



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Impressão 3D de *scaffolds* ósseos a base de amido de batata modificado por aquecimento a seco

Pedro Augusto Invernizzi Sponchiado

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

Versão corrigida

**Impressão 3D de *scaffolds* ósseos a base de amido de batata
modificado por aquecimento a seco**

Pedro Augusto Invernizzi Sponchiado

Orientadora: Profa. Bianca Chierigato Maniglia

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Sponchiado, Pedro Augusto Invernizzi

Impressão 3D de *scaffolds* ósseos a base de amido de batata modificado por aquecimento a seco. Ribeirão Preto, 2023.

p. 97: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Maniglia, Bianca Chierigato.

1. Amido 2. Impressão 3D 3. Hidroxiapatita 4. Biomateriais.

“Tenha fé em deus, tenha fé na vida, tente outra vez”

Raul Seixas

*A minha família,
minha maior fonte de admiração e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

A deus por ter me iluminado e me dado força e resiliência durante esta etapa de minha vida!

Aos meus pais por todo apoio e dedicação comigo durante todos os períodos da minha vida pessoal e profissional!

A minha namorada Andressa por me apoiar e me dar forças nos momentos mais difíceis e sempre participar ativamente das minhas conquistas!

A minha orientadora, Prof. Dra. Bianca Chierigato Maniglia por todos os ensinamentos diários sobre as coisas relacionados ao projeto e a vida! Nesse tempo de orientando, só tenho a agradecer o carinho e a dedicação sua comigo!

A todos os membros do laboratório de Físico-Química de superfícies e coloides (Israel, Jeferson, Mary, Lucas, Isabelle e Marco) em especial a Prof. Dra Ana Paula Ramos pela oportunidade me dada de trabalhar no seu laboratório e de sempre contribuir ativamente com o desenvolvimento do projeto!

Ao laboratório do Prof. Dr. Pietro Ciancaglini pela colaboração com os experimentos de biodegradabilidade e intumescimento

Ao laboratório da Prof. Dra. Delia Tapia Blácido pelo auxílio nos testes mecânicos dos materiais!

Ao laboratório Ge2P (USP - Piracicaba) supervisionado pelo Prof. Dr. Pedro Esteves Duarte Augusto pelos testes de RVA e despolimerização do amido de batata!

A CNPq pelo apoio financeiro durante o período de mestrado!

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA.....	3
AGRADECIMENTOS.....	6
SUMÁRIO.....	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
LISTA DE EQUAÇÕES.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
APRESENTAÇÃO	16
CAPÍTULO 1: Introdução e contextualização.....	17
1. Introdução	17
1.1. Tecido ósseo	17
1.2 Enxertos ósseos.....	19
1.3 Tecnologia de impressão 3D	21
1.4 Modificação do amido.....	28
1.5 Objetivo do trabalho.....	33
1.5.1 Objetivo geral.....	33
1.5.2. Objetivos específicos	33
CAPÍTULO 2: Modificação e caracterização do amido de batata poraquecimento a seco	34
2.1 Material e métodos.....	34
2.1.1 Material	34
2.1.2 Modificação do amido de batata.....	34
2.1.3 Caracterização do grânulo: cor, microscopia, distribuição de tamanho e cristalinidade	35
2.1.4 Caracterização molecular: grupos funcionais, distribuição de tamanho molecular, grupos carbonil e carboxil, amilose aparente e teor de açúcar redutor.....	36
2.1.5 Caracterizações das propriedades de pasta e dos hidrogéis de amido de batata.....	38
2.1.6 Potencial dos hidrogéis de amido de batata para impressão 3D	40
2.1.7 Análise estatística	43
2.2 Resultados e discussão	43
2.2.1 Caracterização do grânulo: aspecto visual do pó, morfologia do grânulo, distribuição de tamanho e cristalinidade	43
2.2.2 Caracterização molecular.....	48
• 2.2.2.1 Grau de Oxidação.....	48
2.2.3 Propriedades de pasta, propriedades reológicas e de textura dos hidrogéis de amido	52
2.2.4 Capacidade de impressão 3D	57
2.2.5 Propriedades mecânicas	61

2.2.6 Biodegradabilidade e intumescimento.....	62
2.3 Conclusão do Capítulo 2	65
CAPÍTULO 3: Produção e caracterização de scaffolds ósseos a base de amido de batata modificado	66
3.1. Material e métodos.....	66
3.1.1 Material	66
3.1.2 Produção e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita (HAp)	66
3.1.3 Produção e caracterização dos hidrogéis de amido de batata com adição de HAp	67
3.1.4 Otimização dos parâmetros de processo da impressão 3D	68
3.1.5 Otimização do pós-processamento dos scaffolds impressos.....	69
3.1.6 Reprodutibilidade de processo	69
3.1.7 Biodegradabilidade e intumescimento	69
3.1.8 Morfologia dos scaffolds (microscopia eletrônica de varredura e μ -tomografia).....	69
3.1.9. Análise estatística	70
3.2. Resultados e discussão	70
3.2.1. Caracterização das nanopartículas de Hidroxiapatita (HAp)	70
3.2.2 Avaliação e otimização dos parâmetros de impressão 3D.....	72
3.2.3 Avaliação do tipo de pós-processamento e reprodutibilidade do processo.....	75
3.2.4 Avaliação das formulações das tintas à base de amido de batata nativo e modificado com adição de nanopartículas de HAp.....	77
3.2.5 Morfologia dos scaffolds impressos por micro-CT e MEV	84
3.3 Conclusão do Capítulo 3	86
4. CONCLUSÃO.....	87
5. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	88
6. TRABALHOS PRODUZIDOS DURANTE O MESTRADO.....	89
7.. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma para descrição dos capítulos da dissertação.	16
Figura 2. Células presentes no tecido ósseo.....	17
Figura 3. Etapas do processo de produção de um material por impressão 3D.....	23
Figura 4. Esquema de impressão 3D por diferentes mecanismos: sinterização seletiva, jato de tinta (Inkjet) e por extrusão.	25
Figura 5. Estrutura química do amido (estrutura projetada utilizando o software ChemsSketch). 27	
Figura 6. (A) Aspecto visual dos géis de mandioca nativo e modificado por aquecimento a seco (DHT) e (B) Estrelas impressas via impressão 3D utilizando hidrogéis preparados com amido nativo e modificado (DHT). Fonte: Maniglia et al. (2020) ⁶⁰	29
Figura 7. Modificação do amido por aquecimento a seco.	34
Figura 8. (A) Aspecto visual do pó de amido, (B) Imagem de microscopia óptica e (C) Microscopia óptica de luz polarizada dos grânulos de amido de batata nativos e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h)	43
Figura 9. Difração de raios-X (DRX) do amido de batata nativo e modificado (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h, bem como a cristalinidade relativa associada (RC); (B) Distribuição granulométrica e diâmetros específicos (d_{10} , d_{50} e d_{90}) do amido de batata nativo e modificados. a, b, c: letras diferentes indicam diferenças significativas entre o amido nativo e o modificado (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h), como revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$	45
Figura 10. (A) Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e (B) Teor de carbonila e carboxila e variação do pH dos amidos de batata nativos e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h).	48
Figura 11. Distribuição do tamanho molecular dos amidos de batata nativo e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h).	50
Figura 12. (A) Curvas de RVA, (B) Imagem das pastas após aquecimento (gelatinização), (C) Gráfico da força x profundidade de penetração, (D) máxima força de pico e energia de coesão dos amidos nativos e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h), (D) Imagens dos géis após 24 h na geladeira. A, B, C, D: letras diferentes indicam diferenças significativas entre os amidos nativos e os modificados, como revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$	52
Figura 13. Propriedades reológicas do amido de batata nativo e modificado com DHT: variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento.	55
Figura 14. Propriedades reológicas do amido de batata nativo e modificado com DHT: Módulo de armazenamento (G'') em função da frequência angular e Módulo de perda (G'') em função da frequência angular.....	56
Figura 15. Imagens da geometria 3D do projeto e dos paralelepípedos impressos à base de hidrogéis de amido de batata nativo e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h).	57
Figura 16. A) Biodegradabilidade dos scaffolds a base de amido de batata nativo e modificados por DHT; B). Scaffolds liofilizados sem e com meio de cultura α -MEM (0 até 72 h o material se manteve com o mesmo comportamento de intumescimento).	63
Figura 17. Parâmetros de impressão 3D avaliados com os hidrogéis a base de amido nativo: porcentagem de preenchimento (10, 15 e 20%), número de camadas (5, 7 e 10), vazão de extrusão (50, 70 e 100%), velocidade de impressão (5, 10, e 15 mm/s), geometria (cilindro e paralelepípedo) e tamanho (20 e 30 mm).	67

Figura 18. Padrão de difração de raios X (DRX) de hidroxiapatita e calcita.....	70
Figura 19. Espectros de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), que exibem as bandas típicas ν_3 (PO_4^{3-}) e ν_1 (PO_4^{2-}) de apatita.	70
Figura 20. Comparativo entre os scaffolds impressos com variação da porcentagem de preenchimento (10, 15, e 20%).	71
Figura 21. Comparativo entre os scaffolds impressos com variação do número de camadas (5, 7 e 10 linhas).....	72
Figura 22. Comparativo entre os scaffolds impressos com variação de vazão mássica (50, 70 e 100%).	72
Figura 23. Comparativo entre os scaffolds impressos com variação da velocidade do braço robótico (5, 10 e 15 mm/s).	73
Figura 24. Comparativo entre os scaffolds impressos com variação da geometria e tamanho.	74
Figura 25. Aspecto visual dos scaffolds a base de amido de batata nativo após impressão e pós-processamento por secagem em câmara de secagem ou liofilizador	76
Figura 26. Propriedades reológicas do amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp: Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento.	78
Figura 27. Propriedades reológicas do amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp: Módulo de armazenamento (G'') em função da frequência angular e Módulo de perda (G'') em função da frequência angular	79
Figura 28. Fotos dos scaffolds de Amido de batata: Nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp em meio de cultura α -MEM para medida do intumescimento.....	81
Figura 29. Teste de biodegradabilidade para os scaffolds impressos e liofilizados das seguintes amostras: Amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp.....	82
Figura 30. Micro-tomografias dos scaffolds ósseos de amido de batata nativo, DHT, com e sem HAp.....	83
Figura 31. MEV dos scaffolds impressos (Nativo, DHT, com e sem HAp).	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos do tratamento por aquecimento a seco nas propriedades do amido.	30
Tabela 2. Ângulos de Bragg, índices de Miller e espaçamento interplanar (d) para os amidos nativos e modificados.	46
Tabela 3. Teor de açúcar redutor e amilose aparente do amido de batata nativo e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h).	49
Tabela 4. Parâmetros obtidos a partir do RVA dos amidos de batata nativo e modificados (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h).	53
Tabela 5. Parâmetros da lei de potência e $\tan \delta$ (G''/G' , determinado pelo meio de G'' e G' no plateau) dos hidrogéis de amido de batata dos amidos de batata nativos e modificados (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h).	56
Tabela 6. Reprodutibilidade (massa, área e número de orifícios das amostras impressas) e fidelidade geométrica (GF) em relação à área ($FG_{\text{área}}$) e número de orifícios ($FG_{\text{orifícios}}$) dos hidrogéis de amido impressos em forma de paralelepípedo. Os hidrogéis são baseados em amidos controle e modificados por aquecimento a seco (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h) (média \pm desvio padrão)	58
Tabela 7. Propriedades mecânicas dos scaffolds baseados em hidrogéis de amido de batata nativo e modificado (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h). (média \pm desvio padrão).....	61
Tabela 8. Variação de massa e área dos scaffolds impressos e após pós-processamento.....	75
Tabela 9. Parâmetros da lei de potência e $\tan \delta$ (G''/G' , determinado pelo meio de G'' e G' no plateau) dos hidrogéis de amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

MEC – Matriz extracelular

CAD – *Computer aided design* (Projeto auxiliado por computador)

STL – *Stereolithography* (Estereolitografia)

SLS – Sinterização a laser seletiva

ITP – *Inkjet printing* (Impressão a jato de tinta)

FDM – *Fused deposition modeling* (Modelo de depósito por fusão)

DHT – *Dry heating treatment* (Tratamento por aquecimento a seco)

HMT – *Heat moist treatment* (Tratamento por aquecimento a úmido)

DHT_1h – Amido modificado por 1 hora de aquecimento a seco

DHT_2h – Amido modificado por 2 horas de aquecimento a seco

DHT_4h – Amido modificado por 4 horas de aquecimento a seco

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

ATR – *Attenuated total reflection* (Refletância atenuada total)

DNS – Ácido dinitrosalicílico

RVA – *Rápid viscosity analyser*

RBD – *Relative breakdown*

RSB – Relative setback

PAV – *Peak apparent viscosity* (Pico de viscosidade aparente)

TAV – *Trough apparent viscosity*

DRX – Difração de raio-x

RC – *Relative cristalinity* (Cristalinidade relativa)

HAp – Hidroxiapatita

SP – Poder de inchamento

FG – Fidelidade geométrica

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: cálculo para obter a diferença total de cor (ΔE^*)	35
Equação 2: Cálculo do conteúdo de carbonila.....	37
Equação 3: Cálculo do conteúdo de carboxila.....	37
Equação 4: Cálculo das curvas de fluxo que foram ajustadas ao modelo <i>Power-Law</i> para em relação aos amidos de batata nativos e modificados por DHT (1, 2 e 4 horas)	39
Equação 5: Cálculo da fidelidade geométrica em relação a área.....	40
Equação 6: Cálculo da fidelidade geométrica em relação ao número de orifícios	41
Equação 7: Cálculo do poder de inchamento dos materiais	42
Equação 8: Cálculo das curvas de fluxo que foram ajustadas ao modelo <i>Power-Law</i> para em relação aos amidos de batata nativo, DHT_1h e estas mesmas amostras com adição de HAp	66

SPONCHIADO, P. A. I. **Impressão 3D de *scaffolds* ósseos a base de amido de batata modificado por aquecimento a seco.** 2023. 97 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

RESUMO

O amido vem demonstrando grande potencial como ingrediente gelificante para uso em formulações para produzir biomateriais impressos em 3D (*scaffolds* ósseos). Essa fonte oferece vantagens como disponibilidade mundial, biocompatibilidade e biodegradabilidade, que é essencial para aplicação em biomateriais para enxertos ósseos. No entanto, os hidrogéis à base de amido apresentam dificuldades de processamento, principalmente associadas às suas propriedades reológicas. Alguns métodos de modificação do amido podem ser usados para superar essas dificuldades. Por exemplo, o tratamento de aquecimento a seco (DHT) é um tratamento simples, seguro, físico e "verde". Nesse contexto, essa dissertação mostra os efeitos do DHT (1 h, 2 h e 4 h a 130 °C) sobre as propriedades estruturais (microscopia e DRX; teor de amilose, distribuição do tamanho molecular) e físico-químicas (pH, teor de açúcar redutor, teor de carbonilae carboxila e grupos funcionais) do amido de batata, bem como o efeito sobre as propriedades dos hidrogéis visando aplicações de impressão 3D (firmeza, reologia, propriedades de pasta e capacidade de impressão). A modificação do amido de batata por DHT alterou todas estas propriedades e resultou em 3 novos materiais (amidos modificados: DHT_1h, DHT_2h, DHT_4h) com distintas propriedades entre si e em relação ao amido nativo. O DHT_1h foi selecionado como o melhor material, tendo em vista a melhor imprimibilidade (melhor resolução em termos de área e orifícios, quando comparado ao projeto original 3D), além de propriedades mecânicas mais favoráveis. Nesta dissertação também foi otimizado os parâmetros de impressão 3D para uso de hidrogéis a base de amido visando a produção de *scaffolds* ósseos (10 mm/s de velocidade de impressão, 20% de preenchimento, 100% de vazão, 5 camadas e geometria cilíndrica 20 x 2 mm). Além disso, foi avaliado o pós-processamento dos materiais impressos, sendo a liofilização escolhida como o melhor método frente a secagem em estufa. Os hidrogéis de amido nativo e DHT_1h foram adicionados de nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) e impressos com os parâmetros otimizados, e foram avaliados em termos de propriedades reológicas e morfológicas. *Scaffolds* produzidos como amido modificado adicionados de HAp apresentaram menor taxa de biodegradabilidade e maior porosidade, sendo com propriedades mais adequadas para essa aplicação. Por fim, esse estudo concluiu que a modificação do amido por DHT foi eficiente para funcionalizar o amido de batata com propriedades promissoras para fabricação via impressão de *scaffolds* ósseos.

Palavras-chaves: Amido; Impressão 3D; Hidroxiapatita; Biomateriais.

SPONCHIADO, P. A. I. **3D printing of bone scaffolds based on potato starch modified by dry heating treatment**. 2023. 97 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ABSTRACT

Starch has shown great potential as a gelling ingredient for use in formulations to produce 3D printed biomaterials (bone scaffolds). This source offers advantages such as worldwide availability, biocompatibility and biodegradability, which is essential for application in biomaterials for bone grafts. However, starch-based hydrogels have processing difficulties, mainly associated with their rheological properties. Some starch modification methods can be used to overcome these difficulties. For example, dry heat treatment (DHT) is a simple, safe, physical and "green" treatment. In this context, this dissertation shows the effects of DHT (1 h, 2h and 4 h at 130 °C) on structural (granules: microscopy and XRD; molecules: amylose, molecular size distribution) and physicochemical (pH, content of reducing sugar, carbonyl and carboxyl content and functional groups) of potato starch, as well as the effect on the properties of hydrogel targeting 3D printing applications (firmness, rheology, paste properties and printability). Modification of potato starch by DHT altered all these properties and resulted in 4 materials with distinct properties (native and modified). DHT_1h was selected as the best material, in view of better printability, having a better resolution in terms of area and holes when compared to the original 3D design, in addition to more favorable mechanical properties. In this dissertation, the 3D printing parameters for the use of starch-based hydrogels were also optimized for the production of bone scaffolds (10 mm/s printing speed, 20% filling, 100% flow, 5 layers and cylindrical geometry 20 x 2 mm). In addition, post-processing of printed materials was evaluated, with freeze-drying chosen as the best post-processing method. Native starch and DHT_1h hydrogels were spiked with hydroxyapatite (HAp) nanoparticles and printed with the optimized parameters and were evaluated in terms of their rheological and morphological properties. The scaffolds produced with modified starch added with HAp showed the lowest rate of biodegradability and the highest porosity, making this biomaterial more sustainable for this application. Finally, this study concluded that the technique of starch modification by DHT is efficient to functionalize potato starch to make it with more promising properties for application in the manufacture of bone scaffolds.

Keywords: Starch; 3D printing; Hydroxyapatite; Biomaterials.

APRESENTAÇÃO

Essa dissertação aborda a produção por tecnologia de impressão 3D de *scaffolds* ósseos a partir de hidrogéis de amidos por aquecimento a seco. Para isso, essa dissertação foi dividida em três capítulos (Figura 1), sendo:

- **Capítulo 1:** Introdução e contextualização do assunto;
- **Capítulo 2:** Modificação e caracterização do amido de batata por aquecimento a seco
- **Capítulo 3:** Produção e caracterização de *scaffolds* ósseos a base de amido de batata modificado.



Figura 1. Fluxograma para descrição dos três capítulos que compõe essa dissertação.

CAPÍTULO 1: Introdução e contextualização

1. Introdução

1.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo é um biocompósito constituído por aproximadamente 65% de fase mineral, 25% de matéria orgânica e 10% de água (em massa)¹. Sua fase mineral é formada por fosfato de cálcio, enquanto a parte orgânica é composta majoritariamente por colágeno do tipo-I e uma fração de proteínas não-colagenosas¹. O biomineral encontrado no tecido ósseo se assemelha em composição e estrutura à hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que em proporções estequiométricas possui razão molar Ca/P = 1,67. Todavia, diferentes substituições iônicas (principalmente CO_3^{2-} , mas também outros íons como Mg^{2+} , Sr^{2+} , Cl^- , F^- , HPO_4^{2-}) e vacâncias na rede cristalina da hidroxiapatita ocorrem no tecido ósseo, resultando em baixa cristalinidade e quebra de estequiometria comparada ao valor de Ca/P = 1,67. Dessa forma, é mais preciso referir-se à fase mineral do tecido ósseo como apatita biológica, ou simplesmente apatita².

Nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea, participam três tipos celulares distintos que derivam de duas linhagens: uma relacionada à formação e manutenção: osteoblastos e osteócitos, e outra à reabsorção: osteoclastos (Figura 2).

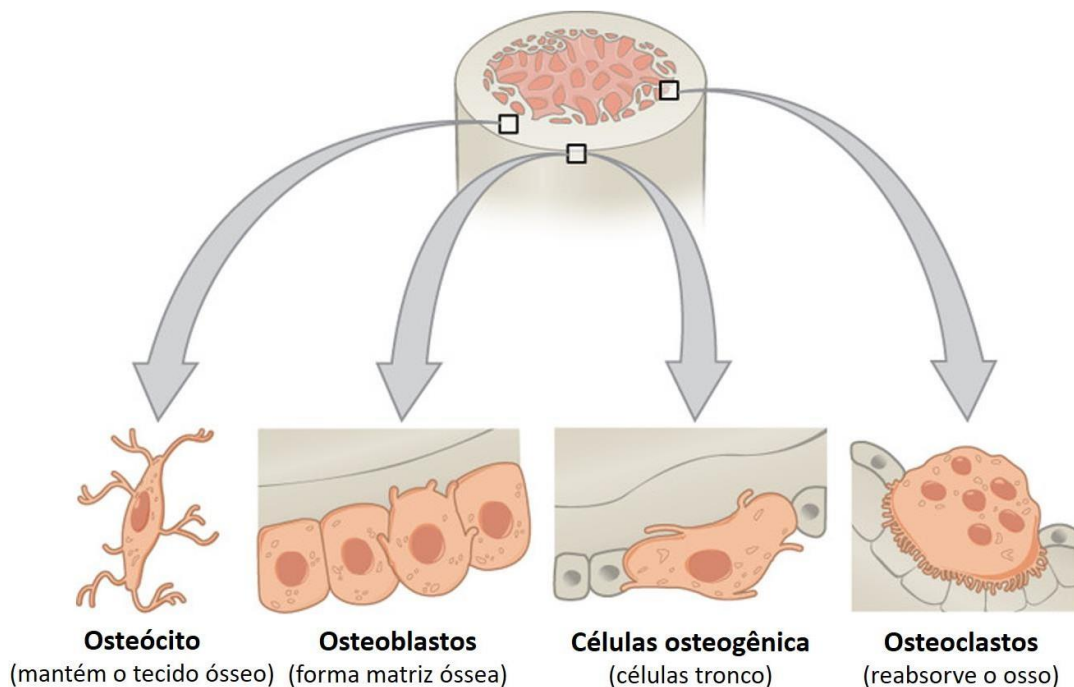


Figura 2. Células presentes no tecido ósseo.

Imagem adaptada da referência de Dorozhkin (2016)²

Os osteoblastos são células mononucleadas, de origem mesenquimal, que se apresentam como células polarizadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo. São cubóides ou ligeiramente alongadas e formam uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que está sendo formada (osteóide). São as células responsáveis pela produção da matriz orgânica do osso bem como pela sua mineralização^{3,4}. Osteoblastos e pré-osteoblastos exibem níveis elevados da enzima fosfatase alcalina na superfície de suas membranas citoplasmáticas, a qual, quando liberada, contribui para o início da mineralização e o progressivo crescimento dos cristais de hidroxiapatita⁵⁻⁷. Osteoblastos aprisionados na matriz extracelular mineralizada se diferenciam em osteócitos, principal tipo celular encontrado em ossos maduros, que formam uma rede complexa (a rede lacuno-canalicular) com importante função na regulação da atividade óssea⁸. Os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleadas da linhagem hematopoiética^{9,10}. Caracterizam-se, citoquimicamente, por apresentar fosfatase ácida resistente ao tartarato, adenosina ácida trifosfatada vanadato sensível, isosima anidrase carbônica II, entre outras enzimas^{8,10}. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, promovendo escavações na superfície óssea denominadas lacunas de *Howship*. Adjacente à superfície óssea, sua membrana celular exibe numerosas invaginações, formando uma borda em escova. Periféricamente a esta borda em escova, há uma região do citoplasma que se assemelha a uma faixa, diretamente apoiada na matriz óssea, denominada de zona clara. A zona clara, porção desprovida de organelas e rica em actina e miosina, está intimamente aderida à superfície óssea e é responsável pela adesão do osteoclasto à superfície óssea, delimitando, desta forma, a borda em escova, compartimento onde ocorre a desmineralização bem como a degradação da matriz do tecido ósseo. Este compartimento cria um microambiente propício para a liberação e atividade das enzimas proteolíticas do osteoclasto, que, junto da geração de prótons pela enzima anidrase carbônica, promove um ambiente ácido, ocorrendo a desmineralização da matriz³.

No processo de remodelação óssea é de extrema importância um equilíbrio entre a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos, pois a perturbação do equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea leva a condições patológicas. A formação óssea excessiva leva à supermineralização e excesso de massa óssea, como no caso da patologia denominada osteopetrose⁹. Por outro lado, condições patológicas decorrentes de reabsorção óssea excessiva podem levar à fragilidade deste tecido, como no caso da osteoporose⁹.

De acordo com as estatísticas de 2009 a 2011, os diagnósticos médicos relacionados à ortopedia representaram 225 milhões de visitas, custando cerca de US\$ 215 bilhões, incluindo mais de um milhão de substituições de quadril e joelho¹¹. Além disso, espera-se que o número de fraturas

devido à osteoporose aumente de uma estimativa de 10,2 milhões em 2010 para 13,6 milhões em 2030 ¹¹. Os ossos têm potencial cicatrizante e regenerativo, mas a cicatrização óssea não pode ser realizada por si só para grandes defeitos ósseos segmentares causados por fatores como idade avançada, acidentes de trânsito, fratura não consolidada, ressecção de tumores ósseos e outros, constituindo sérios problemas em ortopedia que podem prejudicar a saúde e a qualidade de vida ¹².

Diante disso, enxertos auto/alo ósseos, osso heterólogo desmineralizado e substitutos ósseos são usados para regeneração óssea. Sujeito à disponibilidade limitada de transplante autólogo, ao risco de problemas imunológicos e à transmissão de doenças causadas por ossos alogênicos, os enxertos artificiais receberam cada vez mais atenção ¹³. Para reparar e regenerar o tecido ósseo, os *Scaffolds* devem ser biocompatíveis e ter uma estrutura topológica de superfície adequada para suportar a adesão, proliferação, migração e crescimento celular. Uma das mais importantes é que os enxertos devem possuir poros altamente interconectados e de tamanho suficiente para promover a migração celular e distribuição de nutrientes para a osteogênese e angiogênese ¹¹.

1.2 Enxertos ósseos

As lesões ósseas são denominadas "defeitos ósseos críticos" quando a perda de comprimento excede o dobro do diâmetro diafisário de um osso longo ^{14,15} e permanecem um desafio considerável na cirurgia ortopédica e podem ser resultado de trauma, infecção, tumor e anormalidades do desenvolvimento que contribuem para sua complexidade. Há evidências limitadas para orientar o tratamento de defeitos ósseos de tamanho crítico, com ausência de estudos controlados comparando as técnicas. Esses defeitos geralmente carregam um mau prognóstico, sendo as amputações um resultado comum. As opções de tratamento atuais incluem enxerto ósseo de categorias como autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos. Cada uma dessas opções tem vantagens e desvantagens. Aloenxertos e xenoenxertos têm características osteoindutoras e osteocondutoras, mas carecem das propriedades osteogênicas dos autoenxertos ¹⁶. Autoenxertos continuam sendo o padrão-ouro para o reparo do tecido ósseo devido à sua histocompatibilidade e não imunogenicidade, além de fornecer as propriedades imperativas essenciais para um enxerto ósseo ¹⁷. Também foi demonstrado que promove osteoindução, osteogênese e osteocondução ¹⁸. No entanto, apesar das muitas vantagens do enxerto ósseo, existem problemas como dano secundário, lesão e morbidade significativas no local doador, deformidade, cicatrização, além de riscos cirúrgicos como sangramento, inflamação e alto custo ¹⁹. Os autoenxertos também não são

aplicáveis em casos de defeitos ósseos que requerem volumes de enxerto ósseo maiores do que os disponíveis ou viáveis ¹⁶.

Diante disso, a engenharia de tecidos tornou-se uma estratégia alternativa visando o reparo ósseo por meio do uso de uma combinação sinérgica de enxertos ósseos de biomateriais, células e moléculas sinalizadoras/fatores de crescimento para induzir a formação de novos tecidos ósseos, eliminando os riscos associados aos autoenxertos ²⁰.

Os enxertos ósseos também chamados como “*scaffolds*” ósseos, nome em inglês para materiais que imitam a organização 3D de estruturas ósseas, fornecem um modelo para a reconstrução de defeitos, promovendo a fixação celular, proliferação, geração de matriz extracelular, restauração de vasos, nervos, músculos, ossos etc. Além disso, *scaffolds* ósseos tridimensionais porosos, fibrosos ou permeáveis, a base de biomateriais pode promover o transporte de líquidos e gases corporais, promover a interação celular, viabilidade e deposição de matriz extracelular (MEC) com inflamação e toxicidade mínimas, enquanto biodegrada a uma determinada taxa controlada²¹.

