UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

TALITA VILLA BARBOSA

Fabricação de *scaffolds* de polímero reforçado para aplicação na bioengenharia tecidual

São Carlos
2018

TALITA VILLA BARBOSA

Fabricação de *scaffolds* de polímero reforçado para aplicação na bioengenharia tecidual

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientadora: Márcia Cristina Branciforti

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

V238f

Villa Barbosa, Talita
Fabricação de scaffolds de polímero reforçado para aplicação na bioengenharia tecidual / Talita Villa Barbosa; orientadora Márcia Cristina Branciforti. São Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. técnica aditiva por extrusão. 2. poli(e-caprolactona). 3. Biovidro® 45S5. 4. nanofibra de celulose. 5. manufatura aditiva. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **TALITA VILLA BARBOSA.**

Título da dissertação: "Fabricação de scaffolds de polímero reforçado para aplicação na bioengenharia tecidual".

Data da defesa: 10/12/2018.

Comissão Julgadora:	Resultado:
Profa. Dra. **Marcia Cristina Branciforti (Orientadora)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	APROVADA
Profa. Dra. **Zilda de Castro Silveira** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovada
Dra. **Janaina de Andrea Dernowsek** (Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer/CTI)	Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:
Prof. Associado **Rafael Salomão**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Márcia Cristina Branciforti pela orientação, confiança, ensinamentos e paciência ao longo do período do meu mestrado.

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

À Universidade de São Paulo, à Escola de Engenharia de São Carlos e, especialmente, ao Departamento de Engenharia de Materiais e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de realizar este trabalho.

A todos os funcionários e amigos do Departamento de Engenharia de Materiais por todo o auxílio e pelos bons momentos vividos durante o período de mestrado.

Aos técnicos Ricardo Gomes e Wagner Correr pela disponibilidade, paciência e conhecimento técnico.

Ao meu amigo e colega de Laboratório Raul Julian Revelo Tobar, por toda a orientação durante o processo de preparação do biovidro, por todos os ensinamentos, paciência e disponibilidade durante o período de realização desse projeto.

A todos os meus amigos do Grupo de Pesquisa de Materiais Poliméricos.

Ao Professor Doutor Eduardo Ferreira Bellini, por disponibilizar o Laboratório de Materiais Cerâmicos para o processo de fabricação de biovidro, por todas as conversas, discussões e ensinamentos.

Ao Professor Doutor Edgar Dutra Zanotto por disponibilizar o Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) para o processo de queima do biovidro.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Fortulan por disponibilizar o Laboratório de Tribologia e Compósitos (LCT) para o processo de moagem do biovidro.

Ao Professor Doutor Valtencir Zucolotto por disponibilizar o espaço do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxocologia (GNano) para realizar as medidas do tamanho de partícula do biovidro. À DoutoraJuliana Cancino Bernardi e à Doutora Jaqueline Pérola de Souza pelo auxílio na realização das medidas no GNano, pelas conversas e ensinamentos.

Aos funcionários e aos amigos que conheci na Núcleo de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (DT3D–CTI). Ao Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva e ao Msc. Paulo Inforçatti Neto pela disponibilidade, atenção e apoio durante a realização do trabalho.

À Doutora Janaína de Andrèa Dernowsek pela ajuda, ensinamentos, paciência, risadas e excelentes conversas, obrigada!

À Prof.ª Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araujo, por disponibilizar os equipamentos para realização do ensaio de viabilidade celular do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM-DCF) da Universidade Federal de São Carlos.

A todos os funcionários e amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM-DCF) da Universidade Federal de São Carlos. Em especial, à Caroline Faria Bellani, Bruna Carla Casali e Bianca Pachane por toda dedicação, paciência e disposição para me ensinar as técnicas de análise biológica *in vitro*, essenciais para o projeto em questão.

Aos meus pais, Osmar e Marilda, por toda a dedicação, paciência, conversas, pelo amor incondicional e por serem meus maiores exemplos. Muito obrigada!

Aos meus padrinhos e avós Eleutério (*in memorian*) e Maria, pelo amor incondicional, orações e dedicação durante todos os dias da minha vida. Muito obrigada!

A todos os meus amigos. Em especial, ao meu amigo Leonardo Sambini Longhini, pela amizade, paciência, conversas, risadas e companheirismo diário.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

BARBOSA, T. V. **Fabricação de *scaffolds* de polímero reforçado para aplicação em bioengenharia tecidual** 88p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

No presente trabalho, suportes tridimensionais (*scaffolds*) de polímero reforçado foram gerados por meio da técnica aditiva por extrusão utilizando duas estratégias de deposição e, posteriormente, foram avaliados morfologicamente, mecanicamente e por meio de ensaios *in vitro*. Como matriz polimérica do compósito utilizou-se a poli(ε-caprolactona) e como reforço, o Biovidro® 45S5. De forma a melhorar a interação interfacial entre a matriz polimérica e a cerâmica, avaliou-se a incorporação de nanofibra de celulose ao biovidro. Os *scaffolds* foram fabricados seguindo dois métodos diferentes. O primeiro consistiu no pré-processamento do material em extrusora monorrosca, seguida de extrusão direta na impressora 3D experimental Fab@CTI. O segundo consistiu em um único processo de extrusão diretamente no cabeçote de extrusão. A caracterização química do biovidro por espectroscopia de fluorescência de raios-x mostrou eficiência na preparação da biocerâmica e a caracterização da distribuição do tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmica mostrou a obtenção de partículas submicrométricas. Os *scaffolds* foram caracterizados morfologicamente pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, e, pôde-se notar a eficiência na fabricação de geometrias com arquitetura $0^0/90^0$ e tamanho de poros adequado para a aplicação na engenharia tecidual. Os ensaios mecânicos de compressão evidenciaram melhoras na rigidez com o aumento do teor de biovidro, no caso dos materiais pré-processados por extrusão, além da influência da nanofibra de celulose na melhoria das propriedades mecânicas. Os ensaios biológicos *in vitro* mostraram que os *scaffolds* suportam proliferação celular e que o biovidro é responsável pela maior deposição de sais de cálcio extracelular, facilitando a interação do material sintetizado com o tecido ósseo.

Palavras-chave: técnica aditiva por extrusão, poli(ε-caprolactona), Biovidro® 45S5, nanofibra de celulose, manufatura aditiva.

ABSTRACT

BARBOSA, T. V. **Manufacture of reinforced polymer scaffolds for application in tissue bioengineering** 88p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

In the present work, scaffolds of reinforced polymer were generated by means of the extrusion additive technique using two strategies of deposition and, later, were evaluated morphologically, mechanically and by means of in vitro tests. Poly (ε-caprolactone) was used as the polymer matrix of the composite and as a booster, Bioglass® 45S5. In order to improve the interfacial interaction between the polymer matrix and the ceramic, the incorporation of cellulose nanofiber to the bioglass was evaluated. The scaffolds were manufactured following two different methods. The first consisted of the pre-processing of the extruded extruder material followed by direct extrusion into the experimental Fab@CTI 3D printer. The second consisted of a single extrusion process directly on the extrusion head. The chemical characterization of the bioglass by x-ray fluorescence spectroscopy showed efficiency in the preparation of the bioceramics and the characterization of the particle size distribution by dynamic light scattering showed the submicrometric particles. The scaffolds were characterized morphologically by the scanning electron microscopy technique, and it was noted the efficiency in the manufacture of geometries with architecture 00/900 and pore size suitable for application in tissue engineering. The mechanical compression tests showed improvements in stiffness with increasing bioglass content in the case of pre-processed materials by extrusion, as well as the influence of cellulose nanofiber in improving mechanical properties. Biological assays have shown that scaffolds support cell proliferation and that bioglass is responsible for the increased deposition of extracellular calcium salts, facilitating the interaction of the synthesized material with the bone tissue.

Keywords: extrusion additive technique, poly (ε-caprolactone), Bioglass® 45S5, cellulose nanofiber, additive manufacturing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático da estrutura óssea a nível celular. 26
Figura 2 - Corte grosso de um osso seco, ilustrando o osso compacto e o osso esponjoso. 27
Figura 3 - Propriedades do osso cortical e trabecular. 29
Figura 4 - Polimerização da poli(ε-caprolactona) por abertura de anel. 33
Figura 5 - Diagrama de composição para ligação óssea. 34
Figura 6 - Ilustração esquemática da sequência de reação que conduz à formação de HCA de acordo com Hench e colaboradores. 35
Figura 7 - Representação esquemática da estrutura hierárquica da celulose. 37
Figura 8 - Representação esquemática de patente do cabeçote vertical de extrusão. 39
Figura 9 - Variáveis que definem a geometria do *scaffold*: (a) vista superior, (b) vista frontal e (c) perspectiva do *scaffold*. 41
Figura 10 - Diagrama esquemático de uma extrusora monorrosca. 42
Figura 11 - Geometria convencional de uma rosca de extrusão. 42
Figura 12 - Desenho de patente da vista em perspectiva frontal no mini-moinho vibratório. 46
Figura 13 - Imagem da impressora 3D Fab@CTI 1) Controlador de temperatura; 2) Plataforma de impressão; 3) Cabeçote por rosca de extrusão; e 4) Motor. 48
Figura 14 - Dimensionamento da rosca de extrusão. 48
Figura 15 - Construção de *scaffold* retangular na trajetória de deposição 0º/90º. 50
Figura 16 - Disposição dos extratos em placa de 96 poços. 55
Figura 17 - Esquema de superposição das imagens obtidas em microscopia de epi-fluorescência. 57
Figura 18 - Distribuição do tamanho médio de partículas do Biovidro® 45S5 após processo de moagem. 60
Figura 19 - Micrografias MEV das visões superiores (plano xy) dos *scaffolds* fabricados: (a) PCL; (b) EXPCL; (c) PCL+ 2,5 % BV; (d) EX + 2,5 % BV; (e) PCL + 5 % BV; (f) EXPCL + 5 % BV; (g) PCL + 2,5 % BV/NFC; (h) EXPCL + 2,5 % BV/NFC; (i) PCL + 5 % BV/NFC; (j) EXP + 5% BV/NFC. 63
Figura 20 - Micrografias MEV de seções transversais dos *scaffolds* fabricados: (a)

PCL; (b) EXPCL; (c) PCL+ 2,5 % BV; (d) EXPCL + 2,5 % BV; (e) PCL + 5 % BV; (f) EXPCL + 5 % BV; (g) PCL + 2,5 % BV/NFC; (h) EXPCL + 2,5 % BV/NFC; (i) PCL + 5 % BV/NFC; (j) EXPCL + 5 % BV/NFC. 66
Figura 21 - Distribuição e dispersão das partículas de Biovidro 45S5 nos scaffolds fabricados: (a) PCL; (b) EXPCL; (c) PCL + 5 % BV; (d) EXPCL + 5 % BV; (e) PCL + 2,5 % BV/NFC; (f) EXPCL + 2,5 % BV/NFC; (g) EXPCL + 5 % BV/NFC; ; (h) EXPCL + 5 % BV/NFC. 68
Figura 22 - Módulo de elasticidade dos *scaffolds* com diferentes composições de Biovidro® 45S5 e nanofibras de celulose, extrudados diretamente no cabeçote de extrusão. 70
Figura 23 - Módulo de elasticidade calculado para os *scaffolds* com diferentes composições de Biovidro® 45S5 e nanofibras de celulose pré-extrudados em extrusora monorosca. seeguida de extrusão no cabeçote de extrusão 71
Figura 24 - Viabilidade celular de células cultivadas nos diferentes extratos de materiais extrudados diretamente em cabeçote de extrusão. Grupos representam a quantidade de dias de cultivo. Cada coluna representa a média ± desvio padrão para n = 3 e *p< 0,05. 73
Figura 25 - Viabilidade celular de células cultivadas nos diferentes extratos de materiais previamente extrudados em extrusora monorosca seguida de extrusão em cabeçote de extrusão. Grupos representam a quantidade de dias de cultivo. Cada coluna representa a média ± desvio padrão para n = 3 e *p < 0,05. 73
Figura 26 - Fotografias obtidas por câmera equipada com lente macro de amostras dos *scaffolds* e do controle, após 21 dias de cultivo com osteoblastos e respectiva coloração com vermelho de alizarina. (a) EXPCL; (b) EXPCL + 5% BV; (c) PCL+ 5 % BV/NFC; (d) Controle. 75
Figura 27 - Imagens de Epi-fluorescência de osteoblastos cultivados nos *scaffolds*: (a) e (b) PCL; (c) e (d) PCL + 2,5% BV; (e) e (f) PCL + 5% BV; (g) e (h) PCL + 2,5% BV/NFC; (i) e (j) PCL + 5% BV/NFC; (k) e (l) Controle (sem células). 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades do osso cortical e trabecular. 28
Tabela 2 - Caminho de impressão 3D para diferentes geometrias. 40
Tabela 3 - Variáveis do software BioScaffolds PG. 41
Tabela 4 - Formulação e concentração em massa para o preparo do Biovidro® 45S5. 45
Tabela 5 - Composição das amostras obtidas no Método 1 e no Método 2 com concentração em % em peso. 47
Tabela 6 - Parâmetros do processamento definidos para a fabricação dos *scaffolds*. 50
Tabela 7 - Composição química do Biovidro® 45S5 sintetizado comparada com dados da literatura. 58
Tabela 8 - Diâmetro médio do fio extrudado. 64
Tabela 9 - Tamanho médio dos poros. 69

LISTA DE SIGLAS

3D	Tridimensional
AG	Tamanho do poro
ASTM	*American Society for Testing and Materials*
BSA	Solução de albumina bovina
BV	Biovidro
CTI	Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer
DLS	Espalhamento de luz dinâmica
DMEN	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
FBS	Soro fetal bovino
FRX	Espectroscopia de fluorescência de raios-x
HCA	Hidroxicarbonato apatita
ISO	*International Organizations for Standartisation*
LC	Líquidos corporais
LCT	Laboratório de Caracterização Tecnológica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NE	Número de espaços
NFC	Nanofibra de celulose
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PDLLA	Poli (DL-ácido láctico)
PHB	Poli-3-hidroxibutirato
PHBV	Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)
PLDLA	Poli(L-co-D, L ácido láctico)

PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PLLA	Poli (L-ácido láctico)
PVB	Polivinilbutiral
STL	Estereolitografia
TCP	Tricálcio fosfato
WS	Silicato de cálcio

LISTA DE SÍMBOLOS

σ	Tensão principal de compressão (MPa)
ε	Deformação
AG	Tamanho do poro (μm)
d	Diâmetro do filamento (μm)
e	Espaçamento entre fios extrudados (μm)
E	Módulo de elasticidade (MPa)
$\mathbf{M_w}$	Peso molecular médio (g/mol)
NL	Número de camadas
PF	Perda ao fogo (%)
PH	Espessura da camada (mm)
$\mathbf{T_g}$	Temperatura de transição vítrea (ºC)
$\mathbf{T_m}$	Temperatura de fusão (ºC)
W	Largura do *scaffold* (mm)

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....23

2.OBJETIVOS.....25

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....26

3.1 TECIDO ÓSSEO.....26

3.2 ENGENHARIA TECIDUAL.....28

3.3 BIOMATERIAIS.....29

3.3.1 Classificação dos Biomateriais.....30

3.4 *SCAFFOLDS* DE COMPÓSITO POLÍMERO/CERÂMICA.....31

3.5 MATERIAIS.....32

3.5.1 Poli (ε-caprolactona).....32

3.5.2 Biovidro® 45S5.....33

3.5.3 Nanofibras de Celulose (NFC).....36

3.6 CONCEITOS SOBRE MANUFATURA ADITIVA.....37

3.7 TÉCNICA ADITIVA POR EXTRUSÃO.....38

3.8 BIOSCAFFOLDS PG.....39

3.9 PROCESSAMENTO POR EXTRUSÃO MONORROSCA.....41

4.METODOLOGIA.....44

4.1 MATERIAIS.....44

4.2 PREPARO DO BIOVIDRO® 45S5 (BV).....44

4.2.1 Formulação e queima das matérias-primas.....44

4.2.2 Preparo das barbotinas e moagem.....45

4.3 PREPARAÇÃO DOS *SCAFFOLDS*.....46

4.3.1 Preparo das amostras.....46

4.3.2 Processamento em extrusora monorosca.....47

4.3.3 Geração dos *scaffolds* pela técnica aditiva por extrusão.....47

4.3.4 Parâmetros de Processo.....49

4.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....51

4.4.1 Caracterização da composição química do Biovidro® 45S5.....51

4.4.2 Determinação da distribuição de tamanho médio das partículas do Biovidro® 45S5.....51

4.4.3 Caracterização morfológica dos *scaffolds*.....52

4.4.4 Ensaio mecânico de Compressão.....52

4.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO 53
4.5.1 Citoxicidade e viabilidade celular 53
4.5.2 Biomineralização in vitro 55
4.5.3 Microscopia de Epi-fluorescência 56
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO 58
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOVIDRO® 45S5 58
5.1.1 Caracterização química 58
5.1.2 Distribuição de tamanho médio das partículas 59
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS *SCAFFOLDS* 60
5.3.1 Análise Morfológica 60
5.3.2 Propriedade Mecânica – Ensaio de Compressão 69
5.3.2.1Compósitos extrudados diretamente no cabeçote de extrusão 69
5.3.2.2 Compósitos pré-extrudados em extrusora monorosca seguida de extrusão no cabeçote de extrusão 70
5.4 ANÁLISE BIOLÓGICA IN VITRO DOS *SCAFFOLDS* 72
5.4.1 Citotoxicidade e viabilidade celular 72
5.4.1.1Compósitos extrudados diretamente no cabeçote de extrusão ... 72
5.4.1.2 Compósitos pré-extrudados em extrusora monorosca seguida de extrusão no cabeçote de extrusão 73
5.4.2 Biomineralização 74
5.4.3 Microscopia de Epi-fluorescência 75
6.CONCLUSÕES 78
7.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 80
8.REFERÊNCIAS 81

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população, há o crescimento na ocorrência de doenças ósseas, como fraturas e/ou osteoporose e os custos para o tratamento desse tipo de doença também se elevam [1]. O tecido ósseo tem capacidade natural de se regenerar, no entanto, algumas lesões podem impedir as funções ósseas normais, levando à necessidade de enxertia óssea ou inserção de biomateriais ou próteses. Contudo, submeter pacientes idosos a procedimentos cirúrgicos pode aumentar o risco de infecção, a possibilidade de transmissão de doenças ou rejeição. Novas soluções são necessárias a fim de superar as abordagens atuais para o tratamento desse tipo de doença [2].

A engenharia tecidual é uma área do conhecimento no qual são desenvolvidos ambientes propícios para o crescimento e diferenciação celular de tecidos vivos que sofreram algum tipo de dano. Para tal são criadas estruturas tridimensionais de materiais não nocivos ao organismo chamadas *scaffolds,* que são suportes porosos que mimetizam a matriz extracelular de tecidos [3]. O teste de diversos materiais é importante para que se tenha uma ampla gama de opções na solução para diferentes tecidos. Atualmente, tem-se optado por *scaffolds* de compósitos de polímeros biocompatível e cerâmicas bioativas com a finalidade de melhorar a estabilidade mecânica e melhorar a interação com o tecido biológico [4].

A poli(ε-caprolactona) (PCL) é um polímero termoplástico, semicristalino, hidrofóbico, biodegradável, biocompatível e biorreabsorvível, que vem sendo bastante citado nos estudos que envolvem o tema engenharia tecidual [5–8], pois apresenta propriedades reológicas e viscoelásticas superiores quando comparada a outros polímeros biorreabsorvíveis, apresentando assim melhor processabilidade [3].

Os vidros bioativos são materiais inorgânicos que, quando implantados no corpo humano, são capazes de formar uma ligação com o tecido ósseo. A primeira tentativa de desenvolver um material como esse foi feita por Larry L. Hench em 1969, o Biovidro® 45S5. Esse vidro tem a seguinte composição em massa: 45% SiO_2, 24,5 Na_2O, 24,5 CaO, 6% P_2O_5 [9].

Estudos têm demonstrado que combinar celulose e Biovidro® 45S5 melhora a estabilidade mecânica e a resistência à compressão do material, além de manter a biocompatibilidade quando submetido à testes *in vitro* [10–12]. Nesse trabalho, foi

proposta uma estratégia para melhorar as propriedades do compósito estudado por meio da adição de nanofibras de celulose (NFC). Esses materiais são derivados da celulose, polímero de fonte renovável mais abundante na natureza [13]. Podem ser chamados também de celulose microfibrilar ou ainda celulose microfibrilada [14]. É importante também dizer que as nanofibras são interessantes para uso na área médica, sendo essas não tóxicas, biodegradáveis e biocompatíveis [15]. Estudos recentes têm evidenciado as boas propriedades biológicas desse material, com não citoxicidade quando em baixas concentrações [16–18].

Para confeccionar os *scaffolds* foi escolhida a técnica de manufatura aditiva, na qual o protótipo é obtido de maneira precisa. Tal técnica consiste na deposição de material camada a camada, construindo assim peças tridimensionais geradas a partir de *softwares* computacionais [19]. A impressora 3D experimental disponível no Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) tem como vantagem o processamento da matéria-prima na forma de pó. O mini-cabeçote de extrusão utilizado no projeto [20] é adequado para a aplicação pretendida por apresentar alimentação contínua, melhor controle de deposição e possibilidade de extrusão de múltiplos materiais de forma controlada [21]. No Brasil, foi recentemente desenvolvido um *software* para facilitar a confecção de *scaffolds* a partir de impressão 3D, o *BioScaffold PG*®. Esse programa permite que o caminho de deposição do material seja contínuo, evitando hiatos de construção entre as camadas e possíveis defeitos que possam prejudicar as propriedades das peças resultantes [22].

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é o desenvolvimento de *scaffolds* de PCL reforçados com Biovidro® 45S5 e nanofibras de celulose, visando aplicação em engenharia tecidual. Para este fim, os *scaffolds* foram manufaturados de duas maneiras diferentes; uma delas consiste na pré-mistura na extrusora convencional seguida da mistura no cabeçote de extrusão da impressora 3D e a outra consiste na mistura direta no cabeçote de extrusão da impressora 3D, ambos com rosca simples. Foi avaliada a eficiência de mistura do cabeçote de impressão e os *scaffold*s fabricados foram caracterizados quanto suas propriedades mecânicas, morfológicas e comportamento biológico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo formado por células e matriz extracelular (matriz óssea), como mostrado na Figura 1. Comparado a outros tecidos, o tecido ósseo é duro, rígido e resistente [23]. Principal constituinte do esqueleto, o tecido ósseo é suporte para outros tecidos e protege órgãos vitais. O osso também funciona como um depósito de íons, como os íons de cálcio e fosfato, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada [24].

