, Y.; Deng, Z.; Ye, X.; Yu, J. One-Step Gas Foaming Strategy for Constructing Strontium Nanoparticle Decorated 3D Scaffolds: A New Platform for Repairing Critical Bone Defects. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2024**, *16*, 61664–61678. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c13119>.
 54. Rong, D.; Chen, P.; Yang, Y.; Li, Q.; Wan, W.; Fang, X.; Zhang, J.; Han, Z.; Tian, J.; Ouyang, J. Fabrication of Gelatin/PCL Electrospun Fiber Mat with Bone Powder and the Study of Its Biocompatibility. *J. Funct. Biomater.* **2016**, *7* (1), 6. <https://doi.org/10.3390/jfb7010006>.
 55. Mota, C.; Puppi, D.; Dinucci, D.; Gazzarri, M.; Chiellini, F. Additive Manufacturing of Star Poly(ϵ -Caprolactone) Wet-Spun Scaffolds for Bone Tissue Engineering

- Applications. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2013**, 28 (4), 320–340. <https://doi.org/10.1177/0883911513490341>.
56. Dubinenko, G. E.; Zinoviev, A. L.; Bolbasov, E. N.; Novikov, V. T.; Tverdokhlebov, S. I. Preparation of Poly(L-Lactic Acid)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds by Fused Deposit Modeling 3D Printing. *Mater. Today Proc.* **2020**, 22, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.08.092>.
57. Couto, R.; Gonçalves, D. A.; Oliveira, E.; Lima, F. F. De; Menezes, L. R. De; Carlos, A.; Thiele, S. 3D Printed Scaffolds as a New Perspective for Bone Tissue Regeneration : Literature Review. *Mater. Sci. Appl.* **2016**, 7 (August), 430–452.
58. Guvendiren, M.; Molde, J.; Soares, R. M. D.; Kohn, J. Designing Biomaterials for 3D Printing. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, 2 (10), 1679–1693. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00121>.
59. Gao, G.; Xu, F.; Xu, J.; Tang, G.; Liu, Z. A Survey of the Influence of Process Parameters on Mechanical Properties of Fused Deposition Modeling Parts. *Micromachines* **2022**, 13 (4), 1–28. <https://doi.org/10.3390/mi13040553>.
60. Ayrimis, N. Effect of Layer Thickness on Surface Properties of 3D Printed Materials Produced from Wood Flour/PLA Filament. *Polym. Test.* **2018**, 71 (September), 163–166. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.09.009>.
61. de Barros, R. R.; de Souza Balbinot, G.; Vassoler, J. M.; Soares, R. M. D. Effect of Angular Variation and in Vitro Degradation on Mechanical Properties of PBAT 3D Scaffolds. *J. Appl. Polym. Sci.* **2024**, 141 (23), 1–18. <https://doi.org/10.1002/app.55454>.
62. del Barrio Cortés, E.; Matutano Molina, C.; Rodríguez-Lorenzo, L.; Cubo-Mateo, N. Generation of Controlled Micrometric Fibers inside Printed Scaffolds Using Standard FDM 3D Printers. *Polymers (Basel)*. **2023**, 15 (1). <https://doi.org/10.3390/polym15010096>.
63. KAMER, M. S.; TEMİZ, Ş.; YAYKAŞLI, H.; KAYA, A.; AKAY, O. Effect of Printing Speed on Fdm 3D-Printed Pla Samples Produced Using Different Two Printers. *Int. J. 3D Print. Technol. Digit. Ind.* **2022**, 6 (3), 438–448. <https://doi.org/10.46519/ij3dptdi.1088805>.
64. Bracaglia, L. G.; Smith, B. T.; Watson, E.; Arumugasaamy, N.; Mikos, A. G.; Fisher, J. P. 3D Printing for the Design and Fabrication of Polymer-Based Gradient Scaffolds. *Acta Biomater.* **2017**, 56, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.030>.

