

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

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

ERIC MARK FRANCISCO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi

ARARAQUARA – SP

2019

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

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

ERIC MARK FRANCISCO

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi

ARARAQUARA – SP
2019

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

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

Orientador: Antonio Carlos Guastaldi.

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

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

CAPES: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: ERIC MARK FRANCISCO

ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS GUASTALDI

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

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

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

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

Araraquara, 22 de novembro de 2019

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Emicida

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

SCAFFOLDS STERILIZATION STUDY FOR BONE TISSUE REGENERATION

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

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do tecido ósseo.....	18
Tabela 2 - Classificação dos biomateriais de acordo com seu comportamento fisiológico.....	30
Tabela 3 - Capacidade de inativar micro-organismos pelas diferentes técnicas de esterilização	36
Tabela 4 - Vantagens e desvantagens dos métodos de esterilização.....	37
Tabela 5 - Resultado da viscosidade da tinta e dureza dos <i>Scaffold</i> obtidos.....	53
Tabela 6 - Resultados microbiológicos em meio Ágar Sangue	55
Tabela 7 - Resultados microbiológicos em meio BHI	55
Tabela 8 - Resultados da comparação estatística entre as réplicas de cada grupo..	57
Tabela 9 - Valores médios da análise das amostras tratadas com diferentes técnicas de esterilização	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura óssea	19
Figura 2 - Canal de Havers e canal de Volkmann	20
Figura 3 - Principais tipos de células ósseas.....	21
Figura 4 - Conceito de Engenharia de Tecidos	23
Figura 5 - Diferenciação das células-tronco	24
Figura 6 - Células-tronco embrionárias sendo extraída do blastocisto	25
Figura 7 - Obtenção de células-tronco adultas.....	26
Figura 8 - Reprogramação das células da pele através da inserção dos vetores virais	27
Figura 9 - Diferenciação da célula hematopoiética.....	27
Figura 10 - Célula mesenquimatosa e suas diferenciações	28
Figura 11 - Coração artificial constituído por biomaterial	29
Figura 12 - <i>Scaffolds</i> obtidos por: (a) liofilização (b) impressão tridimensional - 3D	34
Figura 13 - Região das micro-ondas no espectro eletromagnético	38
Figura 14 - Diagrama da síntese de fosfato de cálcio amorfo	42
Figura 15 - Pó de fosfato de cálcio amorfo.....	43
Figura 16 - Diagrama de trabalho estabelecido para determinar a concentração de celulose bacteriana (CB) na tinta (AS: alginato de sódio. ACP: fosfato de cálcio amorfo)	45
Figura 17 - Diagrama da confecção dos <i>Scaffolds</i> (AS: alginato de sódio; CB: celulose bacteriana; ACP: fosfato de cálcio amorfo)	46
Figura 18 - Difrátograma de Raios-X da amostra sintetizada (DCPD: monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado; OCP: fosfato octa-cálcico; HA: hidroxiapatita; ACP: fosfato de cálcio amorfo)	50
Figura 19 - Transformações de fases de fosfatos de cálcio intermediárias como as fases brushita (DCPD), fosfato octa-cálcico (OCP), monetita (DCPA) na formação de hidroxiapatita (HA).....	51
Figura 20 - Espectro de FTIR da amostra sintetizada	51
Figura 21 - Micrografia MEV da amostra sintetizada (a = 2000X e b = 100000X).....	52
Figura 22 - Espectro de FTIR de ACP e Tinta contendo celulose bacteriana e fosfato de cálcio amorfo	53

Figura 23 - Avaliação microbiológica (Meios de cultura: a. Ágar Sangue; b. BHI; c. Chromagar; d. SDA).....	56
Figura 24 - Gráfico Q-Q Plot da avaliação no meio Ágar Sangue	58
Figura 25 - Gráfico de dispersão no meio Ágar Sangue	59
Figura 26 - Gráfico de comparação mediana aplicando o teste de Kruskal Wallis.....	60
Figura 27 - Gráfico Q-Q Plot da avaliação no meio BHI	61
Figura 28 - Gráfico de dispersão no meio BHI	61
Figura 29 - Gráfico de comparação de medianas aplicando o teste de Kruskal Wallis	62
Figura 30 - Espectro de FTIR das amostras tratadas com os diferentes métodos de esterilização e amostra controle (Controle: sem esterilização; MW: micro-ondas; UV: ultravioleta).....	63
Figura 31 - Micrografia MEV das amostras tratadas (b: MW; c: UV e d: Vapor) e a amostra controle (a) em 1000X	64
Figura 32 - Resultados do estudo de aplicação da MW	65
Figura 33 - Gráfico de tensão versus deformação das amostras não esterilizadas (esquerda) e esterilizadas (direita)	66
Figura 34 - Micrografia MEV das amostras antes (a e c) e depois (b e d) do teste mecânico. (a e b amostras não esterilizadas; c e d amostras esterilizadas) em 300X	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP: Fosfato de Cálcio Amorfo

AS: Alginato de Sódio

BHI: Ágar Infusão Cérebro e Coração

CAD: *Computer Aided Designs*

CB: Celulose Bacteriana

DRX: Difração de Raios-X

EtO: Óxido de Etileno

FTIR: Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

HA: Hidroxiapatita

iPS: *Induced Pluripotent Stem Cells*

MA: Manufatura Aditiva

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

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MSCs: Células Estaminais Mesenquimatosas

MW: Micro-ondas

OCP: Fosfato Octa-Cálcico

PAA: Ácido Peracético

PEG: Polietileno Glicol

PGA: Poli (ácido glicólico)

PLA: Poli (ácido láctico)

PLGA: [poli (ácido láctico-co-glicólico)]

RM: Ressonância magnética

sCO₂: Dióxido de Carbono Supercrítico

SDA: Ágar Dextrose Sabouraud com Cloranfenicol

STL: *Standard Triangle Language*

TC: Tomografia Computadorizada

TCP: Fosfato Tri-Cálcico

Tg: Transição Vítrea

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UNESP: Universidade Estadual Paulista

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
SUMÁRIO.....	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Osso	18
3.1.1 Estrutura óssea	18
3.1.2 Formação óssea.....	20
3.2 Medicina Regenerativa.....	22
3.3 Engenharia de Tecidos.....	22
3.3.1 Células	23
3.3.2 Biomateriais.....	28
3.3.3 <i>Scaffolds</i>	32
3.4 Métodos de esterilização	35
3.4.1 Esterilização por micro-ondas	36
3.4.2 Esterilização por vapor	39
3.4.3 Esterilização por irradiação ultravioleta.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Materiais.....	41
4.2 Etapas de desenvolvimento do trabalho	41
4.3 Procedimento experimental.....	42
4.3.1 Obtenção de fosfato de cálcio amorfo (ACP)	42
4.3.1.1 Caracterização do fosfato de cálcio amorfo (ACP).....	43
4.3.1.1.1 Difração de Raios X (DRX).....	43
4.3.1.1.2 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	44
4.3.1.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.3.2 Elaboração da tinta	44
4.3.2.1 Estabelecimento da concentração adequada de alginato de sódio (AS)	44

4.3.2.2 Estabelecimento da concentração adequada de celulose bacteriana (CB)...	45
4.3.2.3 Caracterização da tinta.....	45
4.3.3 Confeção de <i>Scaffolds</i>	46
4.3.3.1 Caracterização dos <i>Scaffolds</i>	46
4.3.3.1.1 Determinação da dureza Shore A	47
4.3.4 Estudo da esterilização	47
4.3.4.1 Esterilização por micro-ondas	47
4.3.4.2 Esterilização por vapor	47
4.3.4.3 Esterilização por irradiação ultravioleta.....	47
4.3.4.4 Avaliação microbiológica.....	47
4.3.4.5 Estudo estatístico	48
4.3.4.6 Caracterização dos <i>Scaffolds</i> após esterilização	49
4.3.3.1.2 Teste mecânico	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Caracterização do fosfato de cálcio amorfo (ACP).....	50
5.2 Caracterização da tinta.....	52
5.2.1 Estabelecimento da concentração adequada de alginato de sódio (AS)	52
5.2.2 Estabelecimento da concentração adequada de celulose bacteriana (CB).....	53
5.3 Estudo da esterilização	54
5.3.1 Avaliação microbiológica	54
5.3.2 Estudo estatístico	57
5.3.3 Caracterização dos <i>Scaffolds</i> após esterilização	62
5.3.4 Estudo da influência da aplicação de MW ao longo do tempo	64
5.3.5 Teste mecânico	65
6. CONCLUSÃO.....	68
8. REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

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

2.2 Específicos

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

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

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Osso

3.1.1 Estrutura óssea

Na estrutura do osso humano encontram-se diferentes tipos de tecidos que trabalham juntos, como tecido ósseo, conjuntivo denso, cartilaginoso, nervoso, adiposo e epitelial, além de serem ricos em vasos sanguíneos. A matriz óssea é formada por compostos inorgânicos, principalmente íons de cálcio e fósforo, formando cristais de hidroxiapatita e componentes orgânicos, incluindo colágeno e proteínas não colagenosas, conferindo rigidez e certa elasticidade ao osso (CHEN *et al.*, 2014). A Tabela 1 apresenta a composição química do tecido ósseo.

Tabela 1 - Composição química do tecido ósseo

Fase Inorgânica	% em massa	Fase Orgânica	% em massa
Hidroxiapatita	60	Colágeno	20
Carbonato	4,0	Água	9,0
Citrato	0,9	Proteínas	3,0
Sódio	0,7		
Magnésio	0,5		
Outros: F ⁻ , Cl ⁻ , Sr ⁺ , Pb ⁺² , Cu ⁺² , Zn ⁺² , Fe ⁺²		Outros: Lipídios, polissacarídeos, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células osteoprogenitoras	

Fonte: WU *et al.* (2014)

O tecido ósseo tem diversas funções no organismo, como proteger tecidos moles, servir de suporte para os músculos, além de armazenar os minerais cálcio e fósforo (KATCHBURIAN; ARANA, 2012). Na Figura 1, percebe-se que ele é formado por uma parte sem cavidade, denominado osso compacto, e uma outra parte com muitas cavidades, chamada osso esponjoso.

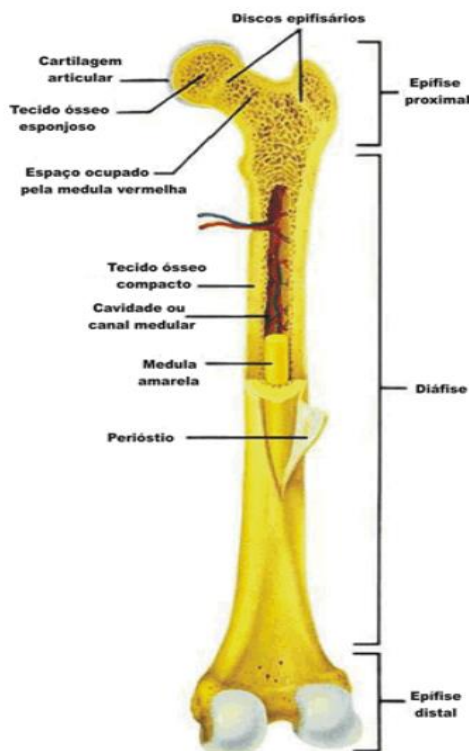


Figura 1 - Estrutura óssea

Fonte: <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio17.php>

Trata-se de uma classificação de ordem macroscópica, pois quando essas partes são observadas no microscópio, observa-se que ambas apresentam o mesmo tipo de célula e de substância intercelular. O tecido ósseo esponjoso possui espaços medulares grandes enquanto o tecido ósseo compacto não apresenta, mas possuem um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos, os chamados canais de Havers e canais de Volkmann. Os canais Havers (Figura 2) percorrem o osso longitudinalmente e podem comunicar-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio dos canais de Volkmann que percorrem perpendicularmente ao eixo maior do osso (WU *et al.*, 2014; RIZZO, 2015).

No interior dos ossos está a medula óssea, estas podem ser de dois tipos: amarela, constituída por tecido adiposo, e vermelha, formadora de células do sangue e plaquetas como mostrado na Figura 1. No recém-nascido, toda a medula óssea é vermelha, já no adulto, a medula vermelha fica limitada aos ossos do crânio, das costelas, das vértebras, no fêmur e do úmero. Com o tempo, a medula óssea vermelha presente no fêmur e no úmero transforma-se em amarela (WU *et al.*, 2014).

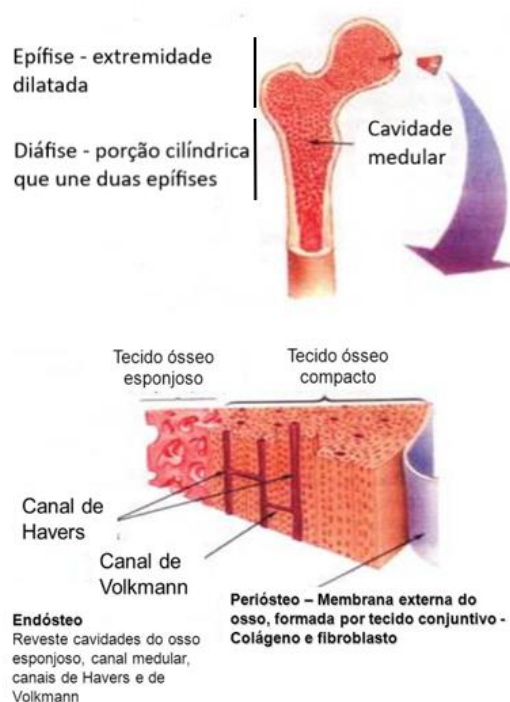


Figura 2 - Canal de Havers e canal de Volkmann

Fonte: WU *et al.* (2014)

3.1.2 Formação óssea

Durante o estágio embrionário, o esqueleto humano é formado somente por cartilagem e só após algumas semanas ocorre o crescimento ósseo. Há dois processos de crescimento: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. No endocondral há a formação de ossos longos (braços, pernas, vértebras e quadris). Os osteoblastos, que são derivados de células mesenquimatosas, encostam na matriz cartilaginosa depositando a matriz óssea e depois de alguns dias, se mineralizam, originando-se as células conhecidas como osteócitos. Nesse processo, a cartilagem é substituída gradualmente pelo tecido ósseo. Já na intramembranosa há a formação dos ossos do crânio, clavícula, entre outros. O processo ocorre quando as células mesenquimatosas no interior do tecido conjuntivo, se diferenciam em osteoblastos, que por sua vez, originam-se em osteoides e após a calcificação, transformam-se em osteócitos, formando o tecido ósseo camada por camada (JUDAS *et al.*, 2012).

Os quatro principais tipos de células (Figura 3) que irá formar o tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e as células osteoprogenitoras ou osteogênicas (CARREIRA *et al.*, 2014).

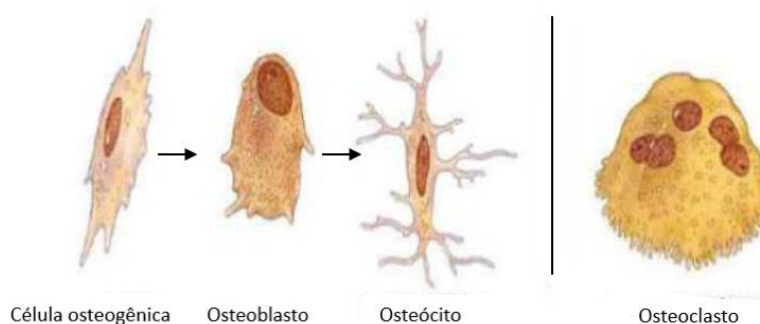


Figura 3 - Principais tipos de células ósseas
Fonte: RIZZO (2015)

Os osteoblastos são células imaturas responsáveis pela formação da matriz óssea, que será posteriormente mineralizada. À medida que a matriz é construída, as células ficam envoltas por ela e passam a ser chamadas de osteócitos. Os osteócitos são os osteoblastos aprisionados dentro da matriz calcificada e tem a função de manter o teor de mineral e proteínas na matriz óssea. Os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, produzem enzimas responsáveis por digerir o tecido ósseo e que também permitem a reabsorção do osso. Os osteoclastos possuem mecanismos necessários para a liberação de íons cálcio e fosfato para a corrente sanguínea e para a digestão da matriz orgânica. Já as células osteoprogenitoras ou osteogênicas, quando ocorre a necessidade de reparo do osso por fratura, podem se diferenciar formando novos osteoblastos (HANKENSON *et al.*, 2015; GU *et al.*, 2017).