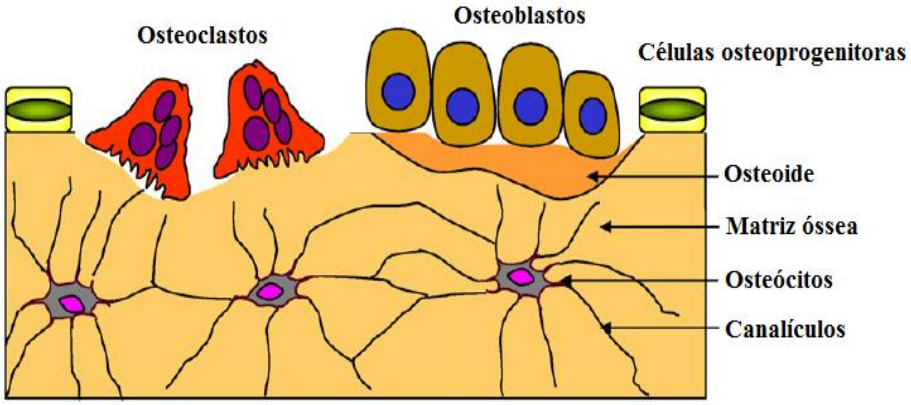


Figura 1 - Diagrama esquemático da estrutura óssea a nível celular.

Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, 2009, p. 1066 [23].

Os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos são os tipos de células que constituem o tecido ósseo. Os osteócitos são os principais constituintes da matriz extracelular; são encontrados em pequenas lacunas (canalículos), interligadas entre si para permitir a troca de íons e moléculas. Essas células têm baixa atividade sintética, mas são indispensáveis na manutenção da matriz óssea. Os osteoblastos são encontrados nas superfícies ósseas. São células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea e podem fazer parte da mineralização da matriz. Quando o osteoblasto é aprisionado pela matriz extracelular recém-sintetizada, passa a ser chamado de osteócito. Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e extensamente ramificadas. Essas células foram originadas de precursores mononucleados provenientes da medula óssea. Essas células reabsorvem o tecido ósseo, participando nos processos de remodelação dos ossos [24].

A matriz óssea é composta de partes orgânica e inorgânica. A fatia inorgânica é composta principalmente por fosfato e cálcio, mas também é possível encontrar bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. O cálcio e o fósforo formam cristais de hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Os cristais da matriz óssea mostram imperfeições e não são exatamente iguais à hidroxiapatita encontrada nos minerais e rochas. A parte orgânica da matriz é formada por fibras de colágeno, principalmente de colágeno do tipo I, por proteoglicanos e glicoproteínas. A associação das fibras de colágeno e da hidroxiapatita é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. Se a parte inorgânica é retirada, o osso passa a apresentar elevada flexibilidade; se a parte orgânica é retirada, o osso passa a ser quebradiço [24]. Pode-se afirmar, portanto, que o osso é um compósito que combina cerâmica (fosfato de cálcio ou hidroxiapatita) e polímero (colágeno).

Ao observar a superfície de um osso, é possível notar que existem duas regiões bastante distintas, como pode ser visto na Figura 2. A porção interior tem maior incidência de poros, sendo então chamada de osso esponjoso ou trabecular. Em contrapartida, a região externa não apresenta cavidades visíveis e, dessa maneira, é chamada de osso compacto ou cortical. A porosidade tem relação direta com as propriedades mecânicas do osso; o aumento da porosidade diminui a resistência e a massa do material [24].

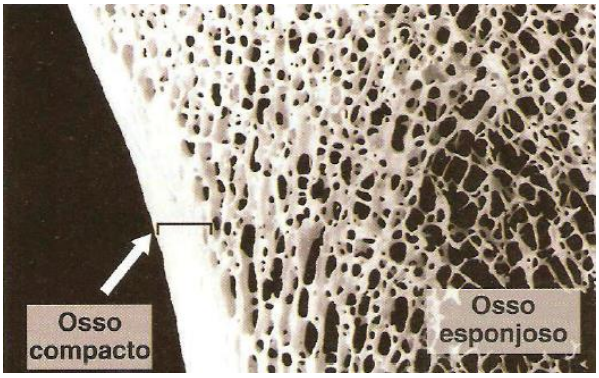


Figura 2 - Corte grosso de um osso seco, ilustrando o osso compacto e o osso esponjoso.

Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008, p. 139 [24].

As propriedades mecânicas do osso variam de acordo com a localização no corpo. Os ossos apresentam estrutura anisotrópica e, portanto, as medidas mecânicas variam conforme a direção escolhida na análise[25]. A Tabela 1 mostra algumas propriedades desses dois ossos cortical e trabecular.

Tabela 1 - Propriedades do osso cortical e trabecular.

Propriedade	Osso Cortical	Osso Trabecular	Fonte
Resistência à compressão (MPa)	100-230	2-12	[26]
Módulo de elasticidade (GPa)	8,7-14,1	0,02-0,5	[27,28]
Densidade (Kg/m^3)	1800-2000	100-900	[28,29]

Fonte: Autoria própria.

3.2 Engenharia Tecidual

O campo da engenharia tecidual é multidisciplinar e engloba as áreas de conhecimento de medicina, engenharia mecânica, engenharia e ciência dos materiais e genética. O termo Engenharia Tecidual foi oficialmente criado em 1988 durante o *Workshop* da Fundação Nacional de Ciência para atribuir uma nomenclatura ao conceito de “aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências da vida em direção à compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos de mamíferos normais e patológicos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido” [30].

A unidade básica para o desenvolvimento da engenharia tecidual é o *scaffold*. Os *scaffolds* funcionam como suportes que devem propiciar um ambiente que favoreça a adesão, diferenciação e proliferação celular, de modo a garantir a formação de um novo tecido *in vitro*. Além disso, é indispensável que os *scaffolds* tenham propriedades mecânicas semelhantes ao tecido danificado, sejam biocompatíveis e biodegradáveis [30,31].

O esquema da Figura 3 mostra a abordagem da engenharia tecidual. Primeiramente, células obtidas de um paciente são isoladas em um meio de cultura bidimensional ou são implantadas diretamente no *scaffold* de modo que essas células possam se diferenciar e formar um tecido novo. Os *scaffolds* têm estrutura de poros interconectados de forma a garantir a penetração celular e permitir a adequada difusão de nutrientes para as células [30,32].

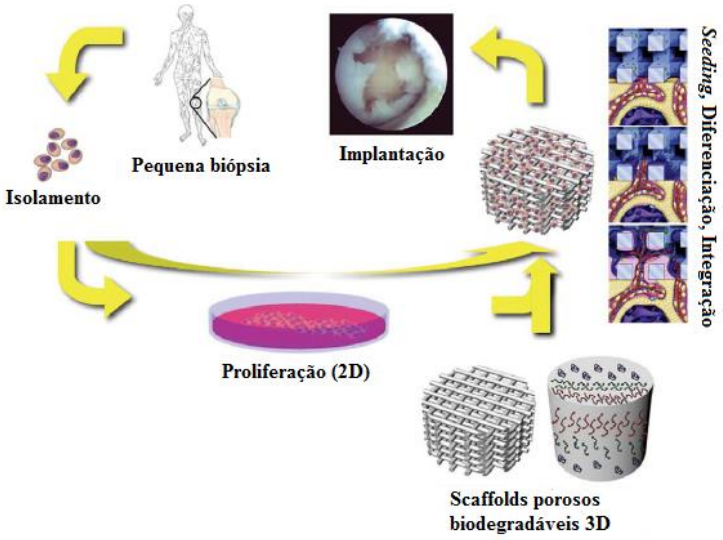


Figura 3 - Propriedades do osso cortical e trabecular.

Fonte: Adaptado de MORONI, ELISSEFF, 2008, p. 45[32].

3.3 Biomateriais

Ao longo dos anos, procurou-se um significado que fosse coerente para a palavra biomaterial. Em 1999, Williams propôs uma definição na qual um biomaterial é “um material destinado a formar uma interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano”. Apesar do consenso na definição dada em 1999, a ideia associada ao termo “biomaterial” ainda foi discutida e uma nova proposta para descrevê-lo foi novamente sugerida por Williams em 2009, na qual “um biomaterial é uma substância desenvolvida para adquirir uma forma, na qual tanto sozinha quanto parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, na medicina humana ou veterinária” [33].

As propriedades físico-químicas e mecânicas dos biomateriais devem ser analisadas antes da aplicação clínica dos mesmos. Devem ser considerados aspectos como a cristalinidade do material, o tamanho e a forma das partículas, módulo elástico, resistência à compressão, flexão, torção e corrosão. Essas propriedades somadas ao ambiente mecânico influenciam diretamente no índice de reabsorção, assim como na restrição de aplicação na área médica [34,35].

O primeiro passo, para que se possa obter um *scaffold* com características aceitáveis para uso em engenharia tecidual óssea, está na escolha correta dos biomateriais a serem utilizados.

3.3.1 Classificação dos Biomateriais.

Segundo o trabalho de revisão bibliográfica de Dalapicula e colaboradores (2006) [34], os biomateriais podem ser classificados de acordo com a origem, o mecanismo de ação e o comportamento fisiológico. Quanto à origem, podem ser classificados em:

a) Autógenos: obtidos do próprio paciente;
b) Aloenxertos ou enxertos homógenos: obtidos em bancos de ossos humanos;
c) Xenoenxertos ou enxertos heterogêneso: são obtidos de doadores de outras espécies, como exemplo o osso bovino; e
d) Aloplásticos: têm origem sintética.

Quanto ao mecanismo de ação, os biomateriais podem ser osteoindutores, osteocondutores, osteogênicos ou ostopromotores, sendo que:

a) Osteoindutores: são os biomateriais capazes de atrair células mesenquimais que, posteriormente, se diferenciarão em osteoblastos;
b) Osteocondutores: materiais que funcionam como estrutura para a proliferação de vasos sanguíneos e, assim, permitir a formação óssea;
c) Osteogênicos: materiais que promovem o crescimento ósseo por apresentarem células viáveis transferidas para o interior do osso;
d) Osteopromotores: são materiais que utilizam meios físicos para isolamento de um local anatômico, permitindo a seleção e proliferação de um grupo de células, preferencialmente osteoblastos a partir do leito do receptor e, impedem fatores que podem inibir a regeneração;

Os biomateriais também podem ser classificados conforme a maneira com que interagem com os tecidos adjacentes. Eles podem ser biotoleráveis, bioinertes ou bioativos, sendo:

a) Biotoleráveis: não estabelecem osseointegração verdadeira. A formação

do tecido é interpretada como uma resposta do tecido ao material;

b) Bioinertes: exercem contato direto com o tecido ósseo;
c) Bioativos: estabelecem osseointegração direta e interagem com os tecidos vizinhos de forma a estimular a proliferação de células e a síntese de produtos específicos para a proliferação celular.

3.4 *Scaffolds* de compósito polímero/cerâmica

Para a manufatura de peças para uma aplicação específica, tem-se observado cada vez mais o uso de materiais combinados em contrapartida aos materiais isolados. Do ponto de vista da ciência de materiais, um único material pode não fornecer todas as propriedades necessárias para uma determinada aplicação, logo a utilização de um material compósito é uma excelente alternativa para alcançar melhor desempenho nas peças finais [36].

Com a intenção de satisfazer o maior número de exigências para confecção de *scaffolds*, a combinação polímero-cerâmica surge com uma excelente alternativa, primeiramente devido ao fato de que o tecido ósseo é a combinação de um polímero (colágeno) e uma cerâmica (hidroxiapatita)[36]. A literatura mostra que a combinação de polímeros e cerâmicas tem sido muito estudada para fabricação de *scaffolds* para engenharia tecidual [4,37]. Os materiais cerâmicos como a hidroxiapatita, o tricálcio fosfato (TCP), cerâmicas a base de silicato de cálcio (WS) e biovidros (BV)são comumente empregados nessa aplicação. Os polímeros geralmente utilizados em combinação com material cerâmico são: poli (ε-caprolactona) (PCL), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli (L-ácido láctico) (PLLA), poli (DL-ácido láctico) (PDLLA), poli(L-co-D, L ácido láctico) (PLDLA), poli-3-hidroxibutirato (PHB) e poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) [37].

A fabricação de *scaffolds* de PCL e Biovidro® 45S5 tem sido reportada na literatura [38–40] como uma boa alternativa para uso na engenharia tecidual.A PCL é um polímero de baixa taxa de degradação, enquanto o Biovidro® 45S5 apresente elevada bioatividade. A combinação desses materiais possibilita a manufatura de *scaffolds* capazes de se adaptar aos processos naturais de regeneração óssea.

SegundoCannillo e colaboradores (2010) [38], a combinação de PCL e Biovidro® 45S5 mostrou resposta citotóxica promissora, mas a lixiviação como forma

de preparo não se mostrou eficiente. O contato prolongado entre as partículas de biovidro e a água necessária para o processo, promoveu a reação química que resultou no aparecimento de calcita e comprometeu a bioatividade do material. Nesse caso, a mistura dos materiais também não se mostrou eficiente.

Fabbri e colaboradores (2010) [39] também investigaram *scaffolds* de PCL e Biovidro® 45S5. Nesse caso, o método de preparo escolhido foi a separação de fase sólido-líquido. Polímero, cerâmica e solvente foram submetidos a temperaturas negativas e, ao final do processo, foi obtida uma estrutura porosa. Além disso, os resultados mostraram boa dispersão das partículas de biovidro na matriz polimérica, o que dificilmente seria alcançado no processo de lixiviação utilizada por Cannilloe colaboradores (2010). Portanto, o método apresentou bons resultados de combinação dos materiais, mas observa-se a necessidade de estudo para escolher o melhor solvente para a preparação dos *scaffolds*, pois alguns solventes utilizados podem ser tóxicos.

No trabalho de Poh e colaboradores (2014) [40] também foram investigados *scaffolds* de PCL e Biovidro® 45S5. Nesse estudo, os materiais foram previamente misturados e, em seguida, as amostras foram fabricadas utilizando manufatura aditiva. Os resultados das propriedades mecânicas e proliferação celular foram positivos e evidenciaram a rapidez e possibilidade de customização quando se utiliza a técnica aditiva na fabricação de *scaffolds.*

3.5 Materiais

3.5.1 Poli (ε-caprolactona)

A PCL é um polímero hidrofóbico e semicristalino [3]. Apresenta baixa temperatura de fusão (T_m = 59ºC – 64ºC) e baixa temperatura de transição vítrea de T_g -60ºC logo em temperatura ambiente, a PCL é sempre encontrada no estado borrachoso [3,41,42]. Apresenta módulo elástico de 0,4 GPa, valor consideravelmente inferior ao módulo elástico de outros polímeros biodegradáveis, como o poli(l-ácido-láctico) (PLLA) que apresenta módulo de 2,7 GPa [41]

Uma propriedade interessante da PCL é a capacidade de formar blendas compatíveis com um grande número de outros materiais poliméricos [42], sendo

assim, esse polímero pode ter suas propriedades melhoradas e, dessa forma, ser utilizado em uma maior gama de aplicações.

O polímero biodegradável em questão é preparado pela abertura de anel do monômero cíclico ε-caprolactona (Figura 4).Catalisadores como o octoato de estanho são utilizados para catalisar a polimerização e alcoóis de baixo peso molecular podem ser utilizados para iniciar a reação[43].

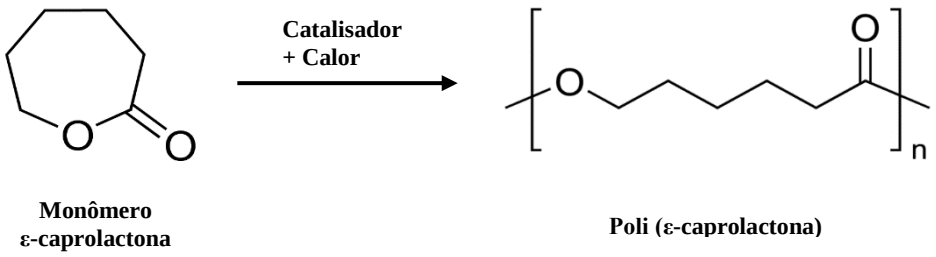


Figura 4 - Polimerização da poli(ε-caprolactona) por abertura de anel.

Fonte: Adaptado de AZIMI et al., 2014, p. 75[44]

Esse polímero tem sido muito empregado em aplicações médicas, devido sua biocompatibilidade [3]. A biocompatibilidade é característica indispensável para uso desse polímero na engenharia tecidual; quando o material é implantado deve provocar uma reação imune insignificante a fim de evitar resposta inflamatória grave [30]. Estudo de Lam e colaboradores (2008) [45] demonstrou a biocompatibilidade de *scaffolds* à base de PCL quando sumetidos em testes *in vivo*.

Além disso, outro fator importante na utilização desse polímero está no fato desse ser biorreabsorvível, ou seja, os produtos da decomposição desse material são eliminados do corpo por vias metabólicas [46].

Woodruff e colaboradores (2010)[3] revisaram a grande variedade de aplicações biomédicas envolvendo a PCL, incluindo a liberação controlada de fármacos, suturas, curativos, dispositivos contraceptivos, dispositivos de fixação, odontologia e engenharia tecidual.

3.5.2 Biovidro® 45S5

Os vidros bioativos foram os primeiros materiais sintéticos a apresentar ligação com o osso, sendo assim muito utilizados na regeneração óssea. A primeira ideia de material bioativo foi definida em 1987, no qual um material bioativo é aquele que "foi

projetado para induzir atividade biológica específica" [33]. Uma definição mais recente afirma que um vidro bioativo é aquele que sofre reações superficiais quando implantado no corpo, levando à formação de uma camada semelhante à hidroxiapatita (HA), responsável pela ligação do material com o tecido do corpo[47,48].

Em 1969, Hench utilizou o diagrama Na_2O-CaO-SiO_2 (Figura 5) para preparar as primeiras composições do que seria o primeiro vidro bioativo, o Biovidro® 45S5 [9]. Esse material apresenta maior bioatividade quando comparado a outros vidros bioativos. O biovidro está disponível comercialmente e é usado em aplicações médicas, como na área de ortopedia, odontológica, maxilofacial e otorrinolaringológicas [49].

Rezwan e colaboradores (2006) [4] revisaram algumas características do Biovidro® 45S5; ele tem a capacidade de promover função celular, aumentando adesão, crescimento e diferenciação dos osteoblastos, além de apresentar excelente propriedade mecânica combinada com elevada biodegradabilidade. Dessa forma, esse material é muito empregado na área de engenharia tecidual para regeneração do tecido ósseo.

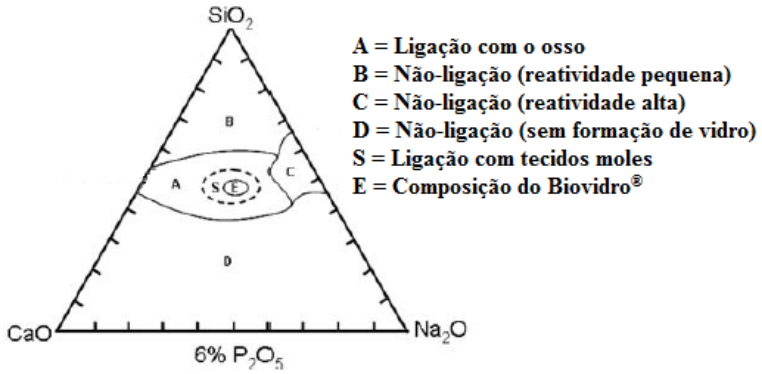


Figura 5 - Diagrama de composição para ligação óssea.

Fonte: Adaptado de HENCH, 2006, p. 969[9].

A sequência de reações químicas que explica a bioatividade e a formação da ligação entre o biovidro e o osso foi proposta também por Hench. As etapas 1 a 5 abaixo mostram o mecanismo de formação da camada de hidroxicarbonato apatita (HCA) na superfície do vidro [50].

1. Troca de íons sódio e cálcio do vidro (Na^+ e Ca^{2+}) com os íons H^+ (H_3O^+) dos líquidos corporais (LC), levando à hidrólise dos grupos sílica e a formação de

grupos silanol (Si-OH) na superfície do vidro. Aumento do pH devido ao consumo de íons H^+:

$$Si\text{-}O\text{-}Na^+ + H^+ \longrightarrow Si\text{-}OH^+ + Na^+_{(aq)}$$

2. O aumento do pH desestabiliza as estruturas SO_2, que reagem e formam sílica ácida $Si(OH)_4$. Nesse estágio, observa-se a contínua formação de grupos Si-OH na superfície do vidro:

$$Si\text{-}O\text{-}Si + H_2O \longrightarrow Si\text{-}OH + OH\text{-}Si$$

3. Condensação e polimerização de uma camada rica em sílica SiO_2 amorfa na superfície do vidro.
4. Migração dos íons Ca^{2+} e $(PO_4)^{3-}$ da superfície do vidro para a camada rica em sílica, formando um filme de $CaO\text{-}P_2O_5$ na superfície da camada de sílica. Em seguida, ocorre a migração dos íons de cálcio e fosfato da solução para a camada de sílica, formando um filme de $CaO\text{-}P_2O_5$ amorfo (ACP: fosfato de cálcio amorfo), como pode ser observado na Figura 6 (c).
5. Ocorre a cristalização do filme de $CaO\text{-}P_2O_5$ pela incorporação dos íons $(OH)^-$ e $(CO_3)^{2-}$, vindos da solução. A camada cristalizada é chamada de hidroxicarbonato apatita (HCA), como ilustrado na Figura 6 (d) [50,51].

A camada de HCA promove um ambiente favorável para colonização dos osteoblastos, seguido de proliferação e diferenciação celular [52].

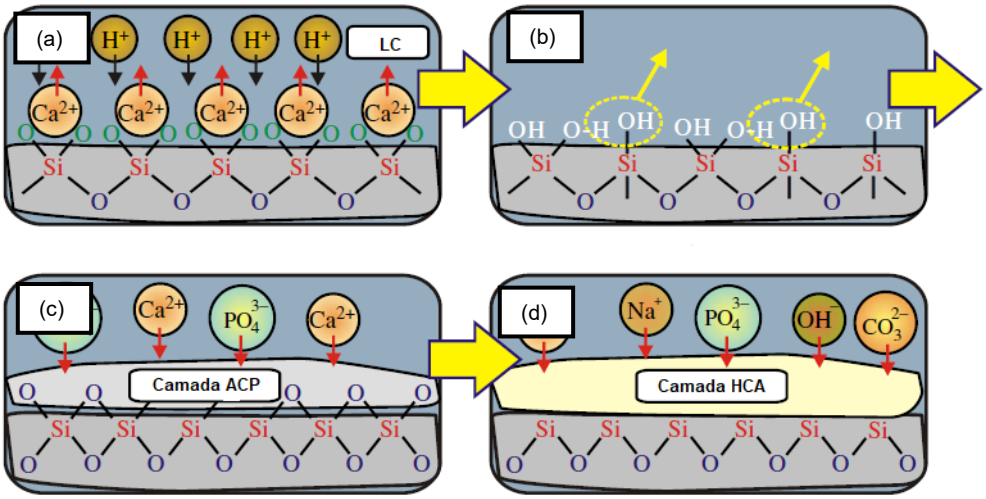


Figura 6 - Ilustração esquemática da sequência de reação que conduz à formação de HCA de acordo com Hench e colaboradores.

