

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta Dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/11/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

**ESTUDO DA ESTERILIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* PARA REGENERAÇÃO DO
TECIDO ÓSSEO**

ERIC MARK FRANCISCO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi

ARARAQUARA – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ESTUDO DA ESTERILIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* PARA REGENERAÇÃO DO
TECIDO ÓSSEO**

ERIC MARK FRANCISCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi

ARARAQUARA – SP

2019

F818e Francisco, Eric Mark.
Estudo da esterilização de *Scaffolds* para regeneração do tecido ósseo / Eric Mark Francisco. – Araraquara: [S.n.], 2019.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Antonio Carlos Guastaldi.

1. Esterilização. 2. *Scaffolds*. 3. Fosfatos de cálcio. 4. Celulose bacteriana. 5. I. Guastaldi, Antonio Carlos, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDO DA ESTERILIZAÇÃO DE SCAFFOLDS PARA REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

AUTOR: ERIC MARK FRANCISCO

ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS GUASTALDI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. JORGE ENRIQUE RODRIGUEZ CHANFRAU
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - Câmpus de Araraquara - UNESP

Profa. Dra. JANAINA HABIB JORGE
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Araraquara, 22 de novembro de 2019

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Angela Rita, a maior mestra da minha vida, que me incentivou nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Ao meu pai Altair Francisco, que é a minha inspiração e talvez eu não consiga ser metade do que ele é, ou talvez um dia eu consiga olhar no espelho e ver que me tornei quem eu mais admirava.

Aos meus irmãos Kelly e Alex, que nos momentos de minha ausência dedicados aos estudos, torceram pelo meu sucesso.

À Paula Scanavez, pela paciência, pelo apoio e por acreditar em mim. Uma pessoa que eu tenho um carinho enorme e se hoje sou mestre eu devo muito a ela.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi, pela oportunidade e pelas suas precisas pontuações para à elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Enrique Rodriguez Chanfrau, que compartilhou os seus conhecimentos, pelo suporte, pelas suas correções e por me proporcionar caráter no processo de formação profissional.

À Profa. Dra. Janaina Habib Jorge e a Jacqueline de Oliveira Zocolotti, pelas análises microbiológicas e pelo empenho dedicado, que sem dúvida foram essenciais para realização deste trabalho.

Aos amigos Beatriz Ambrozini, Thales Pelizaro e Elisabeth Pizoni, do Grupo de Biomateriais do Instituto de Química, Campus de Araraquara – UNESP, pela ajuda, incentivos e conselhos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara – UNESP e seus colaboradores, Claudia Lúcia Molina, Aniele Vilella, Larissa Trindade e Vanessa Peixoto, pelo suporte técnico.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“Irmão, você não percebeu que você é o único representante do seu sonho na face da terra. Se isso não fizer você correr, chapa, eu não sei o que vai”.

Emicida

RESUMO

ESTUDO DA ESTERILIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* PARA REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

O desenvolvimento de biomateriais para a regeneração de tecidos é de grande importância e sua demanda aumenta a cada dia, devido ao aumento do envelhecimento da população, da expectativa e qualidade de vida, bem como ao aumento das taxas de acidentes (trânsito e violência). Os *Scaffolds* são uma estrutura tridimensional, projetada para suportar infiltração, crescimento e diferenciação celular, a fim de melhorar o desenvolvimento e a formação de novos tecidos. Muitos biomateriais podem ser usados para fabricar essas estruturas, como as biocerâmicas e biopolímeros. No entanto, poucos estudos foram realizados para avaliar sua contaminação microbiológica e a influência dos métodos de esterilização podem ter sobre a estrutura e propriedades dos implantes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades mecânicas, físico-químicas e microbiológicas, antes e após três métodos de esterilização. Esses *Scaffolds* foram feitos de celulose bacteriana, alginato de sódio e fosfato de cálcio amorfo. Os *Scaffolds* foram elaborados mediante processo de liofilização. Eles foram divididos em quatro grupos: um grupo controle e três diferentes métodos de esterilização (esterilização a vapor, esterilização por irradiação ultravioleta e esterilização por micro-ondas). O número de colônias viáveis (UFC/mL) foi obtido através do plaqueamento das amostras em Ágar Dextrose Sabouraud com Cloranfenicol (SDA), Ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI), Chromagar e Ágar Sangue. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente. Para avaliar se o processo de esterilização afetou a estrutura e composição química dos *Scaffolds*, as amostras correspondentes a cada grupo foram caracterizadas por Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados mostraram que a esterilização a vapor foi eficaz na eliminação de micro-organismos, enquanto a esterilização por micro-ondas, diminuiu significativamente o número de UFC/mL, e a ultravioleta não demonstrou ação esterilizante. Conclui-se que o processo de esterilização a vapor foi o mais efetivo, não observando mudanças na estrutura e composição dos *Scaffolds*.

Palavras-chave: Esterilização. *Scaffolds*. Fosfatos de cálcio. Celulose bacteriana.

