

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE ENGENHARIA  
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**BRUNO CREPALDI ALVES**

**IMPRESSÃO 3D DE *SCAFFOLDS* DE ALGINATO/HIDROXIAPATITA PARA  
APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Ilha Solteira

2024

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA**

**BRUNO CREPALDI ALVES**

**IMPRESSÃO 3D DE SCAFFOLDS DE ALGINATO/HIDROXIAPATITA PARA  
APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia - UNESP – Campus de Ilha Solteira, como cumprimento de requisito para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Mecânica.

Prof. Dr. Ruís Camargo Tokimatsu

**Orientador**

Prof. Dr. Fauze Ahmad Aouada

**Coorientador**

Ilha Solteira

2024

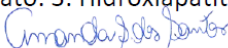
FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

A474i      Alves, Bruno Crepaldi.  
Impressão 3D de scaffolds de alginato/hidroxiapatita para aplicação  
em regeneração óssea / Bruno Crepaldi Alves. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2024  
82 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia  
de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Materiais e Processos de Fabricação,  
2024

Orientador: Ruís Camargo Tokimatsu  
Co-orientador: Fauze Ahmad Aouada  
Inclui bibliografia

1. Hidrogéis. 2. Alginato. 3. Hidroxiapatita. 4. Scaffolds. 5. Biomateriais.

  
**Amanda Sertori dos Santos**

Biblioteca - CRB/8-9061  
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao  
Usuário e Documentação  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: IMPRESSÃO 3D DE SCAFFOLDS DE ALGINATO/HIDROXIAPATITA PARA  
APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA

AUTOR: BRUNO CREPALDI ALVES

ORIENTADOR: RUIS CAMARGO TOKIMATSU

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Mecânica,  
área: Materiais e Processos de Fabricação pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RUIS CAMARGO TOKIMATSU (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia Mecânica / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. CASSIUS OLIVIO FIGUEIREDO TERRA RUCHERT (Participação Virtual)  
Escola de Engenharia de Lorena / Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. TIAGO LUIS EILERS TREICHEL (Participação Virtual)  
Faculdade de Medicina Veterinária / Universidade de Rio Verde - UniRV

Prof. Dr. JUNO GALLEG0 (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia Mecânica / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. VICENTE AFONSO VENTRELLA (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia Mecânica / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Ilha Solteira, 16 de fevereiro de 2024

Documento assinado digitalmente  
The gov.br logo consists of the text "gov.br" in a stylized font, with "gov" in blue and ".br" in green, preceded by a small blue and green geometric icon.  
RUIS CAMARGO TOKIMATSU  
Data: 09/04/2024 22:02:50-0300  
Verifique em <https://validar.fli.gov.br>

## **DEDICO**

Ao meu avô **Moacir Crepaldi** e minha avó **Guiomar de Lara Crepaldi**, que me educaram e me ensinaram que nessa vida devemos sempre preservar acima de tudo nossos valores e princípios.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por estar presente durante cada instante da minha vida.

Aos meus pais Marcelo e Vanilde por todo suporte, conselhos e compreensão, em especial por todo carinho ao longo desta caminhada árdua. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

A minha irmã Marcela e meus avós pelo carinho e companheirismo.

Aos meus companheiros de República por me acolherem em todas as horas.

Aos amigos que acompanharam mais de perto esta etapa.

A todos os professores dos cursos de graduação, mestrado e doutorado em Engenharia Mecânica da UNESP – Ilha Solteira por colaborarem com a minha formação profissional e pessoal.

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Engenharia Mecânica e Departamento de Física e Química que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a concretização deste trabalho.

À Barbara por todo apoio pessoal e profissional e aos colegas da UniRV pela troca de conhecimentos.

Ao professor Fauze pela orientação, paciência e inspiração; à professora Márcia pela colaboração e aos membros GCNH pelo companheirismo e apoio.

Ao professor Ruis pela orientação deste trabalho e pelos conselhos acadêmicos, profissionais e pessoais, minha eterna gratidão.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:  
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e  
depois desinquieta. O que ela quer da gente é  
coragem.”

(Guimarães Rosa)

## RESUMO

A busca por longevidade aliada à qualidade de vida tem gerado cada vez mais a necessidade de alternativas para reparação de tecidos vivos, vítimas de traumas ou patogenias. Os biomateriais voltados para regeneração óssea sempre aparecem como destaque devido à alta demanda. Com crescente interesse surgem os hidrogéis, sendo estes definidos como polímeros altamente hidrofílicos que, quando obtidos por fontes naturais, possuem características necessárias para essa área, principalmente quando combinados com reforços de materiais poliméricos ou de outras classes. Isto resulta na produção de compósitos que são promissores para o uso na engenharia de tecidos. Este trabalho buscou a fabricação de *scaffolds* a partir de um hidrogel composto por uma matriz de alginato de sódio com reforços de hidroxiapatita e reticulados com cloreto de cálcio, visando aplicação em regeneração de tecidos ósseos. Para a fabricação dos *scaffolds* foi utilizada bioimpressão 3D através de uma impressora de filamentos modificada, método eficiente e acessível. Inicialmente, foram otimizados todos os parâmetros de impressão, assim como a concentração de alginato de sódio. A solução de alginato foi preparada dissolvendo alginato de sódio a uma concentração de 10 % (m/v) em água destilada a temperatura ambiente. A esta solução foi então adicionada hidroxiapatita nas concentrações de 2,5, 5,0 % e 10,0 % (m/v). Após a homogeneização, os *scaffolds* foram fabricados utilizando uma bioimpressora 3D. Os modelos foram projetados em formato cilíndrico, com diâmetro de 20 mm, altura de camada de 0,2 mm, preenchimento interno de 20 % e com padrão de preenchimento “hexagonal”. Após as impressões, as amostras foram inseridas, por 24 horas a temperatura ambiente, em um recipiente contendo solução de 1,0% (m/v) de cloreto de cálcio. Os *scaffolds* foram então caracterizados de acordo com as concentrações de hidroxiapatita e características morfológicas, propriedades hidrofílicas, espectroscópicas, térmicas e em relação à citotoxicidade e viabilidade celular. Os *scaffolds* apresentaram boa reprodutibilidade em suas características morfológicas, propriedades hidrofílica e térmica compatíveis com materiais bioimpressos em 3D. As análises espectroscópicas confirmam a formação de hidrogéis e a incorporação de hidroxiapatita na matriz de alginato e resultados preliminares mostraram que os *scaffolds* não apresentam citotoxicidade para células de linhagem canina E20 com viabilidade celular acima de 50%, o que indica que esses biomateriais não são citotóxicos e os *scaffolds* auxiliam na proliferação celular.

**Palavras-chave:** hidrogéis; alginato; hidroxiapatita; *scaffolds*; biomateriais.

## ABSTRACT

The search for longevity combined with the quality of life has increasingly generated the need for alternatives to repair living tissues, victims of trauma, or pathogens. Biomaterials for bone regeneration always appear in the spotlight due to high demand. With increasing interest arise hydrogels, defined as highly hydrophilic polymers with necessary characteristics in this area, especially when combined with other materials. This results in the production of composites that are promising for use in tissue engineering. This work aimed to manufacture *scaffolds* from a hydrogel composed of a sodium alginate matrix with hydroxyapatite reinforcements and cross-linked with calcium chloride, aiming at the application in bone tissue regeneration. For the manufacture of scaffolds, 3D bioprinting was employed using a modified filament printer, an efficient and accessible method. Initially, all printing parameters and the concentration of sodium alginate were optimized. The alginate solution was prepared by dissolving sodium alginate at a concentration of 10% (w/v) in distilled water at room temperature. To this solution, it was then added hydroxyapatite at concentrations of 2.5 and 5.0% (w/v). After homogenization, the *scaffolds* were fabricated using a 3D bioprinter. The models were designed in a cylindrical shape, with a diameter of 25mm and a thickness of 1.5mm, an internal filling of 20%, and a “hexagonal” filling pattern. After the impressions, the samples were placed, for 24 hours at room temperature, in a container containing a 1.0% (w/v) solution of calcium chloride. The *scaffolds* were then characterized according to hydroxyapatite concentrations and morphological characteristics, hydrophilic, spectroscopic, thermal properties and in relation to cytotoxicity and cell viability. These *scaffolds* present good reproducibility in their morphological characteristics, hydrophilic properties were compatible with 3D bioprinted *scaffolds*, as well as thermal analysis. The spectroscopic analyzes confirmed the formation of hydrogels and the incorporation of hydroxyapatite in the alginate matrix and preliminary results showed that the *scaffolds* did not show cytotoxicity for cells of the E20 canine lineage with cell viability above 50%. These results indicate that these biomaterials are not cytotoxic, and the *scaffolds* help in cell proliferation.

**Keywords:** hydrogels; alginate; hydroxyapatite; *scaffolds*; biomaterials.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Esquema apresentando os principais componentes do tecido ósseo.....                                                        | 19 |
| Figura 2 - Representação do processo de reparo em defeitos ósseos .....                                                               | 21 |
| Figura 3 - Estrutura química do alginato de sódio representando os blocos M e G.....                                                  | 24 |
| Figura 4 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita. ....                                                                               | 26 |
| Figura 5 - Processo de intumescimento dos hidrogéis. ....                                                                             | 28 |
| Figura 6 - Diagrama com as diferentes técnicas de biofabricação. ....                                                                 | 30 |
| Figura 7 - Etapas da bioimpressão 3D.....                                                                                             | 32 |
| Figura 8 - Modelo do scaffold criado por meio do PrusaSlicer. ....                                                                    | 34 |
| Figura 9 - Comparação das impressoras (a) Impressora convencional de filamento e (b) Bioender. ....                                   | 36 |
| Figura 10 - Esquema de representação do sistema de bioimpressão.....                                                                  | 37 |
| Figura 11 - Processo de impressão 3D utilizando uma Bioender para fabricação dos scaffolds. ....                                      | 39 |
| Figura 12. Processo de reticulação com $\text{CaCl}_2$ .....                                                                          | 40 |
| Figura 13 - Representação esquemática dos procedimentos descritos. ....                                                               | 40 |
| Figura 14 - Equipamento para banho termostatzado.....                                                                                 | 43 |
| Figura 15 - Arranjo das amostras para ensaio de degradação em PBS. ....                                                               | 43 |
| Figura 16 - Scaffolds incubados em DMEM com 10% de SFB.....                                                                           | 44 |
| Figura 17 - Modelo digital da mandíbula de uma ovelha.....                                                                            | 46 |
| Figura 18 - Designs desenvolvidos para aplicação prática. a) Menor quantidade de macroporos e b) Maior quantidade de macroporos. .... | 46 |
| Figura 19 - Scaffolds inseridos em placas de cultura celular. ....                                                                    | 47 |
| Figura 20 - Exemplos de scaffolds impressos. (a) Amostra HA5 "hexagonal" e (b) Amostra AS "giróide". ....                             | 48 |
| Figura 21 - Scaffolds secos e intumescidos.....                                                                                       | 49 |
| Figura 22 - Imagens obtidas através do MEV com o tamanho de macroporo de uma amostra AS10.....                                        | 51 |
| Figura 23 - Macroporos das amostras (a) HA2,5, (b) HA5 e (c) HA10.....                                                                | 52 |
| Figura 24 - Microestrutura dos biocompósitos com aumento de 1000 vezes. (a) AS10, (b)2,5HA, (c)HA5 e (d)HA10. ....                    | 53 |
| Figura 25 - Microestrutura dos biocompósitos com aumento de 2500 vezes. (a) AS10, (b)2,5HA, (c)HA5 e (d)HA10. ....                    | 53 |
| Figura 26 - Microestrutura dos biocompósitos com aumento de 5000 vezes. (a) AS10, (b)2,5HA, (c)HA5 e (d)HA10. ....                    | 54 |
| Figura 27 - Microestrutura dos biocompósitos com aumento de 10000 vezes. (a) AS10, (b)2,5HA, (c)HA5 e (d)HA10. ....                   | 54 |
| Figura 28 - Medidas das partículas de HA. ....                                                                                        | 55 |
| Figura 29 - Comportamento de intumescimento dos scaffolds. ....                                                                       | 57 |
| Figura 30 - Curvas de TG de HA puro, AS10, HA2,5, HA5 e HA10.....                                                                     | 58 |
| Figura 31 - Curvas de DTG de HA puro, AS10, HA2,5 e HA5.....                                                                          | 59 |
| Figura 32 - Espectros de FTIR referentes ao AS, HA e seus compósitos. ....                                                            | 60 |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 33 - Amostras de AS degradadas. a) 72 horas e b)120 horas.....     | 62 |
| Figura 34 - Amostras de HA2,5 degradadas. a)72 horas e b)120 horas. ....  | 62 |
| Figura 35 - Amostras de HA5 degradadas. a) 72 horas e b) 120 horas. ....  | 63 |
| Figura 36 - Amostras de HA10 degradadas. a) 72 horas e b) 120 horas. .... | 63 |
| Figura 37 - Viabilidade celular dos scaffolds.....                        | 64 |
| Figura 38 - Modelo anatômico impresso em 3D. ....                         | 65 |
| Figura 39 - Protótipos com menor quantidade de macroporos.....            | 66 |
| Figura 40 - Protótipos com maior quantidade de macroporos.....            | 66 |
| Figura 41 - Ensaio de crescimento celular dos protótipos.....             | 67 |

## **LISTA DE TABELAS**

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Parâmetros da impressão 3D. ....                               | 39 |
| Tabela 2 - Medidas dos diâmetros e reduções das amostras. ....            | 50 |
| Tabela 3 - Principais bandas de absorção observadas através do FTIR. .... | 61 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

3D – tridimensional

AS – alginato de sódio

ATT – acidente de trânsito terrestre

BMP – proteínas ósseas morfogenéticas

COO- – grupos carboxilatos

COOH – grupo carboxila

DMEM – meio de Eagle modificado por Dulbecco

DTG – análise termogravimétrica diferencial

FTIR – espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

L.B. – linfócito B

L.T. – linfócito T

MEV – microscopia eletrônica de varredura

Mv – massa molar viscosimétrica média

MTT – teste de viabilidade celular (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina)

NM – não mineralizado

OH – grupos hidroxilas

PBS – solução salina tamponada com fosfato

pH – potencial hidrogeniônico

PLA – ácido polilático

PMN – neutrófilos polimorfonucleares

SBR – Sociedade Brasileira de Reumatologia

SFB – soro fetal bovino

SUS – Sistema Único de Saúde

TG – análise termogravimétrica

UV – ultravioleta

## SUMÁRIO

|          |                                                                                |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                              | <b>13</b> |
| 1.1      | OBJETIVOS                                                                      | 17        |
| 1.1.1    | Objetivo geral                                                                 | 17        |
| 1.1.2    | Objetivos específicos                                                          | 17        |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO TEÓRICA</b>                                                         | <b>18</b> |
| 2.1      | O TECIDO ÓSSEO                                                                 | 18        |
| 2.1.1    | Reparação de defeitos ósseos                                                   | 19        |
| 2.2      | BIOMATERIAIS E ENGENHARIA TECIDUAL                                             | 21        |
| 2.2.1    | Alginato de sódio                                                              | 24        |
| 2.2.2    | Hidroxiapatita                                                                 | 25        |
| 2.2.3    | Hidrogéis                                                                      | 27        |
| 2.3      | BIOFABRICAÇÃO                                                                  | 29        |
| 2.3.1    | Bioimpressão 3D                                                                | 31        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                     | <b>33</b> |
| 3.1      | MATERIAIS                                                                      | 33        |
| 3.2      | PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL                                                      | 33        |
| 3.2.1    | Preparo das soluções compósitas                                                | 33        |
| 3.2.2    | Projeto e fabricação dos <i>scaffolds</i>                                      | 34        |
| 3.3      | CARACTERIZAÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i>                                            | 41        |
| 3.3.1    | Morfologia                                                                     | 41        |
| 3.3.2    | Grau de intumescimento (Q)                                                     | 41        |
| 3.3.3    | Análise termogravimétrica (TG) e análise termogravimétrica diferencial (DTG)   | 42        |
| 3.3.4    | Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) | 42        |
| 3.3.5    | Ensaio de Degradação em PBS                                                    | 42        |
| 3.3.6    | Ensaio de Citotoxicidade e Viabilidade Celular                                 | 43        |
| 3.4      | DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS PARA APLICAÇÃO EM OVELHAS                        | 45        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>                                                 | <b>48</b> |
| 4.1      | MORFOLOGIA                                                                     | 48        |
| 4.2      | GRAU DE INTUMESCIMENTO (Q)                                                     | 55        |
| 4.3      | ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) e ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DIFERENCIAL (DTG)   | 57        |
| 4.4      | ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) | 59        |
| 4.5      | DEGRADAÇÃO EM PBS                                                              | 61        |

|     |                                                         |           |
|-----|---------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6 | CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR                    | 64        |
| 4.7 | DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS PARA APLICAÇÃO EM OVELHAS | 65        |
| 5   | <b>CONCLUSÕES</b>                                       | <b>68</b> |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b>                                      | <b>70</b> |
|     | <b>ANEXOS</b>                                           | <b>75</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A moldura de ossos e cartilagens que protege os órgãos e facilita a mobilidade é denominada sistema esquelético, uma estrutura crucial para movimentação humana e de diversos animais. Cada osso no sistema esquelético é um órgão individual. Este sistema tem como funções a sustentação, proteção, movimento, armazenamento e homeostase mineral, local de produção das células do sangue e armazenamento de energia (Tortora e Derrickson, 2016).

A saúde dos ossos influencia diretamente a qualidade de vida, nos quais diversos fatores vêm aumentando a demanda da reparação osteocondral, que é um defeito na cartilagem de uma articulação e no osso subjacente. Dentre os fatores destacam-se os danos relacionados ao crescente número de lesões esportivas, traumas resultantes de acidentes, patologias congênicas ou adquiridas (Seo *et al.*, 2014).

Dados do hospital Oswaldo Cruz mostram que o aumento da demanda de regeneração óssea também pode ser atribuído à osteoporose, doença caracterizada pela redução da massa óssea e consequente fragilidade do esqueleto e maior suscetibilidade a fraturas. A osteoporose é uma enfermidade multifatorial que depende de, aproximadamente, 30% de fatores ambientais e 70% de fatores genéticos. A idade avançada é um importante fator de risco pois, além de levar à baixa densidade mineral óssea, eleva o risco de quedas devido à diminuição da qualidade óssea e função neuromuscular. Presume-se que cerca de 40% das mulheres e 25% dos homens que estiverem vivos até os 80 anos terão, por causa da doença, fratura de fêmur (Marcelo de Medeiros Pinheiro e Vera Lúcia Szejnfeld, 2024). Esse fator é preocupante visto que dados do IBGE afirmam que a expectativa de vida ao nascer em 2022 era de 75,5 anos (Agência de Notícias IBGE, 2023).

Segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia (Marcelo de Medeiros Pinheiro e Vera Lúcia Szejnfeld, 2024), a osteoartrite é o mesmo que osteoartrose, artrose ou doença articular degenerativa. No conjunto das doenças agrupadas sob a designação de “reumatismos”, a osteoartrite é a mais frequente, representando cerca de 30 a 40% das consultas em ambulatórios de Reumatologia. Além deste fato, sua importância pode ser demonstrada através dos dados da previdência social no Brasil, pois é responsável por 7,5% de todos os afastamentos do trabalho; é a segunda doença entre as que justificam o auxílio-inicial, com 7,5% do total; é a segunda também em relação ao auxílio-doença (em prorrogação) com 10,5%; é a quarta a determinar aposentadoria (6,2%).

O tecido ósseo pode se recuperar naturalmente em condições fisiológicas para danos de pequena extensão, isto é, fraturas milimétricas. Entretanto, para extensões maiores o reparo

natural não recupera a forma ou funcionalidade natural do osso, sendo os enxertos autógenos, em geral, a primeira opção médica. Entretanto, este tratamento possui limitações: disponibilidade de enxerto, defeito gerado na extração do enxerto e pós-operatório de duas áreas lesionadas (Luiz Carlos Uchôa Junqueira e José Carneiro, 2017).

Neste contexto, a engenharia de tecidos ósseos surge como promissora alternativa em casos em que há perda óssea, superando problemas de rejeição e escassez de doadores. Combinando estruturas tridimensionais (3D) – “*scaffolds*”, células e materiais com alta propriedade hidrofílica, que mimetizam o ambiente aquoso vivo, a engenharia de tecidos busca soluções duradouras e funcionais para regeneração óssea.

Hidrogéis vêm sendo amplamente estudados como matrizes 3D por apresentarem sistemas promissores para cura e regeneração de tecidos danificados, justamente por serem altamente permeáveis e facilitar o transporte de nutrientes e metabólitos. Possuem capacidade de mimetizar tecidos do corpo e responder a estímulos, possuem maciez e flexibilidade apropriadas, além da biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades reológicas adequadas, tornando-os importantes objetos de pesquisa em biomateriais, tanto na engenharia de tecidos, quanto para liberação controlada de fármacos. Diferentes materiais com propriedades biodegradáveis foram utilizados em estudos de matrizes porosas 3D (*scaffolds*) para regeneração óssea. Dentre eles, os polímeros naturais são opções que mais atraem pesquisadores, principalmente pelas semelhanças com a versatilidade química da matriz extracelular do tecido, com desempenho biológico e interações celulares (Ribeiro *et al.*, 2015; Vach Agocsova *et al.*, 2023).

Entre os polímeros, os polissacarídeos são muito versáteis, permitindo o carregamento de moléculas sinalizadoras (fatores de crescimento, biomoduladores, medicamentos etc.) e uma interação intrínseca com componentes inorgânicos. Neste aspecto, o alginato de sódio (AS) é um polissacarídeo natural, sensível ao pH, biocompatível, extraído de algas marinhas, injetável e biodegradável. É composto por dois monômeros, ácido  $\beta$ -D-manurônico (bloco M) e  $\alpha$ -L-gulurônico (bloco G), conhecido por formar géis na presença de cátions bivalentes, como cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), processo conhecido como “reticulação”. Dadas essas características, esse polímero tem sido amplamente utilizado para depósito de fármacos e fatores de crescimento, encapsulamento celular e como *scaffolds* em aplicações na engenharia de tecidos. No entanto, o alginato apresenta limitações para tecido ósseo, como ausência de locais para ligação celular ou interações com o tecido receptor, limitando sua funcionalidade a longo prazo, prejudicada tanto pelo inchaço, desintegração e erosão na implantação desses hidrogéis, quanto pelas baixas

propriedades biomecânicas e baixa capacidade bioabsorvível e bioativa. Portanto, o uso de hidroxiapatita (HA) como componente de reforço com capacidades osteocondutivas podem contribuir para superar algumas dessas limitações (Barros *et al.*, 2019).

HA é comumente utilizada na regeneração de tecido ósseo devido à sua similaridade química com o componente inorgânico da matriz óssea e com suas características, como biocompatibilidade, osteoindução, osteocondução e osteointegração. A quantidade de HA dentro da composição de hidrogéis a base de polímeros é crucial para projetar um tecido eficiente para regeneração óssea. Uma vez que HA é degradada gradualmente, libera cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e íons de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), que podem modificar o comportamento celular dentro do microambiente da aplicação, influenciando a mineralização óssea e a ligação aos tecidos circundantes. Alguns autores relataram que o nível de solubilidade, formação de camada de apatita semelhante ao osso, fixação celular, proliferação e diferenciação e, finalmente, a taxa de crescimento ósseo, pode depender da concentração de HA incorporado em compósitos a base de polímeros (Barros *et al.*, 2019; Dubey *et al.*, 2022).