Fonte: Adaptado de GUNAWIDJAJA, 2012, p. 1377[53]

Tem-se observado um grande esforço na fabricação de compósitos com

partículas nanométricas para aplicação em engenharia tecidual por evidenciar melhorias nos resultados biológicos e mecânicos [54]. Estudo realizado por Misra e colaboradores (2008) [55] mostrou que a incorporação de biovidro nanométrico à uma matriz polimérica garantiu melhores propriedades ao compósito; notou-se aumento do módulo elástico e aumento da bioatividade.

3.5.3 Nanofibras de Celulose (NFC)

Os *scaffolds* unicamente compostos de matriz polimérica e carga inorgânica não apresentam as propriedades mecânicas esperadas. Isso pode ser explicado principalmente pela fraca interação interfacial entre a carga cerâmica e a matriz polimérica. A fase cerâmica geralmente é muito hidrofílica, enquanto os polímeros são hidrofóbicos. O aumento da ligação interfacial é um desafio e a celulose tem-se mostrado como uma alternativa na resolução desse problema [4].

Estudos apontados por Chen e colaboradores (2015) [12] mostraram que a combinação de celulose e biovidro é interessante quando se busca bons resultados biológicos. Eles estudaram a resposta obtida quando nanocristais de celulose são combinados ao Biovidro® 45S5. Os nanocristais de celulose foram devidamente dispersos e misturados ao Biovidro® 45S5 com uso de agitação magnética e ultrassom, garantindo assim, boa eficiência de mistura. Os resultados foram promissores quando o material foi submetido aos testes biológicos, mostrando ser um excelente ambiente para adesão, proliferação e diferenciação celular.

A celulose é provavelmente o polímero mais abundante da natureza e a principal fonte desse material é a madeira. A celulose é classificada como sendo um carboidrato, ou seja, tem carbono, hidrogênio e oxigênio na estrutura química. A unidade repetitiva compreende dois anéis de anidroglucose, unidos através de uma ligação glicosídica β-1,4, como pode ser visto na Figura 7. A celulose é um polímero de cadeia linear, hidrofílico, biodegradável e com grande capacidade de modificação química. As ligações de hidrogênio que aparecem na estrutura de celulose conferem estabilidade, além de rigidez [56].

Na natureza, a celulose é encontrada na forma de fibras. Trinta e seis moléculas de celulose são unidas em porções maiores chamadas de fibrilas elementares, que são agregadas em celulose microfibrilada, como ilustrado na Figura 7. O diâmetro das

fibrilas é de 5 nm, enquanto o diâmetro da celulose microfibrilada (ou nanofibrilada) possui diâmetros entre 20 e 50 nm. As microfibrilas têm alguns micrometros de comprimento e razão de aspecto variando de 100 até 150. Além disso, esse material possui excelentes propriedades mecânicas; tem módulo elástico que varia entre 145 e 150 GPa. Com as boas propriedades mecânicas, a nanocelulose se bem dispersa, pode servir como um excelente reforço em compósitos, permitindo boa transferência de carga da matriz para o reforço [14,57–59].

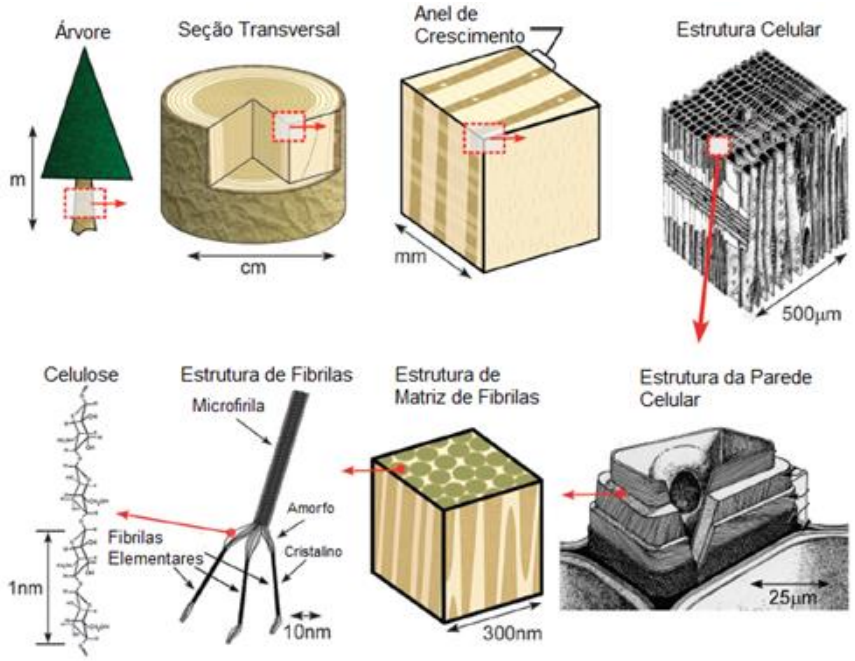


Figura 7 - Representação esquemática da estrutura hierárquica da celulose.

Fonte: Adaptada de MOON et el., 2011, p. 3943 [60].

3.6 Conceitos sobre Manufatura Aditiva

Nas últimas décadas, muitas técnicas têm sido utilizadas na fabricação de *scaffolds*, como a liofilização em emulsão, dissolução em solventes, eletrofiação, entre outras. No entanto, tais técnicas apresentam uma série de desvantagens, tais como retenção de solvente tóxico no polímero, limitação na geometria do *scaffold*, dificuldade no controle de tamanho de poros, entre outras. As técnicas convencionais citadas anteriormente são pouco viáveis quando se deseja estruturas customizadas. A fim de solucionar esse problema, a manufatura aditiva tem surgido como uma tecnologia alternativa e bastante eficiente na construção dos *scaffolds* [61].

A manufatura aditiva consiste na reprodução física, camada-a-camada até

obtenção de uma estrutura física tridimensional. As mais de 20 diferentes técnicas de manufatura aditiva seguem as mesmas etapas. O pré-processamento consiste na modelagem da peça, geração da geometria 3D no padrão STL (formato de arquivo padrão para manufatura aditiva que cria superfície aproximada da peça a ser fabricada), verificação da integridade do arquivo de dados; em seguida, tem-se o processo de fabricação seguido pela etapa de pós-processamento da peça [19]. As tecnologias mais comumente utilizadas na manufatura aditiva para *desktop* são: a modelagem por deposição do fundido (FDM), no qual a matéria-prima é alimentada na forma de filamento enrolado em uma bobina, o material é aquecido e depositado sobre uma base de impressão. A tecnologia de extrusão por seringa consiste na compressão do material em uma câmara e extrusão do mesmo por uma seringa [62].

3.7 Técnica aditiva por extrusão

Com o objetivo de criar uma estrutura que atendesse a demanda por tecnologia aditiva por extrusão, de pequeno porte e para aplicações em pesquisa, foi desenvolvido no Centro de Tecnologia Renato Archer a Fab@CTI, baseada na tecnologia do projeto Fab@Home (Universidade de Cornell). A Fab@Home é um exemplo de impressora portátil, com melhor projeto mecânico e de controle básicos e com custo reduzido para utilização em laboratório[63].

A Fab@CTI foi desenvolvida para ser utilizada em centros de pesquisa e universidades, considerando a aplicação em engenharia tecidual e para a criação de pequenos componentes mecânicos [62].O projeto consiste no desenvolvimento de um cabeçote vertical de extrusão a quente para impressoras 3D [20].

Esse cabeçote (Figura 8) tem caráter inovador, já que a alimentação é feita por material na forma de pó que é transformado em filamento durante a extrusão e, por fim, depositado camada a camada para compor o *scaffold*. A utilização da matéria-prima na forma de pó permite a mistura de materiais poliméricos para a formação de blendas ou de materiais compósitos, além de permitir a introdução simultânea de aditivos ao polímero enquanto é processado. O cabeçote é composto de um parafuso de extrusão com seção variável de forma a garantir maior eficiência na fusão da matéria-prima. Além disso, ele pode ser miniaturizado, permitindo o uso em máquinas de pequeno porte [20].

Os polímeros são a matéria-prima escolhida na utilização no conjunto da

Fab@CTI, pelo fato de ser um material facilmente manipulado por extrusão. O aquecimento do material durante o processo é feito por resistências elétricas que se encontram ao redor do barril de extrusão. A matéria-prima é depositada na forma de pó, misturada e aquecida por uma rosca e, com a movimentação da estrutura, é possível obter *scaffolds* com a geometria desejada e pré-definida no *software BioScaffold PG®*. Os parâmetros do processo de impressão são continuamente controlados, contribuindo para a qualidade do produto obtido [62].

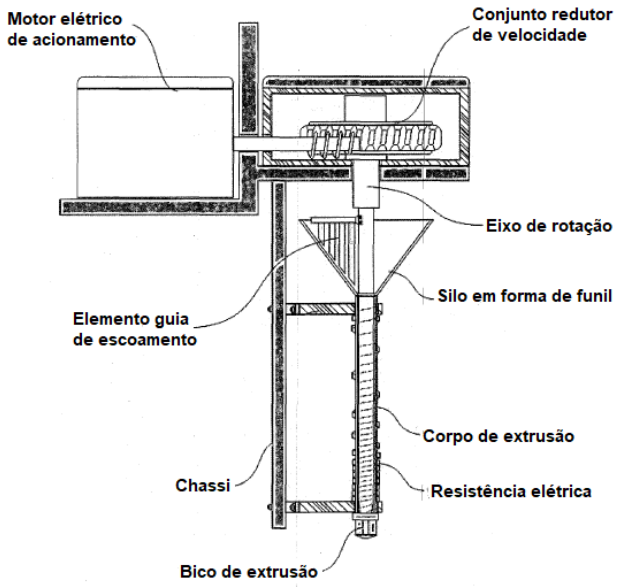


Figura 8 - Representação esquemática de patente do cabeçote vertical de extrusão.

Fonte: Adaptado de [20]

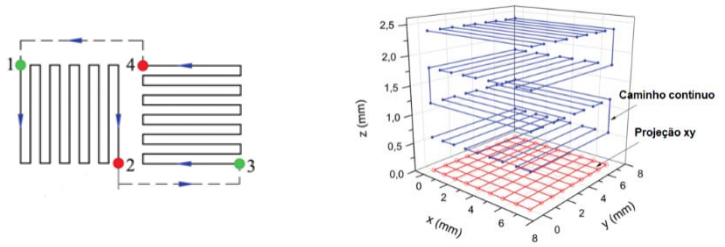
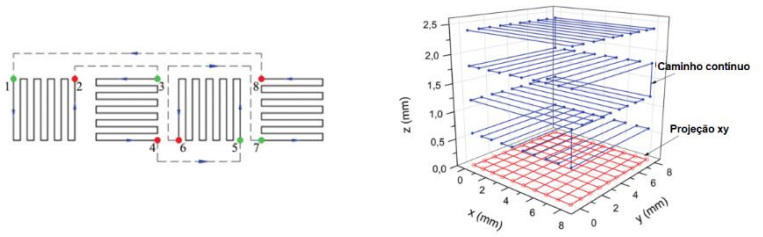
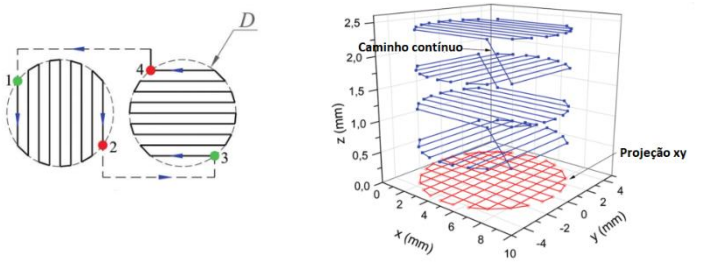
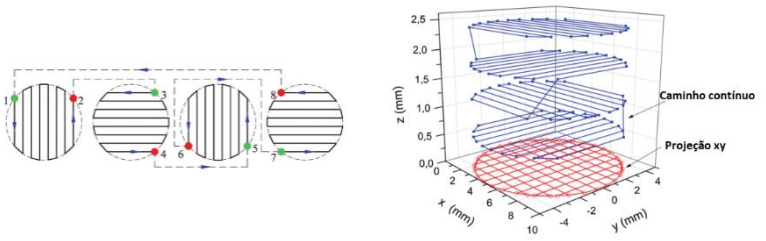
3.8 BioScaffolds PG

A manufatura de *scaffolds* por meio do processamento por sistema de monorrosca projetada para manufatura aditiva por extrusão tem como principal desvantagem a criação de geometrias de maneira descontínua. A construção das amostras geralmente é interrompida quando há a mudança para a próxima camada, possibilitando o aparecimento de pontos de aglomeração de material. Com o objetivo de eliminar esse problema, foi desenvolvido no Brasil o *software BioScaffolds PG*. Criado utilizando *Visual Basic, é* capaz de gerar um arquivo no formato *.txt* compatível com o *software Fab@Home.*

O programa *BioScaffolds PG* é capaz de gerar geometrias circulares ou retangulares, sendo que ambas não apresentam descontinuidade entre as camadas.

O algoritmo foi pensado de forma a gerar *scaffolds* com arquitetura 0º/90º, como pode ser observado na Tabela 2. Nos *scaffolds* retangulares, o último ponto de uma camada é o primeiro ponto da camada seguinte, com incremento em z. Enquanto nos *scaffolds* circulares, o último ponto de uma camada é o mais próximo possível ao primeiro ponto da camada seguinte. Logo, o processo não precisa ser interrompido entre a manufatura de uma camada e outra [22,65].

Tabela 2 - Caminho de impressão 3D para diferentes geometrias.

Geometria Retangular	**Número ímpar de camadas**	
	Número par de camadas	
Geometria Circular	**Número ímpar de camadas**	
	Número par de camadas	

Fonte: Adaptado de DÁVILA et al., 2015, p. 1672-1673 [22].

Na Tabela 3 são apresentadas as variáveis que definem a geometria retangular do *scaffold* quando esse é projetado pelo programa *BioScaffolds PG*. São apresentadas as variáveis de entrada e de saída e as respectivas faixas de valores que o usuário pode escolher na interface do programa. As variáveis da geometria do *scaffold* são representadas na Figura 9.

Tabela 3 - Variáveis do software *BioScaffolds* PG.

		Descrição	Faixa
Variáveis de Entrada	**e (mm)**	Espaçamento entre fios extrudados	0,5 a 1,5
	NE	Número de espaços	2 a 30
	NL	Número de camadas	2 a 100
	PH	Espessura da camada	0,2 a 1,5
Variáveis de Saída	**d (mm)**	Diâmetro do filamento	0,2 a d_{AG}*
	AG (mm)	Tamanho do poro	AG = e - d
	W (mm)	Largura do *scaffold*	W = NE x e

*d_{AG}= Diâmetro em que AG = 0

Fonte: DÁVILA, 2014, p. 46 [65].

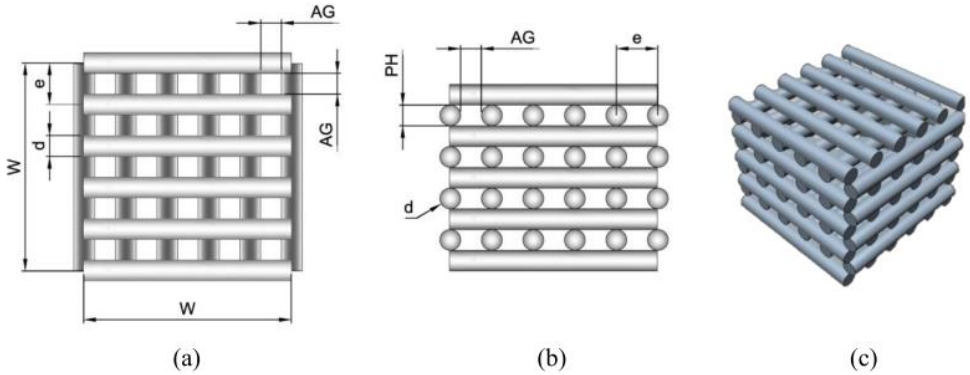


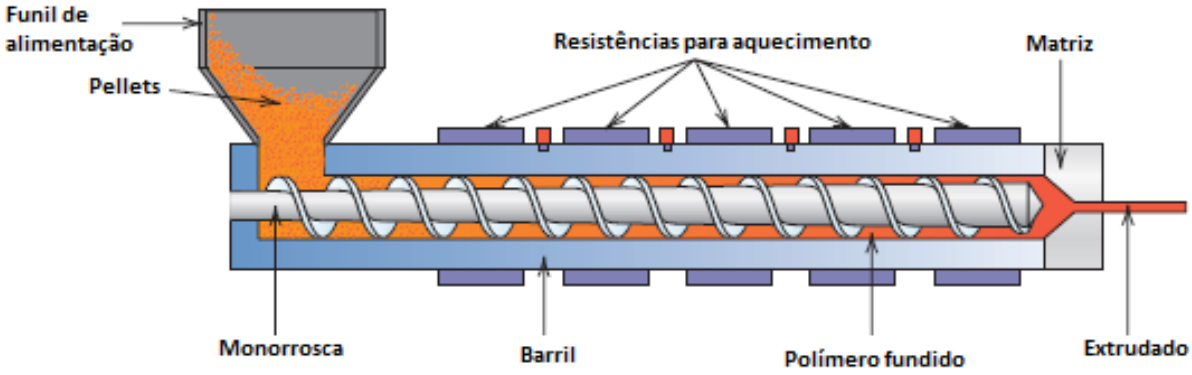
Figura 9 - Variáveis que definem a geometria do *scaffold*: (a) vista superior, (b) vista frontal e (c) perspectiva do *scaffold*.

Fonte: DÁVILA, 2014, p 46 [65].

3.9 Processamento por extrusão monorrosca

O processo de extrusão consiste na moldagem de um polímero termoplástico pressionado por meio de uma matriz com extremidade aberta. O material na forma de *pellets* é carregado por uma rosca e fundido com o auxílio de resistências elétricas.

No caso das extrusoras monorrosca, como o esquema mostrado pela Figura 10, um parafuso mecânico (rosca) é responsável pelo transporte e homogeneização do material ao longo do barril, a principal característica para a escolha da rosca ideal é a relação diâmetro e comprimento (L/D) [66,67]. O material é colocado do funil de alimentação e, as forças de gravidade são responsáveis pela sua descida até a rosca. O material localiza-se, então, entre o barril e a monorrosca. O barril se mantém parado, enquanto a rosca se movimenta, dessa forma, as forças de atrito tanto do barril quanto da rosca atuam no material e são responsáveis por transportá-lo. À medida que o material avança, ele é aquecido como resultado da geração de calor do atrito e pela influência das resistências elétricas. Quando a temperatura do material excede a temperatura de fusão, o material se funde. A Figura 11 mostra as seções geométricas da rosca determinadas em projeto. À medida que o processo avança, a quantidade de material sólido em cada seção reduzirá, de modo que, no final da rosca,



o polímero fundido é simplesmente bombeado para o molde. Esse material é solidificado em contato com o ar ou com auxílio de *spray* ou banho de água [66,68].

Figura 10 - Diagrama esquemático de uma extrusora monorrosca.

Fonte: Adaptado de CALLISTER, 2009, p. 614 [66].

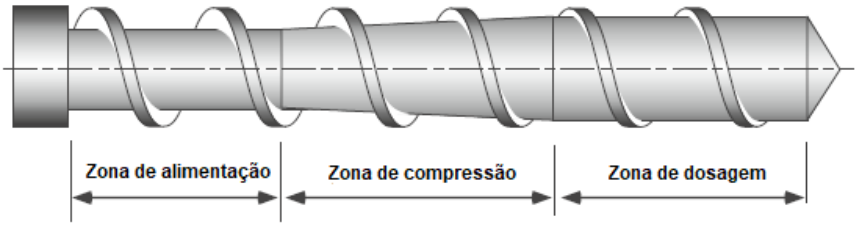


Figura 11 - Geometria convencional de uma rosca de extrusão.

Fonte: Adaptado de RAUWENDAAL, 2013, p. 15 [68].

O projeto de pesquisa objetivou avaliar a fabricação e a caracterização das propriedades morfológica, mecânica e biológica de *scaffolds* formados a partir de matriz polimérica de poli(ε-caprolactona) reforçada com Biovidro® 45S5 e nanofibra de celulose, visando aplicação na regeneração de tecidos ósseos. Além de avaliar a eficiência da mistura do cabeçote vertical de extrusão na condição de processamento em dois métodos distintos.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

Como matriz polimérica utilizou-se a PCL CAPA®6500, com peso molecular médio (M_w) de 50.000 g/mol e temperatura de fusão (T_m) entre 58 e 60 °C, obtida pela Perstorp.

O Biovidro® 45S5 (BV) foi preparado misturando-se quatro matérias-primas:

- Carbonato de sódio (Na_2CO_3): grau de pureza 99,5% da empresa Synth;
- Carbonato de cálcio ($CaCO_3$): grau de pureza 99% da empresa Panreac;
- Dióxido de silício (SiO_2): grau de pureza 99,9% da empresa Santa Rosa;
- Fosfato de amônio bifásico ($(NH_4)_2PO_4$): grau de pureza 98% da empresa Synth.

Como defloculantes foram utilizados na moagem: o polivinilbutiral (PVB) Butvar B98 da empresa Sigma-Aldrich e o ácido para-aminobenzóico (PABA) da empresa Vetec

As nanofibras de celulose (NFC) utilizadas na preparação dos compósitos foram gentilmente cedidas em suspensão aquosa 2% em massa pelo Centro de Biocompósitos e Processamento de Biomateriais da Universidade de Toronto, Canadá. As nanofibras são uma mistura de polpas de madeira mole (*softwood)* branqueada de palha de trigo e cascos de soja. As fibras foram desfibriladas por um moedor comercial *MasukoCorp.*(Japão). A composição das nanofibras é 84,6 ± 4,4 % α-celulose, 6,0 ± 1,1% hemicelulose e 9,4 ± 0,8% lignina. O diâmetro médio das nanofibras é de 10-80 nm e o comprimento é de alguns milhares de nanômetros [69].