O tecido ósseo é altamente organizado e possui potencial para reconstruir sua estrutura original por meio de processos de renovação e remodelação, durante a vida toda. A formação do osso pode ocorrer por três processos distintos, sendo denominados como osteogênese, osteoindução e osteocondução. A osteogênese, é quando ocorre a formação do osso em novos sítios pela colocação de osteoblastos adequados. Na osteoindução, o processo é caracterizado quando células mesenquimais são estimuladas e se diferenciam em células formadoras de ossos. Por exemplo, o osso imaturo é um material osteoindutor, e quando recebido algum estímulo, ocorre a ossificação. Já a osteocondução é quando um material permite o crescimento ósseo em sua superfície ou em seus poros, servindo como *Scaffold* para a migração celular. Quando um material é osteocondutor, os osteoblastos migram nesse suporte, depositam a matriz óssea, ocorrendo assim mineralização em seguida (CARREIRA *et al.*, 2014; HANKENSON *et al.*, 2015).

3.2 Medicina Regenerativa

A Medicina Regenerativa consiste na reparação, regeneração ou substituição de células, tecidos ou órgãos com o objetivo de restaurar a sua função por meio de terapias eficazes, consistentes e seguras (POLAK, 2010). Neste contexto são utilizadas as células humanas, especificamente as células tronco adultas, as células tronco embrionárias e as células pluripotentes que são células programadas a partir das células adultas (GOUDARZI *et al.*, 2017). Segundo FIDÉLES (2014), o uso dessa tecnologia disruptiva permite potencialmente substituir medicamentos e próteses sintéticas.

A Medicina Regenerativa envolve um campo de pesquisa multidisciplinar, com grupos de diferentes especializações. Uma das áreas mais importantes é a Engenharia de Tecidos, pois utiliza métodos para promover o crescimento celular, através de uma combinação de células, biomateriais e moléculas solúveis (DAAR; GREENWOOD, 2007; NEREM, 2010).

3.3 Engenharia de Tecidos

Foi realizada por Vacanti e Langer's, no ano de 1993 a primeira citação científica a respeito da Engenharia de Tecidos, como uma disciplina distinta no campo das ciências biomédicas. É uma ciência que aplica os fundamentos da engenharia e da biologia para o desenvolvimento de substitutos biológicos, denominados por *Scaffolds*, que permitem a regeneração óssea (NAPOLITANO, 2017).

Para a obtenção de novos tecidos, a Engenharia de Tecidos utiliza três ferramentas essenciais: células, suportes e fatores de crescimento. As células secretam moléculas extracelulares (matriz extracelular), que fornecem auxílio estrutural e bioquímico (fatores de crescimento), permitindo as interações célula-célula para a formação do tecido ósseo (FIDÉLES 2014), o suporte deve fornecer o ambiente apropriado para as células crescerem, e os fatores de crescimento, deve facilitar e promover a regeneração tecidual (CHATZINIKOLAIDOU *et al.*, 2017).

Estes suportes que fornecem o ambiente adequado para as células realizarem as suas funções, passaram a ser denominados por *Scaffolds* (TURNBULL *et al.*, 2017). Se a formação do novo tecido for realizada em ambiente *in vitro*, este carece de um biorreator, que em conjunto com a matriz extracelular

fornece condições que se tem *in vivo*. Após o cultivo do tecido, ele é implantado no paciente. No caso do crescimento *in vivo*, há duas linhas principais por onde a Engenharia Tecidual pode ser aplicada. A primeira consiste na implantação direta de um *Scaffolds* na região do defeito ósseo, porém sem a utilização de células semeadas. Essa técnica consiste na capacidade de migração de células adjacentes formadoras de tecido ósseo. Em outra linha, ocorre a coleta de material celular de um indivíduo, que é dissociado em células específicas do tecido ósseo alvo, em seguida cultivadas sobre um *Scaffolds*, para então serem implantadas neste mesmo indivíduo (Figura 4). Esta estratégia é a mais utilizada pela Engenharia de Tecidos e em comparação aos outros métodos é a que conduz os melhores resultados (TEIMOURI *et al.*, 2015).

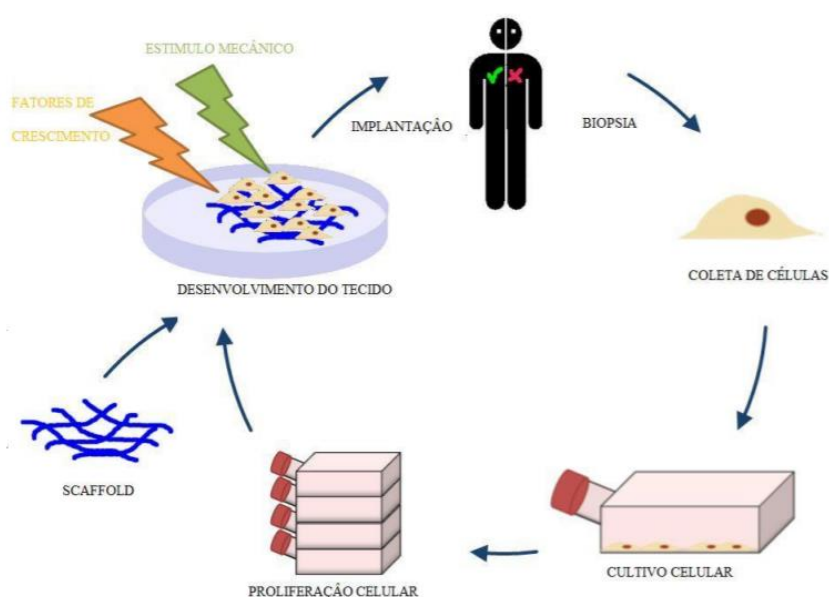


Figura 4 - Conceito de Engenharia de Tecidos
Fonte: RAMOS (2011)

3.3.1 Células

As células são muito importantes para a regeneração e reparação óssea. Na construção de um novo tecido, as células podem ser de origem autólogas, alogênicas e xenogênicas. As células autólogas são células do próprio paciente, as células alogênicas provêm de outro indivíduo e as células xenogênicas são células

de origem animal (GOLCHIN; FARAHANY, 2019). Embora seja um processo com maior custo socioeconômico, sempre que possível deve se optar por células alogênicas, pois, por se tratar de células do próprio paciente, isso permite a aceitação do sistema imunitário, evitando riscos de rejeições imunológicas e infecções virais (FERREIRA *et al.*, 2012). Estas células podem ser extraídas por biópsia, um procedimento cirúrgico no qual se colhe uma amostra de tecido ou células do paciente para posterior estudo em laboratório.

As células-tronco, conhecidas também como células estaminais, são tipo de células mais utilizadas na Engenharia de Tecidos, porque estas apresentam a capacidade de autorrenovação, gerando outras células-tronco e a capacidade de se diferenciarem em diversas linhagens celulares (Figura 5) (GAO *et al.*, 2014; VERYASOV *et al.*, 2014).

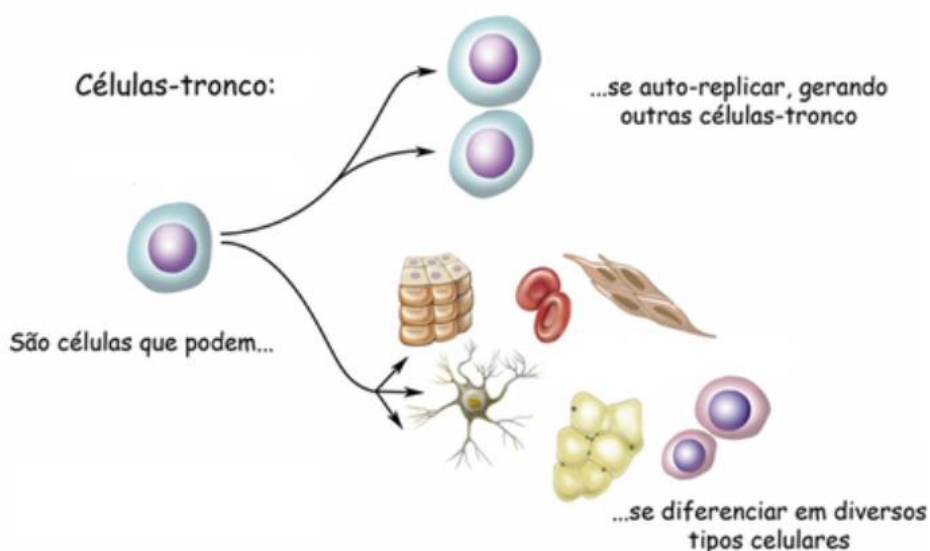


Figura 5 - Diferenciação das células-tronco

Fonte: <http://www.rntc.org.br/ceacutelulas-tronco.html>

Existem três principais tipos de células-tronco, as células-tronco embrionárias e as não embrionárias, que tem fontes naturais, e as células-tronco pluripotentes induzidas que foram obtidas por pesquisadores no ano de 2007. As células-tronco embrionárias são pluripotentes, o que significa que podem dar origem a todos os tipos de células. São encontradas no interior do embrião, no estágio blastocisto, que ocorre entre quatro a cinco dias após a fecundação. Na Figura 6, a região circulada em colorido corresponde a massa celular interna e são estas células que chamamos de células-tronco embrionárias (TOLLEMAR *et al.*, 2016).

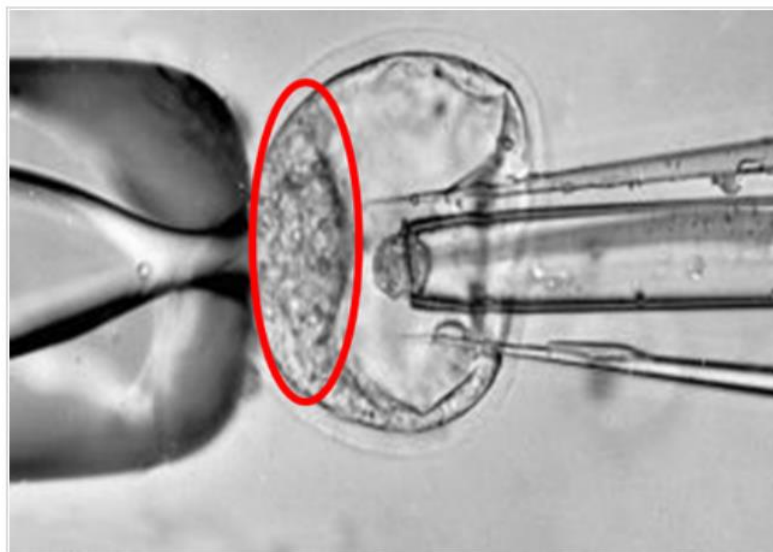


Figura 6 - Células-tronco embrionárias sendo extraída do blastocisto

Fonte: <http://www.rntc.org.br/ceacutelulas-tronco.html>

As células-tronco não embrionárias (células-tronco adultas) são consideradas multipotentes, ou seja, são capazes de se diferenciar em um número limitado de outros tipos de células (Figura 7). Encontram-se, principalmente, na medula óssea e no sangue do cordão umbilical, mas podem ser encontradas em diversos locais do organismo (TOLLEMAR *et al.*, 2016).

Já as células-tronco pluripotentes induzidas, foram produzidas em laboratório, pelo cientista japonês Shynia Yamanaka. O pesquisador foi contemplado com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2012, juntamente com o britânico John Gurdon, pela descoberta de que células adultas podem ser reprogramadas para se tornarem pluripotentes (PETRICCIANI *et al.*, 2017). Em 2006, Yamanaka identificou um pequeno número de genes dentro do genoma de camundongos que se mostraram decisivos nesse processo. Neste caso, as células da pele de um camundongo foram reprogramadas para células-tronco embrionárias, podendo se transformar em diferentes tipos celulares.

Em novembro de 2007, foram geradas as primeiras células induzidas humanas, a partir de fibroblastos humano, que é uma célula adulta constituinte do tecido conjuntivo, introduzindo os mesmos genes encontrados via vetores virais. Esse processo de reprogramação se dá através da inserção de vírus, contendo 4 genes (oct-4, sox-2, Klf-4 e c-Myc). Desse modo, o vírus ao infectar a célula, insere estes genes no DNA da célula-tronco adulta e reprogramam o código genético, fazendo com que as células retornem ao estágio de célula-tronco embrionária

(Figura 8). Estas células são denominadas de células-tronco de pluripotência induzida ou células iPS (do inglês *Induced Pluripotent Stem Cells*) (GOUDARZI *et al.*, 2017).

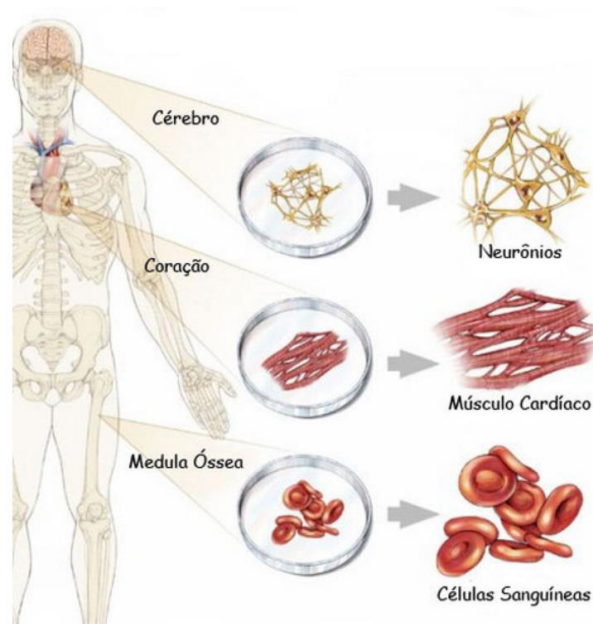


Figura 7 - Obtenção de células-tronco adultas

Fonte: <http://www.rntc.org.br/ceacutelulas-tronco.html>

Devido a questões éticas ao uso das células-tronco embrionárias, a Engenharia de Tecido tem dificuldades em utilizá-las livremente. Com a produção das células iPS esse problema tende a ser resolvido, uma vez que estas células são originadas a partir de células-tronco adultas, que não apresentam tantos problemas éticos, pois podem ser encontradas em diversos locais do organismo. Outra dificuldade em usar células embrionárias é que elas só podem ser usadas após a sua diferenciação total, garantindo a regeneração tecidual sem aparecimento de tumores (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

No sangue do cordão umbilical encontram-se as células estaminais hematopoiéticas, que são células-tronco não embrionária. São células consideradas pluripotentes, pois são capazes de se diferenciar em todas as células da linhagem sanguínea (Figura 9), como eritrócitos (glóbulos vermelhos) e leucócitos (glóbulos brancos) (ZAHOREC *et al.*, 2014).

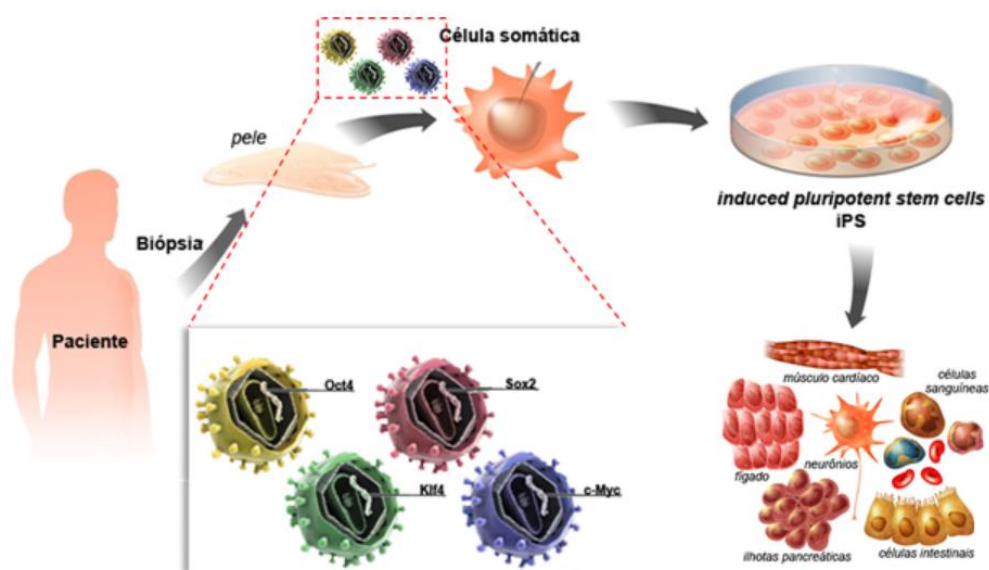


Figura 8 - Reprogramação das células da pele através da inserção dos vetores virais

Fonte: <http://www.rntc.org.br/ceacutelulas-tronco.html>

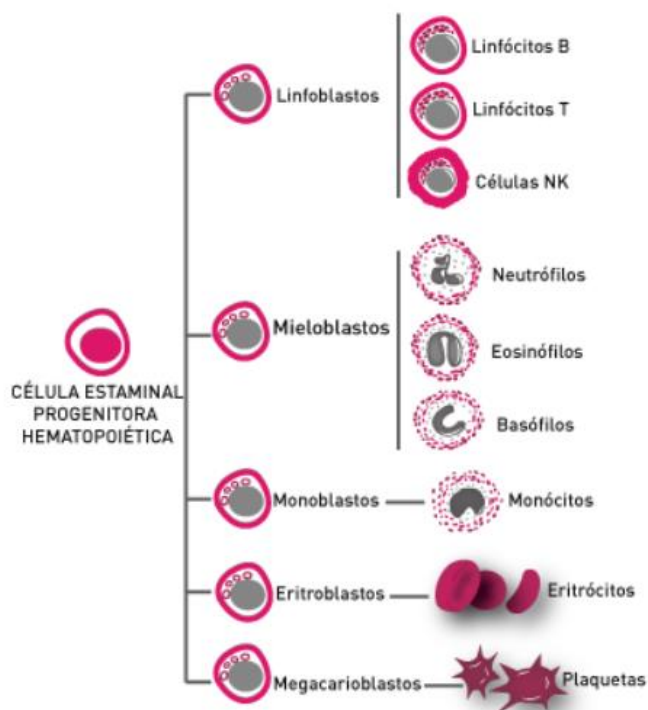


Figura 9 - Diferenciação da célula hematopoética

Fonte: <http://www.criovida.pt/celulas-estaminais>

Nos últimos anos, o sangue do cordão umbilical tornou-se numa importante e relevante alternativa à medula óssea nos transplantes hematopoéticos, nas quais

é necessário regenerar o sistema sanguíneo e imunológico do paciente (ZAHOREC *et al.*, 2014).