ABSTRACT

SCAFFOLDS STERILIZATION STUDY FOR BONE TISSUE REGENERATION

The development of biomaterials for the regeneration of tissues is of great importance and their demand increases every day, due to the increase of the aging population, of the expectation and quality of life, as well as the increase of the accident rates (traffic and violence). *Scaffolds* are a three-dimensional structure designed to withstand cellular infiltration, growth and differentiation in order to improve the development and formation of new tissues. Many biomaterials can be used to make these structures, such as bioceramics and biopolymers. However, few studies have been conducted to evaluate its microbiological contamination and the influence of sterilization methods may have on the structure and properties of implants. Thus, the aim of this work was to evaluate the mechanical, physicochemical and microbiological properties of *Scaffolds*, before and after three different sterilization methods. These *Scaffolds* were made of bacterial cellulose, sodium alginate and amorphous calcium phosphate. *Scaffolds* were made by lyophilization process. They were divided into four groups: a control group and three different sterilization techniques (steam sterilization, sterilization by ultraviolet irradiation and microwave sterilization). The number of viable colonies (CFU/mL) was obtained by plating the samples in Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol (SDA), Brain and Heart Infusion Agar (BHI), Chromagar and Blood Agar. All experiments were performed in triplicate and analyzed statistically. Later, the samples were characterized by X-ray Diffraction (XRD), Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR) and Microscopy Scanning Electronics (SEM) in order to evaluate if the sterilization process affected the structure and chemical composition of the *Scaffolds*. The results showed that steam sterilization was effective in eliminating the microorganisms, whereas microwave sterilization significantly reduced the number of CFU/mL, and ultraviolet did not demonstrate sterilizing efficacy. It was concluded that the steam sterilization process was the most effective, not observing changes in the structure and composition of the *Scaffolds*.

Keywords: Sterilization. *Scaffolds*. Calcium phosphates. Bacterial cellulose.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Composição química do tecido ósseo.....**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 2 - Classificação dos biomateriais de acordo com seu comportamento fisiológico.....**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 3 - Capacidade de inativar micro-organismos pelas diferentes técnicas de esterilização**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 4 - Vantagens e desvantagens dos métodos de esterilização**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 5 - Resultado da viscosidade da tinta e dureza dos *Scaffold* obtidos..... **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 6 - Resultados microbiológicos em meio Ágar Sangue**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 7 - Resultados microbiológicos em meio BHI ...**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 8 - Resultados da comparação estatística entre as réplicas de cada grupo**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 9 - Valores médios da análise das amostras tratadas com diferentes técnicas de esterilização**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura óssea **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2 - Canal de Havers e canal de Volkmann..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3 - Principais tipos de células ósseas..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4 - Conceito de Engenharia de Tecidos **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5 - Diferenciação das células-tronco **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6 - Células-tronco embrionárias sendo extraída do blastocisto **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7 - Obtenção de células-tronco adultas..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8 - Reprogramação das células da pele através da inserção dos vetores virais **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9 - Diferenciação da célula hematopoiética..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10 - Célula mesenquimatosa e suas diferenciações **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 11 - Coração artificial constituído por biomaterial **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12 - *Scaffolds* obtidos por: (a) liofilização (b) impressão tridimensional - 3D **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13 - Região das micro-ondas no espectro eletromagnético **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 14 - Diagrama da síntese de fosfato de cálcio amorfo **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 15 - Pó de fosfato de cálcio amorfo..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 16 - Diagrama de trabalho estabelecido para determinar a concentração de celulose bacteriana (CB) na tinta (AS: alginato de sódio. ACP: fosfato de cálcio amorfo)..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 17 - Diagrama da confecção dos *Scaffolds* (AS: alginato de sódio; CB: celulose bacteriana; ACP: fosfato de cálcio amorfo) **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 18 - Difratoograma de Raios-X da amostra sintetizada (DCPD: monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado; OCP: fosfato octa-cálcico; HA: hidroxiapatita; ACP: fosfato de cálcio amorfo) **Erro! Indicador não definido.**