4.2 Preparo do Biovidro® 45S5 (BV)

4.2.1 Formulação e queima das matérias-primas

Para obtenção das concentrações corretas para o Biovidro® 45S5, foi utilizada a formulação de matérias-primas apresentadas na Tabela 4. Os materiais foram

misturados manualmente e homogeneizados e, em seguida, a mistura foi derretida em um cadinho de platina a 1400 °C por quatro horas, conforme procedimento descrito na literatura [70]. Logo após o cadinho ser retirado do forno, o material fundido foi vertido sobre uma superfície de aço inoxidável e resfriado até temperatura ambiente. Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Tabela 4 - Formulação e concentração em massa para o preparo do Biovidro® 45S5.

Matéria-prima	Concentração em massa (g)
Na_2CO_3	142,94
$CaCO_3$	150,55
SiO_2	152,33
$(NH_4)_2PO_4$	100,62

Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Preparo das barbotinas e moagem

O Biovidro® 45S5 foi submetido à moagem em moinho de discos Pulverisette 13 da empresa Fritsch até que as partículas atingissem tamanho médio de 0,5 mm. Na tentativa de diminuir o tamanho das partículas até escala nanométrica, o material foi submetido à moagem em moinho de bolas e moinho vibratório no Laboratório de Tribologia e Compósitos na USP – São Carlos [71]. A Figura 12 é uma representação gráfica da vista em perspectiva frontal no moinho vibratório.

Para a obtenção do pó submicrométrico, foi utilizado jarro com altura de 85 mm e volume de 300 cm^3 carregado com elementos de moagem, no caso esferas de zircônia de 500g. A barbotina, cuja concentração é de 30% em volume de sólidos e 70% em volume de álcool isopropílico foi colocada no jarro e ocupou 100 cm^3do mesmo. O jarro foi colocado em moinho de bolas com velocidade de 104 rpm por 180 horas. Em seguida, o jarro foi colocado em moinho vibratório por aproximadamente 92 horas. Durante a moagem, foram adicionados dispersantes na barbotina, sendo 0,3% em massa de PVB e 0,5% em massa de PABA.

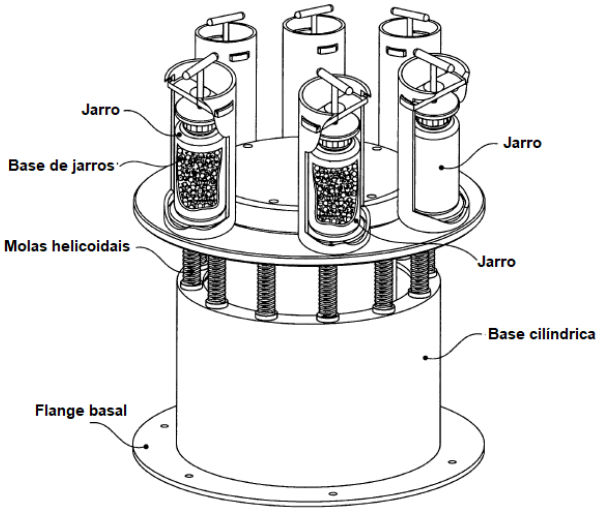


Figura 12 - Desenho de patente da vista em perspectiva frontal no mini-moinho vibratório.

Fonte: Adaptado de [71].

4.3 Preparação dos *scaffolds*

4.3.1 Preparo das amostras

Parte do Biovidro® 45S5 foi seco com eliminação total do álcool isopropílico por evaporação sob agitação magnética e adicionado à matriz polimérica PCL nas proporções de 2,5 e 5% em massa de BV.

Outra parte do BV, ainda em suspensão no álcool isopropílico, foi misturada à uma suspensão de NFC em álcool isopropílico na proporção de 0,1% em massa de NFC em relação ao BV. A mistura foi em seguida seca por evaporação sob agitação magnética e adicionado à PCL nas proporções de 2,5 e 5% em massa.

A preparação das amostras seguiu dois métodos diferentes para obtenção das composições finais:

- **Método 1:** inicialmente foi feita somente a mistura física das matérias-primas em cinco composições diferentes, como apresentadas na Tabela 5. Posteriormente, as amostras foram processadas diretamente no cabeçote de extrusão da impressora 3D
- **Método 2:** a mistura das matérias-primas se deu inicialmente pelo processo convencional de extrusão monorosca (pré-extrusão) em cinco composições diferentes, como apresentadas na Tabela 5. Posteriormente, as amostras foram

processadas no cabeçote de extrusão da impressora 3D.

Tabela 5 - Composição das amostras obtidas no Método 1 e no Método 2 com concentração em % em peso.

Método 1	**Método 2**
PCL	EXPCL
PCL + 2,5% BV	EXPCL + 2,5% BV
PCL + 5% BV	EXPCL + 5% BV
PCL + 2,5% BV/NFC	EXPCL + 2,5% BV/NFC
PCL + 5% BV/NFC	EXPCL + 5% BV/NFC

Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Processamento em extrusora monorosca

Os compósitos pré-extrudados foram preparados em uma extrusora de bancada AX Plásticos, modelo Lab-16, rosca simples equipada com um elemento de mistura na extremidade da rosca do tipo Madock. Para todas as formulações, utilizou-se rotação da rosca de 40 rpm e o seguinte perfil de aquecimento:

- Zona de alimentação: 60ºC;
- Zona da matriz: 66ºC;
- Zona de saída: 72ºC.

Logo após o processamento, o material foi moído a temperatura ambiente em moinho criogênico da marca Ika, modelo A11 para obtenção do material na forma de pó.

4.3.3 Geração dos *scaffolds* pela técnica aditiva por extrusão

Os *scaffolds* foram fabricados utilizando a impressora Fab@CTI do Centro de Tecnologia Renato Archer (CTI), com cabeçote de impressão 3D com rosca de extrusão, como mostrada na Figura 13. A impressora é composta basicamente pelos elementos: base, com movimentação em x, y e z; funil de alimentação; mini-extrusora

monorrosca; resistência elétrica; motor e controlador de temperatura, a Figura 14 mostra um esquema dimensionado da rosca de extrusão utilizada na Fab@CTI. O *software* utilizado para controlar a impressora foi o Fab@Home Model 1:V.0.24 RC6 [65] e o software utilizado para criar a geometria do *scaffold* foi o *BioScaffolds PG* [22].

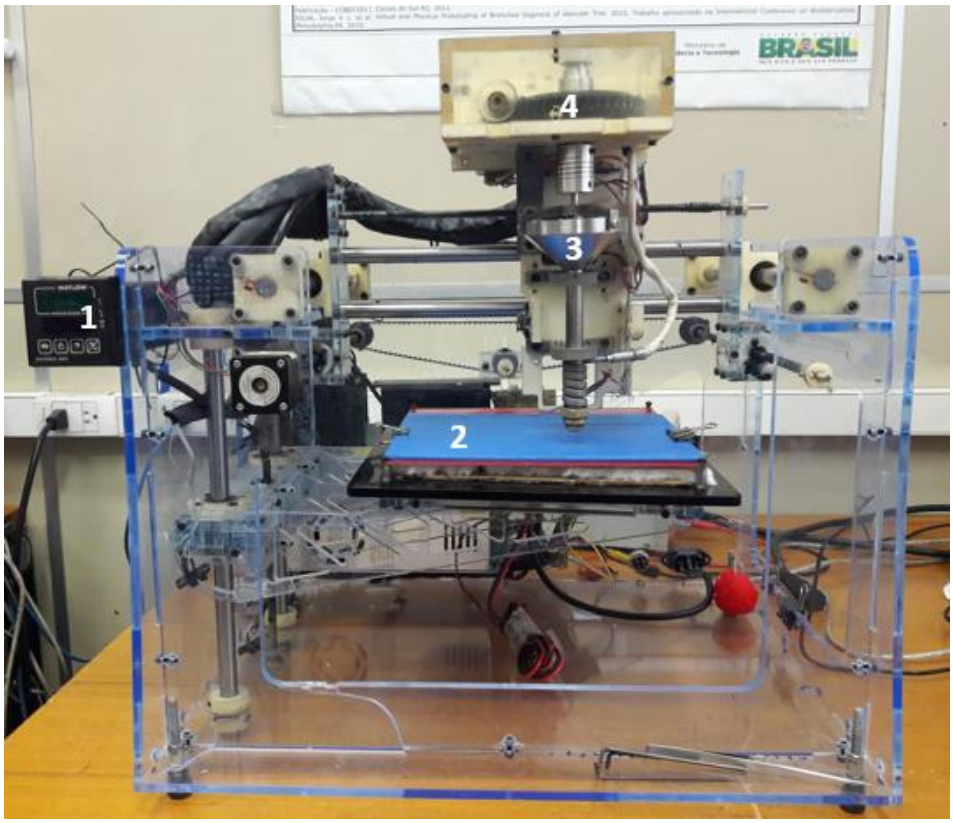


Figura 13 - Imagem da impressora 3D Fab@CTI 1) Controlador de temperatura; 2) Plataforma de impressão; 3) Cabeçote por rosca de extrusão; e 4) Motor.

Fonte: Autoria própria.

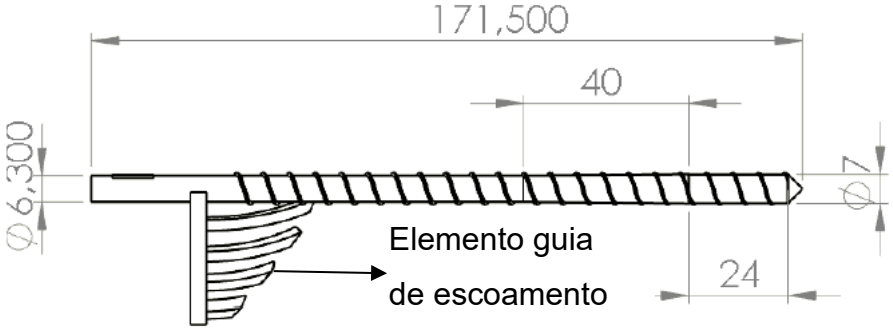


Figura 14 - Dimensionamento da rosca de extrusão.

Fonte: Adaptado de SILVEIRA et al., 2014, p. 13 [65].

4.3.4 Parâmetros de Processo

Os *scaffolds* foram projetados pelo *software Bioscaffolds PG* que permite definir as variáveis geométricas da amostra e gera os dados em arquivo compatível ao *software* Fab@Home [22]. Uma das variáveis mais importante para a criação do *scaffold* é o tamanho de poro. Segundo a literatura, para aplicação em tecido ósseo, tem-se uma faixa de trabalho aceitável de tamanho de poro de 10 a 500µm [72–74]. Segundo Dávila (2016) [64], *scaffolds* de PCL manufaturados utilizando a mesma impressora e cabeçote, apresentaram melhores propriedades mecânicas com tamanho de poro de 450 µm, logo optou-se por utilizar o mesmo tamanho de poro. As variáveis de entrada no programa são: espaçamento entre os fios extrudados, número de espaços, número de camadas, altura da camada e diâmetro do fio extrudado.

Foram produzidos dez *scaffolds* com composições distintas, listados na Tabela 6, sendo todos com 30 camadas. Vários testes foram realizados para definir os melhores parâmetros de processo. A temperatura utilizada inicialmente foi de 77ºC, ou seja, mais próxima à temperatura de fusão da PCL. Essa temperatura foi adequada para a amostra de PCL. No entanto, para as demais amostras, percebeu-se a necessidade de maiores temperaturas com a finalidade de diminuir a viscosidade do material e facilitar o processamento. A altura de camada inicialmente adotada para as amostras de PCL foi de 0,3 mm, no entanto, verificou-se que para as demais formulações, a adesão entre as camadas não era suficientemente eficiente com esse valor, assim a altura de camada foi reduzida para 0,25-0,26 mm. Outros testes foram realizados para que fossem determinadas a melhor temperatura de processamento e a melhor velocidade de impressão para cada composição. A Tabela 6 mostra os valores estabelecidos para cada composição estudada.

Tabela 6 - Parâmetros do processamento definidos para a fabricação dos *scaffolds*.

Amostra	Temperatura (ºC)	Velocidade de Impressão (mm/s)	Espessura da Camada (mm)
PCL	77	8,5	0,30
PCL + 2,5 % BV	82	9,0	0,25
PCL + 5 % BV	88	9,0	0,25
PCL + 2,5 % BV/NFC	82	9,0	0,25
PCL + 5 % BV/NFC	88	9,0	0,25
EXPCL	82	6,0	0,26
EXPCL + 2,5 % BV	82	7,0	0,25
EXPCL + 5 % BV	82	9,0	0,25
EXPCL + 2,5 % BV/NFC	82	9,0	0,25
EXPCL + 5 % BV/NFC	82	9,0	0,25

Fonte: Autoria própria.

O material em pó foi colocado no funil do cabeçote. O movimento de rotação da rosca de extrusão e da pá auxiliam na mistura e homogeneização do material. O material é empurrado para o barril, onde é aquecido, fundido e o filamento extrudado é depositado sobre a base. A Figura 15 mostra a deposição do material em camadas com trajetória 0º/90º durante a fabricação do *scaffold*.

Figura 15 - Construção de *scaffold* retangular na trajetória de deposição 0º/90º.

Fonte: Autoria própria.

4.4 Técnicas de caracterização

4.4.1 Caracterização da composição química do Biovidro® 45S5

A caracterização da composição química da amostra de Biovidro® 45S5 foi realizada pela técnica de espectroscopia fluorescência de raios x (FRX). Essa técnica é não destrutiva e permite identificar os elementos químicos presentes em uma amostra, assim como identificar a concentração de cada elemento [75]. Foi utilizado o espectrômetro de fluorescências de raio x da marca PANAlytical, modelo Zetium do Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) do Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo da USP. A perda ao fogo (PF) foi efetuada a 1020 ^{o}C em mufla por 2 horas.

4.4.2 Determinação da distribuição de tamanho médio das partículas do Biovidro® 45S5

Para verificar o tamanho médio de partículas após o processo de moagem foram realizados ensaios de medida de tamanho de partículas no equipamento de espalhamento de luz dinâmica (DLS do inglês *Dynamic Light Scattering*) Zetasizer Nano-ZS90 da empresa Malvern no Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxocologia da USP. A medida consiste na emissão de um feixe de laser sobre a amostra dispersa em um liquido sendo então a luz espalhada pelas partículas. O equipamento mede o movimento browniano da amostra, obtém-se informações das colisões que ocorrem entre as partículas da amostra e as moléculas do liquido. A distância entre as partículas varia com o tempo gerando interferências construtivas ou destrutivas na luz espalhada. Os dados de espalhamento de luz se correlacionam com a velocidade das partículas. Partículas menores se movimentam mais rapidamente e dão origem a maiores taxas de flutuação na intensidade da luz; no caso das partículas maiores, acontece o contrário. A técnica fornece curvas de intensidade de luz espalhada *versus* diâmetro da partícula [76,77].

4.4.3 Caracterização morfológica dos *scaffolds*

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada com detector espectroscópico de raios-X por dispersão de energia (EDS) consiste em uma técnica no qual um feixe de elétrons incide sobre a superfície de uma amostra, ponto a ponto, fazendo total varredura e fornecendo rapidamente informações sobre a morfologia e identificando elementos químicos da amostra em questão [78].

Para analisar a morfologia dos *scaffolds* e fazer o mapeamento do biovidro foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura FEI®*Inspect*F-50. As amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de platina usando o equipamento *Scancoat Six Sputter Coater*®. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o *software ImageJ*.

4.4.4 Ensaio mecânico de Compressão

O ensaio de compressão consiste na aplicação de cargas de compressão sobre um corpo de prova. Esse tipo de ensaio pode ser realizado em uma máquina universal de ensaios, a mesma utilizada em ensaios de tração, com adaptação de duas placas lisas e de superfície perpendicular ao eixo de aplicação da carga. Uma das placas permanece fixa, enquanto a outra é móvel. Nesse tipo de ensaio, as relações de tensão e deformação são similares àquelas obtidas no ensaio de tração. Até atingir a tensão de escoamento, o material apresenta comportamento elástico, obedecendo a Lei de Hooke (Equação 1) e, ultrapassando esse valor, observa-se deformação plástica [79]

$$E = \sigma/\varepsilon \qquad (1)$$

E (MPa) é o módulo de elasticidade, σ (MPa) é a tensão aplicada e ε é a deformação sofrida pelo corpo de prova.

O ensaio foi realizado utilizando a máquina de ensaios universal *Intron*®,

modelo 5969 de acordo com as normas ASTM F2150–13[1] e ASTM D695–15[2]. A velocidade de compressão utilizada foi de 1,3 mm/min. Para o ensaio, a geometria utilizada foi retangular com 5 x 5 x 9 mm. Para execução do ensaio, utilizou-se o *software Bluehill®*, compatível com a máquina de ensaios.

4.5 Avaliação biológica *in vitro*

A avaliação biológica *in vitro* foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM-DCF) da UFSCar.

4.5.1 Citoxicidade e viabilidade celular

Foram realizados ensaios de citotoxicidade *in vitro* para amostras dos *scaffolds* nas diferentes composições estudadas e para o Biovidro® 45S5 isolado. Foram empregadas linhagens de pré-osteoblastos MG-63, que foram mantidas em meio DMEN (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina-streptomicina (1%) e Fungizona (1%).

Como procedimento de esterilização, primeiramente, amostras dos *scaffolds* foram mergulhadas em álcool 70% e secas em fluxo laminar sob luz ultravioleta (UV) durante 20 minutos. Em seguida, as amostras foram mergulhadas em tampão fosfato salino (PBS) para eliminar quaisquer resquícios de etanol e novamente secas em fluxo laminar sob luz ultravioleta durante 20 minutos.

Após a esterilização, os extratos foram preparados segundo as normas ISO 10993-5[3] e ISO 10993-12[4]. Segundo a norma ISO 10993-12, a relação de extração para produtos sólidos de forma irregular deve ser de 0,2 g/ml. Dessa forma, os *scaffolds* foram colocados em meio de cultura obedecendo essa relação. Os extratos

---

[1]ASTM F2150-13: *Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products*

[2] ASTM D695-15: *Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics*

[3] ISO 10993-5: *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*

[4] ISO 10993-12: *Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample Preparation and material references*

permaneceram 24 horas em estufa a temperatura de 37 ºC e em atmosfera de 5% de dióxido de carbono.

Para verificar a influência da presença do Biovidro® 45S5, da nanofibra de celulose e do método de processamento (com e sem pré-extrusão) no crescimento e viabilidade celular ao longo do tempo, realizou-se o ensaio de citotoxicidade mediante o ensaio de resazurina (*Resazurin Sodium Salt*, Ref. Nº R707, Sigma-Aldrich). A resazurina, quando diluída, é um reagente de coloração azul e apresenta baixa fluorescência intrínseca. Em contato com células eucarióticas, é metabolizada e, ao passar pelas mitocôndrias de células viáveis, ela é reduzida e fluoresce tornando-se avermelhada.

O ensaio foi realizado em triplicata em placa de 96 poços, sendo cada poço preenchido com 150 µl do extrato específico de cada amostra, como ilustrado na Figura 16. Os osteoblastos foram contados e plaqueadas a $2{,}5 \times 10^3$ células por poço para o ensaio com resazurina. Para o ensaio, o meio de cultura foi aspirado e, em seguida, acrescentou-se em cada poço 200 µl de solução de resazurina (previamente diluída em água tri-destilada a 1,6 mMol e filtrada) a 10% (v/v) dissolvida em meio de cultura. A placa foi mantida em atmosfera com 5% de dióxido de carbono a 37 ºC por 4 horas. Em seguida, 150 µl de solução de cada poço foi transferida para uma outra placa de 96 poços, utilizada para realizar a leitura de fluorescência. Para o cálculo de redução relativa, também foi acrescentado em três poços da nova placa, 150 µl de solução de resazurina 10% em meio de cultura completamente reduzido, que foi obtido autoclavando-se a solução. Além disso, três poços sem células foram destinados para deposição de 150 µl de resazurina e serviram como controle branco para a resazurina. Como controle (células) do experimento, utilizou-se apenas células, que foram plaqueadas nas mesmas condições experimentais. A leitura da placa foi feita medindo os valores de fluorescência em um fluorímetro da marca *SpectraMax Gemini® XS – Molecular Devices*, utilizando espectro de 544 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os valores de fluorescência obtidos para cada amostra foram comparados com a média dos valores de fluorescência obtidos da solução de resazurina completamente reduzida.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em três, sete, quatorze e vinte e um dias após o início do cultivo das células nos extratos. Os dados foram analisados estatisticamente, plotados em gráficos e interpretados utilizando ANOVA do programa *GraphPad Prism®*, considerando os valores de probabilidade estatística (P) < 0,05 e

número de determinações igual a três.

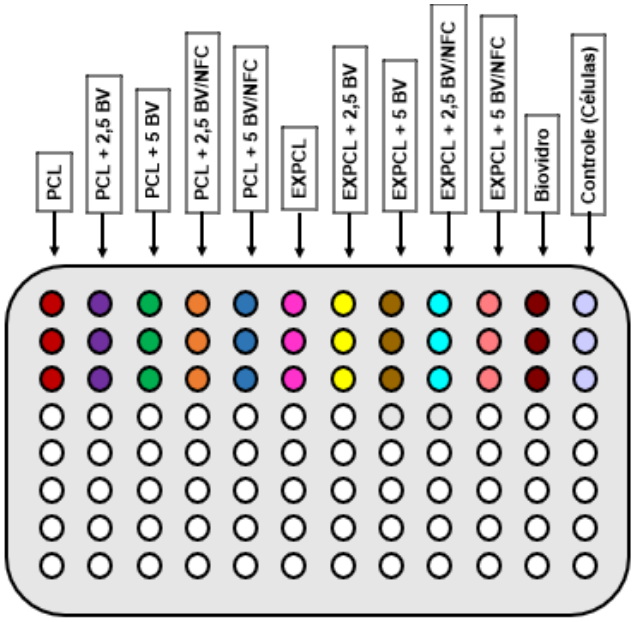


Figura 16 - Disposição dos extratos em placa de 96 poços.

Fonte: Autoria própria.