Os enxertos ósseos têm sido, tradicionalmente, realizados por meio de transplantes de tecido ósseo. No entanto, há vários problemas na utilização tanto de aloenxertos (transplante entre indivíduos geneticamente diferentes, de uma mesma espécie) quanto auto enxertos, incluindo infecções e respostas imune patogênicas para o primeiro caso e a morbidade do sítio doador e a quantidade limitada de tecido ósseo utilizável para o segundo caso (Altugan Cahit Vural *et al.*, 2016; Gredes *et al.*, 2016). Os obstáculos mencionados levaram a necessidade de um método mais seguro e confiável que contorna os problemas com as estratégias terapêuticas atuais para defeitos ósseos. O uso da impressão tridimensional (3D) em engenharia de tecido ósseo é promissor, sendo uma metodologia que auxilia na regeneração óssea mimetizando as propriedades do osso mineral, fornecendo construção óssea nova proporcionando orientações de crescimento tecidual. Para uma regeneração óssea bem-sucedida, as matrizes devem estar totalmente interconectadas, capazes de degradar de forma controlada, apresentando aumento na difusão de oxigênio e transporte de nutrientes, além de promover às células fixação, proliferação e formação tecidual. Em muitas aplicações clínicas em que há suporte de carga, a integridade estrutural é de suma importância para a regeneração tecidual (Moncal *et al.*, 2018; Schuez *et al.*, 2023).

Comparado com a técnicas tradicionais de biofabricação (mistura por fusão, lixiviação e moldagem), a bioimpressão 3D é um método promissor para fabricação de matrizes de tecidos, fornecendo um alto controle sobre os parâmetros de projeto, como o tamanho dos

poros, interconectividade, diâmetro dos filamentos, taxa de degradação e propriedades mecânicas (Moncal *et al.*, 2018).

Entretanto, os sistemas de bioimpressão 3D disponíveis no mercado, em geral, apresentam custos elevados, o que dificulta sua ampla implementação, especialmente em ambientes onde os recursos são escassos. Para superar as limitações inerentes à tecnologia convencional e de mercado, propõe-se a adaptação de uma bioimpressora 3D, resultante da modificação de uma impressora 3D de filamento, comumente empregada nos dias de hoje. Essa proposta permite a instalação em um único dia, possui dimensões adequadas para se integrar a uma capela de fluxo laminar padrão, é personalizável, de custo reduzido e, portanto, acessível para pesquisas avançadas, além de representar uma estratégia para otimizar os custos no processo produtivo.

Segundo Lorna Gibson, em sua aula "Tissue Engineering *Scaffolds*: Processing and Properties"(MIT OpenCourseWare), os requisitos de projetos para *scaffolds* podem ser divididos em 3 classes:

- 1 - "Sólido": ser biocompatível, promover função celular (ligação, proliferação, migração e diferenciação) e deve degradar em componentes não tóxicos que podem ser eliminados pelo corpo.
- 2 - "Estrutura Celular": A estrutura deve possuir uma fração volumétrica de poros expressiva. O tamanho dos poros deve ser ajustado para se situar dentro de um intervalo específico, onde o limite inferior corresponde ao tamanho das células do tecido em estudo e o limite superior é determinado pelas ligações estruturais, assegurando a o crescimento celular e a integridade e resistência necessárias. Essa abordagem visa criar um ambiente propício para o desenvolvimento e regeneração tecidual. Por exemplo, para tecido ósseo entre 100 e 500  $\mu\text{m}$ .
- 3 - "Overall *scaffolds*": integridade mecânica suficiente para manuseio em cirurgia e degradação a uma taxa controlável, de modo que o tecido seja completamente formado através da deposição das células na matriz extracelular nativa e o *scaffold* seja completamente reabsorvido.

Diante das informações citadas acima, é de conhecimento que o alginato aliado à hidroxiapatita possa se tornar um material com grande potencial para aplicação em engenharia de tecidos para regeneração óssea, bem como a bioimpressão 3D, que vem mostrando versatilidade e maior controle das variáveis do processo. Dessa forma, este trabalho surge com a proposta de desenvolver uma solução de alginato com hidroxiapatita que possa ser empregada como matéria-prima para fabricação de *scaffolds* utilizando uma bioimpressora 3D, sendo os *scaffolds* reticulados com cloreto de cálcio posteriormente, com objetivo de formar géis.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* de hidrogéis de alginato com hidroxiapatita obtidas por meio de bioimpressão 3D para uso como substitutos de tecidos ósseos.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Otimizar e padronizar o processo de síntese da matéria-prima a ser impressa a fim de definir as concentrações mais adequadas e com melhores desempenhos;
- Otimizar e padronizar os parâmetros de projeto e de impressão;
- Caracterizar e avaliar os *scaffolds* impressos quanto a reprodutibilidade do processo de fabricação em relação ao aspecto estrutural e morfológico, levando em consideração as diferentes concentrações de hidroxiapatita;
- Caracterizar e avaliar as propriedades morfológicas, hidrofílicas, térmicas e espectroscópicas dos *scaffolds* utilizando técnicas de: Microscopia Eletrônica de Varredura, Comportamento de Intumescimento, Análise Termogravimétrica (TG e DTG) e Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Analisar o comportamento de degradação em PBS;
- Otimizar o design visando aumento de proliferação celular;  
Caracterizar e avaliar a citotoxicidade e viabilidade dos *scaffolds* através do Ensaio de Viabilidade Celular MTT.

## 2 REVISÃO TEÓRICA

### 2.1 O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o principal componente do sistema esquelético, que tem como principais funções o suporte para os tecidos moles e proteção de órgãos vitais, como os contidos na caixa craniana, torácica e canal raquidiano. Serve para proteger e alojar a medula óssea, formadora das células sanguíneas e proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis e constituindo um sistema de alavancas que amplia as forças originadas nas contrações. Além dessas funções, os ossos servem como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, liberando-os de maneira controlada para manter as concentrações nos líquidos corporais (Luiz Carlos Uchôa Junqueira e José Carneiro, 2017).

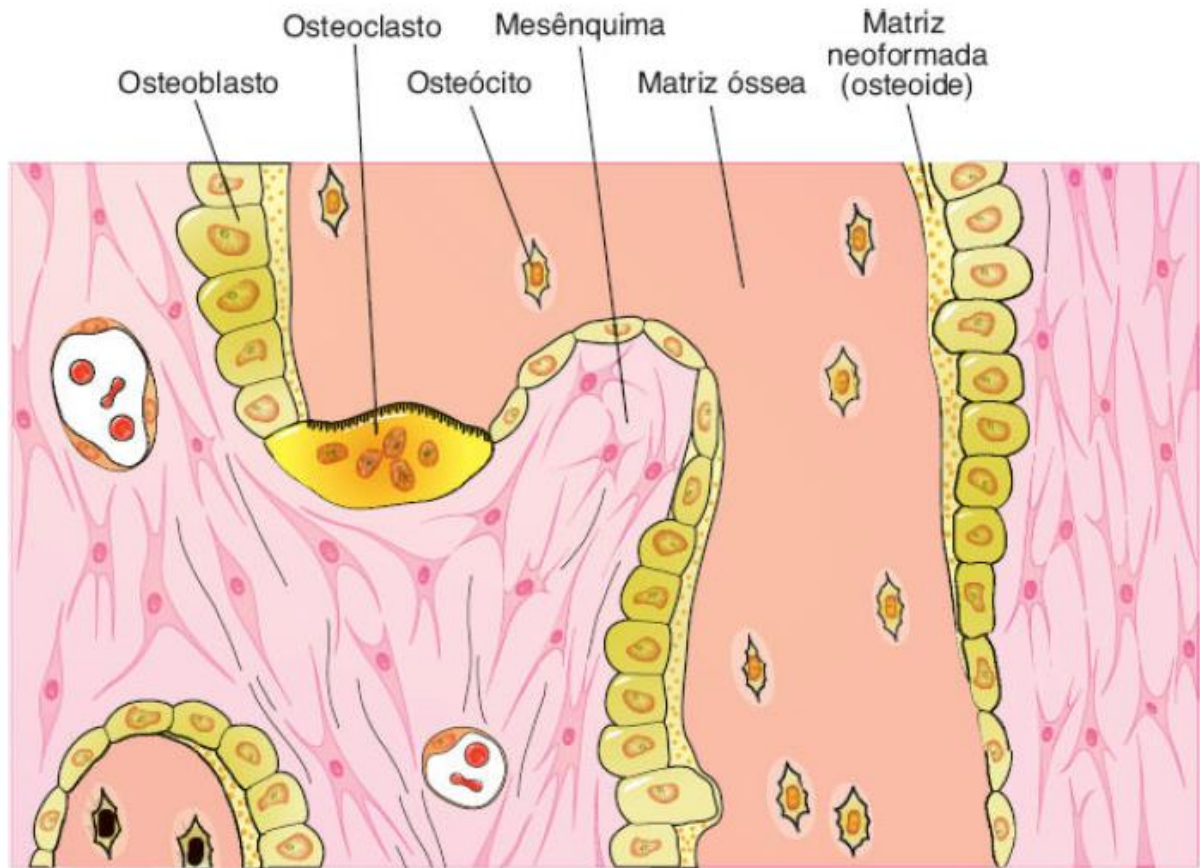
Como outros tecidos conjuntivos, o osso ou tecido ósseo possui uma grande quantidade de “matriz”, ou seja, substância intercelular, cercando células amplamente separadas. A matriz é constituída de dois componentes, sendo um inorgânico que dá dureza ao osso, como os sais minerais, e outro orgânico, principalmente fibras colágenas, que fornecem a rigidez necessária ao osso. Existem quatro tipos de células no tecido ósseo: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As células osteoprogenitoras (*osteo* = osso; *pro* = precursor; *gen* = produzir) sofrem mitose para tornar-se osteoblastos (Tortora e Derrickson, 2016).

Os osteoblastos possuem tamanho entre 10 e 20 micrômetros e ficam localizados na superfície da matriz existente, depositando camadas frescas de osso sobre ela. Alguns dos osteoblastos permanecem livres na superfície, enquanto outros se tornam gradativamente envolvidos pela própria secreção. O material fresco recém-formado (composto sobretudo de colágeno do tipo I) é convertido rapidamente em matriz óssea dura através da deposição de cristais de fosfato de cálcio. Uma vez envolta pela matriz dura, a célula original formadora do osso, agora chamada de osteócito não tem oportunidade de se dividir, embora continue secretando mais matriz de fosfato de cálcio em torno de si mesma, em pequenas quantidades.

Os osteoclastos são células móveis, grandiosas (50 micrômetros), multinucleadas e com ramificações irregulares responsáveis pela reabsorção óssea de tecido velho, lesionado ou desnecessário, originam-se, assim como os macrófagos, das células-tronco hematopoiéticas na medula óssea. Na figura 1, é possível resumir a atividade celular formadora da matriz óssea: Os osteoblastos que revestem a superfície do osso secretam a matriz orgânica do osso (osteóide) e são convertidos em osteócitos quando eles se tornam embebidos nessa matriz. A matriz calcifica logo após ter sido depositada. O mesênquima é um tecido mesodérmico embrionário dos

vertebrados, pouco diferenciado, que origina os tecidos conjuntivos no adulto (Alberts *et al.*, 2009; Luiz Carlos Uchôa Junqueira e José Carneiro, 2017).

Figura 1 - Esquema apresentando os principais componentes do tecido ósseo.



Fonte: Junqueira; Carneiro (2011)

Por meio da breve descrição da atividade celular do tecido ósseo é possível notar que ocorre uma constante, porém sutil, remodelação óssea, que consiste em um mecanismo de substituição ou reconstrução óssea, de modo a preservar sua integridade física e manter suas funções. Este processo é bastante complexo e seu detalhamento não consta no escopo do presente trabalho.

### 2.1.1 Reparação de defeitos ósseos

Para que um reparo ósseo seja bem-sucedido deve ocorrer formação de tecido novo, que pode ocorrer de três maneiras distintas: osteogênese, osteocondução e osteoindução.

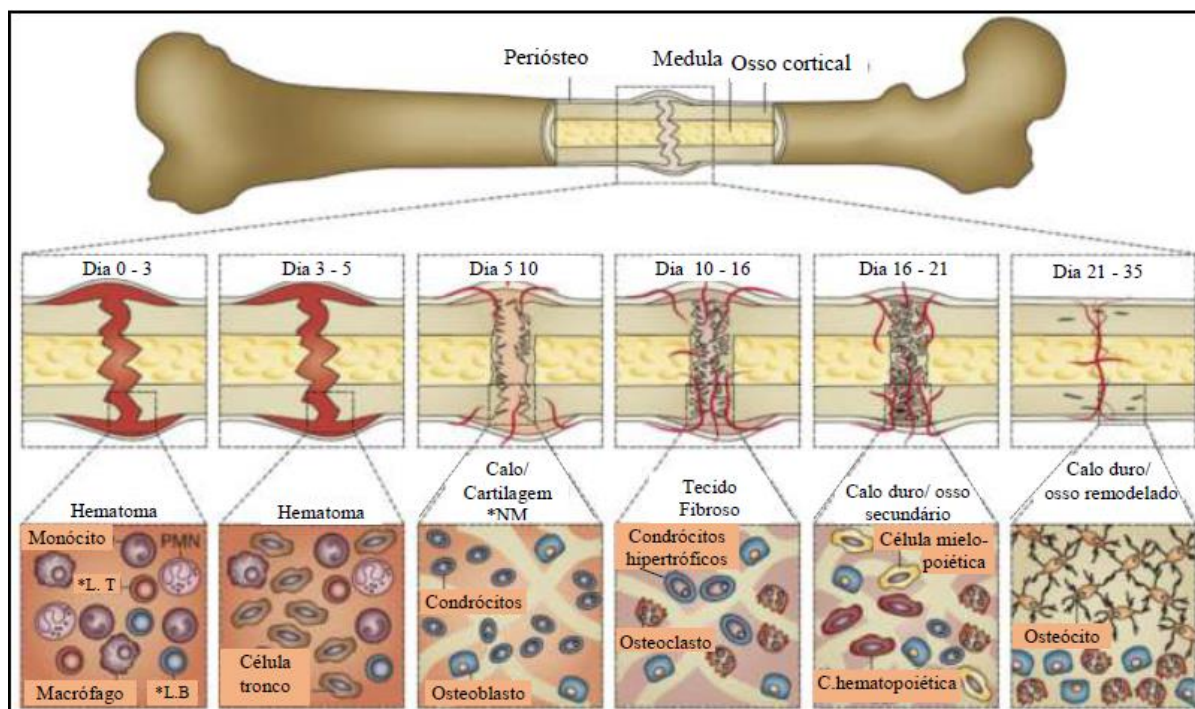
A osteogênese decorre quando osteoblastos viáveis provenientes do material transplantado contribuem para a formação do novo tecido ósseo. Pode-se encontrar esse processo, por exemplo, quando é utilizado enxerto de osso esponjoso autógeno, medula, periósteo e enxertos vascularizados. Este processo é o que ocorre na ausência de material de enxerto. A osteocondução é verificada quando há crescimento ósseo em uma superfície. Os materiais osteocondutores possuem capacidade em servir de arcabouço (*scaffold*) para o crescimento de osteoblastos, provenientes das proximidades do defeito ósseo para a superfície ou poros do biomaterial. Na osteoindução, o material inserido no defeito será capaz de estimular as células osteoprogenitoras para se diferenciarem em osteoblastos, que iniciarão a formação de um novo tecido. A estimulação das células não diferenciadas pode ocorrer pela presença do grupo de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) ou por reações específicas entre o material e a matriz extracelular, que promovam diferenciação celular (Cheisy Daiana Moreira, 2018; Putri *et al.*, 2024).

Materiais considerados “padrão-ouro” na regeneração e reparo ósseo são aqueles que promovem osteoindução, osteocondução e osteogênese. Os enxertos ósseos autógenos possuem capacidade para promover os três processos, porém, o suprimento limitado de osso e a morbidade do sítio doador são algumas dificuldades que dificultam seu uso. Portanto, uma das estratégias utilizadas atualmente no reparo e regeneração óssea consiste na produção de materiais que mimetizem a composição mineral do osso e possam promover respostas metabólicas mais próximas possíveis dos materiais autógenos (Daculsi *et al.*, 2013; Zufía e Abella Sans, 2022).

O processo de recuperação óssea pode ser resumido em algumas etapas principais, como descrito abaixo, no entanto dependerá de uma série de fatores como: condições prévias de saúde do órgão e a extensão do defeito ósseo.

Na primeira etapa ocorre formação de um hematoma acompanhado por uma resposta inflamatória e pelo recrutamento de moléculas de sinalização envolvidas na regulação da formação de tecido ósseo (dentre elas as proteínas BMP). Logo após a proliferação de células no local do defeito, é gerado um calo de fibrocartilagem que com o tempo sofrerá calcificação. Na terceira etapa, a cartilagem calcificada é reabsorvida e os progenitores osteoblásticos iniciam o processo de formação do novo tecido ósseo. Os eventos do processo são ilustrados na figura 2 (Cheisy Daiana Moreira, 2018).

Figura 2 - Representação do processo de reparo em defeitos ósseos



(\*Abreviações: NM: não-mineralizado; L. T (Linfócito T); L. B (linfócito B); PMN (leucócitos polimorfonucleares).

Fonte: Moreira (2018).

## 2.2 BIOMATERIAIS E ENGENHARIA TECIDUAL

Lesões, traumas e doenças congênitas ou adquiridas são os principais fatores que causam danos ou perda de tecidos e órgãos. Como o cenário atual apresenta escassez de órgãos para transplantes, novas alternativas estão sendo estudadas com o objetivo de reduzir a crescente lista de espera de pacientes. O ramo que mostra maior probabilidade de atuar de forma diferencial é a medicina regenerativa, campo que surgiu da união entre a biologia de células-tronco e terapias celulares, terapia de genes, transplante de órgãos e biomateriais e engenharia de tecidos (Daar, 2013).

O termo “biomaterial” há décadas é bastante discutido e foi inicialmente definido por Williams em 1987, desde então algumas revisões foram feitas e a definição mais atual publicada por Williams foi:

Um biomaterial é uma substância que foi projetada de forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, na medicina humana ou veterinária (WILLIAMS, 2009, p. 5908).

Segundo Ratner *et al.*, 2012, um biomaterial deve ser biocompatível, ou seja, desempenhar uma resposta adequada à sua aplicação; bioestável; esterilizável; não ser tóxico, inflamatório ou carcinogênico e possuir propriedades mecânicas adequadas à sua função. Podemos classificar os biomateriais como naturais (fibras proteicas, polissacarídeos etc.) ou sintéticos (metais, cerâmicas, polímeros etc.); como bioabsorvíveis ou temporários (exemplos de suturas, enxertos etc.) e bioestáveis ou permanentes (válvulas cardíacas, próteses de articulações, próteses ósseas metálicas etc.)

Desde o final do século passado, a engenharia de tecidos tem mostrado bastante potencial em fornecer alternativas mais viáveis aos procedimentos cirúrgicos envolvendo tecidos, implantes e próteses, neste contexto os biomateriais têm um papel fundamental nessa área. Na engenharia tecidual, as células são cultivadas *in vitro* e inoculadas em uma matriz sintética (*scaffold*) que é posteriormente implantada no paciente. O objetivo da engenharia de tecidos é promover um desenvolvimento de um tecido sadio, de forma que, conforme o *scaffold* se degrada, o novo tecido vai sendo formado (Pires, Bierhalz e Moraes, 2015).

Liu, Xia e Czernuszka, 2007 definem *scaffolds* como matrizes tridimensionais que devem servir como suporte para a proliferação celular e regeneração tecidual. O *scaffold* deve atender as exigências mecânicas do tecido no qual for inserido, promover suporte à adesão e proliferação celular, possuir uma taxa de degradação compatível com a taxa de formação do tecido novo, sendo que os produtos da degradação não devem ser tóxicos e nem produzir reações tóxicas ou inflamatórias. Também se deve considerar a rigidez do material utilizado no *scaffold*. Para o caso de polímeros, por exemplo, a estrutura do *scaffold* é mais maleável e as células são capazes de permear pelo *scaffold* mesmo com poros menores. Quando inoculado com células, o *scaffold* passa a ser chamado de *construct* ou dispositivo.

A molhabilidade e o intumescimento dos *scaffolds* são características importantes que afetam diretamente a adesão e a proliferação celular dentro dessas estruturas. Um preenchimento ósseo biodegradável deve favorecer a adesão e a proliferação enquanto é gradualmente degradado em uma taxa que é sincronizada com a regeneração óssea. Além disso, quando em contato com os fluidos corporais, deve ser capaz de suportar o intumescimento sem

exercer compressão excessiva sobre os demais tecidos circundantes, mantendo sua forma original (Porrelli *et al.*, 2015; Rajabi *et al.*, 2023).

O inchaço ao intumescer pode afetar a forma e a estabilidade mecânica dos *scaffolds* ao longo do tempo. Por exemplo, o intumescimento resulta em um aumento do tamanho dos poros, o que facilita a difusão de nutrientes, aumentando a infiltração e consequente proliferação celular. No entanto, o inchaço excessivo pode reduzir a resistência mecânica, tornando-se menos adequado para aplicações em tecido ósseo (Nga *et al.*, 2020).

Os polímeros de origem biológica são abundantes e seus produtos de degradação são biocompatíveis e não-tóxicos, o que os torna seguros para utilização na constituição de biomateriais. Além disso, apresentam custo acessível e são obtidos de fontes renováveis. As aplicações dos biopolímeros na medicina regenerativa incluem o tratamento de feridas e a liberação controlada de fármacos, entre outras. Isto se deve às características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, semelhança com a matriz extracelular e por induzir e estimular o processo de cicatrização de feridas. Além do mais, os polímeros naturais possuem grupos funcionais (como grupamentos amino, grupos carboxílicos e hidroxilas) disponíveis para modificações químicas (hidrólise, oxidação, redução, esterificação, ligações cruzadas etc.) e enzimáticas e, também, para interagir com outras moléculas, o que permite a obtenção de uma vasta variedade de produtos com propriedades adaptáveis. Um polímero natural de interesse na área médica é o alginato, polissacarídeo linear de alta massa molar que tem como principal fonte a parede celular de diversas espécies de algas marinhas marrons (Pires, Bierhalz e Moraes, 2015).

Materiais cerâmicos como a hidroxiapatita (HA), vidros bioativos e fosfato tricálcico (TCP) também vêm sendo muito utilizados na medicina, principalmente em regeneração óssea. Esses materiais apresentam biocompatibilidade e osteocondutividade já que são estruturalmente similares à fase inorgânica do osso. Além disso, os íons de cálcio secretados pelos *scaffolds* cerâmicos aumentam a mineralização dos osteoblastos e a regeneração do tecido ósseo. No entanto, a fragilidade apresentada por esses materiais dificulta sua moldabilidade na fabricação de implantes, limitando seu uso (Seol *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2023).