- Figura 19 - Transformações de fases de fosfatos de cálcio intermediárias como as fases brushita (DCPD), fosfato octa-cálcico (OCP), monetita (DCPA) na formação de hidroxiapatita (HA).....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 20 - Espectro de FTIR da amostra sintetizada ..**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 21 - Micrografia MEV da amostra sintetizada (a = 2000X e b = 100000X) **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 22 - Espectro de FTIR de ACP e Tinta contendo celulose bacteriana e fosfato de cálcio amorfo**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 23 - Avaliação microbiológica (Meios de cultura: a. Ágar Sangue; b. BHI; c. Chromagar; d. SDA).....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 24 - Gráfico Q-Q Plot da avaliação no meio Ágar Sangue**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 25 - Gráfico de dispersão no meio Ágar Sangue**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 26 - Gráfico de comparação mediana aplicando o teste de Kruskal Wallis**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 27 - Gráfico Q-Q Plot da avaliação no meio BHI**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 28 - Gráfico de dispersão no meio BHI**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 29 - Gráfico de comparação de medianas aplicando o teste de Kruskal Wallis**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 30 - Espectro de FTIR das amostras tratadas com os diferentes métodos de esterilização e amostra controle (Controle: sem esterilização; MW: micro-ondas; UV: ultravioleta).....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 31 - Micrografia MEV das amostras tratadas (b: MW; c: UV e d: Vapor) e a amostra controle (a) em 1000X**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 32 - Resultados do estudo de aplicação da MW**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 33 - Gráfico de tensão versus deformação das amostras não esterilizadas (esquerda) e esterilizadas (direita)**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 34 - Micrografia MEV das amostras antes (a e c) e depois (b e d) do teste mecânico. (a e b amostras não esterilizadas; c e d amostras esterilizadas) em 300X**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP: Fosfato de Cálcio Amorfo

AS: Alginato de Sódio

BHI: Ágar Infusão Cérebro e Coração

CAD: *Computer Aided Designs*

CB: Celulose Bacteriana

DRX: Difração de Raios-X

EtO: Óxido de Etileno

FTIR: Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

HA: Hidroxiapatita

iPS: *Induced Pluripotent Stem Cells*

MA: Manufatura Aditiva

Me.PEG-PLA: Poli (ácido láctico) - Poli (etileno glicol) - Monometil Éter

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MSCs: Células Estaminais Mesenquimatosas

MW: Micro-ondas

OCP: Fosfato Octa-Cálcico

PAA: Ácido Peracético

PEG: Polietileno Glicol

PGA: Poli (ácido glicólico)

PLA: Poli (ácido láctico)

PLGA: [poli (ácido láctico-co-glicólico)]
 RM: Ressonância magnética
 sCO₂: Dióxido de Carbono Supercrítico
 SDA: Ágar Dextrose Sabouraud com Cloranfenicol
 STL: *Standard Triangle Language*
 TC: Tomografia Computadorizada
 TCP: Fosfato Tri-Cálcico
 Tg: Transição Vítreas
 UFC: Unidade Formadora de Colônia
 UNESP: Universidade Estadual Paulista
 UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
SUMÁRIO.....	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	Erro! Indicador não definido.
3.1 Osso	Erro! Indicador não definido.
3.1.1 Estrutura óssea	Erro! Indicador não definido.
3.1.2 Formação óssea.....	Erro! Indicador não definido.
3.2 Medicina Regenerativa.....	Erro! Indicador não definido.
3.3 Engenharia de Tecidos.....	Erro! Indicador não definido.
3.3.1 Células	Erro! Indicador não definido.
3.3.2 Biomateriais.....	Erro! Indicador não definido.
3.3.3 <i>Scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
3.4 Métodos de esterilização.....	Erro! Indicador não definido.
3.4.1 Esterilização por micro-ondas	Erro! Indicador não definido.

- 3.4.2 Esterilização por vapor **Erro! Indicador não definido.**
- 3.4.3 Esterilização por irradiação ultravioleta **Erro! Indicador não definido.**
4. MATERIAIS E MÉTODOS..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.1 Materiais..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.2 Etapas de desenvolvimento do trabalho **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3 Procedimento experimental..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.1 Obtenção de fosfato de cálcio amorfo (ACP) **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.1.1 Caracterização do fosfato de cálcio amorfo (ACP)..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.1.1.1 Difração de Raios X (DRX)..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.1.1.2 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.1.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) . **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.2 Elaboração da tinta **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.2.1 Estabelecimento da concentração adequada de alginato de sódio (AS) . **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.2.2 Estabelecimento da concentração adequada de celulose bacteriana (CB) **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.2.3 Caracterização da tinta..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.3 Confecção de *Scaffolds*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.3.1 Caracterização dos *Scaffolds*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.3.1.1 Determinação da dureza Shore A **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.4 Estudo da esterilização **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.4.1 Esterilização por micro-ondas **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.4.2 Esterilização por vapor **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.4.3 Esterilização por irradiação ultravioleta **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.4.4 Avaliação microbiológica **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.4.5 Estudo estatístico **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.4.6 Caracterização dos *Scaffolds* após esterilização **Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.3.1.2 Teste mecânico **Erro! Indicador não definido.**
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.1 Caracterização do fosfato de cálcio amorfo (ACP). **Erro! Indicador não definido.**
- 5.2 Caracterização da tinta..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.2.1 Estabelecimento da concentração adequada de alginato de sódio (AS) **Erro! Indicador não definido.**
- 5.2.2 Estabelecimento da concentração adequada de celulose bacteriana (CB). **Erro! Indicador não definido.**
- 5.3 Estudo da esterilização **Erro! Indicador não definido.**