4.5.2 Biomineralização *in vitro*

Para identificar a biomineralização dos osteoblastos MG-63 cultivados nos *scaffolds*, os osteoblastos foram plaqueados sobre os *scaffolds* a uma densidade de 1 x 10^4 células/poço em uma placa de cultura celular de 24 poços, empregando quatro poços para cada tipo de *scaffold* pré-processado em extrusora monorrosca. Para o controle, foram utilizados poços sem *scaffolds*. Os osteoblastos foram estimulados empregando DMEM (utilizado como descrito anteriormente) suplementado com 400 µM de ácido ascórbico (A5960, Sigma-Aldrich), 5 mM de β-glicerolfosfato (50020, Sigma-Aldrich) e 10 nM de dexametasona (D4902, Sigma-Aldrich).

O corante vermelho de Alizarina liga-se seletivamente a sais de cálcio e é amplamente utilizado para coloração de minerais [80]. Após 21 dias de cultivo com osteoblastos, cada poço foi lavado duas vezes com PBS e fixados com etanol 70% frio (zero grau Celsius) por 1 hora. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com água destilada e o vermelho de alizarina (diluído em água destilada a 40 mM) foi adicionado em cada poço (1 ml/poço). Após 20 minutos em temperatura ambiente, os

poços foram lavados diversas vezes com água destilada (até que água retirada estivesse limpa) e, em seguida, os *scaffolds* foram fotografados com uma câmera equipada com lentes macro.

4.5.3 Microscopia de Epi-fluorescência

Com o objetivo de visualizar os osteoblastos MG-63 cultivados com os *scaffolds* compósitos, empregou-se microscopia de epi-fluorescência. Os osteoblastos foram cultivados a uma densidade de 2 x 10^4 células/poço de uma placa de cultura celular de 24 poços, empregando dois poços com amostras de cada tipo de *scaffold* e poços sem amostras como controle. As células foram mantidas em DMEM conforme elucidado anteriormente. Após 7 dias, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS por 10 minutos e, em seguida, lavadas duas vezes com PBS. Para aumentar a permeabilidade da parede celular dos osteoblastos, empregou-se solução de 0, % de Triton x-100 em PBS durante 5 minutos. Os poços foram lavados novamente com PBS por duas vezes e coloridos com os fluoróforos Dapi (Sigma-Aldrich) para visualizar o núcleo, e Faloidina (CytoPainter Phalloidin-iFluor 488, Cat. Nº 176753, Abcam™) para visualizar o citoesqueleto, diluídos com 1% de BSA (Solução de Albumina Bovina, acrônimo em inglês) de acordo com as instruções dos fabricantes. Após 10 minutos para cada fluoróforo, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS sendo que, na última lavagem, parte do PBS foi mantido para prevenir a desidratação das células. Imagens de luz branca e de fluorescência foram obtidas a partir de um microscópio invertido Zeiss Axio Vert.A1 com auxílio do *software* AxioCam. As amostras analisadas foram as extrudadas direto no cabeçote da impressora 3D, pois as amostras pré-processadas em extrusora monorrosca seguida de extrusão no cabeçote apresentaram tamanho dos poros reduzidos, dificultando assim a visualização das células. As imagens obtidas forma sobrepostas de acordo com a Figura 17 (Filtros Dapi – Núcleo, e GFP – filamentos de F-actina presentes no citoesqueleto) e a superposição dos mesmos com as imagens de microscopia de luz e de luz com filtro amarelo para aumento de contraste. Filtros de redução de ruído e melhora de contraste foram aplicados durante a superposição das imagens.

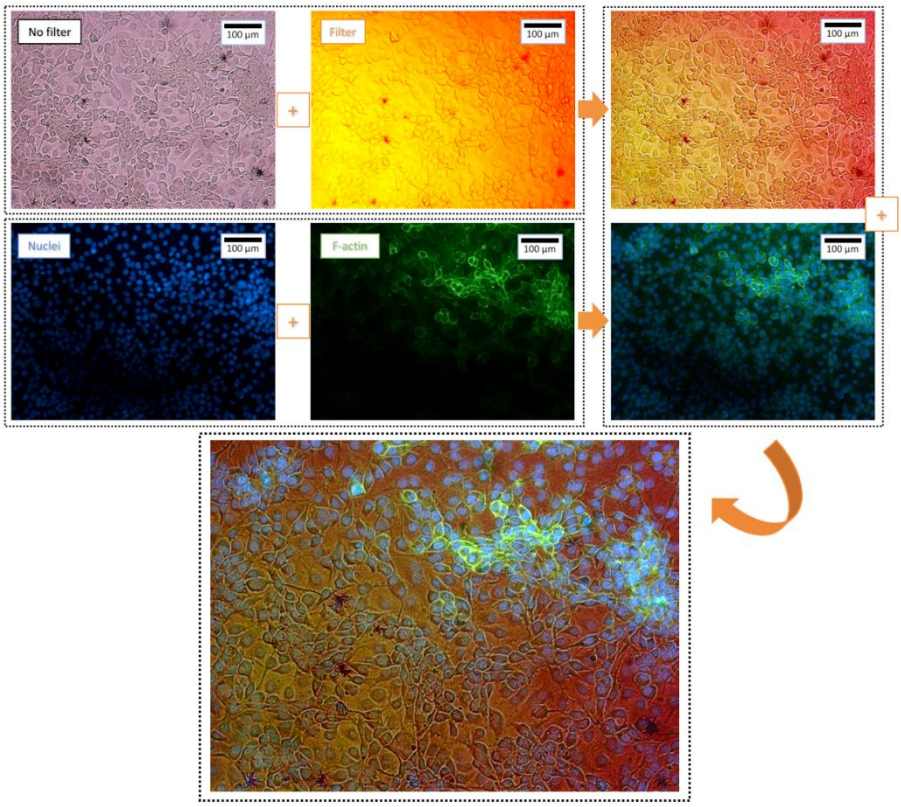


Figura 17 - Esquema de superposição das imagens obtidas em microscopia de epi-fluorescência.

Fonte: Cortesia de BELLANI, 2018 [81].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Biovidro® 45S5

5.1.1 Caracterização química

Na Tabela 7 é apresentada a composição química dos óxidos (% em peso) que compõem o Biovidro® 45S5 sintetizado em comparação com a composição química do vidro encontrada na literatura (% em peso).

Tabela 7 - Composição química do Biovidro® 45S5 sintetizado comparada com dados da literatura.

Óxidos	**Sintetizado (% em peso)**	**Literatura** [9] **(% em peso)**
SiO_2	44,3	45
Al_2O_3	<0,10	--
Fe_2O_3	<0,10	--
MnO	<0,10	--
MgO	<0,10	--
CaO	23,6	24,5
Na_2O	24	24,5
K_2O	<0,10	--
TiO_2	<0,10	--
P_2O_5	6,13	6
Perda ao Fogo	1,36	--

Fonte: Autoria própria.

Comparando os resultados da análise química do Biovidro® 45S5 com os valores encontrados na literatura, pode-se observar que os teores dos principais óxidos formadores do vidro são muito próximos. Além disso, os teores de óxidos do Biovidro sintetizado estão dentro da faixa de bioatividade indicada pelo diagrama proposto por Hench [9].

A elevada concentração dos óxidos Na_2O e CaO é fundamental para a garantia da boa bioatividade do Biovidro® 45S5, já que a liberação dos íons Na^+ e Ca^{2+} desencadeiam no início das reações que formam a camada de hidroxicarbonato apatita; a presença do P_2O_5 também é indispensável nas etapas finais de formação dessa camada [51].

A presença de óxidos como Al_2O_3, Fe_2O_3, MnO, MgO, K_2Oe TiO_2 é inferior a 0,1% em peso cada, o que pode não acarretar em grandes problemas para as aplicações do material e pode ser interpretada como dentro do limite de erros da medição.

As pequenas diferenças de composição do Biovidro fabricado podem ocorrer por erro de cálculo da quantidade de matéria-prima necessária para a fabricação. Pode-se destacar também a possível ocorrência de perdas de massa devido ao transporte ou perdas por volatilização durante a fusão. A elevada reatividade do Biovidro® 45S5 com a água também pode explicar as pequenas diferenças de composição.

5.1.2 Distribuição de tamanho médio das partículas

A Figura 18 mostra a curva de distribuição do tamanho médio das partículas para o Biovidro® 45S5 submetido à moagem em moinho de discos, moinho de bolas e moinho vibratório, respectivamente.

Após a moagem, a distribuição de tamanho de partículas encontra-se entre 300 nm e 1000nm. Esses resultados foram muito promissores, muito próximos ao espectro das nanopartículas (<100 nm).

Partículas de tamanho submicrométrico conferem melhores propriedades mecânicas e de bioatividade ao compósito. Segundo trabalho de Tamjid e colaboradores, a maior área superficial de partículas submicrométricas de Biovidro® 45S5 em matriz de PCL, permite maior contato do material cerâmico com os líquidos corpóreos, acelerando a formação da camada de hidroxicarbonato apatita, aumentando a bioatividade do material. Além disso, as partículas submicrométricas também conferem melhores propriedades mecânicas ao compósito, pois a maior área superficial aumenta a transferência de carga entre a matriz e as partículas [82].

Embora o resultado de tamanho de partículas tenha sido satisfatório, pode ser interessante a análise do comportamento das amostras quando as partículas têm tamanhos ainda menores. Experimentalmente observou-se que partículas ainda menores podem ser obtidas com a combinação de um maior tempo de moagem e a

não adição de PVB. O PABA mostrou-se um melhor defloculante durante a moagem;o PVB induziu a aglomeração das partículas.

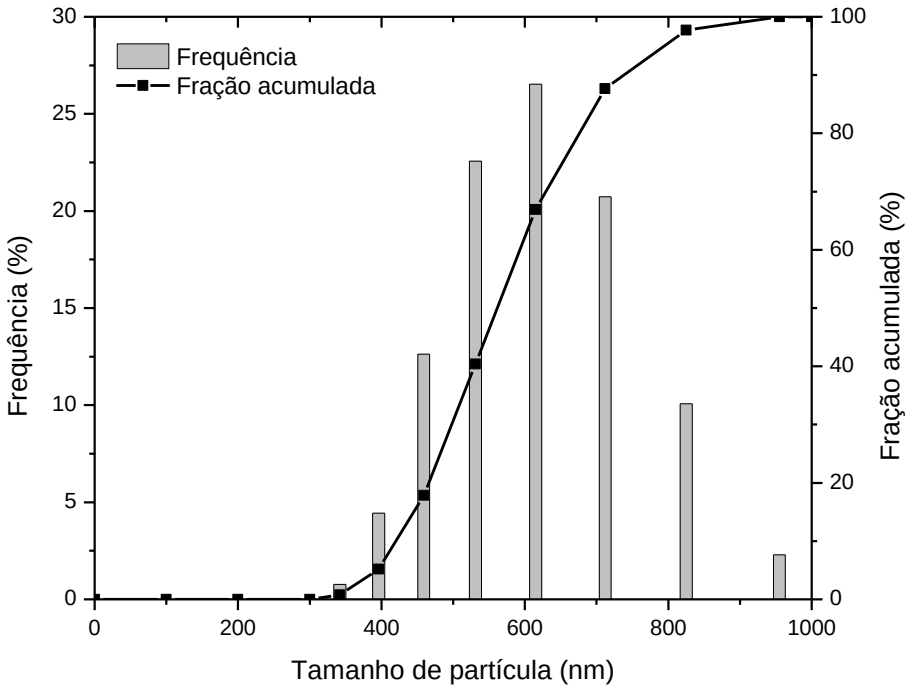


Figura 18 - Distribuição do tamanho médio de partículas do Biovidro® 45S5 após processo de moagem.

Fonte: Autoria própria.

5.2 Caracterização dos *Scaffolds*

5.3.1 Análise Morfológica

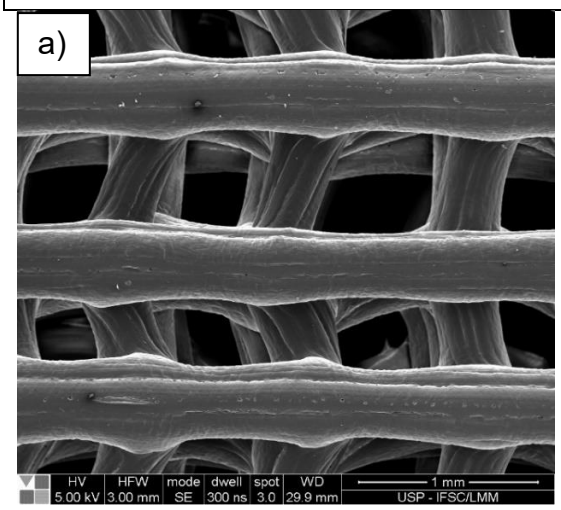
Primeiramente, é importante analisar a qualidade de impressão da impressora 3D utilizada para manufaturar os *scaffolds*. A Figuras 19(a) → (j)mostra as micrografias MEV do plano xy dos *scaffolfs* fabricados. As imagens mostram a arquitetura 0º/90º inicialmente proposta na preparação dos corpos de prova. Pode-se também observar a porosidade e a interconectividade entre os poros, características indispensáveis no projeto de peças para engenharia tecidual.

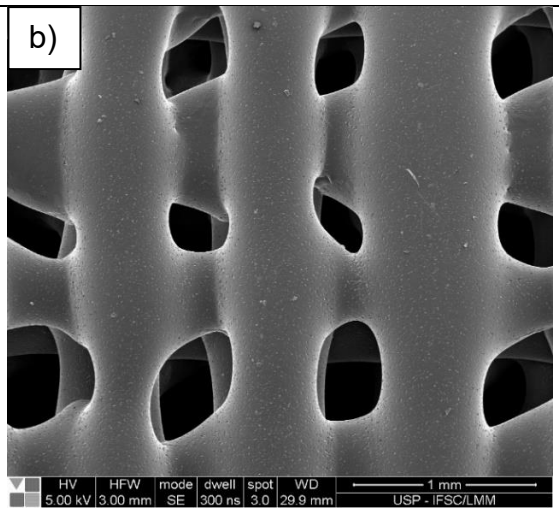
Os fios extrudados das amostras de PCL puro são irregulares quando comparados às amostras com carga cerâmica e nanofibras de celulose. Os parâmetros de impressão podem não ter sido adequados no momento da manufatura.

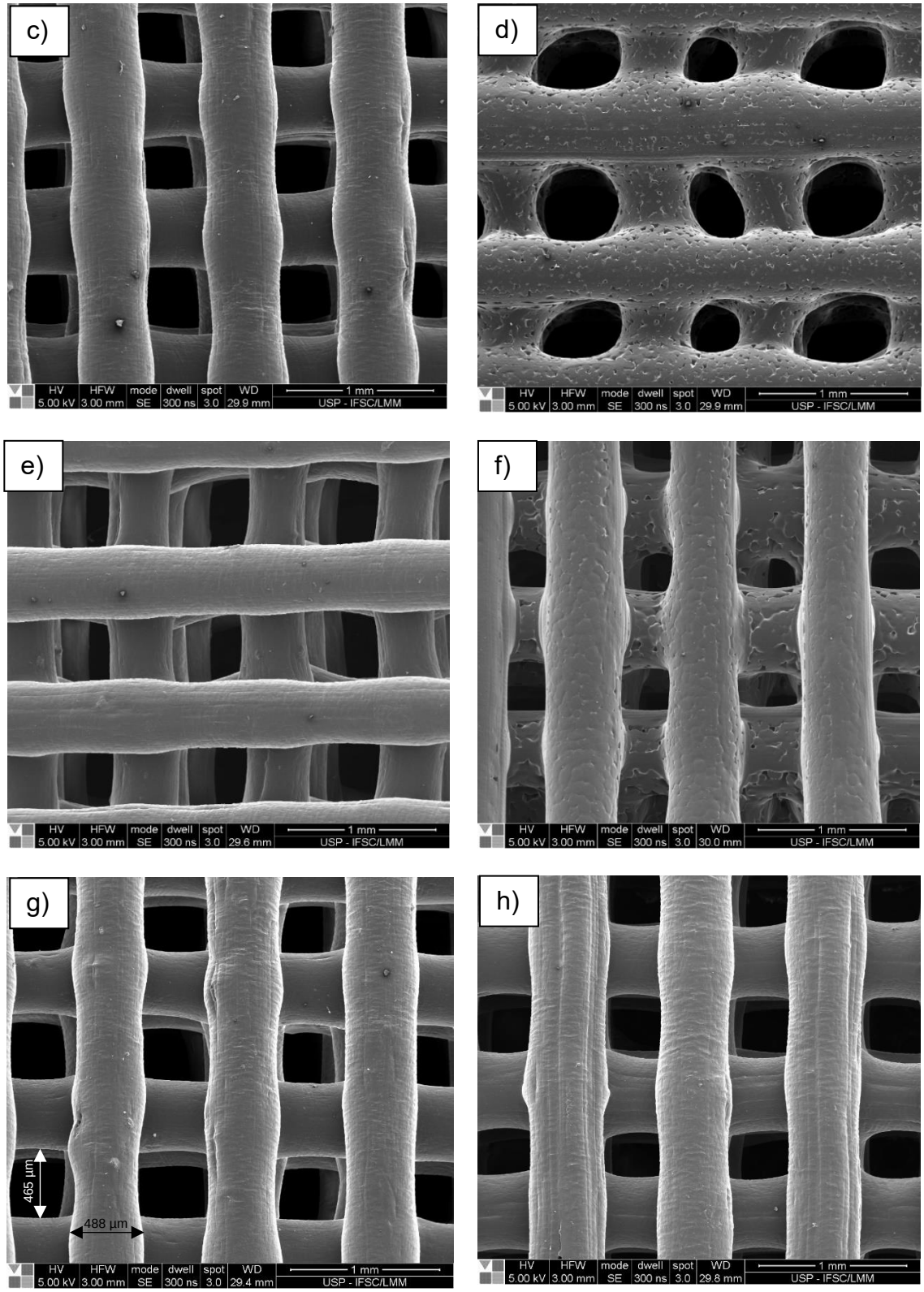
A elevada temperatura altera a viscosidade do polímero, dificultando o processo de deposição dos filetes e, contribuindo para o aparecimento de ângulos diferentes de 90º no interior dos poros. A altura de camada empregada na fabricação dos *scaffolds* da PCL pura extrudada diretamente no cabeçote da impressora, amostra denominada PCL, também pode ter influenciado na arquitetura irregular do *scaffold*, como pode ser observado na Figura 19(a). Como a primeira amostra a ser manufatura, a altura de camada (0,3 mm) utilizada não se mostrou eficiente, já que não houve boa adesão da camada superior sobre a camada inferior. Em contrapartida, nota-se bons resultados de estruturação dos fios para as amostras que contém carga, o que evidencia que, nesses casos, os parâmetros de processo foram adequados.

Analisando as Figuras 19(b), 19(d) e 19(f), pode-se notar também a presença de microvazios nos filetes dessas amostras. A pré-extrusão em extrusora monorrosca realizada nas amostras em questão, pode ter alterado o comportamento de fluxo dos materiais. Quando submetidos ao processo de impressão 3D, a temperatura de 82 ºC foi mantida, e essa pode não ter sido ideal para a fusão dos materiais. O aparecimento dos microvazios nos fios extrudados pode influenciar negativamente as propriedades mecânicas, logo é necessário realizar testes prévios dos materiais, como análise térmica e reológica, antes de submetê-los à etapa de manufatura aditiva. Por outro lado, os microvazios possibilitam maior adesão e proliferação celular.

Extrusão direta no cabeçote da impressora	Pré-extrusão em extrusora monorosca, seguida de extrusão no cabeçote






c)
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 29.9 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM
d)
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 29.9 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM
e)
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 29.6 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM
f)
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 30.0 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM
g)
465 µm
488 µm
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 29.4 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM
h)
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 29.8 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM

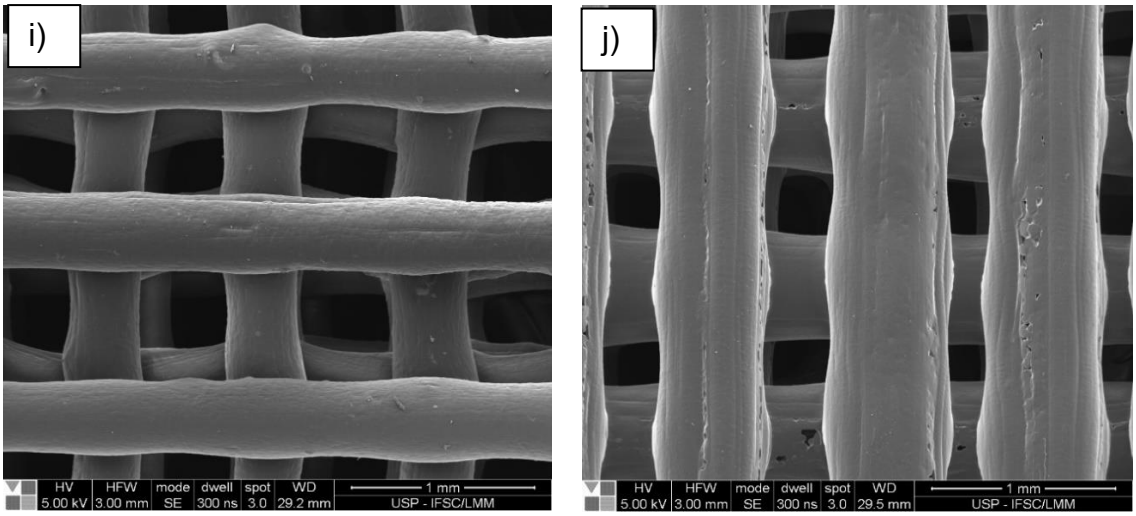


Figura 19 - Micrografias MEV das visões superiores (plano xy) dos *scaffolds* fabricados: (a) PCL; (b) EXPCL; (c) PCL+ 2,5 % BV; (d) EX + 2,5 % BV; (e) PCL + 5 % BV; (f) EXPCL + 5 % BV; (g) PCL + 2,5 % BV/NFC; (h) EXPCL + 2,5 % BV/NFC; (i) PCL + 5 % BV/NFC; (j) EXP + 5% BV/NFC.

Fonte: Autoria própria.