Já no tecido do cordão umbilical temos as células conhecidas como células estaminais mesenquimatosas (MSCs). Também são células-tronco adultas, mas esta são classificados como multipotentes (Figura 10) e podem ser utilizadas como suporte no transplante hematopoiético (ZAHOREC *et al.*, 2014).



Figura 10 - Célula mesenquimatosa e suas diferenciações

Fonte: <http://www.criovida.pt/celulas-estaminais>

Tanto as células estaminais hematopoiéticas quanto as MSCs podem ser encontradas em diferentes regiões do organismo, porém têm a vantagem de estar disponíveis nos cordões umbilicais no qual são rejeitados após o parto, contribuindo para bancos de células-tronco. Na medicina regenerativa o uso de células mesenquimais é a chave para alcançar seus objetivos, pois estas são progenitoras de tecidos esqueléticos, como tecido muscular, adiposo, e conjuntivo, destacando sua relevância na formação de ossos (osteoblastos) e cartilagem (condrócitos) (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

3.3.2 Biomateriais

A ciência dos biomateriais engloba vários conhecimentos de áreas como biologia, engenharia, medicina, química, entre outras. O aumento da longevidade e traumas decorrentes de acidentes de trânsito, violência e por doenças faz com que o mercado de biomateriais seja um dos mais crescentes no país e no mundo (CGEE, 2010).

Um biomaterial é definido como qualquer material natural ou sintético, utilizado em dispositivos médicos ou implantes e que possam interagir com sistemas biológicos. Tem como objetivo tratar, substituir ou aumentar quaisquer tecidos, órgãos ou funções do organismo (BABU; OGLE, 2015).

Temos como exemplos de biomateriais, os implantes de seios, coração artificial (Figura 11), lentes de contato, válvula do coração, prótese de quadril, implantes dentários, dentre outros (PAVINATO, 2012).



Figura 11 - Coração artificial constituído por biomaterial

Fonte: https://www.ethz.ch/en/news-and-events/eth-news/news/2017/07/artificial_heart.html

Para que um material seja implantado no corpo humano ele requer algumas propriedades fundamentais. Há dois fatores essenciais para o sucesso de um biomaterial. A biocompatibilidade para que o material tenha uma resposta apropriada do tecido hospedeiro, sem causar reações adversas, e a biofuncionalidade, para que o material exerça a sua função corretamente, ou seja, ele deve suportar processos químicos, térmicos e mecânicos sem substancial deterioração e pelo tempo necessário (TURNBULL *et al.*, 2017).

Segundo as características das substâncias que compõem um biomaterial, este pode ser classificado segundo sua natureza química (naturais ou sintéticos), reação tecidual e interação com o meio biológico (bioativo, bioinerte, poroso ou reabsorvível) e origem (autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos) (PIRES, 2010).

De acordo com o comportamento dos biomateriais em meio biológico, os bioativos são materiais que, quando implantado no corpo humano, ocorre várias

reações na interface tecido/implante, formando uma camada ativa sobre a superfície do material, que possibilita reações químicas com o tecido vivo (ALLO *et al.*, 2012; FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2014).

Os bioinertes são materiais tolerados pelo organismo, não possuindo ligação com o tecido hospedeiro e a sua inserção no corpo humano resulta na formação de uma cápsula fibrosa. Atualmente esse tipo de biomaterial é chamado de “quase bioinerte” pois nenhum material é totalmente inerte, o que comprova pela formação da cápsula fibrosa (ALLO *et al.*, 2012; FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2014).

Os materiais reabsorvíveis ou biodegradáveis são materiais que atuam por um determinado tempo e depois são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo e assim substituídos por novos tecidos (ALLO *et al.*, 2012; FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2014).

Já os biomateriais porosos, são materiais onde o crescimento do tecido ocorre no interior dos poros e esta ligação tecido/implante poroso é chamado fixação biológica (ALLO *et al.*, 2012; FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2014). A Tabela 2 apresenta as principais classes dos biomateriais de acordo a interação com o meio biológico com respectivos exemplos.

Tabela 2 - Classificação dos biomateriais de acordo com seu comportamento fisiológico

Biomaterial	Interação com o meio biológico	Exemplos
Bioativo	Ligação interfacial	Fosfatos de cálcio; Vitro-cerâmicas
Bioinerte	Fixação morfológica	Alumina; Zircônia; Titânio; Polietileno
Reabsorvível	Substituição por novos tecidos	Fosfato tri-cálcico (TCP); Poli (ácido láctico) – PLA
Poroso	Crescimento de tecido ósseo no interior dos poros	Hidroxiapatita porosa

Fonte: ALLO *et al.* (2012)

As principais classes de materiais utilizados na composição dos biomateriais são: metais, cerâmicos, polímeros e compósitos.

Os biomateriais metálicos são utilizados em aplicações que exigem alta resistência mecânica, como atividades de impacto e mastigação. Sua principal desvantagem é que esses materiais podem sofrer corrosão no meio fisiológico, havendo perda do material e conseqüentemente enfraquecimento do implante, além dos efeitos indesejáveis ocasionados pelos produtos da corrosão. Os mais usados pela Engenharia de Tecidos são o aço inoxidável, titânio e ligas metálicas (BABU; OGLE *et al.*, 2015).

Os cerâmicos possuem boa biocompatibilidade, resistência a corrosão e dureza, eles estão disponíveis como redes porosas, recobrimentos de superfícies, compósitos com polímeros, dentre outros. Como exemplo, temos a alumina, zircônia, carbono e os fosfatos de cálcio. As biocerâmicas de fosfato de cálcio, também conhecidas como apatitas, são do tipo de maior relevância na área de biomateriais. A hidroxiapatita (HA), o fosfato de cálcio amorfo (ACP), o fosfato tri-cálcico (TCP) e o fosfato octa-cálcico (OCP) são os quatro tipos de apatitas que ocorrem com maior frequência em sistemas biológicos, além de promoverem uma resposta imune mínima por parte do tecido, visto que são compostas essencialmente de íons de cálcio e fosfato, os quais já estão naturalmente presentes no organismo, (MARTINS, 2011; PAVINATO, 2012). Contudo, essas biocerâmicas também apresentam desvantagens, como baixo módulo de elasticidade e baixa resistência mecânica (RIBEIRO, 2007; PIRES, 2010).

Os biopolímeros apresentam diferentes características de acordo com a sua origem. Dentre os biomateriais biopoliméricos sintéticos, destacam-se: polipropileno, poliuretano, poli (álcool vinílico), resina epóxidica, metacrilatos, poli (propileno fumaratos), poli (α -hidroxiácidos), poli (ácido glicólico) – PGA, poli (ácido láctico) – PLA e [poli (ácido láctico-co-glicólico)] – PLGA. Algumas de suas propriedades são: alta elasticidade, baixa densidade e fácil fabricação, sendo encontrados em áreas como odontologia, ortopedia e cardiologia (RIBEIRO, 2007; PIRES, 2010). Já os de origem natural, como o alginato, celulose, quitosana, amido, colágeno e poli (hidroxibutirato), além de serem biocompatíveis e biodegradáveis, também promovem maior proliferação celular quanto comparados aos sintéticos, pois possuem uma estrutura semelhante à matriz extracelular do tecido alvo de regeneração. Entretanto, assim como os outros tipos de materiais, os biopolímeros também apresentam limitações, como a baixa resistência mecânica, possível

liberação de partículas e contaminação microbiana (GIMENES, 2001; MORENO, 2014).

Os biomateriais compósitos envolvem a associação adequada de dois ou mais componentes acima citados, unidos por uma interface, resultando em materiais com propriedades desejadas, ou seja, superando as limitações dos materiais atuando individualmente (CHEN *et al.*, 2012; RATNER *et al.*, 2013). Como exemplo, um pino de titânio odontológico recoberto com uma camada de fosfato de cálcio, combina a resistência mecânica do metal com a bioatividade e biocompatibilidade da cerâmica (RATNER *et al.*, 2013).

O Grupo de Biomateriais do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, realizou diversas pesquisas relacionadas aos fosfatos de cálcio e seu uso como biomateriais (PELIZARO *et al.*, 2017a e 2017b; RODRIGUEZ-CHANFRAU *et al.*, 2019a; TOLABA *et al.*, 2018 e 2019). Ocorreram também alguns estudos sobre a confecção de *Scaffolds* para a regeneração tecidual a partir de materiais compósitos. Entre os materiais estudados estão as apatitas, a celulose bacteriana (OLYVEIRA *et al.*, 2017; RODRIGUEZ-CHANFRAU *et al.*, 2017, 2017a e 2017b; TIOMNO-TIOMNOVA *et al.*, 2017; RODRIGUEZ-CHANFRAU *et al.*, 2019) e o alginato de sódio, nos quais são os biomateriais utilizados na elaboração da tinta neste trabalho.

3.3.3 Scaffolds

As estruturas artificiais onde as células são frequentemente transplantadas ou infiltradas e que são capazes de suportar a formação de tecido em três dimensões são chamadas de *Scaffolds*. Essas estruturas tridimensionais têm como principais funções promover crescimento, proliferação e diferenciação celular do tecido, promovendo a regeneração do tecido danificado de forma controlada (KIM *et al.*, 2015).

Não há consenso entre a comunidade científica sobre as características que um *Scaffold* deve possuir, para uma aplicação particular. Essas propriedades dependem principalmente do tecido a ser regenerado e sobre o local e tamanho do defeito, porém existem algumas características gerais principais que são significativas para o sucesso do seu desempenho como substitutos biológicos (SHIM *et al.*, 2017), como ser biocompatível, permitindo a atividade celular normal, com o intuito de

evitar danos locais ou sistêmicos, ser biorreabsorvível, cujos seus produtos de degradação sejam metabolizados pelo organismo, apresentar uma microestrutura porosa com poros de tamanhos adequados e interconectados, que proporcione uma difusão efetiva de oxigênio e nutrientes essenciais à sobrevivência celular (KIM *et al.*, 2015; PATI *et al.*, 2015). Os *Scaffolds* devem ter também uma biodegradabilidade controlada para suportar a formação do novo tecido, ter propriedades mecânicas que garantam o suporte estrutural no decorrer das atividades normais do paciente, ser osteocondutor e osteoindutor, propiciando a adesão e proliferação das células ósseas (ONTES, 2010; CHEN *et al.*, 2012).

Os *Scaffolds* devem ser fabricados a partir de biomateriais com propriedades adequadas aos tecidos que se pretende regenerar. Esses requisitos e a exigência estrutural tornam a confecção desses *Scaffolds* um processo complexo, exigindo do profissional elevados conhecimentos sobre as características dos biomateriais bem como as técnicas de fabricação destes. O descumprimento destes e outros requisitos na escolha do material pode comprometer o resultado esperado (HAN *et al.*, 2010).

A escolha do processo de fabricação é baseada nas características do tecido a reparar, tipo de material utilizado e complexidade do defeito. Os *Scaffolds* podem ser construídos por dois métodos: métodos convencionais e métodos avançados.

Dentre os métodos convencionais, podemos citar as técnicas, como liofilização, lixiviação, formação de espumas, separação de fases, formação de fibras, entre outros. Neste trabalho foi utilizado a técnica de liofilização que consiste em um processo de desidratação, onde o material é congelado em dada temperatura e posteriormente a água é eliminada por sublimação, através de um controle de vácuo. O equipamento responsável pela realização desse processo é liofilizador. Estes métodos convencionais apresentam limitações quanto ao controle da arquitetura interna e porosidade. Outras desvantagens é a intervenção manual, utilização de solventes tóxicos e fracas propriedades mecânicas (HAN *et al.*, 2010).

Já nos métodos avançados temos as técnicas como estereolitografia, sinterização seletiva à laser, modelagem por deposição de material fundido, impressão por jato de tinta e o mais promissor, a impressão tridimensional - 3D que pode, em breve, permitir a geração de grandes enxertos ósseos artificiais com arquitetura personalizada e específica do paciente (TEMPLE *et al.*, 2014;

KONOPNICKI *et al.*, 2015). Esses métodos tem o objetivo de resolver as limitações inerentes aos métodos convencionais e são denominados de Manufatura Aditiva (MA) ou prototipagem rápida. Diferente das técnicas convencionais, este processo de fabricação de *Scaffolds* se inicia com o uso de imagens feita por Tomografia Computadorizada (TC) e/ou Ressonância Magnética (RM). As imagens podem ser tratadas em programas para gerar um modelo tridimensional padronizado com superfícies triangulares (*Standard Triangle Language* – STL). Uma vez gerados, são enviados diretamente as impressoras 3D ou são tratados em softwares CAD (*Computer Aided Designs*) para trabalhar a geometria e superfícies de acordo com a exigência do tratamento (VOLPATO; CARVALHO, 2017). A Figura 12 mostra os *Scaffolds* obtidos por liofilização e impressão 3D.

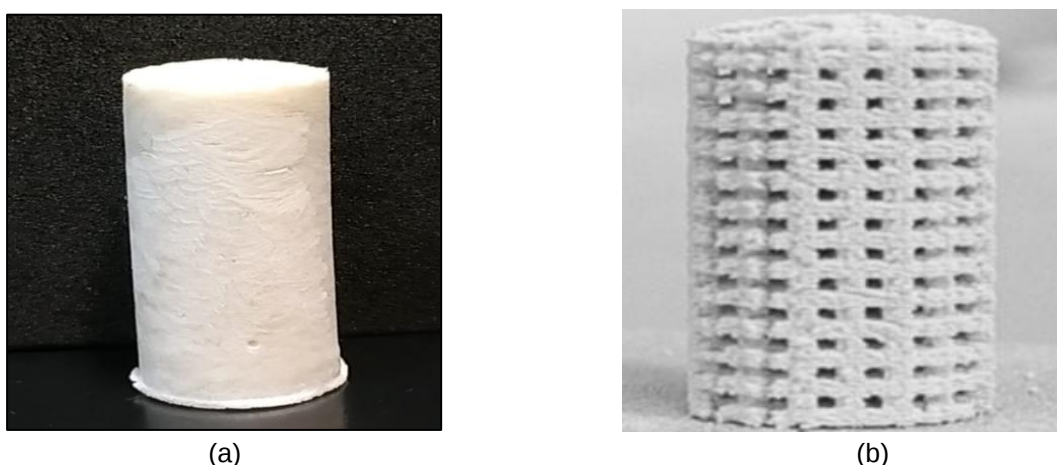


Figura 12 - Scaffolds obtidos por: (a) liofilização (b) impressão tridimensional - 3D
Fonte: SULTANA e WANG (2011); YUN *et al.* (2014)

Vários trabalhos vem sendo realizados com o objetivo de desenvolver novos biomateriais que englobe uma quantidade maior de características essenciais à regeneração óssea e métodos de fabricação que possa controlar a porosidade dos *Scaffolds* na qual é um parâmetro de suma importância para o crescimento tecidual ósseo, pois permite a migração celular, vascularização e difusão de nutrientes, permitindo a formação do novo tecido (KIM *et al.*, 2015; SARTUQUI *et al.*, 2016; SHIM *et al.*, 2017). Por exemplo, JIN *et al.* (2014) demonstraram que estruturas tridimensionais constituídas de fibroína da seda e hidroxiapatita podem ser usados como carreadores e que promovem uma liberação controlada e eficaz de células estaminais mesenquimatosas (MSCs), para reparar defeitos ósseos. Pittella (2017)

desenvolveu *Scaffolds* de nanocelulose bacteriana para aplicações tópicas e verificou que o biomaterial não apresenta toxicidade, o que conclui que o material é seguro para aplicação em humanos. HAN *et al.* (2010), utilizando a técnica de liofilização, estudaram a porosidade de *Scaffolds* de hidroxiapatita e alginato e verificaram que seus *Scaffolds* exibiram estrutura altamente porosa com boa interconectividade, com poros de tamanho entre 80 a 200 μm .