5.3.1 Avaliação microbiológica	Erro! Indicador não definido.
5.3.2 Estudo estatístico	Erro! Indicador não definido.
5.3.3 Caracterização dos <i>Scaffolds</i> após esterilização .	Erro! Indicador não definido.
5.3.4 Estudo da influência da aplicação de MW ao longo do tempo ...	Erro! Indicador não definido.
5.3.5 Teste mecânico	Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÃO.....	18
8. REFERÊNCIAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos tipos de tratamento para regeneração tecidual é uma área de grande impacto social, visto que uma proporção significativa das doenças crônicas progressivas é representada pelas doenças degenerativas, as quais podem não apresentar abordagens terapêuticas eficazes, resultando em aumento da morbidade populacional. O tecido ósseo tem a capacidade de regeneração, porém é limitada com o tamanho da lesão, assim defeitos ósseos grandes não se regeneram espontaneamente (MCNAMARA *et al.*, 2014). O preenchimento de defeitos com osso do próprio paciente, de doadores ou por próteses sintéticas são opções de tratamento regenerativo. No entanto, esta prática de substituição por enxertos é restrita devido à quantidade limitada de tecido, ausência de biocompatibilidade, infecção e rejeição imunológica (SOWJANYA *et al.*, 2013; CUERVO-LOZANO *et al.*, 2018). Já as próteses apresentam limitações por não terem como funcionalidade a regeneração, mas sim uma estruturação mecânica.

O número significativo de pessoas que sofrem destes problemas, assim como os consequentes custos socioeconômicos, evidenciam a necessidade do desenvolvimento de terapias alternativas para a solução destas perdas. Com o intuito de aumentar a expectativa e qualidade de vida da população, a Engenharia de Tecidos busca desenvolver novos sistemas para atuarem como suporte artificial temporário para regeneração de órgãos e tecidos que tenham sofrido algum dano. Nessa perspectiva os biomateriais são exemplos de materiais com resultados promissores para aplicação em dispositivos médicos ou estruturas para regeneração do tecido ósseo. As principais classes de materiais utilizados na composição dos biomateriais são: metais, polímeros, compósitos e cerâmicos. Em virtude da boa biocompatibilidade, adequada resistência mecânica e dureza, as biocerâmicas e os biopolímeros têm recebido destaque na área médica, contudo, ambos apresentam limitações como alta densidade e liberação de partículas, respectivamente (KAWACHI *et al.*, 2000). Os biomateriais formados a partir de compósitos tem o intuito de superar essas limitações, pois se trata da combinação de materiais de diferentes características, resultando em uma associação com propriedades superior à dos materiais atuando individualmente (CHEN *et al.*, 2012).

A Engenharia de Tecidos tem desenvolvido uma alternativa para promover a regeneração tecidual óssea, designada por *Scaffolds*, os quais são estruturas tridimensionais biodegradáveis, constituídos pelos diferentes biomateriais, que funcionam como suporte para o crescimento celular, podendo ocorrer *in vivo* ou *in vitro*. Dessa maneira auxiliam na agregação, proliferação e diferenciação celular, promovendo um ambiente adequado para deposição da nova matriz extracelular óssea, e conseqüentemente, para regeneração de tecido ósseo (MORENO, 2014). Uma das vantagens na utilização dessas estruturas é sua completa degradação ao longo do tempo, eliminando a necessidade de cirurgia para a recuperação do implante, permitindo uma recuperação mais rápida no local da lesão (DAI *et al.*, 2016). Uma vez que os *Scaffolds* são constituídos por biomateriais estes precisam apresentar características semelhantes para a utilização em sistemas biológicos, como biocompatibilidade, taxa de degradação adequada, porosidade, além de propriedades mecânicas, físicas e químicas à adesão de células e formação de novo tecido (FONTES, 2010). Portanto, a escolha dos biomateriais mais adequados para a produção de um *Scaffold*, capaz de cumprir todos esses requisitos é um passo crítico a ser estudado e continua sendo objeto de pesquisas para a Medicina Regenerativa (GAUTAM *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2017).

No que se refere à fabricação dos *Scaffolds*, estes podem ser produzidos via método convencional (liofilização, lixiviação, formação de espumas, e separação de fases) ou via prototipagem rápida (impressão tridimensional - 3D, estereolitografia, sinterização laser e extrusão). Enquanto a metodologia convencional não permite o controle da arquitetura interna do *Scaffolds* ou um alto controle de sua porosidade, a prototipagem rápida atua de maneira contrária, proporcionando a fabricação de *Scaffolds* de geometria complexa, com maior controle da porosidade e arquitetura interna (MA, 2004).