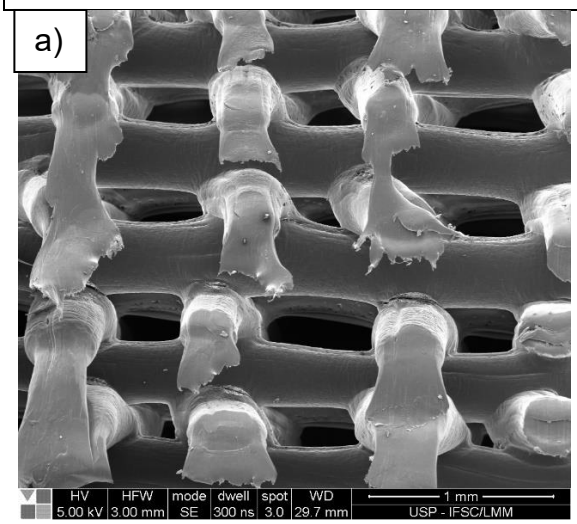
As micrografias MEV mostradas na Figura 20 permitem a avaliação da adesão entre as camadas dos *scaffolds*. Pode-se notar a boa adesão entre as camadas, embora o diâmetro dos filetes extrudados não seja exatamente uniforme. O diâmetro médio do fio extrudado previamente proposto na confecção dos *scaffolds* foi de 450 µm. Pode-se observar na Tabela 8 que a maior parte das amostras apresentou fios extrudados com diâmetro médio coerente com o configurado. No entanto, as amostras de PCL + 2,5% BV, EXPCL + 2,5% BV/NFC e EXPCL + 5% BV/NFC apresentaram diâmetros médios consideravelmente maiores. Esse resultado pode ter relação com a escolha incorreta dos parâmetros de processo, a temperatura e/ou a velocidade escolhidas podem ter sido elevadas para essas composições e, também, pode ser influenciado pela instabilidade da temperatura durante o processo da manufatura aditiva.

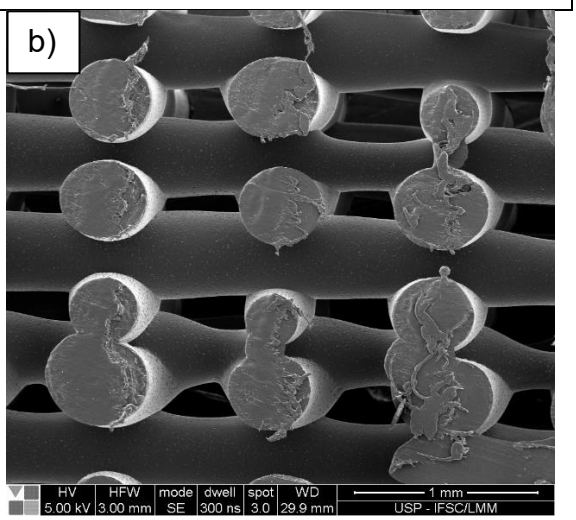
Tabela 8 - Diâmetro médio do fio extrudado.

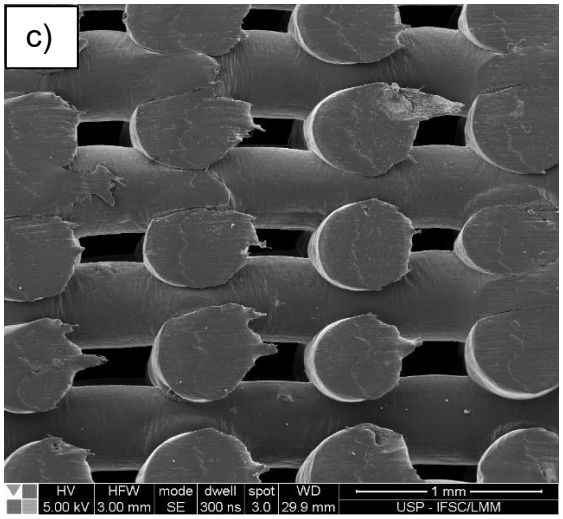
Amostra	Diâmetro médio do fio extrudado (µm)
PCL	441,84 ± 40,65
PCL + 2,5% BV	506,35 ± 29,56
PCL + 5% BV	473,76 ± 27,07
PCL + 2,5% BV/NFC	478,07 ± 25,34
PCL + 5 % BV/NFC	410,85 ± 25,03
EXPCL	414,24 ± 53,03
EXPCL + 2,5% BV	411,26 ± 19,23
EXPCL + 5% BV	489,43 ± 50,36
EXPCL + 2,5% BV/NFC	510,20 ± 28,36
EXPCL + 5 % BV/NFC	651,51 ± 38,08

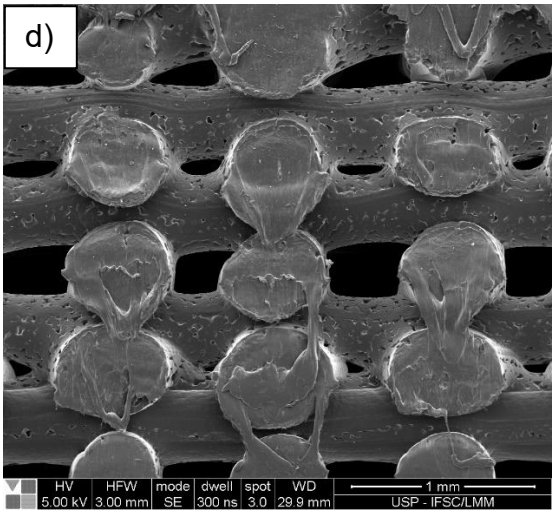
Fonte: Autoria própria.

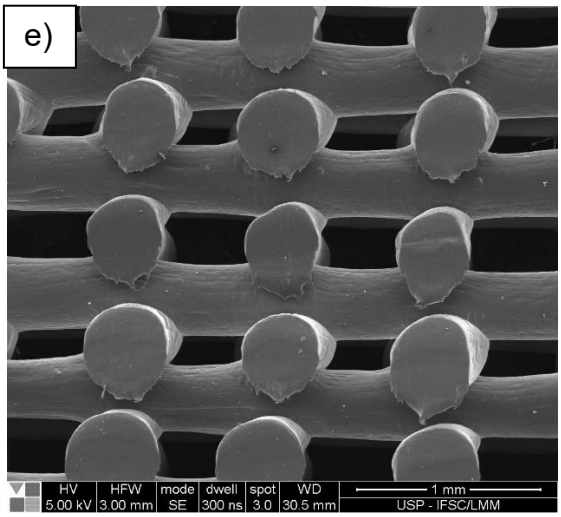
Extrusão direta no cabeçote da impressora	Pré-extrusão em extrusora monorosca, seguida de extrusão no cabeçote

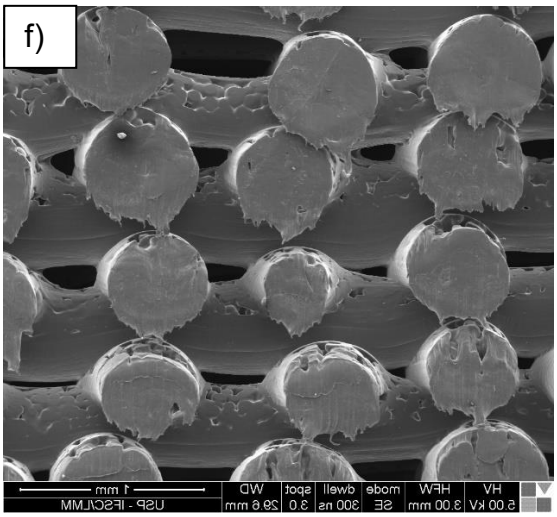


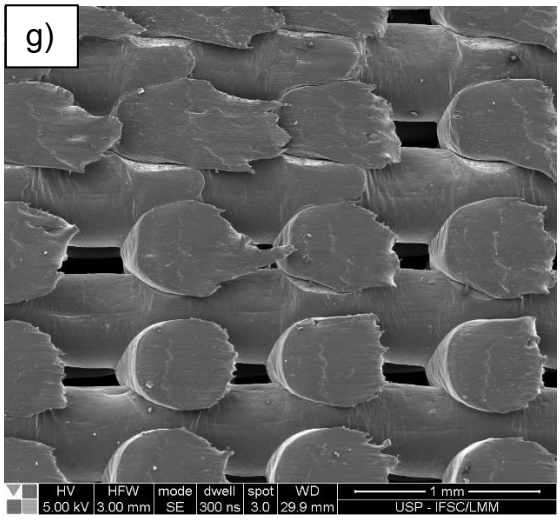


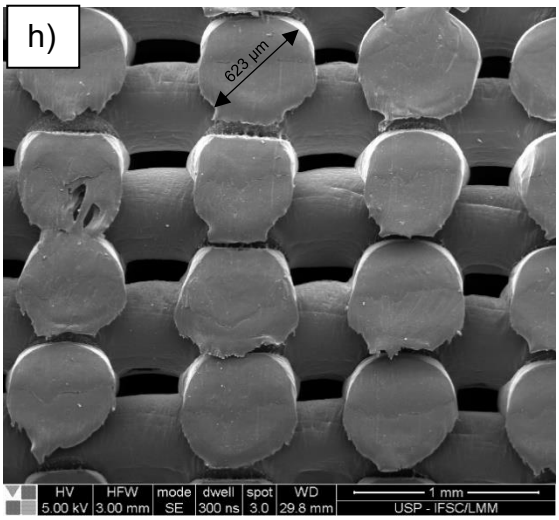

c)
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 29.9 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM


d)
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 29.9 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM


e)
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 30.5 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM


f)


g)
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 29.9 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM


h)
623 µm
HV 5.00 kV
HFW 3.00 mm
mode SE
dwell 300 ns
spot 3.0
WD 29.8 mm
1 mm
USP - IFSC/LMM

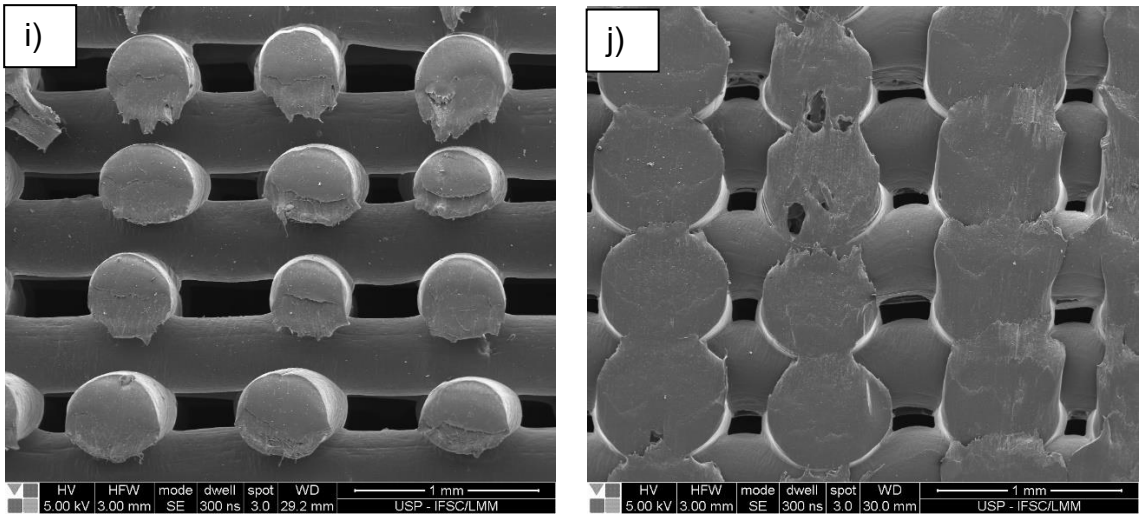


Figura 20 - Micrografias MEV de seções transversais dos *scaffolds* fabricados: (a) PCL; (b) EXPCL; (c) PCL+ 2,5 % BV; (d) EXPCL + 2,5 % BV; (e) PCL + 5 % BV; (f) EXPCL + 5 % BV; (g) PCL + 2,5 % BV/NFC; (h) EXPCL + 2,5 % BV/NFC; (i) PCL + 5 % BV/NFC; (j) EXPCL + 5 % BV/NFC.

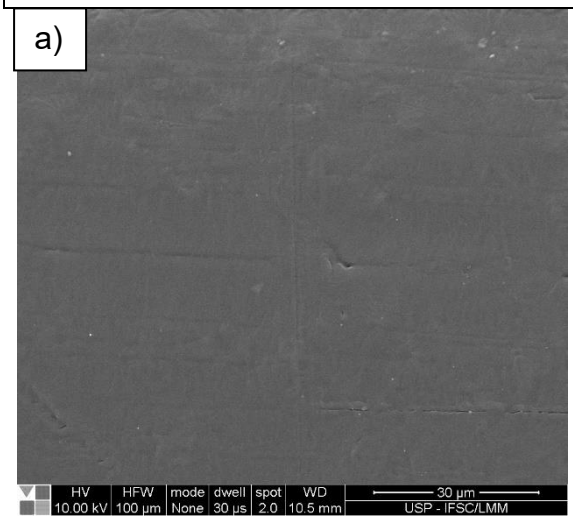
Fonte: Autoria própria.

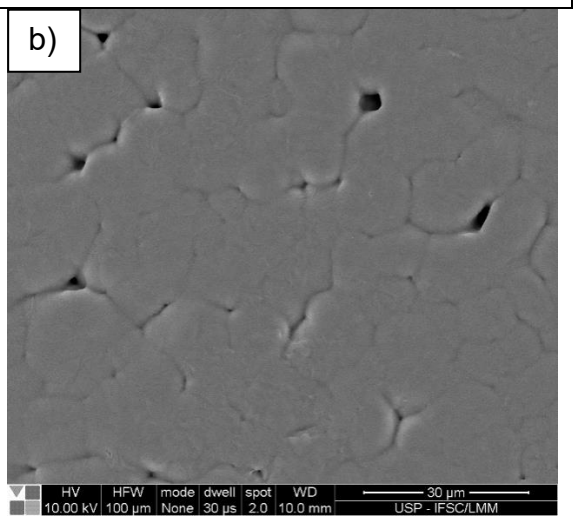
A Figura 21 mostra as micrografias MEV das amostras evidenciando a distribuição e dispersão das partículas de biovidro na matriz polimérica. Pode-se observar a presença de microvazios, principalmente notados nas micrografias de EXPCL e EXPCL + 2,5% BV. Esses microvazios são possivelmente causados pela temperatura instável durante o processo de impressão 3D, consequência do ambiente não controlado e possíveis erros de medida do termostato.

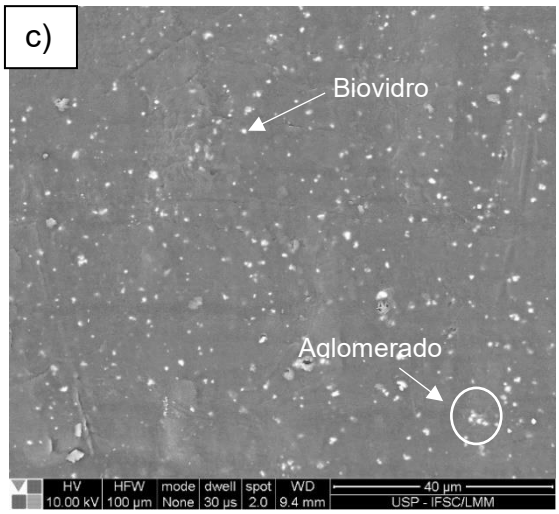
As micrografias MEV da Figura 21 também mostram a boa distribuição da fase cerâmica na matriz polimérica. Essa característica pode ser observada tanto nas amostras pré-extrudadas seguida de extrusão no cabeçote, quanto nas amostras diretamente extrudadas no cabeçote da impressora. Tal fato evidencia bom desempenho do cabeçote de extrusão da impressora 3D quando se deseja distribuição homogênea da carga na matriz. Dessa forma, pode ser interessante a eliminação da etapa de pré-extrusão em extrusora monorosca no processo de fabricação dos *scaffolds*.

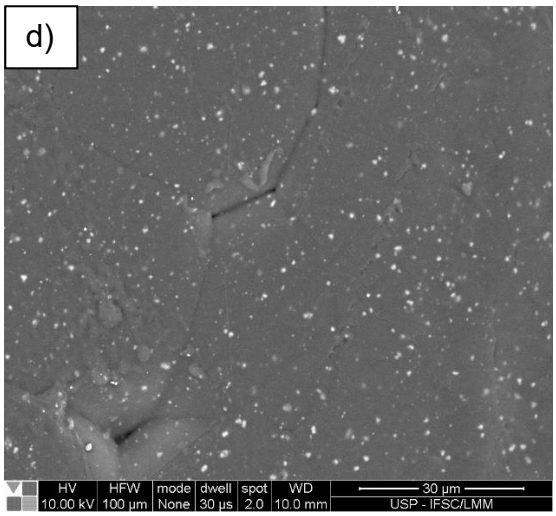
Pode-se observar nas micrografias da Figura 21 a presença de regiões com elevadas concentrações de sólidos, logo, nota-se uma dispersão pouco eficiente das partículas de Biovidro® 45S5.

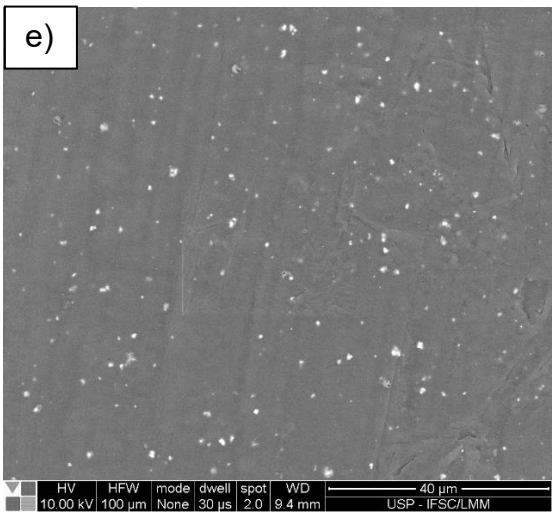
Extrusão direta no cabeçote da impressora	Pré-extrusão em extrusora monorosca, seguida de extrusãono cabeçote

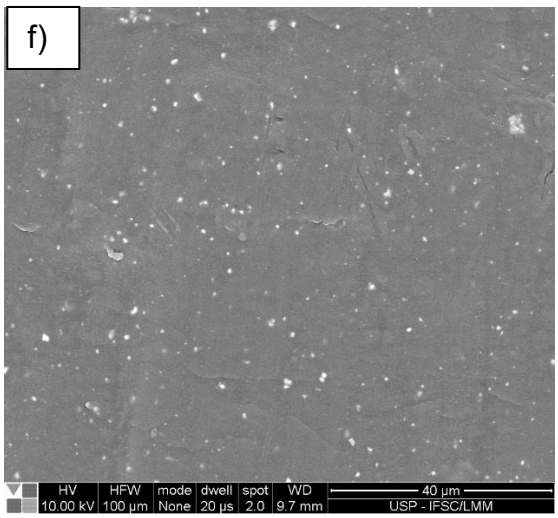












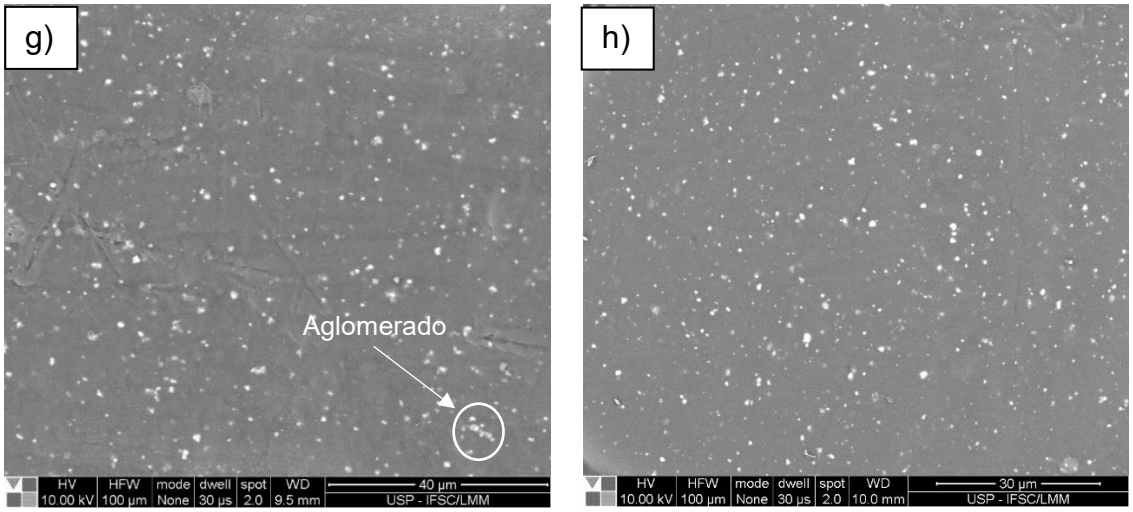


Figura 21 - Distribuição e dispersão das partículas de Biovidro 45S5 nos scaffolds fabricados: (a) PCL; (b) EXPCL; (c) PCL + 5 % BV; (d) EXPCL + 5 % BV; (e) PCL + 2,5 % BV/NFC; (f) EXPCL + 2,5 % BV/NFC; (g) EXPCL + 5 % BV/NFC; ; (h) EXPCL + 5 % BV/NFC.

Fonte: Autoria própria.

A análise morfológica também buscou avaliar a geometria e as dimensões dos poros presentes na estrutura dos *scaffolds.* O controle do tamanho dos poros é fundamental para garantir propriedades mecânicas que sejam compatíveis às propriedades do osso e, assim, garantir a funcionalidade do *scaffold*, além de garantir um ambiente favorável para adesão, diferenciação e proliferação celular. Segundo à dados da literatura, o tamanho mínimo de poro recomendado para a confecção de um *scaffold* é de 100 µm [31]. Alguns estudos mostraram que melhor osteogênese ocorre em scaffolds com tamanho de poro maior que 300 µm, já que poros maiores favorecem maior vascularização e oxigenação [83,84]. Pode-se observar na Tabela 9 que os tamanhos médios de poro obtidos para os *scaffolds* fabricados são sempre maiores que 100 µm e, com exceção da amostra EXPCL + 5% BV, os demais *scaffolds* têm tamanho de poro superior a 300 µm, garantindo melhores propriedades às amostras manufaturadas.

É importante ressaltar que há um limite superior para o tamanho dos poros, já que o aumento do volume de vazio resulta na redução das propriedades mecânicas, o que pode ser crítico para a regeneração óssea [31]. O tamanho médio de poro da amostra PCL + 5% BV/NFC é superior à 500 µm e pode ter influência na diminuição da resistência mecânica desse *scaffold*.

Além disso, a Tabela 9 mostra que o tamanho de poros está de acordo com o tamanho estabelecido para a confecção dos *scaffolds*, que foi de 450 µm,

evidenciando a eficiência do processo de manufatura adotado.

Tabela 9 - Tamanho médio dos poros.