Segundo a literatura, em poros com dimensões muito pequenas, as células não conseguirão proliferar ao longo do *Scaffold* devido à dificuldade de mobilidade celular e penetração de vasos sanguíneos para a região. Poros com dimensões muito grandes criam um espaço vazio que dificulta o contato das células com a superfície do poro, podendo ocasionar a morte celular. Para regeneração tecidual, estudos experimentais demonstraram uma porosidade ótima de 5 μm para neovascularização, 5-15 μm para o desenvolvimento dos fibroblastos, 20 μm para o crescimento dos hepatócitos, de 20 a 125 μm para regeneração de pele e 40-100 μm para o desenvolvimento osteóide que se forma antes da maturação do tecido ósseo. A interconectividade entre os poros também é um fator fundamental para o sucesso da Engenharia de Tecidos e não deve ser inferior a 50 μm , pois os osteoblastos possuem em média 30 μm de diâmetro (REBELO *et al.*, 2015).

3.4 Métodos de esterilização

Scaffolds têm sido extensivamente estudados devido às suas amplas aplicações em Engenharia de Tecidos. No entanto, as infecções associadas ao uso *in vivo* desses *Scaffolds* por diferentes contaminantes microbiológicos continuam a ser um desafio significativo (DAI *et al.*, 2016).

A esterilização é a completa eliminação de todos os tipos de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e vírus. A sua ação é realizada por processos físicos e/ou químicos que inativam todos as formas de vida microbiana. A desinfecção, por outro lado, é a eliminação de todos os micro-organismos, exceto os endósporos bacterianos (QIU *et al.*, 2011; DAI *et al.*, 2016).

Infelizmente, a maioria dos métodos de esterilização não é adequada para uso em materiais biológicos. Por exemplo, altas temperaturas e altas doses de radiação gama (> 30 kilogray (kGy)) são efetivos na esterilização, mas enfraquecem a estrutura do colágeno. Portanto, o método de esterilização não deve causar

nenhuma mudança significativa no biomaterial que induza uma resposta adversa do corpo e não deve alterar as propriedades mecânicas que comprometeriam a função do implante (QIU *et al.*, 2011).

Os métodos físicos incluem o uso de calor, pressão, filtração e radiação ionizante ou não ionizante, enquanto os métodos químicos incluem óxido de etileno (EtO), plasma, glutaraldeído, peróxido de hidrogênio, entre outros.

Micro-organismos diferentes possuem características diferentes e, portanto, seus níveis de resistência às técnicas de esterilização ou desinfecção diferem uns dos outros (DAI *et al.*, 2016). A Tabela 3 apresenta alguns métodos de esterilização e sua capacidade de matar diferentes tipos de micro-organismos.

Tabela 3 - Capacidade de inativar micro-organismos pelas diferentes técnicas de esterilização

Categoria	Técnica	Nível de inativação	Micobactéria	Bactéria vegetativa	Endósporo bacteriano	Vírus não envelopado	Vírus envelopado	Prion	Fungo
Calor	Tratamento térmico	Alto	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Irradiação	Gama	Alto	✓	✓	✓	✓	✓		✓
	Feixe de elétrons	Alto	✓	✓	✓	✓	✓		✓
	UV	Médio		✓			✓		
Plasma	Plasma	Alto	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Químico	EtO	Alto	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	PAA	Alto		✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Etanol	Médio	✓	✓			✓		✓
	Iodo	Médio		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Novas técnicas	sCO ₂	Baixo		✓	✓	✓	✓		
	Antibióticos	Baixo		✓					

UV: ultravioleta; EtO: óxido de etileno; PAA: ácido peracético; sCO₂: dióxido de carbono supercrítico
 Fonte: DAI *et al.* (2016)

A inativação incompleta dos micro-organismos, os resíduos tóxicos e as alterações nas propriedades estruturais e bioquímicas dos *Scaffolds* podem ser fatores problemáticos para a segurança e eficácia dos mesmos. A Tabela 4 apresenta as vantagens e desvantagens das técnicas citadas na Tabela 3. Nesse trabalho foram escolhidas as técnicas de esterilização por micro-ondas, vapor e por irradiação ultravioleta. Foram escolhidas por serem métodos simples, rápidos e de baixo custo operacional e cada uma será abordada com mais detalhes a seguir.

3.4.1 Esterilização por micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes. Sua região no espectro eletromagnético (Figura 13) se encontra entre a região do infravermelho

e ondas de rádio, possuem uma frequência de 300 a 300.000 MHz, correspondente a comprimento de onda entre 1 mm a 1 m.

Tabela 4 - Vantagens e desvantagens dos métodos de esterilização

Categoria	Técnica	Vantagens	Desvantagens
Calor	Tratamento térmico	Simples, rápida, eficaz, alta capacidade de penetração e sem resíduos tóxicos.	A alta temperatura afeta as propriedades estruturais de polímeros biodegradáveis.
Irradiação	Gama	Alta capacidade de penetração, baixa temperatura, eficaz, fácil de controlar e sem resíduos tóxicos.	Induz alterações nas propriedades estruturais e tempo de exposição alta.
	Feixe de elétrons	Baixa temperatura, fácil de controlar, rápida e sem resíduos tóxicos.	Induz alterações nas propriedades estruturais, necessidade de acelerador de elétrons e baixa capacidade de penetração.
	UV	Baixa temperatura, rápida, baixo custo, sem resíduos tóxicos.	Não eficazes e induzem alterações nas propriedades estruturais e bioquímicas de polímeros biodegradáveis sob longa duração de exposição.
Plasma	Plasma	Baixa temperatura, melhor interação celular, aumento da molhabilidade na superfície de polímeros biodegradáveis e rápida.	Pode causar alterações nas propriedades químicas e mecânicas dos polímeros biodegradáveis.
Químico	EtO	Eficaz e baixa temperatura.	Induz alterações nas propriedades estruturais, resíduo tóxico, inflamável, explosivo e carcinogênico.
	PAA	Eficaz e baixa temperatura.	Induz alterações nas propriedades estruturais e bioquímicas e resíduo ácido.
	Etanol	Baixa temperatura, rápida, baixo custo, nenhum equipamento complexo e sem resíduos tóxicos.	Não é eficaz e altera as propriedades estruturais e bioquímicas dos <i>Scaffolds</i> .
	Iodo	Baixa temperatura, sem alteração de propriedade estrutural, rápida.	Induz alterações nas propriedades bioquímicas.
Novas técnicas	sCO ₂	Nenhum resíduo tóxico, nenhuma mudança de propriedade bioquímica.	Pode afetar a porosidade e a morfologia dos <i>Scaffolds</i> .
	Antibióticos	Conveniente, simples.	Não eficaz e resíduo prejudicial.

UV: ultravioleta; EtO: óxido de etileno; PAA: ácido peracético; sCO₂: dióxido de carbono supercrítico
 Fonte: DAI *et al.* (2016)

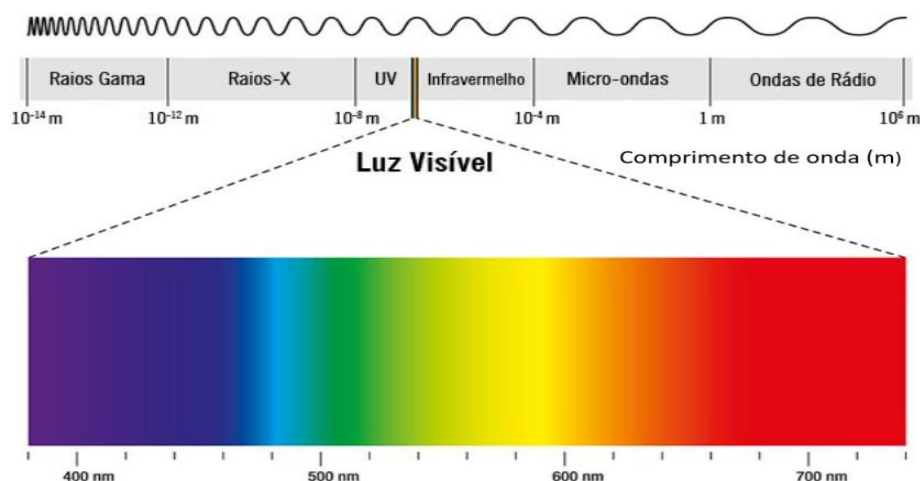


Figura 13 - Região das micro-ondas no espectro eletromagnético
 Fonte: QIU *et al.* (2011)

O mecanismo de inativação de micro-organismos por micro-ondas ainda não foi completamente esclarecido. Alguns pesquisadores acreditam que a energia térmica causa a morte dos micro-organismos, uma vez que ela gera aumento da aceleração entre os íons causando à desnaturação de suas proteínas. Outros sugerem que além do calor, as micro-ondas ocasionam mudanças intracelulares específicas que levam a morte microbiana. A natureza exata do efeito de esterilização e se é devido apenas aos efeitos térmicos ou ao efeito de micro-ondas tem sido motivo de controvérsias por décadas (KOUTCHMA *et al.*, 2001, BANIK *et al.*, 2003).

Trata-se de um método prático e econômico e tem a vantagem de ser feita com um forno de micro-ondas doméstico simples com tempo de tratamento curto. Mas a intensidade do campo não é uniforme e homogênea, criando “pontos frios”. Desse modo a mesa giratória não é adequada para assegurar que todo material seja exposto à radiação (TÁVORA, 2007). Uma alternativa para resolver o problema dos “pontos frios” que possuem ausência de energia micro-ondas é a utilização de um dispositivo que promovesse uma rotação tridimensional (SINGH; SINGH, 2012).

Embora a micro-ondas tenham se mostrado um método confiável para promover a segurança microbiológica dos alimentos, poucos trabalhos foram realizados sobre sua eficácia na esterilização de enxertos ósseos. UCHIYAMA *et al.* (2005) utilizaram o micro-ondas como alternativa à banheira para tratamento térmico de ossos. Dunsmuir e Gallacher (2003) estudaram esterilização de enxerto da cabeça femoral por micro-ondas e Singh e Singh, (2012) demonstraram a eficácia

bactericida da radiação de micro-ondas para a esterilização de enxertos ósseos contaminados por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

3.4.2 Esterilização por vapor

Uma autoclave é um dispositivo que usa vapor de alta pressão para esterilizar. Os parâmetros que afetam a eficácia da esterilização incluem vapor, pressão, temperatura e tempo. As duas temperaturas comuns do vapor são 121°C e 132°C por cerca de 20 minutos. As temperaturas e os tempos de tratamento variam dependendo do tipo de material, bem como do tipo de esterilizador (DAI *et al.*, 2016).

A vantagem do tratamento térmico é que ele é eficaz, rápido, simples e sem resíduos tóxicos. A capacidade de penetração é uma das melhores dentre todas as técnicas de esterilização (SİLİNDİR; ÖZER, 2009) e pode eliminar completamente todos os micro-organismos viáveis (ver Tabela 3). O calor do vapor combinado com alta pressão destrói os componentes metabólicos e estruturais essenciais da replicação do micro-organismo (MCDONNELL; SHEARD, 2012).

Como a maioria dos biopolímeros tem baixas temperaturas de transição vítrea (T_g), o uso de tratamento térmico como técnica de esterilização para esses materiais é problemático. Além disso, a presença de vapor d'água foi demonstrado que causa degradação hidrolítica do material a ser esterilizado (MCDONNELL; SHEARD, 2012). Para solucionar esse problema, alguns cientistas modificaram o processo de esterilização a vapor para *Scaffolds* constituídos de poli (ácido láctico) - PLA através da introdução de ciclos consistindo em fases individuais para remoção de ar e vapor. No entanto, uma perda substancial no peso molecular foi observada, juntamente com um aumento na resistência mecânica devido à recristalização do polímero. Portanto, ao optar pela esterilização por calor úmido, deve-se ter cuidado com seus efeitos colaterais sobre a resistência mecânica do material e o peso molecular (DAI *et al.*, 2016).

3.4.3 Esterilização por irradiação ultravioleta

A irradiação ultravioleta é uma nova abordagem para a esterilização de *Scaffolds*. É comumente usada para esterilizar superfícies de materiais e descontaminação de ambientes. A radiação ultravioleta de comprimento de onda curto (~ 254 nm) causa mutações no material genético microbiano, impedindo sua

replicação e essa ação promove a inativação dos micro-organismos. No entanto, a radiação sozinha não é considerada um método eficaz de esterilização devido ao seu baixo poder de penetração (QIU, 2011; DAI *et al.*, 2016).

O tempo de irradiação e o comprimento de onda foram considerados os dois parâmetros fundamentais para esterilizar substitutos biológicos (DAI *et al.*, 2016). O comprimento de onda, geralmente entre 200 e 280 nm são ótimos, embora 260 nm seja relatado como mais letal (PRESCOTT *et al.*, 2004). Já o tempo de exposição à radiação ultravioleta é um dos fatores que mais afetam as propriedades pós-esterilização. O trabalho realizado por YIXIANG *et al.* (2008), demonstrou que o tempo de exposição de 1 hora de radiação causou uma redução drástica no peso molecular e resistência à tração de *Scaffolds* constituídos por nanofibras. FISCHBACH *et al.* (2001) relataram eficácia no processo de esterilização do copolímero poli (ácido láctico) - poli (etileno glicol) - monometil éter (Me.PEG-PLA) por exposição de 2 horas de radiação ultravioleta. Porém exposições de radiação entre 5 e 24 horas causaram mudanças significativas nas propriedades dos *Scaffolds*, com perda de cadeias de polietileno glicol (PEG) na superfície do suporte.

Portanto, por haver uma discrepância de valores na literatura de acordo com o tipo de material, se faz necessário uma avaliação e um estudo cuidadoso do tempo de duração e comprimento de onda da irradiação ultravioleta necessários para esterilizar as estruturas, mantendo suas propriedades físico-químicas e mecânicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As caracterizações mecânicas, físico-químicas e microbiológicas antes e após esterilização dos *Scaffolds* foram realizadas pelo Grupo de Biomateriais do Instituto de Química - UNESP, em parceria com a Faculdade de Odontologia - UNESP, Araraquara, São Paulo.

4.1 Materiais

- Ácido o-Fosfórico.
- Alginato de Sódio.
- Celulose Bacteriana.
- Hidróxido de Cálcio.
- RPMI 1640.
- PBS.
- Ágar Dextrose Sabouraud com Cloranfenicol (SDA).
- Ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI).
- Chromagar.
- Ágar Sangue.

4.2 Etapas de desenvolvimento do trabalho

O trabalho foi realizado nas seguintes etapas:

- I. Obtenção de fosfato de cálcio amorfo (ACP) por via úmida e caracterização.
- II. Elaboração da tinta à base de alginato de sódio (AS), celulose bacteriana (CB) e fosfato de cálcio amorfo (ACP) e caracterização.
- III. Confeção de *Scaffolds* a partir da tinta elaborada na etapa II e caracterização.
- IV. Esterilização dos *Scaffolds* por micro-ondas, vapor e por irradiação ultravioleta.
- V. Avaliação microbiológica e caracterização dos *Scaffolds*.