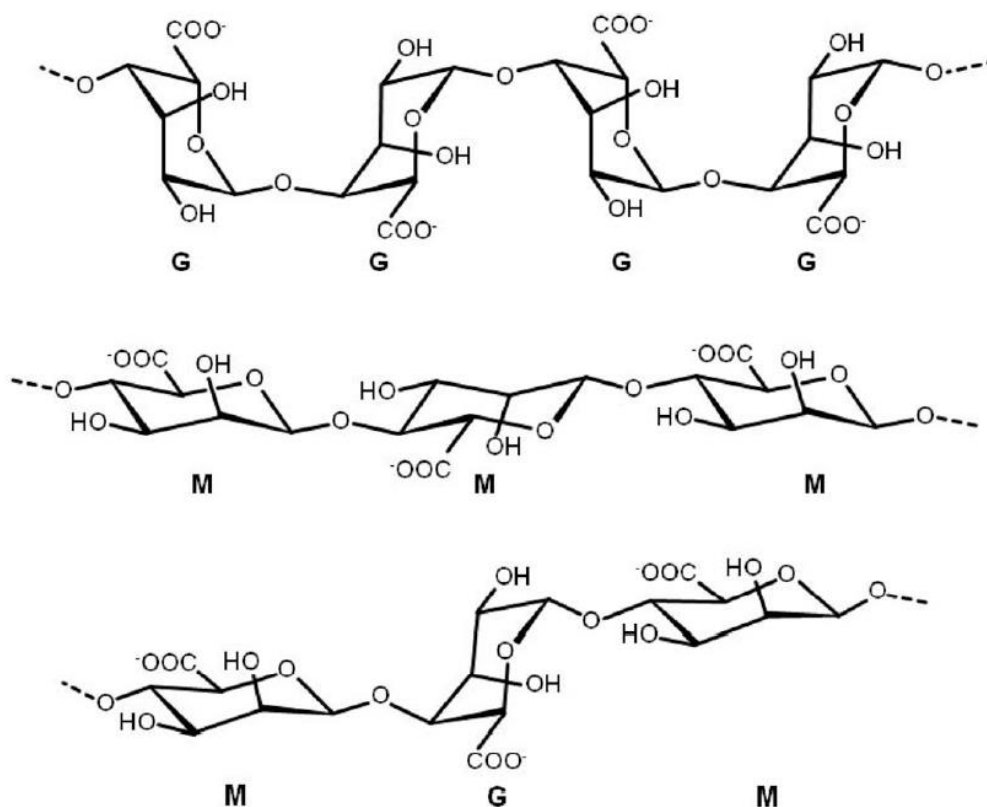
O uso de compósitos surge como um método que possibilita aproveitar as propriedades tanto do polímero quanto da cerâmica, visando obter materiais com alta rigidez e alta tenacidade. Tais compósitos podem possuir a matriz cerâmica ou polimérica, desde que apresentem poros para atender os requisitos biológicos para regeneração tecidual (PEROGLIO, 2007). Barros *et al.*, 2019 conclui em seu trabalho que a porcentagem de HA presente na

composição dos *scaffolds* altera significativamente sua aplicação para regeneração de tecido ósseo, sendo ideal balancear as propriedades dos materiais AS e HA afim de otimizar o produto.

### 2.2.1 Alginato de sódio

O alginato de sódio,  $(C_6H_7O_6Na)_x$ , é um polissacarídeo aniônico extraído de algas marrons da espécie *Phaeophyceae* e de bactérias *Pseudomonas* e *Azotobacter*. É um copolímero composto por cadeias lineares com segmentos rígidos e flexíveis. As cadeias lineares são formadas por unidades monossacarídicas de ácido  $\beta$ -D-manurônico (bloco M) e  $\alpha$ -L-gulurônicos (bloco G) que estão ligadas entre si por meio de ligação glicosídica  $\alpha$  (Figura 3). A cadeia polimérica do alginato pode apresentar somente a configuração do bloco M, somente bloco G ou uma mistura de ambas (Fernandes, 2020).

Figura 3 - Estrutura química do alginato de sódio representando os blocos M e G.



Fonte: (Lee e Mooney, 2012).

Além das propriedades citadas acima, o alginato de sódio apresenta ser atóxico, termoestável e com custo relativamente baixo. Os grupamentos hidroxila, carboxila e alquila presentes em sua estrutura atraem interesse em áreas que necessitam de materiais com alta taxa de absorção, pois devido a esses grupos a cadeia é considerada altamente hidrofílica e com elevada capacidade de absorção e adsorção de água e outros solutos (Fernandes, 2020).

Quando imerso em soluções contendo íons di ou trivalentes, como o  $\text{Ca}^{+2}$ , o alginato de sódio tem a característica de formar hidrogéis biocompatíveis instantaneamente com estrutura semelhante a matriz extracelular de tecidos vivos, permitindo amplas aplicações em engenharia de tecidos, entrega de agentes bioativos e farmacêuticos, proliferação celular e cicatrização de feridas (Tavakoli *et al.*, 2019). É importante ressaltar que a relação de blocos G/M altera as propriedades físicas dos hidrogéis. Logo, hidrogéis obtidos a partir de alginatos com maiores quantidades de blocos G são mais rígidos, e maiores quantidades de blocos M mais flexíveis (Fernandes, 2020).

Entretanto, como destacado por Barros *et al.*, 2019, quando aplicado ao tecido ósseo, o alginato apresenta algumas limitações, como ausência de locais para fixação celular, propriedades biomecânicas fracas e interações com o tecido natural, o que impede o uso de alginato a longo prazo em tecidos ósseos. Portanto, o uso de hidroxiapatita como componente de reforço pode contribuir para superar algumas dessas potenciais limitações.

### 2.2.2 Hidroxiapatita

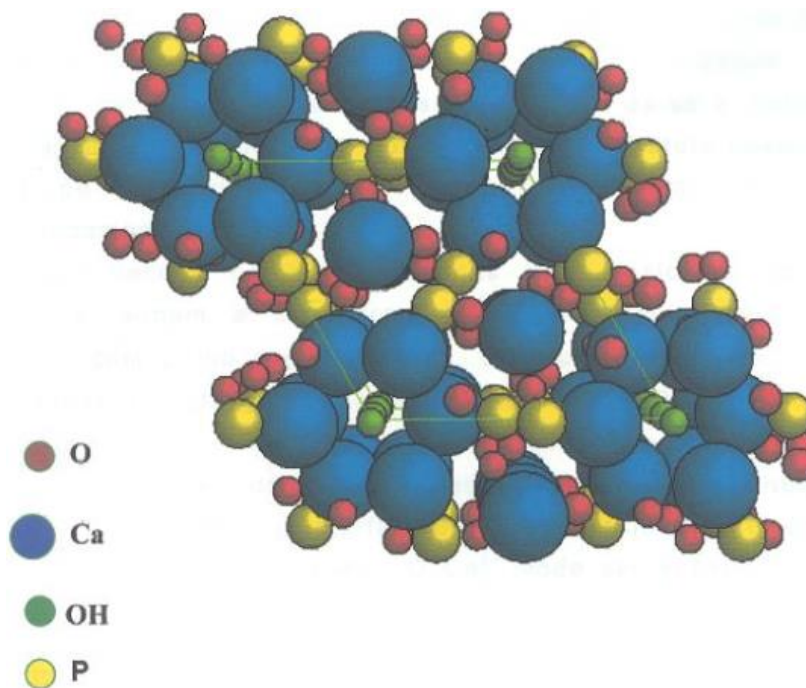
A hidroxiapatita (HA) é um dos materiais mais utilizados em pesquisas e estudos envolvendo a cicatrização de tecido ósseo. Pode ser encontrada como mineral natural, componente ósseo e sintetizada, sendo facilmente manufaturada em pó. Uma das primeiras publicações a descrever aplicações biomédicas desse material foi por Levitt *et al.* (1969), no qual prensaram a quente pó de hidroxiapatita em modelos para ensaios biológicos. Desde então a hidroxiapatita vem sendo muito utilizada em pesquisas envolvendo materiais para aplicações biomédicas, no entanto, há indícios de que o nácar utilizado em implantes na pré-história pode dever sua eficácia à HA, pois foi demonstrado que o carbonato de cálcio do nácar pode transformar soluções de fosfato em hidroxiapatita (Ratner *et al.*, 2012).

A HA é o constituinte mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes. A hidroxiapatita sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração que aliadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de

drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos e eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (Nishiyama *et al.*, 2016).

Apresenta fórmula química  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , podendo ser escrita como  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , mostrando que há 2 unidades de fórmula na célula unitária. Cristaliza-se no sistema hexagonal com grupo espacial  $\text{P6}_3/\text{m}$ , onde P indica que é um sistema hexagonal primitivo, ou seja,  $a = b = 9,43 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,88 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$  e  $\gamma = 120^\circ$ . Os átomos de cálcio estão localizados em sítios não equivalentes, sendo 4 no sítio I ( $\text{Ca}_1$ ) e 6 no sítio II ( $\text{Ca}_2$ ), e os íons  $\text{OH}^-$  ocupam os denominados sítios canais (Guastaldi e Aparecida, 2010). A estrutura cristalina da HA está representada na figura 4.

Figura 4 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita.



Fonte: (Kay, Young e Posner, 1964)

A estrutura da HA permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande facilidade, sendo referida como capaz de incorporar metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura, sendo essa uma de suas mais importantes propriedades. Íons  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser substituídos por muitos cátions metálicos monos e divalentes, tais como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , e íons trivalentes de elementos terra rara. A diferença de valência causada por qualquer substituição requer uma redução na carga aniônica para manter o balanço de carga. Íons  $\text{PO}_4^{3-}$  podem ser substituídos por íons  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,

$\text{SiO}_4^{4-}$ ,  $\text{VO}_4^{3-}$  e os íons  $\text{OH}^-$  por íons  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ . Todas as substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da HA que, por sua vez, alteram a degradação e o comportamento *in vivo* (Guastaldi e Aparecida, 2010).

Devido sua facilidade nas substituições catiônicas e aniônicas, a HA atua como reservatório de cálcio e fósforo nos organismos vivos, regulando diferentes íons nos líquidos corporais por meio de sua liberação e armazenamento. Sua interação com proteínas se dá através de interação elétrica dos seus grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  com os grupos  $\text{NH}_4^+$  das proteínas de ponto isoelétrico superiores a 8. Para proteínas ácidas a adsorção ocorre com a formação do complexo  $\text{HA} - \text{Ca}^{2+} \dots -\text{OOC} - \text{proteína}$  (Félix *et al.*, 2017).

### 2.2.3 Hidrogéis

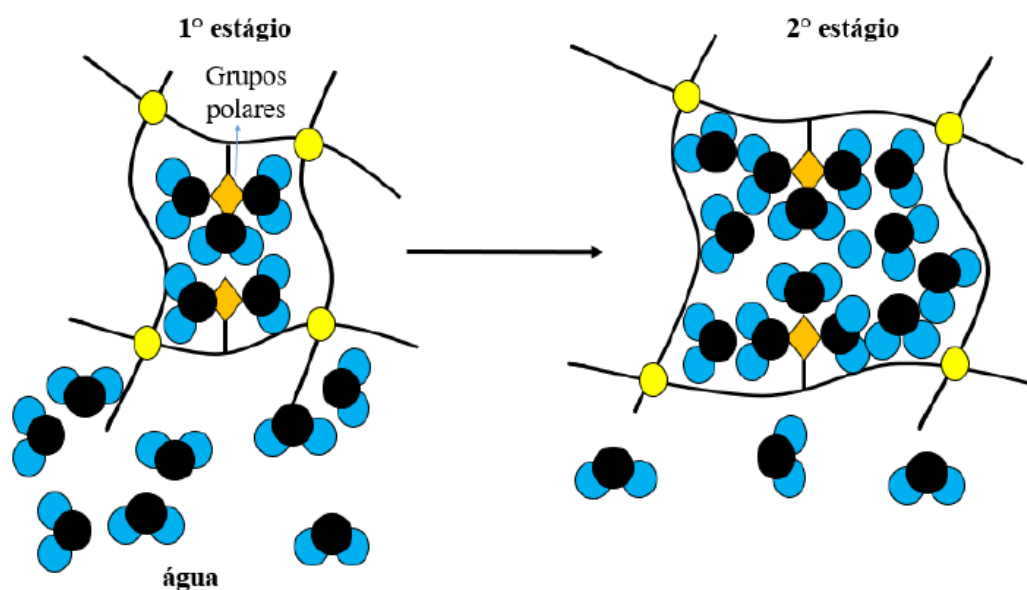
Pode-se definir os hidrogéis como materiais poliméricos formados por redes tridimensionais hidrofílicas, insolúveis e com capacidade para absorver elevada quantidade de água. A hidrofiliidade é atribuída à presença de grupamentos polares, tais como:  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ . Já a insolubilidade é resultante do entrelaçamento, emaranhamento ou reticulações das cadeias para formação das redes tridimensionais, sendo que estas reticulações podem ser originadas por emaranhamento físico e interação iônica ou reticulação química (Fernandes, 2020).

Quando reticulados fisicamente, os hidrogéis tendem a se apresentar mais fracos e com baixa estabilidade a longo prazo. Em contrapartida, quando reticulados quimicamente, apresentam estabilidade e propriedades mecânicas superiores, no entanto, ficam restringidos pelo risco químico de algumas substâncias precursoras da síntese provarem reações com a células e medicamentos, causando efeitos indesejáveis para aplicações médicas (Dragan e Dinu, 2019).

Devido à característica hidrofílica dos hidrogéis, quando em contato com água ou algum meio aquoso, apresentam intumescimento, ou seja, aumento de seu tamanho físico. Em um primeiro momento, moléculas de água são direcionadas aos grupamentos polares da estrutura, hidratando-os por meio de interações eletrostáticas. Em seguida, as moléculas do solvente (já no interior do hidrogel) interagem com as moléculas do exterior, potencializando a difusão das mesmas para dentro da estrutura do hidrogel, processo representado na figura 5. Ademais, ocorre um fenômeno osmótico que conduz o solvente do meio externo para o interior, até o ponto de saturação ou equilíbrio. Nesse momento, as forças osmótica e elástica (expansão da

cadeia polimérica) se igualam, indicando que o máximo de água permitido pela igualdade de potencial químico foi atingido (Fernandes, 2020).

Figura 5 - Processo de intumescimento dos hidrogéis.



Fonte: Fernandes (2020).

Os materiais precursores para o preparo ou síntese de hidrogéis podem ser classificados pela origem: natural ou sintética. Comumente, hidrogéis à base de polímeros naturais são utilizados em aplicações biomédicas por apresentarem características bioativas, biodegradáveis, biocompatíveis e semelhanças estruturais com a matriz extracelular (Guilherme *et al.*, 2015; Fernandes, 2016; Ullah *et al.*, 2015). Por apresentarem cinética de expansão rápida, capacidade de modificação superficial, estrutura porosa controlável, termoestabilidade e facilidade de permeação e difusão, esses têm sido aplicados em diferentes setores tecnológicos, nos quais se destacam: tecnologia de alimentos, engenharia de recursos hídricos, tratamento de água e efluentes incluindo remoção de íons metálicos, resíduos farmacêuticos e corantes nocivos, agricultura, biomedicina, entre outros (Sinha e Chakma, 2019).

Na biomedicina, os hidrogéis podem ser usados para controlar a concentração do fármaco a níveis efetivos, melhorando a atividade terapêutica e reduzindo as administrações e consequente toxicidade. Na engenharia de tecidos podem ser usados pois possuem estrutura

altamente porosa, semelhante à de um osso. Sua hidrofiliçidade promove a adesão celular e sua semelhança com a matriz extracelular possibilitam o transporte de nutrientes, homeostase e crescimento, proliferação e diferenciação celular (Fernandes, 2020).

## 2.3 BIOFABRICAÇÃO

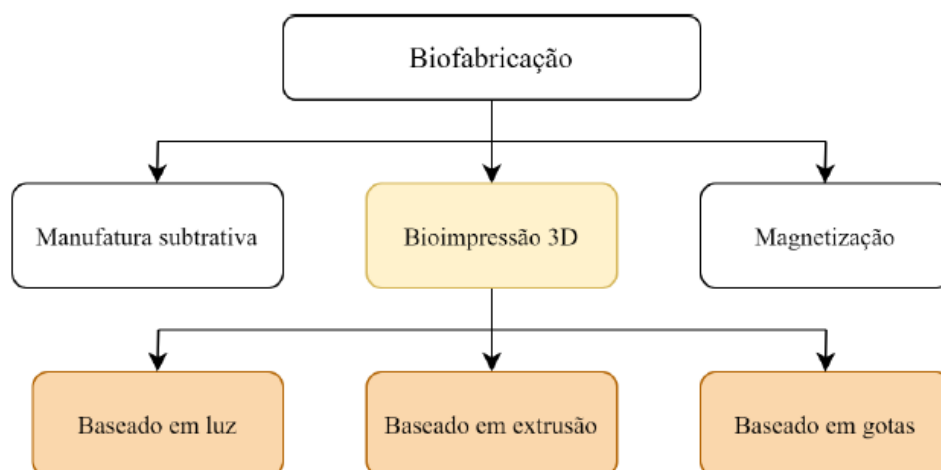
A definição do termo biofabricação ainda não possui um consenso de utilização na literatura, o que por si só representa um desafio adicional na área. Pelo fato de o termo já ter sido utilizados em diferentes situações e contextos ao longo da história, acabou assumindo diversos significados. Mesmo após o desenvolvimento da área nesse século, quando o termo começou a ser efetivamente empregado em diversas publicações de artigos e periódicos específicos da área foram lançados, ainda há diferenças de abordagem e uso dos conceitos conforme as áreas de pesquisa (Mironov *et al.*, 2009).

Definições abrangentes definem o termo com base na própria terminologia, em que a parte “bio” implica o envolvimento de partes biológicas no processo, seja no material, no produto ou na própria inspiração estrutural. A parte “fabricação” se relaciona com construção ou estruturação de algo. Essa forma pode ser adequada, mas pode se tornar muito abrangente no sentido de abordar não só apenas o escopo da biofabricação, como também de outras áreas e até mesmo processos naturais. De modo geral, uma definição que une diferentes aspectos conceituais já citados pela literatura e que será considerada nesse trabalho é a biofabricação como uma área de pesquisa multidisciplinar inovadora derivada da bioengenharia, que combina ideias da engenharia, biologia e ciências dos materiais em processos de manufatura resultando na criação de biomiméticos, bioprodutos e bioestruturas (Silva, 2019).

Segundo Mironov *et al.*, 2009, há diversas formas de biofabricar, seja por meio de modulação do biomaterial em *scaffold* (arcabouço), seja modulando a estruturação desse material para servir de matriz para crescimento celular e até mesmo pelo direcionamento direto de células para formação de estruturas. Dentre as diferentes formas de estruturação de biomateriais pode-se citar a bioimpressão 3D (baseada em extrusão, em luz – estereolitografia, jato de tinta e combinada com outras técnicas de biofabricação como a eletrofiação); manufatura subtrativa e a induzida por campo magnético, a figura 6 classifica os processos (Vaz, 2022). A maior parte das tecnologias utilizadas foram idealizadas por meio do escopo da manufatura aditiva para prototipagem rápida e posteriormente foram incluídas entre técnicas de biofabricação. De forma geral, os processos de biofabricação buscam o desenvolvimento de biomateriais que se assemelham ao máximo ao microambiente celular dos tecidos e órgãos de

organismos vivos, tanto no sentido estrutural, como no sentido de sinalização celular (Bajaj *et al.*, 2014).

Figura 6 - Diagrama com as diferentes técnicas de biofabricação.



Fonte: Vaz (2021)

Ozbolat & Yu (2013) citam que para o desenvolvimento de órgãos funcionais é necessário integrar 3 fatores: tecnologia de células, relacionada à necessidade de se obter células que funcionem nas condições desejadas para aplicação clínica; tecnologia de biomanufatura (biofabricação), relacionada com a combinação das células e biomateriais de modo que possam ser utilizados em uma configuração 3D; e por fim, tecnologias que possibilitem a aplicação e a integração do tecido biomanufaturado com o organismo que receberá a estrutura, garantindo a aceitação (Vaz, 2022).

Levando em consideração os três fatores, temos que o primeiro engloba tecnologias de obtenção, aprimoramento de condições e utilização de células compatíveis, o segundo abrange o processo de biofabricação e o desenvolvimento e seleção de biomateriais compatíveis com células que possibilitem um posicionamento no espaço, e o terceiro leva em consideração a aplicação da estrutura desenvolvida (Ozbolat e Yu, 2013). Pensando em aplicações desejadas pela pesquisa atualmente, o segundo fator se sobressai ao unir a necessidade da escolha de um

biomaterial que seja compatível com as células do primeiro fator e que seja planejado para a aplicação final do terceiro (Murphy, De Coppi e Atala, 2020).

### 2.3.1 Bioimpressão 3D

A manufatura aditiva, também denominada de impressão 3D, originou diversas técnicas de biofabricação, principalmente na última década em que obteve maiores avanços. Tendo em conta a possibilidade do uso de diversos materiais, seleção de células para fabricação de bioestruturas e munido do conceito de manufatura aditiva, o termo biofabricação passou a ser frequentemente associado à bioimpressão (Vaz, 2022).

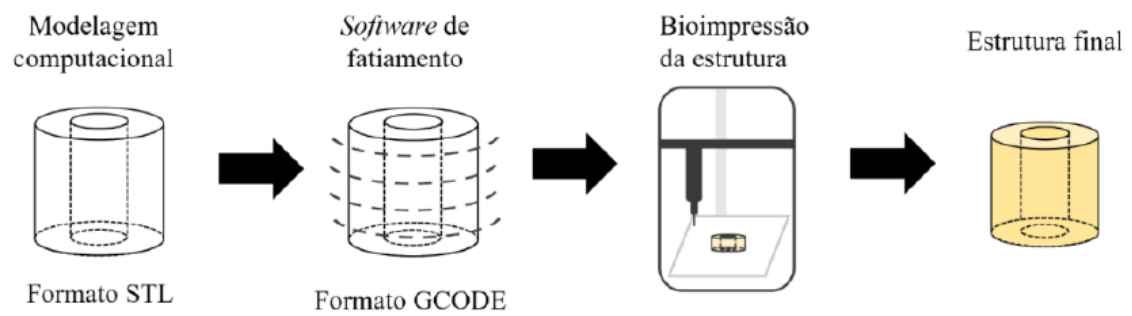
As técnicas de manufatura aditiva vêm gerando crescente interesse devido suas principais características: queda do custo de produção e expansão do conhecimento e das possibilidades de aplicações. Na área da saúde, essa tecnologia é considerada revolucionária, podendo ser utilizada em diversas situações, como a bioimpressão de órgãos e tecidos, desenvolvimento de próteses personalizadas, implantes, modelos anatômicos e até mesmo em pesquisas farmacêuticas que envolvem triagem de princípios ativos (Oleksy, Dynarowicz e Aebisher, 2023; Randazzo *et al.*, 2016; Schubert, Langeveld, van e Donoso, 2014).