A tradução clínica dos *scaffolds* ósseos ainda enfrenta muitos desafios, apesar dos intensos esforços e avanços nos últimos anos. Para desenvolver *scaffolds* mais praticáveis clinicamente, são necessárias mais investigações sobre o *design* correto e as propriedades do material que devem ser adaptadas nos *Scaffolds* de acordo com os diferentes tipos de defeitos ósseos e locais de fratura. Em primeiro lugar, um material deve ser biocompatível e interagir com células e tecidos vivos sem provocar respostas fisiológicas indesejáveis. A biocompatibilidade abrange todos os aspectos relacionados à função de um biomaterial no corpo humano¹⁴. Esse é um critério de triagem que pode ser examinado sob diferentes aspectos (desde o ensaio de citotoxicidade *in vitro* até a toxicidade sistêmica aguda e subcrônica *in vivo*) com base na norma ISO 10993. Além disso, é desejável que um material de suporte ósseo seja biodegradável, o que significa que ele pode se decompor ao longo do tempo em produtos não tóxicos capazes de serem metabolizados e eliminados do corpo^{22,23}. Ao mesmo tempo, o novo tecido cresce e preenche gradualmente o defeito. Outros fatores importantes são a osteocondutividade, a osteoindutividade e a capacidade de osseointegração²⁴. Um material osteocondutor orienta o crescimento ósseo em sua superfície, apoiando o crescimento de capilares e células do hospedeiro. Os materiais osteoindutores induzem o processo de osteogênese, estimulando células-tronco imaturas e pluripotentes de um ambiente não ósseo a se diferenciarem em condrócitos e osteoblastos. Esses materiais, portanto, permitem a regeneração em um local que normalmente não cicatriza se não for tratado. A osteointegração

ocorre quando se forma uma ancoragem funcional e estrutural direta entre um implante e o osso. A falta de osseointegração, observada em materiais bioinertes, leva à formação de um tecido não aderente, de uma cápsula fibrosa não aderente ao redor do biomaterial algumas semanas após o implante. As complicações clínicas da má osseointegração, na maioria das vezes, são devidas à instabilidade mecânica. Nas extremidades do defeito ósseo, onde o osso faz interface com o *scaffold*, não deve haver micromovimento que, de outra forma, causaria não uniões²⁴. Com relação às propriedades mecânicas, a resistência e o módulo de elasticidade/rigidez de um material de suporte ósseo são de particular importância²⁵. A resistência mecânica adequada proporciona integridade após o implante. Os *scaffolds* ósseos devem ter estabilidade mecânica temporária e suportar forças biomecânicas iniciais, como forças de contração da ferida e cargas corporais, à medida que se degradam com o tempo.

Metodologias tradicionais de fabricação de *scaffolds* ósseos, como *casting* por evaporação de solvente, ligação de fibras, fundição com solvente e lixiviação de partículas, laminação de membrana, moldagem por fusão e espuma de gás apresentam muitas limitações²⁶. Os inconvenientes dessas técnicas incluem a uso extensivo de solventes orgânicos altamente tóxicos, longos períodos de fabricação, processos de trabalho intensivo, incompleta remoção de partículas residuais na matriz polimérica, baixa repetibilidade, poros com formas irregulares, interconectividade insuficiente de poros e estruturas finas. Além disso, a maioria desses métodos têm restrições no controle do formato. Por exemplo, a fundição depende da forma do molde e não do poder controlar de maneira fácil e independente a porosidade e tamanho dos poros dos *scaffolds*²⁷. Sendo assim, novas tecnologias de fabricação, como a manufatura aditiva, vêm sendo desenvolvidas para a produção destes biomateriais.

1.3 Tecnologia de impressão 3D

Métodos convencionais para a preparação de enxertos ósseos, como lixiviação de agentes formadores de poros, formação de espuma de gás ou separação de fases, levam a uma ampla variação na geometria dos poros²⁸, distribuição do tamanho dos poros²⁹, no entanto geralmente resultam em baixa interconectividade³⁰.

Neste contexto, a técnica de impressão 3D, também conhecida por manufatura aditiva, tem despertado o interesse pela sua facilidade de processamento e principalmente pela capacidade em produzir um material com propriedades únicas e personalizadas³¹. A impressão 3D tem atraído um interesse crescente no desenvolvimento de dispositivos implantáveis, uma vez que pode promover a formação de biomateriais, no contexto da regeneração do tecido ósseo, que alcancem migração

intracelular efetiva, suprimento de nutrientes e produção de MEC requer uma estrutura bem trabalhada com alta porosidade, interconectividade e tamanho e geometria de poros precisamente definidos³². Isso torna a impressão 3D particularmente adequada para a fabricação de estruturas destinadas ao reparo do tecido ósseo, além de facilitar a diferenciação direcionada e a proliferação de células-tronco³³.

No processo de impressão 3D, há algumas etapas fundamentais aplicadas em todos os sistemas de prototipagem rápida (Figura 3). Primeiramente, o objeto desejado deve ser modelado tridimensionalmente em um *software* 3D com o sistema de desenho auxiliado por computador (*computer-aided design*, CAD). Atualmente, diversos softwares estão disponíveis com este sistema, dentre os mais utilizados estão: SolidWorks®, PTC Creo Parametric®, AutoCAD®, CATIA®, Solid Edge® e FreeCAD®. Cada *software* CAD utiliza algoritmos diferentes para simular objetos sólidos, dessa maneira, o formato STL (estereolitografia), criado em 1987 pela 3D Systems Inc³⁴ foi adotado como padrão pela indústria de prototipagem rápida e é compatível com qualquer *software* de desenho digital para manufatura computadorizada. O objeto modelado é, portanto, convertido para o formato STL que descreve as superfícies do modelo através das coordenadas dos vértices que constituem cada uma de suas faces. O arquivo STL é enviado para um *software* CAM (Fabricação assistida por computador), como por exemplo o G-code, que processa o objeto a ser impresso, fatiando esse objeto em várias camadas. Deste modo, o *software* G-code permite configurar os parâmetros de impressão das camadas a serem impressas, e calcula o trajeto que a máquina deve fazer para depositar cada uma dessas camadas baseado na geometria gerada no CAD. Após a impressão dos objetos, alguns materiais necessitam de pós processamento como banho de luz, secagem, congelamento, por exemplo.

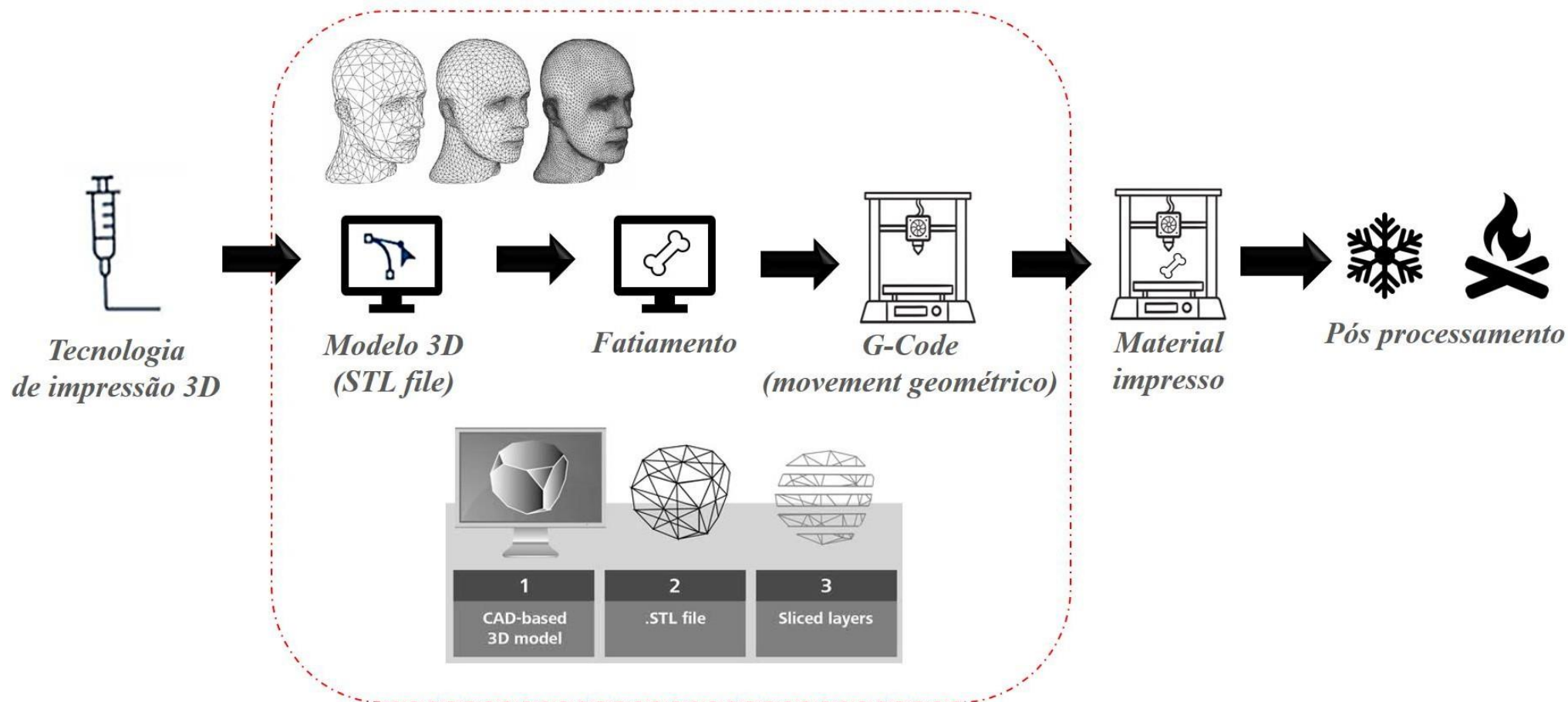


Figura 3. Etapas do processo de produção de um material por impressão 3D.

A impressão 3D envolve, em sua maioria, a extrusão de um filamento derretido ou pastas através de um bico fino enquanto a posição do bico é controlada computacionalmente³⁵. Muitas técnicas diferentes de impressão 3D podem ser potencialmente utilizadas para a deposição de materiais. Tais metodologias são classificadas de acordo com os materiais utilizados (pastas, pós, soluções etc.) ou com base nos mecanismos utilizados para conferir estrutura e estabilidade aos produtos. Como mencionado, a impressão 3D envolvendo extrusão é o método mais usado em diversas áreas de aplicações, porém, há outros métodos que envolvem outros tipos de materiais, que também fazem parte do universo da impressão 3D, dentre eles pode-se citar a sinterização e a impressão a jato de tinta (*inkjet printing*). A técnica de sinterização pode ser classificada dependendo do tipo de sinterização, como sinterização a laser seletiva (SLS) ou sinterização seletiva de ar quente e fusão (SHASAM). Ambos os métodos, que são representados na Figura 4, usam uma fonte de sinterização para derreter as partículas de pó e para realizar camadas sólidas³⁶. Um rolo distribui uma camada de pó na mesa da impressora (ou na camada anterior) enquanto o processo de sinterização é controlado pelo modelo CAD (*computer-aided design*), permitindo a estabilidade estrutural do material 3D a ser alcançado. A impressão a jato de tinta (IJP), representada também na Figura 4, utiliza bicos de membrana pneumática que colocam pequenas gotas de tinta (material a ser impresso) líquida para formar padrões 2D e 3D em um objeto em movimento assistido por computador. As gotas formam juntas uma imagem digital em formato de decoração gráfica, preenchimento de superfície ou deposição de cavidades³⁷.

Dentre os diferentes tipos de tecnologia de impressão 3D, para o processamento envolvendo biopolímeros, a do tipo extrusão é a mais comumente empregada. Essa tecnologia se trata de uma modificação da tradicional impressora 3D do tipo FDM (*fused deposition modeling*), que usa os mecanismos de uma extrusora para depositar camadas de material termoplástico, para a usinagem de precisão de materiais compostos³⁸. Diferente da FDM, esse tipo de impressora 3D envolve extrusão do material, geralmente na forma de pastas ou géis, alocadas em compartimentos do tipo seringa que são comprimidos a partir de um sistema tipo parafuso ou pistão, sendo a quantidade de material extrudada controlada com precisão (Figura 4). Além disso, a extrusora é sincronizada com o sistema de precisão de movimento XY que controla a plataforma de construção, para que a espessura e a posição da deposição do material possam ser controladas com precisão³⁸.

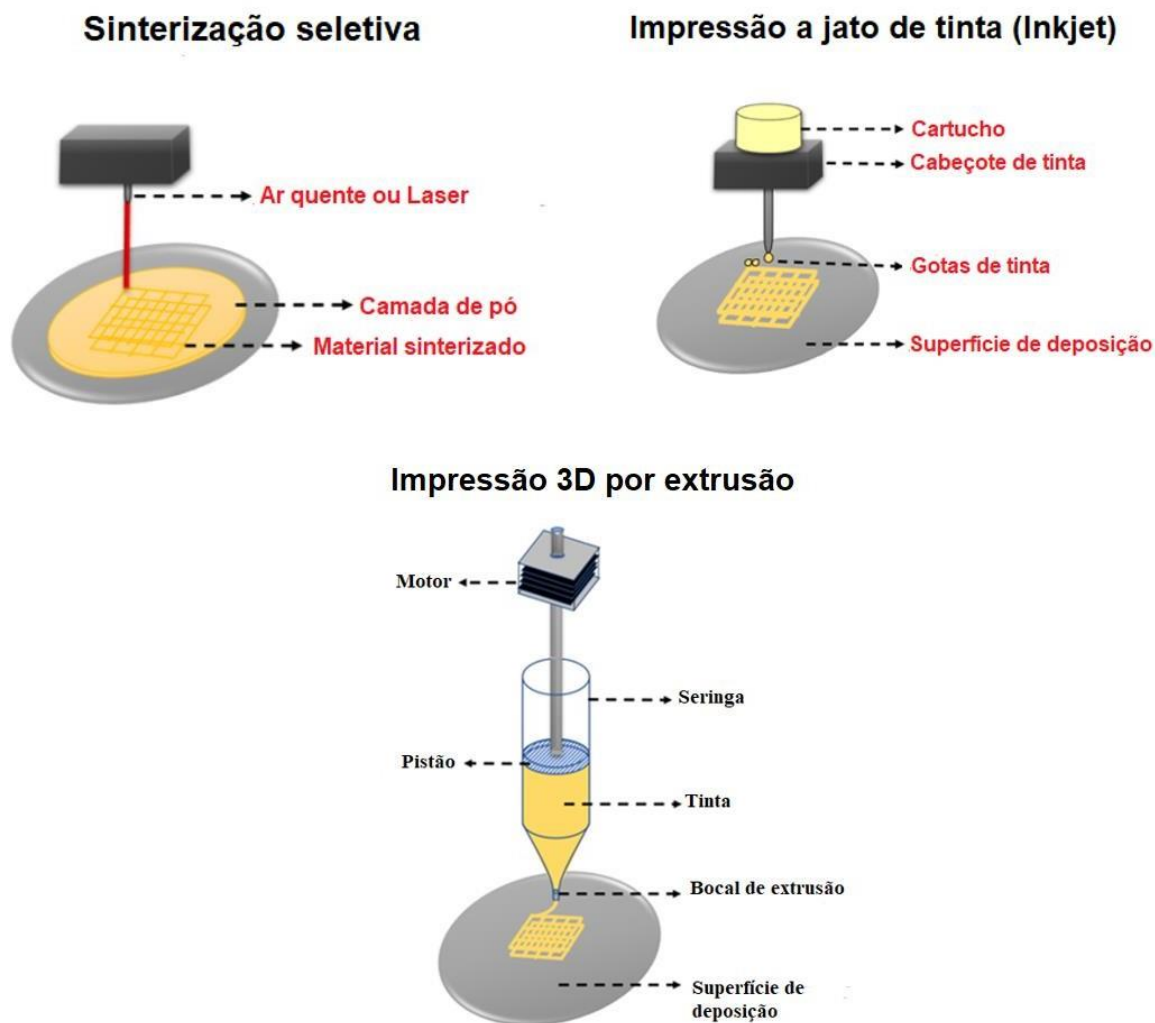


Figura 4. Esquema de impressão 3D por diferentes mecanismos: sinterização seletiva, jato de tinta (*Inkjet*) e por extrusão.

Fonte: Autoria própria

Atualmente, a maior limitação desta tecnologia para processamento de pastas ou géis está ligada a reologia desses materiais tanto do ponto de vista da extrusão quando ao seu comportamento na deposição da superfície. Além do fato do conteúdo das formulações a serem processadas não terem sido amplamente exploradas, principalmente no campo de aplicação tecnológica³⁹.

Dentro deste cenário, o grande desafio é a seleção de uma formulação adequada tanto para o processamento por impressão 3D quanto para a obtenção de um biomaterial com boas propriedades finais para aplicação na área de engenharia tecidual. Dentre as opções, os polímeros, a maioria dos sintéticos não são indicados para essa aplicação, pois apresentam natureza hidrofóbica, dificuldade de adesão, proliferação e diferenciação celular⁴⁰. Dessa forma, polímeros

naturais biocompatíveis têm sido investigados para esta finalidade. Dentre estes podemos citar os: alginatos⁴¹, quitosana⁴²⁻⁴⁴, ácido hialurônico⁴⁵ e amido⁴⁶.

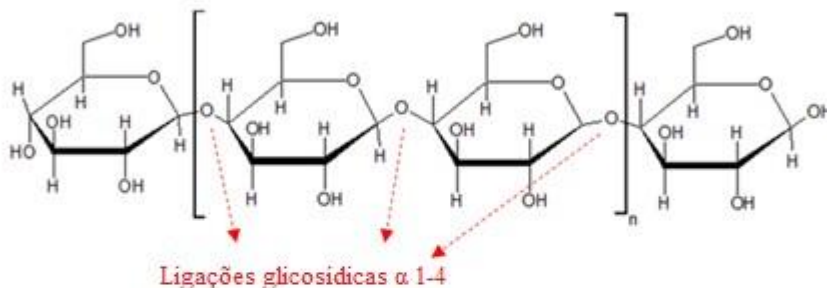
1.2 Uso do amido para *scaffold* ósseo

O amido é um polímero natural da família dos homopolissacarídeos e é composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, criando uma cadeia linear. A amilopectina, por outro lado, é formada por unidades de glicose α -1,4 e α -1,6 ligadas entre si, formando uma estrutura ramificada (Figura 5). As proporções em que essas estruturas aparecem diferem com relação a fontes botânicas, variedades da mesma espécie e até mesmo na mesma variedade, de acordo com o grau de maturidade da planta⁴⁷. O amido é a principal fonte de energia das plantas, sendo armazenado em tubérculos/raízes, frutos e grãos/sementes na forma de grânulos com diferentes formas e tamanhos de partículas que variam de 2 a 50 μm ⁴⁸.

O amido tem sido explorado na produção de *scaffolds* ósseos para engenharia de tecidos ósseo por apresentar os critérios apropriados como biocompatibilidade e a capacidade de regular o tempo de degradação⁴⁶. A regulação e personalização do tempo de degradação dos *scaffolds* ósseos é interessante para que a estrutura seja substituída pela nova estrutura óssea ao fim do tratamento, dependendo da necessidade do paciente⁴⁹. Os biomateriais à base de amido têm sido investigados para diversas aplicações biomédicas como para cicatrização de feridas, adesão, proliferação, diferenciação e regeneração de células^{50,51}.

AMIDO

Amilose



Amilopectina

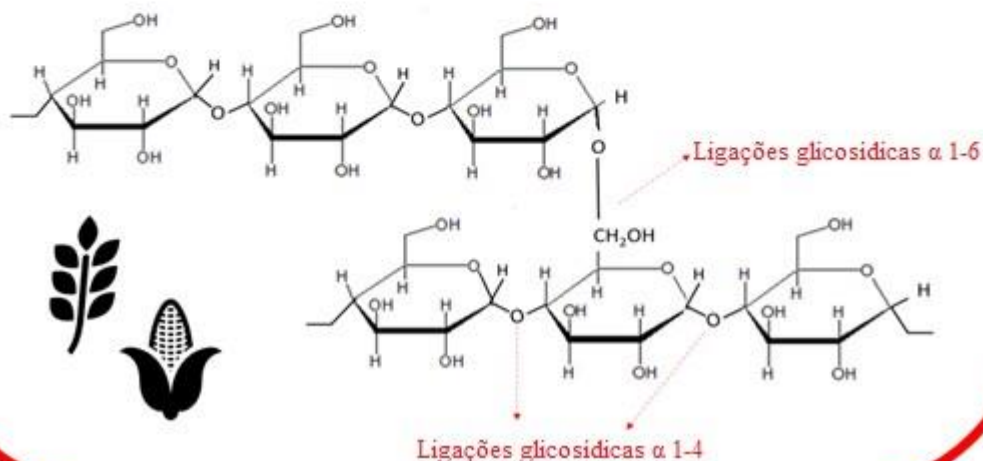


Figura 5. Estrutura química do amido (estrutura projetada utilizando o *software ChemsSketch*).

Fonte: própria autoria.

SHAHRIARPANAH; NOURMOHAMMADI; AMOABEDINY (2016)⁵² avaliaram compósitos de quitosana carboxilada com diferentes concentrações de amido. Os autores concluíram que um maior teor de amido pode melhorar a proliferação, a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização de células osteoblásticas. KOSKI et al. (2018)²⁷ avaliaram a produção via impressora 3D de diferentes formulações de amido de milho com hidroxiapatita. O aumento do teor de amido resultou em aumento da resistência mecânica e maior proliferação de células osteoblásticas in vitro. KOSKI & BOSE (2019)⁵³ investigaram o uso de amidos de diferentes fontes botânicas (milho, batata, mandioca) como polímeros ligantes com HAp, para produção de *scaffolds* ósseos por impressão 3D. Os autores observaram que o aumento do conteúdo de amilose

permitiu a produção de *scaffolds* com maior resistência mecânica, sendo a fonte amilácea fator importante nas propriedades finais dos biomateriais. Apesar dos promissores resultados, o uso do amido na elaboração de *scaffolds* ósseos tem apresentado algumas limitações como dificuldades de processamento, elevado intumescimento, caráter altamente hidrofílico, baixa resistência mecânica e instabilidade para aplicação a longo prazo⁵⁴.

Neste contexto, métodos de modificação do amido têm sido explorados para superar as deficiências dos amidos nativos e aumentar a utilidade deste polímero para uma variedade de aplicações. Além da imprimibilidade, a modificação do amido pode resultar em ganho na resistência mecânica, melhora na compatibilidade com os biomateriais e remoção da necessidade de reticulação ou pós processamento após a impressão 3D⁵⁵.

1.4 Modificação do amido

Os amidos nativos geralmente são modificados para diversificar a estrutura e a funcionalidade para atender às diversas aplicações⁵⁶. Em novembro de 2016, as exportações brasileiras de amido modificado foram de 3.000 toneladas (US\$ 1.000/ton), comumente processadas por oxidação química (CEPEA, 2020)⁵⁷. No entanto, essa tecnologia gera grandes quantidades de águas residuais contendo altas concentrações de sais tóxicos⁵⁸. No Brasil, a Cargill investiu R\$ 229 milhões em 2021 em tratamento de efluentes, enquanto US\$ 2,30 milhões foram destinados a ações para o meio ambiente⁵⁹.

Assim, a busca por tecnologias de processamento ambientalmente favoráveis tem auxiliado no desenvolvimento de tecnologias verdes emergentes para a modificação de amidos, como os processos físicos utilizando aquecimento do material em dois estados: seco (*Dry heating treatment* - DHT) e úmido (*Heat-moist treatment* - HMT). A modificação física dos grânulos de amido é segura, simples (tecnologicamente) e relativamente de baixo custo. Essas técnicas não requerem agentes químicos ou biológicos e, portanto, são preferidas quando o produto é para consumo humano⁵⁷. Neste contexto, Maniglia et al. (2020)⁶⁰ obtiveram hidrogéis de amido de mandioca modificado (DHT por 4 h a 130 °C) mais fortes e com melhor imprimibilidade que o amido nativo (Figura 6). Outros trabalhos descritos na literatura (Tabela 1) demonstram que o tratamento por DHT por variar temperatura, tempo e umidade relativa do amido e assim pode promover alteração nas propriedades de pasta, padrão de cristalinidade relativo, cristalinidade, e na entalpia; alteração na firmeza dos géis de amido; ampliação do centro de cruz de Malta; melhorar a solubilidade e capacidade de inchamento; redução da sinérese; despolimerização e redução no tamanho médio

das moléculas⁶¹⁻⁶⁶. Dessa forma, pode alterar as propriedades e melhorar sua capacidade para ser usado para elaboração de hidrogéis para serem usados no processo de impressão 3D.

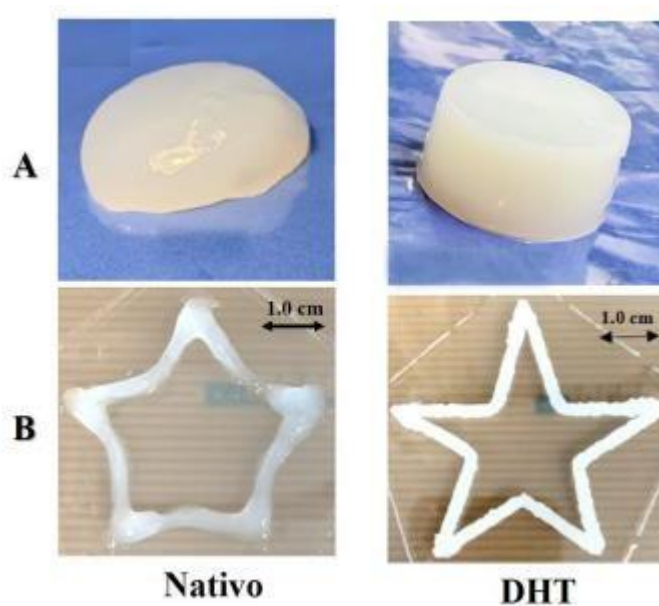


Figura 6. (A) Aspecto visual dos géis de mandioca nativo e modificado por aquecimento a seco (DHT) e (B) Estrelas impressas via impressão 3D utilizando hidrogéis preparados com amido nativo e modificado (DHT). Fonte: Maniglia et al. (2020)⁶⁰.

Tabela 1. Efeitos do tratamento por aquecimento a seco nas propriedades do amido.

Matéria prima	Condições do tratamento	Principais características	Referências
Amido de arroz	<p>Aquecimento (forno elétrico) a 130 °C por 0, 1, 2 e 4 h</p> <p>Teor de umidade (MC):</p> <p>Pré-tratamento: MC <10%</p> <p>Pós-tratamento: não determinado</p>	<p>O DHT usando 1 h de tratamento periódico causou as mudanças mais significativas na amostra de amido.</p> <p>O amido tratado apresentou maior índice de absorção de água, solubilidade em água, poder de inchamento, pico de viscosidade e força de gel do que o amido nativo. Por outro lado, a DHT promoveu a redução do índice glicêmico, do teor de amido resistente e do teor de amido de digestão rápida e lenta.</p>	61
Amido de batata doce	<p>Calor seco contínuo (CDH): 130 °C por 3, 6, 9, 12, 15, 18 h.</p> <p>Calor seco repetido (RDH): 130 °C por 3 h, depois resfriado a 25 °C por 60 min (1 ciclo)</p> <p>Avaliação: 1 - 6 ciclos</p> <p>Teor de umidade (MC):</p> <p>Pré-tratamento: MC <10%</p> <p>Pós-tratamento: não determinado</p>	<p>O amido tratado com CDH apresentou valores mais altos de cristalinidade relativa, solubilidade, poder de inchamento, transmitância de luz e parâmetros térmicos do que os tratados por RDH, comparando a mesma duração do tratamento. O tratamento com RDH resultou em amidos com teor de amido digestível rápido ligeiramente maior, enquanto o tratamento com CDH influenciou muito a estrutura da superfície do grânulo de amido. Em ambos os tratamentos (CDH e RDH), o teor de amido resistente aumentou com a ciclagem ou com o tempo de tratamento.</p>	62

<p>Amido de batata ceroso</p>	<p>110 °C por 0,5, 1,5 e 2,5 h</p> <p>Teor de umidade (MC):</p> <p>Pré-tratamento: MC <10%</p> <p>Pós-tratamento: não determinado</p>	<p>O DHT promoveu alterações na morfologia do amido: aparecimento de buracos e a expansão do centro da estrutura cruzada polarizada. O amido tratado apresentou alteração do padrão cristalino (tipo B para BpA), redução da cristalinidade relativa. Por outro lado, o amido tratado apresentou maior poder de inchamento, solubilidade, pico de viscosidade e temperatura de colagem do que o do que o amido nativo. O DHT promoveu o aumento do teor de amido rapidamente digerível</p> <p>rapidamente digerível e a redução do teor de amido resistente</p>	<p>⁶³</p>
<p>Amido de milho ceroso</p>	<p>Tratamento de aquecimento a seco repetido (RDHT)</p> <p>Um ciclo: 140 °C por 4 h e, em seguida, resfriado em temperatura ambiente por 1 h.</p> <p>Número de ciclos: 1, 2, 3, 4 ou 5</p> <p>Tratamento contínuo de aquecimento a seco</p> <p>(CDHT): 140 °C por 8, 12, 16 ou 20 h.</p> <p>Teor de umidade (MC):</p> <p>Pré-tratamento: MC <10%</p> <p>Pós-tratamento: não determinado</p>	<p>O amido tratado com RDHT e CDHT apresentou agregação de grânulos, alterações na cristalinidade relativa e na ordem molecular de curto alcance ordem molecular de curto alcance, redução do índice de absorção de água, viscosidade e parâmetros térmicos. Por outro lado, esses amidos tratados apresentaram maior clareza de pasta, solubilidade e temperatura de pasta dos amidos em comparação com o amido nativo. O RDHT apresentou maior impacto no enfraquecimento da resistência à força de cisalhamento, diminuindo a transmitância da pasta de amido e no aumento do grau de retrogradação da pasta de amido do que o CDHT, comparando a mesma duração.</p>	<p>⁶⁴</p>

Amido de milho normal e amido de batata	130 °C por 2 h Teor de umidade (MC): Pré-tratamento: MC <10% Pós-tratamento: não determinado	Para ambos os amidos, o DHT diminuiu o peso molecular do amido, temperatura de gelatinização. Amido de batata tratado: não apresentou diferença significativa de amido de digestão rápida e lenta e lentamente digerível e teor de amido resistente quando comparado com o amido nativo. Por outro lado, o amido de milho tratado não apresentou diferença significativa em relação ao amido de digestão rápida, mas maior em relação ao amido de digestão lenta digerível e menor teor de amido resistente do que o milho nativo do milho. Ambos os amidos tratados apresentaram redução da temperatura de gelatinização e peso molecular médio peso molecular médio quando comparados com o respectivo amido de controle.	65
Amido de mandioca	130 °C por 2 e 4 h Teor de umidade (MC): Pré-tratamento: MC 13,2% Pós-tratamento: MC 6,8 e 6,7%, para 2 e 4 horas de tratamento, respectivamente	O aumento do tempo de DHT produziu um amido com maior teor de carbonila e maior tamanho de grânulos. Também reduziu o índice de absorção de água índice de absorção de água, aumentou o índice de solubilidade em água, afetou a cristalinidade dos grânulos e reduziu o tamanho molecular. O período de armazenamento mais longo aumentou a firmeza do gel. Os amidos DHT resultaram em géis que apresentaram melhor capacidade de impressão do que do que o amido nativo, principalmente para o amido de mandioca tratado por aquecimento a seco por 4 h.	60
Amido de milho	140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 °C por 2 h Teor de umidade (MC): Pré-tratamento: MC <10% Pós-tratamento: MC < 7%	O aumento da temperatura de aquecimento do DHT resultou na redução do tamanho molecular, das cadeias longas de amilose e da cristalinidade do amido de milho, enquanto a estrutura granular foi mantida com uma leve agregação entre as partículas de amido. A solubilidade do amido DHT aumentou, diminuiu o DH e aumentou a heterogeneidade dos cristalitos de amido. Com o aquecimento temperatura de aquecimento, o DHT reduziu a viscosidade geral da pasta de amido.	66

Fonte: Tabela adaptada da referência MANIGLIA et al (2020) ⁶⁷

Com isso pode-se dizer que a modificação física do amido por aquecimento a seco (DHT) é uma potencial alternativa para a produção de novos materiais que possuam propriedades adequadas para o uso como aditivo no processo de impressão 3D.