Além dos métodos de fabricação, outra etapa essencial é a esterilização, pois, devido às propriedades biológicas que os biomateriais utilizados precisam apresentar, estas estruturas tornam-se alvo de contaminação microbiológica, associada à sua utilização *in vivo*. A esterilização é um processo pelo qual um produto torna-se livre de contaminação de micro-organismos vivos. Quando se esterilizam estruturas biodegradáveis, a técnica de esterilização escolhida deve manter as propriedades estruturais e bioquímicas dos *Scaffolds*, garantindo que cumprirão as finalidades pretendidas após a esterilização. Essas estruturas podem

ser contaminadas por uma ampla gama de micro-organismo, como vírus, fungos e bactérias. Esses micro-organismos podem causar infecções e doenças, por exemplo, tétano, gripe, AIDS, febre amarela, candidíase e histoplasmose (COGLIATI, 2013). De acordo com as características morfológicas, cada micro-organismo apresenta um nível de resistência a esterilização. De acordo com DAI *et al.* (2016) em termos de resistência às esterilizações, na ordem de alto a baixo, os esporos bacterianos mostraram ser os mais resistentes, seguidos por micobactérias, vírus sem envelope, fungos, bactérias e vírus envelopados. Estão sendo testadas técnicas de esterilização, como iodo, ácido peracético (PAA) e alguns métodos recentemente desenvolvidos, como liofilização e dióxido de carbono supercrítico (sCO₂). Por exemplo, Jimenez *et al.* (2008) avaliaram a eficácia da esterilização do sCO₂ no poli (acrilacido-co-acrilamida), um modelo de biomaterial hidrogel, e relataram que a uma pressão de 27,6 MPa e a uma temperatura de 40°C, o hidrogel era efetivamente esterilizado.

Portanto, considerando a importância da utilização de suportes estéreis em ambientes biológicos e a crescente demanda por implantes para regeneração óssea, este trabalho tem o objetivo de estudar as propriedades mecânicas, físico-químicas e microbiológicas, antes e após três métodos de esterilização, em *Scaffolds* constituídos de celulose bacteriana, alginato de sódio e fosfato de cálcio amorfo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Estudar as propriedades mecânicas, físico-químicas e microbiológicas, antes e após três metodologias de esterilização sobre *Scaffolds* feitos de celulose bacteriana, alginato de sódio e fosfato de cálcio amorfo, visando a aplicação destes na regeneração óssea.

2.2 Específicos

- Produzir fosfato de cálcio amorfo a escala de banco e caracterizar mediante Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

- Elaborar uma tinta à base de alginato de sódio, celulose bacteriana e fosfato de cálcio amorfo e caracterizar através de Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), viscosidade e estudo de estabilidade.
- Confeccionar *Scaffolds* por processo de liofilização e caracterizar por meio de Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), dureza e prova mecânica.
- Estudar a efetividade da esterilização por micro-ondas, vapor e por irradiação ultravioleta sobre os *Scaffolds*. Caracterizar os *Scaffolds* após a esterilização por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e testes mecânicos.

6. CONCLUSÃO

- Elaborou-se a escala de banco da fase fosfato de cálcio amorfo que cumpre com os parâmetros de qualidade dos mesmos segundo a caracterização realizada.
- Estabeleceu-se um procedimento tecnológico que permite obter tintas de alginato de sódio, celulose bacteriana e fosfato de cálcio amorfo com uma viscosidade adequada.
- A partir da tinta elaborada se obteve *Scaffolds* por liofilização e os mesmos cumpriram com os parâmetros de dureza.
- Estudaram-se três processos de esterilização em *Scaffolds*, realizando-se a avaliação microbiológica em quatro meios de cultivos.
- Nas amostras avaliadas não houve crescimento de fungos.
- O método de esterilização por Vapor elimina totalmente a carga microbiana nos meios avaliados
- O método de esterilização por MW teve uma redução logarítmica igual a 1 nas condições estudadas.
- Método de esterilização por UV não diminui a carga microbiana nas amostras avaliadas;
- As técnicas de esterilização não afetam de maneira geral as propriedades físico-químicas dos *Scaffolds* estudados;
- Um aumento no tempo de exposição à radiação no MW diminui a carga microbiana nas amostras nas condições de trabalho estabelecidas, porém modifica o material.
- As metodologias de esterilização por Vapor, nas condições avaliadas neste trabalho, não afetam as propriedades mecânicas dos *Scaffolds*.

8. REFERÊNCIAS

ALLO, B. A. *et al.* Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 3, n. 2, p. 432-463, 2012.

ARIFUZZAMAN, S. M.; ROHANI, S. Experimental study of brushite precipitation. **Journal of Crystal Growth**, v. 267, p. 624-634, 2004.

AVENDAÑO ROMERO G.C. *et al.* Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. **Temas selectos de ingeniería de alimentos**. v. 7, n. 1, p. 87-96, 2013.

BABU, R. S. A.; OGLE, O. Tissue response: Biomaterials, dental implants, and compromised osseous tissue. **Dental Clinics of North America**, v. 59, n. 2, p. 305-315, 2015.

BANIK, S. *et al.* Bioeffects of microwave — a brief review. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 155-159, 2003.

CARREIRA, A. C. *et al.* Bone morphogenetic proteins: Facts, challenges, and future perspectives. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 4, p. 335-345, 2014.

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Materiais avançados no Brasil 2010-2022. Brasília (DF), p.360, 2010.