Mesmo com muitas possibilidades de aplicação, a bioimpressão 3D é comumente vinculada com o transplante de órgãos, isso se deve porque, atualmente, o transplante é o único tratamento para o estágio final da falência de órgãos, como coração e fígado. Segundo o Registro Brasileiro de Transplantes, em março de 2018, a lista de espera para transplantes de órgãos no Brasil contava com 32 mil pessoas, esse cenário aliado à diminuição de doadores no mesmo ano demonstra que a bioimpressão 3D pode ser um forte aliado na busca pela diminuição das filas de espera. Mesmo com grande mobilização para alcançarmos esse cenário, outras aplicações do processo terão de ser desenvolvidas, como por exemplo a personalização de tratamentos, em que a partir de uma imagem médica e células de biópsias, seria possível fabricar uma estrutura personalizada e realizar testes de fármacos e tratamentos específicos (Vaz, 2022)

A bioimpressão 3D deriva da impressão 3D, que consiste em formar objetos a partir da deposição e sobreposição de múltiplas camadas, podendo ser realizadas a base de polímeros, metais, cerâmicas, líquidos e até mesmo células – nesse caso sendo chamada de bioimpressão 3D (Schubert, Langeveld, van e Donoso, 2014). As etapas que envolvem o processo de fabricação estão ilustradas na figura 7 e podemos descrevê-las sequencialmente: modelagem CAD e geração de um arquivo no formato STL, fatiamento em software com ajuste dos

parâmetros adequado resultado em um arquivo GCODE, importação do arquivo para o software de controle da bioimpressora e, finalmente, o processo de fabricação e obtenção da estrutura final.

Figura 7 - Etapas da bioimpressão 3D.



Fonte: Vaz (2021).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

O alginato de sódio (AS) (Mv: 85.000 g/mol) foi obtido junto a Cromoline Química Fina, a hidroxiapatita (HA) foi obtida junto a Fluidinova S.A. (nanoXIM.HAp202) com tamanho médio de partícula de 5  $\mu\text{m}$  e, finalmente, o cloreto de cálcio anidro ( $\text{CaCl}_2$ ) foi adquirido junto a Vetec (Química Fina, MM: 110,99 g/mol). Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, sem qualquer purificação.

O DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) (Sigma Aldrich), o soro fetal bovino (SFB) e as células mamárias caninas benignas (E20) foram gentilmente cedidos pela profa. Dra. Debora Zuccari do Departamento de Biologia Celular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

#### 3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

##### 3.2.1 Preparo das soluções compósitas

Inicialmente, preparou-se uma solução de AS com uma concentração de 3,0 % (m/v) em água destilada a uma temperatura ambiente de 25°C utilizando agitação magnética. Após alguns testes iniciais de impressão, notou-se ser necessário um acréscimo na concentração de AS visando otimizar a printabilidade da solução, devido à baixa viscosidade apresentada. Todos os parâmetros de impressão, configurações da impressora/programa de impressão foram transmitidos pelo fabricante da bioimpressora 3D, a *startup* Bioedtech.

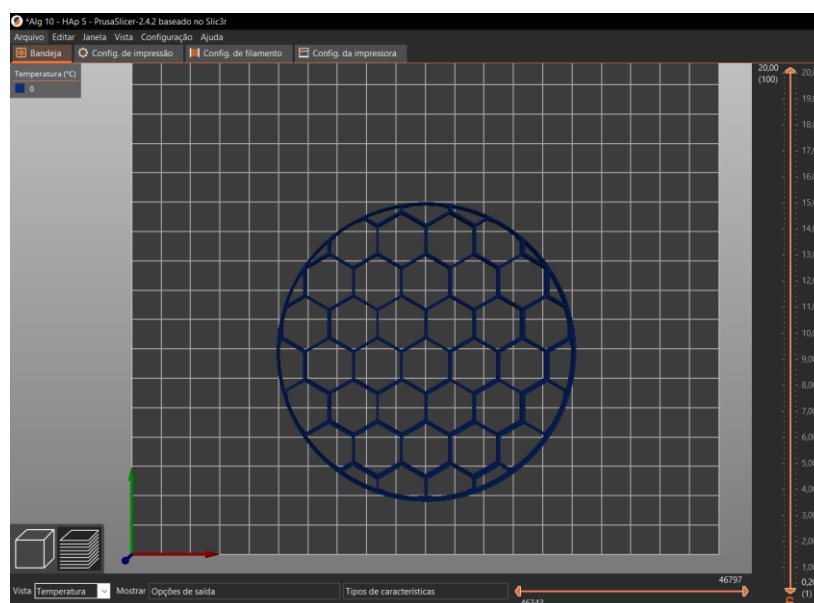
As amostras foram então preparadas com concentrações de 5,0%, 7,0% e 10,0% (m/v) de AS com os testes sendo refeitos a cada acréscimo, a última se mostrou ideal para impressão dos *scaffolds*. Com a concentração de AS otimizada para o uso na bioimpressora 3D, HA foi adicionado nas concentrações de 2,5%, 5,0% e 10,0% utilizando dessa vez agitação mecânica, visto que o acréscimo de HA na solução de AS apresenta um aumento da viscosidade da solução. Dessa forma, foram fabricados quatro tipos de amostra:

- 1 – AS10 - concentração de 10% de AS;
- 2 – HA2,5 - concentração de 10% de AS e 2,5% de HA;
- 3 – HA5 - concentração de 10% de AS e 5,0% de HA;
- 4 – HA10 - concentração de 10% de AS e 10,0% de HA;

### 3.2.2 Projeto e fabricação dos *scaffolds*

A modelagem dos *scaffolds* foi realizada por meio do programa livre PrusaSlicer que, por ser um fatiador de modelos para impressão 3D, permite o controle dos processos de impressão como a velocidade, força de extrusão, preenchimento interno, padrão de preenchimento do modelo etc. Apesar de ser um programa de fatiamento, que permite configurar todas as características e variáveis da impressão 3D, o PrusaSlicer apresenta uma ferramenta de criação de modelos simples, capaz de atender as necessidades do projeto. Os modelos desenvolvidos possuem diâmetro externo de 20 mm, altura de camada de 0,2 mm, preenchimento interno de 20% e padrão de preenchimento “hexagonal”. Os modelos foram desenvolvidos baseando-se na literatura (Chen *et al.*, 2020) e após os testes iniciais, sendo o padrão de preenchimento escolhido pela estabilidade demonstrada pelo material com esse formato. A figura 8 ilustra o modelo criado pronto para impressão (os tamanhos na figura estão modificados para ilustrar melhor).

Figura 8 - Modelo do *scaffold* criado por meio do PrusaSlicer.



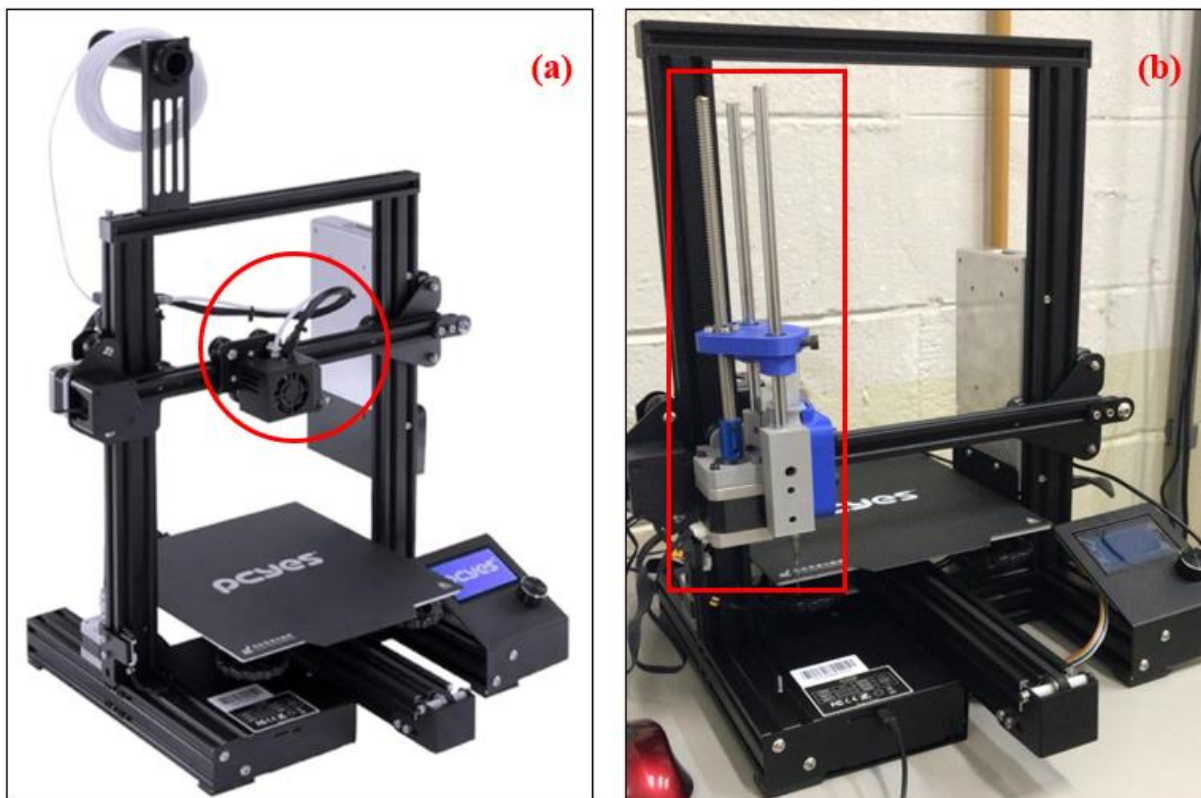
Fonte: Próprio autor.

A bioimpressora 3D utilizada foi um modelo “Bioender” adquirida junto a *startup* Bioedtech e consiste, basicamente, de uma impressora 3D convencional (voltada para impressão de filamentos de polímeros como PLA, ABS e PETG) modificada para bioimpressora.

Esta abordagem foi adotada com a intenção de tornar o processo de fabricação mais acessível e economicamente viável. A adaptação da impressora 3D convencional para trabalhar com hidrogeis permite uma flexibilidade no controle das propriedades do material, ao mesmo tempo que aproveita as vantagens da tecnologia de filamento bastante difundidas, facilitando a replicação do método em ambientes de pesquisa e laboratórios com recursos mais limitados. Esta abordagem inovadora visa não apenas alcançar resultados eficazes na regeneração óssea, mas também contribuir para a disseminação mais ampla de técnicas de bioimpressão 3D em pesquisas relacionadas à engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

A modificação é simples e as peças necessárias podem ser fabricadas com a impressora 3D de filamentos. A principal alteração se dá no cabeçote, onde é retirado todo o sistema de extrusão e inserido um sistema de compressão de um êmbolo acionado via motor de passo que, anteriormente, era responsável por alimentar a extrusora com o filamento. O "novo cabeçote" consiste em uma estrutura projetada para acoplar uma seringa convencional, duas barras lisas como guias e uma rosca sem fim responsável por transmitir a rotação do motor de passo para pressionar o êmbolo da seringa. Essa modificação possibilita adaptar os movimentos originalmente destinados a inserir filamento na extrusora, agora direcionados para comprimir a seringa a uma velocidade controlada. Isso viabiliza a criação de estruturas por meio do depósito controlado do material. A seguir a figura 9 mostra uma comparação da impressora de filamento convencional e a modificada, com destaque para a diferença nos cabeçotes. Imagens detalhadas das peças do “novo cabeçote” estão apresentadas no anexo 1.

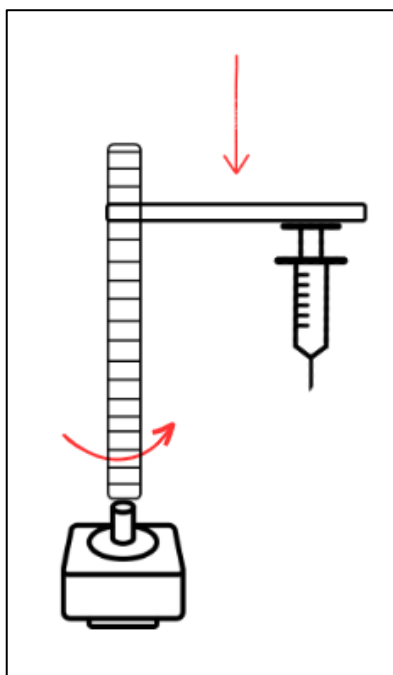
Figura 9 - Comparação das impressoras (a) Impressora convencional de filamento e (b) Bioender.



Fonte: Próprio autor.

Pela figura 10 podemos destacar os componentes do sistema: motor de passo, barra roscada, suporte da seringa (êmbolo) e seringa. A tabela 1 a seguir apresenta os parâmetros usados para cada amostra, os valores de referência utilizados foram disponibilizados pela Bioedtech e foram otimizados nos primeiros testes com o material desenvolvido no projeto, as pequenas diferenças entre as amostras estão diretamente ligadas à modificação da viscosidade do material.

Figura 10 - Esquema de representação do sistema de bioimpressão.



Fonte: próprio autor.

Mesmo com a modificação, os softwares envolvidos na impressão 3D continuam atendendo às necessidades, sendo necessário apenas a reinterpretação do que cada parâmetro significa nesse novo modo de operar. Como explicado no parágrafo anterior, a força motriz de alimentação da extrusora continua sendo a mesma para compressão do êmbolo, dessa forma, se torna possível uma adaptação dos parâmetros do software.

Abaixo estão detalhados os principais parâmetros que devem ser levados em consideração para obter uma boa impressão:

- Velocidade de impressão (mm/s): como o nome sugere, é a velocidade que os motores da impressora se movem, incluindo os motores que controlam os eixos X e Y, bem como o motor da extrusora. Como já mencionado, o motor da extrusora, para nosso caso, é o motor do êmbolo.
- Número de camadas: é a quantidade de fatias que o modelo 3D será dividido. Uma observação necessária é que as camadas inferiores devem suportar a camada que está sendo impressa. Devido a viscosidade do alginato de sódio, há uma limitação na quantidade de camadas, que o impresso suportaria sem colapsar as camadas inferiores.

- Diâmetro do bico (mm): é o diâmetro do bico da extrusora, para a impressora modificada representa o diâmetro de saída do material, podendo ser através de uma ponta acoplada na seringa ou de uma agulha hipodérmica.
- Temperatura de extrusão (°C): parâmetro muito importante na impressão 3D de filamentos, no caso para a impressão do alginato de sódio, não há necessidade de um controle fino desse parâmetro. Foi adotada a temperatura do ambiente controlada por ar-condicionado.
- Multiplicador de extrusão: o motor de passo que alimenta a extrusora com o filamento possui uma rotação pré-definida pelo firmware da impressora, os programas fatiadores colocam esse parâmetro como ajuste fino dessa rotação. Para o nosso caso, este parâmetro é diretamente ligado à rotação do motor que pressiona o êmbolo da seringa, portanto, é diretamente ligado ao fluxo de material que é impresso.
- Diâmetro da extrusora (diâmetro do filamento, mm): Esse parâmetro é o diâmetro do filamento propriamente dito, portanto, quando se utilizam valores maiores, o motor de passo trabalha menos para alimentar a extrusora, visto que o pinhão dá menos voltas para deslocar a mesma quantidade de volume. Quando analisamos para o caso do êmbolo, esse parâmetro se torna muito importante, pois afeta diretamente a força que é aplicada e, conseqüentemente, a quantidade de material depositado pela seringa.
- Comprimento de retração (mm): a retração é o movimento que o motor de passo realiza sobre o filamento durante os movimentos no qual não há deposição de material, portanto, o motor de passo rotaciona de forma invertida puxando o filamento. O comprimento de retração é o quanto a impressora puxará do filamento. Para o caso da bioimpressora, o parâmetro é importante para evitar que o material escorra pelo bico da seringa em movimentos onde não há deposição do material.
- Velocidade de retração (mm/s): é a velocidade que o motor realiza o movimento de retração.

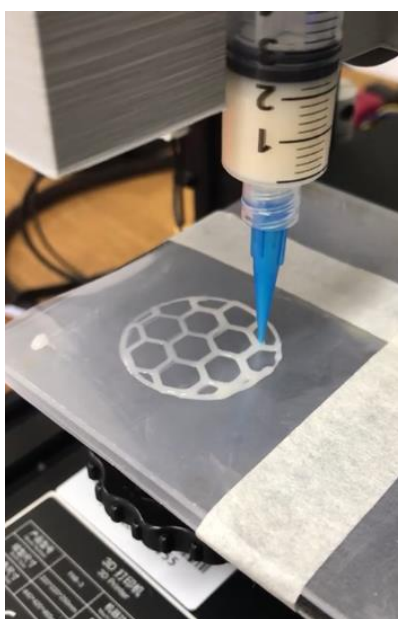
Tabela 1 - Parâmetros da impressão 3D.

| Parâmetros                                         | AS10 | HA2,5 | HA5  | HA10 |
|----------------------------------------------------|------|-------|------|------|
| Velocidade de extrusão (mm/s)                      | 8    | 7     | 7    | 7    |
| Número de camadas                                  | 5    | 5     | 5    | 5    |
| Diâmetro do bico (mm)                              | 0,4  | 0,4   | 0,4  | 0,4  |
| Temperatura de extrusão (°C)                       | 25   | 25    | 25   | 25   |
| Multiplicador de extrusão                          | 0.45 | 0.45  | 0.45 | 0.45 |
| Diâmetro da extrusora (diâmetro do filamento) (mm) | 1.55 | 1.55  | 1.55 | 1,55 |
| Comprimento de retração (mm)                       | 7    | 5     | 5    | 5    |
| Velocidade de retração (mm/s)                      | 9    | 15    | 15   | 15   |

Fonte: próprio autor.

Imediatamente após a impressão dos *scaffolds*, eles foram imersos em soluções aquosas de cloreto de cálcio para o processo de reticulação química, nas concentrações de 1,0%, 2,5% e 5,0% (m/v) por 24 horas a temperatura ambiente de 25°C. As concentrações do cloreto de cálcio na reticulação não alteraram aspectos morfológicos nem hidrofílicos nos *scaffolds*, portanto, a menor concentração foi adotada como padrão para todas as amostras. Após a reticulação, as amostras foram deixadas imersas em água destilada para o processo de diálise por 24 horas e foram secadas em estufa por 48 horas a 40°C. A figura 11 ilustra o processo de impressão dos *scaffolds* e a figura 12 o processo de reticulação. Uma representação esquemática dos procedimentos adotados está ilustrada na figura 13.

Figura 11 - Processo de impressão 3D utilizando uma Bioender para fabricação dos *scaffolds*.



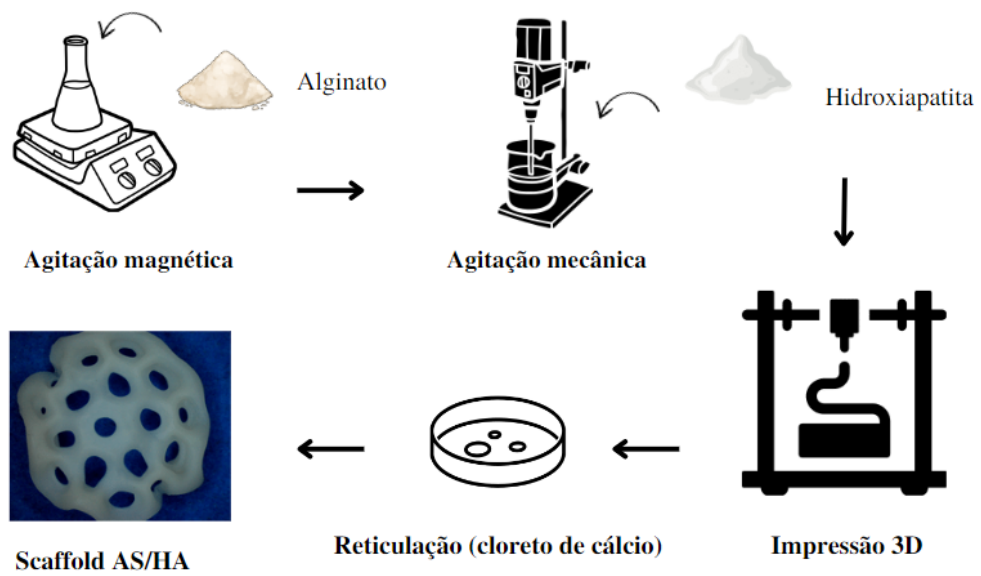
Fonte: próprio autor.

Figura 12 - Processo de reticulação com  $\text{CaCl}_2$ .



Fonte: próprio autor.

Figura 13 - Representação esquemática dos procedimentos descritos.



Fonte: próprio autor.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS

#### 3.3.1 Morfologia

A análise morfológica foi realizada com duas abordagens: a primeira sendo uma análise macroscópica e a segunda microscópica e a densidade dos macroporos nos *scaffolds* foi levantada utilizando o programa ImageJ e frações de imagens dos *scaffolds*, de forma a utilizar as superfícies mais regulares possíveis.

- i) Macroscópica: foram analisadas 6 amostras para cada tipo de proporção de HA, nas condições intumescido e seco, utilizando o estereoscópio ZEISS Stereo Discovery.V8, visando comparar as concentrações de hidroxiapatita e investigar os parâmetros de impressão.
- ii) Microscópica: foi realizada a partir de um microscópio eletrônico de varredura ZEISS EVO /LS15, com o objetivo de analisar a porosidade, a separação de fases entre os constituintes, agregação e tamanho das partículas de hidroxiapatita etc. Para isto, os hidrogéis foram intumescidos até o equilíbrio, retirados do meio de intumescimento, imersos em nitrogênio líquido, e em seguida, liofilizados a temperatura de -50°C por 24 horas. Através deste procedimento, a estrutura porosa do hidrogel não é modificada, assumindo que todas as características morfológicas dos hidrogéis secos podem ser aplicadas aos hidrogéis intumescidos. A tensão de aceleração utilizada foi de 7 kV.

#### 3.3.2 Grau de intumescimento (Q)

As propriedades hidrofílicas dos hidrogéis (*scaffolds*) foram avaliadas pelo método gravimétrico, que possibilitou a determinação do grau de intumescimento (Q) em função do tempo. Água destilada foi o utilizada como meio de intumescimento. Para determinação dos valores de Q, os hidrogéis secos foram pesados ( $M_s$ ) em uma balança analítica Shimadzu AUY-220 (sensibilidade de 0,1 mg) e, posteriormente, imersos em 20 mL de água destilada. Após tempos pré-determinados, os hidrogéis foram removidos do meio e pesados novamente ( $M_t$ ). Os valores de Q foram determinados em g/g (grama de água por grama de hidrogel), de acordo com a equação 1 a seguir:

$$Q = \frac{M_t}{M_s} \quad (1)$$

### **3.3.3 Análise termogravimétrica (TG) e análise termogravimétrica diferencial (DTG)**

A TG é uma técnica em que se mede a variação de massa em função da temperatura ou tempo. Quando submetidos ao aumento de temperatura, os materiais podem apresentar algum tipo de modificação química ou física em sua estrutura, podendo ocorrer via volatilização, desidratação, decomposição, oxidação, fusão, entre outras. A DTG é a derivada da curva de TG, que facilita a observação dos eventos térmicos através de picos bem definidos em sua curva (Fernandes, 2020).