1.5 Objetivo do trabalho

1.5.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa a impressão 3D de biomateriais (*scaffolds ósseo*) a base de amido de batata modificado por aquecimento a seco (DHT) com adição de nanopartículas de hidroxiapatita para aplicação deles como enxertos ósseos que estimulem a regeneração óssea.

1.5.2. Objetivos específicos

- ✓ Modificar o amido de batata por aquecimento a seco (DHT);
- ✓ Caracterizar o amido modificado em termos das suas propriedades físico-químicas, moleculares, propriedades de pasta, propriedades do gel (firmeza e reologia), capacidade de impressão 3D, biodegradabilidade e intumescimento;
- ✓ Otimizar os parâmetros de processo na impressão 3D, avaliar o melhor tipo de pós processamento e selecionar a melhor amostra de amido modificado para a produção dos *scaffolds* ósseos;
- ✓ Imprimir géis de amido modificado (amostra selecionada) com adição de nanopartículas de hidroxiapatita e caracterizar suas propriedades reológicas;
- ✓ Avaliar a biodegradabilidade, intumescimento e morfologia dos *scaffolds* ósseos impressos.

CAPÍTULO 2: Modificação e caracterização do amido de batata por aquecimento a seco

O Capítulo 2 aborda a modificação do amido de batata por aquecimento a seco (DHT) e avaliar como essa modificação atuou nas propriedades estruturais, físico-químicas e nas propriedades dos seus hidrogéis, visando aplicações em impressão 3D.

2.1 Material e métodos

2.1.1 Material

O amido de batata nativo (teor de umidade: 11,1 g/100 g, amilose aparente: 22,57 g/100 g de amido, b.s.) foi adquirido da Cargill - Agrícola (Brasil). Todos os produtos químicos foram de grau analítico.

2.1.2 Modificação do amido de batata

O tratamento de aquecimento a seco (DHT) seguiu o método descrito por MANIGLIA, LIMA, et al. (2020)⁶⁰. Em resumo, o pó de amido de batata foi espalhado (~1-1,5 mm) sobre uma folha de papel-alumínio e coberto com outra folha de papel-alumínio. As partes laterais foram fechadas com fita adesiva para formar um envelope fechado e evitar a perda de material. O amido embalado foi então colocado em um forno convectivo de ar quente (ModFic03, Famo, São Paulo, Brasil), no qual o DHT foi realizado usando ar a 130 °C por 1, 2 e 4 h (chamado DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h, respectivamente) (Figura 7). Após o processamento, o amido foi resfriado e armazenado em recipientes de vidro para análise posterior.

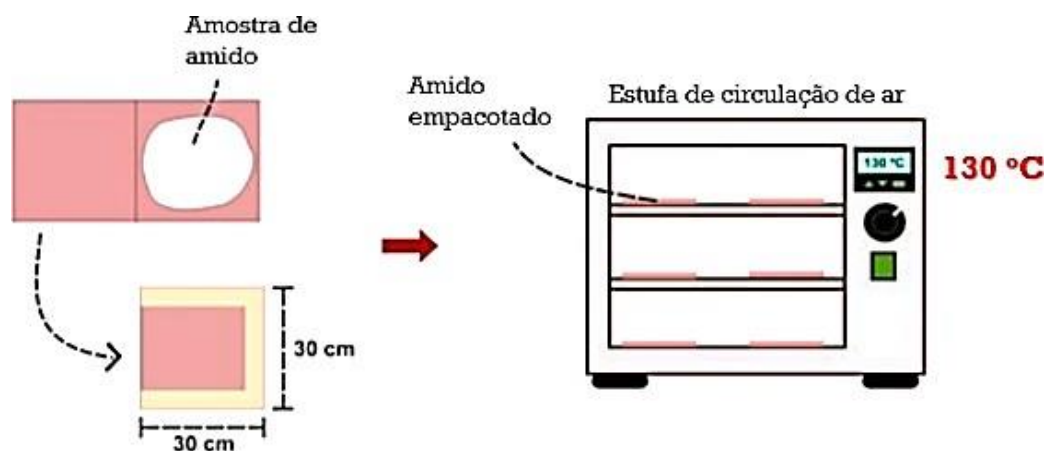


Figura 7. Modificação do amido por aquecimento a seco.

Fonte: adaptada de MANIGLIA et al. (2020)⁶⁰

2.1.3 Caracterização do grânulo: cor, microscopia, distribuição de tamanho e cristalinidade

Os amidos nativos e modificados foram avaliados com um colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Americas, Inc., Ramsey, EUA). Uma escala de cores CIE-Lab foi usada para medir o parâmetro de luminosidade L^* ($L^* = 0$ preto e $L^* = 100$ branco), os parâmetros de cromaticidade a^* ($+a^* =$ vermelho e $-a^* =$ verde) e b^* ($+b^* =$ amarelo e $-b^* =$ azul) das amostras. Os resultados foram expressos como a média de três medições dos amidos em pó e dos seus hidrogéis. A Equação 1 mostra o cálculo para obter a diferença total de cor (ΔE^*).

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Equação 1}$$

Os grânulos de amido (nativo e modificado) foram observados em um microscópio óptico (Axiovert 25, Zeiss, EUA) com uma lâmpada de halogênio de 20 W e ampliação de 40 x) e uma câmera digital com 8,0 megapixels (Samsung modelo CMOS, Coreia). Os grânulos de amido foram dispersos em água destilada (1:1, v/v) e colocados em uma lâmina de vidro, que foi coberta por uma lamínula e avaliada diretamente. Um filtro de luz polarizada acoplado ao sistema foi usado para observar a cruz de Malta.

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada usando um analisador de tamanho de partículas a laser Beckman Coulter LS13320 (Brea, Califórnia, EUA). As amostras de amido nativo e modificado foram dispersas em etanol (99,5%) e colocadas em um banho de ultrassom por 5 minutos antes da análise. Os diâmetros d_{10} , d_{50} e d_{90} também foram obtidos, denotando a redução do tamanho das partículas, 10%, 50% e 90%, respectivamente.

Um difratômetro de raios X (Siemens modelo D5005, Baden-Württemberg, Alemanha) com radiação de cobre foi usado para avaliar a cristalinidade dos grânulos, usando as seguintes condições de trabalho: ângulo 2θ variando de 3 a 40 °, uma taxa de varredura de 2 °-min⁻¹, 40 kV e 30 mA. As amostras de amido foram mantidas em um dessecador contendo uma solução saturada de BaCl₂ (25 °C, $a_w = 0,900$) por dez dias para garantir uma atividade de água constante. As curvas obtidas foram suavizadas usando o *software* Origin, versão 2018 (Microcal Inc., Northampton, MA, EUA). A cristalinidade relativa foi calculada como a razão entre a área superior do pico de difração e a área total de difração, seguindo o método descrito por NARA & KOMIYA (1983)⁶⁸.

2.1.4 Caracterização molecular: grupos funcionais, distribuição de tamanho molecular, grupos carbonil e carboxil, amilose aparente e teor de açúcar redutor

O teor de umidade dos amidos de batata nativos e modificados foi analisado em um analisador de umidade Mb27 OHAUS (Barueri, Brasil).

As alterações nos grupos funcionais foram avaliadas usando a técnica de espectroscopia de infravermelho. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada usando um instrumento Spectrum 100™ FTIR (Perkin-Elmer, Shelton, EUA) equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR). Todos os espectros foram obtidos com uma média de 16 varreduras de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} e foram adquiridos com uma resolução de 4 cm^{-1} .

O perfil de distribuição do tamanho molecular foi determinado usando um sistema de cromatografia de permeação em gel (GPC), de acordo com SONG E JANE (2000)⁶⁹, com algumas modificações descritas por MANIGLIA, LIMA, et al. (2020)⁷⁰. A coluna de vidro (GE Healthcare - 28988950 XK 27/70) foi embalada com gel Sepharose CL-2B (Sigma, Suécia). Primeiramente, uma solução com 0,1 g de amido com 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO; 90%, LabSynth, Brasil) foi preparada e aquecida em um banho com água fervente (1 h). Em seguida, foi mantido a 25 °C por 24 h sob agitação constante. Em seguida, 3 mL dessa solução de amido foram misturados com 10 mL de etanol absoluto e centrifugados (30 min, 3000 g). O amido precipitado foi dissolvido em água (9 mL) e aquecido em um banho com água fervente (30 min). Essa solução de amido (4 mL) foi adicionada à coluna cromatográfica com uma solução eluente (25 mmol.L^{-1} de NaCl e 1 mmol.L^{-1} de NaOH) a uma taxa de 1 mL.min^{-1} . Alíquotas de 4 mL foram coletadas usando um coletor de frações (Gilson, modelo FC203B, Middleton, Inglaterra) e, em seguida, analisadas pelo método do valor azul⁵² usando um espectrofotômetro a 620 nm de comprimento de onda (Femto, modelo 600S, São Paulo - Brasil). A glicose foi usada como marcador para indicar o fim da análise.

Os teores de carbonila e carboxila foram determinados de acordo com o método descrito por SMITH (1967)⁷¹ e CHATTOPADHYAY, SINGHAL e KULKARNI (1997)⁷², respectivamente. O teor de carbonila foi determinado da seguinte forma: As amostras de amido nativo e modificadas por 1, 2 e 4 h de aquecimento a seco (4 g em base seca) foram dispersas em água destilada (100 mL) e aquecidas em um banho com água fervente sob agitação constante por 30 minutos. As amostras foram resfriadas a 40 °C, e o pH foi ajustado para 3,2 usando solução de HCl (0,1 M). Esse ajuste de pH foi feito para o branco, composto apenas de água. 15 ml de solução de cloridrato

de hidroxilamina foram adicionados às amostras de amido de batata, e o branco e as amostras foram banhados a 40 °C por 4 horas. Em seguida, as amostras foram tituladas com HCl (0,1 M) até o pH 3,2. Para calcular o conteúdo do grupo carbonila, foi usada a seguinte expressão (Equação 2):

$$\frac{CO}{100GU} = \frac{[(V_{bl}-V_{ss}) \cdot M_{HCl} \cdot 0,028 \cdot 100]}{M} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:

- V_{bl} = Volume de titulação (mL) da solução de HCl 0,1 M necessário para o branco;
- V_{ss} = Volume de titulação (mL) da solução de HCl 0,1 M necessário para a amostra de amido;
- M_{HCl} = Molaridade da solução de HCl (mol/L);
- 0,028 = Peso molecular da unidade de carbonila ($M(C) + M(O) = 0,028$ kg/mol);
- M = Massa da amostra (g) em base seca.

O resultado é expresso na quantidade de grupos carbonílicos por 100 unidades de glicose (CO/100GU).

O conteúdo de carboxila foi determinado da seguinte forma: as amostras de amido nativo (branco) e modificado por 1, 2 e 4 horas de aquecimento a seco (2 g em uma base seca) foram dispersas em 25 mL de solução de HCl (0,1 M) sob agitação a 25 °C por 30 minutos. O resíduo foi filtrado usando um sistema de vácuo com um papel de filtro qualitativo (205 µm) e depois lavado com 400 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 300 mL de água destilada, e as dispersões de amido foram aquecidas em um banho com água fervente sob agitação contínua por 15 minutos. Enquanto ainda estavam quentes e sob agitação, as amostras foram tituladas com NaOH 0,01 M até o pH 8,3. Para calcular o conteúdo do grupo carboxílico, foi usada a seguinte expressão (Equação 3):

$$\frac{COOH}{100GU} = \frac{[(V_{ss} - V_{bl}) \cdot M_{NaOH} \cdot 0,028 \cdot 100]}{M}$$

Equação 3

Sendo:

- V_{ss} = volume de titulação (mL) da solução de NaOH 0,01 M necessário para as amostras oxidadas;
- V_{bl} = Volume de titulação (mL) da solução de NaOH 0,01 M necessário para o branco;
- M_{NaOH} = Molaridade da solução de NaOH (mol/L);
- 0,045 = Peso molecular da unidade de carboxila ($M(C) + 2 M(O) + M(H) = 0,045$ kg/mol);
- M = Massa da amostra (g) em base seca

O resultado é expresso na quantidade de grupos carboxílicos por 100 unidades de glicose (COOH/100GU).

A amilose aparente foi analisada de acordo com a metodologia proposta por Juliano (1971)⁵⁵ e adaptada por MARTÍNEZ & CUEVAS (1989)⁷³. Foi utilizada uma curva de referência contendo padrões de amilose (A0512 tipo III) da Sigma-Aldrich Pty Ltd (Castle Hil, NSW, Austrália)

Para determinar o açúcar redutor total, os amidos foram analisados usando o método colorimétrico DNS, conforme descrito no trabalho de ZHANG, LIU, & ZHAO (2012)⁷⁴. Resumidamente, o reagente DNS foi preparado pela dissolução de 6,3 g de ácido 3,5-dinitro salicílico, 182 g de tartarato de sódio e potássio e 262 mL de NaOH 2 M em 500 mL de água deionizada a 50 °C. Em seguida, 5 g de fenol e 5 g de sulfito de sódio foram adicionados à solução e resfriados à temperatura ambiente para obter o reagente DNS. 0,5 mL do reagente DNS foi misturado com 0,5 mL de amido hidrolisado, aquecido por 5 minutos e resfriado à temperatura ambiente. 1 mL da solução foi diluído com 4 mL de água deionizada para obter 5 mL de solução posteriormente. A absorbância da solução final foi medida usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-9100 a 540 nm. A curva de calibração foi realizada usando a glicose como reagente padrão ($R^2 = 0,9989$) da qual se obteve a equação: $y = 1,0175 x - 0,0169$, sendo y = absorbância e x = concentração de glicose (g/L).

2.1.5 Caracterizações das propriedades de pasta e dos hidrogéis de amido de batata

2.1.5.1 Propriedades de pasta (RVA)

As propriedades de colagem do amido foram determinadas com o uso de um *Rapid Visco*

Analyzer (RVA) (Newport Scientific Pvt. Ltd., Austrália, com o *software* Thermocline for Windows, versão 3.0) usando a metodologia descrita em MANIGLIA et al. (2021)⁷⁵. As condições padrão para a caracterização do amido foram empregadas usando uma suspensão de 10,7 g de amido/100 g (correção para 14% de base de umidade). As etapas do procedimento foram as seguintes: manter a 50 °C por 1 min e, em seguida, aquecer a 95 °C (6 °C -min⁻¹) e manter a 95 °C por 5 min, seguido de resfriamento a 50 °C (6 °C-min⁻¹) e, finalmente, permanecer a 50 °C por 2 min. Parâmetros significativos foram calculados para eliminar mal-entendidos, como o RBD (*Relative breakdown*) e o RSB (*Relative setback*). O RBD foi calculado pela razão entre a quebra (*Breakdown*) e o pico de viscosidade aparente (PAV) para entender a facilidade de ruptura dos grânulos de amido. O RSB foi calculado pela razão entre os valores de SB e TAV (*Trough apparent viscosity*) para entender a tendência à retrogradação.

2.1.5.2 Preparação dos Hidrogéis

Os hidrogéis de amido foram preparados adicionando-se amido de batata (10 g/100 g b.s.) à água e aquecendo-se a suspensão a 85 °C em um banho (Solid Stell, Brasil) sob agitação constante com um agitador mecânico (Fisatom Scientific, Brasil) durante 30 minutos. Depois disso, a pasta de amido foi colocada em moldes plásticos (20 x 20 mm) e em seringas (5 mL). Em seguida, ela foi mantida em dessecadores com água na geladeira (5 °C) durante 24 horas. Após esse tempo, foram obtidos os hidrogéis de amido nativo e modificado (DHT_1h, DHT_2h, DHT_4h). Os hidrogéis nos moldes foram usados para caracterização da reologia e da firmeza do gel. Os hidrogéis na seringa foram usados para avaliação de impressão 3D.

2.1.5.3 Reologia e firmeza dos hidrogéis

As medições reológicas dos hidrogéis foram analisadas em um reômetro híbrido (Discovery HR-3, DHR, TA Instruments, EUA) usando uma placa paralela de 20 mm com 2000 µm de espaço. Foi usada uma temperatura de 25 °C. Antes do teste, o excesso de material da placa foi raspado e deixado em repouso por 5 minutos para atingir um estado estável. Foram realizadas rampas de fluxo com taxas de cisalhamento de 0,1 a 100 1/s. As curvas de fluxo foram então ajustadas ao modelo *Power-Law* da seguinte forma:

$$v = K\gamma^{n-1} \quad \text{Equação 4}$$

Em que v é a viscosidade cinemática não newtoniana (m²/s), K é o índice de consistência (m²/s²⁻ⁿ), γ é a taxa de cisalhamento (s⁻¹) e n é o índice de potência (sem dimensão) para o modelo *Power Law*.

A análise de frequência de oscilação dinâmica foi realizada em uma deformação constante (0,03% de deformação) dentro da faixa viscoelástica linear com uma frequência de 0,01 a 100 rad/s. Os espectros mecânicos foram obtidos registrando-se o módulo de armazenamento (G'), o módulo de perda (G'') e o fator de perda ($\tan \delta = (G''/G')$) em função da frequência. Todos os experimentos foram repetidos três vezes, e os dados médios foram usados para traçar as curvas.

A firmeza dos hidrogéis foi determinada por um teste de punção usando um analisador de textura TA TX Plus (STabela Micro Systems Ltd., Surrey, Reino Unido) com uma célula de carga de 50 kgf (490,3 N). As amostras foram penetradas até uma distância de 10 mm, usando uma sonda cilíndrica (P/0,5 R, 0,5 cm de diâmetro) a $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. O equipamento mede a força como uma função da profundidade de penetração. A firmeza está associada à força máxima suportada pelo gel até sua ruptura em uma determinada distância, e a energia de coesão foi obtida pela área abaixo da força gráfica \times profundidade de penetração (fixada em 10 mm).

2.1.6 Potencial dos hidrogéis de amido de batata para impressão 3D

A capacidade de impressão 3D (imprimibilidade) dos hidrogéis de amido de batata nativo e modificado foi avaliada usando uma impressora 3D do tipo extrusão modular bioV4-BioEdPrinter v4-4 da BioEdTech (São Paulo-SP, Brasil). As tintas (hidrogéis de amido nativo e modificado) foram impressas, em temperatura ambiente, de acordo com os seguintes parâmetros: velocidade do braço robótico = 10 mm/s; fluxo de extrusão (w) = 100%; diâmetro da agulha (d) = 1,2 mm; geometria 3D = paralelepípedo (20 x 20 x 2 mm) com porcentagem de preenchimento = 15%, geometria de preenchimento retangular. O projeto impresso em 3D foi um paralelepípedo com 4 cm² de superfície e 88 orifícios em sua estrutura, geometria frequentemente utilizada para aplicações alimentícias e biomédicas.

O desempenho dos hidrogéis foi avaliado pela reprodutibilidade da produção de *scaffolds* impressos em 3D frescos e para isso foi avaliado o coeficiente de variação (CV = desvio padrão dividido pela média \times 100) do peso e da área do paralelepípedo impresso em 3D. As amostras foram pesadas em balança analítica (AUW220D, Marte Científica, Minas Gerais, Brasil) e os tamanhos foram medidos em cinco posições diferentes usando um paquímetro digital (modelo CD-6 CSX-B, Mitutoyo, Roissy-en-France, França). A área do paralelepípedo impresso em 3D foi calculada pelo *software* ImageJ e comparada com a área do projeto de desenho 3D do paralelepípedo.

Também foi calculada a fidelidade geométrica (FG) com base na comparação entre a área do paralelepípedo impresso em 3D e a área do projeto 3D (Equação 5) e o número de orifícios (N) do paralelepípedo impresso em 3D e o número de orifícios de o projeto 3D (Equação 6).

$$FG_{\text{área}} = \left(\frac{\text{Área}_{\text{paralelepípedo impresso}}}{\text{Área}_{\text{projeto 3D paralelepípedo}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

$$FG_{\text{orifícios}} = \left(\frac{N_{\text{paralelepípedo impresso}}}{N_{\text{projeto 3D paralelepípedo}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

2.1.6 Caracterização dos *scaffolds*

2.1.6.1 Propriedades mecânicas

A espessura dos *Scaffolds* pré-condicionados (58% UR, 25 °C) foi avaliada através da espessura média resultante de cinco medições em posições aleatórias usando um micrômetro digital (modelo CD-6 CSX-B, Mitutoyo, Roissy-en-France, França) com ponta plana (resolução de 1 µm). O efeito da composição do *scaffold* também será avaliado em termos de variações em suas propriedades mecânicas. Para isso, será adotado o teste de punção, método relatado por Sobral et al. [28] e La Fuente [29]. Basicamente, a força aplicada para puncionamento (F) [N] e deformação no ponto de ruptura do *scaffold* (D) [mm] será determinada por pontuação em um Texturômetro (TA Instrument – TA. TX Plus), usando o “Texture Expert” software, com célula de carga de 30 kgf (294 N). Para isso, os *Scaffolds* serão fixados em células circulares de permeação (d = 0,05 m) e perfurados por uma sonda de 3 mm de diâmetro. A força de punção (F) pode ser associada à resistência no ponto de ruptura do material, e o deslocamento da sonda (D) pode ser associado à flexibilidade, e foi obtido a partir de curvas de força-deformação e as medidas foram feitas em quintuplicata.

2.1.6.2 Biodegradabilidade e intumescimento

Os *scaffolds* foram colocados em placas de cultura celular de seis poços e imersos em 5 mL de meio de cultura celular (α -MEM, Gibco) a 37 ± 2 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 7 e 14 dias. Em seguida, os *scaffolds* foram recolhidos e completamente secos em estufa. A biodegradabilidade foi calculada pela porcentagem de massa solubilizada no meio no intervalo de tempo.

Para avaliação do intumescimento, os *scaffolds* foram pesados (P_i) e imersos em meio α -MEM em placas de 6 poços, e fotos foram tiradas nos períodos de 0, 2, 4, 8, 24, 48 e 72 h de imersão. As imagens foram processadas pelo software ImageJ para calcular a variação da área do *scaffold* ($A_{inicial}$: área inicial antes da imersão no meio e A_{final} : área final após a imersão), sendo o poder de inchamento (SP) calculado conforme a Equação 7.

$$SP (\%) = \frac{(A_{final} - A_{inicial})}{A_{inicial}} \times 100$$

Equação 7

2.1.7 Análise estatística

Foi utilizada a técnica estatística de análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de comparação de médias (teste de Tukey), com um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). O software *Statistica* (StatSoft, EUA) foi usado para o tratamento estatístico dos dados.

2.2 Resultados e discussão

2.2.1 Caracterização do grânulo: aspecto visual do pó, morfologia do grânulo, distribuição de tamanho e cristalinidade

A Figura 8 apresenta o aspecto visual e a diferença de cor (ΔE^*) dos amidos de batata nativos e modificados (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h). À medida que o período de DHT aumenta, o pó do amido de batata adquiriu uma coloração mais marrom e esse efeito pode ser observado pelo aumento no valor de ΔE^* dos amidos modificados em relação ao nativo. Sendo assim, DHT_4h apresentou o valor de ΔE^* mais significativo em relação ao amido nativo. Esse comportamento pode estar associado à alta temperatura que pode causar reações de caramelização de açúcares residuais no amido na ausência de compostos nitrogenado⁶⁸. LIMA et al. (2021)⁷⁶ também observaram esse efeito para o amido de mandioca modificado com dois métodos combinados, DHT e tratamento de ozônio.

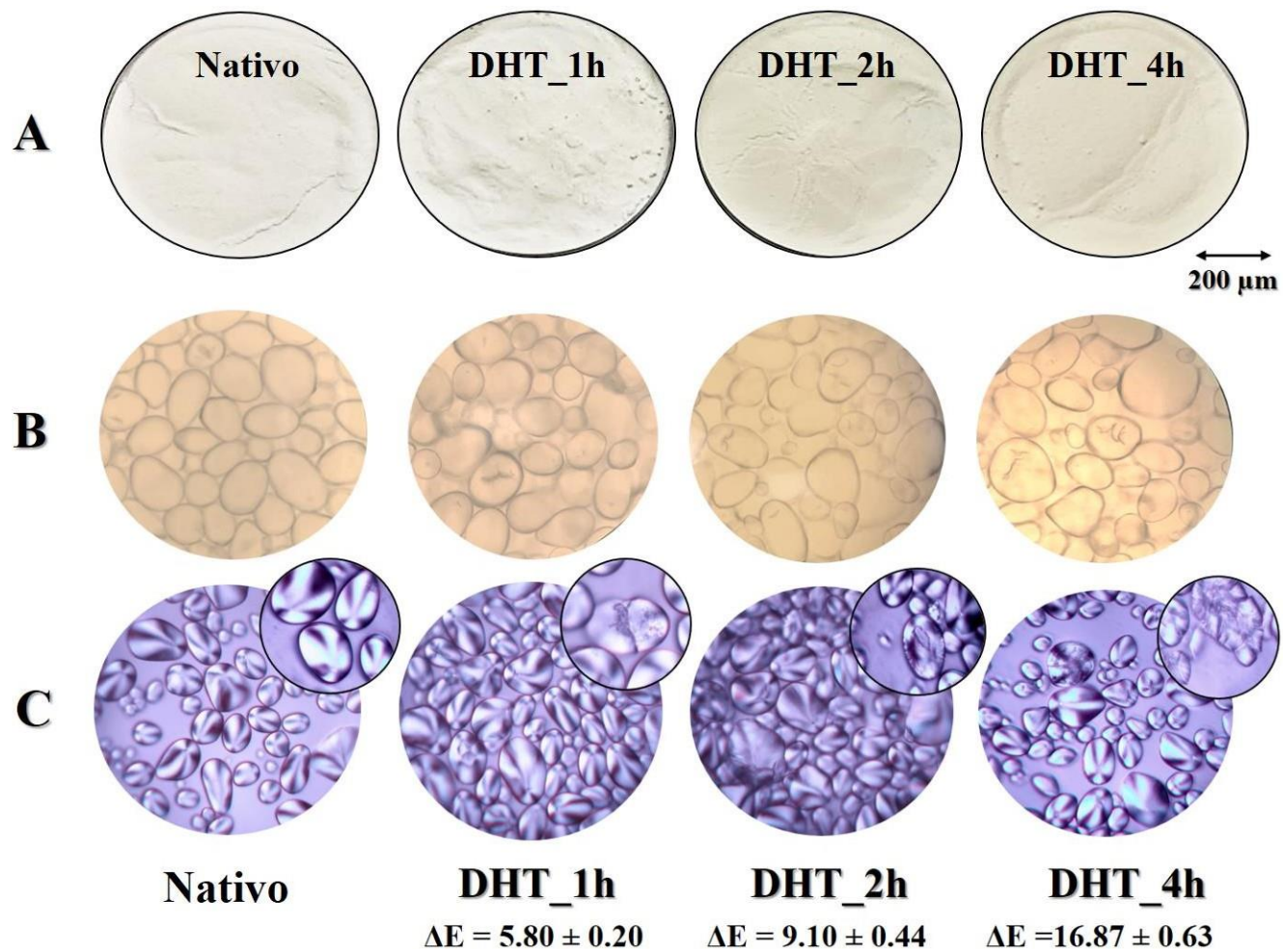


Figura 8. (A) Aspecto visual do pó de amido, (B) Imagem de microscopia óptica e (C) Microscopia óptica de luz polarizada dos grânulos de amido de batata nativos e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h)

Em relação à morfologia (Figura 8B), avaliada por microscopia ótica, observou-se que os grânulos de amido de batata nativo apresentam tamanhos não homogêneos com pequenos grânulos esféricos e grânulos de tamanho médios e grandes no formato de elipsoides. Os grânulos de amido nativo apresentaram superfície lisa, sem rachaduras. Além disso, os grânulos de amido de batata são relativamente grandes, especialmente quando comparados a outras fontes como o trigo e a mandioca⁶⁰. A Figura 8(B) apresenta que o tempo mais longo de tratamento com DHT promoveu a formação de rachaduras na superfície dos grânulos modificados (principalmente na amostra DHT_4h). Este fenômeno pode ser atribuído à violenta expulsão da umidade do interior da molécula de amido, que não é uniforme devido à distribuição de temperatura⁷¹. O grânulo de amido apresenta birrefringência quando visto microscopicamente sob luz polarizada, e este efeito pode ser associado às características da estrutura cristalina em grânulos de amido⁷². Analisando a Figura 8(C), é possível observar uma diminuição ou perda de birrefringência em tempos de aquecimento mais longos. Isso indica que o DHT afetou significativamente a microestrutura interna dos grânulos de amido de batata, afetando a sua estrutura interna associada, principalmente, a porção cristalina do amido de batata. Esse comportamento pode ser atribuído ao aumento da temperatura no centro do grânulo de amido, que supostamente danifica a estrutura de dupla hélice da amilopectina⁶⁹. O mesmo comportamento foi observado por LIU et al. (2019)⁶³ para amido de batata ceroso tratado com DHT (110 °C para 1,5 h) e por MANIGLIA et al. (2020b)⁷⁰ para amido de trigo também tratado com DHT (130 °C por 4 h).