65. Kołbuk, D.; Sajkiewicz, P.; Maniura-Weber, K.; Fortunato, G. Structure and Morphology of Electrospun Polycaprolactone/Gelatine Nanofibres. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49* (8), 2052–2061. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.04.036>.
66. Silva, A. C. Q.; Silvestre, A. J. D.; Vilela, C.; Freire, C. S. R. Natural Polymers-Based Materials: A Contribution to a Greener Future. *Molecules* **2022**, *27* (1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010094>.
67. Roy, S.; Ghosh, T.; Zhang, W.; Rhim, J. W. Recent Progress in PBAT-Based Films and Food Packaging Applications: A Mini-Review. *Food Chem.* **2024**, *437* (P1), 137822. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137822>.
68. Menezes, F. C.; Siqueira, N. M.; Fung, S.; Scheibel, J. M.; Moura, D. J.; Guvendiren, M.; Kohn, J.; Soares, R. M. D. Effect of Crosslinking, Hydroxyapatite Addition, and Fiber Alignment to Stimulate Human Mesenchymal Stem Cells Osteoinduction in Polycaprolactone-Based Electrospun Scaffolds. *Polym. Adv. Technol.* **2022**, *33* (9), 2682–2695. <https://doi.org/10.1002/pat.5723>.
69. Ferreira, F. V.; Cividanes, L. S.; Gouveia, R. F.; Lona, L. M. F.; Cnpem, M. An Overview on Properties and Applications of Poly (Butylene Adipate-Co-Terephthalate)–PBAT Based Composites. *Polym. Eng. Sci* **2019**, *59* (s2), E7–E15. <https://doi.org/10.1002/pen.24770>.
70. Jia, H.; Zhang, M.; Weng, Y.; Zhao, Y.; Li, C.; Kanwal, A. Degradation of Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) by *Stenotrophomonas* Sp. YCJ1 Isolated from Farmland Soil. *J. Environ. Sci. (China)* **2021**, *103*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.10.001>.
71. Ferreira, F. V.; Cividanes, L. S.; Gouveia, R. F.; Lona, L. M. F. An Overview on Properties and Applications of Poly (Butylene Adipate-Co-Terephthalate)–PBAT Based Composites. *Polym. Eng. Sci* **2017**, No. November, 1–9. <https://doi.org/10.1002/pen.24770>.
72. Vasconcellos, L. M. R.; Santana-Melo, G. F.; Silva, E.; Pereira, V. F.; Araújo, J. C. R.; Silva, A. D. R.; Furtado, A. S. A.; Elias, C. de M. V.; Viana, B. C.; Marciano, F. R.; Lobo, A. O. Electrospun Poly(Butylene-Adipate-Co-Terephthalate)/Nano-Hydroxyapatite/Graphene Nanoribbon Scaffolds Improved the in Vivo Osteogenesis of the Neofomed Bone. *J. Funct. Biomater.* **2021**, *12* (1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/jfb12010011>.

73. Ulbrich, L. M.; Balbinot, G. de S.; Brotto, G. L.; Leitune, V. C. B.; Soares, R. M. D.; Collares, F. M.; Ponzoni, D. 3D Printing of Poly(Butylene Adipate-co-terephthalate) (PBAT)/Niobium Containing Bioactive Glasses (BAGNb) Scaffolds: Characterization of Composites, in Vitro Bioactivity, and in Vivo Bone Repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2022**, *16* (3), 267–278. <https://doi.org/10.1002/term.3276>.
74. Bowlin, G. L. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. **2010**, *2*, 522–553. <https://doi.org/10.3390/polym2040522>.
75. Wang, X.; Ao, Q.; Tian, X.; Fan, J.; Tong, H.; Hou, W.; Bai, S. Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. *Polymers (Basel)*. **2017**, *9* (9). <https://doi.org/10.3390/polym9090401>.
76. Ko, J. H.; Yin, H.; An, J.; Chung, D. J.; Kim, J. H.; Lee, S. B.; Pyun, D. G. Characterization of Cross-Linked Gelatin Nanofibers through Electrospinning. *Macromol. Res.* **2010**, *18* (2), 137–143. <https://doi.org/10.1007/s13233-009-0103-2>.
77. Gorgieva, S.; Kokol, V. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. *Biomater. Appl. Nanomedicine* **2011**, No. November. <https://doi.org/10.5772/24118>.
78. Erencia, M.; Cano, F.; Tornero, J. A.; Fernandes, M. M.; Tzanov, T. Electrospinning of Gelatin Fibers Using Solutions with Low Acetic Acid Concentration : Effect of Solvent Composition on Both Diameter of Electrospun Fibers and Cytotoxicity. **2015**, *42115*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/app.42115>.
79. Milano, F.; Masi, A.; Madaghiele, M.; Sannino, A.; Salvatore, L.; Gallo, N. Current Trends in Gelatin-Based Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051499>.
80. Mehrasa, M.; Asadollahi, M. A.; Ghaedi, K.; Salehi, H.; Arpanaei, A. Electrospun Aligned PLGA and PLGA/Gelatin Nanofibers Embedded with Silica Nanoparticles for Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *79*, 687–695. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.050>.
81. Jae Eun Jeong, Shin Young Park, Ji Youn Shin, Ji Min Seok, June Ho Byun, Se Heang Oh, Wan Doo Kim, Jun Hee Lee, Won Ho Park, and S. A. P. 3D Printing of Bone-Mimetic Scaffold Composed of Gelatin-Tri-Calcium Phosphate. *Macromol. Biosci.* **2020**, *20*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000256>.