A TG foi realizada em um analisador térmico TA Instruments SDT Q600, onde cerca de 8mg de material foram colocados em um porta-amostra de platina e aquecidos de 25 a 900°C, com uma atmosfera de nitrogênio a uma taxa de fluxo de 100mL/min. Todos os ensaios foram conduzidos com uma razão de aquecimento de 10°C/min.

### **3.3.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Com a aplicação da técnica de FTIR foi possível identificar os possíveis pontos de interações existentes entre a matriz do hidrogel (AS) e o material inserido como reforço (HA), através da presença de grupos químicos específicos. Para realizar o ensaio, as amostras de hidrogel secas foram maceradas, misturadas com brometo de potássio (KBr) e prensadas para obtenção das pastilhas que são inseridas no espectrômetro. Os espectros foram obtidos utilizando um espectrômetro Nicolet-NEXUS 610 FTIR com uma faixa espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , realizando 128 varreduras com resoluções de 2 $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.3.5 Ensaio de Degradação em PBS**

Três scaffolds de cada tipo foram fragmentados e incubados em uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) com um pH de 7, que, embora semelhante ao do corpo humano, é mais ácido. Esses fragmentos foram expostos a um banho termostatizado (modelo TE-184, Tecnal) a 37°C, por períodos de 72 e 120 horas. Devido às variações de temperatura no laboratório, o banho não conseguiu manter constantemente os 37 graus Celsius, chegando em alguns momentos a ultrapassar os 40 graus Celsius. O propósito desse procedimento foi analisar de maneira quantitativa o comportamento de degradação das amostras em um ambiente com pH semelhante ao do corpo humano, embora não ideal.

Figura 14 - Equipamento para banho termostático.



Fonte: Próprio autor.

Figura 15 - Arranjo das amostras para ensaio de degradação em PBS.



Fonte: Próprio autor.

### 3.3.6 Ensaio de Citotoxicidade e Viabilidade Celular

Para realização dos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular, os *scaffolds* foram expostos previamente à radiação de luz ultravioleta (UV) do fluxo laminar por 3 horas a 30 cm da fonte de radiação.

Após a esterilização, os *scaffolds* foram incubados por 28 dias em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB),

conforme ilustrado na figura 16. Não houve alteração do meio durante o período de incubação. As células mamárias caninas benignas (E20) foram semeadas diretamente em placas de cultura de 24 poços ( $5 \cdot 10^4$  células/poço) com DMEM suplementado por 10% de SFB e então foram incubadas ( $37^\circ\text{C}$  / 5%  $\text{CO}_2$ ) por 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi retirado de cada poço e em seu lugar foi adicionado meio de cultura sem suplementação por 24 horas.

Figura 16 - *Scaffolds* incubados em DMEM com 10% de SFB.



Fonte: Próprio autor.

Em seguida, o meio no qual estavam as células foi trocado pelo extrato das soluções resultantes da incubação dos *scaffolds*. Após mais 24 horas, os extratos de *scaffolds* foram removidos e a viabilidade celular foi medida usando o método de brometo de metil tiazol tetrazólio (MTT). Após 3 horas de estufa ( $37^\circ\text{C}$  / 5%  $\text{CO}_2$ ), alíquotas dessas soluções foram coletadas e tiveram suas absorbâncias medidas a 540 nm em equipamento Multiskan FC (Thermo Scientific). Os dados obtidos foram tratados utilizando o programa graphpad 8. Os valores obtidos foram expressos em porcentagem de células viáveis de acordo com a equação 2:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância das células em contato com as amostras} \times 100}{\text{Absorbância (controle)}} \quad (2)$$

Este ensaio foi conduzido com as amostras AS, HA2,5 e HA5 para uma avaliação inicial dos resultados, com o intuito de orientar as proporções a serem desenvolvidas. As amostras de HA10 foram produzidas após a análise dos resultados obtidos; portanto, não estão incluídas neste estudo.

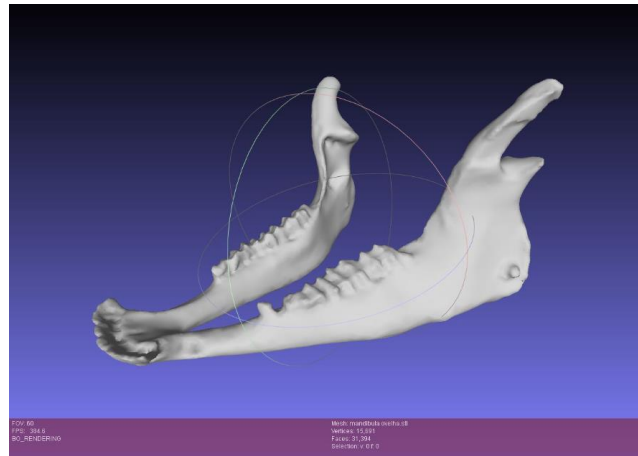
### 3.4 DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS PARA APLICAÇÃO EM OVELHAS

Após a formação de uma equipe interdisciplinar composta por profissionais das áreas de medicina veterinária, biologia e engenharia, foram concebidos protótipos de scaffolds destinados a simular sua aplicação em ovinos. O objetivo central deste projeto é avaliar a versatilidade do processo de impressão de scaffolds utilizando uma impressora 3D modificada, de fácil acesso. Para isso, foi simulado o planejamento de um implante real, visando identificar a eficácia e a viabilidade do método. As etapas do projeto de desenvolvimento dos protótipos podem ser divididas em:

- Escolha do sítio cirúrgico;
- Definição de como inserir o *scaffold* em procedimento operatório;
- Modelagem de *designs* novos;
- Teste *in vitro* para comparação entre os *designs*.

O sítio cirúrgico escolhido foi a mandíbula, devido acessibilidade, relevância clínica, similaridade anatômica à dos humanos e potencial de aplicação. No planejamento pré-operatório, visando aprimorar o desenvolvimento do procedimento cirúrgico e auxiliar na criação de novos *designs*, foi elaborado um modelo anatômico tridimensional das mandíbulas de ovelhas, utilizando uma impressora 3D de filamentos e empregando o material PLA. Vale ressaltar que modelos anatômicos estão disponíveis de forma acessível e gratuita na rede. Esta abordagem torna-se importante para direcionar o *design* do *scaffold*, não apenas para o estímulo do crescimento tecidual, mas também para otimizar a manipulação cirúrgica. A figura 17 ilustra o modelo em formato digital.

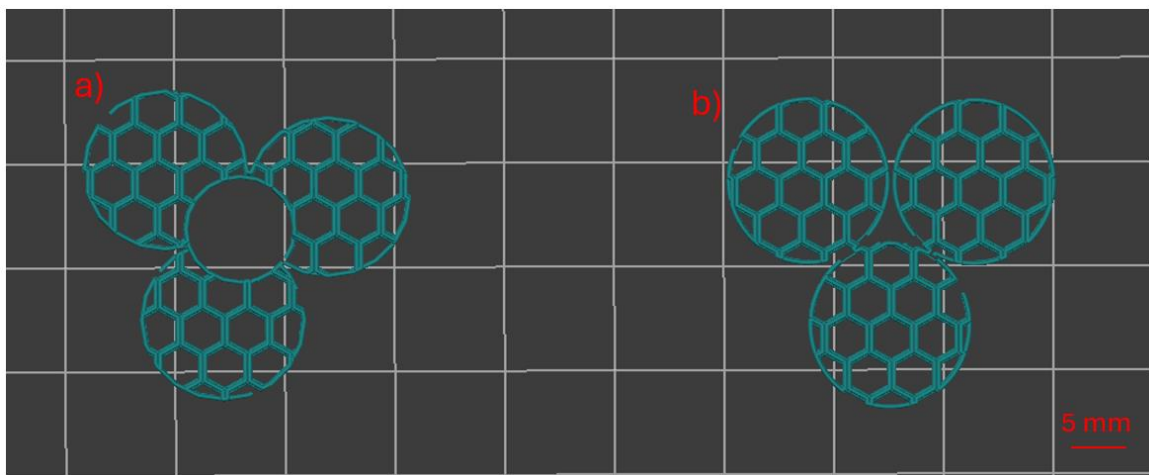
Figura 17 - Modelo digital da mandíbula de uma ovelha.



Fonte: Próprio autor.

O tipo de amostra escolhido para o projeto foi o HA5, pois apresenta uma melhor printabilidade comparado ao AS e HA2,5 e mais prático na mistura dos componentes em relação ao HA10. Todos os procedimentos adotados na fabricação das amostras foram reproduzidos na obtenção dos protótipos. Foram desenvolvidos dois designs com diferentes quantidades de macroporos, conforme ilustrado na figura 18.

Figura 18 - Designs desenvolvidos para aplicação prática. a) Menor quantidade de macroporos e b) Maior quantidade de macroporos.



Fonte: Próprio autor.

Os *designs* foram concebidos com um aumento na quantidade de poros e apresentam uma estrutura circular interconectada. Após a definição do sítio cirúrgico, foi determinado o procedimento utilizando uma broca para remover material ósseo da mandíbula e alojar o *scaffold* no local, posicionando-o verticalmente na aplicação na mandíbula. Para assegurar uma

aderência robusta nas paredes do furo, os formatos foram selecionados com essas estruturas circulares, visando que as regiões circulares sejam alojadas com interferência no local cirúrgico e evitem que o *scaffold* se desloque, especialmente em uma área sujeita a movimentação frequente dos animais, principalmente durante a mastigação.

Para a avaliação dos dois *designs*, foi conduzido um ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular com células mamárias caninas (CF41). A esterilização seguiu um procedimento simulando a cirurgia, onde os *scaffolds*, na condição seca, foram expostos à radiação ultravioleta (UV) do fluxo laminar por 3 horas a 30 cm da fonte de radiação. Posteriormente, foram lavados com Clorexidina 2%. Em seguida, os *scaffolds* foram intumescidos em água ultrapura por 12 horas e inseridos em placas de cultura de 24 poços (5.104 células/poço), nas quais células CF41 foram cultivadas com DMEM suplementado por 10% de soro fetal bovino (SFB). As amostras permaneceram na solução com células por 40 horas, e a viabilidade celular foi medida utilizando o ensaio MTT. Após 3 horas de incubação em estufa (37°C / 5% CO<sub>2</sub>), as soluções foram coletadas, e suas absorbâncias foram medidas a 540 nm utilizando o equipamento Multiskan FC (Thermo Scientific). Os dados obtidos foram processados utilizando o software GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis, conforme calculado pela equação 2. A figura 19 ilustra os *scaffolds* sendo inseridos na placa de cultura.

Figura 19 - Scaffolds inseridos em placas de cultura celular.



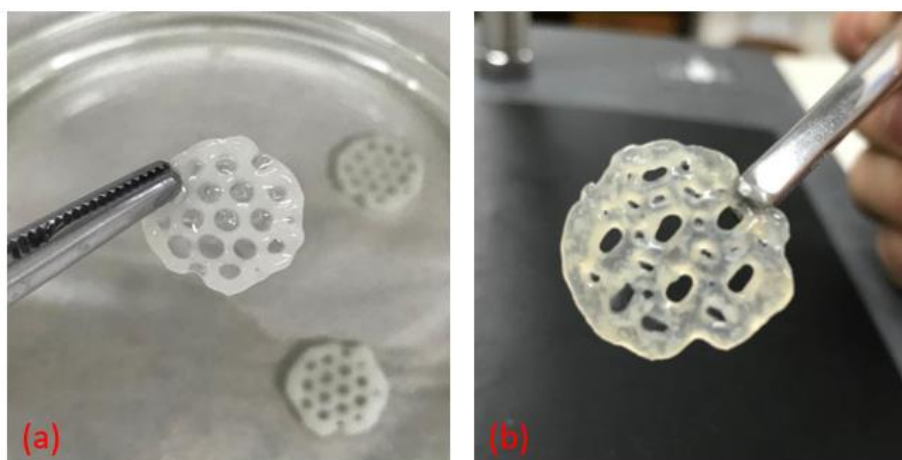
Fonte: Próprio autor.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 MORFOLOGIA

A figura 20 apresenta imagens de *scaffolds* recém-impressos e reticulados com  $\text{CaCl}_2$ , é possível notar certa rigidez e manutenção da forma do modelo projetado, requerimento desejado para que o *scaffold* seja manipulado durante o uso em cirurgias. Durante os testes iniciais de impressão, os parâmetros do processo, o padrão de preenchimento e as concentrações de AS foram otimizados para que os *scaffolds* apresentassem boa reprodutibilidade nas amostras, mantendo o máximo de parâmetros e a síntese do material iguais. Na figura 20 (a) nota-se uma amostra de AS com 5% de HA com padrão “hexagonal”, já na figura 20 (b) tem-se uma amostra de AS com padrão “giróide”, sendo o primeiro adotado como padrão por apresentar melhor reprodutibilidade entre todas as amostras. Ambos os padrões foram utilizados para comparação por se assemelharem ao tecido ósseo e já serem explorados em publicação de relevância (Chen *et al.*, 2020)

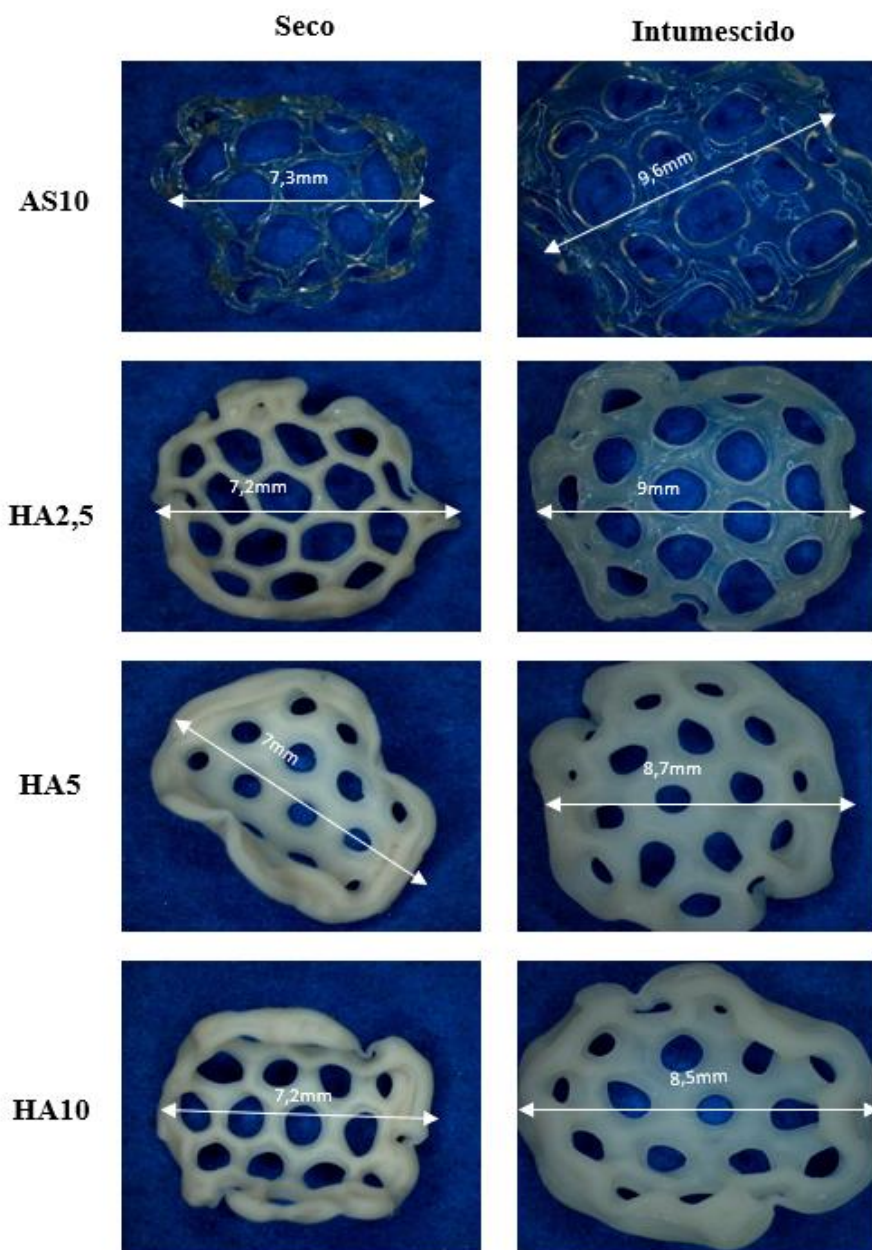
Figura 20 - Exemplos de scaffolds impressos. (a) Amostra HA5 "hexagonal" e (b) Amostra AS "giróide".



Fonte: próprio autor.

Na figura 21 tem-se as imagens dos *scaffolds* secos e intumescidos, obtidas por meio do estereoscópio ZEISS Stereo Discovery.V8 e com as medidas dos diâmetros externos realizadas através do software AxioVision. Devido a irregularidade nas bordas externas dos *scaffolds*, as medidas foram realizadas considerando as partes mais regulares, de forma a se obter valores para comparações de reprodutibilidade.

Figura 21 - Scaffolds secos e intumescidos



Fonte: Próprio autor.

É possível notar que após o processo de reticulação, a forma do modelo não foi alterada, mesmo após o intumescimento. No geral, as amostras apresentaram superfícies bem aderidas e lisas e uma coloração esbranquiçada devido à incorporação de HA. A presença de HA, independente da concentração, resultou em melhor printabilidade das amostras.

A tabela 2 a seguir contém os valores de média dos diâmetros externos das 6 amostras para cada tipo de proporção e a porcentagem de redução em relação ao diâmetro original de

projeto, o desvio padrão se manteve em 0,1mm para todas as amostras e foi removido da tabela para melhorar a visualização. É notável que o diâmetro dos *scaffolds* intumescidos sofreu uma redução média de 57% em relação ao diâmetro do modelo, isso ocorre devido ao processo de reticulação que promove uma mudança na estrutura do sistema, levando à formação de uma rede tridimensional entre as cadeias poliméricas, aproximando as cadeias umas das outras. Dessa forma, o sistema inicialmente viscoso adquire caráter elástico (gel) (Moreira, 2018). Em comparação, os diâmetros dos *scaffolds* secos apresentaram redução média de 62,8%, diferença essa que se deve à perda de água no sistema.

Tabela 2 - Medidas dos diâmetros e reduções das amostras.

| Amostra | $\bar{x}$ seco (mm) | $\bar{x}$ intumescido (mm) | Red. seca (%) | Red. intumescida (%) |
|---------|---------------------|----------------------------|---------------|----------------------|
| AS10    | 7,7                 | 9,2                        | 61,5          | 54                   |
| HA2,5   | 7,6                 | 8,8                        | 62            | 56                   |
| HA5     | 7,4                 | 8,4                        | 63            | 58                   |
| HA10    | 7,1                 | 8,2                        | 64,5          | 59                   |
| Média   | 7,5                 | 8,7                        | 62,8          | 56,8                 |

Fonte: Próprio autor.

As imagens e os resultados trazem a percepção de que quanto maior a proporção de HA, maior a redução em relação ao diâmetro inicial do projeto e maior estabilidade morfológica, apresentando bordas mais regulares e poros melhores definidos. No entanto, observa-se que quanto menor a proporção de HA, maiores os poros, aumentando a densidade porosa do *scaffold*.

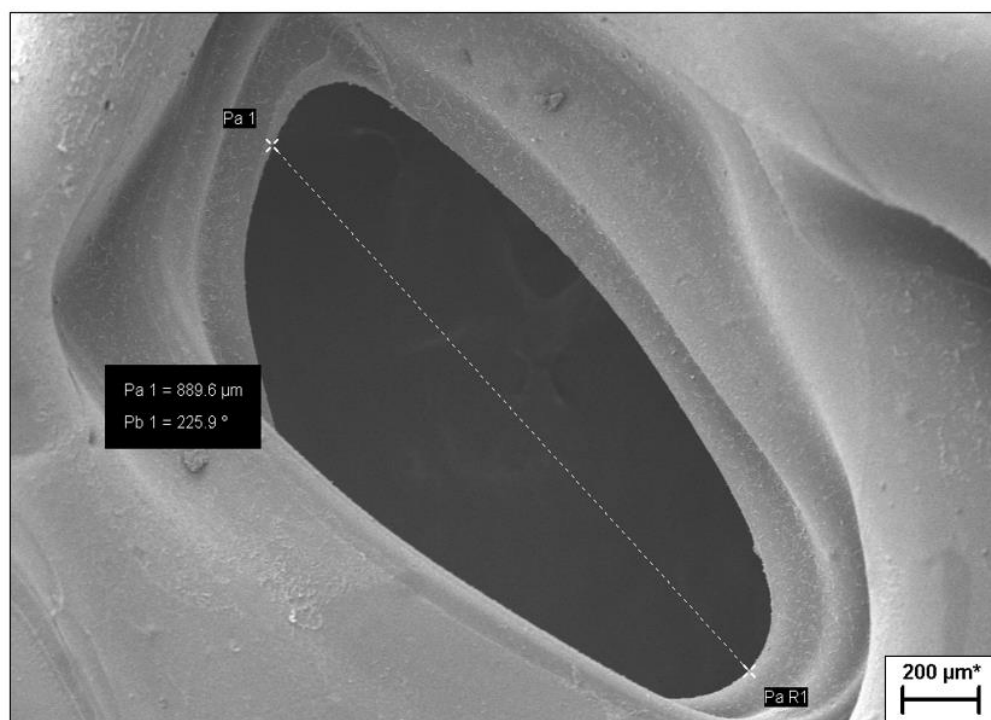
Os resultados de densidade dos macroporos variaram de 20% de macroporosidade para maiores proporções de HA até 35% para menores proporções. Resultados estes mais compatíveis com aplicações em ossos corticais, ou seja, as regiões do osso mais densas e compactas. Para ossos trabeculares, que constituem a parte esponjosa do osso, é necessário uma maior densidade macroporosa (Chen *et al.*, 2020).

O tamanho dos macroporos foi determinado tanto por meio do estereoscópio quanto por meio do MEV para as 6 amostras de cada tipo, exibindo variações entre 400 e 900  $\mu\text{m}$ . Os

macroporos apresentaram uma considerável variação, tanto dentro de uma mesma amostra quanto entre diferentes amostras. A Figura 22 apresenta imagens do maior macroporo de uma amostra AS10 obtida por meio do MEV, com tamanho de 889,6  $\mu\text{m}$ . Em seguida, a figura 23 apresenta imagens dos outros 3 tipos de amostras, destacando-se uma maior homogeneidade nos formatos dos macroporos à medida que a proporção de hidroxiapatita é aumentada, a variação dos tamanhos foi estabilizada com a adição de HA e a média dos valores obtidos foi em torno de 550  $\mu\text{m}$ . O que pode ser devido a presença de HA causar um aumento na reticulação da rede polimérica, pois os íons de  $\text{Ca}^{2+}$  induzem uma interação forte específica com os blocos G do alginato, aumentando a coesão estrutural e conduzindo a uma matriz mais resistente (Barros *et al.*, 2019).