4.3 Procedimento experimental

4.3.1 Obtenção de fosfato de cálcio amorfo (ACP)

O ACP foi sintetizado aplicando a metodologia descrita por RODRIGUEZ-CHANFRAU *et al.* (2018). Este método consiste na reação direta entre uma solução contendo íons fosfato (solução de ácido o-fosfórico, 6M) e uma solução contendo íons cálcio (solução de hidróxido de cálcio, 6M). Agitou-se a solução contendo íons cálcio em um agitador mecânico (IKA® RW 20) por três horas, gotejando-se a solução de ácido o-fosfórico. Após o tempo de agitação, deixou-se a mistura em repouso por duas horas, totalizando cinco horas de síntese. Uma vez completada a reação, a suspensão obtida foi filtrada sob vácuo e depois seca por liofilização durante 24 horas.

A metodologia utilizada para a obtenção de fosfato de cálcio amorfo foi esquematizada através do diagrama apresentado na Figura 14. Na Figura 15, temos o pó de fosfato de cálcio amorfo obtido pelo método via úmida.

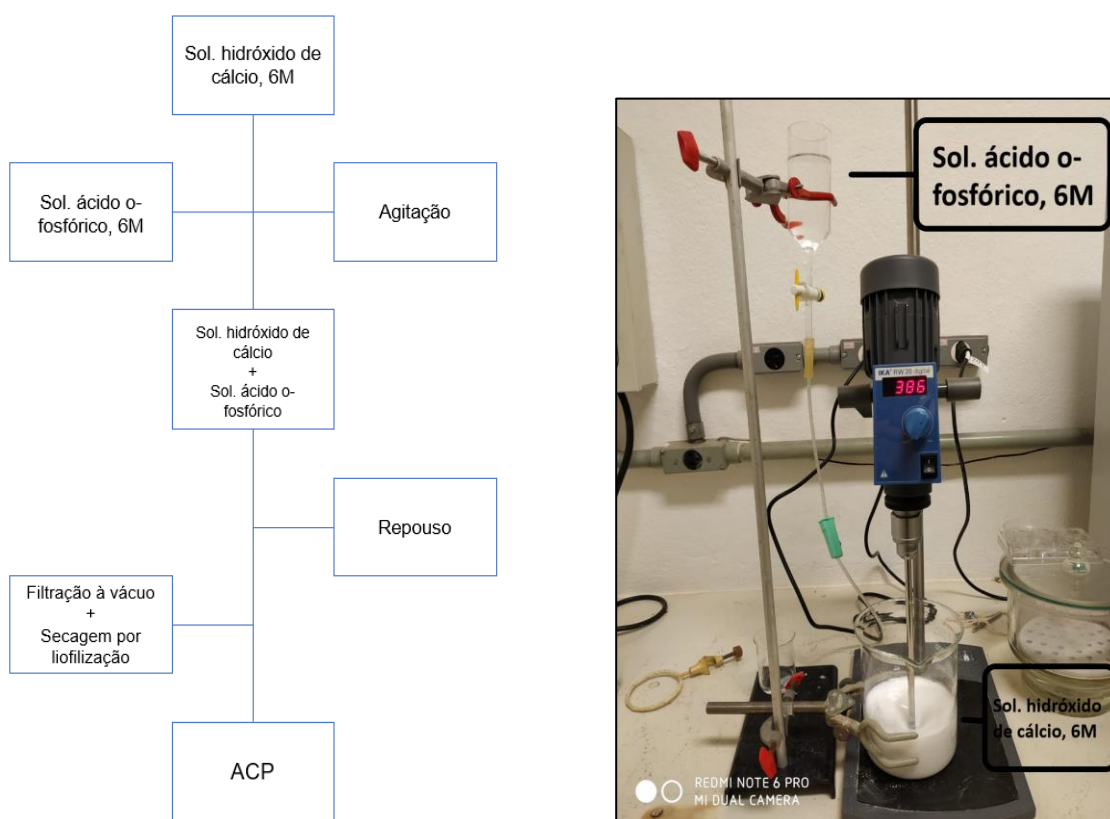


Figura 14 - Diagrama da síntese de fosfato de cálcio amorfo

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)



Figura 15 - Pó de fosfato de cálcio amorfo
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

4.3.1.1 Caracterização do fosfato de cálcio amorfo (ACP)

O fosfato de cálcio amorfo, foi caracterizado por Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

4.3.1.1.1 Difração de Raios X (DRX)

Os espectros de DRX foram registrados à temperatura ambiente (25°C) com difratômetro SIEMENS D5000, DIFFRAC PLUS XRD (Alemanha) com geometria BRAGG-Brentano, radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.154 \text{ nm}$), detector Flicker e monocromador de grafite. A faixa de ângulo de espalhamento de 4° a 80° com intervalo de 2 θ passos de 0,02 foi usada. As amostras foram cortadas em pequenos pedaços e colocadas na porta amostras de vidro, analisadas sob condições de platô. Uma tensão de operação de 40 kV e corrente de 30 mA foi utilizada, e as intensidades foram medidas na faixa de 5 < 2 < 30. Separações de pico foram realizadas usando deconvolução gaussiana. Os espaçamentos “d” foram calculados usando a equação de Bragg. O software X Pert High Score (versão 2.0.1; 2004) foi utilizado para identificar a estrutura cristalina das amostras.

4.3.1.1.2 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das amostras foram medidos em um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier, modelo VERTEX 70, marca BRUKER (Alemanha). Um total de 64 varreduras cumulativas foram realizadas, com uma resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de frequência de 4000 a 400 cm^{-1} , no modo de transmissão.

4.3.1.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras foi realizada utilizando um FEG-MEV; Microscópio eletrônico de varredura JEOL 7500F (Alemanha). O equipamento foi operado a uma voltagem de aceleração de 2 kV. As amostras foram revestidas por evaporação de carbono (Baltec SCD 050 Sputter Coater, EUA).

4.3.2 Elaboração da tinta

Na preparação da tinta utilizou-se alginato de sódio, celulose bacteriana e ACP sintetizado anteriormente. O desenvolvimento da tinta foi realizado em duas etapas:

- Estabelecimento da concentração adequada de alginato de sódio.
- Estabelecimento da concentração adequada de celulose bacteriana.

4.3.2.1 Estabelecimento da concentração adequada de alginato de sódio (AS)

Para determinar a concentração de alginato de sódio que a tinta deve conter, estabeleceu-se uma concentração fixa de celulose bacteriana a 10% e a concentração de alginato de sódio nas concentrações de 20% (denominada Cart 1) e 30% (denominada Cart 2). A estabilidade da tinta obtida foi estudada durante 72 horas e a sua viscosidade foi estudada durante 7 dias. Aquele que apresentou o melhor comportamento foi utilizado na segunda etapa.

4.3.2.2 Estabelecimento da concentração adequada de celulose bacteriana (CB)

Uma vez estabelecida a concentração de alginato de sódio (30%), determinou-se a concentração de celulose bacteriana a ser utilizada na formulação da tinta. Previamente, foi estabelecida a concentração de fosfato de cálcio amorfo que a formulação deve conter, sendo a mesma definida a partir de referência na literatura, onde na maioria das publicações, a apatita é utilizada em concentrações que variam entre 50% e 75%. Após uma análise, uma concentração de 50% de ACP foi estabelecida na formulação, e o conteúdo de celulose bacteriana foi estabelecido pelo estudo das variantes mostradas na Figura 16.

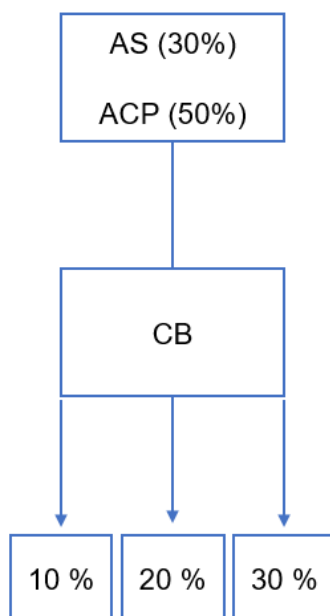


Figura 16 - Diagrama de trabalho estabelecido para determinar a concentração de celulose bacteriana (CB) na tinta (AS: alginato de sódio. ACP: fosfato de cálcio amorfo)

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

4.3.2.3 Caracterização da tinta

Para as tintas elaboradas, a viscosidade foi determinada no início e após 30 dias. O que apresentou melhor viscosidade ao longo do tempo foi caracterizado por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), feita de acordo com o que foi declarado na sessão 4.3.1.1.2.

4.3.3 Confecção de *Scaffolds*

Para a confecção dos *Scaffolds*, foi utilizado a tinta elaborada na sessão 4.3.2. Portanto, após estabelecido as concentrações dos componentes, a mistura foi agitada em um agitador mecânico (IKA® RW 20 digital) até a completa homogeneização. Após a completa homogeneização, a tinta foi colocada em moldes e em seguida foram refrigerados (-18°C) por 24 horas e posteriormente liofilizados por 48 horas, ocorrendo assim, a formação dos *Scaffolds*, através do método da agregação de partículas.

A metodologia utilizada para a confecção dos *Scaffolds* foi esquematizada através do diagrama apresentado na Figura 17.

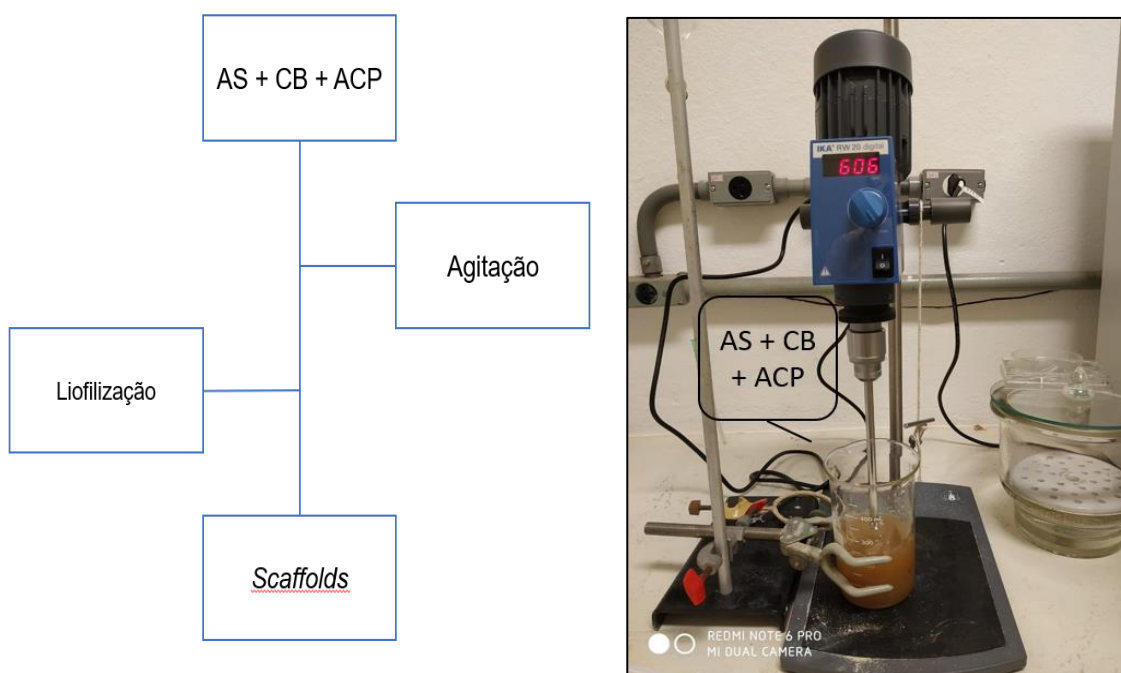


Figura 17 - Diagrama da confecção dos *Scaffolds* (AS: alginato de sódio; CB: celulose bacteriana; ACP: fosfato de cálcio amorfo)
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

4.3.3.1 Caracterização dos *Scaffolds*

Os *Scaffolds* obtidos na sessão anterior foram caracterizados por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (sessão 4.3.1.1.2) e dureza.

4.3.3.1.1 Determinação da dureza Shore A

O teste de dureza Shore A foi baseado no tipo A da norma ASTM D2240, o equipamento utilizado foi um durômetro de elastômeros e polímeros tipo A da marca Metrotokyo. O teste foi realizado com um peso de 1 kgf, com um tempo de penetração de 1 segundo. O teste foi realizado em 3 pontos diferentes para o cálculo da média e desvio padrão.

4.3.4 Estudo da esterilização

Os processos de esterilização utilizados foram: esterilização por micro-ondas, esterilização por vapor e esterilização por irradiação ultravioleta. Após a esterilização foi feita avaliação microbiológica, estudo estatístico dos resultados obtidos e nova caracterização das amostras.

4.3.4.1 Esterilização por micro-ondas

As amostras foram colocadas dentro de um equipamento de micro-ondas convencional. A micro-ondas foi aplicada por 5 minutos a uma potência de 100 Watts (SINGH; SINGH, 2012).

4.3.4.2 Esterilização por vapor

As amostras foram colocadas em uma autoclave vertical, marca FABBE, modelo 103. Em seguida, foram esterilizadas sob pressão de 1 atm e temperatura de vapor igual 121°C por 20 minutos (DAI *et al.*, 2016).

4.3.4.3 Esterilização por irradiação ultravioleta

As amostras foram esterilizadas sob luz ultravioleta, marca FLUOR 30W GL GERMICIDA, fabricante LUCMAT LÂMPADAS. Cada lado da amostra foi deixado sob radiação por 30 minutos (YIXIANG *et al.*, 2008).

4.3.4.4 Avaliação microbiológica

Primeiramente, de maneira asséptica, em tubos tipo Falcon foram adicionados 10mL de meio de cultura RPMI 1640 (tamponado com MOPS) estéril. Em seguida, uma amostra foi adicionada a cada tubo, sendo três amostras para

cada situação experimental (grupo controle, micro-ondas, vapor e ultravioleta), totalizando 12 amostras por ocasião. Os procedimentos foram realizados em três ocasiões diferentes ($n = 9$). O tubo foi levado para incubação na estufa a 37°C por 12 horas para a dispersão das células presentes no interior das amostras e obtenção de extratos.

Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL): Para a quantificação de micro-organismos após as 12 horas os tubos foram agitados durante 1 minuto em vórtex para o desprendimento dos micro-organismos e homogeneização do extrato. Em seguida, o processo de diluição seriada foi realizado em tubos eppendorf contendo 900 μL de PBS puro por meio da transferência de alíquotas de 100 μL da solução original. As diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram obtidas. Duas alíquotas de 25 μL da diluição de 10^{-3} e de 10^{-4} foram gotejadas em duas placas de Petri contendo os seguintes meios: Ágar Dextrose Sabouraud com Cloranfenicol (SDA), Ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI), Chromagar e Ágar Sangue. Em seguida, todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as placas foram posicionadas sobre um contador de colônias manual e o número de colônias foi determinado. Os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $\text{UFC/mL} = \text{número de colônias} \times 25/q$. Nessa fórmula, “n” equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 3 a 4) e “q” equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas (0,025 mL = 25 μL). Todos os resultados foram avaliados estatisticamente.

4.3.4.5 Estudo estatístico

Com os dados obtidos pela avaliação microbiológica, uma análise estatística foi realizada usando one-way ANOVA. Dentro dele, um grupo de controle foi usado para avaliar o experimento. Antes disso, foi realizado um estudo exploratório dos dados e a verificação das hipóteses necessárias que devem ser cumpridas para aplicar uma ANOVA clássica e, no caso de não conformidade com homocedasticidade, foi utilizada a alternativa não paramétrica de Kruskal Wallis. O software estatístico utilizado para realizar o estudo foi INFOSTAT versão 2017. Todos os testes foram avaliados com significância $\alpha = 5\%$.

4.3.4.6 Caracterização dos *Scaffolds* após esterilização

Os *Scaffolds* esterilizados foram caracterizados por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (sessões 4.3.1.1.2 e 4.3.1.1.3). A melhor variante de esterilização foi avaliada por teste mecânico (teste de compressão) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (sessão 4.3.1.1.3) para estudar a influência do processo de esterilização nas propriedades mecânicas.

4.3.3.1.2 Teste mecânico

O teste de resistência à compressão (Emic DL2000, Tesc Program 384) foi realizado com uma célula de carga Trd 28 de 2 kN, empregando-se velocidade do travessão de 1 mm/min, de acordo com as normas ISO 5833.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do fosfato de cálcio amorfo (ACP)

A Figura 18 mostra o padrão de Difração de Raios-X (DRX) da amostra de fosfato de cálcio amorfo sintetizada pela metodologia descrita neste trabalho. De acordo com o difratograma de Raios-X, identificado fosfato de cálcio amorfo (ACP), hidroxiapatita (HA), fosfato octa-cálcico (OCP) e monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (Brushita, DCPD). Estes resultados coincidem com aqueles relatados na literatura por outros autores (PELIZARO *et al.*, 2018; RODRIGUEZ CHANFRAU *et al.*, 2018; RODRIGUEZ CHANFRAU *et al.*, 2019a) que demonstraram a presença destas fases na síntese do fosfato de cálcio amorfo por metodologia de síntese semelhante ao nosso pó com secagem por evaporação, secagem na bandeja e secagem por atomização.