82. Patil, T.; Saha, S.; Biswas, A. Preparation and Characterization of HAp Coated Chitosan-Alginate PEC Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Macromol. Symp.* **2017**, *1600205*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/masy.201600205>.
83. Salgado, J.; Coutinho, O. P.; Reis, R. L. Bone Tissue Engineering : State of the Art and Future Trends. *Macromol. Biosci.* **2004**, *4* (8), 743–765. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400026>.
84. Jang, S. J.; Kim, S. E.; Han, T. S.; Son, J. S.; Kang, S. S.; Choi, S. H. Bone Regeneration of Hydroxyapatite with Granular Form or Porous Scaffold in Canine Alveolar Sockets. *In Vivo.* 2017, pp 335–341. <https://doi.org/10.21873/invivo.11064>.
85. Wei Xiao, B. Sonny Bal, and M. N. R. Preparation of Resorbable Carbonate-Substituted Hollow Hydroxyapatite Microspheres and Their Evaluation in Osseous Defects in Vivo Wei. *Mater Sci Eng C* **2016**, *60*, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
86. Peng, F.; Yu, X.; Wei, M. In Vitro Cell Performance on Hydroxyapatite Particles/Poly (L-Lactic Acid) Nanofibrous Scaffolds with an Excellent Particle along Nanofiber Orientation. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (6), 2585–2592. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.021>.
87. *Hydroxyapatite structure.* <http://www.chemtube3d.com/solidstate/SSHydroxyapatite.htm> (accessed 2017-05-02).
88. Gomes, D. S.; Santos, A. M. C.; Neves, G. A.; Menezes, R. R.; Grande, C.; Grande, C. A Brief Review on Hydroxyapatite Production and Use in Biomedicine. *Cerâmica* **2019**, *65*, 282–302.
89. Li, X.; Wang, Y.; Guo, M.; Wang, Z.; Shao, N.; Zhang, P.; Chen, X.; Huang, Y. Degradable Three Dimensional-Printed Polylactic Acid Scaffold with Long-Term Antibacterial Activity. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (2), 2047–2054. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03464>.
90. Cestari, F.; Petretta, M.; Yang, Y.; Motta, A.; Grigolo, B.; Sglavo, V. M. 3D Printing of PCL/Nano-Hydroxyapatite Scaffolds Derived from Biogenic Sources for Bone Tissue Engineering. *Sustain. Mater. Technol.* **2021**, *29* (May), e00318. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2021.e00318>.
91. Kaur, G.; Kumar, V.; Bains, F.; Mauro, J. C.; Pickrell, G.; Evans, I.; Bretcanu, O. Mechanical Properties of Bioactive Glasses, Ceramics, Glass-Ceramics and Composites:

- State-of-the-Art Review and Future Challenges. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *104* (December 2018), 109895. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109895>.
92. Labbaf, S.; Houreh, A. B.; Rahimi, M.; Ting, H. Bioactive Glass-Polycaprolactone Fiber Membrane and Response of Dental Pulp Stem Cells in Vitro. *Biomed. Glas.* **2018**, *4*, 123–130.
93. LI, Y. INVESTIGATING THE STRUCTURE, SOLUBILITY AND BIOACTIVITY OF Na/Sr BIOACTIVE GLASSES/GLASS-CERAMICS, FACULTY OF ALFRED UNIVERSITY, 2014.
94. Hench, L. L.; Splinter, R. J.; Allen, W. C.; Greenlee, T. K. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *J. Biomed. Mater. Res.* **1971**, *5* (6), 117–141. <https://doi.org/10.1002/jbm.820050611>.
95. Yadav, V. S.; Sankar, M. R.; Pandey, L. M. Coating of Bioactive Glass on Magnesium Alloys to Improve Its Degradation Behavior: Interfacial Aspects. *J. Magnes. Alloy.* **2020**, No. xxxx, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jma.2020.05.005>.
96. Balbinot, G. de S.; Collares, F. M.; Visioli, F.; Soares, P. B. F.; Takimi, A. S.; Samuel, S. M. W.; Leitune, V. C. B. Niobium Addition to Sol-Gel Derived Bioactive Glass Powders and Scaffolds: In Vitro Characterization and Effect on Pre-Osteoblastic Cell Behavior. *Dent. Mater.* **2018**, *34* (10), 1449–1458. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.06.014>.
97. Cacciotti, I. Bivalent Cationic Ions Doped Bioactive Glasses: The Influence of Magnesium, Zinc, Strontium and Copper on the Physical and Biological Properties. *J. Mater. Sci.* **2017**, *52* (15), 8812–8831. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1010-0>.
98. Bari, A.; Bloise, N.; Fiorilli, S.; Novajra, G.; Vallet-Regí, M.; Bruni, G.; Torres-Pardo, A.; González-Calbet, J. M.; Visai, L.; Vitale-Brovarone, C. Copper-Containing Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles as Multifunctional Agent for Bone Regeneration. *Acta Biomater.* **2017**, *55*, 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.04.012>.
99. Atkinson, I.; Anghel, E. M.; Predoana, L.; Mocioiu, O. C.; Jecu, L.; Raut, I.; Munteanu, C.; Culita, D.; Zaharescu, M. Influence of ZnO Addition on the Structural, in Vitro Behavior and Antimicrobial Activity of Sol–Gel Derived CaO–P₂O₅–SiO₂ Bioactive Glasses. *Ceram. Int.* **2016**, *42* (2), 3033–3045. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.10.090>.