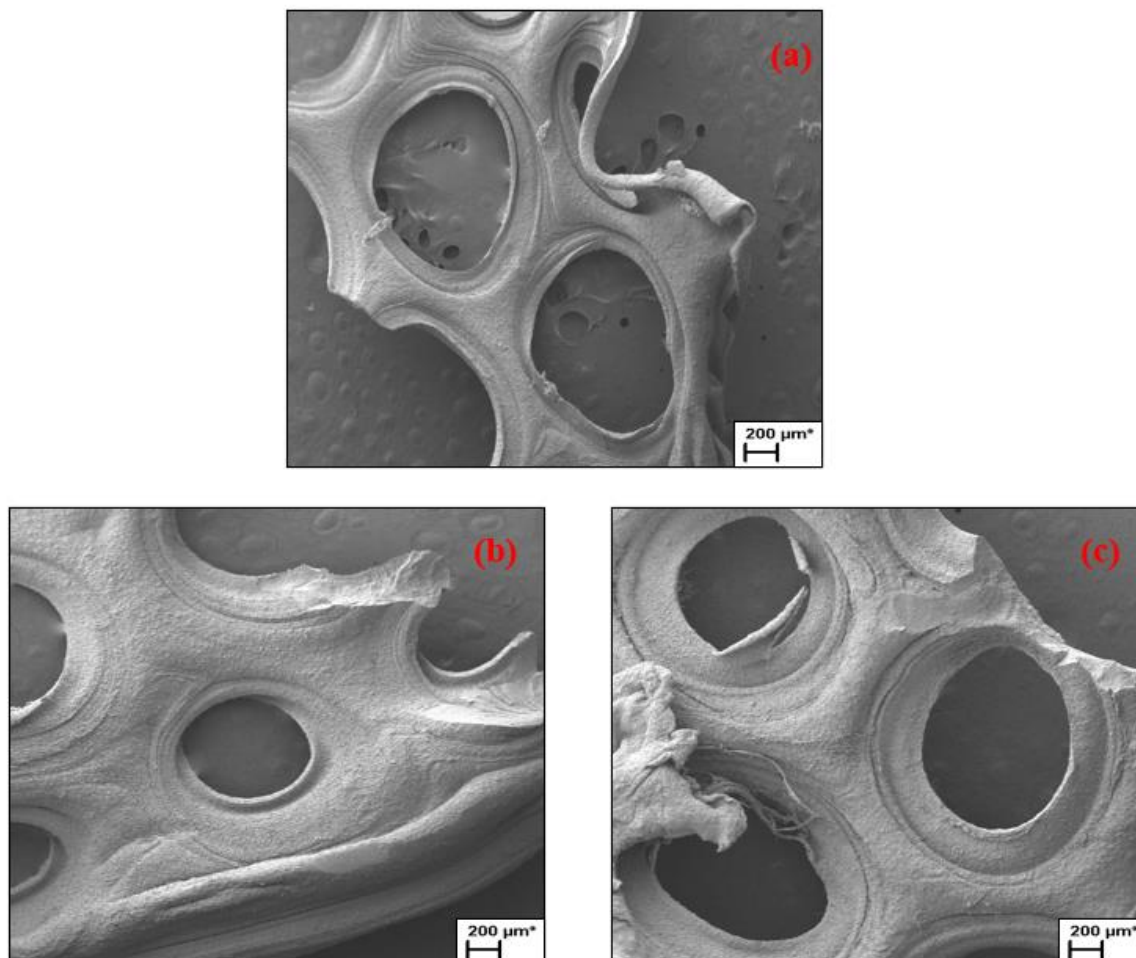
Macroporos menores foram alcançados utilizando o padrão de preenchimento "giróide", o que evidencia a possibilidade de alcançar tamanhos inferiores às amostras estudadas. No entanto, é necessária uma investigação mais aprofundada nos parâmetros de impressão, buscando alcançar uma maior uniformidade em macroporos que fiquem em um intervalo indicado para regeneração de tecido ósseo.

Figura 22 - Imagens obtidas através do MEV com o tamanho de macroporo de uma amostra AS10.



Fonte: Próprio autor.

Figura 23 - Macroporos das amostras (a) HA2,5, (b) HA5 e (c) HA10.

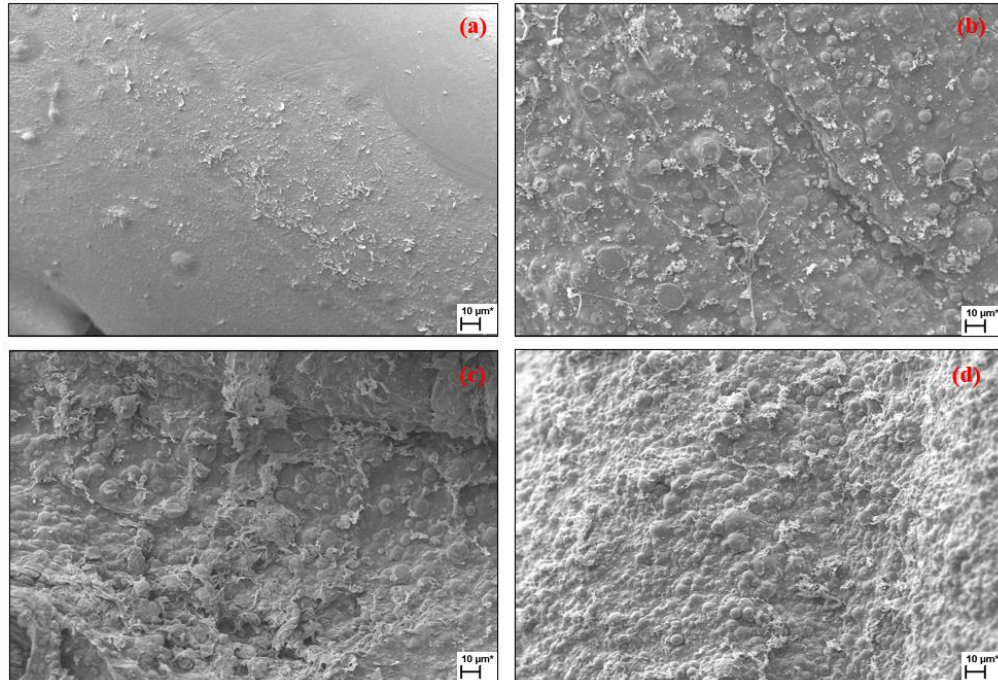


Fonte: Próprio autor.

Ao analisar as figuras 24 a 27, adquiridas através do MEV e com ampliações diversas, observa-se que as amostras de AS exibem superfícies distintas e lisas, ao passo que aquelas com a adição de HA demonstram superfícies mais rugosas. Essa rugosidade aumenta proporcionalmente com o acréscimo na proporção de HA, que acabou por se incorporar e dispersar de maneira homogênea por toda a matriz de AS. Alguns autores relatam que superfícies ásperas em implantes permitem maior crescimento do tecido e melhoram a adesão celular, proliferação e diferenciação em comparação a substratos poliméricos lisos (Barros *et al.*, 2019).

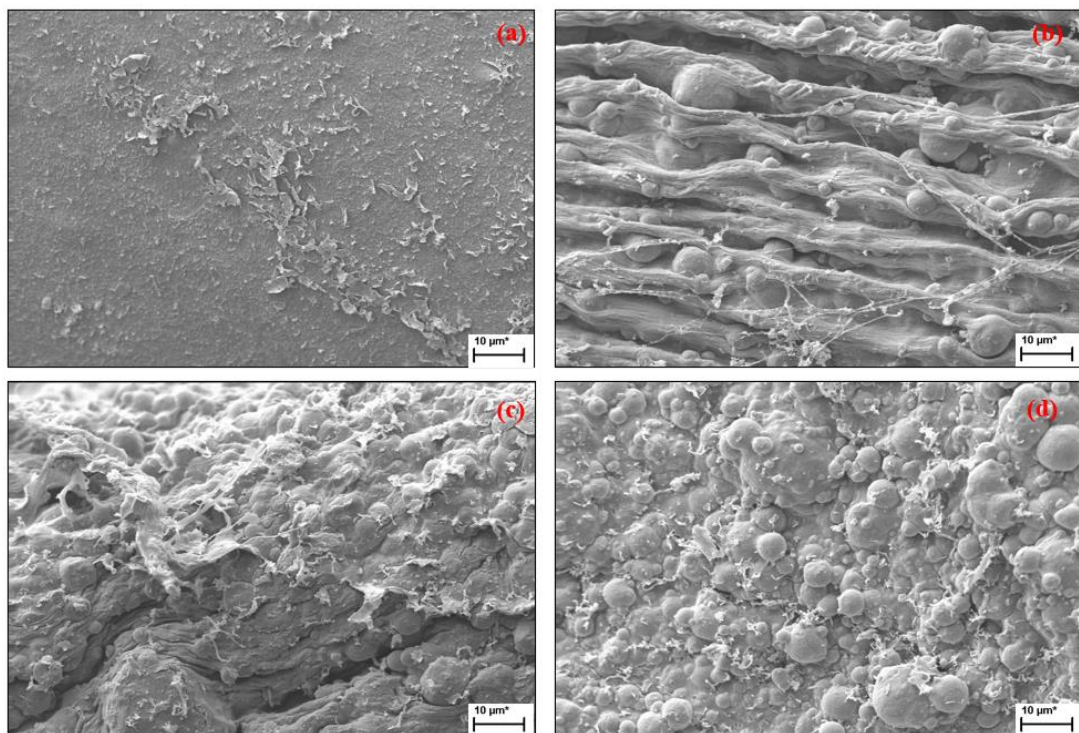
Turco *et al.*, 2009 destaca a importância de reforços bioativos expostos na superfície de um biocompósito, com funções de promover uma interface osso-implante estável, aumento na osteocondução e osteointegração.

Figura 24 - Microestrutura dos biocompósitos com aumento de 1000 vezes. (a) AS10, (b)2,5HA, (c)HA5 e (d)HA10.



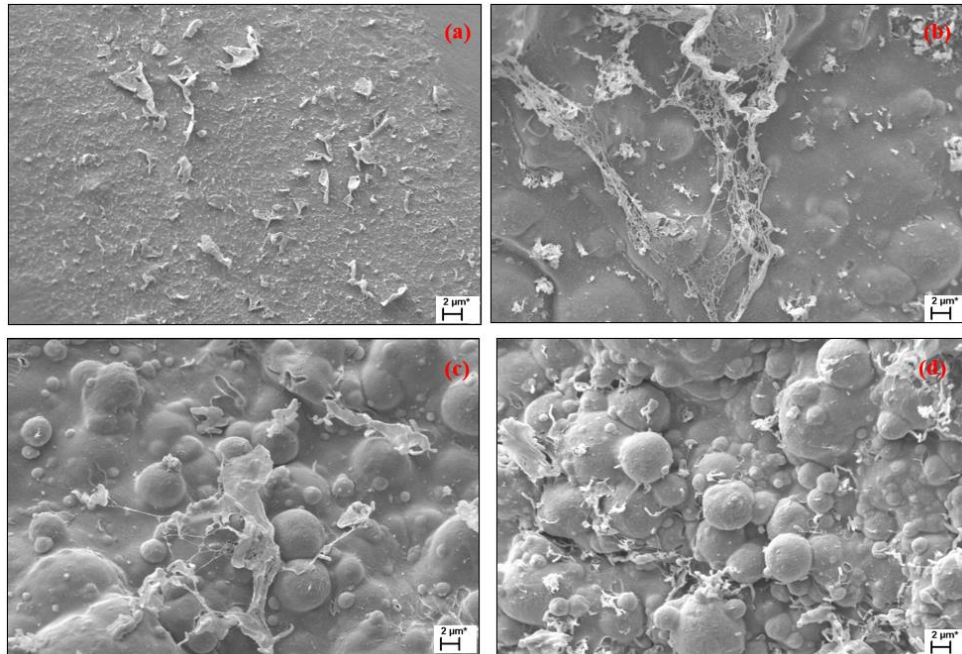
Fonte: Próprio autor.

Figura 25 - Microestrutura dos biocompósitos com aumento de 2500 vezes. (a) AS10, (b)2,5HA, (c)HA5 e (d)HA10.



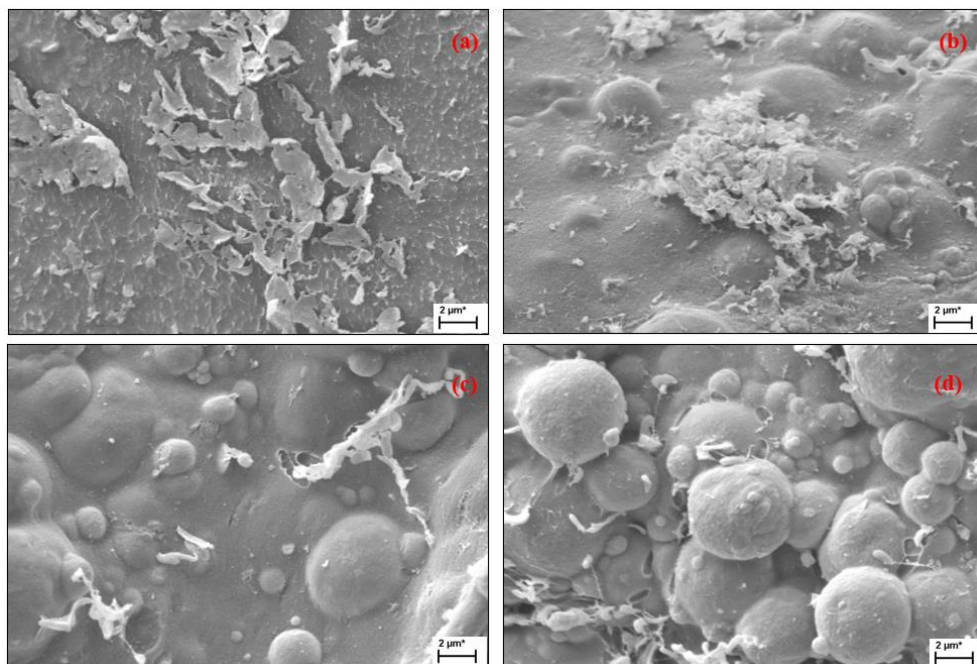
Fonte: Próprio autor.

Figura 26 - Microestrutura dos biocompósitos com aumento de 5000 vezes. (a) AS10, (b)2,5HA, (c)HA5 e (d)HA10.



Fonte: Próprio autor.

Figura 27 - Microestrutura dos biocompósitos com aumento de 10000 vezes. (a) AS10, (b)2,5HA, (c)HA5 e (d)HA10.

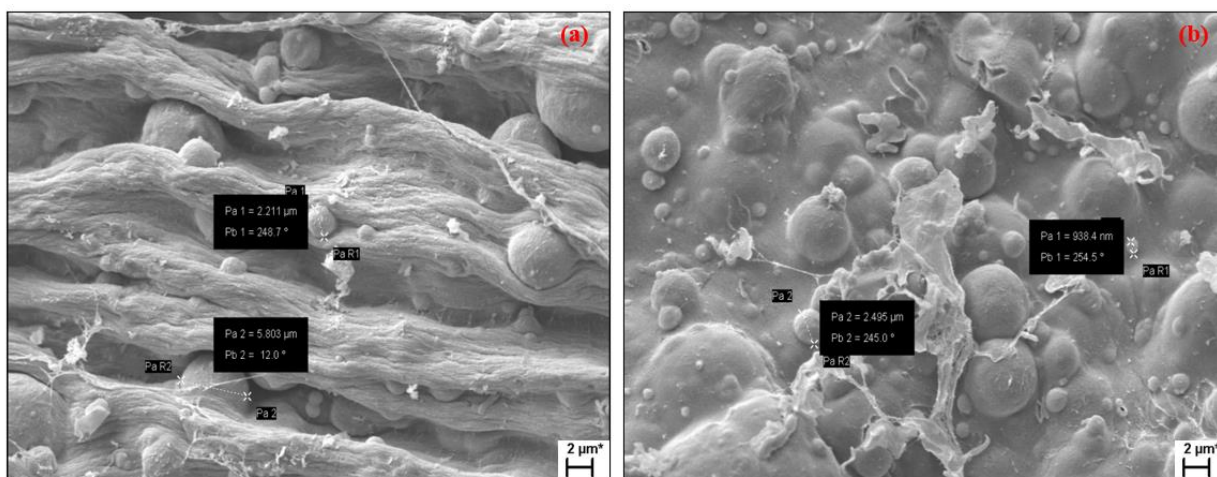


Fonte: Próprio autor.

Nas morfologias é visto que, mesmo com o aumento da ampliação nas imagens, nenhuma apresenta uma superfície estrutural porosa, que era esperada na matriz de AS (Fernandes, 2020). A falta dessa característica pode ser devido a micrografia ter sido realizada apenas na superfície reticulada do material, onde nenhum corte foi realizado para capturar imagens de seções dos *scaffolds*. Como a impressão 3D é baseada na deposição do material por camada e logo após há a reticulação, pode ter originado a formação de um invólucro na camada superficial.

A figura 28 apresenta medidas das partículas de HA que foram incorporados, resultando em um tamanho médio de  $5\mu\text{m}$ , conforme especificação do fabricante. No entanto, é possível visualizar partículas em escala nanométrica. Na imagem (a), temos:  $\text{Pa}1 = 2,211\mu\text{m}$  e  $\text{Pa}2 = 5,803\mu\text{m}$ . Na imagem (b), temos:  $\text{Pa}1 = 938,4\text{nm}$  e  $\text{Pa}2 = 2,495\mu\text{m}$ .

Figura 28 - Medidas das partículas de HA.



Fonte: Próprio autor.

#### 4.2 GRAU DE INTUMESCIMENTO (Q)

Este estudo foi realizado com o intuito de otimizar as concentrações de AS e HA nas amostras e de  $\text{CaCl}_2$  como reticulador, portanto, o grau de intumescimento foi considerado o parâmetro de análise inicial do trabalho.

Na figura 29 temos o comportamento de intumescimento dos *scaffolds*. Nota-se que as amostras apresentam comportamento semelhante, com um equilíbrio de intumescimento após as 5 primeiras horas, independente da concentração de HA. Os valores apresentados, tanto para Q quanto para o tempo de equilíbrio, mostram-se compatíveis com resultados já publicados de

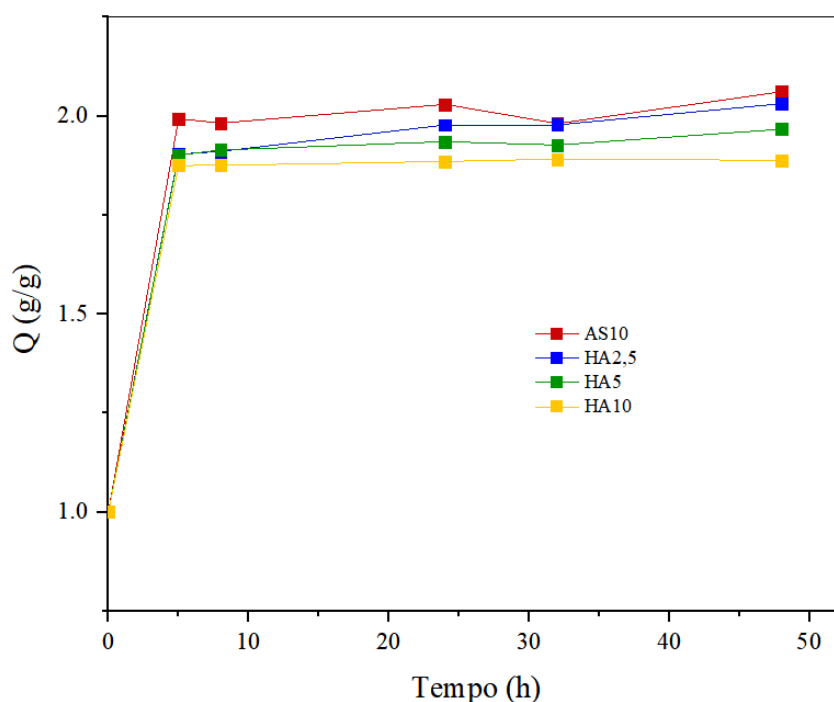
*scaffolds* compostos de polímeros naturais e HA obtidos através de bioimpressão 3D (Chakraborty *et al.*, 2022).

Fernandes (2020) compara em seu trabalho o comportamento de intumescimento entre hidrogéis com 1% e 2% (m/v) de AS e esclarece que a maior concentração de AS apresenta menores valores de Q, podendo tal comportamento ser atribuído ao fato que, mesmo que a maior concentração possua maior quantidade de grupamentos polares ( $-\text{COO}^-$ ), esses estão interagindo com o reticulador e não estão mais livres para interagir com as moléculas de água. Além disso, a reticulação deixa as cadeias do hidrogel com alta densidade de reticulação, o que contribui para baixa capacidade de expansão destas, resultando em um baixo grau de intumescimento. Comparando com as concentrações citadas, a alta concentração presente no trabalho de 10% (m/v) de AS pode ter contribuído para valores de Q nesse patamar demonstrado.

É notável, também, que o grau de intumescimento dos *scaffolds* diminuiu conforme o aumento de HA na amostra, portanto, a absorção de água do AS foi ligeiramente prejudicada pela introdução de HA. Tal comportamento pode ser atribuído ao preenchimento da rede de AS por partículas de HA, impedindo a difusão das moléculas de água nos hidrogéis.

Como discutido nessa seção, a otimização das concentrações é um ponto muito importante na fabricação de *scaffolds* de polímeros naturais (no caso AS) com HA, de forma que ocorra um balanceamento entre as propriedades de ambos os materiais. Mesmo com o decréscimo de Q observado conforme aumento de HA, os valores não sofreram alterações muito significativas, demonstrando que o reforço de HA mantém a hidrofiliabilidade do AS e incorpora aos *scaffolds* importantes características para regeneração óssea já citadas nesse trabalho.

Figura 29 - Comportamento de intumescimento dos scaffolds.



Fonte: próprio autor.

#### 4.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) e ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DIFERENCIAL (DTG)

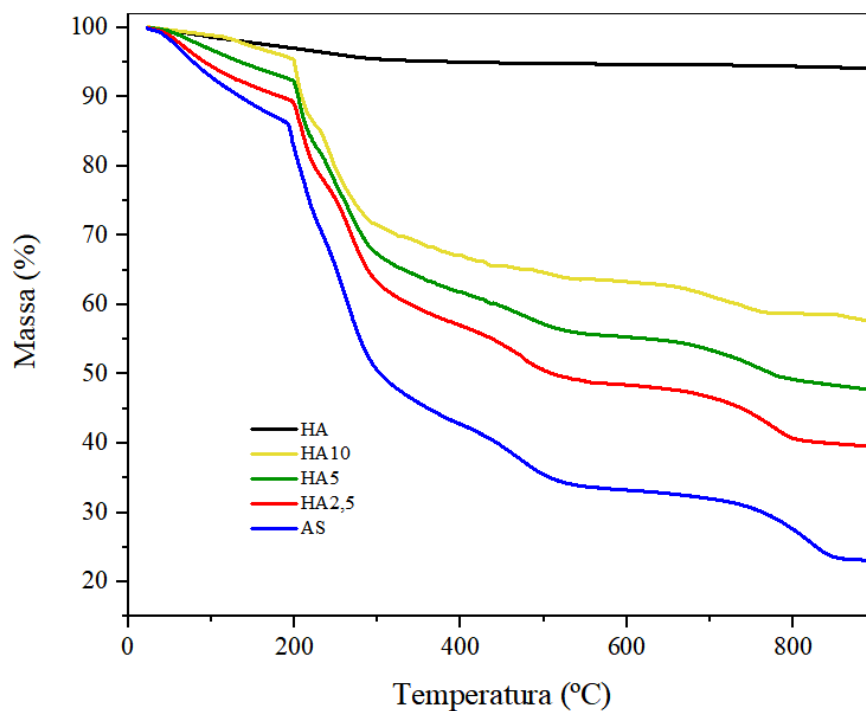
As curvas de TG e DTG da HA, AS10 e seus compósitos são mostrados nas figuras 30 e 31, respectivamente. Nota-se um primeiro evento térmico comum na região de 100°C para as amostras que contém AS em sua composição. Esse evento pode ser devido à vaporização da água absorvida que está presente na superfície dos *scaffolds*. No termograma de AS, é possível visualizar um segundo evento térmico entre 200°C e 310°C, que pode ser atribuído ao início da degradação e decomposição da estrutura carbonácea. Um terceiro evento térmico, como um pico discreto entre 360-530°C, é associado a decomposição completa da matriz e consequente formação do carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) mediante a recombinação dos elementos termicamente estáveis nessa faixa de temperatura. Por fim, notou-se um 4º evento acima de 600°C que possivelmente está relacionado a decomposição do  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  de forma não-elementar (Fernandes, 2020).