Uma análise de DRX foi realizada para avaliar o efeito do DHT na cristalinidade do amido de batata, conforme mostrado na Figura 9. A Tabela 2 mostra os ângulos de Bragg, os índices de Miller e o espaçamento interplanar (d) para os amidos nativos e modificados.

Na Figura 9(A), podemos observar que o padrão de cristalinidade do amido de batata não foi afetado pelo DHT e que o amido de batata nativo e modificado mostrou um padrão típico de amido do tipo B com intensidade de reflexão centrada em 17,6° (valor máximo), 20,1°, 22,7° e 24,3°(2 θ)° com picos de difração fracos em 2 θ = 11,8° e 26,4°⁷⁴. O padrão do tipo B é típico de amidos em tubérculos e amidos ricos em amilose⁷⁵. Além disso, conforme apresentado na Tabela 2, é possível observar que a estrutura cristalina do amido de batata corresponde a uma fase ortorrômbica⁷⁵, que é semelhante à mostrada por LIMA et al (2020)⁷⁶ para o amido de mandioca. Além disso, embora todas as amostras de amido tenham apresentado os mesmos picos, o pico de valor máximo (17,6°) ficou enfraquecido e alargado. Isso pode ser atribuído à reorientação das hélices duplas que formam a matriz cristalina e a ruptura cristalina⁷³. A alteração da cristalinidade promovida pelo DHT pode ser confirmada pelo parâmetro calculado de cristalinidade relativa

(RC). Observa-se que quanto maior o tempo de DHT, menor o valor de RC do amido modificado. Esse resultado está de acordo com as imagens de microscopia com luz polarizada, uma vez que o DHT promoveu a redução da birrefringência (redução do brilho). Portanto, o DHT atuou não somente nas lamelas amorfas, mas também no amido semicristalino, e foi mais significativo para o amido de batata tratado por 4 horas. O mesmo comportamento foi observado para os amidos de trigo, mandioca e batata cerosa tratados por aquecimento a seco^{51,52,69}.

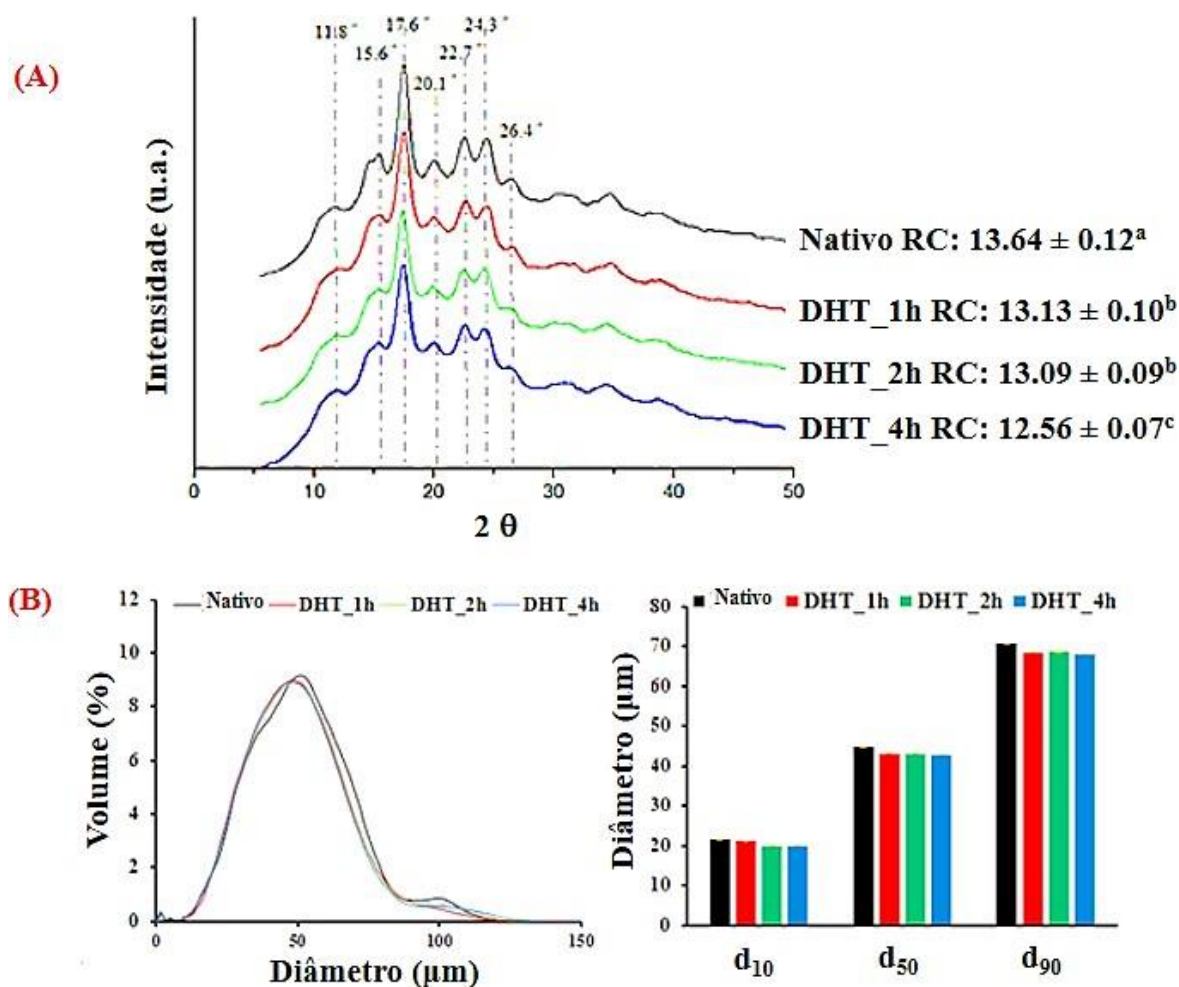


Figura 9. Difração de raios-X (DRX) do amido de batata nativo e modificado (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h, bem como a cristalinidade relativa associada (RC); (B) Distribuição granulométrica e diâmetros específicos (d_{10} , d_{50} e d_{90}) do amido de batata nativo e modificados. a, b, c: letras diferentes indicam diferenças significativas entre o amido nativo e o modificado (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h), como revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

Tabela 2. Ângulos de Bragg, índices de Miller e espaçamento interplanar (d) para os amidos nativos e modificados.

Ângulo de Bragg (2 θ)	Índice de Miller (<i>hkl</i>)	d (Å)
11.8	101	7.94
15.6	121	5.85
17.6	031	5.21
20.1	040	4.42
22.7	202	3.88
24.3	132	3.69
26.4	142	3.35

A Figura 9 também mostra a distribuição do tamanho das partículas e os diâmetros específicos das partículas de amidos de batata nativos e modificados. É possível observar na Figura 9(B) que todas as amostras apresentaram uma distribuição bimodal com uma população maior de grânulos em torno de 50 μm e uma população menor em 100 μm . Além disso, as amostras de DHT apresentaram o primeiro e o segundo pico ligeiramente mais baixos do que o amido nativo. Esse comportamento pode ser confirmado pelo gráfico de diâmetros específicos (d_{10} , d_{50} e d_{90}) que mostrou que o DHT reduziu ligeiramente o tamanho dos grânulos de batata (Figura 9B), o que pode ser atribuído à perda de umidade promovida pelo DHT, e esse comportamento foi maior com o tempo de DHT. Isso pode ser confirmado pelo teor de umidade de cada amostra de amido logo após o processamento: $11,07 \pm 0,20$ % (Nativo); $5,28 \pm 0,21$ % (DHT_1h); $5,26 \pm 0,01$ % (DHT_2h) e $3,53 \pm 0,49$ % (DHT_4h). A perda de umidade pode causar o encolhimento ou mesmo a quebra dos grânulos de amido quando comparados aos nativos, com destaque para o DHT_4h (veja as microscopias). Além disso, podemos observar que a redução do tamanho dos grânulos ocorreu para todas as populações de tamanho de grânulos (tamanho pequeno, médio e grande), e isso pode ser confirmado pela redução de todos os diâmetros específicos d_{10} , d_{50} e d_{90} .

CASTANHA, SANTOS, CUNHA, & AUGUSTO (2019)⁷⁷ observaram que o amido de batata modificado por tratamento com ozônio (método químico realizado em suspensão aquosa) promoveu aumento do tamanho dos grânulos. MANIGLIA, LIMA, DA MATTA JUNIOR, et al. (2020^a, 2020b)^{60,70} observaram que o DHT aumentou o tamanho dos grânulos dos amidos de mandioca e de trigo. Isso demonstra que cada fonte de amido pode apresentar um comportamento específico para o mesmo método de modificação e condições de processo, destacando a importância de estudar diferentes fontes.

2.2.2 Caracterização molecular

• 2.2.2.1 Grau de Oxidação

O grau de oxidação foi avaliado pelos grupos funcionais observados pela técnica FTIR, pelo pH e pelo teor de carbonila e carboxila (Figura 10). A oxidação pode afetar os grupos hidroxilas nas posições C₂, C₃ e C₆ das moléculas de amido, formando grupos de carbonila e carboxila⁶³. Com base nos resultados obtidos, a modificação do amido de batata pelo DHT promoveu a oxidação, uma vez que houve redução do pH e aumento do teor de carbonila; no entanto, a oxidação não promoveu a formação de grupos carboxílicos (Figura 10B). Diante disso, podemos observar que a oxidação promovida pelo DHT foi branda similar ao observado por MANIGLIA et al. (2020a)⁶⁰ para amido de mandioca modificado pelo mesmo método. Em relação ao espectro FTIR, todas as amostras apresentaram bandas típicas do espectro infravermelho para amidos^{78,79}. Todas as amostras apresentaram banda alargada em 3290 cm⁻¹ que pode ser atribuída ao alongamento O-H e uma banda a 2900 cm⁻¹, o que corresponde à deformação CH₂⁸⁰. Bandas a 1640 cm⁻¹ podem ser atribuídas a moléculas de água absorvidas na região amorfa e à vibração de alongamento da banda C=O⁸¹. Esta banda é mais evidente para DHT_4h, que pode ser associada com o aparecimento dos grupos carbonila. A banda em 1340 cm⁻¹ pode estar relacionada ao alongamento de OH devido a álcoois primários ou secundários⁸².

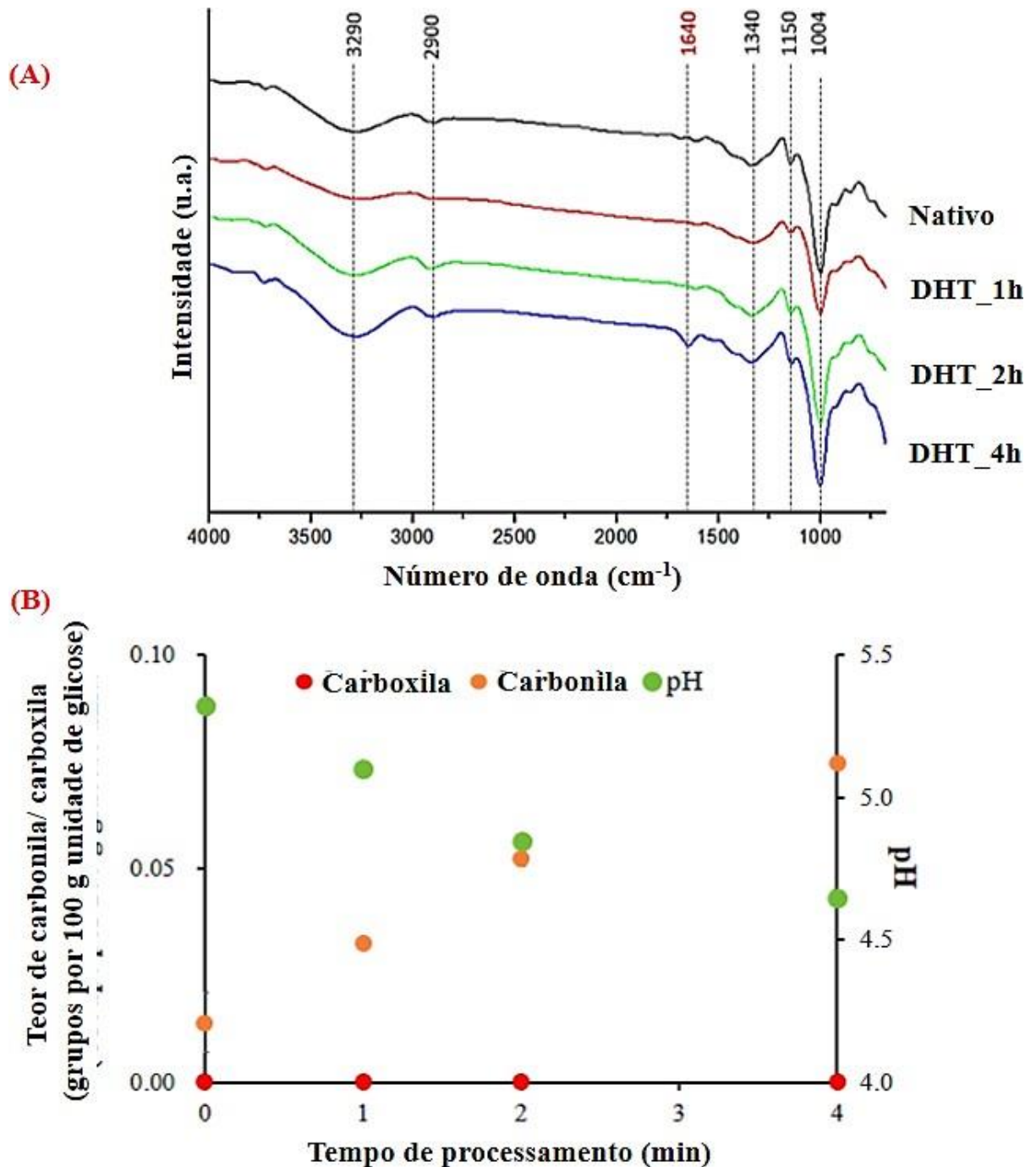


Figura 10. (A) Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e (B) Teor de carbonila e carboxila e variação do pH dos amidos de batata nativos e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h).

A região espectral de 1200 a 650 cm⁻¹ é considerada a região da impressão digital do amido, onde fornece informações sobre a estrutura polimérica e conformacional. A banda em 1150 cm⁻¹ pode ser atribuída ao estiramento assimétrico C-O e C-C das ligações glicosídicas⁸³. A intensa banda IR em 1004 cm⁻¹ pode ser atribuída principalmente às vibrações do modo esquelético de 9 ligações glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 4$ ⁸⁴. Além disso, a banda intensa em 1150 cm⁻¹ pode ser atribuída

principalmente à vibração de alongamento de CO e vibração de dobra de C-O-H⁸⁵ e pode ser associada a estruturas amorfas do amido. Por outro lado, a banda em 1004 cm⁻¹ pode ser associada à hélice cristalina relacionada às ligações de hidrogênio da unidade de anidroglicose⁸⁶. Em geral, podemos observar pequena diferença significativa entre a presença e intensidade das bandas do amido nativo em relação aos modificados, e vale destacar a presença de bandas associadas a oxidação nos amidos modificados (principalmente DHT_4h).

2.2.2.2 Teor de açúcar redutor, teor de amilose aparente e distribuição do tamanho molecular

A Tabela 3 apresenta o teor de açúcar redutor e o teor de amilose aparente e a Figura 11 apresenta a distribuição do tamanho molecular dos amidos de batata nativo e modificados (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h).

Tabela 3. Teor de açúcar redutor e amilose aparente do amido de batata nativo e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h).

Amostras	Açúcar Redutor (g glicose/L)	Teor de amilose aparente (g/100g amido, b.s.)
Nativo	0.105 ± 0.015 ^c	22.57 ± 0.46 ^c
DHT_1h	0.201 ± 0.017 ^b	25.34 ± 0.36 ^b
DHT_2h	0.198 ± 0.008 ^b	26.87 ± 1.12 ^a
DHT_4h	0.518 ± 0.021 ^a	26.13 ± 1.20 ^a

a, b, c: letras diferentes indicam diferenças significativas entre o amido nativo e o modificado (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h), como revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

Nota-se pela Tabela 3 que à medida que o tempo de aquecimento a seco aumentou, observou-se aumento no teor de açúcar redutor e no teor de amilose aparente. Esse comportamento pode estar associado à despolimerização do amido até seu monômero que no caso é a glicose (açúcar redutor). DHT_4h tem o maior teor de glicose, indicando que este amido sofreu a maior despolimerização entre todas as amostras. Esse resultado pode ser associado ao aparecimento de uma coloração marrom à medida que o tempo de tratamento com DHT aumentou, sendo mais visível para DHT_4h. Como já discutido, essa cor pode ser atribuída ao processo de caramelização, que ocorre com açúcares redutores, como a glicose, com o aquecimento (neste caso DHT), e na ausência de compostos nitrogenados.

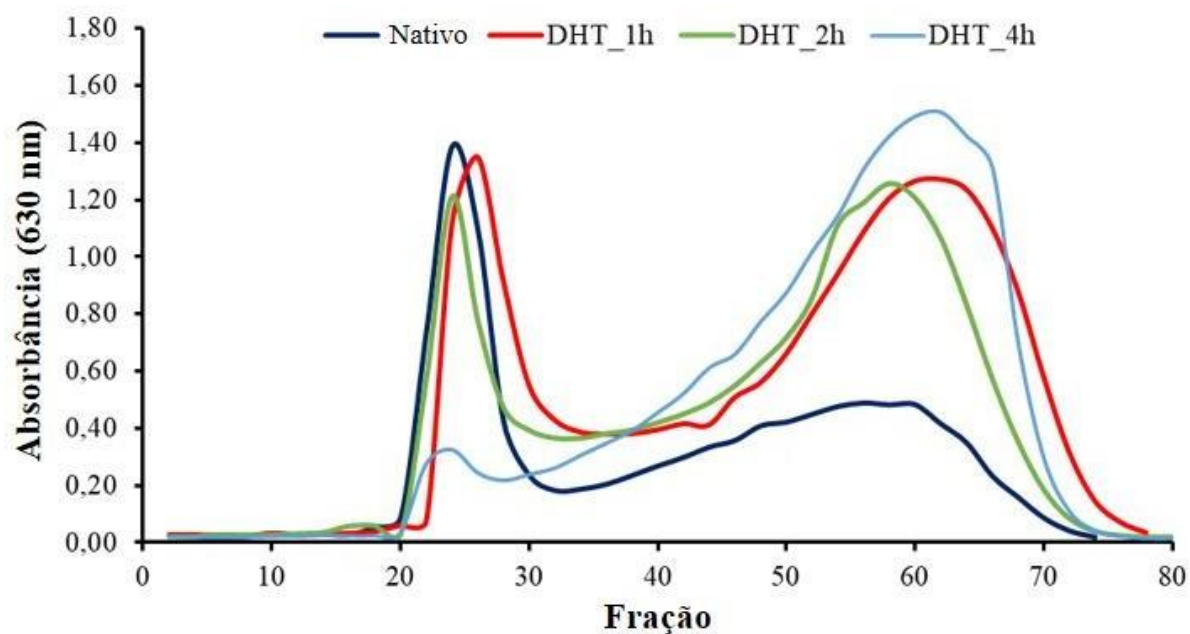


Figura 11. Distribuição do tamanho molecular dos amidos de batata nativo e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h).

Em relação ao teor de amilose aparente, os amidos modificados (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h) apresentaram maior valor quando comparados ao amido nativo, o que também indica a despolimerização do amido com DHT. De fato, a distribuição de tamanho molecular confirma essa despolimerização (Figura 11). Para determinar a distribuição do tamanho molecular, foi realizada a análise GPC, que é uma técnica cromatográfica de exclusão de tamanho. Nesta técnica, moléculas de amido são colocadas em uma coluna cheia de um gel com uma porosidade específica: moléculas maiores eluem primeiro, enquanto moléculas menores são retidas nos poros do gel e eluem mais tardiamente⁸⁷. Dessa forma, pode-se associar que o primeiro pico do gráfico (primeiras frações) se refere às moléculas maiores, que podem ser relacionadas às moléculas de amilopectina, enquanto o segundo pico refere-se às moléculas menores, que podem ser relacionadas às moléculas de amilose⁷⁶. Nota-se na Figura 11 que à medida que o tempo de DHT aumentou, os amidos modificados apresentaram redução do primeiro pico, indicando que a fração de moléculas de maior tamanho foi significativamente reduzida. Por outro lado, o segundo pico apresentou significativo aumento, e ambos os picos, primeiro e segundo, deslocaram-se para a direita (tempos de eluição mais longos). Isso indica que o DHT promoveu a formação de moléculas de menor tamanho (moléculas mantidas por mais tempo na coluna cromatográfica) devido à despolimerização promovida pela clivagem das ligações glicosídicas. Isso indica que além oxidação, o DHT promoveu enfraquecimento das cadeias poliméricas resultando em despolimerização.

Esses resultados são consistentes com os observados por LEI et al. (2020)⁸⁸ envolvendo amido de milho e MANIGLIA et al. (2020b)⁷⁰ para amido de trigo tratado por DHT. Os autores observaram que o aumento da temperatura do DHT reduziu drasticamente as cadeias de tamanho grande, enquanto mais cadeias curtas foram formadas.

2.2.3 Propriedades de pasta, propriedades reológicas e de textura dos hidrogéis de amido

2.2.3.1 Propriedades de pasta e firmeza dos hidrogéis

A Figura 12(A) e a Tabela 4 apresentam, respectivamente, as curvas RVA e seus parâmetros associados para os amidos de batata nativo e modificados (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h).

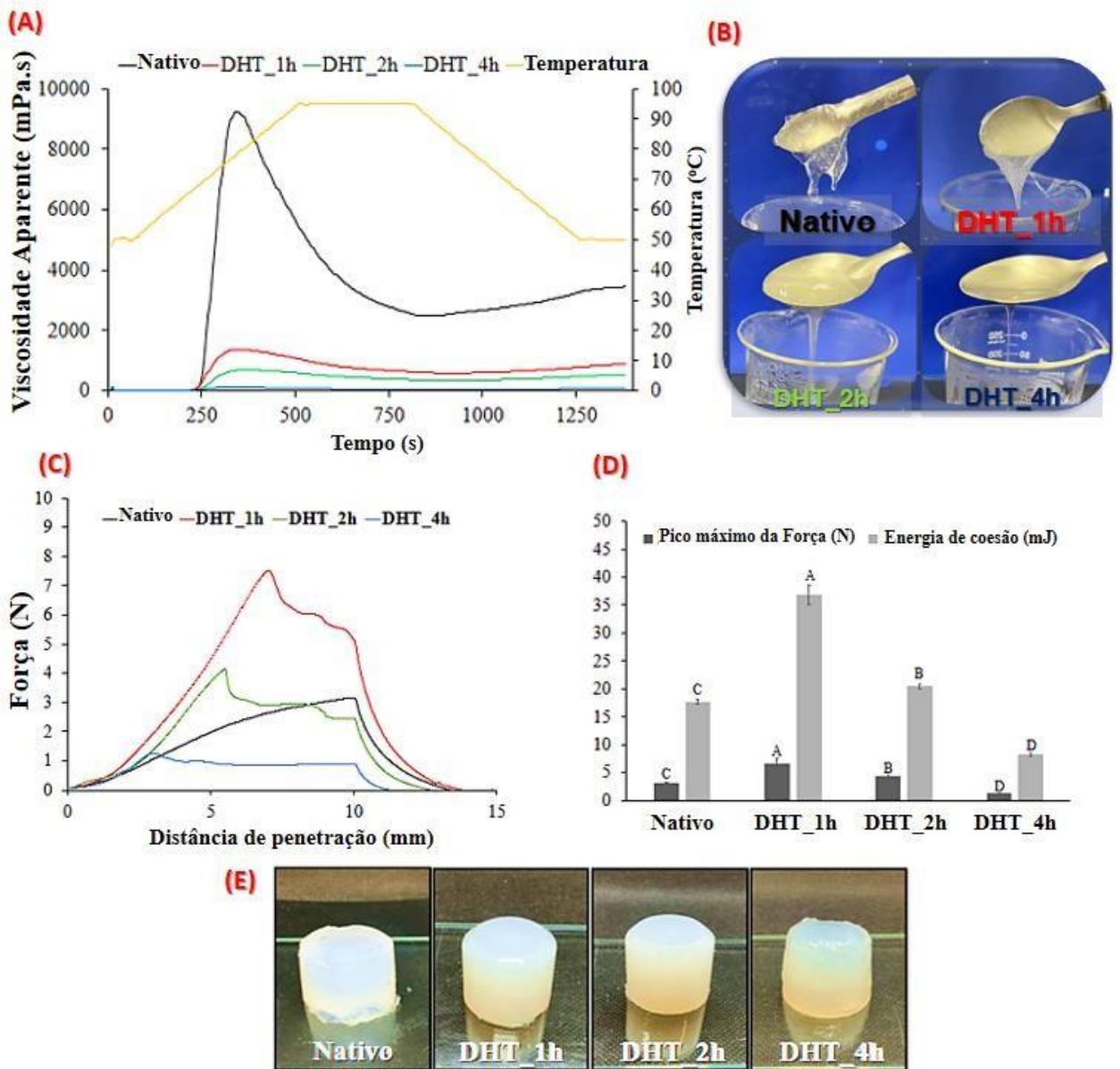


Figura 12. (A) Curvas de RVA, (B) Imagem das pastas após aquecimento (gelatinização), (C) Gráfico da força x profundidade de penetração, (D) máxima força de pico e energia de coesão dos amidos nativos e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h), (E) Imagens dos géis após 24 h na geladeira. A, B, C, D: letras diferentes indicam diferenças significativas entre os amidos nativos e os modificados, como revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

Tabela 4. Parâmetros obtidos a partir do RVA dos amidos de batata nativo e modificados (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h).

Amostras	PAV (mPa.s)	RBD (%)	RSB (%)	PT (°C)
Nativo	9245.7 ± 76.8 ^A	38.3 ± 0.76 ^C	73.1 ± 0.26 ^A	67.50 ± 0.04 ^C
DHT_1h	1374.3 ± 2.4 ^B	48.6 ± 0.10 ^B	57.0 ± 0.48 ^C	67.55 ± 0.01 ^C
DHT_2h	702.0 ± 2.9 ^C	52.6 ± 1.30 ^A	50.0 ± 0.58 ^D	68.85 ± 0.33 ^B
DHT_4h	133.7 ± 1.2 ^D	50.3 ± 1.42 ^A	58.9 ± 0.30 ^B	69.55 ± 0.18 ^A

A, B, C: letras diferentes indicam diferenças significativas entre os amidos nativos e os modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h), como revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

O PAV (*Peak apparent viscosity*) representa a viscosidade aparente máxima da pasta alcançada na etapa de aquecimento e indica o ponto exato entre o inchaço máximo e a ruptura dos grânulos⁸⁹. A Figura 12(A) e a Tabela 4 demonstram que, à medida que o tempo de DHT aumenta, o PAV diminuiu drasticamente. Tal diminuição, pode estar associada ao enfraquecimento da estrutura dos grânulos de amido e à despolimerização molecular com o aumento do tempo de DHT.

Esse comportamento também foi observado por CASTANHA et al. (2019)⁷⁷ para amido de batata modificado pelo tratamento de ozônio, bem como mandioca e amidos de trigo tratados por DHT (MANIGLIA et al., 2020b, 2020a)^{60,70}. Os parâmetros relativos RBD (*Relative breakdown*) e RSB (*Relative setback*) foram calculados de acordo com a metodologia proposta por CASTANHA; MATTA JUNIOR; AUGUSTO (2017)⁹⁰. RBD é um parâmetro relacionado à facilidade de quebrar os grânulos. Além disso, o RSB é um parâmetro que indica a tendência à retrogradação, que consiste na reassociação ou reordenação de moléculas de amido⁹¹. À medida que o tempo de DHT aumentou, houve valores mais elevados de RBD, indicando que os amidos modificados apresentaram maior facilidade de separação. Os amidos modificados pelo DHT apresentaram menor valor de RSB em comparação com o amido nativo, indicando uma tendência menor à retrogradação do que ao amido de batata nativo – uma consequência da nova distribuição molecular e interação química promovidas pela modificação do amido. A temperatura da pasta (PT) corresponde à temperatura em que os grânulos de amido começam a inchar devido à absorção de água⁹². O aumento do tempo de DHT resultou em um aumento do valor da PT, que pode estar relacionado à presença de uma alta fração de moléculas pequenas, que requerem mais energia para gelatinizar do que moléculas grandes, semelhante ao observado por LIMA et al. (2021)⁷⁶.

A Figura 12 apresenta o perfil de firmeza (B), aspecto visual (C), a força máxima e energia de coesão (D) dos hidrogéis a base de amido de batata nativo e modificados por DHT. A firmeza está associada à força máxima suportada pelo gel até sua ruptura a uma determinada distância, e a energia de coesão foi obtida pela área abaixo do gráfico força x profundidade de penetração (fixada em 10 mm) (Figura 12B). A Figura 12(D) nos indica que a amostra DHT_1h apresentou maior firmeza do gel e maior energia de coesão em relação às outras amostras. Em contrapartida, os géis DHT_4h apresentaram os menores valores para esses mesmos parâmetros. A energia de coesão refere-se à energia necessária para romper a estrutura do gel, de modo que quanto maior o seu valor, nos indica que houve maior resistência de quebra da estrutura deste gel. A maior energia de coesão dos hidrogéis pode estar relacionada à melhor reassociação das moléculas de amido, com os novos grupos funcionais presentes e pelas interações promovidas pela nova distribuição de tamanho das moléculas^{76,77}. Dessa forma, os resultados indicam que dependendo do intervalo empregado de DHT, houve a produção de amidos com maior (DHT_1h) ou menor (DHT_2h e DHT_4h) capacidade de reassociação do que o amido de batata nativo (aspecto visível na Figura 12(C)).