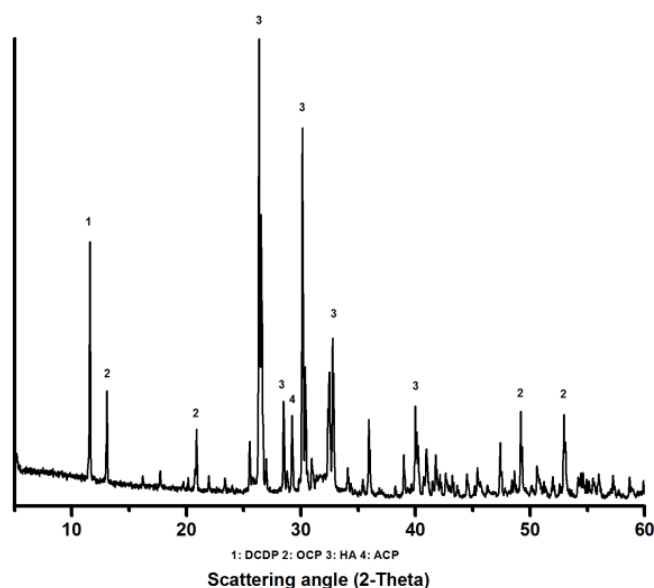


Figura 18 - Difratograma de Raios-X da amostra sintetizada (DCPD: monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado; OCP: fosfato octa-cálcico; HA: hidroxiapatita; ACP: fosfato de cálcio amorfo)

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

A formação de fosfatos de cálcio é complicada devido à possibilidade de formação de diferentes fases durante o processo de síntese. Sabe-se que neste sistema ocorre a co-precipitação de fases como brushita (DCPD) e fosfato octa-cálcico (OCP), sendo maior ou menor dependendo de como os parâmetros de síntese são controlados (ARIFUZZAMAN; ROHANI, 2004). Por outro lado, sabe-se

que estes dois co-precipitantes são precursores necessários para a posterior formação da hidroxiapatita e desempenham um papel importante no processo de biomineralização (Figura 19).

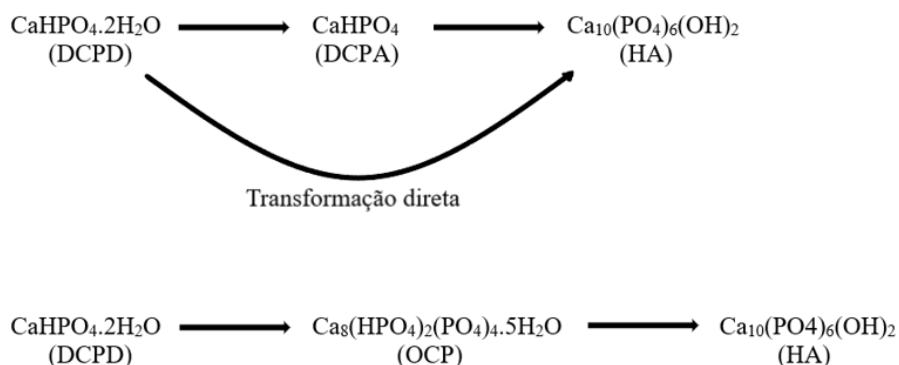


Figura 19 - Transformações de fases de fosfatos de cálcio intermediárias como as fases brushita (DCPD), fosfato octa-cálcico (OCP), monetita (DCPA) na formação de hidroxiapatita (HA)
 Fonte: ARIFUZZAMAN; ROHANI (2004)

A Figura 20 mostra os resultados da análise FTIR. As bandas características dos grupos fosfato a $1192,7 \text{ cm}^{-1}$ (vibração P-O-H), 1118 cm^{-1} , 1052 cm^{-1} e 787 cm^{-1} (vibração P-O) e 573 cm^{-1} (vibração O-P-O) foram observadas. Bandas características da presença de grupos OH na região entre 3000 e 3500 cm^{-1} e 1641 cm^{-1} também foram observadas; bem como uma banda a 868 cm^{-1} atribuída à presença de CO_3^{2-} .

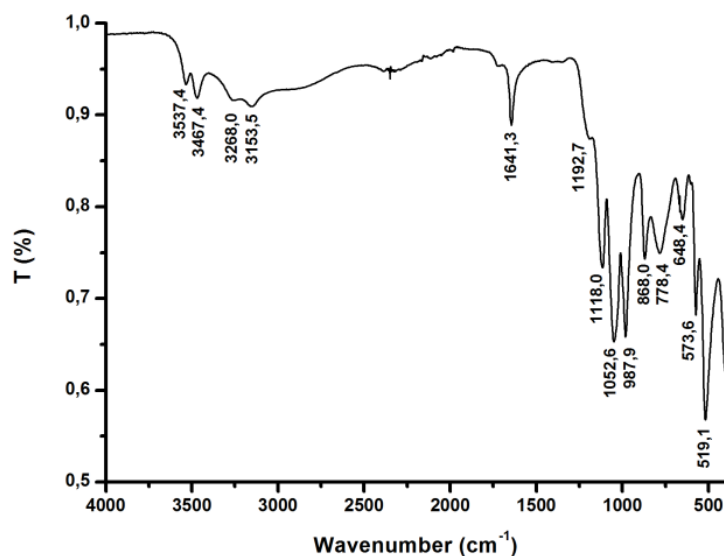


Figura 20 - Espectro de FTIR da amostra sintetizada
 Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2009)

A Figura 21 mostra a micrografia das amostras obtidas com ampliação 2000X e 100000X. Observa-se que o pó tem morfologia na forma de placas recobertas com partículas menores, formando aglomerado.

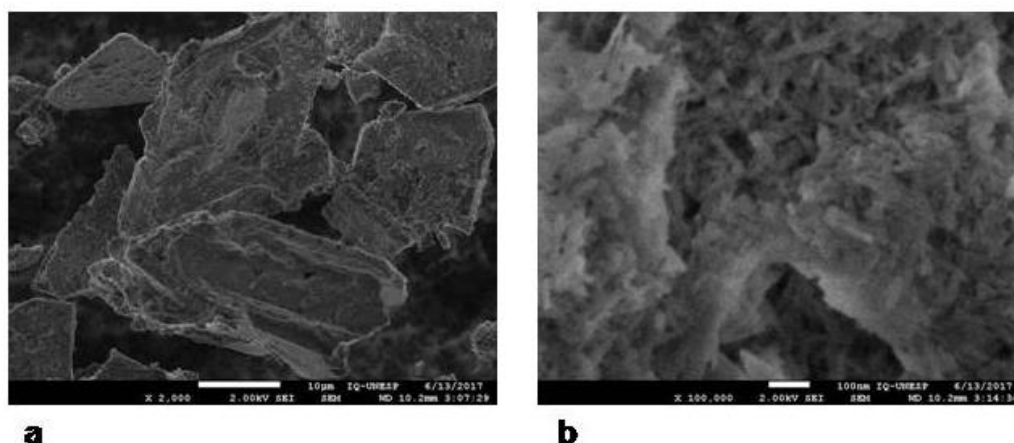


Figura 21 - Micrografia MEV da amostra sintetizada (a = 2000X e b = 100000X)
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2009)

5.2 Caracterização da tinta

5.2.1 Estabelecimento da concentração adequada de alginato de sódio (AS)

Primeiro, foi feito um trabalho para determinar a concentração de alginato de sódio que a tinta deveria conter. Para este fim, uma concentração de celulose bacteriana a 10% foi estabelecida e a concentração de alginato de sódio foi variada em concentrações de 20% e 30%. Duas formulações foram feitas com celulose bacteriana (10%) e alginato de sódio em concentrações de 20% (denominada Cart 1) e 30% (denominada Cart 2) e a estabilidade foi estudada por 72 horas e a viscosidade por 7 dias.

Os resultados mostraram que ambas as formulações foram estáveis por 72 horas à temperatura ambiente, sem sofrer alterações organolépticas ou separação de fases. Isso é importante porque garante que, durante o processo de preparação, não ocorram variações que afetem sua estabilidade e qualidade.

A viscosidade no tempo, no caso da formulação Cart 1, foi muito baixa (4,82 Pa.s), o que fez com que a consistência ficasse muito líquida. Aos 7 dias, a viscosidade aumentou (7,81 Pa.s). No caso da amostra Cart 2 a viscosidade no início do experimento foi de 15,08 Pa.s, enquanto aos 15 dias foi de 15,03 Pa.s,

indicando maior estabilidade. Com base nesses resultados, a formulação Cart 2 foi escolhida para continuar o trabalho.

5.2.2 Estabelecimento da concentração adequada de celulose bacteriana (CB)

Os resultados da medição da viscosidade são mostrados na Tabela 5, verificando que os melhores resultados foram alcançados na formulação CartnHa 20. Após 30 dias, verificou-se que a formulação foi estável (522,4 Pa.s no início e 521,9 Pas em 30 dias), não se observaram variações nas características organolépticas e sua viscosidade.

Tabela 5 - Resultado da viscosidade da tinta e dureza dos Scaffold obtidos

Formulação	Viscosidade (Pa.s)	Dureza (N/mm²)
CartnHa 10	149,2	490
CartnHa 20	522,4	1250
CartnHa 30	323,7	870

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

O espectro de FTIR (Figura 22) mostra as bandas características dos grupos fosfato (bandas indicadas no círculo), bem como as bandas da celulose bacteriana.

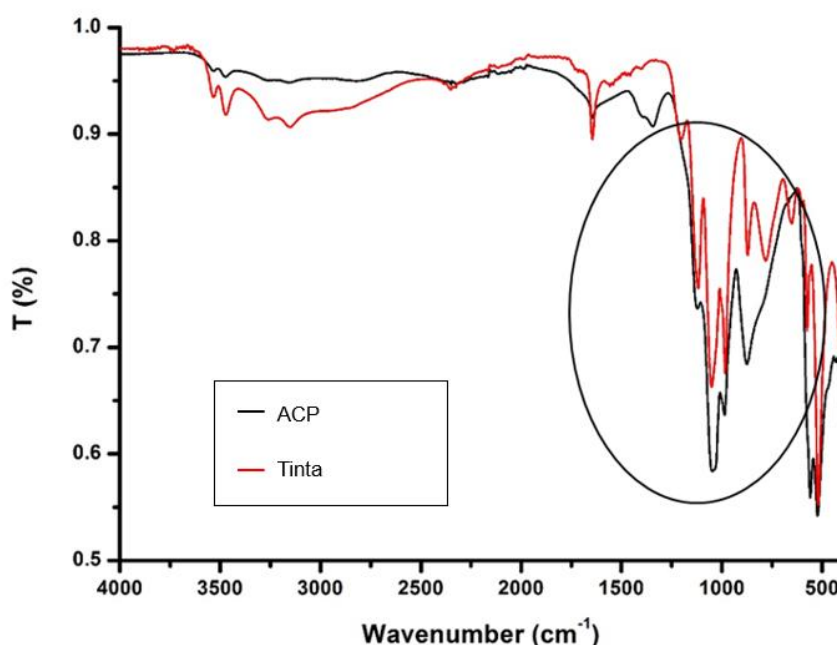


Figura 22 - Espectro de FTIR de ACP e Tinta contendo celulose bacteriana e fosfato de cálcio amorfo
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

Em paralelo, com estas tintas, o *Scaffold* foi preparado pela metodologia de liofilização e a dureza foi determinada acordo com o que foi declarado na sessão 4.3.3.1.1. Os resultados mostraram que a variante CartnHa 20 teve melhor comportamento, então foi decidido estabelecer esta variante de tinta para o resto do trabalho (Tabela 5).

5.3 Estudo da esterilização

5.3.1 Avaliação microbiológica

Neste estudo, quatro tipos de meios de culturas foram utilizados para avaliar o crescimento de micro-organismos presentes nas amostras esterilizadas e não esterilizadas (grupo controle). Eles foram:

- SDA, que é um meio de cultura amplamente utilizado para o crescimento e manutenção de fungos do tipo *C. albicans* e *T. mentagrophytes*.
- Chromagar utilizado para o crescimento e manutenção de fungos do tipo *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.
- Ágar Sangue que é um meio que permite o crescimento da maioria das bactérias gram-positivas e gram-negativas. É um meio diferencial que permite conhecer bactérias hemolíticas e não hemolíticas.
- BHI é um meio adequado para o cultivo de uma ampla variedade de tipos de organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Os resultados da avaliação microbiológica utilizando meio SDA e Chromagar mostraram que não foi observado crescimento para nenhuma das amostras testadas, portanto, podemos inferir que nas amostras testadas não há presença de fungos. Por outro lado, as Tabelas 6 e 7 mostram os resultados da avaliação microbiológica no Ágar Sangue e no meio BHI respectivamente para todas as amostras tratadas com diferentes metodologias de esterilização. Em todas as experiências a diluição foi de 1000 e "n" igual a 3.

Tabela 6 - Resultados microbiológicos em meio Ágar Sangue

Experimento	Grupo	Número de colônias (Média/DE)	UFC/mL	Log10
1	Controle	125.7/20.9	5026666.7	6.70
	MW	14.7/3.6	586666.7	5.77
	UV	113.3/11.1	4533333.3	6.66
	Vapor	0.0	0.0	0.00
2	Controle	122.7/20.9	4906666.7	6.69
	MW	22.0/4.7	880000.0	5.94
	UV	116.0/3.3	4640000.0	6.67
	Vapor	0.0	0.0	0.0
3	Controle	167.0/23.3	6680000.0	6.82
	MW	23.7/8.2	946666.7	5.98
	UV	132.0/19.3	5280000.0	6.72
	Vapor	0.0	0.0	0.0

Controle: sem esterilização; MW: micro-ondas; UV: ultravioleta

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

Tabela 7 - Resultados microbiológicos em meio BHI

Experimento	Grupo	Número de colônias (Média/DE)	UFC/mL	Log10
1	Controle	299.3/0.9	11973333.3	7.08
	MW	20.7/5.6	826666.7	5.92
	UV	300.0/0.7	12000000.0	7.08
	Vapor	0.0	0.0	0.00
2	Controle	299.7/0.4	11986666.7	7.08
	MW	17.3/3.6	693333.3	5.84
	UV	299.7/1.1	11986666.7	7.08
	Vapor	0.0	0.0	0.0
3	Controle	299.3/0.9	11973333.3	7.08
	MW	21.0/6.0	840000.0	5.92
	UV	299.3/0.4	11973333.3	7.08
	Vapor	0.0	0.0	0.0

Controle: sem esterilização; MW: micro-ondas; UV: ultravioleta

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

A Figura 23 mostra a avaliação microbiológica nos quatro meios de cultura para as diferentes metodologias de esterilização.

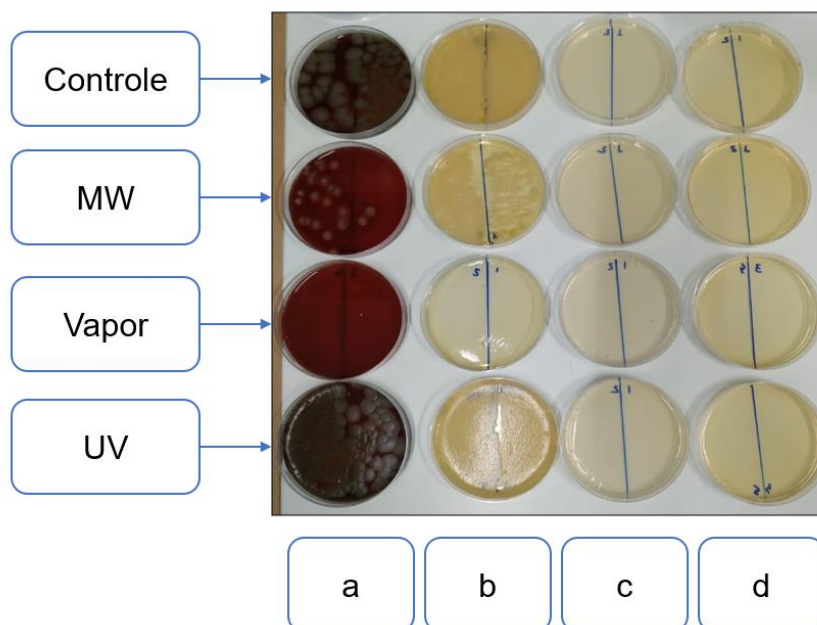


Figura 23 - Avaliação microbiológica (Meios de cultura: a. Ágar Sangue; b. BHI; c. Chromagar; d. SDA)

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

Observa-se que a esterilização por Vapor nas condições de trabalho utilizadas neste estudo, eliminou em sua totalidade a carga microbiana das amostras avaliadas, não observado, em nenhum dos dois meios utilizados, crescimento de micro-organismos. Esse foi um resultado esperado, uma vez que a eficiência desse procedimento de esterilização é conhecida e, por isso, seu grande uso para a esterilização de uma ampla variedade de amostras em todos os campos da vida diária.