Para a HA pura, também foi observado um evento térmico semelhante até 100 °C associado à perda das moléculas de água fisicamente adsorvidas na HA. O segundo evento

térmico entre 250° e 600°C pode obedecer a perda de moléculas carbonatadas adsorvidas. O último evento, após 600°C, está associado à lenta perda de água da rede (PALACIOS *et al.*, 2013).

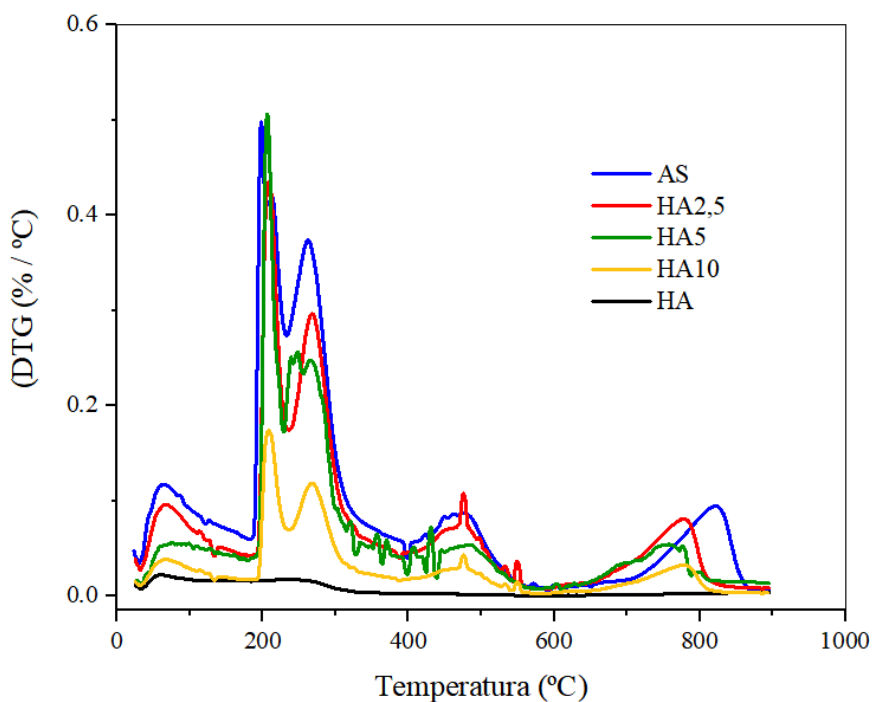
A presença de HA nos *scaffolds* não influenciou significativamente a estabilidade térmica, com apenas um leve aumento na temperatura de degradação inicial (Ti). Os valores de Ti para os *scaffolds* AS, HA2,5, HA5 e HA10 foram 186, 192, 190 e 199°C, respectivamente. Observou-se também que o resíduo após o ciclo de aquecimento aumentou com o aumento da quantidade de HA, conforme esperado (Senra *et al.*, 2020).

Figura 30 - Curvas de TG de HA puro, AS10, HA2,5, HA5 e HA10.



Fonte: próprio autor.

Figura 31 - Curvas de DTG de HA puro, AS10, HA2,5 e HA5.

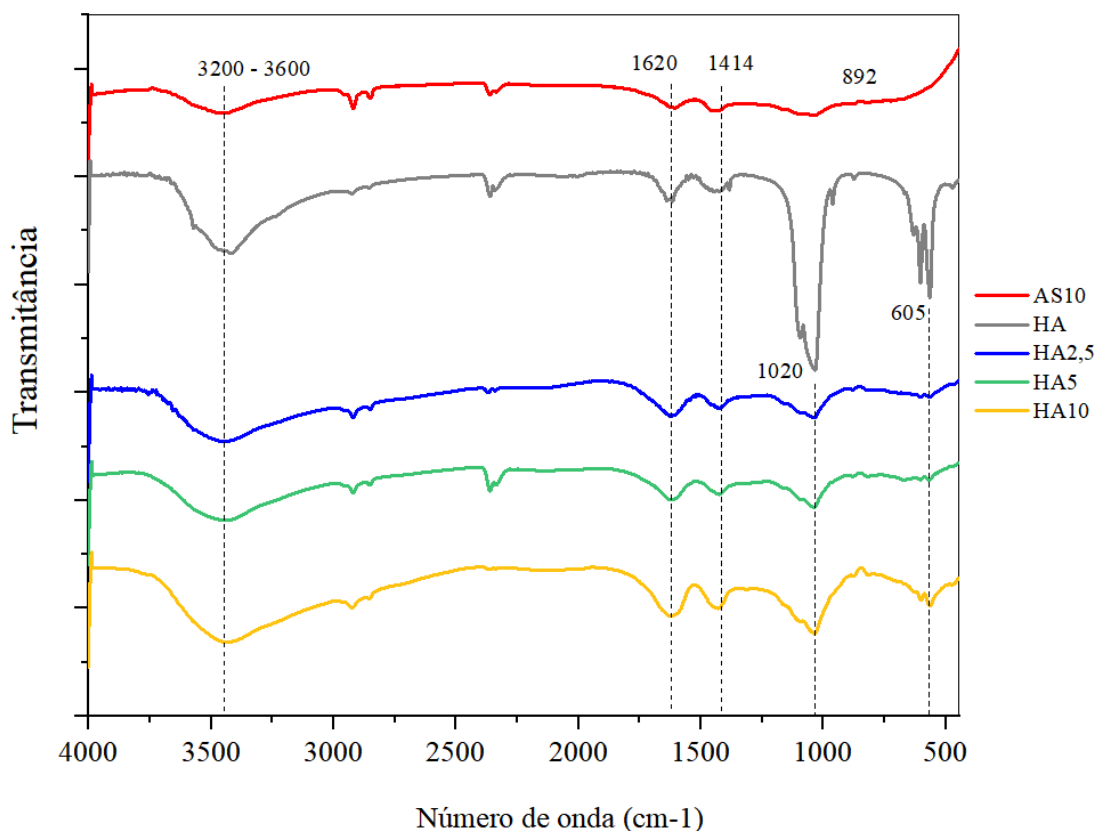


Fonte: próprio autor.

#### 4.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

O FTIR é uma técnica utilizada para detectar as vibrações das ligações das moléculas de um determinado composto. Utilizou-se essa técnica para investigar as vibrações das ligações presentes na estrutura da HA, do AS e as eventuais interações entre os compostos formadores dos *scaffolds*. A figura 32 apresenta os espectros dos materiais citados, em que é possível observar bandas bem definidas que apresentam os grupos característicos do AS e da HA e as possíveis interações observadas quando sintetizados ambos materiais e reticulados após a bioimpressão.

Figura 32 - Espectros de FTIR referentes ao AS, HA e seus compósitos.



Fonte: próprio autor.

Para o espectro de AS, nota-se uma banda larga na região de 3200 – 3600  $\text{cm}^{-1}$  que está relacionada com o alongamento das hidroxilas (-OH), atribuído devido à forte ligação de hidrogênio dos tipos intramolecular e intermolecular. Em 1620 e 1414  $\text{cm}^{-1}$ , é possível notar, respectivamente, picos referentes ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo carboxilato  $\text{-COO}^-$ . Em 892  $\text{cm}^{-1}$  é possível notar um pico suave correspondente as vibrações de alongamentos dos grupos éteres (C-O-C) presente no anel da estrutura do AS (Fernandes, 2020).

Nos espectros de HA pura e dos compósitos formados é possível visualizar a banda larga entre 3200 – 3600  $\text{cm}^{-1}$  do alongamento das hidroxilas. Nota-se ainda os picos de flexão e alongamento do grupo fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  em 1020  $\text{cm}^{-1}$  e 605  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, que, no caso dos compósitos, podem ser atribuídos à sobreposição do alongamento de  $\text{COO}^-$  do AS e do grupo fosfato da HA. É possível notar que a intensidade dos picos relativos ao grupo fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  nos compósitos aumentou conforme houve aumento da concentração de HA nas amostras

(Barros *et al.*, 2019). A tabela 2 a seguir apresenta as bandas de absorção mais relevantes discutidas no trabalho.

Tabela 3 - Principais bandas de absorção observadas através do FTIR.

| NÚMERO DE ONDA (cm <sup>-1</sup> ) | GRUPOS FUNCIONAIS                                                                |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 3200-3600                          | Alongamento do grupo hidroxila (-OH)                                             |
| 1620 e 1414                        | Alongamento simétrico e assimétrico dos grupos carboxílicos (-COO <sup>-</sup> ) |
| 892                                | Alongamento dos grupos éteres C-O-C                                              |
| 1020                               | Estiramento de P-O                                                               |
| 605                                | Deformação de P-O                                                                |

Fonte: próprio autor.

#### 4.5 DEGRADAÇÃO EM PBS

As figuras 33 a 36 ilustram as degradações observadas após 72 e 120 horas, destacando uma notável variação na coloração esbranquiçada à medida que a proporção de hidroxiapatita (HA) aumenta. Todas as amostras manifestaram comportamento semelhante em relação à degradação, com um aumento visível na deterioração conforme as proporções de HA aumentavam. Esse incremento na degradação pode ser atribuído ao mecanismo *in situ* da hidroxiapatita no gel de alginato, resultando na redução da concentração de íons Ca<sup>2+</sup> retidos na cadeia molecular do alginato. Isso, por sua vez, diminui o efeito da reticulação e/ou possivelmente a alta interação da troca iônica do Ca<sup>2+</sup> com outros íons da solução PBS (Correia, 2022)

Originalmente, a expectativa era uma degradação mais gradual, culminando em 4 semanas; no entanto, o ensaio foi interrompido após 120 horas devido à completa deterioração das amostras. A aceleração do processo de degradação pode ser atribuída ao pH mais ácido do que o ideal para o corpo humano e à instabilidade da temperatura durante o ensaio, com valores superiores a 40°C em alguns momentos durante os dias.

Figura 33 - Amostras de AS degradadas. a) 72 horas e b) 120 horas.



Fonte: Próprio autor.

Figura 34 - Amostras de HA2,5 degradadas. a) 72 horas e b) 120 horas.



Fonte: Próprio autor.

Figura 35 - Amostras de HA5 degradadas. a) 72 horas e b) 120 horas.



Fonte: Próprio autor.

Figura 36 - Amostras de HA10 degradadas. a) 72 horas e b) 120 horas.



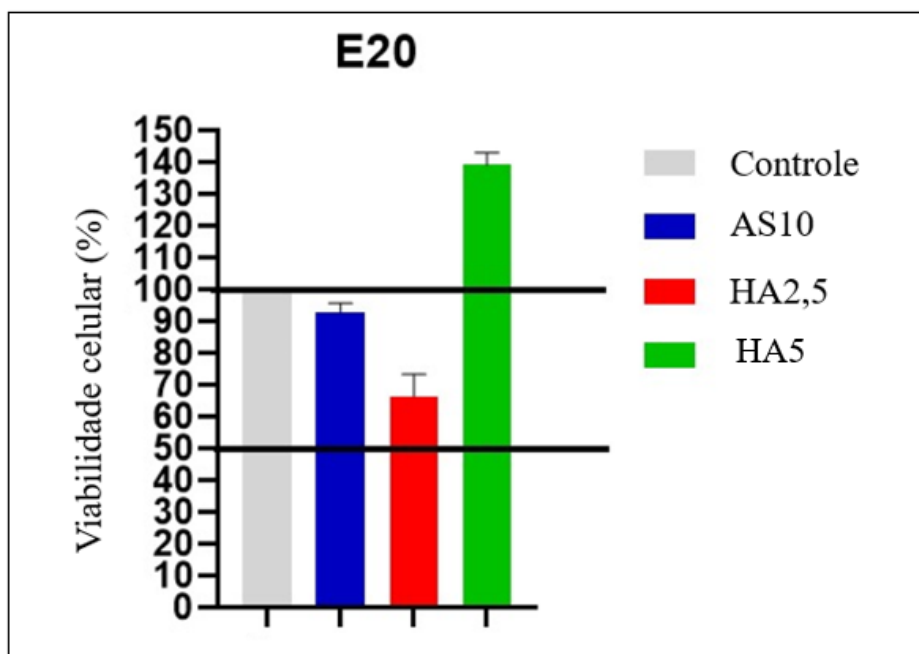
Fonte: Próprio autor.

#### 4.6 CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de viabilidade celular foi realizado em triplicata, utilizando o método MTT. O meio de controle utilizado foi DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino em comparação com o substrato retirado da incubação dos *scaffolds*. Após 24 horas de incubação, foi possível observar que os índices estavam acima de 50%, o que indica que não houve diminuição da viabilidade celular tanto do controle, quanto do substrato dos *scaffolds*, em células benignas da mama canina, E20.

A viabilidade celular dos *scaffolds* de AS e reforçados com HA foram sempre superiores a 50%. HA2,5 demonstrou viabilidade celular acima de 60% e, mesmo próxima do controle (50%), não se mostrou citotóxica para as células estudadas. Já para HA5, os valores foram superiores a 100%, indicando ótima viabilidade celular. Esses resultados, ainda que preliminares, indicam que os *scaffolds* não se apresentam citotóxicos para a linhagem celular estudada. Além disso, é possível afirmar que tais materiais auxiliaram na proliferação celular. A figura 37 demonstra os resultados discutidos.

Figura 37 - Viabilidade celular dos scaffolds.



Fonte: próprio autor.

#### 4.7 DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS PARA APLICAÇÃO EM OVELHAS

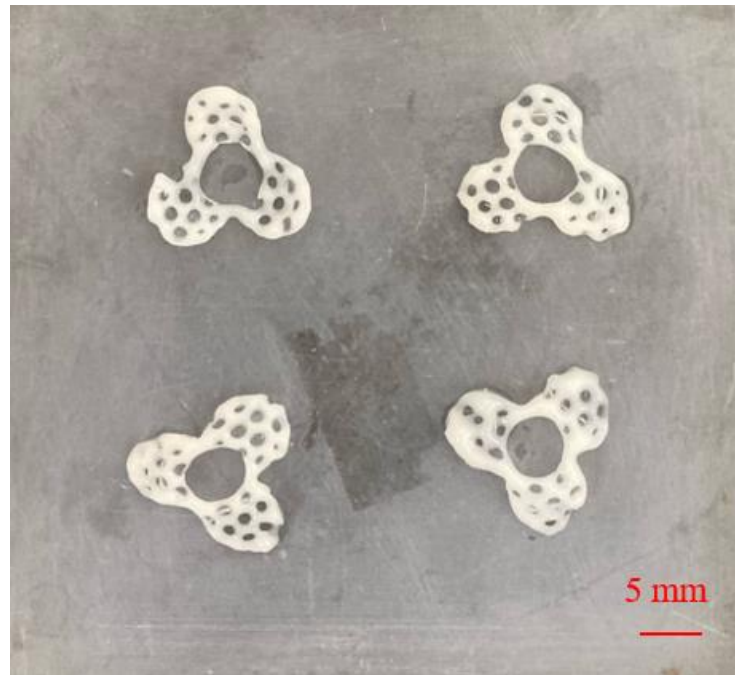
A figura 38 ilustra o modelo anatômico impresso em PLA que auxiliou no planejamento cirúrgico e consequentemente ao desenvolvimento dos designs. As figuras 39 e 40 mostram os protótipos desenvolvidos utilizando HA5 e reticulação com CaCl<sub>2</sub> a 1%. Os *scaffolds* apresentam a rigidez esperada para este tipo de amostra, tornando-os manuseáveis em procedimentos cirúrgicos. Contudo, observa-se uma maior dificuldade em manter a reprodutibilidade das formas, uma ocorrência considerada normal dado o caráter prototípico inicial. Isso indica a necessidade de ajustes nos parâmetros de impressão, ressaltando que os mesmos parâmetros utilizados para fabricar um determinado *design* podem não ser suficientes para reproduzir outros com precisão.

Figura 38 - Modelo anatômico impresso em 3D.



Fonte: próprio autor.

Figura 39 - Protótipos com menor quantidade de macroporos.



Fonte: Próprio autor.

Figura 40 - Protótipos com maior quantidade de macroporos.

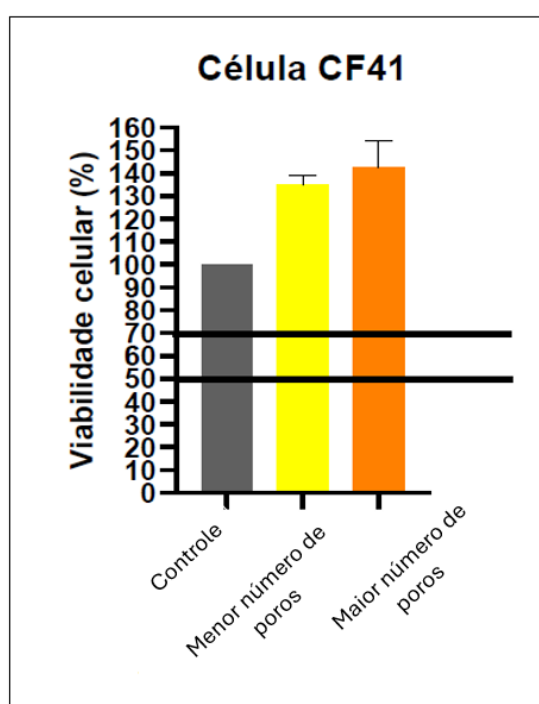


Fonte: Próprio autor.

Os protótipos exibiram uma redução em suas dimensões, proporcional àquela observada nas amostras de HA5 previamente analisadas neste estudo, aproximadamente 60%, ao considerar a maior medida entre as bordas. Quanto ao tamanho dos poros, notou-se uma significativa variação dentro de uma mesma amostra, permanecendo em uma faixa previamente discutida, com dimensões oscilando entre 400 e 900  $\mu\text{m}$ .

A figura 41 mostra os resultados para o ensaio de crescimento celular realizado para comparar o desempenho entre os dois *designs*.

Figura 41 - Ensaio de crescimento celular dos protótipos.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados indicam que os protótipos fabricados com ambos os *designs* exibiram maior viabilidade celular em comparação com o controle, no qual o crescimento celular foi observado sem a presença de qualquer *scaffold* na cultura. Ambos os *designs* demonstraram viabilidade celular consistente com a amostra HA5 no ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular descritos na seção 4.6. No entanto, uma metodologia distinta e um tempo de exposição às células mais curto foram empregados, evidenciando que ambos os *designs* foram mais eficazes. Entre eles, os protótipos com maior porosidade apresentaram resultados mais atrativos em relação ao crescimento celular, destacando a importância da quantidade de macroporos nos projetos de *scaffolds* destinados à regeneração óssea.

## 5 CONCLUSÕES

Por meio dos procedimentos adotados nesse trabalho, foi possível produzir *scaffolds* de alginato/hidroxiapatita utilizando a bioimpressão 3D em uma impressora 3D convencional modificada para bioimpressora pela empresa Bioedtech, uma técnica acessível e que se mostrou bastante versátil, além de utilizar materiais biodegradáveis e de fácil acesso.

Os *scaffolds* bioimpressos apresentaram geometria fiel ao modelo 3D projetado, além de resistência e rigidez adequadas para manipulação em cirurgias. A redução observada entre o diâmetro do modelo e o diâmetro dos *scaffolds* após a reticulação se mantiveram bastante próximas, independentemente da concentração de HA, o que possibilita aplicações personalizadas, facilitando a previsão do diâmetro após a reticulação.

Com relação ao comportamento de intumescimento, as amostras se mostraram com boa hidrofiliabilidade, se mantendo dentro do esperado para a alta concentração do AS. Além disso, com a adição da HA foi possível notar um pequeno decréscimo nos valores de Q, podendo ser justificado pelo preenchimento da rede de AS por partículas de HA, pois conforme houve aumento da concentração de HA, menos intumescidos se tornaram os *scaffolds*.

Com relação aos termogramas, o comportamento da HA foi dentro do esperado, se mantendo bastante estável e a amostra de AS10 apresentou eventos térmicos normais para a faixa de temperatura adotada. Já com relação aos compósitos, a adição de HA na matriz de AS melhorou a estabilidade térmica dos *scaffolds*, com aumento da estabilidade conforme aumento na concentração de HA. As análises espectroscópicas (FTIR) comprovaram evidentemente a formação de hidrogéis, além disso, o aparecimento de bandas característica de  $\text{PO}_4^{3-}$  em 1020 e  $605\text{ cm}^{-1}$  demonstraram a incorporação da HA na matriz de AS. Os resultados obtidos no ensaio de degradação em PBS, embora não tenham ocorrido de forma ideal, sugerem uma correlação entre a proporção de HA nas amostras e a velocidade de deterioração, evidenciando a importância de encontrar a proporção adequada de HA para otimizar a estabilidade dos *scaffolds*.

O projeto de aplicação prática foi uma importante ferramenta para simular o preparo e fabricação de *scaffolds* voltados para uma aplicação bastante específica. Tanto o material quanto o processo de fabricação se mantiveram eficazes, demonstrando de forma prática o potencial uso dos processos estudados.

Os resultados da biofabricação de *scaffolds* demonstraram a possibilidade de utilizar AS como matriz compósita e a adição de propriedades de osteoindução, osteocondução e ganho de

resistência mecânica através da HA, sem a perda de propriedades importantes do AS. Além disso, os *scaffolds* se mostraram não citotóxicos para as linhagens celulares estudada e com possibilidade de ajudar na proliferação celular.

A bioimpressão utilizando uma impressora de filamentos convencional demonstrou ser um método eficiente e acessível para a produção de scaffolds, permitindo a avaliação das características do material e simulação de suas aplicações. A amostra com 5% de HA destacou-se como uma escolha equilibrada, viável tanto em termos de síntese quanto de printabilidade, em comparação com as amostras com 10% de HA e 2,5% de HA. Além disso, essa concentração apresentou as características necessárias para aplicações práticas.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA DE NOTÍCIAS IBGE. **Em 2022, expectativa de vida era de 75,5 anos.** Agência de Notícias, 2023. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/38455-em-2022-expectativa-de-vida-era-de-75-5-anos>. Acesso em: 6 abr. 2024.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

VURAL, Altugan Cahit; ODABAS, Odabas; KORKUSUZ, Petek; SAĞLAM, Atyie Y. S. **Cranial bone regeneration via BMP-2 encoding mesenchymal stem cells**. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.3109/21691401.2016.1160918?needAccess=true>. Acesso em: 4 abr. 2024.