2.2.3.2 Propriedades reológicas dos hidrogéis de amido

As propriedades reológicas foram obtidas através de um reômetro rotacional e apresentam informações importantes sobre a capacidade de uma tinta (hidrogel) ser usada para impressão 3D. Buscam-se tintas que apresentam comportamento de afinamento ao cisalhamento sendo facilmente extrudadas a uma alta taxa de cisalhamento durante a impressão 3D e que potencialmente mantenham a sua estrutura após a deposição⁹³. A análise das propriedades reológicas para amidos nativos e modificados pelo DHT estão apresentadas nas Figuras 13 e 14. A Figura 13 indica que enquanto a taxa de cisalhamento aumenta, a viscosidade aparente diminui para todas as amostras, confirmando o comportamento pseudoplástico dos hidrogéis de amido, característico de um fluido viscoelástico não newtoniano⁹⁴. Essa redução na viscosidade do gel, visando uma boa qualidade de impressão 3D, é bastante favorável já que o gel menos viscoso tem maior fluidez, o que gera linhas mais contínuas.

Além disso, nota-se que a viscosidade aparente inicial é maior para as amostras DHT_1h e menor para as amostras de DHT_4h. Na Tabela 5 estão apresentados os parâmetros n (índice de potência) e K (índice de consistência), que se referem ao modelo matemático *Power-Law* utilizado para estudar o tipo de comportamento do fluido em questão (hidrogel de amido de batata). Pode-se ver que quase todos os coeficientes de correlação (R^2) estavam próximos de 0,99, mostrando uma forte dependência da lei de potência da viscosidade na taxa de cisalhamento. Além disso,

todos os valores n foram muito inferiores a 1, indicando que as amostras de amido se comportaram fortemente como um fluido não newtoniano e mostraram um comportamento de afinamento ao cisalhamento. O módulo elástico ou de armazenamento (G') é a medida elástica do material, ou seja, a capacidade que o material tem para armazenar energia. O módulo viscoso ou de perda (G'') determina a capacidade do fluido de dissipar energia na forma de calor⁶³. A Figura 14 nos apresenta que G' é maior que G'' , o que denota que o perfil sólido/elástico domina a estrutura de perfil gel. Hidrogéis com esse comportamento têm bom potencial para serem usados como tintas para impressão 3D, pois podem recuperar melhor sua forma quando depositados na superfície⁹⁵. A Tabela 5 também apresenta o parâmetro $\tan\delta^*$ (G''/G') dos hidrogéis de amido. Um alto valor $\tan\delta^*$ indica que o material apresenta um comportamento mais fluido, e um baixo valor indica um comportamento mais sólido do hidrogel, apresentando baixa fluidez⁹⁶. Em geral, todos os valores de $\tan\delta^*$ dos hidrogéis de amido foram inferiores a 1, sugerindo o comportamento do tipo sólido/elástico dominante nas tintas. No entanto, nota-se que a amostra com o menor valor $\tan\delta^*$ foi a DHT_1h seguida por amido nativo, DHT_2h e DHT_4h. Portanto, DHT_1h dentre as demais amostras apresentou um comportamento mais do tipo sólido, enquanto DHT_4h tem um comportamento mais fluido. Esses resultados sugerem que a modificação estrutural dos grânulos de amido promovidos pela DHT alterou as propriedades viscoelásticas das amostras de amido de batata de diferentes maneiras, dependendo o tempo de DHT aplicado.

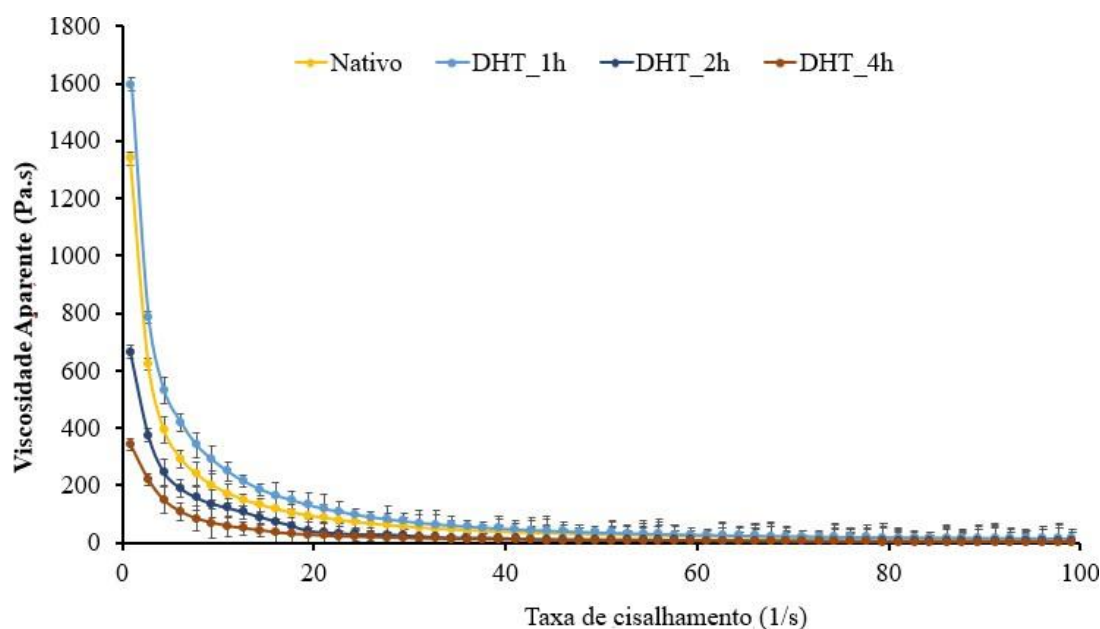


Figura 13. Propriedades reológicas do amido de batata nativo e modificado com DHT: variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento.

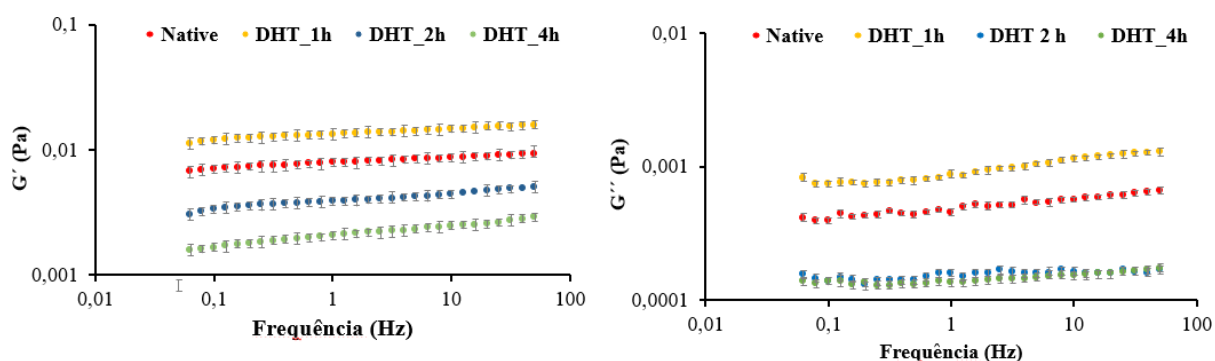


Figura 14. Propriedades reológicas do amido de batata nativo e modificado com DHT: Módulo de armazenamento (G') em função da frequência angular e Módulo de perda (G'') em função da frequência angular.

Tabela 5. Parâmetros da lei de potência e $\tan \delta$ (G''/G' , determinado pelo meio de G'' e G' no *plateau*) dos hidrogéis de amido de batata dos amidos de batata nativos e modificados (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h).

<i>Hidrogéis</i>	$\eta = K\gamma^{n-1}$			$\tan \delta$ (G''/G' , in the plateau)
	K	n	R²	
Nativo	786.16 ± 8.90^b	0.20 ± 0.01^b	0.99	0.0632 ± 0.0007^c
DHT_1h	1597.03 ± 5.67^a	0.33 ± 0.00^a	0.98	0.0382 ± 0.0005^d
DHT_2h	665.49 ± 4.55^c	0.23 ± 0.01^b	0.99	0.0666 ± 0.0004^b
DHT_4h	343.80 ± 9.08^d	0.20 ± 0.00^b	0.98	0.0701 ± 0.0013^a

a, b, c: letras diferentes indicam diferenças significativas entre os amidos nativo e modificado (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h), conforme revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

2.2.4 Capacidade de impressão 3D

A Figura 15 mostra imagens de geometrias impressas com base em diferentes tintas hidrogéis nativas e modificadas, a fim de avaliar seu potencial para serem utilizadas como tintas para impressão 3D. A Tabela 6 apresenta a reprodutibilidade (peso, área e número de orifícios das amostras impressas) e a fidelidade geométrica (GF) em relação à área ($GF_{\text{área}}$) e ao número de orifícios ($GF_{\text{orifícios}}$) dos hidrogéis de amido de batata nativo e modificado .

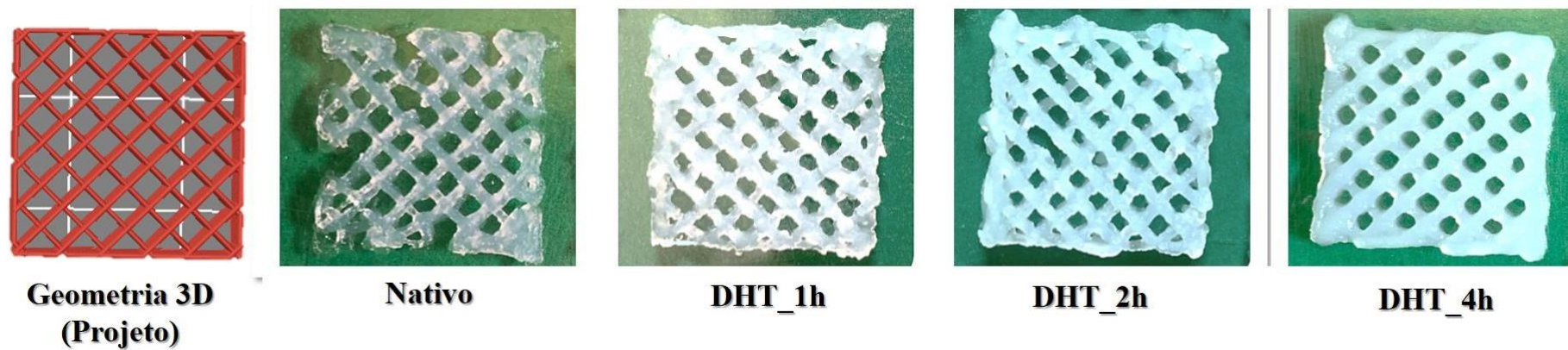


Figura 15. Imagens da geometria 3D do projeto e dos paralelepípedos impressos à base de hidrogéis de amido de batata nativo e modificados (DHT_1h, DHT_2h, e DHT_4h).

Tabela 6. Reprodutibilidade (massa, área e número de orifícios das amostras impressas) e fidelidade geométrica (GF) em relação à área ($FG_{\text{área}}$) e número de orifícios ($FG_{\text{orifícios}}$) dos hidrogéis de amido impressos em forma de paralelepípedo. Os hidrogéis são baseados em amidos controle e modificados por aquecimento a seco (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h) (média \pm desvio padrão)

Amostras	Massa (g)	Área material impresso (cm ²)	Número de orifícios	Fidelidade de geometria (FG)	
				(%)	
				$FG_{\text{área}}$	$FG_{\text{orifícios}}$
Nativo	0.5445 \pm 0.0333 ^C	3.12 \pm 0.54 ^C	24 \pm 12 ^C	78 \pm 12 ^C	27 \pm 15 ^D
DHT_1h	0.5904 \pm 0.0114 ^A	3.83 \pm 0.21 ^A	44 \pm 2 ^A	96 \pm 4 ^A	50 \pm 5 ^A
DHT_2h	0.5867 \pm 0.0120 ^A	3.35 \pm 0.36 ^B	42 \pm 2 ^A	90 \pm 4 ^A	48 \pm 4 ^A
DHT_4h	0.5609 \pm 0.0131 ^B	3.52 \pm 0.24 ^B	31 \pm 4 ^B	89 \pm 6 ^A	45 \pm 3 ^A

A, B, C: letras diferentes indicam diferenças significativas entre os amidos nativo e modificado (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h), conforme revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Projeto impresso em 3D paralelepípedo mostra 4 cm² de superfície e 88 orifícios em sua estrutura.

Podemos observar na Figura 15 que os hidrogéis a base de amidos DHT_1h e DHT_2h apresentaram geometrias impressas com maior definição, com destaque para deposição das linhas de forma contínua, com maior definição da geometria dos orifícios. As amostras impressas com amido nativo tiveram a geometria impressa falha, já as amostras impressas com DHT_4h, apesar de terem toda a sua geometria impressa, formaram orifícios sem a definição dos quadrados, pois a reologia desse hidrogel resultou em orifícios redondos diferente da definida no projeto. Nota-se que a reologia dos hidrogéis de DHT_1h e DHT_2h foi favorável para uso em impressão 3D, no entanto, DHT_4h, apesar das linhas impressas serem mais contínuas e lisas, elas não se sustentam, resultando em orifícios sem a definição do projeto. Dessa forma, pode-se dizer que o tempo de DHT no amido de batata não foi linear em relação ao potencial de aplicação dessa fonte de amido para impressão 3D, sendo 1 h já suficiente para gerar amidos funcionalizados para essa aplicação. Essas características são muito importantes para aplicações futuras, principalmente na área de biomateriais.

Com relação à reprodutibilidade (Tabela 6), observa-se um menor desvio padrão, em termos de peso e área, para os amidos modificados em relação ao nativo. Além disso, a $FG_{\text{área}}$ e $FG_{\text{orifícios}}$ dos impressos é maior para os hidrogéis DHT_1h e DHT_2h, sendo ainda mais evidente o potencial desses amidos para essa aplicação. Portanto, o tempo de DHT de 1 e 2 h melhorou a imprimibilidade dos hidrogéis de fécula de batata, aumentando a fidelidade e reprodutibilidade com o projeto 3D.

Trabalhos anteriores mostraram que, embora o amido seja um ingrediente interessante para aplicações de impressão 3D (biotinta, biomateriais, alimentos); algumas estratégias são necessárias para permitir um bom desempenho. Uma estratégia é combinar o amido com outras macromoléculas, como frutas ⁹⁷, vegetais ⁹⁸ proteínas⁹⁹ ou gelatina ¹⁰⁰. No entanto, esses biopolímeros são biomacromoléculas nobres e caras, cujo uso apenas para melhorar as propriedades gelificantes do amido pode ser evitado. Portanto, a modificação do amido pode ser uma estratégia interessante para obter melhor desempenho com fontes comerciais de amido para aplicações de impressão 3D. Por exemplo, tratamentos de modificação de amido como ozônio, DHT e campo elétrico pulsado resultaram em hidrogéis de amido de mandioca mais fortes quando comparados com o nativo, com melhor imprimibilidade ^{60,75}. No entanto, a fécula de mandioca é uma fonte conhecida por produzir géis relativamente fracos em comparação com outras fontes, sendo a fécula de batata o oposto ¹⁰¹.

No presente trabalho, observamos que o DHT pode produzir hidrogéis de amido de batata mais fortes ou mais fracos, dependendo das condições de processamento, e também apresentando melhor imprimibilidade. Portanto, observamos que os hidrogéis devem apresentar desempenho reológico adequado para promover uma extrusão suave através do bocal e uma camada impressa estável para suportar as seguintes sem deformação ou colapso. Dessa forma, o amido de batata por DHT em 1 e 2 h foram as condições mais favoráveis visando a aplicação para processamento via impressão 3D.

No geral, as tintas desenvolvidas neste trabalho se apresentaram dentro da faixa de perfil de viscosidade que permitem uma boa imprimibilidade, sendo não muito líquidas e nem muito espessas dificultando serem extrudadas. Além disso, ao serem depositadas na superfície apresentaram a capacidade de não se espalharem e manterem estabilidade para a deposição da próxima linha.

2.2.5 Propriedades mecânicas

A Tabela 7 apresenta as propriedades mecânicas dos *scaffolds* liofilizados com base nos hidrogéis de amido. Os *scaffolds* não apresentaram diferença significativa em relação à espessura (~ 1,5 mm). Os *scaffolds* à base de hidrogéis de amido modificado apresentaram maior resistência à ruptura (60 – 80%) e menor flexibilidade (35 – 65%) do que os hidrogéis de amido nativo - vale ressaltar a relevância deste resultado. O tempo de aquecimento a seco não foi proporcional às propriedades mecânicas, DHT_1h resultou em *scaffolds* mais fortes e menos flexíveis. Como mencionado anteriormente, o processo de aquecimento a seco leva à despolimerização e oxidação das moléculas de amido, resultando na formação de grupos carbonila. ZHANG, WANG, ZHAO E WANG (2021)¹⁰² explicaram que esses grupos carbonila estão disponíveis para formar ligações de hidrogênio robustas com os grupos hidroxila do amido, levando ao desenvolvimento de materiais mais rígidos com alongamento reduzido. Além disso, a despolimerização aumenta a tendência de reassociação da molécula, potencialmente promovendo interações mais fortes¹⁰¹. Conseqüentemente, a matriz polimérica recém-formada exibe diferentes interações moleculares entre o amido e a água, resultando na produção de materiais de *scaffolds* mais fortes. Assim como nos géis, as interações formadas nos *scaffolds* pela presença dos biopolímeros foram propiciadas pela distribuição de tamanho e teor de carbonila presentes no amido DHT_1h, o que nos mostra que existe uma faixa ótima para a formação da matriz com maior interação entre os polímeros. Vale ressaltar também que os hidrogéis DHT_2h e DHT_4h apresentaram firmeza menor que o nativo e DHT_1h, mas quando esses materiais estão em condições secas, a interação entre os polímeros foi mais favorável, resultando em *scaffolds* mais fortes que o nativo.

Conseqüentemente, matrizes poliméricas distintas podem ser alcançadas, e a organização da rede de biopolímeros e a subsequente interação e permeação da água também podem ser influenciadas por essas diferenças.

Os *scaffolds* de amido produzidos neste trabalho apresentaram maior resistência à ruptura (~ 10x) e flexibilidade semelhante aos *scaffolds* de colágeno-carragenana moldados produzidos no trabalho de NOGUEIRA et al. (2023)¹⁰³.

Tabela 7. Propriedades mecânicas dos *scaffolds* baseados em hidrogéis de amido de batata nativo e modificado (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h). (média ± desvio padrão).

Amostras	F (N)	D (mm)	SP (%)
Nativo	50.35 ± 5.76 ^c	7.10 ± 1.06 ^a	54 ± 4 ^a
DHT_1h	90.63 ± 1.83 ^a	2.89 ± 0.55 ^c	39 ± 5 ^b
DHT_2h	83.20 ± 3.01 ^b	4.55 ± 0.88 ^b	43 ± 6 ^b
DHT_4h	80.00 ± 3.00 ^b	4.45 ± 0.62 ^b	37 ± 4 ^b

F: força de punção (N), D: deslocamento da sonda (mm) e SP: poder de dilatação (%). A, B, C: letras diferentes indicam diferenças significativas entre os amidos nativo e modificado (DHT_1h, DHT_2h e DHT_4h), conforme revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

2.2.6 Biodegradabilidade e intumescimento

O teste de biodegradabilidade foi feito com o objetivo de avaliar o comportamento dos materiais na presença do meio de cultura de células α -MEM como mostrado na Figura 16.

Em aplicações regenerativas, é essencial que os *scaffolds* à base de polímeros exibam biodegradabilidade, permitindo a substituição ou remodelação gradual do *scaffold* com tecido natural, sem deixar para trás quaisquer materiais sintéticos sólidos no corpo¹⁰⁴. Analisando a Figura 16(A), percebe-se que os materiais que ficaram no meio de cultura por 14 dias tiveram maior porcentagem de biodegradabilidade que os materiais que ficaram por 7 dias. Além disso

nota-se que tanto para 7 quanto para 14 dias os amidos de batata modificados (1, 2 e 4 h) possuem menor biodegradabilidade do que o amido nativo, com destaque para o DHT_1h, que possui a menor porcentagem de biodegradabilidade dentre todas as amostras e para os dois tempos de exposição ao meio de cultura (7 e 14 dias). Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de DHT_1h produzir um hidrogel mais forte, o que o torna mais resistente a biodegradação provocada pelo meio de cultura. As imagens dos materiais com e sem o meio de cultura estão representadas na Figura 16(B). Em relação a biodegradabilidade o material deve apresentar um tempo adequado de degradação²¹. Este tempo precisa ser suficiente para que as células osteogênicas consigam realizar o processo de mineralização óssea, em seguida é interessante que este material se degrade, servindo apenas como indutor da mineralização e não como substituinte definitivo como ocorre em materiais à base de ligas metálicas como o titânio, por exemplo¹⁰⁵. Analisando as amostras nota-se que todas possuem aumento significativo da biodegradabilidade com o passar dos dias e observa-se que em 14 dias há perda de massa em torno de 60 a 80%, portanto resta pouco do material capaz de fazer com que as células osteogênicas promovam o processo de mineralização. A literatura sugere que os biomateriais devem permanecer fisicamente e mecanicamente intactos por pelo menos 4 a 6 semanas para que a terapia regenerativa seja bem-sucedida¹⁰⁶. Taxas de degradação inadequadas podem dificultar significativamente o potencial regenerativo dos biomateriais¹⁰⁷. Nesse sentido, os *scaffolds* ósseos produzidos neste estudo precisam ser melhorados em termos de biodegradabilidade para serem aplicados como potenciais materiais para esse fim. Técnicas de *crosslinking* e também outros métodos de modificação de amido podem ser investigados como alternativas para melhorar essa propriedade.

Em relação ao intumescimento (Figura 16B), todos os *scaffolds* de amido produzidos neste trabalho apresentaram intumescimento quando adicionados ao meio α -MEM, e esses biomateriais atingiram sua capacidade máxima de intumescimento no momento em que foram adicionados ao meio α -MEM e estabilizaram, permanecendo relativamente constante até 72 h. Os *Scaffolds* baseados em hidrogéis de amido nativo exibem capacidades de absorção de água ligeiramente maiores em comparação com os hidrogéis de amido modificados. Essa diferença pode ser atribuída aos sítios hidrofílicos presentes na arquitetura dos *scaffolds*, o que contribui para sua capacidade de retenção de água. O inchamento de *scaffolds* em um meio aquoso pode às vezes ser desejável em aplicações biomédicas porque o tamanho dos poros inicialmente aumentaria e acomodaria as células, embora o inchamento do *scaffold* levasse a propriedades mecânicas piores¹⁰⁸. No entanto, embora o inchaço dos *scaffolds* promova a adesão celular, ele pode diminuir suas propriedades mecânicas¹⁰⁸.

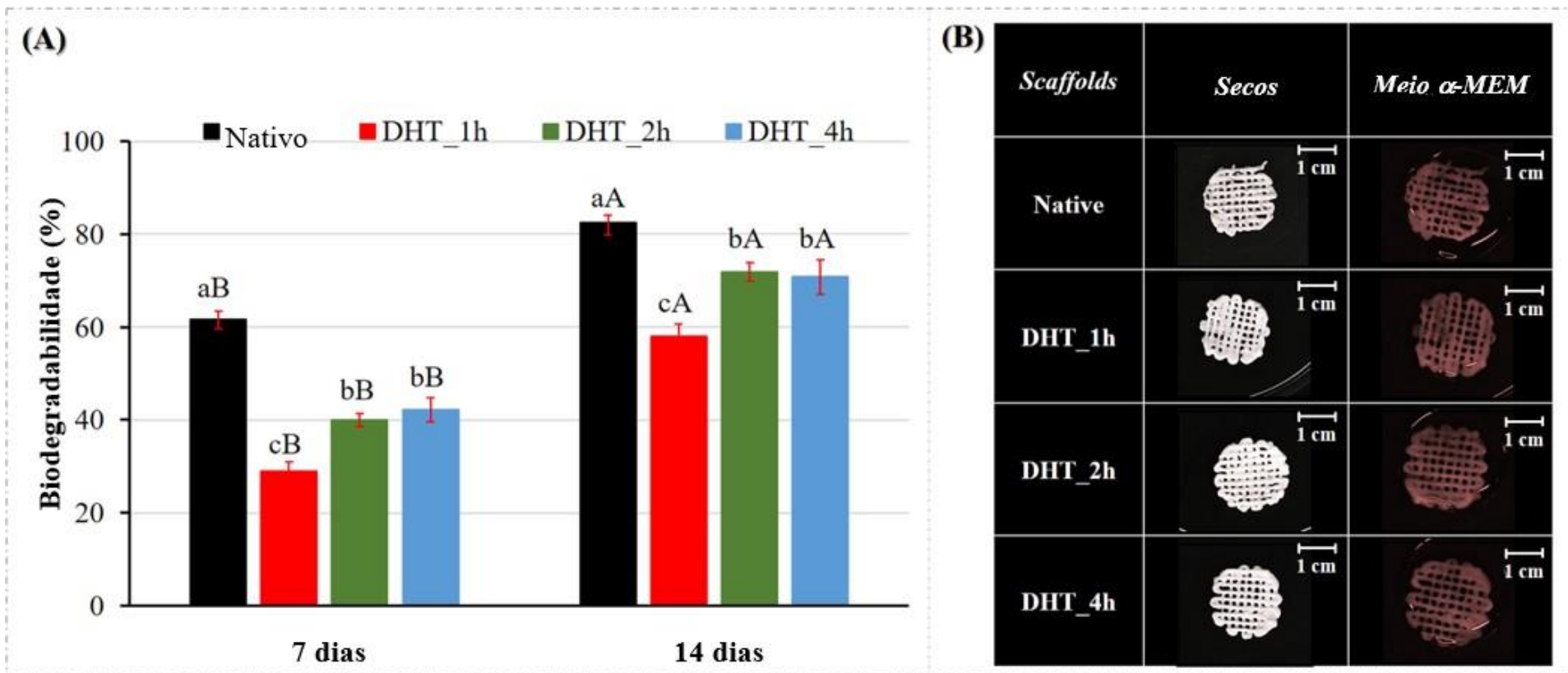


Figura 16. A) Biodegradabilidade dos *scaffolds* a base de amido de batata nativo e modificados por DHT; B). *Scaffolds* liofilizados sem e com meio de cultura α -MEM (0 até 72 h o material se manteve com o mesmo comportamento de intumescimento).

2.3 Conclusão do Capítulo 2

A tecnologia “limpa” e física aquecimento a seco (DHT) mostrou-se eficaz em promover alterações na estrutura do amido de batata, promovendo leve oxidação (formação de carbonila) e despolimerização parcial. Essas mudanças são refletidas em modificações nas propriedades de pasta, reologia e firmeza do hidrogel. Os amidos modificados foram capazes de formar hidrogéis mais fortes (DHT_1h) ou mais fracos (DHT_2h e DHT_4h), quando comparados com a fonte nativa, dependendo das condições do processo. Amidos modificados por DHT tiveram melhora de imprimibilidade (amostras impressas em 3D com linhas mais contínuas, geometria bem definida dos materiais impressos) quando comparada ao amido nativo, com destaque para 1 e 2 h que apresentaram melhor resolução e reprodutibilidade em termos de peso, área e número de orifícios dos materiais impressos, aumentando a fidelidade com a geometria 3D projeto. Além disso, a modificação do amido sugerida neste trabalho resultou em *scaffolds* impressos com propriedades superiores quando comparados aos baseados em hidrogéis nativos. Os *scaffolds* baseados em amidos modificados apresentaram propriedades mecânicas superiores, menor taxa de biodegradabilidade e poder de inchamento. Podemos concluir que DHT_1h foi a melhor opção para ser usado como ingrediente gelificante para produzir *scaffolds* impressos em 3D. Portanto, pode-se dizer que a fécula de batata modificada por DHT superou as deficiências encontradas na fécula de batata nativa, tornando-se um ingrediente promissor para ser utilizado como “tintas” para impressão de biomateriais funcionais. As informações obtidas neste trabalho também podem ser úteis para expandir futuras aplicações para fécula de batata, pensando principalmente em potenciais biomateriais produzidos via manufatura aditiva.

CAPÍTULO 3: Produção e caracterização de *scaffolds* ósseos a base de amido de batata modificado

Este capítulo aborda a síntese e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita (HAp), otimização dos parâmetros de impressão 3D e de pós processamento, avaliação da imprimibilidade dos hidrogéis de amido nativo e modificado por aquecimento a seco (DHT) com a adição de HAp, avaliação das propriedades físico-químicas dos *scaffolds* impressos: intumescimento, biodegradabilidade e morfologia. Partindo dos resultados obtidos no Capítulo 2, essa etapa foi realizada com o amido nativo e o modificado por DHT por 1h por ter apresentado melhor potencial para essa aplicação.

3.1. Material e métodos

3.1.1 Material

A água deionizada Milli-Q® (tensão superficial de 72,8 mN.m⁻¹ e resistividade de 18,2 MΩ.cm) foi usada para preparar as soluções. Cloreto de cálcio hexahidratado (CaCl₂.6H₂O, Synth), hidróxido de amônio (NH₄OH, Synth) e ácido fosfórico (H₃PO₄). O amido de batata foi adquirido da Cargill Agrícola (Brasil).

3.1.2 Produção e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita (HAp)

Para a produção dos *scaffolds* ósseos foram produzidas nanopartículas de HAp para contribuir nas formulações dos hidrogéis de forma a contribuírem tanto nas suas propriedades mecânicas quanto ativas ¹⁰⁹.

As nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) foram sintetizadas seguindo uma metodologia adaptada de MOTA et al¹¹⁰. Uma solução aquosa de Ca²⁺ (0,10 mol.L⁻¹) foi preparada e misturada com uma solução de H₃PO₄ (0,06 mol.L⁻¹), totalizando uma relação Ca/P igual a 1,67, conforme encontrado na HAp biológica. O pH da solução foi ajustado para aproximadamente 9,0 usando uma solução de NH₄OH 1,0 mol.L⁻¹ sob agitação vigorosa usando um ultraturrax a 22.000 rpm por 10 minutos para favorecer a precipitação das nanopartículas. Em seguida, a solução foi mantida sob agitação por 1 hora usando um agitador magnético. Em seguida, a solução foi filtrada e o precipitado foi lavado com água para remover os sais solúveis presentes. Por fim, as amostras foram levadas a uma estufa (60 °C) até secarem completamente.

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de HAp e o potencial Zeta foram medidos pela técnica do espalhamento dinâmico de luz (NanoZS, Malvern-UK) de amostras dispersas em

água deionizada. As características estruturais das partículas foram estudadas analisando os padrões de difração de raios-X (difratômetro Bruker-AXS D5005 usando radiação Cu-K α a 40 kV e 30 mA) e espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Perkin-Elmer, Shelton, EUA) equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR).

3.1.3 Produção e caracterização dos hidrogéis de amido de batata com adição de HAp

3.1.3.1 Produção dos hidrogéis

Primeiramente, a HAp foi dispersa em água deionizada (2 g/100 g de amido) usando ultraturrax por 10 minutos e, em seguida, 24 horas de mistura em um agitador magnético. Em seguida, o amido de batata (10 g/100 g suspensão, base seca) nativo e modificado por aquecimento a seco (1,2 e 4 horas) foram adicionados à suspensão de HAp e aquecido a 85 °C por 20 minutos em um béquer encamisado conectado a um banho com circulação externa de água.

Depois disso, a pasta de amido de batata com HAp foi colocada em moldes plásticos (20 x 20 mm) e em seringas (5 mL). Em seguida, os moldes plásticos e as seringas foram mantidos em dessecadores com água na geladeira (5 °C) durante 24 horas. Após esse tempo, os materiais condicionados são os hidrogéis de amido nativo e modificado (DHT) adicionados de HAp e chamados também de tintas ou formulações para serem processados via impressão 3D e/ou caracterizados. Os hidrogéis nos moldes foram usados para caracterização da reologia e da firmeza do gel. Os hidrogéis na seringa foram usados para avaliação de impressão 3D.

3.1.3.2 Propriedades reológicas

As medições reológicas dos hidrogéis foram analisadas em um reômetro híbrido (Discovery HR-3, DHR, TA Instruments, EUA) usando uma placa paralela de 20 mm com 2000 μ m de espaço. Foi usada uma temperatura de 25 °C. Antes do teste, o excesso de material da placa foi raspado e deixado em repouso por 5 minutos para atingir um estado estável. Foram realizadas rampas de fluxo com taxas de cisalhamento de 0,1 a 100 1/s. As curvas de fluxo foram então ajustadas ao modelo *Power-Law* da seguinte forma:

$$v = K\gamma^{n-1} \quad \text{Equação 8}$$

Em que v é a viscosidade cinemática não newtoniana (m^2/s), K é o índice de consistência (m^2/s^{2-n}), γ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}) e n é o índice de potência (sem dimensão) para o modelo Power Law.

A análise de frequência de oscilação dinâmica foi realizada em uma deformação constante (0,03% de deformação) dentro da faixa viscoelástica linear com uma frequência de 0,01 a 100 rad/s. Os espectros mecânicos foram obtidos registrando-se o módulo de armazenamento (G'), o módulo de perda (G'') e o fator de perda ($\tan \delta = (G''/G')$) em função da frequência. Todos os experimentos foram repetidos três vezes, e os dados médios foram usados para traçar as curvas.

3.1.4 Otimização dos parâmetros de processo da impressão 3D

Foi utilizada uma impressora 3D do tipo extrusão (BioV4-BioEdPrinter v4-4 Impressora 3D tipo extrusão de cabeça modular da BioEdTech, Brasil) para produção dos *scaffolds*. O hidrogel de amido foi extrudado da seringa através de um sistema de pistão e o extrusor movia-se nos eixos x, y e z depositando o material sob uma placa de Petri.

Os parâmetros de impressão 3D avaliados foram: porcentagem de preenchimento (10, 15 e 20%), número de camadas (5, 7 e 10), vazão de extrusão (50, 70 e 100%), velocidade de impressão (5, 10, e 15 mm/s), geometria (cilindro e paralelepípedo) e tamanho (20 e 30 mm) (Figura 17). Após cada impressão, os materiais impressos foram levados para secagem (45 °C, 10% UR). Os parâmetros ótimos foram escolhidos com base na resolução do material antes e depois da secagem. Essa etapa de seleção dos parâmetros foi feita apenas com os hidrogéis a base de amido nativo e com os parâmetros ótimos foram feitas as avaliações das demais tintas à base de amido nativo e modificado por DHT com adição de HAp.

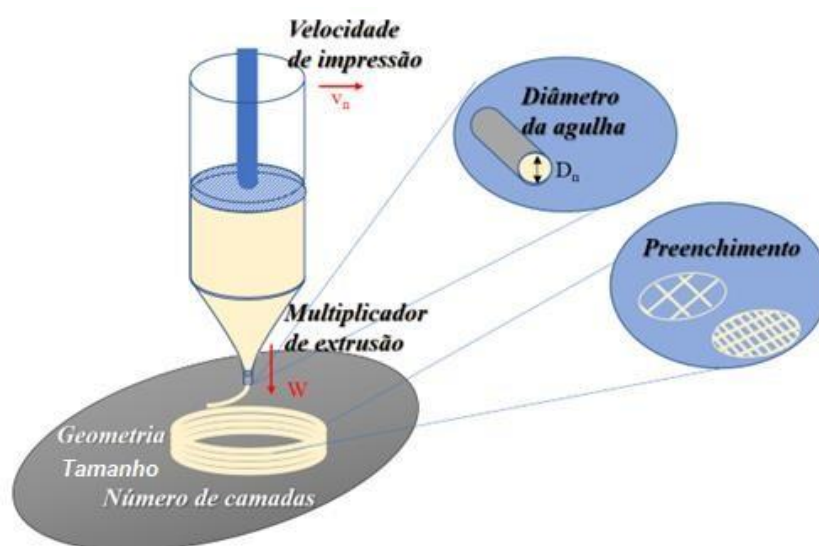


Figura 17. Parâmetros de impressão 3D avaliados com os hidrogéis a base de amido nativo: porcentagem de preenchimento (10, 15 e 20%), número de camadas (5, 7 e 10), vazão de extrusão (50, 70 e 100%), velocidade de impressão (5, 10, e 15 mm/s), geometria (cilindro e paralelepípedo) e tamanho (20 e 30 mm).

3.1.5 Otimização do pós-processamento dos scaffolds impressos

Após a impressão dos *scaffolds*, foi avaliado o tipo de pós-processamento do material. Duas técnicas foram consideradas: secagem por convecção em câmara de secagem (modelo SSA85L, Solidsteel, Brasil) a 45 °C e liofilização em liofilizador vertical (modelo SL-404, Solab, Brasil).

3.1.6 Reprodutibilidade de processo

Para verificar a reprodutibilidade do processo de impressão 3D e do pós-processamento foi analisada massa, área e imagem dos *scaffolds*. A massa dos *scaffolds* foi medida em balança analítica (modelo Unibloc ATY224 Shimadzu, Shimadzu, Brasil). A área dos *scaffolds* foi medida através do *software* ImageJ e da análise das imagens capturadas através de uma câmera (modelo BW-400X, Duratool, China).

3.1.7 Biodegradabilidade e intumescimento

Os materiais (*scaffolds*) foram colocados em placas de cultura de células de 6 poços e imersas em 5 mL do meio de cultura de células (α -MEM, Gibco) por um período de 7 e 14 dias a 37 ± 2 °C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esse período, os materiais foram coletados e levados a estufa até secarem completamente. A biodegradabilidade foi calculada como a porcentagem de matéria seca na membrana após a imersão em um meio de cultura de células.

Para avaliar o intumescimento dos materiais (*scaffolds*), eles foram imersos em 5 mL de meio de cultura de células (α -MEM, Gibco) por períodos de: 0, 2, 4, 8, 24 e 72 horas e em cada período foi tirada uma foto de todas as amostras com uma câmera digital com 8,0 megapixels (Samsung modelo CMOS, Coreia). O intumescimento é calculado pela variação da área dos *scaffolds*, calculada pelo programa ImageJ.

3.1.8 Morfologia dos scaffolds (microscopia eletrônica de varredura e μ -tomografia)

A estrutura dos *scaffolds* de amido bem como a dispersão de carga foi analisadas por microtomografia. O modelo impresso foi inserido em um suporte padrão de latão e fixado com massa padrão no porta amostras, livre de qualquer movimento durante a aquisição das projeções. Após preparação, o modelo foi alocado no compartimento de amostras do microtomógrafo Bruker SkyScan 1272 equipado com detector CMOS. A fonte de raios-X foi alimentada em tensão de 60kV, corrente de 165 mA e com filtro de alumínio de 0,25 mm de espessura. Anteriormente ao escaneamento foi realizado o procedimento de *flat field*, em que o tempo de exposição foi mantido em 495 ms. Cada projeção de raios-X é resultado da média de 4 projeções iguais. O passo do

ângulo de rotação foi de 0,30 de 0 a 1800. Os parâmetros de reconstrução foram mantidos iguais para todas as amostras: *Smooth* (0), *beam hardening correction* (8%), *Ring artifacts* (20). A microtomografia foi realizada no LAimage – CTI Renato Archer. O *software* NRecon (Bruker Corp.) foi utilizado para a reconstrução das projeções.

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no microscópio JEOL JSM-7200F para verificação da dispersão e morfologia das partículas de carga presentes na matriz polimérica. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e fraturadas. Posteriormente, foram fixadas na superfície de *stubs* metálicos com auxílio de fita de carbono que apresenta superfície adesiva e condutora. Os *stubs* contendo as amostras foram recobertos com carbono a fim de torná-las condutoras e possibilitar a obtenção das imagens. As imagens das amostras foram obtidas a partir do uso do detector de elétrons secundários e utilizou como diferença de potencial 15 kV para a aceleração dos elétrons.

3.1.9. Análise estatística

Para análise estatística, foi realizado o teste de comparação de médias (teste de Tukey, 95%, $p < 0.05$), utilizando o *software* STATISTICA7®.

3.2. Resultados e discussão

3.2.1. Caracterização das nanopartículas de Hidroxiapatita (HAp)

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de HAp foi de $307,2 \pm 21,4$ nm (PDI: 0,345) e o Potencial Zeta foi de $-22,6 \pm 1,2$ mV, conforme determinado pelo espalhamento dinâmico de luz de amostras dispersas em água deionizada. O difratograma referente à HAp (Figura 18) revelou picos intensos a 26° e 32° (2θ) que podem ser relacionados aos planos da fase hexagonal da hidroxiapatita (002) e (300), respectivamente (COD 9001233)¹¹¹.

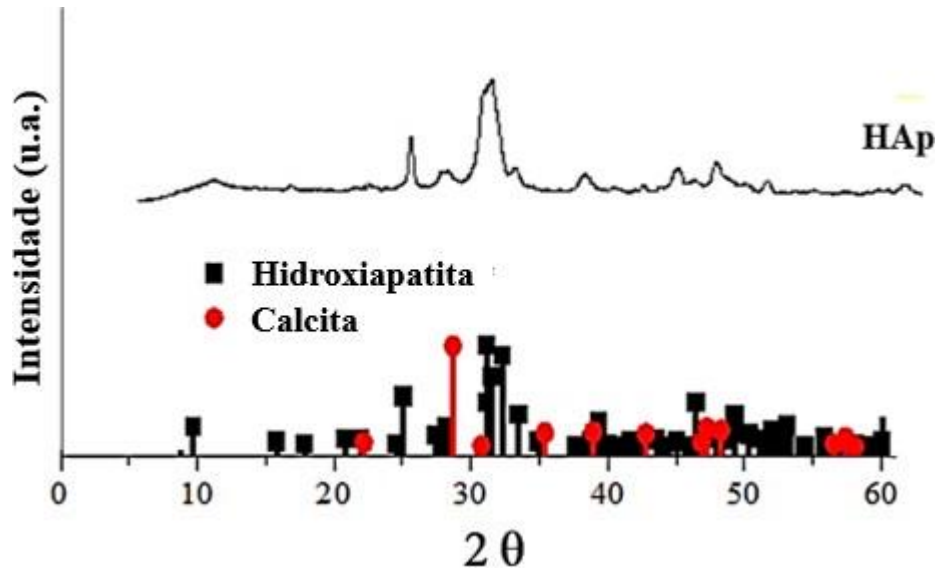


Figura 18. Padrão de difração de raios X (DRX) de hidroxiapatita e calcita.

O espectro de FTIR (Figura 19) apresentou as bandas características de hidroxiapatita, correspondendo aos grupos funcionais fosfatos, hidroxilas e carbonatos substitutos na estrutura da HAp. No espectro destaca-se as bandas características em 1070 e 980 cm^{-1} típicas de ν_3 (PO_4^{3-}) e ν_1 PO_4^{2-} de apatita, respectivamente.

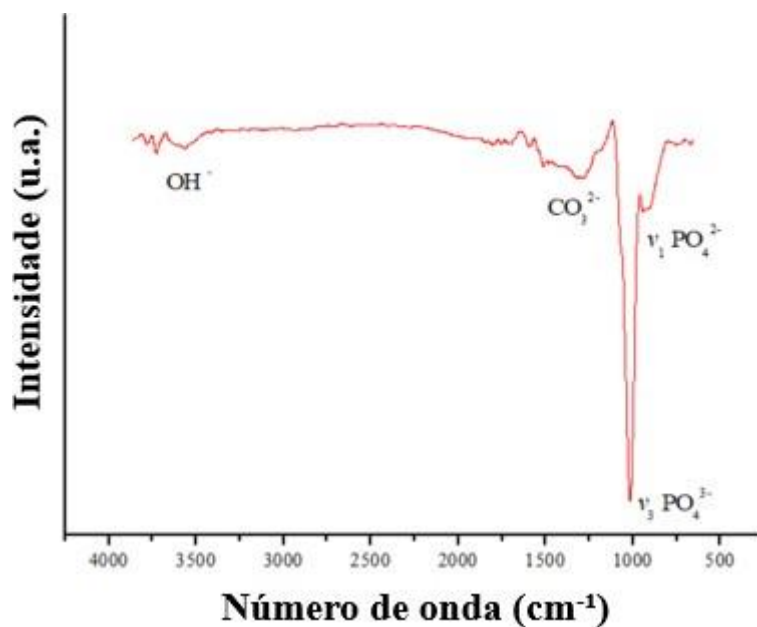


Figura 19. Espectros de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), que exibem as bandas típicas ν_3 (PO_4^{3-}) e ν_1 (PO_4^{2-}) de apatita.

3.2.2 Avaliação e otimização dos parâmetros de impressão 3D

A otimização dos parâmetros de impressão 3D foi feita com os hidrogéis a base de amido de batata nativo, com isso avaliou-se a influência de cada parâmetro na capacidade de impressão 3D e foi escolhido as melhores condições para o processamento dos *scaffolds* ósseos. A escolha dos melhores parâmetros foi feita considerando a resolução dos objetos impressos que se baseia na semelhança entre as imagens virtuais do projeto 3D comparadas aos objetos impressos. Para cada parâmetro avaliado, mantiveram-se os demais constante. Iniciou-se a avaliação pela porcentagem de preenchimento (10, 15 e 20%) com os demais parâmetros constantes (velocidade do braço robótico: 10 mm/s, vazão mássica: 100%, número de camadas: 10, geometria: paralelepípedo 20 x 20 x 2 mm). Em seguida, manteve-se a porcentagem de preenchimento selecionada e avaliou o próximo parâmetro mantendo os demais constantes.

3.2.2.1 Avaliação do preenchimento

A Figura 20 apresenta *scaffolds* impressos com 10, 15 e 20% de vazão, respectivamente. Considerando que resolução se baseia na semelhança entre as imagens virtuais do projeto 3D comparadas aos objetos impressos, optou-se por preenchimento de 20%. Além disso, este percentual de preenchimentos foi escolhido visando orifícios menores para melhor e maior adesão celular.

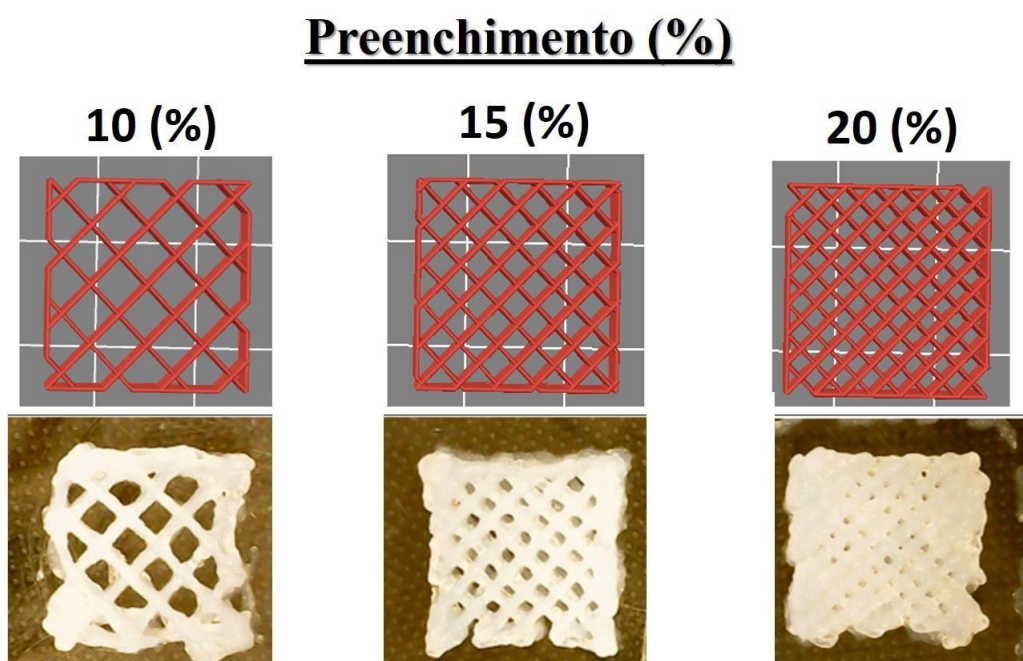


Figura 20. Comparativo entre os *scaffolds* impressos com variação da porcentagem de preenchimento (10, 15, e 20%).

3.2.2.2 Avaliação do número de camadas

A Figura 21 apresenta *scaffolds* com 5, 7 e 10 camadas, respectivamente. Novamente, considerando que resolução se baseia na semelhança entre as imagens virtuais do projeto 3D comparadas aos objetos impressos, optou-se por 5 camadas. Além disso, por ser um arcabouço com maior representatividade de uma estrutura 3D para crescimento celular.

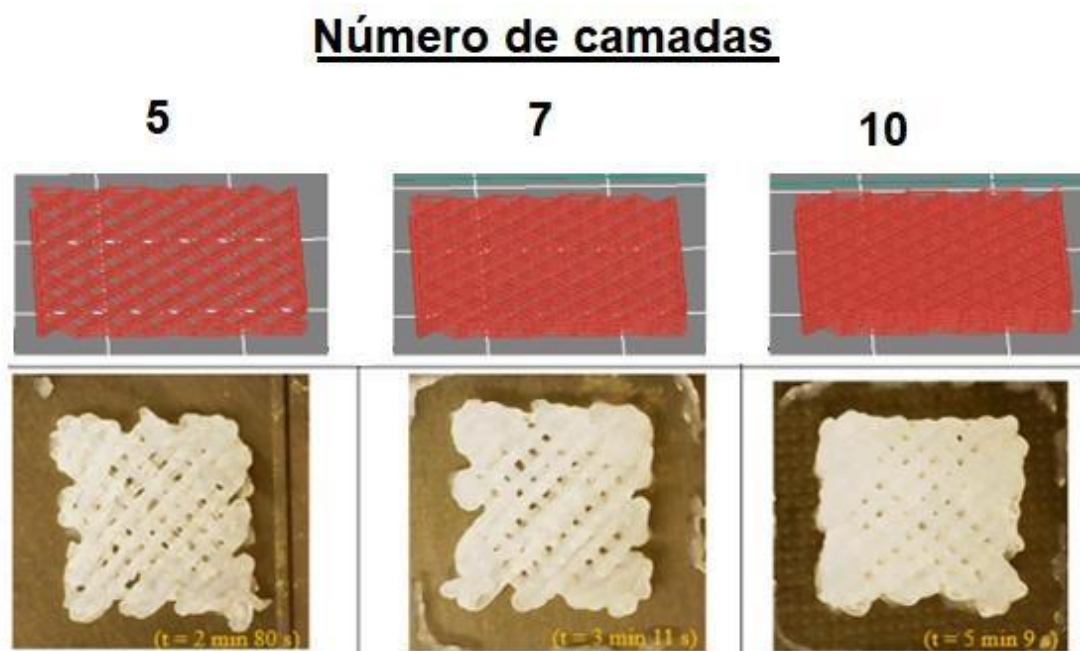


Figura 21. Comparativo entre os *scaffolds* impressos com variação do número de camadas (5, 7 e 10 linhas).

3.2.2.3 Avaliação da vazão mássica

A Figura 22 apresenta os *scaffolds* impressos com vazão de 50, 70 e 100% de massa, respectivamente. Considerando a resolução, optou-se por 100% de vazão mássica.

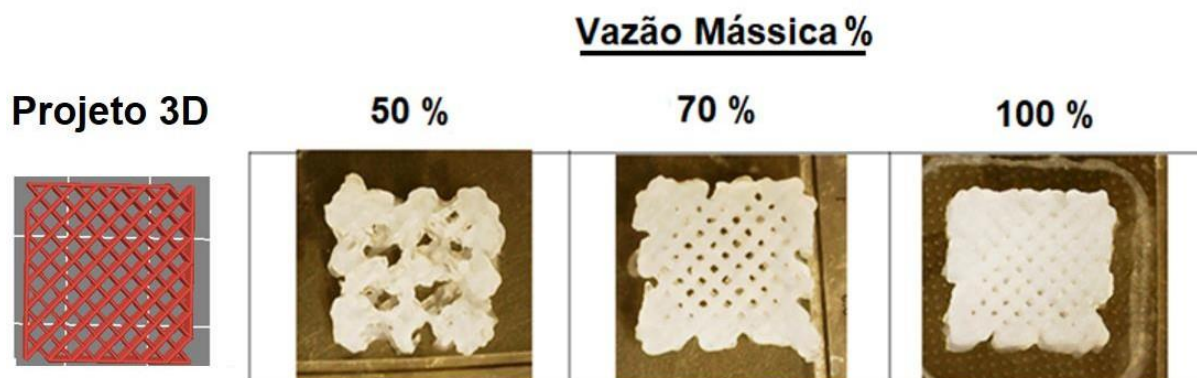


Figura 22. Comparativo entre os *scaffolds* impressos com variação de vazão mássica (50, 70 e 100%).

3.2.2.4 Avaliação da velocidade do braço robótico

A Figura 23 apresenta as velocidades (5, 10 e 15 mm/s, respectivamente) do braço robótico na impressão dos *scaffolds* e os respectivos tempos de impressão. Considerando a resolução, optou-se por velocidade de impressão de 10 mm/s.

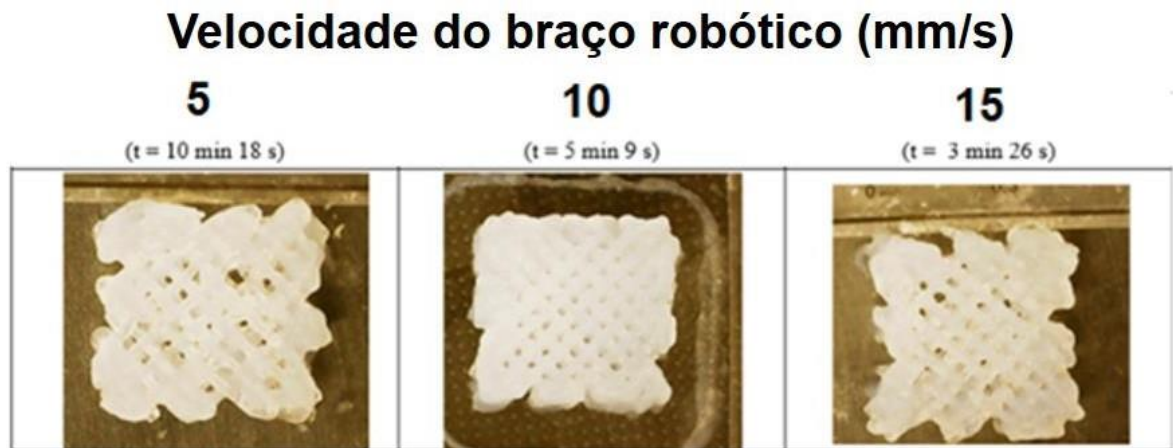


Figura 23. Comparativo entre os *scaffolds* impressos com variação da velocidade do braço robótico (5, 10 e 15 mm/s).

3.2.2.5 Avaliação da geometria e do tamanho dos *scaffolds*

A Figura 24 apresenta os *scaffolds* impressos com 20 x 20 x 2 mm e 30 x 30 x 2 mm de dimensão para a geometria paralelepípedica e 20 x 2 mm e 30 x 2 mm para a geometria cilíndrica, respectivamente. Considerando tanto a resolução quanto a geometria exigida para os ensaios de cultura celular que são executadas em placas de cultura de 6 poços em formato circular, optou-se por cilindros de 20 x 2 mm.

Tamanho e geometria

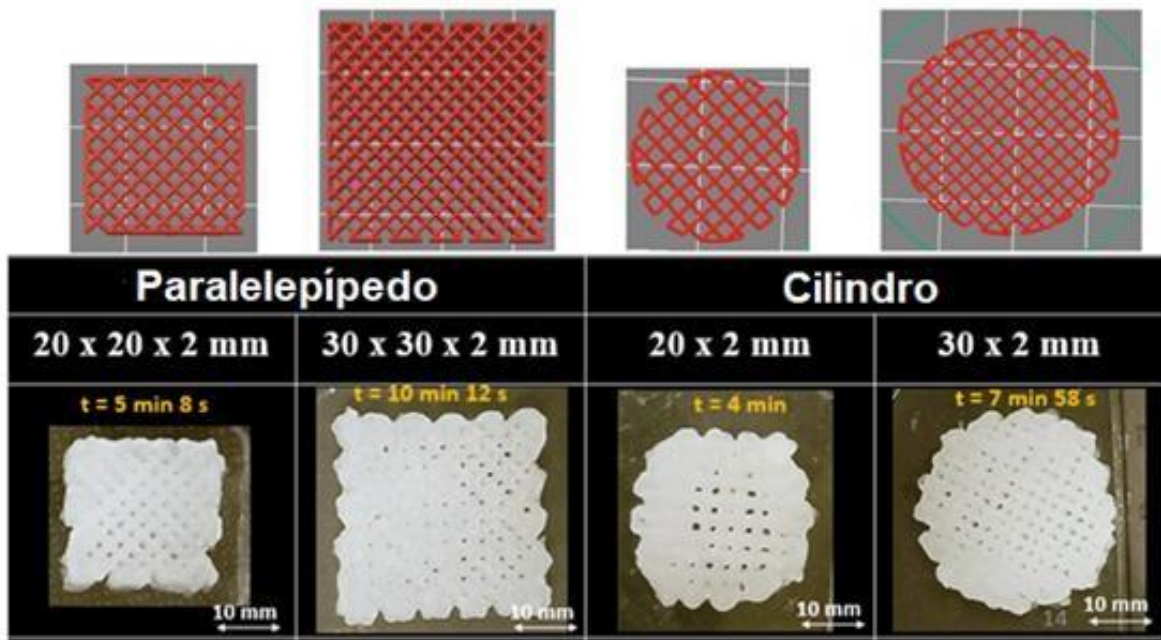


Figura 24. Comparativo entre os *scaffolds* impressos com variação da geometria e tamanho.

Por fim, foi concluído que os parâmetros de impressão ótimos são: 10 mm/s de velocidade de impressão, 20% de preenchimento, 100% de vazão, 5 camadas e geometria cilíndrica (20 x 2 mm).

3.2.3 Avaliação do tipo de pós-processamento e reprodutibilidade do processo

O pós-processamento dos *scaffolds* a base de hidrogéis de amido nativo foi analisado pela diferença entre a massa, área (Tabela 8) e imagens dos *scaffolds* recém impressos e após pós-processamento (câmara de secagem e liofilização).

Tabela 8. Variação de massa e área dos *scaffolds* impressos e após pós-processamento.

<i>Pós-processamento</i>	<i>Câmara de secagem</i>	<i>Liofilização</i>
<i>Massa inicial (M₀) (g)</i>	1,29 ± 0,11 ^a	1,29 ± 0,13 ^a
<i>Massa final (M_f) (g)</i>	0,15 ± 0,03 ^b	0,25 ± 0,08 ^a
<i>Variação da massa com a secagem (ΔM) (%)</i>	88 ± 8 ^a	81 ± 5 ^b
<i>Área inicial (A₀) (cm²)</i>	3,23 ± 0,08 ^b	3,39 ± 0,06 ^a
<i>Área final (A_f) (cm²)</i>	2,09 ± 0,18 ^b	2,95 ± 0,16 ^a
<i>Variação de área com a secagem (ΔA) (%)</i>	35 ± 3 ^a	13 ± 4 ^b

a, b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre os *scaffolds* impressos e após os diferentes pós-processamentos, como revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

A partir da Tabela 8 pode-se observar que os *scaffolds* impressos apresentaram baixo desvio padrão em relação a massa, o que indica que o processo apresentou alta reprodutibilidade. Além disso, o processo de liofilização removeu menor teor de umidade (menor variação de massa com a secagem) que a câmara de secagem, ainda mantendo baixos desvios em ambos os processos, o que demonstra que também permitiu reprodutibilidade. Por fim, a técnica de liofilização apresenta menor variação na área dos *scaffolds* (13%) em relação ao seco em câmara de secagem (35%), o que indica que esse pós-processamento consegue manter mais a geometria projetada.