100. Souza, L. P.; Domingues, J. A.; Ferreira, F. V.; Mazali, I. O.; Martin, R. A.; Bertran, C. A. In Vitro and in Vivo Osteogenic Potential of Niobium-Doped 45S5 Bioactive Glass : A Comparative Study. *J Biomed Mater Res* **2019**, No. August, 1–16. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34486>.
101. Balbinot, G. de S.; Collares, F. M.; Visioli, F.; Soares, P. B. F.; Takimi, A. S.; Samuel, S. M. W.; Leitune, V. C. B. Niobium Addition to Sol-Gel Derived Bioactive Glass Powders and Scaffolds: In Vitro Characterization and Effect on Pre-Osteoblastic Cell Behavior. *Dent. Mater.* **2018**, *34* (10), 1449–1458. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.06.014>.
102. Alves, A. R.; Dos Reis Coutinho, A. The Evolution of the Niobium Production in Brazil. *Mater. Res.* **2015**, *18* (1), 106–112. <https://doi.org/10.1590/1516-1439.276414>.
103. Olivares-Navarrete, R.; Olaya, J. J.; Ramírez, C.; Rodil, S. E. Biocompatibility of Niobium Coatings. *Coatings* **2011**, *1* (1), 72–87. <https://doi.org/10.3390/coatings1010072>.
104. Balbinot, G. de S.; Bahlis, E. A. da C.; Visioli, F.; Leitune, V. C. B.; Soares, R. M. D.; Collares, F. M. Polybutylene-Adipate-Terephthalate and Niobium-Containing Bioactive Glasses Composites: Development of Barrier Membranes with Adjusted Properties for Guided Bone Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *125* (April). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112115>.
105. Zhou, Z. X.; Chen, Y. R.; Zhang, J. Y.; Jiang, D.; Yuan, F. Z.; Mao, Z. M.; Yang, F.; Jiang, W. B.; Wang, X.; Yu, J. K. Facile Strategy on Hydrophilic Modification of Poly(ϵ -Caprolactone) Scaffolds for Assisting Tissue-Engineered Meniscus Constructs In Vitro. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11* (May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00471>.
106. Tham, C. Y.; Hamid, Z. A. A.; Ahmad, Z.; Ismail, H. Surface Engineered Poly (Lactic Acid) (PLA) Microspheres by Chemical Treatment for Drug Delivery System Surface Engineered Poly (Lactic Acid) (PLA) Microspheres by Chemical Treatment for Drug Delivery System. **2013**, No. May 2015. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.594-595.214>.
107. Ferreira, F. V.; Cividanes, L. S.; Gouveia, R. F.; Lona, L. M. F. An Overview on Properties and Applications of Poly(Butylene Adipate- Co -terephthalate)–PBAT Based Composites. *Polym. Eng. Sci.* **2019**, *59* (s2). <https://doi.org/10.1002/pen.24770>.
108. Chen, Y.; Shie, M.; Fang, H. Y. Poly(Dopamine)-Assisted Immobilization of Xu Duan

- on 3D Printed Poly(Lactic Acid) Scaffolds to Up-Regulate Osteogenic and Angiogenic Markers of Bone Marrow Stem Cells. **2015**, No. July. <https://doi.org/10.3390/ma8074299>.
109. Zaeri, A.; Zgeib, R.; Zhang, F.; Cao, K.; Chang, R. C. Gradient Biomolecular Immobilization of 3D Structured Poly- ϵ -Caprolactone Biomaterials toward Functional Engineered Tissue. *Macromol. Mater. Eng.* **2023**, *308* (12), 1–17. <https://doi.org/10.1002/mame.202300040>.
110. Namhongsa, M.; Daranarong, D.; Molloy, R.; Ross, S.; Ross, G. M.; Tuantranont, A.; Boonyawan, D.; Tocharus, J.; Sivasinprasasn, S.; Topham, P. D.; Tighe, B. J.; Punyodom, W. Plasma Surface Modification of Two-Component Composite Scaffolds Consisting of 3D-Printed and Electrospun Fiber Components from Biodegradable PLGA and PLCL. *Eur. Polym. J.* **2023**, *194* (May), 112135. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112135>.
111. Pooja Bhati, Alok Srivastava, Ramya Ahuja, Pankaj Chauhan, Priya Vashisth, N. B. PLA Tubular Scaffolds. *Polymers (Basel)*. **2023**, *15*, 1097.
112. Chakraborty, R.; Anoop, A. G.; Thakur, A.; Mohanta, G. C.; Kumar, P. Strategies To Modify the Surface and Bulk Properties of 3D-Printed Solid Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *ACS Omega* **2023**, *8* (6), 5139–5156. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05984>.
113. Tabatabaei, F.; Gelin, A.; Rasoulianboroujeni, M.; Tayebi, L. Coating of 3D Printed PCL/TCP Scaffolds Using Homogenized-Fibrillated Collagen. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2022**, *217* (June), 112670. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112670>.
114. Suttiat, K.; Wattanutchariya, W.; Manaspon, C. Preparation and Characterization of Porous Poly(Lactic Acid)/Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) (PLA/PBAT) Scaffold with Polydopamine-Assisted Biomineralization for Bone Regeneration. *Materials (Basel)*. **2022**, *15*, 7756. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ma15217756>.
115. Kanwar, S.; Vijayavenkataraman, S. Design of 3D Printed Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Review. *Bioprinting* **2021**, *24* (August), e00167. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00167>.
116. Chinnasami, H.; Dey, M. K.; Devireddy, R. Three-Dimensional Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Bioengineering* **2023**, *10* (7). <https://doi.org/10.3390/bioengineering10070759>.