BAJAJ, Piyush.; SCHWELLER, Ryan. M.; KHADEMHOSEINI, Ali.; WEST, Jennifer L.; BASHIR, Rashid. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Annual review of biomedical engineering**. Palo Alto, v. 16, p. 247–276, 11 jul. 2014.

BARROS, Joana; FERRAZ, Maria Pia; AZEREDO, Joana; FERNANDES, M. H.; GOMES, Pedro S.; MONTEIRO, Fernando J. Alginate-nanohydroxyapatite hydrogel system: Optimizing the formulation for enhanced bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**. Amsterdam, v. 105, p. 109985, 1 dez. 2019.

RATNER, Buddy D.; HOFFMAN, Allan S.; SCHOEN, Frederick J.; LEMONS, Jack E. **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine**. 3. ed. Cambridge: Academic Press, 2012.

CHAKRABORTY, Juhi; MAJUMDER, Nilotpal; SHARMA, Aarushi; PRASAD, Sukanya; GHOSH, Sourabh. 3D bioprinted silk-reinforced Alginate-Gellan Gum constructs for cartilage regeneration. **Bioprinting**. Amsterdam, v. 28, p. e00232, dez. 2022.

CHEISY DAIANA MOREIRA. **Hidrogéis injetáveis a base de quitosana/gelatina/nanopartículas de vidro bioativo com potencial para regeneração óssea: estudo in vitro e in vivo**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 21 maio 2018.

CHEN, Hao; HAN, Qing; WANG, Chenyu; LIU, Yang; CHEN, Bingpeng; WANG, Jincheng. Porous Scaffold Design for Additive Manufacturing in Orthopedics: A Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. Lausanne, v. 8, 17 jun. 2020.

DAAR, Abdallah S. The Future of Replacement and Restorative Therapies: From Organ Transplantation to Regenerative Medicine. **Transplantation Proceedings**. Philadelphia, v. 45, n. 10, p. 3450–3452, 1 dez. 2013.

DACULSI, Guy; FELLAH, Borhane Hakim; MIRAMOND, Thomas; DURAND, Marlene. Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a

smart bone substitutes. **IRBM**. Issy les Moulineaux Cedex, Numéro spécial - RITS 2013. v. 34, n. 4, p. 346–348, 1 nov. 2013.

DRAGAN, Ecaterina Stela; DINU, Maria Valentina. Polysaccharides constructed hydrogels as vehicles for proteins and peptides. A review. **Carbohydrate Polymers**. Oxford, v. 225, p. 115210, 1 dez. 2019.

DUBEY, Anshu; GHOSH, Souvik; JAISWAL, Satish; ROY, Partha; LAHIRI, Debrupa. Assessment of protein adhesion behaviour and biocompatibility of magnesium/Co-substituted HA-based composites for orthopaedic application. **International Journal of Biological Macromolecules**. Amsterdam, v. 208, p. 707–719, 31 maio 2022.

FÉLIX, F. T.; MARINHO, J. P. N.; SILVA, S. N. DA; AZEVEDO, D. M. DE F. S. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO E NANOFIBRAS DE CELULOSE VISANDO APLICAÇÃO NO REPARO DE TECIDOS ÓSSEOS. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**. Viçosa, v. 3, n. 8, p. 1209–1226, 28 set. 2017.

GABRIELA MENDES DA ROCHA VAZ. **Printabilidade de biotinta para processos de bioimpressão 3D por extrusão: abordagem de design e parâmetros de impressão**. Brasília: Universidade de Brasília, 29 maio 2022.

GREDES, Tomasz; KUNATH, Franziska; GEDRANGE, Tomasz.; KUNERT-KEIL, Cristiane. Bone Regeneration after Treatment with Covering Materials Composed of Flax Fibers and Biodegradable Plastics: A Histological Study in Rats. **BioMed Research International**. Londres, v. 2016, p. 5146285, 2016.

CORREIA, Gricirene Sousa. **Fabricação de nanofibras de poli (álcool vinílico) / hidroxiapatita-alginato por eletrofiação para aplicação na engenharia de tecido ósseo**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 3 mar. 2022.

GUASTALDI, Antonio Carlos; APARECIDA, Anahi Herrera. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**. São Paulo, v. 33, p. 1352–1358, 2010.

GUILHERME, Marcos R.; AOUADA, Fauze A.; FAJARDO, André R.; MARTINS, Alessandro F.; PAULINO, Alexandre T.; DAVI, Magali F. T.; RUBIRA, Adley F.; MUNIZ, Edvani C. Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. **European Polymer Journal**. Oxford, v. 72, p. 365–385, 1 nov. 2015.

KAY, M.I.; YOUNG, R. A.; POSNER, A. S. Crystal Structure of Hydroxyapatite. **Nature**. Londres, v. 204, n. 4963, p. 1050–1052, dez. 1964.

LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**. Londres, v. 37, n. 1, p. 106–126, jan. 2012.

LI, Jialiang; LI, jiaxi; YANG, Yubing; HE, Xijing; WEI, Xinyu; TAN, Qinghua; WANG, Yigun; XU, Siyue; CHANG, Sue; LIU, Weiwei. Biocompatibility and osteointegration capability of  $\beta$ -TCP manufactured by stereolithography 3D printing: In vitro study. **Open Life Sciences**. Berlim, v. 18, n. 1, p. 20220530, 24 jan. 2023.

LIU, Chaozong; XIA, Zhidao; CZERNUSZKA, Jan T. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. **Chemical Engineering Research and Design**. Londres, v. 85, n. 7, p. 1051–1064, 1 jan. 2007.

GIBSON, Lorna. Tissue Engineering Scaffolds: Processing and Properties. Youtube, 16 de outubro de 2016. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=hOZ6-geaRUo&list=PLUl4u3cNGP611bupB7ohUYEScjWb60mWW>. Acesso em 06 de abril de 2024.

LUIZ CARLOS UCHÔA JUNQUEIRA; JOSÉ CARNEIRO. **Histologia Básica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MARCELO DE MEDEIROS PINHEIRO; VERA LÚCIA SZEJNFELD. **Epidemiologia da osteoporose no Brasil** *Sociedade Paulista de Reumatologia*, 18 mar. 2024. Disponível em: <https://www.reumatologiasp.com.br/artigos/epidemiologia-da-osteoporose-no-brasil/>. Acesso em: 6 abr. 2024

MIRONOV, V.; TRUSK, T.; KASYANOV, V.; LITTLE, S.; SWAJA, R.; MARKWALD, R. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. **Biofabrication**. Bristol, v. 1, n. 2, p. 022001, jun. 2009.

MONCAL, K. K. *et al.* 3D printing of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(D,L-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite constructs for bone tissue engineering. **Journal of Materials Research**, Heidelberg, v. 33, n. 14, p. 1972–1986, 27 jul. 2018.

MURPHY, Sean V.; DE COPPI, Paolo; ATALA, Anthony. Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. **Nature Biomedical Engineering**. Londres, v. 4, n. 4, p. 370–380, abr. 2020.

NGA, Nguyen Kim; THANH TAM, Lai Thi; HA, Nguyen T.; HUNG VIET, Pham; HUY, Trang Q. Enhanced biomineralization and protein adsorption capacity of 3D chitosan/hydroxyapatite biomimetic scaffolds applied for bone-tissue engineering. **RSC Advances**. Cambridge v. 10, n. 70, p. 43045–43057, 2020.

NISHIYAMA, Yuichi; HANAFUSA, Tadashi; YAMASHITA, Jun; YAMAMOTO, Yoko; ONO, Toshiro. Adsorption and removal of strontium in aqueous solution by synthetic hydroxyapatite. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**. Budapeste, v. 307, p. 1279–1285, 2016.

OLEKSY, Malgorzata; DYNAROWICZ, Klaudia; AEBISHER, David. Rapid Prototyping Technologies: 3D Printing Applied in Medicine. **Pharmaceutics**. Basel, v. 15, n. 8, p. 2169, ago. 2023.

OZBOLAT, Ibrahim T.; YU, Yin. Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. **IEEE transactions on bio-medical engineering**. Piscataway, v. 60, n. 3, p. 691–699, mar. 2013.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa C. K.; MORAES, Ângela M. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. **Química Nova**. São Paulo, v. 38, p. 957–971, ago. 2015.

PORRELLI, Davide; TRAVAN, Andrea.; TURCO, G.; MARSICH, E.; BORGOGNA, M.; PAOLETTI, S.; DONATI, I. Alginate–Hydroxyapatite Bone Scaffolds with Isotropic or Anisotropic Pore Structure: Material Properties and Biological Behavior. **Macromolecular Materials and Engineering**. Berlim, v. 300, n. 10, p. 989–1000, 2015.

PUTRI, Indri L.; FATCHIYAH; PRAMONO, Coen.; BACHTIAR, Indra; LATIEF, Fourier D. E.; UTOMO, Budi; RACHMAN, Arif; SOESILAWATI, Pratiwi; HAKIM, Lukman; RANTAM, Fedik A.; PERDANAKUSUMA, David S. Alveolar Repair Using Cancellous Bone and Beta Tricalcium Phosphate Seeded With Adipose-Derived Stem Cell. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal: Official Publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association**. Thousand Oaks, v. 61, n. 4, p. 555–565, abr. 2024.

RAJABI, Mina; CABRAL, Jaydee D.; SAUNDERSON, Sarah; GOULD, Mauree; ALI, M. Azam. Development and optimisation of hydroxyapatite-polyethylene glycol diacrylate hydrogel inks for 3D printing of bone tissue engineered scaffolds. **Biomedical Materials**. Bristol, v. 18, n. 6, p. 065009, set. 2023.

RANDAZZO, Michael; PISAPIA, Jared M.; SINGH, Nickpreet; THAWANI, Jayesh P. 3D printing in neurosurgery: A systematic review. **Surgical Neurology International**. Pittsford, v. 7, n. Suppl 33, p. S801–S809, 14 nov. 2016.

RENAN DA SILVA FERNANDES. **Síntese e caracterização de hidrogéis nanoestruturados contendo argila e zeólita com potencialidade de aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos**. Ilha Solteira: Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Faculdade de Engenharia Campus de Ilha Solteira, 1 mar. 2016.

**Desenvolvimento de hidrogéis bionanocompósitos ativos baseados em amido e alginato com potencial aplicação na agricultura e na biomedicina**. Ilha Solteira: Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Faculdade de Engenharia Campus de Ilha Solteira, 15 maio 2020.

RIBEIRO, Marta; MORAES, Mariana A. DE; BEPPU, Marisa M.; GARCIA, Mónica P.; FERNANDES, Maria H.; MONTEIRO, Fernando J.; FERRAZ, Maria P. Development of silk fibroin/nanohydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering. **European Polymer Journal**. Oxford, v. 67, p. 66–77, 1 jun. 2015.

SCHUBERT, Carl; LANGEVELD, Mark C. VAN; DONOSO, Larry A. Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. **The British Journal of Ophthalmology**. Londres, v. 98, n. 2, p. 159–161, fev. 2014.

SCHUEZ, Maritta; KURTH, Thomas; CURRIE, Joshua D.; SANDOVAL-GUZMÁN, Tatiana. Embryonic Tissue and Blastema Transplantations. In: SEIFERT, A. W.; CURRIE, J. D. (Eds.). **Salamanders: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2023. p. 235–247.

SENRA, Monica R.; LIMA, Rafaella B. DE; SOUZA, Diego DE H. S.; MARQUES, Maria DE F. V.; MONTEIRO, Sergio N. Thermal characterization of hydroxyapatite or carbonated hydroxyapatite hybrid composites with distinguished collagens for bone graft. **Journal of Materials Research and Technology**. Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 7190–7200, 1 jul. 2020.

SEOL, Young -J.; PARK, Dong Y.; PARK, Ju Y.; KIM, S. W.; PARK, Seonj J.; CHO, Dong-W. A new method of fabricating robust freeform 3D ceramic scaffolds for bone tissue regeneration. **Biotechnology and Bioengineering**. Hoboken, v. 110, n. 5, p. 1444–1455, maio 2013.

SILVA, Luciano P. Current Trends and Challenges in Biofabrication Using Biomaterials and Nanomaterials: Future Perspectives for 3D/4D Bioprinting. *Em: 3D and 4D Printing in Biomedical Applications*. [S.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2019. p. 373–421.

SINHA, Vibha; CHAKMA, Sumedha. Advances in the preparation of hydrogel for wastewater treatment: A concise review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. Amsterdam, v. 7, n. 5, p. 103295, 1 out. 2019.

TAVAKOLI, Javad; LAISAK, Esther.; GAO, Meng.; TANG, Youhong. AIEgen quantitatively monitoring the release of Ca<sup>2+</sup> during swelling and degradation process in alginate hydrogels. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**. Amsterdam, v. 104, p. 109951, nov. 2019.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. 10. ed. [s.l.] Artmed, 2016.

TURCO, Gianluca; MARSICH, Eleonora; BELLOMO, Francesca; SEMERARO, Sabrina; DONATI, Ivan; BRUN, Francesco; GRANDOLFO, Micaela; ACCARDO, Agostino; PAOLETTI, Sergio. Alginate/Hydroxyapatite Biocomposite For Bone Ingrowth: A Trabecular Structure With High And Isotropic Connectivity. **Biomacromolecules**. Washington, v. 10, n. 6, p. 1575–1583, 8 jun. 2009.

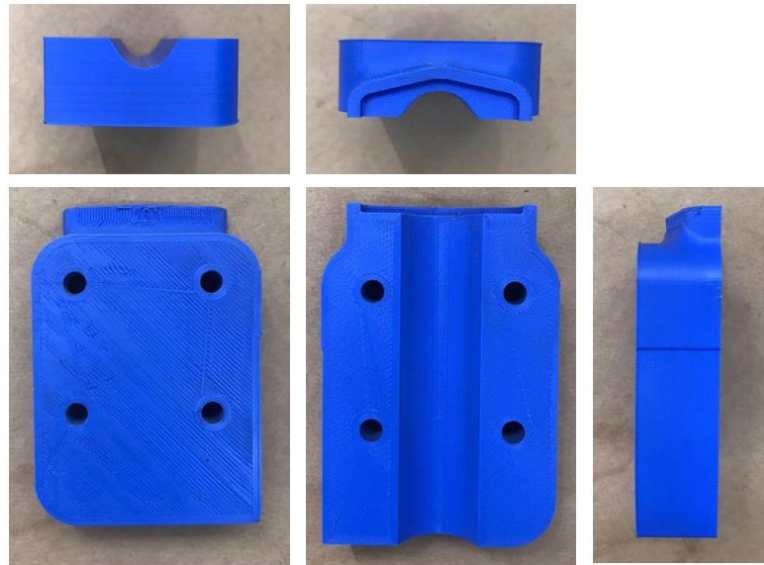
ULLAH, Faheem; OTHMAN, Muhammad B. H.; JAVED, Fatima; AHMAD, Zulkifli; AKIL, Hazizan MD. Classification, processing and application of hydrogels: A review. **Materials Science and Engineering: C**. Amsterdam, v. 57, p. 414–433, 1 dez. 2015.

AGOC SOVA, Sarah V.; CULENOVA, Martina; BIROVA, Ivana; OMANIKOVA, Leona; MONC MANOVA, Barbora; DANISOVIC, Lubos; ZIARAN, Stanislav; BAKOS, Dusan; ALEXY, Pavol. Resorbable Biomaterials Used for 3D Scaffolds in Tissue Engineering: A Review. **Materials**. Basel, v. 16, n. 12, p. 4267, 8 jun. 2023.

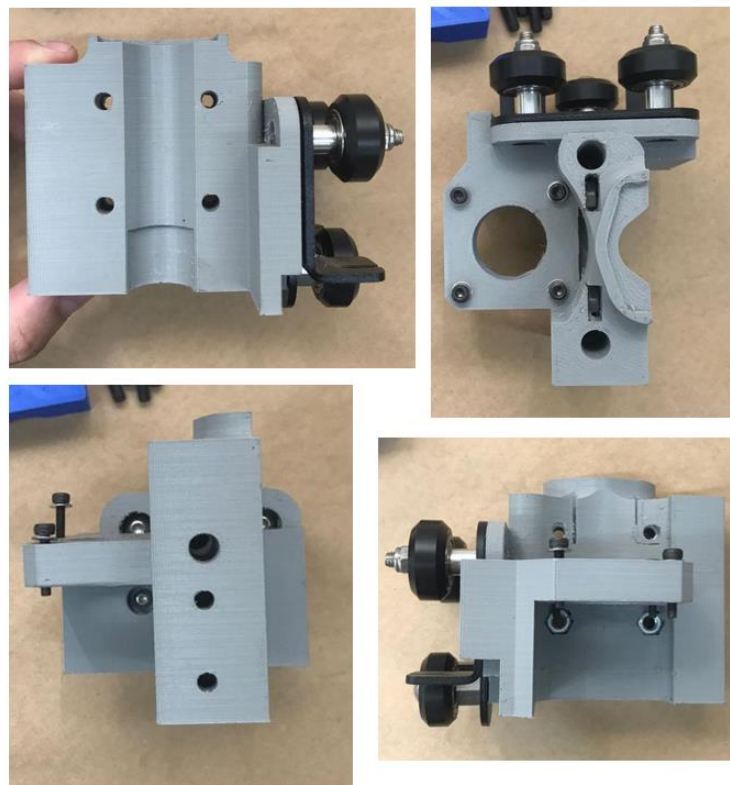
ZUFÍA, Juan; SANS, Francesc A. Applications of maxillary tuberosity block autograft. **Journal Esthetic and Restorative Dentistry**. Chichester, v. 34, n. 7, p. 1015–1028, out. 2022.

## ANEXOS

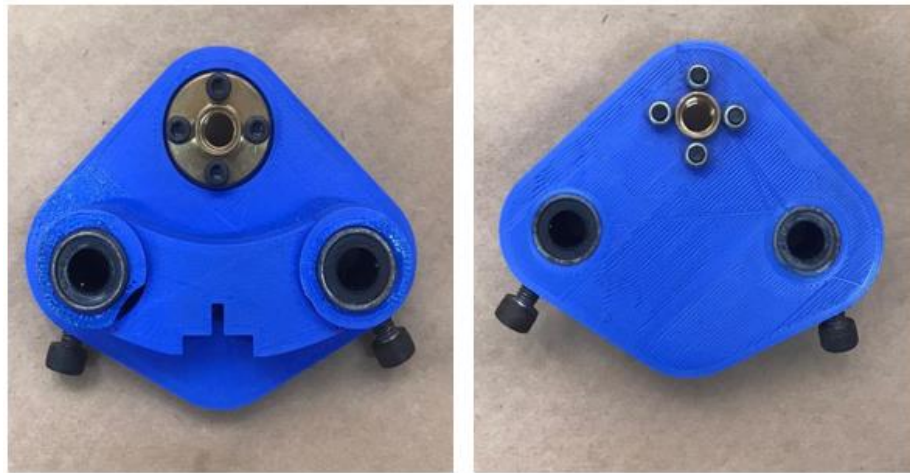
### Anexo 1 – Novo cabeçote detalhado



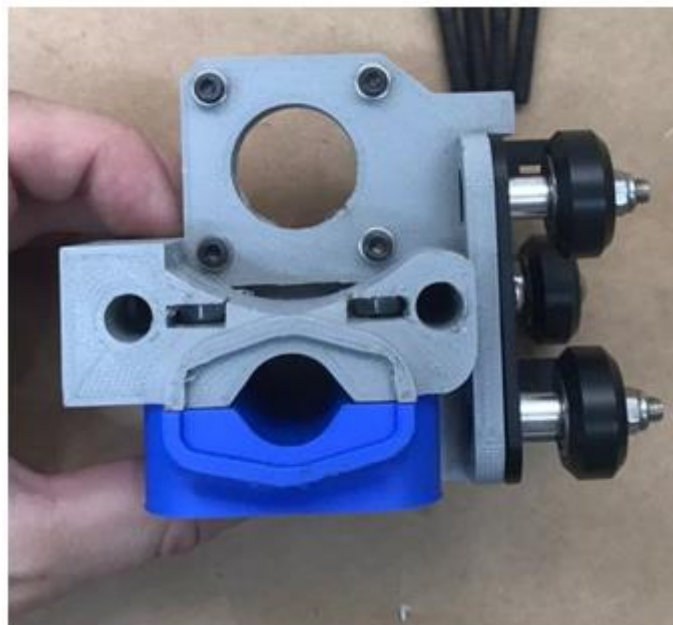
Fonte: Próprio autor.



Fonte: Próprio autor

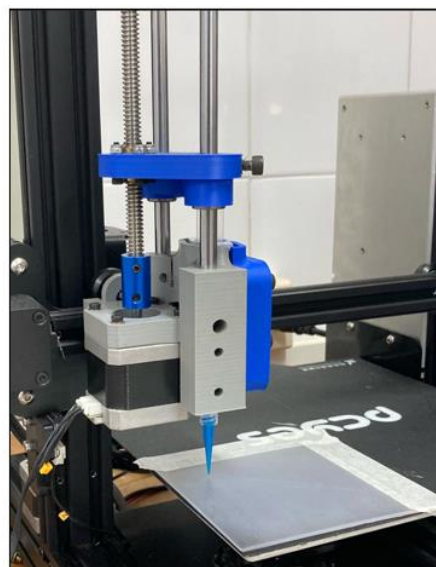
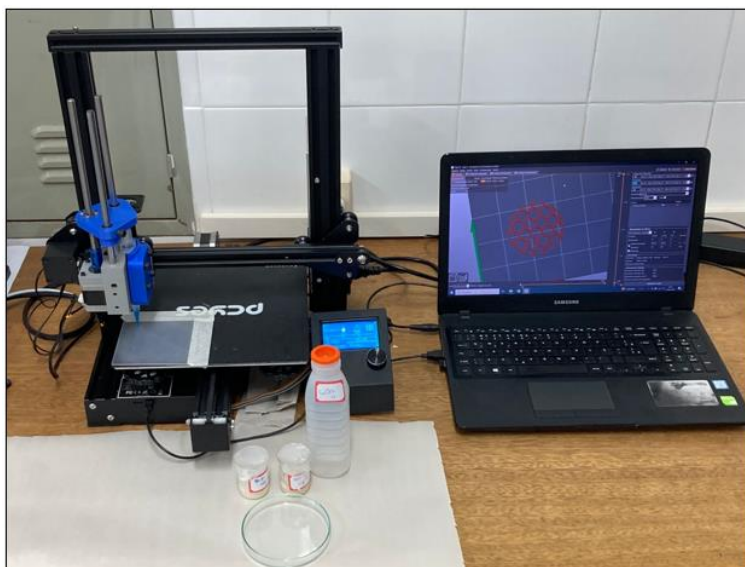


Fonte: Próprio autor.



Fonte: Próprio autor.

## Anexo 2 – Impressora modificada



Fonte: Próprio autor.