A Figura 25 nos mostra como os *scaffolds* liofilizados são menos deformados que os secos em câmara de secagem. Sendo, portanto, o método de liofilização o pós-processamento selecionado para dar sequência no estudo.

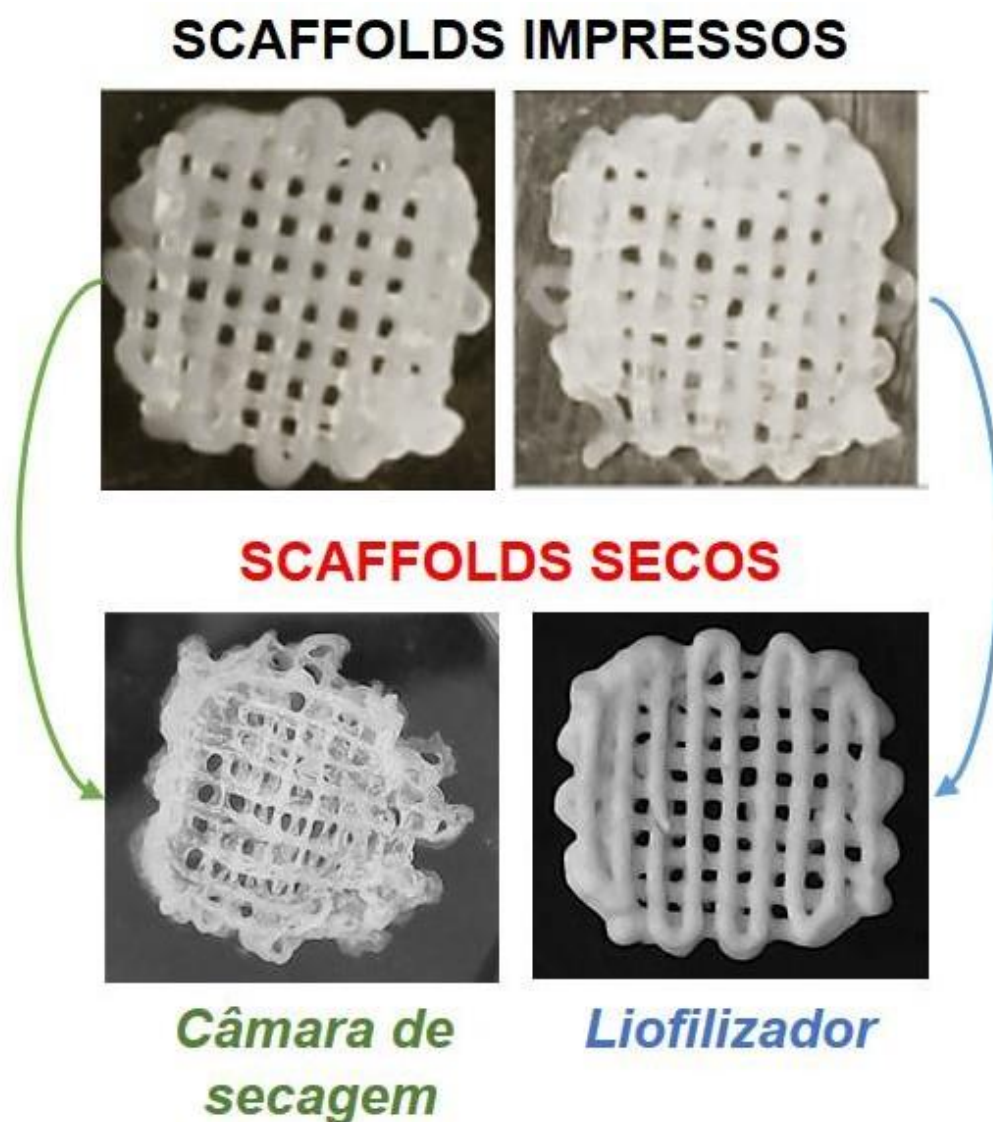


Figura 25. Aspecto visual dos *scaffolds* a base de amido de batata nativo após impressão e pós-processamento por secagem em câmara de secagem ou liofilizador.

3.2.4 Avaliação das formulações das tintas à base de amido de batata nativo e modificado com adição de nanopartículas de HAp

Partindo dos resultados obtidos no Capítulo 2, essa etapa foi realizada com o amido nativo e o modificado por DHT por 1h por ter apresentado melhor potencial para essa aplicação.

A análise das propriedades reológicas foi feita para as amostras de amido de batata nativo, modificado por 1 hora de aquecimento a seco (DHT_1h), amido de batata nativo adicionado de HAp (Nativo_HAp) e amido de batata modificado por 1 hora de aquecimento a seco adicionado de HAp (DHT_HAp). As propriedades reológicas estão apresentadas nas Figuras 26 e 27. A

Figura 26 indica que enquanto a taxa de cisalhamento aumenta, a viscosidade aparente diminui para todas as amostras, confirmando o comportamento pseudoplástico de todas as amostras analisadas, característico de um fluido viscoelástico não newtoniano⁸⁵. Como mencionado no capítulo anterior essa redução na viscosidade do gel, visando uma boa qualidade de impressão 3D, é bastante favorável já que o gel menos viscoso tem maior fluidez, o que gera linhas mais contínuas. Além disso, nota-se que a viscosidade aparente inicial é maior para as amostras DHT_HAp e menor para as amostras de amido nativo. Na Tabela 9 estão apresentados os parâmetros n (índice de potência) e K (índice de consistência), que se referem ao modelo matemático *Power-Law* utilizado para estudar o tipo de comportamento do fluido em questão. Pode-se ver que quase todos os coeficientes de correlação (R^2) estavam próximos de 0,99, mostrando uma forte dependência da lei de potência da viscosidade na taxa de cisalhamento. Além disso, todos os valores n foram muito inferiores a 1, indicando que as amostras de amido se comportaram fortemente como um fluido não newtoniano e mostraram um comportamento de afinamento ao cisalhamento. O módulo elástico ou de armazenamento (G') é a medida elástica do material, ou seja, a capacidade que o material tem para armazenar energia. O módulo viscoso ou de perda (G'') determina a capacidade do fluido de dissipar energia na forma de calor⁶³. A Figura 27 nos apresenta que G' é maior que G'' , o que denota que o perfil sólido/elástico domina a estrutura de perfil gel. Hidrogéis com esse comportamento têm bom potencial para serem usados como tintas para impressão 3D, pois podem recuperar melhor sua forma quando depositados na superfície⁸⁶. A Tabela 9 também apresenta o parâmetro $\tan\delta^*$ (G''/G') dos hidrogéis de amido. Um alto valor $\tan\delta^*$ indica que o material apresenta um comportamento mais fluido, e um baixo valor indica um comportamento mais sólido do hidrogel, apresentando baixa fluidez³². Em geral, todos os valores de $\tan\delta^*$ dos hidrogéis de amido foram inferiores a 1, sugerindo o comportamento do tipo sólido/elástico dominante nas tintas. Analisando todas as amostras nota-se que as amostras de amido nativo e DHT possuem um menor valor de $\tan\delta^*$, com destaque para o DHT, em relação as amostras com adição de HAp. Com isso pode-se concluir que a adição da HAp fez com que o hidrogel apresentasse um comportamento mais fluido (efeito mais pronunciado para a amostra DHT_HAp), em relação as amostras de amido nativo e DHT sem HAp, que possuem um comportamento mais do tipo sólido.

Esses resultados sugerem que a modificação estrutural dos grânulos de amido promovidos pelo DHT e a adição de HAp foram capazes de alterar as propriedades viscoelásticas das amostras de amido de batata de diferentes maneiras.

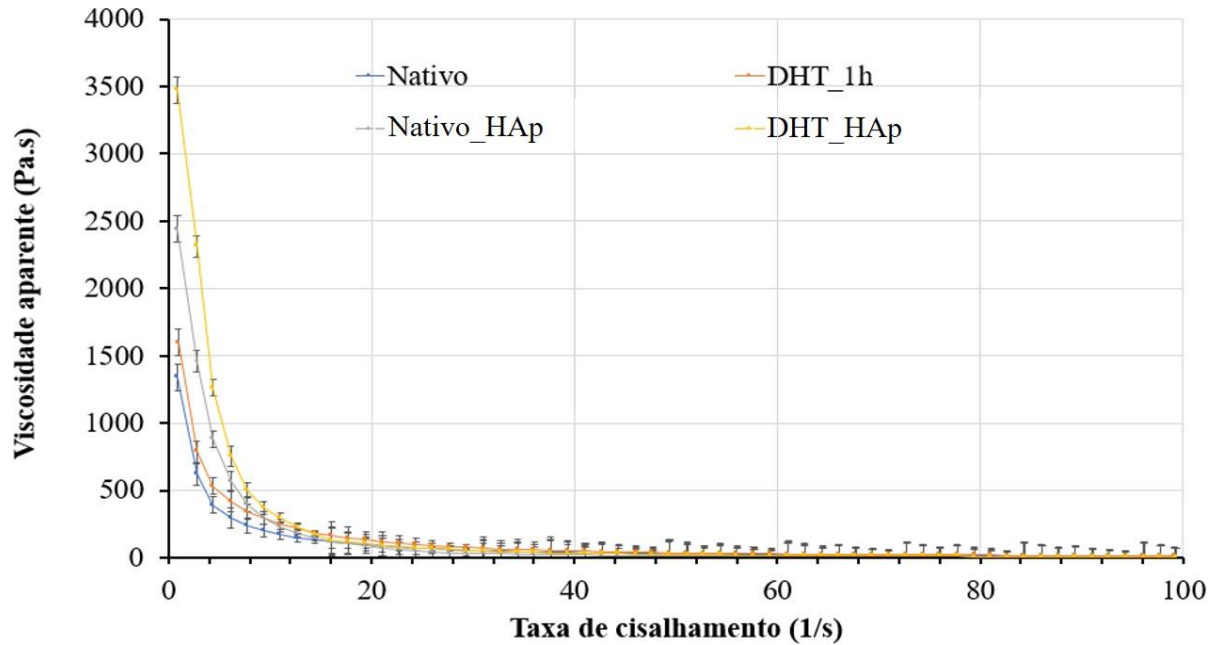


Figura 26. Propriedades reológicas do amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp: Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento.

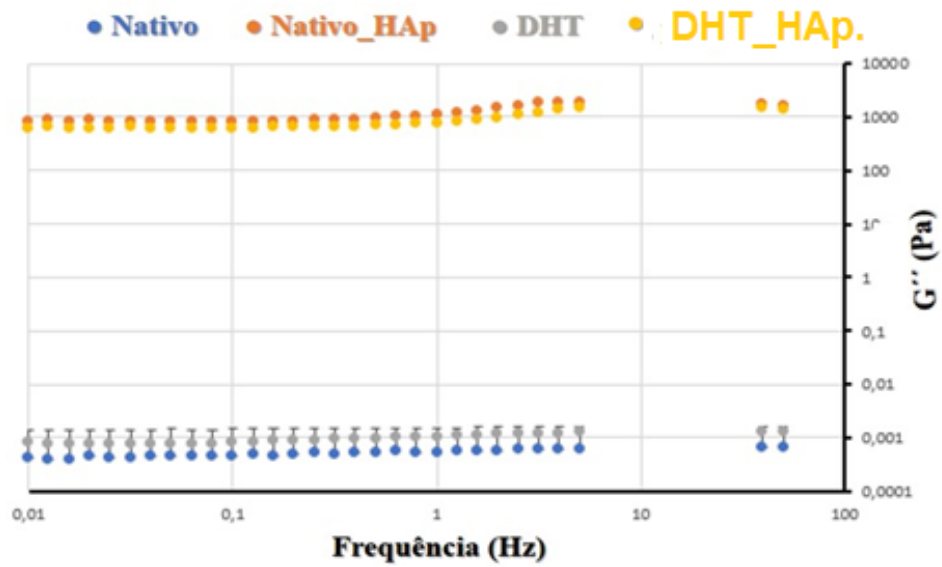
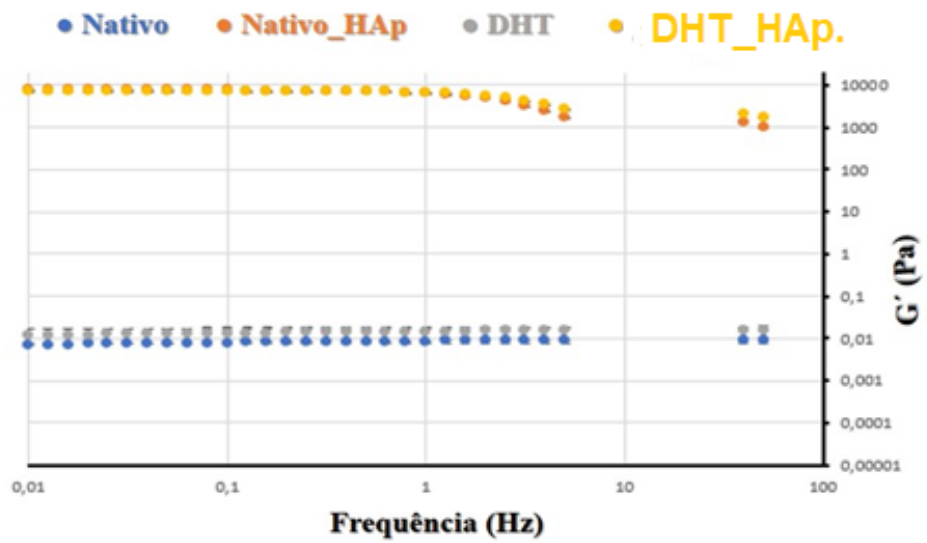


Figura 27. Propriedades reológicas do amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp: Módulo de armazenamento (G') em função da frequência angular e Módulo de perda (G'') em função da frequência angular.

Tabela 9. Parâmetros da lei de potência e $\tan \delta$ (G''/G' , determinado pelo meio de G'' e G' no *plateau*) dos hidrogéis de amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp.

<i>Hidrogéis</i>	$\tau = k\gamma^n$			$\tan\delta^*$
	k	n	R²	
Nativo	786.16 ± 8.90 ^b	0.55 ± 0.01 ^a	0.99	0.0632 ± 0.0007 ^c
DHT	1597.03 ± 5.67 ^a	0.29 ± 0.00 ^d	0.98	0.0382 ± 0.0005 ^d
Nativo_HAp	665.49 ± 4.55 ^c	0.35 ± 0.01 ^c	0.97	0.2085 ± 0.0218 ^a
DHT_HAp	343.80 ± 9.08 ^d	0.47 ± 0.00 ^b	0.98	0.1571 ± 0.0221 ^b

a, b, c: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp conforme revelado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

3.2.5. Intumescimento dos *scaffolds*

O intumescimento foi medido com os *scaffolds* impressos e liofilizados das seguintes amostras: Amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp. Os *scaffolds* foram colocados em meio de cultura α -MEM por períodos de 0, 2, 4, 8, 24 e 72 horas. As imagens dos materiais no meio de cultura estão representadas na Figura 28.

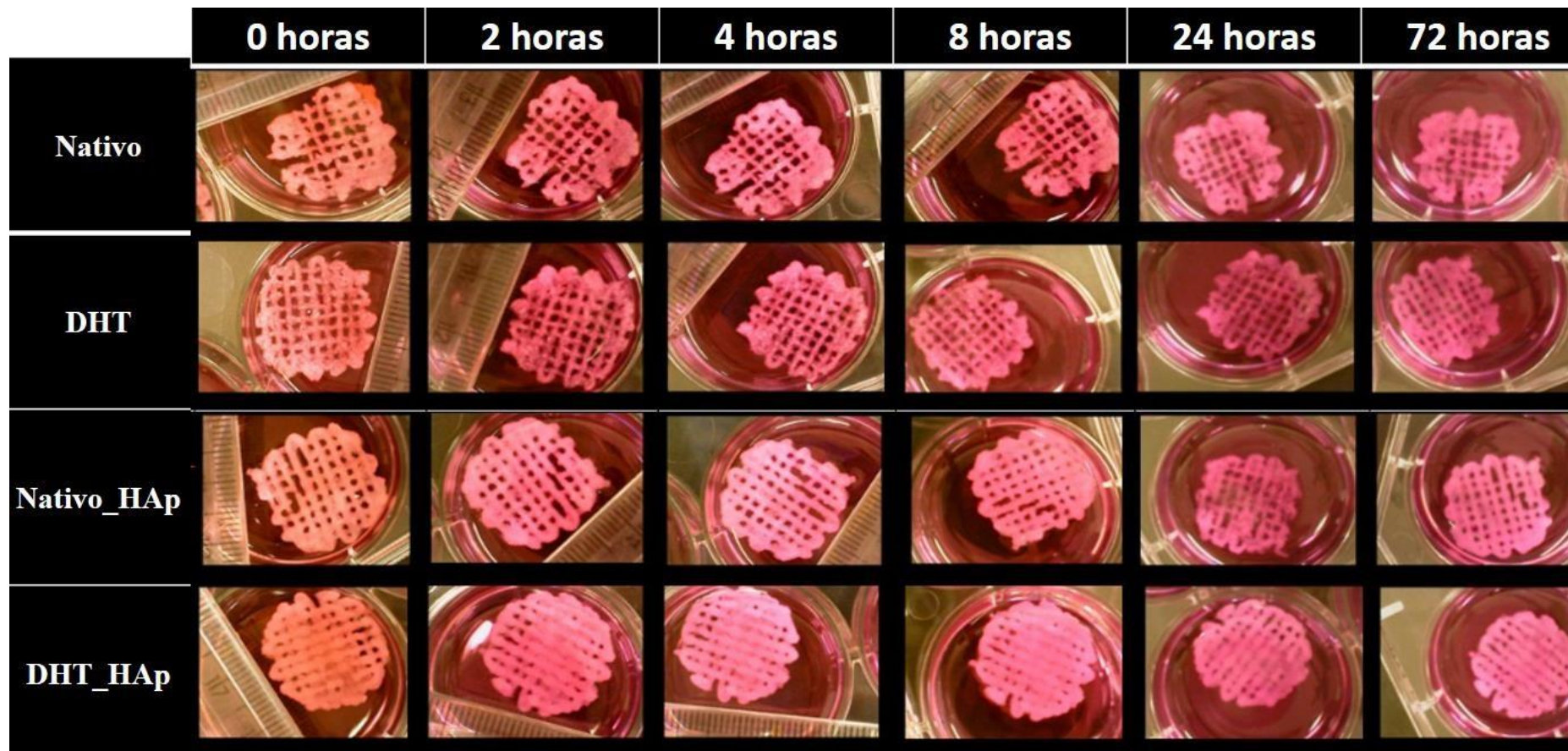


Figura 28. Fotos dos *scaffolds* de Amido de batata: Nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp em meio de cultura α -MEM para medida do intumescimento.

Notou-se que as amostras de *scaffolds* incharam imediatamente após o processo de adição de meio de cultura (~20%) e depois permaneceu com o mesmo tamanho. Portanto, para todas as amostras não houve variação significativa da área com o passar do tempo, o que mostra que a exposição ao meio de cultura causa inchaço nestes materiais apenas no contato inicial, sendo que no período analisado (até 72 h) não sofreu mais alteração. Trata-se de uma característica interessante ao se pensar no ponto de garantir uma boa acomodação do *scaffold* na inclusão na fratura óssea, mas sem comprometer a integridade do local com o passar do tempo.

3.2.6. Biodegradabilidade dos *scaffolds*

A biodegradabilidade foi medida por um período de 7 e 14 dias em meio de cultura de células α -MEM para os *Scaffolds* impressos e liofilizados das seguintes amostras: amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp. Os dados estão representados no gráfico da Figura 29.

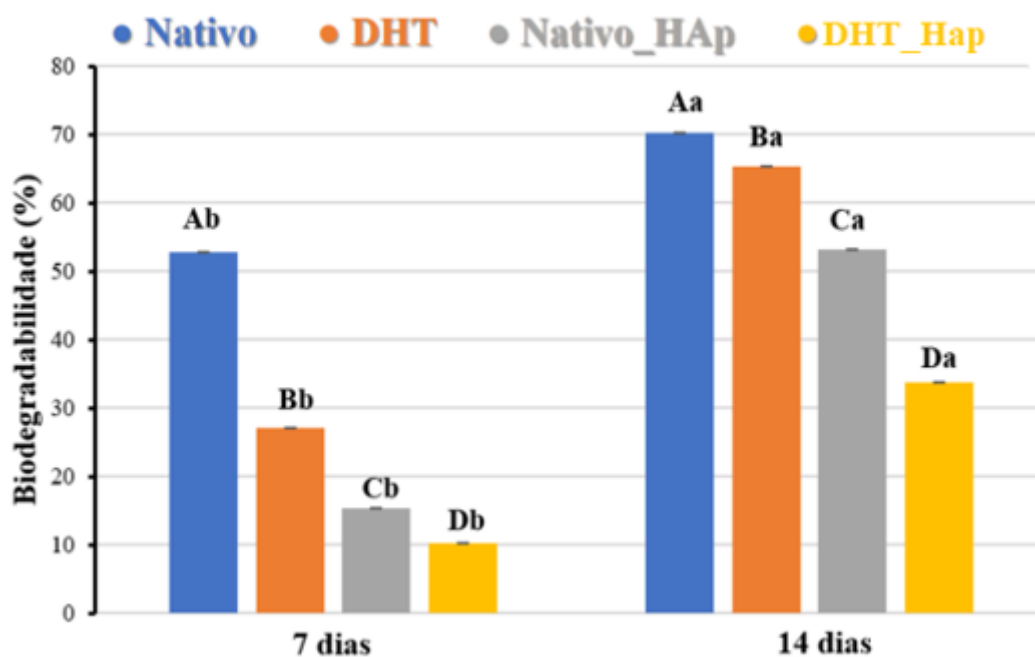


Figura 29. Teste de biodegradabilidade para os *scaffolds* impressos e liofilizados das seguintes amostras: Amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp.

Analisando o gráfico da Figura 29, nota-se que a biodegradabilidade foi maior para o tempo de 14 dias em relação ao tempo de 7 dias de exposição ao meio de cultura α -MEM. Analisando as amostras que ficaram 7 dias no meio de cultura, nota-se que os materiais de amido de batata nativo possuem a maior biodegradabilidade seguido do amido modificado por 1 hora (DHT_1h). Os materiais de amido com adição de HAp apresentaram biodegradabilidade menor em relação as outras amostras citadas sendo que a menor porcentagem foi para a amostra DHT_HAp. Para uma

exposição de 14 dias ao meio de cultura α -MEM foi verificado o mesmo comportamento. Com isso pode-se concluir que a modificação do amido de batata pelo período de 1 hora em conjunto com a adição de HAp aumentou a resistência dos *scaffolds* quando estão expostos ao meio de cultura, fazendo com que a porcentagem de biodegradabilidade diminuísse.

3.2.5 Morfologia dos *scaffolds* impressos por micro-CT e MEV

A Figura 30 apresenta a microCT realizada para os *scaffolds* impressos: amido de batata nativo, DHT, Nativo_HAp, DHT_HAp.

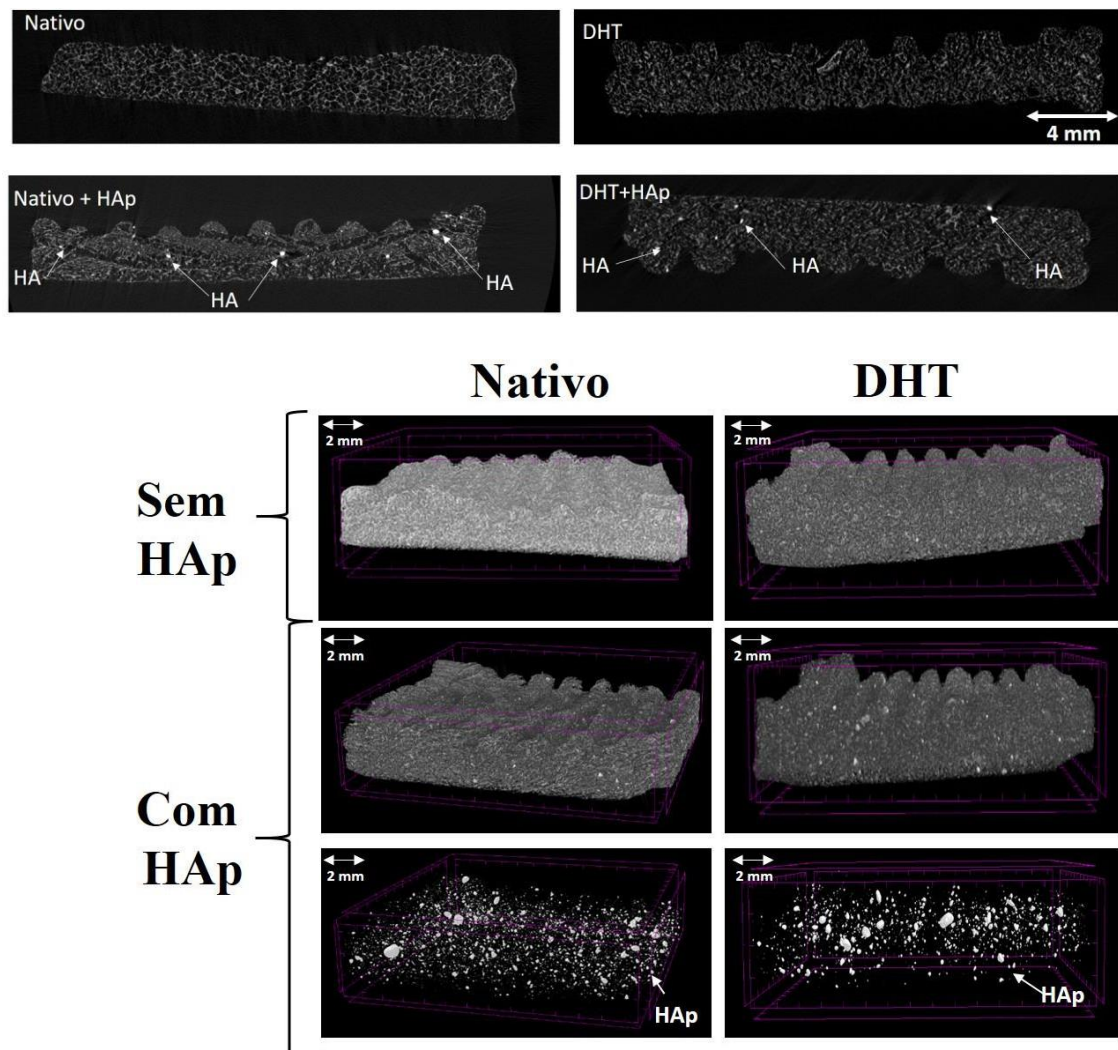


Figura 30. Micro-tomografias dos *scaffolds* ósseos de amido de batata nativo, DHT, com e sem HAp.

A partir de Figura 30, é possível observar que os *scaffolds* apresentaram estrutura porosa altamente interconectada, que é um requisito essencial para auxiliar o crescimento, migração e

proliferação celular ¹¹². Em sequência, é possível identificar pontos brancos na estrutura do material. Baseado nisto, foi realizado tratamento de imagem por separação de fases em tons de cinza, onde os tons mais claros correspondem à elementos mais densos. De tal modo, a microCT possibilitou evidenciar a boa dispersão da HAp identificada na matriz polimérica, pois as partículas encontram-se dispersas em todo o arcabouço volumetricamente, (representado na Figura 30). A boa dispersão da HAp é positiva também do ponto de vista da propriedade osteogênica¹⁰⁴ que essa partícula apresenta, podendo auxiliar em diferentes pontos do *scaffold* no processo de mineralização.

A Figura 31 apresenta microscopias eletrônicas de varredura feitas para os *scaffolds* produzidos neste estudo.

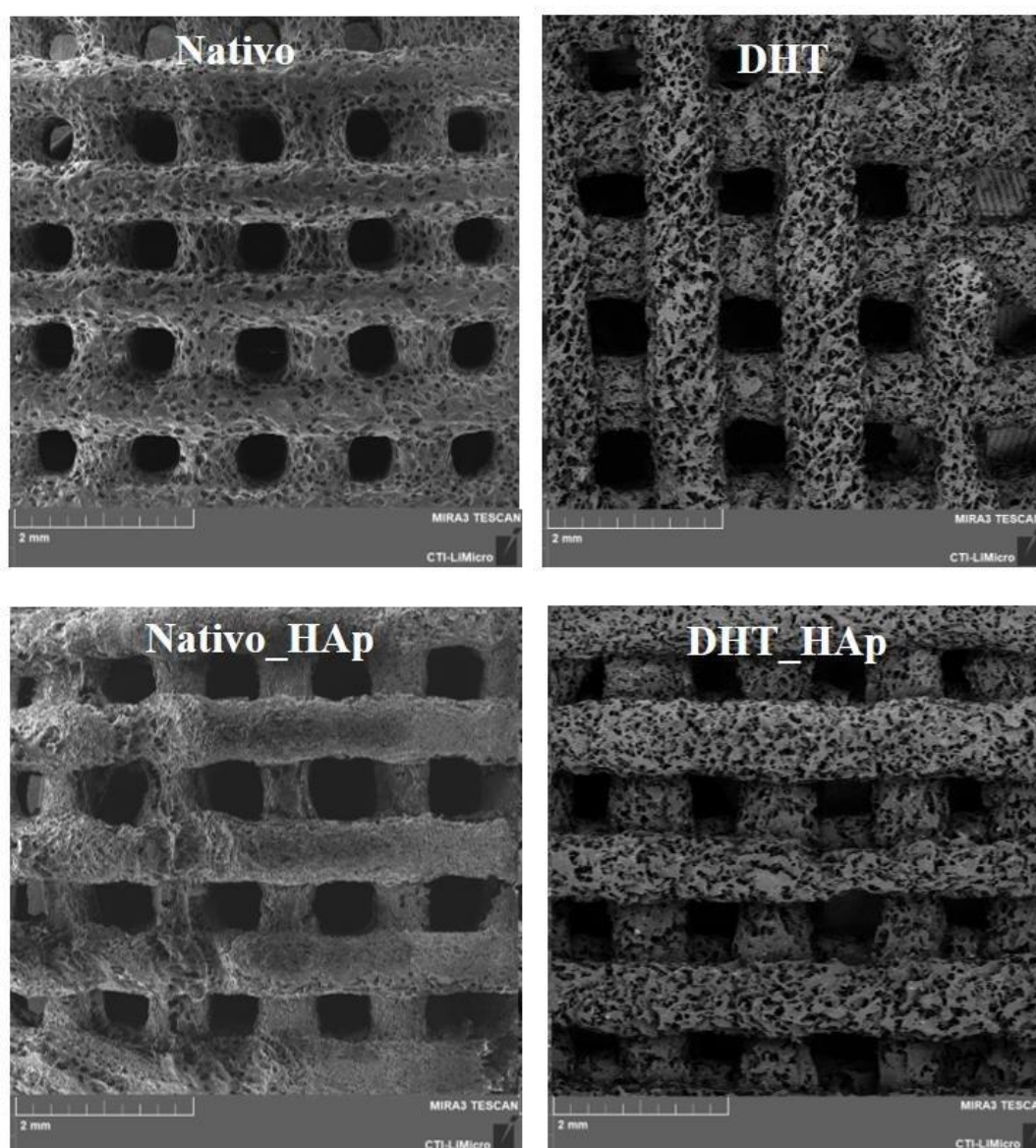


Figura 31. MEV dos *scaffolds* impressos (Nativo, DHT, com e sem HAp).