117. Babu, R. D.; Devaprakasam, D. A Review on Additive Manufacturing Techniques in Medical Applications. *Int. J. Adv. Sci. Eng.* **2019**, *5* (3), 988–997.
118. Esther J. Lee, F. Kurtis Kasper, and A. G. M. Biomaterials for Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng.* **2015**, *42* (2), 323–337. <https://doi.org/10.1201/b13978>.
119. Chen, Q.; Zhu, C.; Thouas, G. a. Progress and Challenges in Biomaterials Used for Bone Tissue Engineering: Bioactive Glasses and Elastomeric Composites. *Prog. Biomater.* **2012**, *1* (2), 1–22. <https://doi.org/10.1186/2194-0517-1-2>.
120. Martin, V.; Ribeiro, I. A.; Alves, M. M.; Gonçalves, L.; Claudio, R. A.; Bettencourt, A. F. Materials Science & Engineering C Engineering a Multifunctional 3D-Printed PLA-Collagen-Minocycline- NanoHydroxyapatite Sca Ff Old with Combined Antimicrobial and Osteogenic e Ff Ects for Bone Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *101* (February), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.056>.
121. Wang, X.; Cui, L.; Fan, S.; Li, X.; Liu, Y. Biodegradable Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) Antibacterial Nanocomposites Reinforced with MgO Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. **2021**, *13* (4), 1–11. <https://doi.org/10.3390/polym13040507>.
122. Albuquerque, P. B. S.; Cerqueira, M. A.; Vicente, A. A.; Teixeira, J. A.; Carneiro-da-Cunha, M. G. Immobilization of Bioactive Compounds in Cassia Grandis Galactomannan-Based Films: Influence on Physicochemical Properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *96*, 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.081>.
123. Chen, X.; He, B.; Feng, M.; Zhao, D.; Sun, J. Immobilized Laccase on Magnetic Nanoparticles for Enhanced Lignin Model Compounds Degradation. *Chinese J. Chem. Eng.* **2020**, *28* (8), 2152–2159. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.02.028>.
124. Luo, Y.; Li, Y.; Qin, X.; Wa, Q. 3D Printing of Concentrated Alginate/Gelatin Scaffolds with Homogeneous Nano Apatite Coating for Bone Tissue Engineering. *Mater. Des.* **2018**, *146*, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.03.002>.
125. Govindan, R.; Kumar, G. S.; Girija, E. K. Polymer Coated Phosphate Glass/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications. *RSC Adv.* **2015**, *5* (74), 60188–60198. <https://doi.org/10.1039/c5ra09258b>.
126. Zehetmeyer, G.; Meira, S. M. M.; Scheibel, J. M.; de Brito da Silva, C.; Rodembusch, F. S.; Brandelli, A.; Soares, R. M. D. Biodegradable and Antimicrobial Films Based on Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) Electrospun Fibers. *Polym. Bull.* **2017**, *74* (8), 3243–3268. <https://doi.org/10.1007/s00289-016-1896-8>.