Amostra	Tamanho médio dos poros (µm)
PCL	447,21 ± 90,74
PCL + 2,5% BV	413,73 ± 50,53
PCL + 5% BV	439,69 ± 53,06
PCL + 2,5% BV/NFC	431,28 ± 39,94
PCL + 5 % BV/NFC	516,51 ± 63,84
EXPCL	353,56 ± 111,05
EXPCL + 2,5% BV	452,04 ± 92,04
EXPCL + 5% BV	278,15 ± 61,17
EXPCL + 2,5% BV/NFC	390,67 ± 44,22
EXPCL + 5 % BV/NFC	321,64 ± 50,34

Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Propriedade Mecânica – Ensaio de Compressão

Os ensaios mecânicos de compressão foram realizados com o intuito de analisar o efeito do Biovidro® 45S5 e das nanofibras de celulose sobre as propriedades mecânicas dos *scaffolds.*

Os testes também foram realizados para verificar se os valores de módulo de elasticidade são compatíveis com os valores necessários para aplicação do material em engenharia tecidual. Segundo a literatura, o módulo de elasticidade do tecido ósseo encontra-se na faixa de 0,02 a 14,1GPa [26,85]. Como pode ser observado nas Figuras 22 e 23 os valores de módulo de elasticidade experimentais para todas as amostras estão dentro dessa faixa de valores, atendendo a exigência necessária para aplicações médicas.

5.3.2.1 Compósitos extrudados diretamente no cabeçote de extrusão

A Figura 22 mostra o aumento do módulo de elasticidade das amostras de PCL + 2,5% BV e PCL + 2,5% BV/NFC quando comparadas à amostra de PCL puro. Isso mostra que as partículas de biovidro e as nanofibras de celulose conferiram maior rigidez ao compósito, funcionando como reforço. No entanto, com o aumento da

concentração de biovidro nas amostras de PCL + 5% BV e PCL + 5% BV/NFC, nota-se a diminuição do módulo de elasticidade, apresentando valores médios próximos aos valores da amostra de PCL pura. Tal fato pode ser explicado pela presença de aglomerados das partículas de BV e BV/NFC na matriz polimérica; os aglomerados funcionam como concentradores de tensão e fragilizam o *scaffold*. Esse resultado corrobora com os resultados de microscopia (Figura 21) que confirmam a presença dos aglomerados das partículas de BV e BV/NFC.

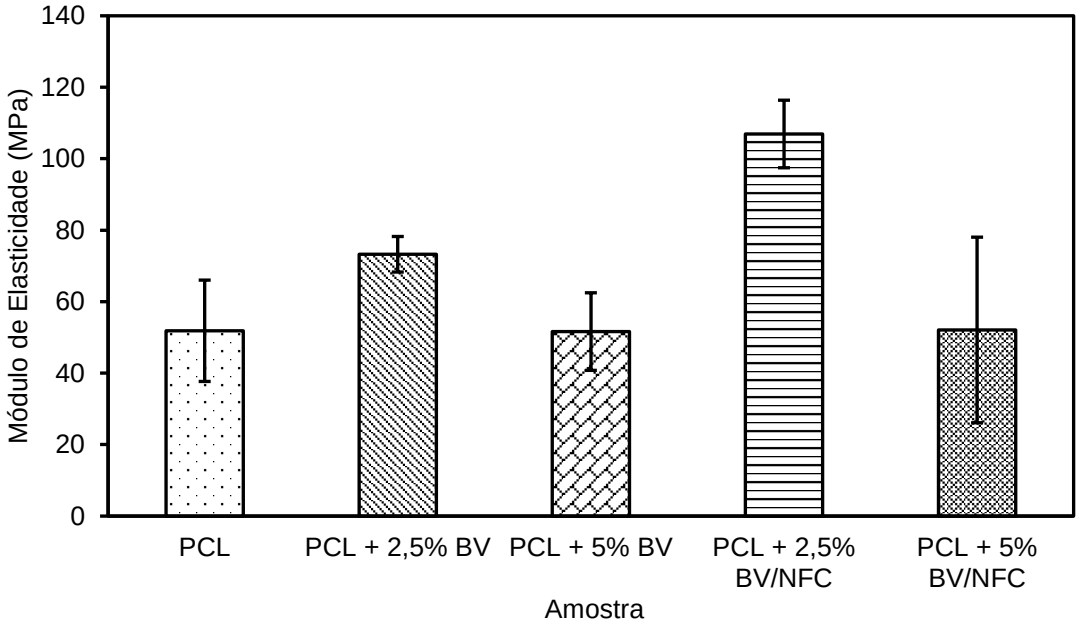


Figura 22 - Módulo de elasticidade dos *scaffolds* com diferentes composições de Biovidro® 45S5 e nanofibras de celulose, extrudados diretamente no cabeçote de extrusão.

Fonte: Autoria própria.

5.3.2.2 Compósitos pré-extrudados em extrusora monorosca seguida de extrusão no cabeçote de extrusão

A Figura 23 mostra os módulos de elasticidades para as amostras que foram previamente extrudadas em extrusora monorosca, seguida de extrusão em cabeçote de impressão. Nesse caso, observa-se a menor rigidez na amostra PCL + 2,5% BV, isso pode ter acontecido a grande incidência de microvazios nos filetes do scaffolds, observados nas imagens de microscopia MEV (Figura 19(d) e Figura 20(d)). No caso das demais amostras, todas apresentaram valores médios maiores quando comparadas à amostra de PCL pura, sendo que as amostras com 5% em massa de

aditivo conferem maios rigidez quando comparada aos compósitos com 2,5% em massa de aditivo. Dessa forma, mostrou-se que a maior concentração em massa de biovidro tem relação direta com o aumento da rigidez do compósito. Outro fato que pode ser considerado é o de que os tamanhos de poro médios para as amostras de PCL + 5% BV e EXPCL + 5% BV/NFC são consideravelmente menores, com valores próximos a 300 µm, enquanto para as demais amostras, os valores variam entre 400 e 500 µm.

Pode-se notar também que as amostras com nanofibra de celulose apresentam melhores resultados de módulo elástico, indicando possível influência da celulose na interação biovidro e matriz polimérica. Provavelmente, as nanofibras de celulose recobriram eficientemente a superfície das partículas de biovidro, aumentando a adesão da fase dispersa e da matriz.

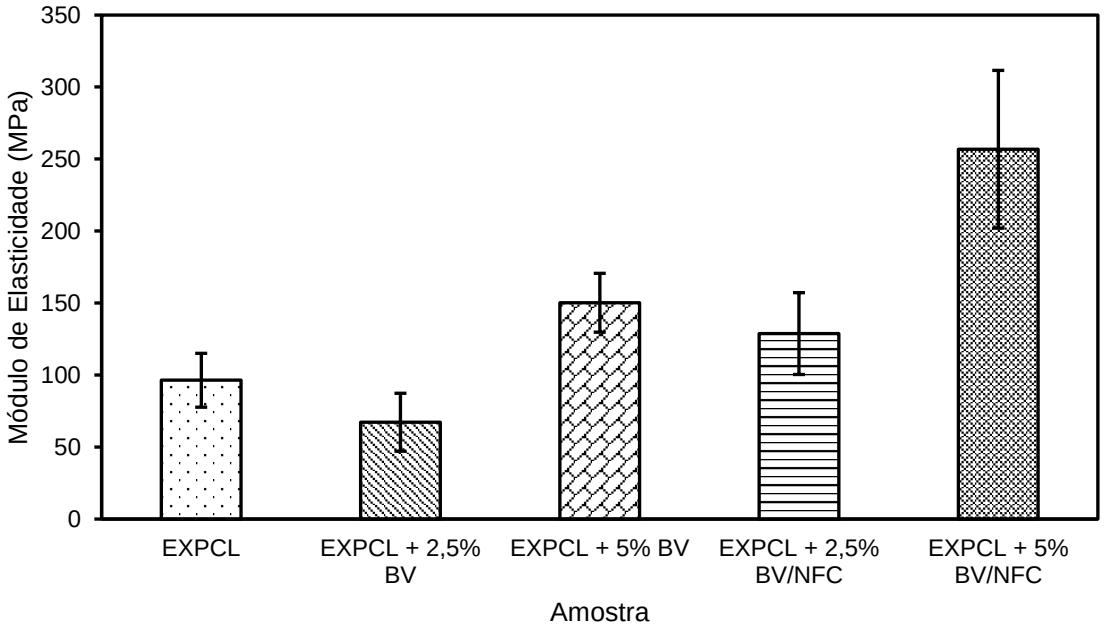


Figura 23 - - Módulo de elasticidade calculado para os *scaffolds* com diferentes composições de Biovidro® 45S5 e nanofibras de celulose pré-extrudados em extrusora monorosca. seeguida de extrusão no cabeçote de extrusão

Fonte: Autoria própria.

5.4 Análise biológica *in vitro* dos *scaffolds*

5.4.1 Citotoxicidade e viabilidade celular

As Figuras 24 e 25 mostram gráficos de viabilidade celular para células pré-osteoblastos, durante o ensaio *in vitro* dos *scaffolds*fabricados, medida pela fluorescência relativa da resazurina. Quanto maior a fluorescência relativa, maior o número de células viáveis. Destaca-se que os asteriscos indicados nos gráficos correspondem a 95% de confiabilidade nos resultados comparativos entre as amostras.

5.4.1.1 Compósitos extrudados diretamente no cabeçote de extrusão

A Figura 24 mostra que houve crescimento no número de células viáveis para todas as amostras quando observados os períodos de 3 e 7 dias. Contudo, para os demais períodos, nota-se que há diminuição na proliferação celular entre 7 e 14 dias e entre 14 e 21 dias para as amostras de PC + 2,5% BV, PCL + 5% BV, PCL + 2,5% BV/NFC e PCL + 5% BV/NFC. Logo, quando se trata dos materiais compósitos, a viabilidade celular observada é menor quando comparados aos materiais puros. Ressalta-se, entretanto, que houve proliferação de osteoblastos para todas amostras, confirmando, portanto, o caráter não-citotóxico dos *scaffolds*. Além disso, é possível observar que o controle (células) apresentou viabilidade celular estatisticamente superior à demais amostras nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Também é possível perceber, nesse caso, que a presença do Biovidro® 45S5 e das nanofibras de celulose não pareceram exercer grande influência na bioatividade dos materiais e que as amostras com maior quantidade de biovidro (5% em massa) apresentam resultados inferiores.

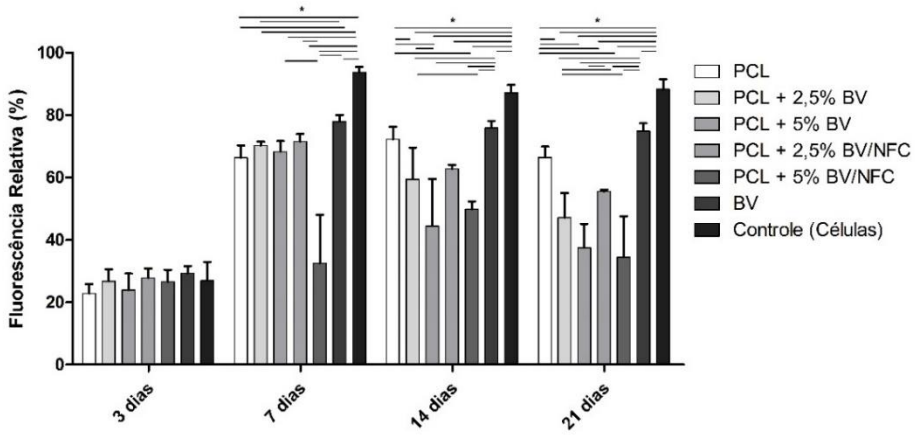


Figura 24 - Viabilidade celular de células cultivadas nos diferentes extratos de materiais extrudados diretamente em cabeçote de extrusão. Grupos representam a quantidade de dias de cultivo. Cada coluna representa a média ± desvio padrão para n = 3 e *p< 0,05.

Fonte: Autoria própria.

5.4.1.2 Compósitos pré-extrudados em extrusora monorosca seguida de extrusão no cabeçote de extrusão

A Figura 25 mostra o crescimento no número de células para todas as amostras. Além disso, é possível observar que o controle apresentou viabilidade celular muito superior às demais amostras nos períodos de 14 e 21 dias. Também é possível perceber, nesse caso, que a presença do Biovidro® 45S5 e das nanofibras de celulose não pareceram exercer grande influência na bioatividade dos materiais, já que os valores de fluorescência relativa do polímero puro são próximos aos valores dos compósitos.

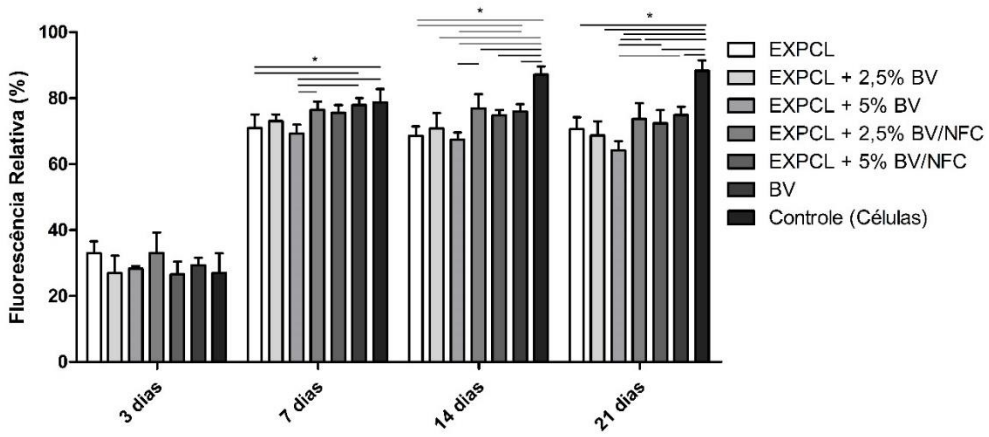


Figura 25 - Viabilidade celular de células cultivadas nos diferentes extratos de materiais previamente extrudados em extrusora monorosca seguida de extrusão em cabeçote de extrusão. Grupos representam a quantidade de dias de cultivo. Cada coluna representa a média ± desvio padrão para n = 3 e *p < 0,05.
Fonte: Autoria própria.

Ao observar os testes de citotoxicidade/viabilidade celular, nota-se que as amostras puras, com somente biovidro ou somente PCL, mostram resultado de proliferação celular superior ou muito semelhante aos resultados das demais amostras e, que a combinação desses materiais também confere bons resultados de viabilidade celular. Ressalta-se, novamente, que os osteoblastos proliferaram continuidade para todas as amostras. Portanto, tanto os *scaffold*s de compósitos, não-extrudados e extrutados e o biovidro utilizado, não apresentam citotoxicidade e suportam a proliferação de pré-osteoblastos MG-63.

5.4.2 Biomineralização

Após 21 dias de cultura, a biomineralização *in vitro* pode ser detectada por meio da coloração de vermelho de alizarina, que colore exudatos de cálcio das células entre os *scaffolds* (Figura 26). A biomineralização refere-se à deposição de sais de cálcio extracelulares a partir das células, onde moléculas aniônicas da matriz extracelular ligam-se ao Ca^{2+}, e íons fosfato servem de sítios de nucleação e crescimento, levando à calcificação [86], e o vermelho de alizarina cora estes depósitos. Observa-se, contudo, uma quantidade expressivamente maior de coloração vermelha nas amostras contendo Biovidro® 45S5 do que na amostra de PCL puro e do controle. Estas observações corroboram com o trabalho de Bellani, 2018, que avalia a biomineralização *in vitro* a partir de osteoblastos MG-63 cultivados com membranas eletrofiadas de PCL com Biosilicato® [81] e de outros trabalhos de *scaffolds* de PCL incorporados com cerâmicas bioativas [87–91]. Contudo, ensaios quantitativos são necessários para se estabelecer uma correlação com os compósitos adicionados aos *scaffolds* e a quantidade de biominerais, para futuramente ser possível prever a biomineralização *in vivo* e, portanto, a formação óssea.

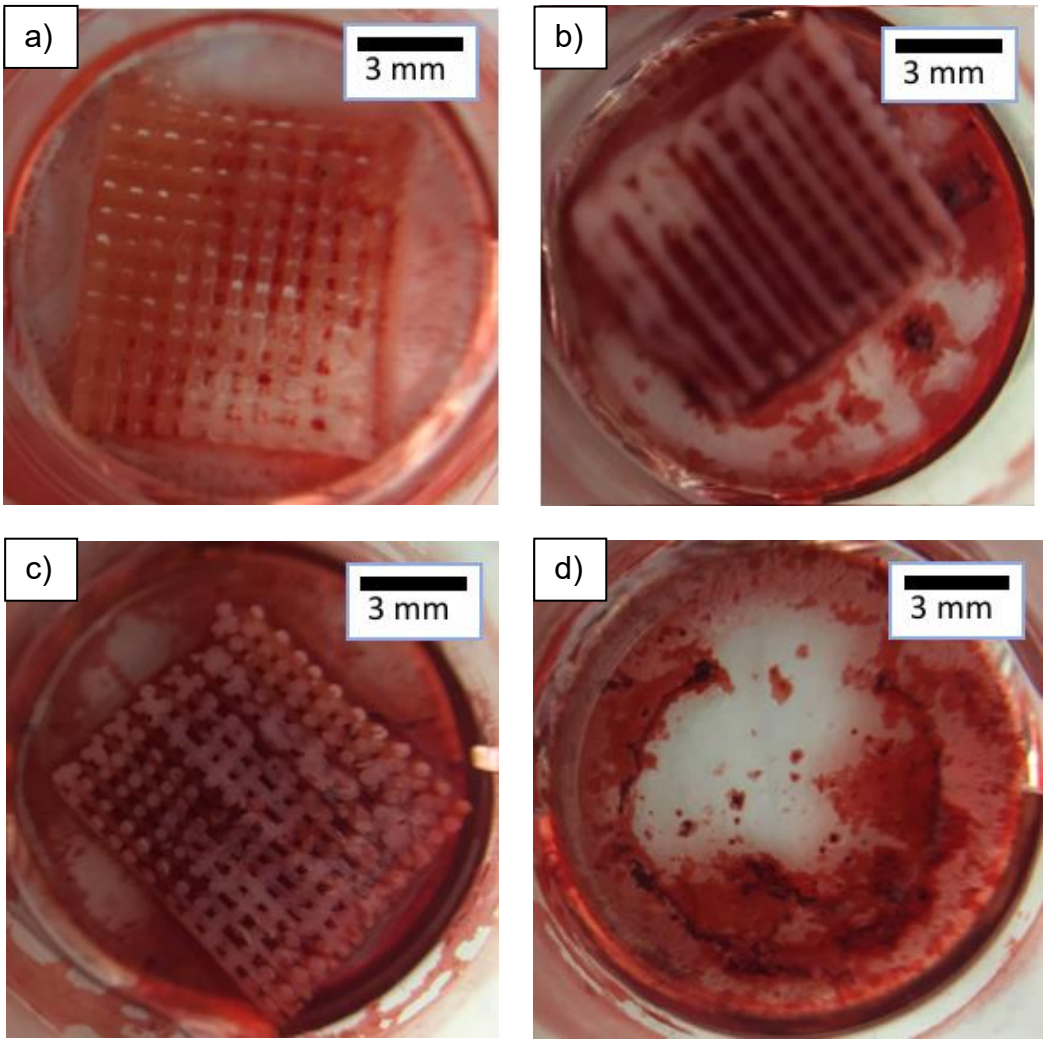


Figura 26 - Fotografias obtidas por câmera equipada com lente macro de amostras dos *scaffolds* e do controle, após 21 dias de cultivo com osteoblastos e respectiva coloração com vermelho de alizarina. (a) EXPCL; (b) EXPCL + 5% BV; (c) PCL+ 5 % BV/NFC; (d) Controle.

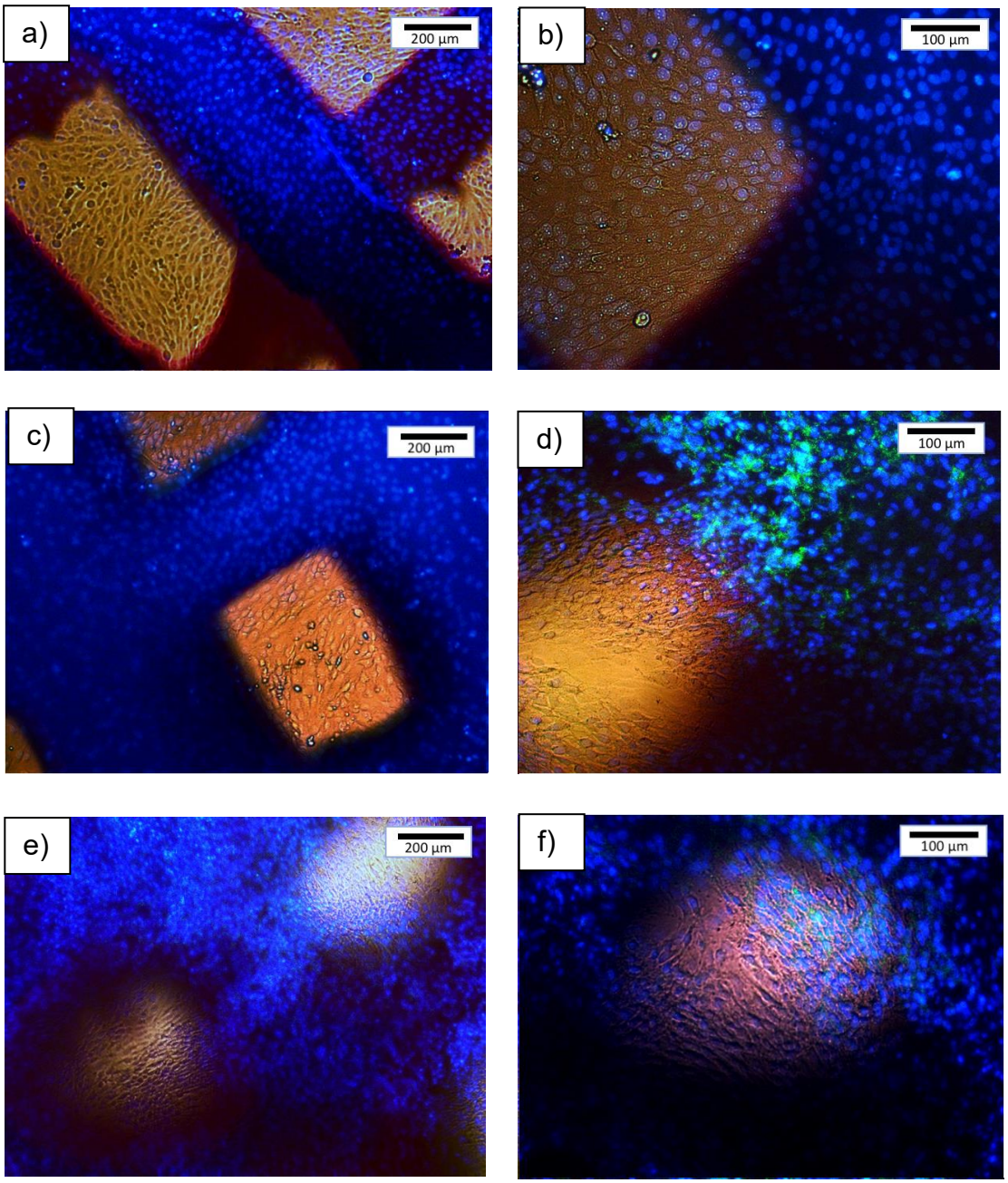
Fonte: Autoria própria.