CHATZINIKOLAIDOU, M. *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) immobilized on laser-fabricated 3D scaffolds enhance osteogenesis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 149, p. 233-242, 2017.

CHEN, L. *et al.* Preparation and evaluation of collagen-silk fibroin / hydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 1-7, 2014.

CHEN, Q. *et al.* Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. **Progress in Biomaterials**, v. 1, n. 1, p. 2, 2012.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* : An Atlas of the Molecular Types. v. 2013, n. serotype D, 2013.

CRIOVIDA. **Células Estaminais**. Disponível em: <http://www.criovida.pt/celulas-estaminais/>. Acesso em: 20 mai. 2019.

CUERVO-LOZANO, C. E. *et al.* Osteogenesis induced by a three-dimensional bioimplant composed of demineralised bone matrix, collagen, hydroxyapatite, and bone marrow-derived cells in massive bone defects: An experimental study. **Tissue and Cell**, v. 50, p. 69-78, 2018.

DAAR, A. S.; GREENWOOD, H. L. A proposed definition of regenerative medicine. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 1, n. April, p. 179-184, 2007.

DAI, Z. *et al.* Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. **Journal of Tissue Engineering**, v. 7, p. 1-13, 2016.

DUNSMUIR, R. A.; GALLACHER, G. Microwave Sterilization of Femoral Head Allograft. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4755-4757, 2003.

ETH ZURICH. **Testing a soft artificial heart**. Disponível em: https://www.ethz.ch/en/news-and-events/eth_news/news/2017/07/artificial_heart.html. Acesso em: 30 mai. 2019.

FERNANDEZ-YAGUE, M. A. *et al.* Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, p. 1-29, 2014.

FERREIRA, H. A. *et al.* Magnetic Resonance Imaging - a powerful tool for Tissue Engineering . An updated review. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 2, n. 9, p. 159-165, 2012.

FIDELES, T. B. **Desenvolvimento de scaffolds de quitosana para aplicação na engenharia de tecidos**. 121 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

FISCHBACH, C. *et al.* Does UV irradiation affect polymer properties relevant to tissue engineering? **Surface Science**, v. 491, p. 333-345, 2001.

FONTES, R. A. M. **Fabrico e Caracterização de Scaffolds à Base de Fosfatos de Cálcio**. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Mecânica, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

GAO, Y. *et al.* Isolation and multiple differentiation potential assessment of human gingival mesenchymal stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 20982-20996, 2014.

GAUTAM, S. *et al.* Fabrication and characterization of PCL / gelatin composite nano fibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. **Materials Science & Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1228-1235, 2013.

GIMENES, R. **Preparação e Caracterização de Compósitos Polímero/Cerâmica com Potencial de Aplicações Médicas**. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2001.

GOLCHIN, A.; FARAHANY, T. Z. Biological Products: Cellular Therapy and FDA Approved Products. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 15, n. 2, p. 166-175, 2019.

GOUDARZI, F. *et al.* Combined effect of retinoic acid and calcium on the in vitro differentiation of human adipose-derived stem cells to adipocytes. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 2, p. 109-118, 2017.

GU, Q. *et al.* Macrophages and bone inflammation. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 10, p. 86-93, 2017.

HAN, J. *et al.* Alginate-chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 2, p. 199-205, 2010.

HANKENSON, K. D. *et al.* Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 94, p. 3-12, 2015.

JAYA, S. *at al.* Influence of processing methods on mechanical and structural characteristics of vacuum microwave dried biopolymer foams. **Food Bioprod Process, Trans IChem E: Pt C**; v. 85, n. C3, p. 1-9, 2007.

JIMÉNEZ, A. *et al.* Evaluation of CO₂-based cold sterilization of a model hydrogel. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, p. 1344–1352, 2008.

JIN, J. *et al.* Transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells in a silk fibroin/hydroxyapatite scaffold improves bone repair in rabbits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 5, p. 593-598, 2014.

JUDAS, F. *et al.* **Estrutura e Dinâmica do Tecido Ósseo**. Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina. Disciplina de Ortopedia - Clínica Universitária de Ortopedia dos HUC-CHUC, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, p. 1-51, 2012.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. *Histologia e Embriologia Oral*. 3^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 381, 2012.

KAWACHI, E. Y. *et al.* Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KIM, H. L. *et al.* Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 54, p. 20-25, 2015.

KONOPNICKI, S. *et al.* Tissue-engineered bone with 3-dimensionally printed β -tricalcium phosphate and polycaprolactone scaffolds and early implantation: An in vivo pilot study in a porcine mandible model. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 73, n. 5, p. 1016.e1-1016.e11, 2015.

KOUTCHMA, T. *et al.* Comparative experimental evaluation of microbial destruction in continuous-flow microwave and conventional heating systems. **Canadian Biosystems Engineering**, p. 1-8, 2001.

MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 30-40, 2004.