127. Sattary, M.; Taghi, M.; Rozve, H. S. Incorporation of Nanohydroxyapatite and Vitamin D3 into Electrospun PCL / Gelatin Scaffolds : The Influence on the Physical and Chemical Properties and Cell Behavior for Bone Tissue Engineering. *Polym. Adv. Technol.* **2018**, *29* (June 2017), 451–462. <https://doi.org/10.1002/pat.4134>.
128. Azevedo, A. G. D. S.; Strecker, K.; Gorgulho, H. F. Effect of Temperature in Process of Sintering of Hydroxyapatite Powders. *Ceramica* **2015**, *61* (357), 52–59. <https://doi.org/10.1590/0366-69132015613571879>.
129. Savicki, C.; Camargo, N. H. A.; Gemelli, E.; Copatti, C.; Camargo, N. A.; Silva, D. F. Carregamento e Caracterização Do Fármaco Carboplatina Na Microestrutura Microporosa Do Biomaterial Granulado Bifásico Micro e Nanoestruturado de Fosfato de Cálcio. *Matéria (Rio Janeiro)* **2019**, *24* (3). <https://doi.org/10.1590/s1517-707620190003.0703>.
130. Chong, L. H.; Lim, M. M.; Sultana, N. Fabrication and Evaluation of Polycaprolactone / Gelatin-Based Electrospun Nanofibers with Antibacterial Properties. *J. Nanomater.* **2015**, *2015*, 1–8.
131. Jiang, Y. C.; Jiang, L.; Huang, A.; Wang, X. F.; Li, Q.; Turng, L. S. Electrospun Polycaprolactone/Gelatin Composites with Enhanced Cell–Matrix Interactions as Blood Vessel Endothelial Layer Scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *71*, 901–908. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.083>.
132. Amaravathy, P.; Sowndarya, S.; Sathyanarayanan, S.; Rajendran, N. Novel Sol Gel Coating of Nb2O5 on Magnesium Alloy for Biomedical Applications. *Surf. Coat. Technol.* **2014**, *244*, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.01.050>.
133. Aquino, F. T. “ Desenvolvimento de Materiais Nanoestruturados à Base de Óxido de Nióbio Para Aplicação Em Fotônica ” Felipe Thomaz Aquino, Universidade de São Paulo (USP), 2013.
134. Deliormanl, A. M. Preparation and in Vitro Characterization of Electrospun 45S5 Bioactive Glass Nanofibers. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.08.086>.
135. Adams, L. A.; Essien, E. R.; Shaibu, R. O.; Oki, A. Sol-Gel Synthesis of SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ Bioactive Glass Ceramic from Sodium Metasilicate. *New J. Glas. Ceram.* **2013**, *3* (January), 11–15.
136. Elias, C. de M. V.; Filho, A. L. M. M.; Silva, L. R. da; Amaral, F. P. de M. do; Webster,

- T. J.; Marciano, F. R.; Lobo, A. O. In Vivo Evaluation of the Genotoxic Effects of Poly Nanohydroxyapatite Scaffolds for Bone Regeneration. *Materials (Basel)*. **2019**, *12* (1130), 1–16.
137. Ribeiro Neto, W. A.; De Paula, A. C. C.; Martins, T. M. M.; Goes, A. M.; Averous, L.; Schlatter, G.; Suman Bretas, R. E. Poly (Butylene Adipate-Co-Terephthalate)/Hydroxyapatite Composite Structures for Bone Tissue Recovery. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *120*, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.009>.
138. Nejati, E.; Mirzadeh, H.; Zandi, M. Synthesis and Characterization of Nano-Hydroxyapatite Rods/Poly(l-Lactide Acid) Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* **2008**, *39* (10), 1589–1596. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2008.05.018>.
139. Rajzer, I.; Kurowska, A.; Magdalena, K. C.; Douglas, T. E. L. Electrospun Polycaprolactone Membranes with Zn-Doped Bioglass for Nasal Tissues Treatment. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**, *30* (80). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6280-4>.
140. Michailova, I.; Radev, L.; Vladov, D.; Michailova, I.; Cholakova, E. In Vitro Bioactivity of Polycaprolactone / Bioglass Composites In Vitro Bioactivity of Polycaprolactone / Bioglass Composites. **2015**, No. March. <https://doi.org/10.5923/j.ijmc.20130305.02>.
141. Amaravathy, P.; Sowndarya, S.; Sathyanarayanan, S.; Rajendran, N. Novel Sol Gel Coating of Nb₂O₅ on Magnesium Alloy for Biomedical Applications. *Surf. Coatings Technol.* **2014**, *244*, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.01.050>.
142. Zhang, K.; Fan, Y.; Dunne, N.; Li, X. Effect of Microporosity on Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Regenerative Biomaterials*. 2018, pp 115–124. <https://doi.org/10.1093/rb/rby001>.
143. Loh, Q. L.; Choong, C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Eng. - Part B Rev.* **2013**, *19* (6), 485–502. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>.
144. Martin, V.; Ribeiro, I. A.; Alves, M. M.; Gonçalves, L.; Claudio, R. A.; Grenho, L.; Fernandes, M. H.; Gomes, P.; Santos, C. F.; Bettencourt, A. F. Engineering a Multifunctional 3D-Printed PLA-Collagen-Minocycline-NanoHydroxyapatite Scaffold with Combined Antimicrobial and Osteogenic Effects for Bone Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *101* (March), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.056>.