5.4.3Microscopia de Epi-fluorescência

Na Figura 27 são apresentadas imagens de fluorescência sobrepostas com imagens de microscopia de luz de osteoblastos cutivados nos *scaffolds* e na amostra controle sem *scaffold*. A estrutura geral das células e a estrutura dos *scaffolds*, também são evidenciadas nas imagens de microscopia de luz. A partir destas imagens é possível ver que os osteoblastos cresceram e se aderiram nas regiões porosas e poliméricas dos *scaffolds*, após 7 dias, evidenciando, juntamente com o ensaio da resazurina (proliferação e viabilidade celular), o caráter não-tóxico dos *scaffolds*.

Como a microscopia de epi-fluorescência é uma análise qualitativa, sugere-se, para estudos futuros, que análises quantitativas do número de células totais em cada

poço sejam realizadas e complementadas com análises estatísticas. As células podem ser quantificadas pela superimposição de várias imagens obtidas de diferentes regiões dos poços e quantificação por meio de software específico. Também é possível realizar citometria de fluxo com o mesmo propósito.



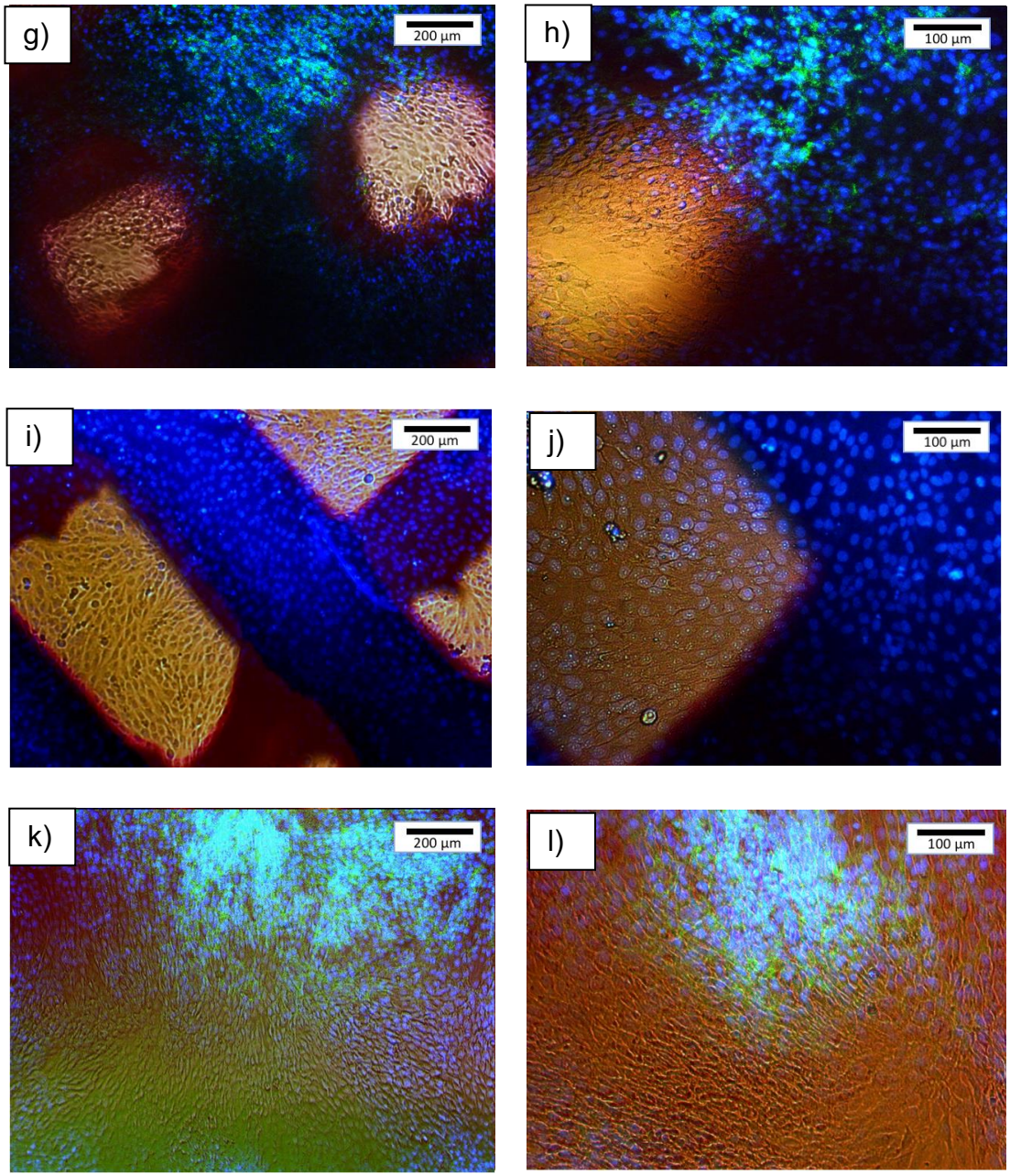


Figura 27 - Imagens de Epi-fluorescência de osteoblastos cultivados nos *scaffolds*: (a) e (b) PCL; (c) e (d) PCL + 2,5% BV; (e) e (f) PCL + 5% BV; (g) e (h) PCL + 2,5% BV/NFC; (i) e (j) PCL + 5% BV/NFC; (k) e (l) Controle (sem células).

Fonte: Autoria própria.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, o processamento dos *scaffolds* sob dois métodos diferentes foi importante para identificar a capacidade ou não de mistura e homogeneização unicamente realizada pela impressora 3D em comparação com materiais que foram pré-processados em extrusora monorrosca.

A análise morfológica dos *scaffolds* mostrou a obtenção de amostras com arquitetura 0°/90º sem descontinuidade, o que evidencia boa compatibilidade entre os *softwarese* a impressora 3D. No entanto, ainda é necessário investigar novamente os melhores parâmetros de impressão no caso dos compósitos analisados, de modo a evitar possíveis erros, como a não completa fusão do polímero, os microvazios e a variação no diâmetro do fio extrudado e tamanho de poro. O controle contínuo da temperatura e a velocidade de impressão são fundamentais para a produção de melhores resultados.

Os resultados mecânicos mostraram que os materiais podem ser utilizados para a aplicação de engenharia tecidual, já que, eles atendem as especificações exigidas na literatura para módulo de elasticidade/rigidez (0,02 a 0,5GPa). Os resultados mecânicos para os materiais que foram pré-processados em extrusora monorrosca e, em seguida, impressos, mostrou que o aumento na porcentagem em massa de biovidro está intimamente relacionado com o aumento da rigidez nos compósitos. Tal comportamento não foi verificado nos materiais processados unicamente na impressora 3D, isso pode ter ocorrido pela maior presença de aglomerados de material nesse caso, que podem ter fragilizado o compósito final. Dessa forma, é possível concluir que, quando o material é submetido à pré-extrusão, esse apresenta melhores resultados com maior quantidade de carga cerâmica, o que pode estar relacionado com melhor distribuição e dispersão das partículas de biovidro nesse caso. Uma significativa melhora nas propriedades mecânicas dos compósitos quando esses apresentam na composição as nanofibras de celulose, pode evidenciar que elas têm importante papel na melhora da adesão de biocerâmica/matriz polimérica. No entanto, é importante ressaltar que um estudo mais sistemático de formas de dispersão de nanofibra de celulose/biovidro se faz necessário.

A avaliação biológica *in vitro* mostrou a proliferação celular e o caráter não citotóxico para células pré-osteoblásticas MG-63 com os compósitos analisados. No

teste de viabilidade celular pode-se perceber que os resultados dos *scaffolds* com pré-processamento em extrusora monorrosca apresentaram melhores resultados de proliferação celular no período de 21 dias. Observou-se proliferação celular em todas as amostras, com os melhores resultados para as amostras de polímero puro ou bioidro puro. Com o ensaio de biomineralização, é possível notar que a presença de biovidro é responsável pela maior deposição de saias de cálcio extracelular, o que facilitará a ligação entre o material sintetizado ao tecido ósseo.

Os resultados morfológicos, mecânicos e biológicos mostraram-se promissores para que trabalhos futuros sejam realizados, como os testes *in vivo*. Dessa forma será possível observar a viabilidade do uso do material estudado como *scaffold* para engenharia tecidual.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar o comportamento térmico e a cristalização dos *scaffolds* nas composições propostas;
- Estudar outras maneiras de mistura para o biovidro e a nanofibra de celulose de forma a melhorar a interação entre os reforços e a matriz polimérica;
- Estudar outras maneiras de obter e moer o biovidro que possam garantir menores tamanhos de partícula;
- Analisar o comportamento do biovidro durante à moagem quando sob influência dos defloculantes PVB e PABA;
- Investigar a possibilidade de fabricação de scaffolds com geometrias ainda mais similares a da estrutura óssea;
- Estudar o comportamento do material *in vivo* para que se possa observar se ocorre processo inflamatório e osteogênese mais acentuada.

8. REFERÊNCIAS

[1] AGARWAL, R.; GARCÍA, A. J. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 94, p. 53–62, 2015.

[2] FERNANDEZ-YAGUE, M. A. et al. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomechanical strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, p. 1–29, 2015.

[3] WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 2010.

[4] REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.

[5] RIE, J. VAN et al. Cryogel-PCL combination scaffolds for bone tissue repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 123, p. 2–7, 2015.

[6] PATRÍCIO, T. et al. Characterisation of PCL and PCL / PLA scaffolds for tissue engineering. **Procedia CIRP 5**, v. 5, p. 110–114, 2013.

[7] KIM, Y. B.; KIM, G. H. PCL/Alginate Composite Sca ff olds for Hard Tissue Engineering: Fabrication, Characterization, and Cellular Activities. **ACS Combinatorial Science**, v. 17, p. 87–99, 2015.

[8] SOUSA, I.; MENDES, A.; BÁRTOLO, P. J. PCL scaffolds with collagen bioactivator for applications in Tissue Engineering. **Procedia Engineering**, v. 59, p. 279–284, 2013.

[9] HENCH, L. L. The story of Bioglass®. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 11, p. 967–978, 2006.

[10] LI, W. et al. 45S5 bioactive glass-based scaffolds coated with cellulose nanowhiskers for bone tissue engineering. **RSC Adv.**, v. 4, n. 99, p. 56156–56164, 2014.

[11] BERTOLLA, L.; DLOUHÝ, I.; BOCCACCINI, A. R. Preparation and

characterization of Bioglass®-based scaffolds reinforced by poly-vinyl alcohol/microfibrillated cellulose composite coating. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 34, n. 14, p. 3379–3387, 2014.

[12] CHEN, Q. et al. Cellulose Nanocrystals—Bioactive Glass Hybrid Coating as Bone Substitutes by Electrophoretic Co-deposition: In Situ Control of Mineralization of Bioactive Glass and Enhancement of Osteoblastic Performance. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 44, p. 24715–24725, 2015.

[13] OSULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173–207, 1997.

[14] LAVOINE, N. et al. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 735–764, 2012.

[15] ZIMMERMANN, T.; PÖHLER, E.; GEIGER, T. Cellulose Fibrils for Polymer Reinforcement. **Advanced Engineering Materials**, v. 6, n. 9, p. 754–761, 2004.

[16] PITKÄNEN, M. et al. Characteristics and safety of nano-sized cellulose fibrils. **Cellulose**, v. 21, n. 6, p. 3871–3886, 2014.

[17] LOPES, V. R. et al. In vitro biological responses to nanofibrillated cellulose by human dermal, lung and immune cells: surface chemistry aspect. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2017.

[18] ČOLIĆ, M. et al. Cytocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. **Cellulose**, v. 22, n. 1, p. 763–778, 2015.

[19] OLIVEIRA, M. F. et al. Construção de Scaffolds para engenharia tecidual utilizando prototipagem rápida. **Matéria**, v. 12, n. 2, p. 373–382, 2007.

[20] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, CENTRO FEDERAL DE TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO RENATO ARCHER-CTI. Zilda de Castro Silveira; Paulo Inforçatti Neto; Matheus Stochy de Freitas; Pedro Yoshito Noritomi; Jorge Vicente Lopes da Silva. **Cabeçote vertical de extrusão para impressoras 3D e processo de extrusão por rosca utilizando o referido cabeçote**. BR n. PI 1020140051430- A2. 06 mar. 2014, 01 dez. 2015.

[21] NETO, P. I. **Estudo da viabilidade técnica e projeto de um mini-cabeçote de extrusão com rosca para impressoras tridimensionais portáteis**. 2 105 f.

Universidade de São Paulo, 2013.

[22] DÁVILA, J. L. et al. Software to generate 3-D continuous printing paths for the fabrication of tissue engineering scaffolds. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 84, n. 5–8, p. 1671–1677, 2015.

[23] JANG, J.; CASTANO, O.; KIM, H. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 12, p. 1065–1083, 2009.

[24] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

[25] NJEH, C. F.; LANGTON, C. M. **The physical measurement of bone**. 1. ed. [s.l.] CRC Press, 2004.

[26] WHITE, A A; BEST, S. M.; KINLOCH, I. A. Hydroxyapatite-carbon nanotube composites for biomedical applications: A review. **International Journal of Applied Ceramic Technology**, v. 4, p. 1–13, 2007.

[27] CURREY, J. D. The effects of drying and re-wetting on some mechanical properties of cortical bone. **Journal of Biomechanics**, v. 21, n. 5, p. 439–441, 1988.

[28] GIBSON, L. J.; ASHBY, M. F. **Cellular Solids: Structure and Properties**. 2. ed. [s.l.] Cambridge University Press, 1999.

[29] DOROZHKIN, S. Calcium Orthophosphate Cements and Concretes. **Materials**, v. 2, n. 1, p. 221–291, 2009.

[30] O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.

[31] KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 2005.

[32] MORONI, L.; ELISSEEFF, J. H. Biomaterials engineered for integration. **Materials Today**, v. 11, n. 5, p. 44–51, 2008.

[33] WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897–5909, 2009.

[34] DALAPICULA, S. S. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas . Uma revisão crítica. **ImplantNewsPerio**, v. 3, n. 5, p. 487–491,

2006.

[35] MEIRA, C. R. DE. **Processamento de Hidroxiapatita Bovina Associada com Prototipagem Rápida Visando Implantes Ósseos**. Universidade de São Paulo, 2014.

[36] BOCCACCINI, A. R.; BLAKER, J. J. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. **Expert Review of Medical Devices**, v. 2, n. 3, p. 303–317, 2005.

[37] DZIADEK, M.; STODOLAK-ZYCH, E.; CHOLEWA-KOWALSKA, K. Biodegradable ceramic-polymer composites for biomedical applications : A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 1175–1191, 2017.

[38] CANNILLO, V. et al. Production of Bioglass® 45S5 - Polycaprolactone composite scaffolds via salt-leaching. **Composite Structures**, v. 92, n. 8, p. 1823–1832, 2010.

[39] FABBRI, P. et al. Highly porous polycaprolactone-45S5 Bioglass® scaffolds for bone tissue engineering. **Composites Science and Technology**, v. 70, n. 13, p. 1869–1878, 2010.

[40] POH, P. S. P. et al. Corrigendum: Fabrication and in vitro characterization of bioactive glass composite scaffolds for bone regeneration. **Biofabrication**, v. 6, n. 2, p. 29501, 14 abr. 2014.

[41] GUNATILLAKE, P. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 1–16, 2003.

[42] ENGELBERG, I.; KOHN, J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study. **Biomaterials**, v. 12, n. 3, p. 292–304, 1991.

[43] IN'T VELD, P. J. A. et al. Melt block copolymerization of ?-caprolactone andL-lactide. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 219–226, 1997.

[44] AZIMI, B. et al. Poly (ε -caprolactone) Fiber: An Overview. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 9, n. 3, p. 74–90, 2014.

[45] LAM, C. X. F. et al. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.

90A, n. 3, p. 906–919, 2009.

[46] BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros**, v. 15, p. 13–21, 2005.

[47] KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. **Biomaterials**, v. 12, p. 155–163, 1991.

[48] KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 2006.

[49] HENCH, L. L.; JONES, J. R. Bioactive Materials for Tissue Engineering Scaffolds. **Future Strategies for Tissue and Organ Replacement**, v. 8, p. 3–24, 2002.

[50] HENCH, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487–1510, 1991.

[51] RAHAMAN, M. N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2355–2373, 2011.

[52] HENCH, L. L. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014–1017, 2002.

[53] GUNAWIDJAJA, P. N. et al. Local structures of mesoporous bioactive glasses and their surface alterations in vitro: inferences from solid-state nuclear magnetic resonance. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 370, n. 1963, p. 1376–1399, 2012.

[54] SIMCHI, A. et al. Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, p. 22–39, 2011.

[55] MISRA, S. K. et al. Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass® composites. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1750–1761, 2008.

[56] EICHHORN, S. J. et al. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 1, p. 1–33, 2010.

[57] SIRÓ, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. **Cellulose**, v. 17, n. 3, p. 459–494, 2010.

[58] ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 649–665, 2014.

[59] LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p. 302–325, 2014.

[60] MOON, R. J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941, 2011.

[61] GE, Z.; JIN, Z.; CAO, T. Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. **Biomedical Materials**, v. 3, n. 2, p. 22001, 2008.

[62] SILVEIRA, Z. DE C. et al. Design development and functional validation of an interchangeable head based on mini screw extrusion applied in an experimental desktop 3-D printer. **International Journal of Rapid Manufacturing**, v. 4, n. 1, p. 49, 2014.

[63] MALONE, E.; LIPSON, H. Fab@Home: the personal desktop fabricator kit. **Rapid Prototyping Journal**, v. 13, n. 4, p. 245–255, 2007.

[64] DÁVILA, J. L. et al. Fabrication of PCL/β-TCP scaffolds by 3D mini-screw extrusion printing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 15, p. n/a-n/a, 2016.

[65] DÁVILA, J. L. **Fabricação de Scaffolds de PCL Reforçados com β -TCP Mediante Impressão 3D por Rosca de Extrusão para Aplicações em Engenharia Tecidual Fabricação de Scaffolds de PCL Reforçados com β -TCP Mediante Impressão 3D por Rosca de Extrusão para Aplicações em Eng**. 2014. 103 f. Universidade Estadual de Campinas, 2014.

[66] JR., W. D. C.; RETHWISCHI, D. G. **Materials Science and Engineering - An Introduction**. 8. ed. [s.l: s.n.].

[67] MARK, H. F. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**. 3. ed. [s.l: s.n.].

[68] RAUWENDAAL, C. **Polymer Extrusion**. 5. ed. [s.l: s.n.].

[69] NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205–208, 1997.

[70] MAJHI, M. R.; PYARE, R.; SINGH, S. P. Studies on preparation and characterizations of CaO-Na2O-SiO2-P2O5 bioglass ceramics substituted with Li2O, K2O, ZnO, MgO, and B2O3. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 2, n. 2, p. 154–169, 2012.

[71] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.Benedito Moraes Purqueiro; Carlos Alberto Fortulan. **Moinho vibratório para processar materiais cerâmicos.** BR n. PI 102012027129-0 A2. 23 out. 2012, 05 ago. 2014.

[72] SEPULVEDA, P.; JONES, J. R.; HENCH, L. L. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 2, p. 340–348, fev. 2002.

[73] XYNOS, I. D. et al. Bioglass ®45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation In Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering. **Calcified Tissue International**, v. 67, n. 4, p. 321–329, 11 out. 2000.

[74] KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474–5491, set. 2005.

[75] FERRETTI, M. Princípios e aplicações de espectroscopia de fluorescência de Raios X (FRX) com instrumentação portátil para estudo de bens culturais. **Cpc**, n. 7, p. 74–98, 2009.

[76] MALVERN INSTRUMENTS. Zetasizer Nano Series User Manual. **Department of Biochemistry Biophysics Facility , University of Chambridge**, n. 2, p. 207, 2004.

[77] RÓZ, A. L. DA et al. **Técnicas de Nanocaracterização**. [s.l: s.n.]. v. 3

[78] DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrónica de varredura: Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**, 2007.

[79] GARCIA, A.; SPIM, J. A.; CARLOS ALEXANDRE DOS SANTOS. **Ensaios dos Materiais**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos S.A., 2000.

[80] GREGORY, C. A. et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77–84, 2004.

[81] BELLANI, C. **Electrospun Biocomposites and 3D Microfabrication for Bone**

Tissue Engineering. set. 2018. 190 f. PhD - Universidade de São Paulo/ Université de Strasbourg. set. 2018.

[82] TAMJID, E. et al. Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 7, p. 1526–1533, out. 2011.

[83] GÖTZ, H. . et al. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4057–4064, ago. 2004.

[84] TSURUGA, E. et al. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP- induced osteogenesis. **J Biochem (Tokyo)**, v. 121, n. 297244630, p. 317–324, 1997.

[85] FONTES, R. A. M. **Fabrico e Caracterização de Scaffolds à Base de Fosfatos de Cálcio**. 2010. 98 f. 2010.

[86] BOSKEY, A. L. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. **Journal of cellular biochemistry**, v. 72, n. S30–31, p. 83–91, 1998.

[87] ENAYATI, M. S. et al. Development of electrospun poly (vinyl alcohol)-based bionanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 4, p. 1111–1120, 2018.

[88] GAHARWAR, A. K. et al. Nanoclay-enriched poly (ε-caprolactone) electrospun scaffolds for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 15–16, p. 2088–2101, 2014.

[89] SAJESH, K. M. et al. Sequential layer-by-layer electrospinning of nano SrCO3/PRP loaded PHBV fibrous scaffold for bone tissue engineering. **Composites Part B: Engineering**, v. 99, p. 445–452, 2016.

[90] VENUGOPAL, J. et al. Electrospun-modified nanofibrous scaffolds for the mineralization of osteoblast cells. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 85, n. 2, p. 408–417, 2008.

[91] ZHANG, Y. et al. Enhanced biomineralization in osteoblasts on a novel electrospun biocomposite nanofibrous substrate of hydroxyapatite/collagen/chitosan. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 6, p. 1949–1960, 2010.