MARTINS, M. J. R. **Fabricação pelo processo de sinterização e caracterização de scaffolds de PLLA, PLLA/HA e PLLA/ β -TCP**. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MCDONNELL, G.; SHEARD, D. A practical guide to decontamination in healthcare. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2012. e-book, p. 460. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118321287>.

MCNAMARA, S. L. *et al.* Silk as a bioadhesive sacrificial binder in the fabrication of hydroxyapatite load bearing scaffolds. **Biomaterials**, v. 35, n. 25, p. 6941-6953, 2014.

MORENO, M. S. **Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo**. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

NAPOLITANO, M. A. **Obtenção e Caracterização de Compósitos de Fosfatos de Cálcio com Ácido Polilático e Impressão 3D para Produção de Biomateriais Visando Aplicações Médicas e Odontológicas**. 122 f. Tese (Doutorado) – Curso de Química, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

NEREM, R. M. Regenerative medicine: The emergence of an industry. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. Suppl. 6, 2010.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 28-36, 2010.

OLIVEIRA G. M. *et al.* Physical Chemistry Properties Influences in Bacterial Cellulose Biocomposites. **Journal of Bionanoscience**, v. 11, n. 6, p. 573-577, 2017.

ONTES, R. A. M. **Fabrico e Caracterização de Scaffolds à Base de Fosfatos de Cálcio**. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia Mecânica, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

PATI, F. *et al.* Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 37, p. 230-241, 2015.

PAVINATO, V. P. **Estudo da solubilidade de apatitas em meios de interesse biológico**. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

PELIZARO T. A. G. *et al.* Influence of the application of ultrasound during the synthesis of calcium phosphates. **Journal of Bionanoscience**, v. 12, n.1, p. 733-738, 2018.

PELIZARO, T. A. G.; RODRÍGUEZ-CHANFRAU, J. E.; GUASTALDI A. C. **Evaluation of tray drying on the particle size in the synthesis of three phases apatites**. In: 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO, 5ª Edição do Workshop de

Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais – OBI, Metallum Eventos Técnico e Científicos, p. 140-146, Maresias, 2017b.

PELIZARO, T. A. G.; RODRÍGUEZ-CHANFRAU, J. E.; GUASTALDI A. C. Use of ultrasound in the synthesis of apatite. In: 14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO, 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais – OBI, Metallum Eventos Técnico e Científicos, p. 134-139, Maresias, 2017a.

PETRICCIANI, J. *et al.* Scientific considerations for the regulatory evaluation of cell therapy products. **Biologicals**, v. 50, p. 20-26, 2017.

PIRES, G. **Biomateriais derivados de quitosana e hidroxiapatita com potencial para preenchimento ósseo.** 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PITTELLA, C. Q. **Desenvolvimento de Scaffold de Nanocelulose Bacteriana com Modificação de Superfície para Aplicações Tópicas.** 144 f. Tese (Doutorado) – Curso de Engenharia Química, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2017.

POLAK, D. J. Regenerative medicine. Opportunities and challenges: A brief overview. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. Suppl. 6, 2010.

PRESCOTT L, *et al.* **Laboratory Exercises in Microbiology.** 6th. ed. McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 2004. e-book, ISBN: 978-0072556803.

QIU, Q. *et al.* Sterilization of biomaterials of synthetic and biological origin. **Comprehensive Biomaterials**, v. 4, p. 127-144, 2011.

RAMOS, S. L. F. **Membranas de Policaprolactona Obtidas por Eletrofiliação para Utilização em Engenharia Tecidual.** 64 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

RATNER, B. *et al.* **Biomaterials Science: An Introduction to materials in medicine.** **Academic Press**, e-book, ed. 3, p. 1573, 2013.

REBELO, M. A. *et al.* Chitosan-based scaffolds for tissue regeneration: preparation and microstructure characterization. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 15-24, 2016.

REDE NACIONAL DE TERAPIA CELULAR. **O que são células-tronco.** Disponível em: <http://www.rntc.org.br/ceacutelulas-tronco.html>. Acesso em: 20 mai. 2019.

RIBEIRO, A. A. **Biomateriais: estudo da deposição de hidroxiapatita por via polimérica sobre superfícies de Ti cp modificado por feixe de laser.** 169 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RIZZO, D. C. **Fundamentals of Anatomy and Physiology.** 4th. ed. Michigan: Cengage Learning, 2015. p. 515.

RODRÍGUEZ-CHANFRAU, J. E. *et al.* Bacterial cellulose hydrogel treated with phosphoric acid for used as biomaterial on bone tissue regeneration. **Advance Pharmaceutical Journal**, v. 1, n. 5, p. 133-138, 2017.

RODRÍGUEZ-CHANFRAU, J. E. *et al.* Basic treatment of bacterial cellulose for use in regenerative medicine. **Advance Pharmaceutical Journal**, v. 2, n. 3, p. 93-99, 2017b.

RODRÍGUEZ-CHANFRAU, J. E. *et al.* Chemical modification of bacterial cellulose for use in medicine regenerative. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 51, n. 7-8 p. 673-680, 2017a.