Observa-se na Figura 31 que as linhas dos *scaffolds* apresentam certa porosidade, o que é positivo para essa aplicação, conforme já salientado. A porosidade foi mais significativa para os *scaffolds* a base de amido modificado. Aparentemente, a adição de HAp deixou a estrutura menos porosa, o que indica que essa partícula está sendo bem aderida a matriz polimérica.

SHIN et al. (2017)⁴⁰ afirmam que a mistura de polímero com cargas apresenta grande complexidade de forma. A obtenção de compósitos homogêneos com boa dispersão e distribuição é de grande dificuldade. Ao adicionar excesso de carga, em geral, a distância média entre as partículas reduz, há maior probabilidade de choque entre estas e há a formação de agregados em escala micrométrica, perdendo propriedades características e aumentando suas dimensões⁴⁰. Por um lado, na ótica biológica, a presença de aglomerados ao longo da superfície das amostras pode favorecer o ancoramento de células e dar início à diferenciação celular óssea. Por outro lado, do ponto de vista mecânico, estes aglomerados podem formar regiões frágeis que causam propagação de rachaduras e reduzem a resistência mecânica do material ¹¹³.

3.3 Conclusão do Capítulo 3

A otimização dos parâmetros de processo (10 mm/s de velocidade de impressão, 20% de preenchimento, 100% de vazão, 5 camadas e geometria cilíndrica 20 x 2 mm) aliada com a escolha do melhor método de pós processamento (Liofilização) foi de extrema importância para a continuidade do estudo, visto que, com essas condições otimizadas, ocorreu melhora da imprimibilidade dos materiais. Neste capítulo também foi estudado os efeitos da adição da HAp nos géis de amido nativo e modificado por DHT (condição selecionada no Capítulo 2), promovendo alteração nas propriedades reológicas e uma melhora significativa na biodegradabilidade dos materiais. Os estudos de micro-CT mostraram que as nanopartículas de HAp estavam bem dispersas na matriz polimérica e as análises de MEV mostraram que essas partículas estavam bem aderidas na matriz polimérica.

Com isso pode-se concluir que os *scaffolds* ósseos a base de amido de batata modificado por DHT e adicionados de HAp, quando impressos com os parâmetros de impressão otimizados e tendo como método de pós processamento a liofilização, são materiais com enorme potencial para serem utilizados como enxerto ósseo.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi feita a modificação do amido de batata por aquecimento a seco (DHT), que é uma tecnologia simples, segura e “verde”. Esse tratamento foi capaz de alterar as propriedades moleculares, físico-químicas, granulométricas e reológicas do amido de batata, resultando em hidrogéis com diferentes estruturas. O amido de batata modificado por 1 hora (DHT_1h) mostrou melhor imprimibilidade em termos da reprodutibilidade em relação a área e aos orifícios dos materiais impressos, sendo a amostra escolhida para dar sequência aos estudos. Além desse amido ter resultado em melhores propriedades mecânicas e ser mais resistente a biodegradação que o amido nativo, o que é extremamente crucial pensando na aplicação como *scaffold* ósseo. Com isso pode-se dizer que a modificação por DHT é um método eficaz para superar as dificuldades do amido nativo em ser utilizado como tinta para impressão 3D.

Em relação a impressão 3D foi feita a otimização dos parâmetros de processo, em que, após uma avaliação de cada parâmetro foi determinado que os melhores parâmetros de impressão (10 mm/s de velocidade de impressão, 20% de preenchimento, 100% de vazão, 5 camadas e geometria cilíndrica 20 x 2 mm). Além disso, foi avaliado o melhor tipo de pós processamento, no qual foi escolhido a liofilização como melhor método, visto que, esse processo mantém a estrutura do material impresso, ou seja, foi capaz de preservar a sua geometria.

Aos hidrogéis de amido de batata nativo e DHT_1h (selecionado no Capítulo 2) adicionou-se nanopartículas de HAp o que mudou as propriedades mecânicas e reológicas dos materiais. Com a adição da HAp houve uma diminuição significativa da biodegradabilidade, o que no contexto de utilização destes materiais como enxertos ósseos é muito positivo. Foi visto também que as nanopartículas de HAp ficaram bem dispersas e aderidas na matriz polimérica, o que é positivo do ponto de vista da propriedade osteogênica que essa partícula pode promover, cooperando em diferentes pontos do *scaffold* no sentido da mineralização.

Por fim, essa dissertação confirmou a melhora das propriedades de impressão com a modificação do amido e com a adição de HAp, que aliados a otimização dos parâmetros de impressão e de pós processamento, fizeram ser possível a obtenção de materiais promissores para serem utilizados como enxertos ósseos. Além disso, o tema abordado nessa dissertação traz a geração de novos materiais que podem contribuir para a saúde e bem estar da população, com descrição científica inédita.

5. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

- Testes de viabilidade celular (ensaios de MTT) e mineralização (ensaios de *Alizarin red*);
- Avaliação de outros métodos de modificação do amido como por micro-ondas e aquecimento a úmido;
- Quantificação da porosidade dos *scaffolds* ósseos;
- Testes biológicos com outras linhagens de células ósseas para avaliar a capacidade destes materiais para serem usados com enxerto ósseo;
- Impressão 3D de materiais a base de amido com a adição de compostos bioativos (projeto de doutorado).

6. TRABALHOS PRODUZIDOS DURANTE O MESTRADO

Artigo aceito para publicação:

1) SILVA, L. S. ; SPONCHIADO, P. A. I. ; MELO, M. T. ; BARBOSA JUNIOR, F. ; BLACIDO, D. R. T. ; CIANCAGLINI, PIETRO ; RAMOS, ANA PAULA ; **MANIGLIA, BIANCA CHIEREGATO** . Synthesis of composite corn starch/hydroxyapatite nanoparticle biomembranes and their effect on mineralization by osteoblasts. *Journal of Applied Polymer Science JCR*, v. 1, p. 1, 2023. (doi: 10.1002/app.54579)

Apresentações orais no congresso: XX Brazil MRS meeting, 2022:

- 1) SPONCHIADO, P. A. I.; MELO, M. T.; SILVA, L. S, RAMOS, A. P.; MANIGLIA, B. C. Optimization of 3D printing parameters for production of bone scaffolds based on potato starch hydrogels. 2022.
- 2) SPONCHIADO, P. A. I; MELO, M. T.; SILVA, L. S.; RAMOS, A. P.; MANIGLIA, B. C. Hydrogel inks based on modified potato starch by dry heating treatment (DHT) for 3D bioprinting application. 2022

Participação em trabalhos apresentados em anais de eventos:

- 1) SILVA, L. S.; MELO, M. T.; **SPONCHIADO, P.**; CIANCAGLINI, P.; RAMOS, ANA PAULA ; MANIGLIA, BIANCA CHIEREGATO. *The potential of corn starch/hydroxyapatite nanoparticle composite membranes for guided bone regeneration (GBR)*. In: 11 International Colloids Conference, 2022, Lisboa. 11 International Colloids Conference - 2022, 2022. v. 11
- 2) **SPONCHIADO, P. A. I.** ; MELO, M. T. ; SILVA, L. S. ; BITENCOURT, B. S. ; GUEDES, J. S. ; RAMOS, ANA PAULA ; MANIGLIA, BIANCA CHIEREGATO. *Dry heating treatment as a tool to improve the 3D printability of hydrogels based on potato starch for biomedical applications*. In: 11 International Colloids Conference, 2022, Lisboa. 11 International Colloids Conference - 2022, 2022. v. 11.
- 3) SILVA, L. S.; MELO, M. T.; **SPONCHIADO, P. A. I.**; CIANCAGLINI, P.; RAMOS, ANA PAULA; MANIGLIA, BIANCA CHIEREGATO. *Evaluation of the effect of hydroxyapatite nanoparticle concentration in corn starch-based membranes for use in guided bone regeneration (GBR)*. In: 45 Reuniao Anual da SBQ, 2022, Maceió. 45 Reunião Anual da SBQ, 2022. v. 45.

7.. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reznikov, N., Shahar, R. & Weiner, S. Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater.* **10**, 3815–3826 (2014).
2. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphates (CaPO₄): occurrence and properties. *Prog. Biomater.* **5**, 9–70 (2016).
3. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–17 (2015).
4. Prideaux, M., Findlay, D. M. & Atkins, G. J. Osteocytes: The master cells in bone remodelling. *Curr. Opin. Pharmacol.* **28**, 24–30 (2016).
5. Katchburian, E. & Arana Chavez, V. E. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas.* (2014).
6. Mundy, G. R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J. Periodontal Res.* **26**, 213–217 (1991).
7. Manolagas, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **21**, 115–137 (2000).
8. Sodek, J. & Mckee, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol. 2000* **24**, 99–126 (2000).
9. Del Fattore, A., Cappariello, A. & Teti, A. Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone* **42**, 19–29 (2008).
10. Katchburian, E., Cerri, P. S., Cardoso, R. J. A., Manolagas, S. C. & Mundy, G. R. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Cir. para Implant. São Paulo Artes Médicas* **26**, 213–217 (2002).
11. Chen, X., Chen, G., Wang, G., Zhu, P. & Gao, C. Recent Progress on 3D-Printed Polylactic Acid and Its Applications in Bone Repair. *Adv. Eng. Mater.* **22**, 1901065 (2020).
12. Qasim, M., Chae, D. S. & Lee, N. Y. Advancements and frontiers in nano-based 3D and 4D scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 14**, 4333–4351 (2019).
13. Baldwin, P. *et al.* Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J. Orthop. Trauma* **33**, 203–213 (2019).

14. Key, J. A. The effect of a local calcium depot on osteogenesis and healing of fractures. *JBJS* **16**, 176–184 (1934).
15. McBride, J., Clyde, M., Banks, R. E., Taylor, D. & Ryan, J. Healing of segmental bone defects in goat tibia. *J Invest Surg* **6**, 369 (1993).
16. Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D. & Giannoudis, P. V. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* **9**, 66 (2011).
17. Elsalanty, M. E. & Genecov, D. G. Bone Grafts in Craniofacial Surgery. *Craniofacial Trauma Reconstr.* **2**, 125–134 (2009).
18. T., A. & C., J. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* **10**, S96–S101 (2001).
19. Brydone, A. S., Meek, D. & Maclaine, S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* **224**, 1329–1343 (2010).
20. Alonzo, M. *et al.* Bone tissue engineering techniques, advances, and scaffolds for treatment of bone defects. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **17**, 100248 (2021).
21. Nikolova, M. P. & Chavali, M. S. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioact. Mater.* **4**, 271–292 (2019).
22. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).
23. Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A. & Davaran, S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **45**, 185–192 (2017).
24. Agrawal, S. & Srivastava, R. Osteoinductive and Osteoconductive Biomaterials. in *Racing for the Surface* 355–395 (Springer International Publishing, 2020). doi:10.1007/978-3-030-34471-9_15.
25. Kohn, J. New approaches to biomaterials design. *Nat. Mater.* **3**, 745–747 (2004).
26. Lam, C. X. ., Mo, X. ., Teoh, S. . & Hutmacher, D. . Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. *Mater. Sci. Eng. C* **20**, 49–56 (2002).
27. Koski, C., Onuike, B., Bandyopadhyay, A. & Bose, S. Starch-hydroxyapatite composite bone scaffold fabrication utilizing a slurry extrusion-based solid freeform fabricator. *Addit. Manuf.* **24**, 47–59 (2018).
28. Elhaj, A. & Irgum, K. Monolithic space-filling porous materials from engineering plastics by thermally induced phase separation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 15653–15666 (2014).

29. Nakamatsu, J., Torres, F. G., Troncoso, O. P., Min-Lin, Y. & Boccaccini, A. R. Processing and characterization of porous structures from chitosan and starch for tissue engineering scaffolds. *Biomacromolecules* **7**, 3345–3355 (2006).
30. Degli Esposti, M., Chiellini, F., Bondioli, F., Morselli, D. & Fabbri, P. Highly porous PHB-based bioactive scaffolds for bone tissue engineering by in situ synthesis of hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng. C* **100**, 286–296 (2019).
31. Koski, C. & Bose, S. Effects of amylose content on the mechanical properties of starch-hydroxyapatite 3D printed bone scaffolds. *Addit. Manuf.* **30**, 100817 (2019).
32. Do, A.-V., Khorsand, B., Geary, S. M. & Salem, A. K. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 1742–1762 (2015).
33. Song, Y. *et al.* Nano-biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol composites with enhanced bioactivity for bone repair via low-temperature three-dimensional printing and loading with platelet-rich fibrin. *Int. J. Nanomedicine* 505–523 (2018).
34. Wong, K. V. & Hernandez, A. A Review of Additive Manufacturing. *ISRN Mech. Eng.* **2012**, 1–10 (2012).
35. Le Tohic, C. *et al.* Effect of 3D printing on the structure and textural properties of processed cheese. *J. Food Eng.* **220**, 56–64 (2018).
36. Sun, J., Zhou, W., Huang, D., Fuh, J. Y. H. & Hong, G. S. An Overview of 3D Printing Technologies for Food Fabrication. *Food Bioprocess Technol.* **8**, 1605–1615 (2015).
37. Lanaro, M., Desselle, M. R. & Woodruff, M. A. 3D printing chocolate: Properties of formulations for extrusion, sintering, binding and ink jetting. in *Fundamentals of 3D Food Printing and Applications* 151–173 (Elsevier, 2019).
38. Su, X., Wang, T. & Guo, S. Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field. *Regen. Ther.* **16**, 63–72 (2021).
39. Wegrzyn, T. F., Golding, M. & Archer, R. H. Food Layered Manufacture: A new process for constructing solid foods. *Trends Food Sci. Technol.* **27**, 66–72 (2012).
40. Shin, K., Acri, T., Geary, S. & Salem, A. K. Biomimetic Mineralization of Biomaterials Using Simulated Body Fluids for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Eng. Part A* **23**, 1169–1180 (2017).
41. Augst, A. D., Kong, H. J. & Mooney, D. J. Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromol. Biosci.* **6**, 623–633 (2006).
42. Bergamonti, L. *et al.* 3D printed chitosan scaffolds: A new TiO₂ support for the photocatalytic degradation of amoxicillin in water. *Water Res.* **163**, 114841 (2019).
43. Dai, L., Yu, H., Zhang, J. & Cheng, F. Preparation and characterization of cross-linked

- starch nanocrystals and self-reinforced starch-based nanocomposite films. *Int. J. Biol. Macromol.* **181**, 868–876 (2021).
44. Ergul, N. M. *et al.* 3D printing of chitosan/ poly(vinyl alcohol) hydrogel containing synthesized hydroxyapatite scaffolds for hard-tissue engineering. *Polym. Test.* **79**, 106006 (2019).
 45. Cui, N., Qian, J., Liu, T., Zhao, N. & Wang, H. Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **126**, 192–198 (2015).
 46. Roslan, M. R., Nasir, N. F. M., Cheng, E. M. & Amin, N. A. M. Tissue engineering scaffold based on starch: A review. in *International Conference on Electrical, Electronics, and Optimization Techniques (ICEEOT)* 1857–1860 (IEEE, 2016). doi:10.1109/ICEEOT.2016.7755010.
 47. Wiercigroch, E. *et al.* Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **185**, 317–335 (2017).
 48. Dharini, V., Periyar Selvam, S., Jayaramudu, J. & Sadiku Emmanuel, R. Functional properties of clay nanofillers used in the biopolymer-based composite films for active food packaging applications - Review. *Appl. Clay Sci.* **226**, 106555 (2022).
 49. Shi, Q., Shui, H., Chen, Q. & Li, Z.-Y. How does mechanical stimulus affect the coupling process of the scaffold degradation and bone formation: An in silico approach. *Comput. Biol. Med.* **117**, 103588 (2020).
 50. Baghaie, S., Khorasani, M. T., Zarrabi, A. & Moshtaghian, J. Wound healing properties of PVA/starch/chitosan hydrogel membranes with nano Zinc oxide as antibacterial wound dressing material. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **28**, 2220–2241 (2017).
 51. Waghmare, V. S. *et al.* Starch based nanofibrous scaffolds for wound healing applications. *Bioact. Mater.* **3**, 255–266 (2018).
 52. Shahriarpanah, S., Nourmohammadi, J. & Amoabediny, G. Fabrication and characterization of carboxylated starch-chitosan bioactive scaffold for bone regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.* **93**, 1069–1078 (2016).
 53. Koski, C. & Bose, S. Effects of amylose content on the mechanical properties of starch-hydroxyapatite 3D printed bone scaffolds. *Addit. Manuf.* **30**, 100817 (2019).
 54. Xie, F., Pollet, E., Halley, P. J. & Avérous, L. Starch-based nano-biocomposites. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 1590–1628 (2013).
 55. Maniglia, B. C., Castanha, N., Le-Bail, P., Le-Bail, A. & Augusto, P. E. D. Starch modification through environmentally friendly alternatives: a review. *Crit. Rev. Food Sci.*

- Nutr.* **61**, 2482–2505 (2021).
56. Zhu, F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. *Carbohydr. Polym.* **122**, 456–480 (2015).
 57. CEPEA. Centro de Estudos avançados em economia aplicada ESALQ/USP -Boletim da Mandioca. <https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/revista/pdf/0638505001602596446.pdf> (2020).
 58. Chan, H. *et al.* Molecular structure, rheological and thermal characteristics of ozone-oxidized starch. *Food Chem.* **126**, 1019–1024 (2011).
 59. CARGILL. Relatório Anual. http://www.cargill.com.br/wcm/fragments/csf_brazil_mag_resources/relatorio-anual-2012/index.html#page45 (2017).
 60. Maniglia, B. C. *et al.* Preparation of cassava starch hydrogels for application in 3D printing using dry heating treatment (DHT): A prospective study on the effects of DHT and gelatinization conditions. *Food Res. Int.* **128**, 108803 (2020).
 61. Oh, I. K., Bae, I. Y. & Lee, H. G. Effect of dry heat treatment on physical property and in vitro starch digestibility of high amylose rice starch. *Int. J. Biol. Macromol.* **108**, 568–575 (2018).
 62. Gou, M. *et al.* Effects of repeated and continuous dry heat treatments on properties of sweet potato starch. *Int. J. Biol. Macromol.* **129**, 869–877 (2019).
 63. Liu, K., Hao, Y., Chen, Y. & Gao, Q. Effects of dry heat treatment on the structure and physicochemical properties of waxy potato starch. *Int. J. Biol. Macromol.* **132**, 1044–1050 (2019).
 64. Zhou, Y. *et al.* Effects of repeated and continuous dry heat treatments on the physicochemical and structural properties of quinoa starch. *Food Hydrocoll.* **113**, 106532 (2021).
 65. Chi, C. *et al.* Dry heating and annealing treatment synergistically modulate starch structure and digestibility. *Int. J. Biol. Macromol.* **137**, 554–561 (2019).
 66. Lei, N. *et al.* Effect of dry heating treatment on multi-levels of structure and physicochemical properties of maize starch: A thermodynamic study. *Int. J. Biol. Macromol.* **147**, 109–116 (2020).
 67. Maniglia, B. C., Castanha, N., Le-Bail, P., Le-Bail, A. & Augusto, P. E. D. Starch modification through environmentally friendly alternatives: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **61**, 2482–2505 (2021).
 68. Nara, S. & Komiya, T. Studies on the relationship between water-saturated state and

- crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. *Starch - Stärke* **35**, 407–410 (1983).
69. Song, Y. & Jane, J. Characterization of barley starches of waxy, normal, and high amylose varieties. *Carbohydr. Polym.* **41**, 365–377 (2000).
 70. Maniglia, B. C. *et al.* Dry heating treatment: A potential tool to improve the wheat starch properties for 3D food printing application. *Food Res. Int.* **137**, 109731 (2020).
 71. Smith, R. J. Production and use of hypochlorite oxidized starches. *Starch Chem. Technol.* **2**, 620–625 (1967).
 72. Chattopadhyay, S., Singhal, R. S. & Kulkarni, P. R. Optimisation of conditions of synthesis of oxidised starch from corn and amaranth for use in film-forming applications. *Carbohydr. Polym.* **34**, 203–212 (1997).
 73. Martínez, C.; Cuevas, F. *Evaluación de la calidad culinaria y molinera del arroz. Guia de studio.* (CIAT, 1989).
 74. Zhang, Z., Liu, B. & Zhao, Z. (Kent). Efficient acid-catalyzed hydrolysis of cellulose in organic electrolyte solutions. *Polym. Degrad. Stab.* **97**, 573–577 (2012).
 75. Maniglia, B. C. *et al.* Pulsed electric fields (PEF) treatment to enhance starch 3D printing application: Effect on structure, properties, and functionality of wheat and cassava starches. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **68**, 102602 (2021).
 76. Lima, D. C. *et al.* Dual-process of starch modification: Combining ozone and dry heating treatments to modify cassava starch structure and functionality. *Int. J. Biol. Macromol.* **167**, 894–905 (2021).
 77. Castanha, N., Santos, D. N. e, Cunha, R. L. & Augusto, P. E. D. Properties and possible applications of ozone-modified potato starch. *Food Res. Int.* **116**, 1192–1201 (2019).
 78. Nowak, E., Khachatryan, G. & Wisła-Świder, A. Structural changes of different starches illuminated with linearly polarised visible light. *Food Chem.* **344**, 128693 (2021).
 79. Krystyjan, M., Gumul, D., Areczuk, A. & Khachatryan, G. Comparison of physico-chemical parameters and rheological properties of starch isolated from coloured potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and yellow potatoes. *Food Hydrocoll.* **131**, 107829 (2022).
 80. Barroso, A. G. & del Mastro, N. L. Physicochemical characterization of irradiated arrowroot starch. *Radiat. Phys. Chem.* **158**, 194–198 (2019).
 81. Dankar, I., Haddarah, A., Omar, F. E. L., Pujolà, M. & Sepulcre, F. Characterization of food additive-potato starch complexes by FTIR and X-ray diffraction. *Food Chem.* **260**, 7–12 (2018).
 82. Muscat, D., Adhikari, B., Adhikari, R. & Chaudhary, D. S. Comparative study of film

- forming behaviour of low and high amylose starches using glycerol and xylitol as plasticizers. *J. Food Eng.* **109**, 189–201 (2012).
83. Chuang, L., Panyoyai, N., Katopo, L., Shanks, R. & Kasapis, S. Calcium chloride effects on the glass transition of condensed systems of potato starch. *Food Chem.* **199**, 791–798 (2016).
 84. Jao, C.-L. & Ko, W.-C. 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fish. Sci.* **68**, 430–435 (2002).
 85. Hou, Q., Wang, X. & Ragauskas, A. J. Preparation and characterization of nanocellulose–polyvinyl alcohol multilayer film by layer-by-layer method. *Cellulose* **26**, 4787–4798 (2019).
 86. Xiong, J., Li, Q., Shi, Z. & Ye, J. Interactions between wheat starch and cellulose derivatives in short-term retrogradation: Rheology and FTIR study. *Food Res. Int.* **100**, 858–863 (2017).
 87. Hizukuri, S., Abe, J. & Hanashiro, I. Starch: analytical aspects. *FOOD Sci. Technol. YORK-MARCEL DEKKER* **159**, 305 (2006).
 88. Dai, L., Qiu, C., Xiong, L. & Sun, Q. Characterisation of corn starch-based films reinforced with taro starch nanoparticles. *Food Chem.* **174**, 82–88 (2015).
 89. Balet, S., Guelpa, A., Fox, G. & Manley, M. Rapid Visco Analyser (RVA) as a tool for measuring starch-related physiochemical properties in cereals: A review. *Food Anal. Methods* **12**, 2344–2360 (2019).
 90. Castanha, N., Matta Junior, M. D. da & Augusto, P. E. D. Potato starch modification using the ozone technology. *Food Hydrocoll.* **66**, 343–356 (2017).
 91. Cozzolino, D. The use of the rapid visco analyser (RVA) in breeding and selection of cereals. *J. Cereal Sci.* **70**, 282–290 (2016).
 92. Gałkowska, D. & Juszczak, L. Effects of amino acids on gelatinization, pasting and rheological properties of modified potato starches. *Food Hydrocoll.* **92**, 143–154 (2019).
 93. Lille, M., Nurmela, A., Nordlund, E., Metsä-Kortelainen, S. & Sozer, N. Applicability of protein and fiber-rich food materials in extrusion-based 3D printing. *J. Food Eng.* **220**, 20–27 (2018).
 94. de Goede, T. C., de Bruin, K. G. & Bonn, D. High-velocity impact of solid objects on Non-Newtonian Fluids. *Sci. Rep.* **9**, 1–8 (2019).
 95. Le-Bail, A., Maniglia, B. C. & Le-Bail, P. Recent advances and future perspective in additive manufacturing of foods based on 3D printing. *Curr. Opin. Food Sci.* **35**, 54–64 (2020).

96. Cheng, Y.-L. & Chen, F. Preparation and characterization of photocured poly (ϵ -caprolactone) diacrylate/poly (ethylene glycol) diacrylate/chitosan for photopolymerization-type 3D printing tissue engineering scaffold application. *Mater. Sci. Eng. C* **81**, 66–73 (2017).
97. Tomašević, I. *et al.* 3D printing as novel tool for fruit-based functional food production. *Curr. Opin. Food Sci.* **41**, 138–145 (2021).
98. Guo, C., Zhang, M., Bhandari, B. & Devahastin, S. Investigation on simultaneous change of deformation, color and aroma of 4D printed starch-based pastes from fruit and Vegetable as induced by microwave. *Food Res. Int.* **157**, 111214 (2022).
99. Chuanxing, F., Qi, W., Hui, L., Quancheng, Z. & Wang, M. Effects of Pea Protein on the Properties of Potato Starch-Based 3D Printing Materials. *Int. J. Food Eng.* **14**, (2018).
100. Sartori, A. G. de O. *et al.* Anthocyanin bioaccessibility and anti-inflammatory activity of a grape-based 3D printed food for dysphagia. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **84**, 103289 (2023).
101. Guedes, J. S. *et al.* Structural modification on potato tissue and starch using ethanol pre-treatment and drying process. *Food Struct.* **29**, 100202 (2021).
102. Zhao, Z. *et al.* Synergistic effect of microwave 3D print and transglutaminase on the self-gelation of surimi during printing. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **67**, 102546 (2021).
103. Nogueira, L. F. B. *et al.* Collagen/ κ -Carrageenan-Based Scaffolds as Biomimetic Constructs for In Vitro Bone Mineralization Studies. *Biomacromolecules* **24**, 1258–1266 (2023).
104. Sung, H.-J., Meredith, C., Johnson, C. & Galis, Z. S. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* **25**, 5735–5742 (2004).
105. Huang, T. *et al.* 3D-printed scaffolds of biomineralized hydroxyapatite nanocomposite on silk fibroin for improving bone regeneration. *Appl. Surf. Sci.* **467–468**, 345–353 (2019).
106. Won, S., Choi, W., Lim, H. S., Cho, K. & Lim, S. Viscoelasticity of cowpea starch gels. *Cereal Chem.* **77**, 309–314 (2000).
107. Qasim, M., Chae, D. S. & Lee, N. Advancements and frontiers in nano-based 3d and 4d scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* **14**, 4333–4351 (2019).
108. Felfel, R. M., Gideon-Adeniyi, M. J., Zakir Hossain, K. M., Roberts, G. A. F. & Grant, D. M. Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. *Carbohydr. Polym.* **204**, 59–67 (2019).
109. Liu, Y., Luo, D. & Wang, T. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue

- Engineering. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* vol. 12 4611–4632 (2016).
110. Mota, J. *et al.* Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration. *Acta Biomater.* **8**, 4173–4180 (2012).
 111. Fang, W. *et al.* Hydroxyapatite Crystal Formation in the Presence of Polysaccharide. *Cryst. Growth Des.* **16**, 1247–1255 (2016).
 112. Pierantozzi, D. *et al.* 3D printed Sr-containing composite scaffolds: Effect of structural design and material formulation towards new strategies for bone tissue engineering. *Compos. Sci. Technol.* **191**, 108069 (2020).
 113. Palhares, T. N. *et al.* Production and Characterization of Poly (Lactic Acid)/Nanostructured Carboapatite for 3D Printing of Bioactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *3D Print. Addit. Manuf.* **8**, 227–237 (2021).