Esta metodologia tem uma desvantagem de que este processo é realizado com vapor de água, o que pode, em alguns casos, aumentar a umidade nos materiais avaliados, podendo afetar suas propriedades. Alguns testes foram realizados e as amostras não foram afetadas. No entanto, outros estudos devem ser realizados para definir a viabilidade de utilização deste processo na descontaminação de *Scaffold*, tendo em vista que dentro dos materiais utilizados na preparação dos mesmos, existem polímeros que possuem uma alta higroscopicidade.

No caso dos outros dois métodos de esterilização estudados, observou-se que, ao aplicar a esterilização por micro-ondas (MW), o conteúdo da carga microbiana teve redução de 1 log nos dois meios estudados, e isso não ocorreu quando a esterilização ultravioleta (UV) foi aplicada.

Como o método de esterilização por Vapor foi o mais efetivo, realizou-se o estudo estatístico para os métodos de esterilização por MW, UV e grupo controle (sem esterilização) nos meios de cultura Ágar Sangue e BHI.

5.3.2 Estudo estatístico

Primeiro, os três experimentos foram comparados estatisticamente pela ANOVA para cada um dos grupos estudados, com o objetivo de avaliar se havia diferenças significativas entre os resultados de cada experiência. A Tabela 8 mostra os resultados da avaliação, observando que em nenhum dos casos houve diferença significativa entre as réplicas experimentais, por isso podemos afirmar que o procedimento analítico estabelecido é reproduzível.

Tabela 8 - Resultados da comparação estatística entre as réplicas de cada grupo

Meio	Grupo	n	Média	p
Ágar Sangue	Controle	3	138.5/19.0	0.480
	MW	3	20.1/3.6	0.319
	UV	3	120.4/7.7	0.952
BHI	Controle	3	299.4/0.2	0.973
	MW	3	19.7/1.6	0.077
	UV	3	299.7/0.2	0.872

Controle: sem esterilização; MW: micro-ondas; UV: ultravioleta

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

Com base nesses resultados, o estudo realizado para cada grupo de esterilização foi considerado como um único experimento, assumindo n como 9. Os resultados do estudo estatístico são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores médios da análise das amostras tratadas com diferentes técnicas de esterilização

Meio	Grupo	n	Média	DE
Ágar Sangue	Controle	9	138.4	28.0
	MW	9	20.1	5.7
	UV	9	120.4	13.8
BHI	Controle	9	299.4	0.7
	MW	9	19.7	4.7
	UV	9	299.7	0.81

Controle: sem esterilização; MW: micro-ondas; UV: ultravioleta

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

O estudo de comparação estatística para as amostras avaliadas em meio Ágar Sangue mostrou que as médias das amostras esterilizadas por micro-ondas são diferentes das médias das amostras esterilizadas por UV e das amostras controle (Tabela 9). Observa-se uma concordância na normalidade do resíduo das variáveis de resposta verificadas por meio do gráfico de quantil normal (Q-Q Plot) de que existe uma forte correlação ($r = 0,971$) com a reta dos quantis normais (Figura 24). Enquanto, ao aplicar o teste de Shapiro-Wilks, verifica-se que o valor de p (0,5159) é maior que o valor α (0,05), portanto, pode-se supor que as variáveis de resposta são normais, ou seja, há normalidade.

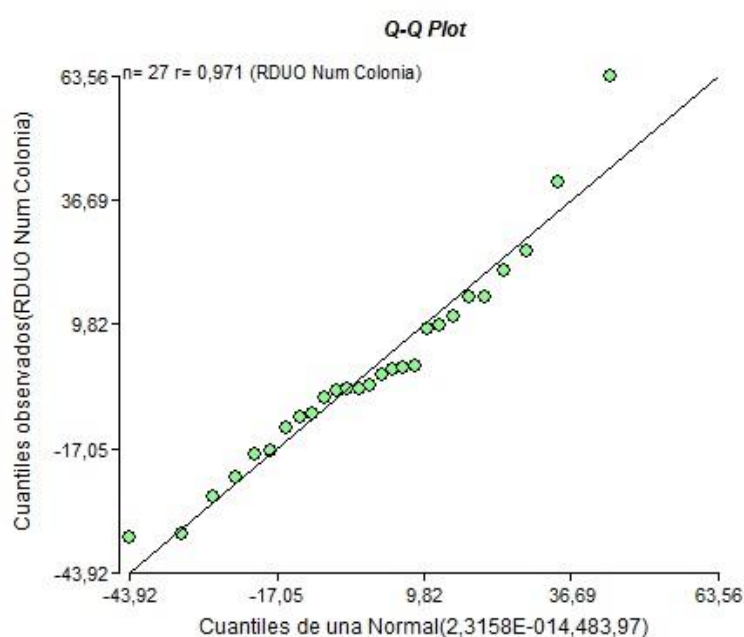


Figura 24 - Gráfico Q-Q Plot da avaliação no meio Ágar Sangue
 Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

Por outro lado, o gráfico de dispersão dos resíduos das variáveis respostas de acordo com a ordem em que os dados foram tomados apresenta um comportamento aleatório (Figura 25), o que garante a independência dos dados.

Ao analisar a homocedasticidade, confirma-se que ao aplicar o teste de Levene, obtém-se um valor p (0,0023) menor que o valor de α (0,05), o que permite rejeitar a hipótese nula H_0 e pode-se sobrepor que as variâncias das subpopulações não são homogêneas, então a homocedasticidade não é atendida.

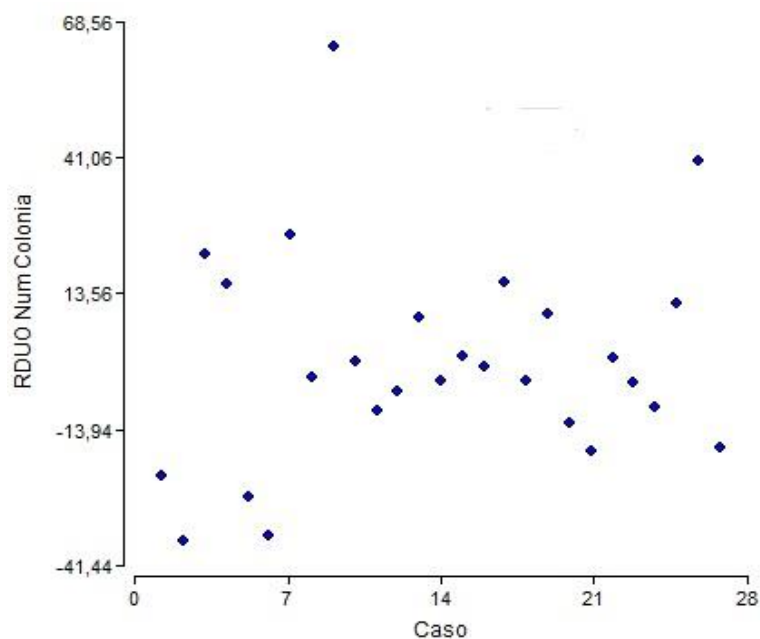


Figura 25 - Gráfico de dispersão no meio Ágar Sangue
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

Quando essa suposição não é atendida, o teste não paramétrico de Kruskal Wallis e o teste de contraste não paramétrico (post-hoc) são realizados. Os resultados mostraram que o valor de p (0,0001) é menor que o valor de α (0,05), portanto existem diferenças significativas no número médio de colônias após a aplicação dos diferentes tratamentos de esterilização (Figura 26).

O teste de contraste mostrou uma diferença significativa entre o grupo controle e as amostras esterilizadas aplicando MW. Para o caso das amostras tratadas aplicando metodologia UV não se observa diferença significativa.

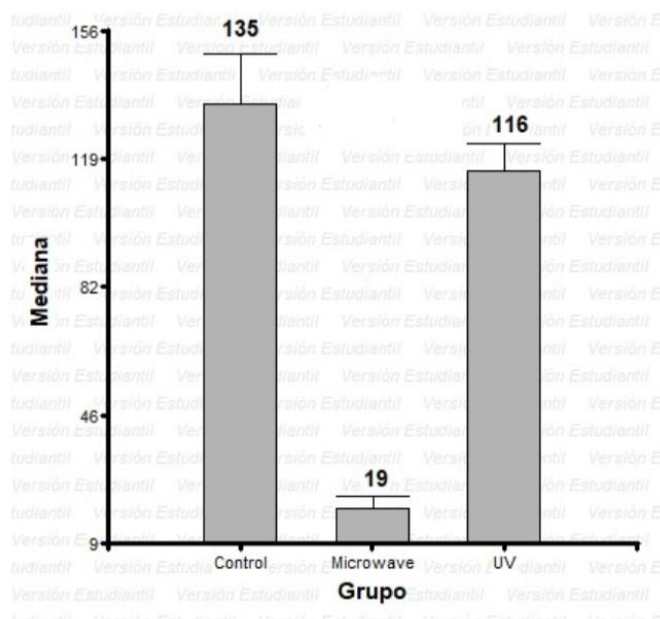


Figura 26 - Gráfico de comparação mediana aplicando o teste de Kruskal Wallis
 Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

O estudo de comparação estatística para as amostras avaliadas em meio BHI, como no caso anterior, mostrou que as médias das amostras esterilizadas por micro-ondas são diferentes das médias das amostras esterilizadas por UV e as amostras controle (Tabela 9).

No entanto, ao contrário do que aconteceu no caso dos estudos realizados em meio Ágar Sangue, observou-se uma não conformidade na normalidade do resíduo das variáveis respostas verificadas por meio do gráfico quantil normal (Q-Q Plot) de que não há correlação forte ($r = 0,861$) com a linha reta dos quantis normais (Figura 27). Considerando que, ao aplicar o teste de Shapiro-Wilks, verifica-se que o valor de p (0,0001) é menor que o valor α (0,05), portanto, pode-se supor que as variáveis respostas não são normais, ou seja, não há normalidade.

O gráfico de dispersão dos resíduos das variáveis respostas de acordo com a ordem em que os dados foram obtidos não é completamente aleatório, observando uma tendência aleatória para uma parte dos dados (Figura 28). Mas, levando em conta que o experimento é planejado de tal forma que cada unidade amostral receba apenas um tratamento, podemos afirmar que há independência nos dados avaliados.

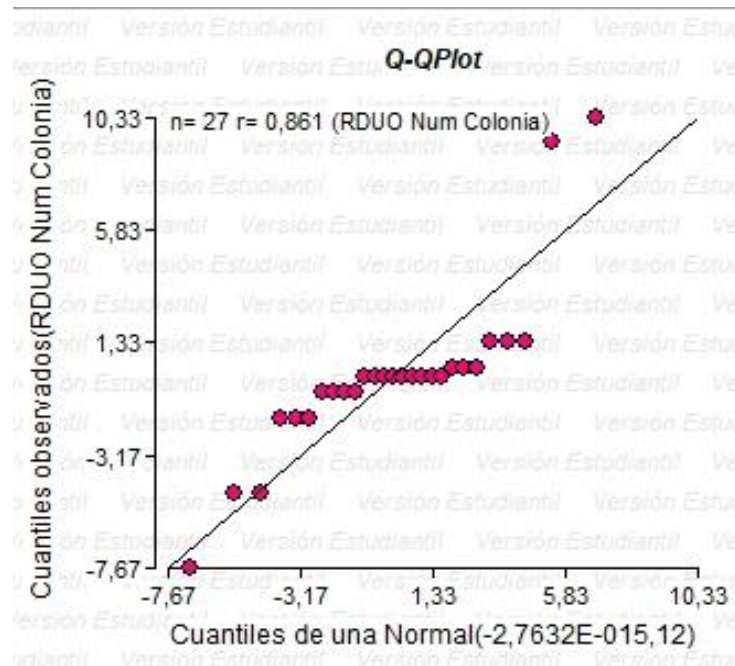


Figura 27 - Gráfico Q-Q Plot da avaliação no meio BHI
 Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

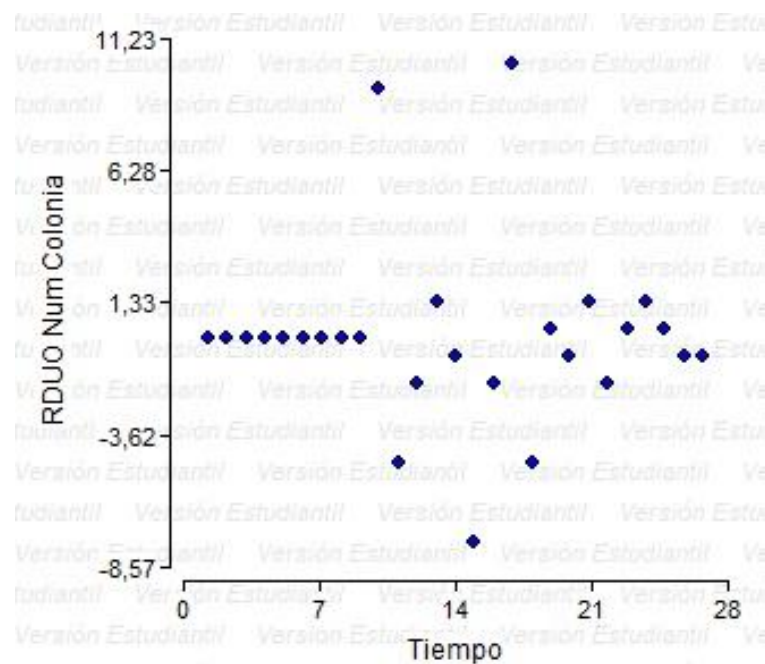


Figura 28 - Gráfico de dispersão no meio BHI
 Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

Ao analisar a homocedasticidade, confirma-se que ao aplicar o teste de Levene, obtém-se um valor p (0,0002) menor que o valor de α (0,05), que permite rejeitar a hipótese nula H_0 e pode-se sobrepor que as variâncias das subpopulações não são homogêneas, então a homocedasticidade não é atendida.

Como a homocedasticidade e homogeneidade não foram satisfeitas, o teste não paramétrico de Kruskal Wallis e o teste de contraste não paramétrico (post-hoc) foram realizados. Os resultados mostraram que o valor de p (0,0001) é menor que o valor de α (0,05), portanto, existem diferenças significativas no número médio de colônias após a aplicação dos diferentes tratamentos de esterilização (Figura 29).

O teste de contraste mostrou uma diferença significativa entre o grupo controle e as amostras esterilizadas aplicando MW. Já no caso das amostras tratadas aplicando metodologia UV não se observa diferença significativa.

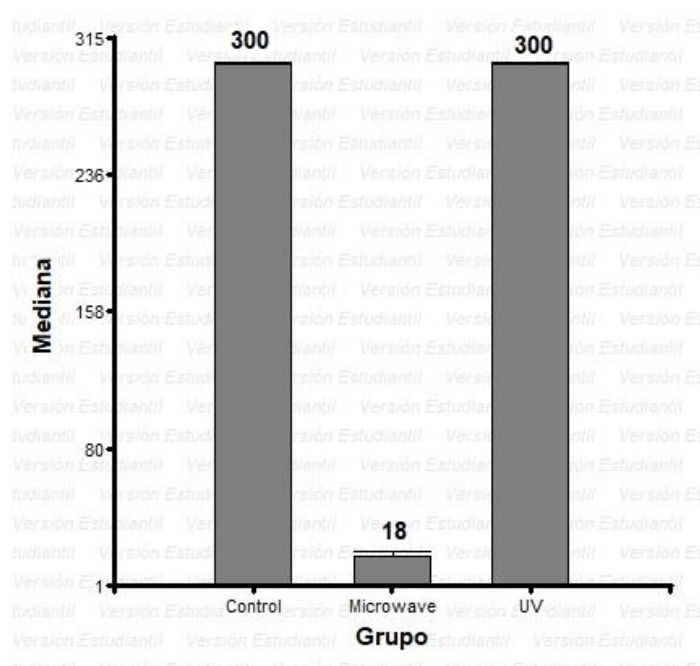


Figura 29 - Gráfico de comparação de medianas aplicando o teste de Kruskal Wallis
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

Em geral, foi demonstrado que o tratamento com MW garante uma diminuição significativa da carga microbiana. Enquanto, o tratamento com UV não garante a diminuição dos micro-organismos.