RODRÍGUEZ-CHANFRAU, J. E. *et al.* Influence of the reaction time during the treatment of bacterial cellulose with sulfuric acid solution. **Biointerface Research in Applied Chemistry.** v 9, n 5, p. 4301-4304, 2019.

RODRÍGUEZ-CHANFRAU, J. E. *et al.* Synthesis by wet chemical method of different phases of apatites applying ultrasound. **Journal of Bionanoscience**, v. 12, n. 1, p. 134-141, 2018.

RODRÍGUEZ-CHANFRAU, J. E. *et al.* Ultrasonic application and spray drying during amorphous calcium phosphate synthesis. **Letters in Applied NanoBioScience**. v 8, n 4, p. 711-714, 2019a.

SARTUQUI, J. *et al.* Biomimetic fiber mesh scaffolds based on gelatin and hydroxyapatite nano-rods: Designing intrinsic skills to attain bone reparation abilities. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 382-391, 2016.

SHIM, K. *et al.* Fabrication of micrometer-scale porous gelatin scaffolds for 3D cell culture. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 50, p. 183-189, 2017.

SİLİNDİR, M.; ÖZER, A. Y. Sterilization Methods and the Comparison of E-Beam Sterilization with Gamma Radiation Sterilization. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 43-53, 2009.

SINGH, R.; SINGH, D. Sterilization of bone allografts by microwave and gamma radiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 88, n. 9, p. 661-666, 2012.

SÓ BIOLOGIA. **Tecido conjuntivo ósseo**. Disponível em: <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio17.php>. Acesso em: 20 mai. 2019.

SOWJANYA, J. A. *et al.* Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 294-300, 2013.

SULTANA, N.; WANG, M. PHBV Tissue Engineering Scaffolds Fabricated via Emulsion Freezing / Freeze-drying : Effects of Processing Parameters. **International Conference on Biomedical Engineering and Technology**, v. 11, p. 29-34, 2011.

TÁVORA, F. F. F. **Efeito de sucessivos ciclos de desinfecção por microondas sobre a microdureza e rugosidade superficial de diferentes bases de próteses totais. Estudo longitudinal.** Dissertação (Mestrado) – Curso de Odontologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

TEIMOURI, A. *et al.* Preparation, characterization, degradation and biocompatibility of different silk fibroin based composite scaffolds prepared by freeze-drying method for tissue engineering application. **Polymer Degradation and Stability**, v. 121, p. 18-29, 2015.

TEMPLE, J. P. *et al.* Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hASCs and 3D-printed PCL scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 12, p. 4317-4325, 2014.

TIOMNO-TIOMNOVA, O. *et al.* **Characterization of bacterial cellulose treated with sodium resinate obtained from Cuban pine resin.** In: 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO. 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais – OBI, Metallum Eventos Técnico e Científicos, p. 149-157, Maresias, 2017.

TOLABA, A. G. *et al.* **Influence of the time of application of ultrasound on the particles size in the amorphous calcium phosphates synthesis process.** In: 15º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO, 10º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais – COLAOB, p. 70-74, João Pessoa, 2018.

TOLABA, A. G. *et al.* Statistical evaluation of the effect of ultrasound on the synthesis of calcium phosphates. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. v 9, n 5, p. 4345-4348, 2019.

TOLLEMAR, V. *et al.* Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. **Genes and Diseases**, v. 3, n. 1, p. 56-71, 2016.

TURNBULL, G. *et al.* 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 3, p. 278-314, 2018.

UCHIYAMA, K. *et al.* Development of heating method by microwave for sterilization of bone allografts. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 10, p. 77-83, 2005.

VERYASOV, V. N. *et al.* Isolation of mesenchymal stromal cells from extraembryonic tissues and their characteristics. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 157, n. 1, p. 119-124, 2014.

VOLPATO, N.; CARVALHO, J. Introdução à Manufatura Aditiva ou Impressão 3D. Universidade Tecnológica Federal do Paraná e Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, **Blucher**, e-book, ed. 1, p. 400, 2017.

WU, S. *et al.* Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science & Engineering R**, v. 80, p. 1-36, 2014.

YIXIANG, D. *et al.* Degradation of Electrospun Nanofiber Scaffold by Short Wave Length Ultraviolet Radiation Treatment and Its Potential Applications in Tissue Engineering. **Tissue Engineering: Part A**, v. 14, n. 8, p. 1321-1329, 2008.

YU, W. *et al.* Colloids and Surfaces B : Biointerfaces In vitro and in vivo evaluation of MgF₂ coated AZ31 magnesium alloy porous scaffolds for bone regeneration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 149, p. 330-340, 2017.

YUN, H. *et al.* Novel Process to Fabricate 3D Porous Calcium Phosphate Scaffolds at Room Temperature. **Biomaterials Research**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2014.

ZAHOREC, P. *et al.* Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy. **Cell and Tissue Banking**, v. 16, n. 1, p. 19-26, 2014.