145. Zadpoor, A. A. Bone Tissue Regeneration: The Role of Scaffold Geometry. *Biomaterials Science*. Royal Society of Chemistry 2015, pp 231–245. <https://doi.org/10.1039/c4bm00291a>.
146. Fathi, A.; Kermani, F.; Behnamghader, A.; Banijamali, S.; Mozafari, M.; Bairo, F.; Kargozar, S. Three-Dimensionally Printed Polycaprolactone/Multicomponent Bioactive Glass Scaffolds for Potential Application in Bone Tissue Engineering. *Biomed. Glas.* **2021**, *6* (1), 57–69. <https://doi.org/10.1515/bglass-2020-0006>.
147. Elise F. Morgan, Ginu U. Unnikrisnan, and A. I. H. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annu Rev Biomed Eng.* **2019**, *20*, 119–143. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-121139>.
148. He, Y.; Liu, W.; Guan, L.; Chen, J.; Duan, L.; Jia, Z.; Huang, J.; Li, W.; Liu, J.; Xiong, J.; Liu, L.; Wang, D. A 3D-Printed PLCL Scaffold Coated with Collagen Type i and Its Biocompatibility. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 10. <https://doi.org/10.1155/2018/5147156>.
149. Zhang, K.; Fan, Y.; Dunne, N.; Li, X. Effect of Microporosity on Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Regen. Biomater.* **2018**, No. February, 115–124. <https://doi.org/10.1093/rb/rby001>.
150. Tabia, Z.; El Mabrouk, K.; Briccha, M.; Nouneh, K. Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles Doped with Magnesium: Drug Delivery and Acellular: In Vitro Bioactivity. *RSC Adv.* **2019**, *9* (22), 12232–12246. <https://doi.org/10.1039/c9ra01133a>.
151. Boccaccini, A. R.; Chen, Q.; Lefebvre, L.; Gremillard, L.; Chevalier, J. Sintering, Crystallisation and Biodegradation Behaviour of Bioglass®-Derived Glass-Ceramics. *Faraday Discuss.* **2007**, *136* (March 2016), 27–44. <https://doi.org/10.1039/b616539g>.
152. Chitra, S.; Bargavi, P.; Durgalakshmi, D.; Rajashree, P.; Balakumar, S. Role of Sintering Temperature Dependent Crystallization of Bioactive Glasses on Erythrocyte and Cytocompatibility. *Process. Appl. Ceram.* **2019**, *13* (1), 12–23. <https://doi.org/10.2298/PAC1901012C>.
153. da Silva Buriti, J.; Barreto, M. E. V.; Barbosa, F. C.; de Brito Buriti, B. M. A.; de Lima Souza, J. W.; de Vasconcelos Pina, H.; de Luna Rodrigues, P.; Fook, M. V. L. Synthesis and Characterization of Ag-Doped 45S5 Bioglass and Chitosan/45S5-Ag Biocomposites for Biomedical Applications. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2020**, No. 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09734-4>.

154. Siqueira, N. M.; Paiva, B.; Camassola, M.; Rosenthal-Kim, E. Q.; Garcia, K. C.; Dos Santos, F. P.; Soares, R. M. D. Gelatin and Galactomannan-Based Scaffolds: Characterization and Potential for Tissue Engineering Applications. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *133*, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.039>.
155. Gautam, S.; Kumar, A.; Chandra, N. Fabrication and Characterization of PCL / Gelatin Composite Nano Fibrous Scaffold for Tissue Engineering Applications by Electrospinning Method. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (3), 1228–1235. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.015>.
156. Ran, J.; Hu, J.; Chen, L.; Shen, X.; Tong, H. Preparation and Characterization of Gelatin/Hydroxyapatite Nanocomposite for Bone Tissue Engineering. *Polym. Compos.* **2015**, *38* (8), 1579–1590. <https://doi.org/10.1002/pc.23725>.
157. Costescu, A.; Pasuk, I.; Ungureanu, F.; Dinischiotu, A.; Costache, M.; Huneau, F.; Galaup, S.; le Coustumer, P.; Predoi, D. Physico-Chemical Properties Of Nano-Sized Hexagonal Hydroxyapatite Powder Synthesized By Sol-Gel. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* **2010**, *5* (4), 989–1000.
158. Zehetmeyer, G.; Meira, S. M. M.; Scheibel, J. M.; De Oliveira, R. V. B.; Brandelli, A.; Soares, R. M. D. Influence of Melt Processing on Biodegradable Nisin-PBAT Films Intended for Active Food Packaging Applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **2016**, *133* (13), 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.43212>.
159. Kashi, S.; Gupta, R. K.; Kao, N.; Bhattacharya, S. N. Electrical, Thermal, and Viscoelastic Properties of Graphene Nanoplatelet/Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) Biodegradable Nanocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.* **2016**, *133* (27). <https://doi.org/10.1002/app.43620>.
160. Teixeira, B. N.; Aprile, P.; Mendonça, R. H.; Kelly, D. J.; Thiré, R. M. da S. M. Evaluation of Bone Marrow Stem Cell Response to PLA Scaffolds Manufactured by 3D Printing and Coated with Polydopamine and Type I Collagen. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2019**, *107* (1), 37–49. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34093>.
161. Fukushima, K.; Rasyida, A.; Yang, M. C. Characterization, Degradation and Biocompatibility of PBAT Based Nanocomposites. *Appl. Clay Sci.* **2013**, *80–81*, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.04.015>.
162. Zhou, C.; Liu, L.; Wang, W.; Zhao, L.; Li, M.; Li, J.; Zhang, B.; Han, Y.; Wang, L.; Zhang, Z. Fabrication and Properties of PLA/Nano-HA Composite Scaffolds with

Balanced Mechanical Properties and Biological Functions for Bone Tissue Engineering Application. *Nanotechnol. Rev.* **2021**, *10* (1), 1359–1373. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2021-0083>.