5.3.3 Caracterização dos *Scaffolds* após esterilização

Após o processo de esterilização, as amostras foram analisadas por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para determinar se o processo de esterilização afetou a composição físico-química das amostras.

A Figura 30 mostra os resultados da análise das amostras por Espectroscopia FTIR. Não são observadas alterações substanciais nos espectros das amostras tratadas em relação ao espectro da amostra não tratada (grupo controle), exceto no caso da amostra esterilizada por irradiação UV onde a intensidade dos picos é maior.

A Figura 31 mostra as imagens obtidas por microscopia eletrônica das amostras tratadas com diferentes metodologias de esterilização e a amostra controle. Os resultados mostram que não há mudanças de interesse na morfologia das amostras.

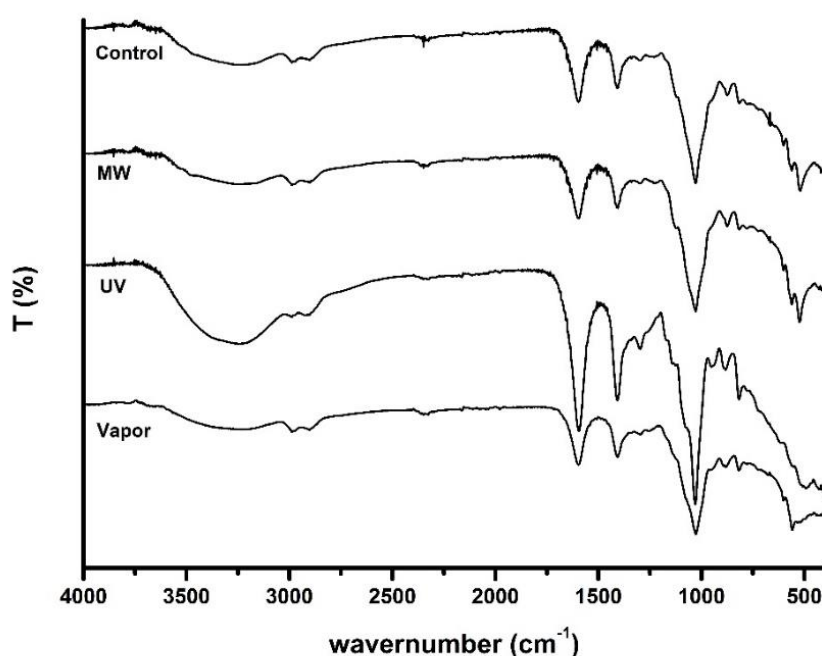


Figura 30 - Espectro de FTIR das amostras tratadas com os diferentes métodos de esterilização e amostra controle (Controle: sem esterilização; MW: micro-ondas; UV: ultravioleta)

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

Estes resultados mostram que os diferentes tratamentos de esterilização realizados não afetaram a estrutura e composição das amostras. Vale ressaltar que, no caso das amostras tratadas com MW e Vapor a cor escureceu levemente. É possível que a estrutura seja influenciada pela umidade e esses aspectos serão estudados em maior profundidade.

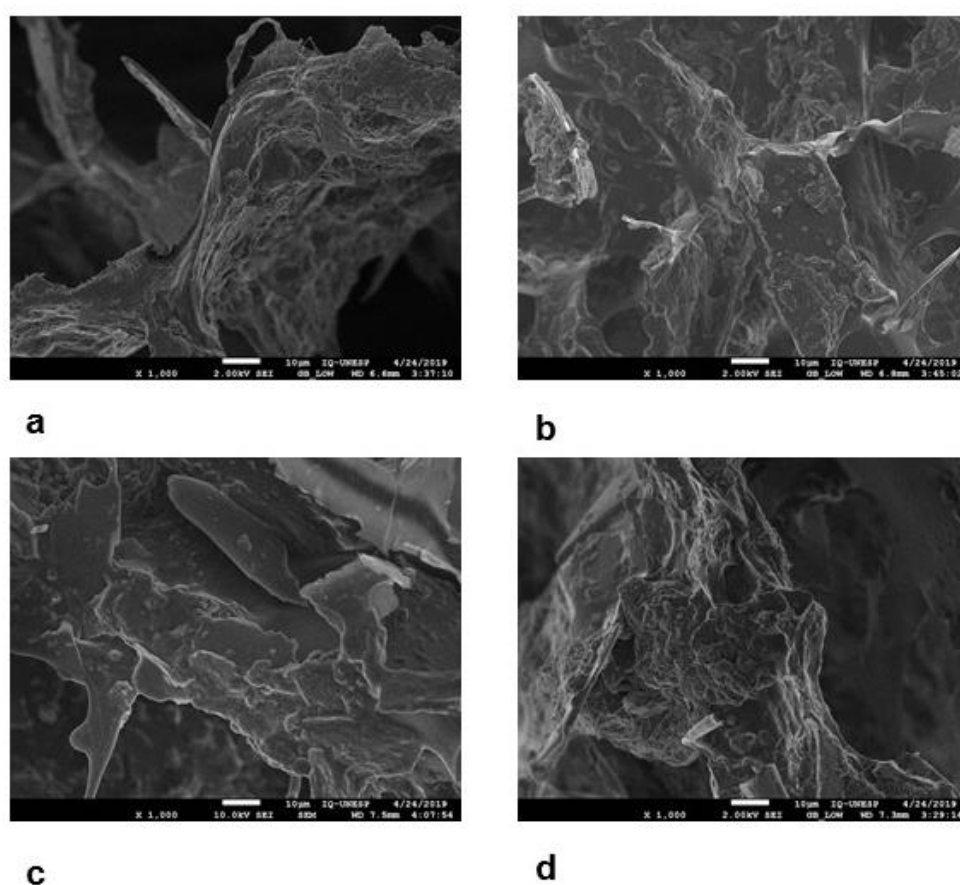


Figura 31 - Micrografia MEV das amostras tratadas (b: MW; c: UV e d: Vapor) e a amostra controle (a) em 1000X

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

5.3.4 Estudo da influência da aplicação de MW ao longo do tempo

A partir dos resultados obtidos para as amostras esterilizadas que aplicam MW, passamos a estudar a influência do tempo de tratamento na eliminação da carga microbiana. Para isso, estudamos tempos de tratamento de 5, 6 e 8 minutos nas condições de trabalho estabelecidas anteriormente. BHI foi usado como um meio de cultura. Os resultados são mostrados na Figura 32.

Os resultados do estudo mostram que um aumento no tempo de exposição à radiação no MW diminui a carga microbiana nas amostras nas condições de trabalho estabelecidas. Porém, este tratamento modifica o material, observando uma mudança de cor nas amostras e um processo de degradação das mesmas. Isso ocorre devido à presença de alginato de sódio na formulação, que é conhecido por ser um polímero que a uma temperatura acima de 100 graus Celsius começa a

passar por um processo de despolimerização com a consequente degradação do mesmo, que é mais intensa quando o material é aquecido na presença de oxigênio (AVEDAÑO *et al.*, 2013). Por tudo isso, seria aconselhável realizar um estudo mais aprofundado para avaliar os parâmetros operacionais a serem aplicados durante o processo de esterilização do MW.

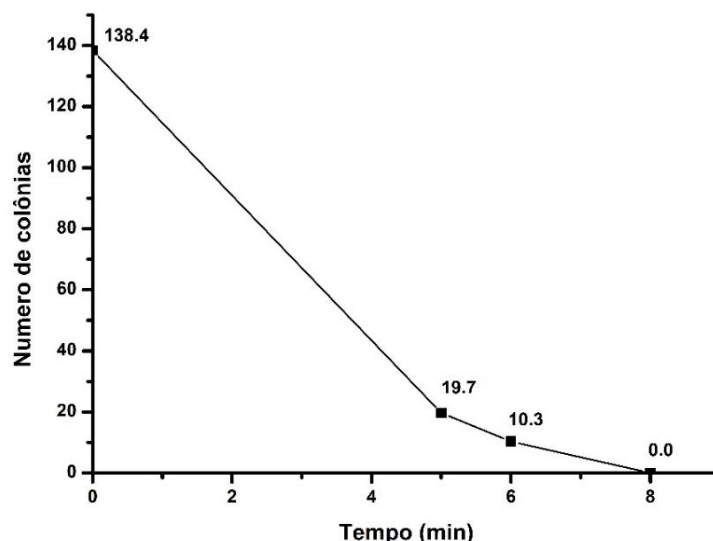


Figura 32 - Resultados do estudo de aplicação da MW
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

5.3.5 Teste mecânico

A Figura 33 mostra os resultados do teste mecânico em *Scaffolds* não esterilizados e esterilizados por Vapor. Pode-se observar que em ambos os grupos os *Scaffolds* sofrem um processo de deformação sem ruptura da peça. Esse fenômeno é causado pela presença de polímeros (alginato de sódio e celulose bacteriana) na formulação. Sabe-se que durante a aplicação de uma carga a uma velocidade constante, os polímeros presentes respondem eficientemente à tensão aplicada, absorvendo energia e dissipando-a sem fraturar a peça (JAYA; DURANCE, 2007). Os resultados mostraram que a tensão de ruptura foi $\sigma = 66.76 \pm 0.09$ MPa e $\sigma = 66.76 \pm 0.15$ MPa para as amostras não esterilizadas e as amostras esterilizadas, respectivamente. Esses resultados indicam que o processo de esterilização, nas condições avaliadas neste trabalho, não afeta as propriedades mecânicas do *Scaffolds* estudado. As imagens MEV (Figura 34) das amostras antes

e após o teste mecânico mostram que antes de aplicar a força as amostras têm uma morfologia na forma de folhas com porosidade abundante. Ao realizar o teste mecânico, a amostra é comprimida com uma diminuição no tamanho dos poros, perdendo a morfologia original. Da mesma forma não foram observadas variações apreciáveis entre a morfologia das amostras não esterilizadas e as amostras esterilizadas.

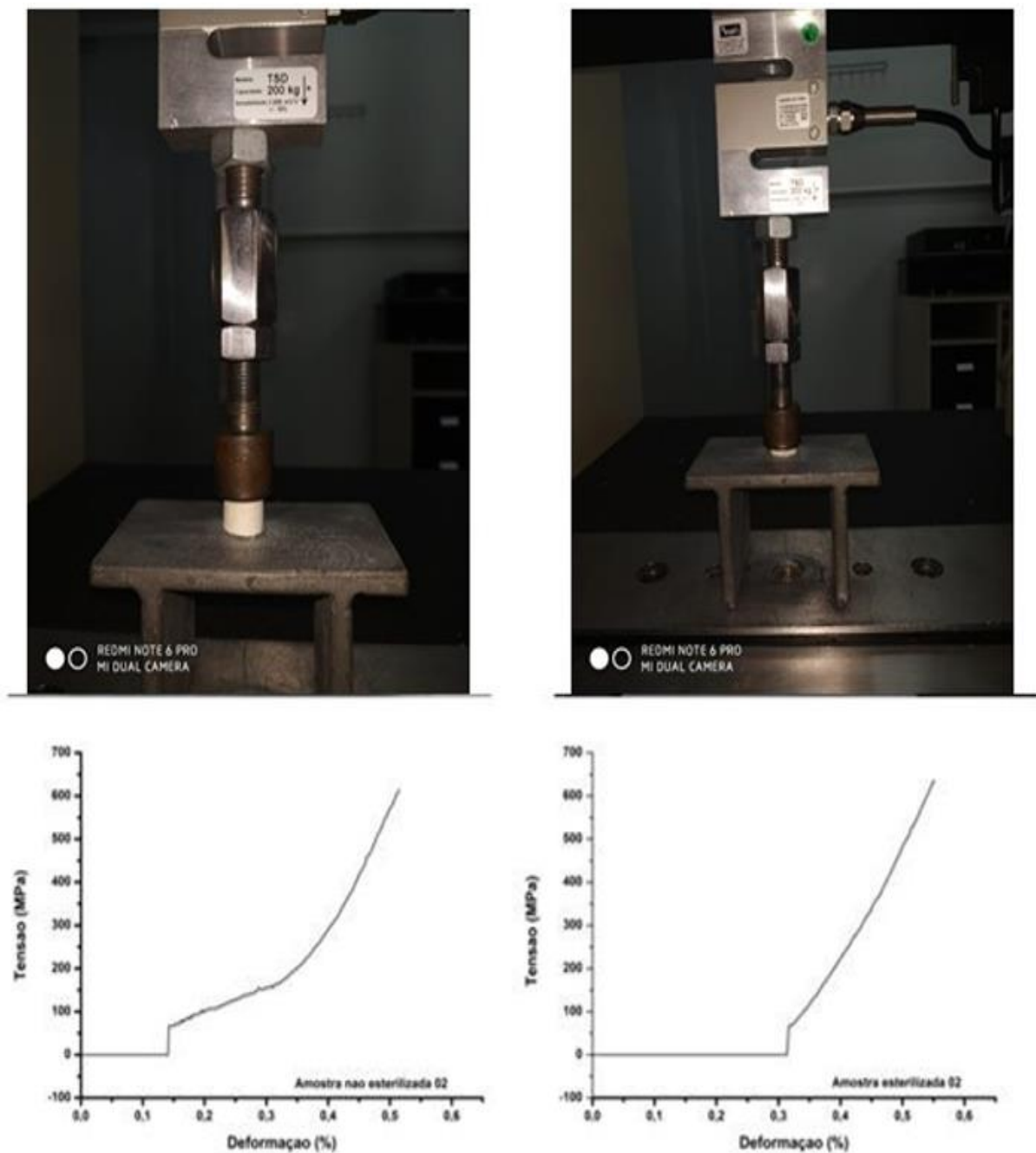


Figura 33 - Gráfico de tensão versus deformação das amostras não esterilizadas (esquerda) e esterilizadas (direita)

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

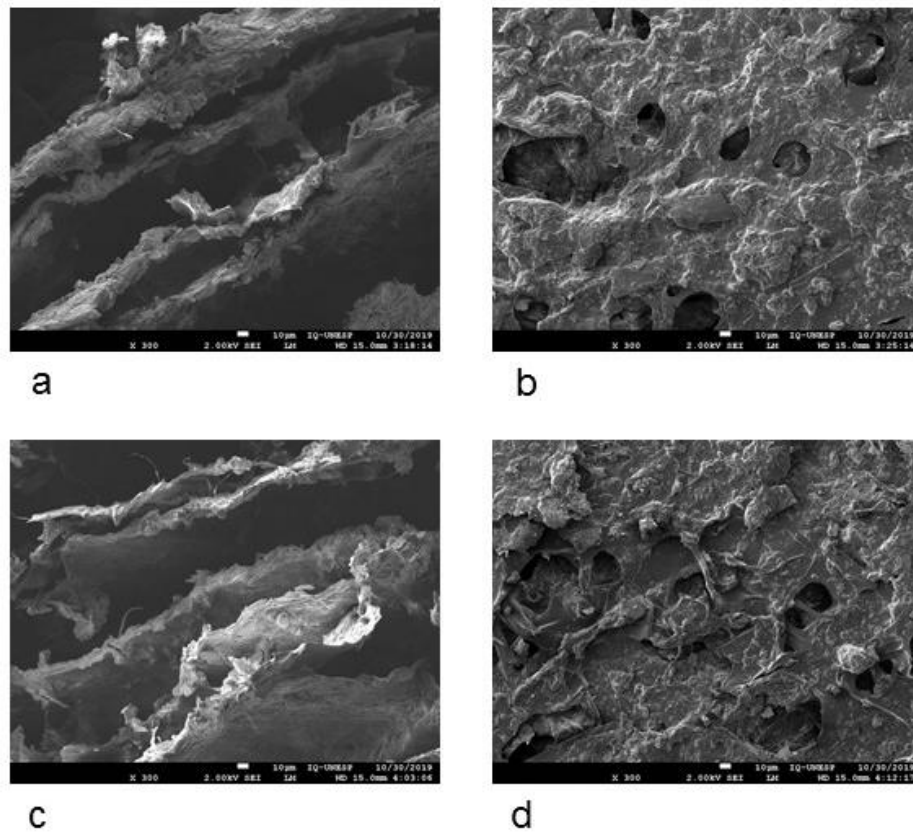


Figura 34 - Micrografia MEV das amostras antes (a e c) e depois (b e d) do teste mecânico. (a e b amostras não esterilizadas; c e d amostras esterilizadas) em 300X
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2019)

6. CONCLUSÃO

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

8. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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