163. Liu, J.; Wu, S.; Ma, J.; Liu, C.; Dai, T.; Wu, X.; Zhao, H.; Zhou, D. Polycaprolactone/Gelatin/Hydroxyapatite Electrospun Nanomembrane Materials Incorporated with Different Proportions of Attapulgitte Synergistically Promote Bone Formation. *Int. J. Nanomedicine* **2022**, *17* (August), 4087–4103. <https://doi.org/10.2147/IJN.S372247>.

8. Perspectivas Futuras

Como perspectivas deste trabalho, pretende-se:

- Avaliar a rugosidade dos arcabouços obtidos para complementar os resultados biológicos, por meio da técnica de microscopia de força atômica;
- Realizar ensaios de reparos ósseos *in vivo* em colaboração com o laboratório LAMAD, para avaliar quais componentes conseguem agir de forma sinérgica e reparar o tecido estudado.

Anexo 1 - Produção Científica

Artigos Aceitos e Publicados

Menezes, F. C.; Scheibel, J. M., Balbinot, G. S., Miranda, G. M., Leitune, V. C. B., Collares F. M., Soares, R. D., Bioactive materials-coated polybutylene-adipate-co-terephthalate 3D-printed scaffolds for application in the bone tissues engineering. *Polymers for Advanced Technologies*, **2024**, vol. 35, Issue 4. <https://doi.org/10.1002/pat.6373>.

Menezes, F. C.; Siqueira, N. M., Fung, S., Scheibel, J. M., Moura, D. J., Guvendiren, M., Kohn, J., Soares, R. D., Effect of crosslinking, hydroxyapatite addition, and fiber alignment to stimulate human mesenchymal stem cells osteoinduction in polycaprolactone-based electrospun scaffolds, *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 33, **2022**, 2682-2695. <https://doi.org/10.1002/pat.5723>.

Scheibel, J. M.; Menezes, F. C.; Reginatto, C. L. ; Silva, C. ; Moura, D. J.; Rodembusch, F. ; Bussamara, R.; Weibel, D. E. ; Soares, R. M. D.. Antibiotic-loaded wound dressings obtained from the PBAT -gentamicin combination. *Journal Of Applied Polymer Science*. **2021**, 00, 50633. <https://doi.org/10.1002/app.50633>

Sanguinet, E. O.; Siqueira, N. M.; Menezes, F. C.; Rasia, G. M.; Lothhammer, N.; Soares, Rosane M. D.; Meirelles, F. V.; Bressan, F. F.; Bos-Mikich, A. Interaction of fibroblasts and induced pluripotent stem cells with poly(vinyl alcohol)-based hydrogel substrates. *Journal of Biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials*, **2019**, .2019, 1 - 11. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34439>

Dias, F. T. G.; Ingracio, A. R.; Nicoletti, N. F.; Menezes, F. C.; Dall Agnol, L.; Marinowic, D. R.; Soares, R. M. D.; Da Costa, J. C.; Falavigna, A.; Bianchi, O. Soybean-modified polyamide-6 mats as a long-term cutaneous wound covering. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, **2019**, 99, 957 – 968. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.019>.

Apresentação Congressos/Trabalhos

Belmonte, Guilherme Kretzmann; Menezes, F. C. ; Peyrot, A. ; Simon, D. A. ; Chagas, G. R. ; Weibel, D. E.. UV Treatment Induce Grafting on Synthetic 3D-Printed Polymer. In: Journées Méditerranéennes des Jeunes Chercheurs - 6th Mediterranean Young Researchers Days, 2018, Marseille, France. 6th Mediterranean Young Researchers Days, 2018.

Menezes, F. C.; Belmonte, G. K.; Reginatto, C. L.; Trindade, F. G.; Moura, D. J.; Weibel, D. E. e Soares, R. M. D. Avaliação de viabilidade celular e índice de danos em protótipos poliméricos obtidos por impressão 3D. In: XV Congresso Brasileiro de Polímeros – CBPol, 2019, Bento Gonçalves.

Belmonte, Guilherme Kretzmann; Menezes, F. C. ; Peyrot, A. ; Simon, D. A. ; Chagas, G. R. ; Weibel, D. E. . Surface Modification of 3D-Printed PBAT by Ultraviolet Radiation. In: 4th International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry and Materials (N.I.C.E. Conference 2018), 2018, Nice, France, 2018 Book, 2018.