

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS BIOATIVOS A BASE DE PBAT E
PLA COM ADIÇÃO DE HIDROXIAPATITA E TANINO PARA APLICAÇÃO EM
ENGENHARIA DE TECIDOS

Ewerton de Oliveira Teotônio Bezerra

São Carlos-SP
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS BIOATIVOS A BASE DE PBAT E
PLA COM ADIÇÃO DE HIDROXIAPATITA E TANINO PARA APLICAÇÃO EM
ENGENHARIA DE TECIDOS**

Ewerton de Oliveira Teotônio Bezerra

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de
Materiais como requisito parcial à obtenção
do título de DOUTOR EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientador: Dr. Luiz Antonio Pessan

Coorientadora: Dra. Samarah Vargas Harb

Agência Financiadora: CAPES – Processo: 88887.371791/2019-00

São Carlos-SP

2024

DEDICATÓRIA

Ao meu querido irmão Emerson (*in memoriam*).

VITAE

Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (2019)

Bacharel em Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina
Grande (2016)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Ewerton de Oliveira Teotônio Bezerra, realizada em 02/09/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Luiz Antonio Pessan (UFSCar)

Profa. Dra. Lidiane Cristina Costa (UFSCar)

Prof. Dr. Francys Kley Vieira Moreira (UFSCar)

Profa. Dra. Edcleide Maria Araújo (UFMG)

Prof. Dr. Fabio Roberto Passador (UNIFESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar força e saúde para superar todos os obstáculos e discernimento nos momentos mais difíceis nesta minha existência.

Aos meus pais (Mesmar e Fátima), pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos, muitas vezes deixando seus sonhos de lado, para que eu pudesse alcançar os meus.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Luiz Antonio Pessan e Dra. Samarah Vargas Harb pela amizade, orientação, apoio e conselhos ao longo deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas que fiz ao longo desses anos em São Carlos, pela amizade e troca de ideias durante os cafezinhos da tarde. Com vocês a jornada foi menos árdua.

A todos os professores e alunos do nosso grupo de pesquisa, pelo apoio e contribuição em diversos momentos deste trabalho.

Ao Dr. Cesar Beatrice pelo treinamento e ajuda nos ensaios reológicos.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) e a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela oportunidade da realização desse doutorado.

A todos os técnicos de laboratório da Polímeros e do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa)

Ao Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM), representado pela Profa. Dra. Lidiane C. Costa, pela realização do ensaio antimicrobiano.

A Profa Dra. Heloisa S.S. de Araújo em nome do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM), ao Prof. Dr. Eduardo Backes e ao Me. Leonardo Pinto pela realização dos ensaios de biocompatibilidade.

A empresa TANAC S/A pela doação do Tanfloc.

Esta pesquisa utilizou instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). A equipe da instalação (XPS) é reconhecida pela assistência durante os experimentos (proposta 20220419).

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro para realização desse trabalho com bolsa de estudos, processo nº 88887.371791/2019-00.

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

RESUMO

O aumento da expectativa de vida da população tem elevado a demanda por procedimentos ortopédicos voltados à reparação óssea, impulsionando o desenvolvimento de novos materiais para auxiliar na regeneração de tecidos. Neste contexto, este projeto teve como objetivo a obtenção de biocompósitos para a fabricação de *scaffolds* bioativos via impressão 3D, visando à regeneração óssea. Os biocompósitos foram baseados em Ecovio® (Poli(ácido láctico) - PLA/ Poli(adipato-co-tereftalato de butileno) - (PBAT)), hidroxiapatita (HA) e um derivado amino-funcionalizado de tanino (TN). Na primeira etapa, realizou-se a purificação do TN, a fim de remover impurezas provenientes do seu processo de síntese. A etapa seguinte envolveu o processamento dos biocompósitos de Ecovio nos quais tanto a HA quanto o tanino purificado (pTN) foram incorporados em uma proporção de 10% em massa cada, utilizando um misturador interno. Foram investigadas as características térmicas, reológicas, morfológicas, mecânicas, além da printabilidade, bioatividade e atividade antimicrobiana. Na última etapa, *scaffolds* de Ecovio® foram impressos em 3D, seguidos de modificações superficiais com tratamento alcalino e posterior adição de pTN e HA com o objetivo de otimizar suas propriedades biológicas. As características morfológicas, mecânicas, de molhabilidade, rugosidade superficial, bioatividade e biocompatibilidade com células foram avaliadas. Os resultados demonstraram que a purificação do TN foi bem-sucedida e sugerem que a adição de pTN e HA não degradou a matriz polimérica, conferindo bioatividade e eficácia bactericida nas composições com pTN. Em relação aos *scaffolds*, as modificações superficiais foram realizadas com sucesso, otimizando suas propriedades biológicas, como bioatividade e biocompatibilidade, favorecendo a proliferação celular. As propriedades biológicas e mecânicas dos *scaffolds* mostraram que os materiais desenvolvidos são compatíveis com as exigências para aplicação como enxerto ósseo.

Palavras-chave: Ecovio; Taninos; Hidroxiapatita; Regeneração óssea; *Scaffolds*; Manufatura aditiva.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BIOACTIVE COMPOSITES BASED ON PBAT AND PLA WITH THE ADDITION OF HYDROXYAPATITE AND TANNIN FOR APPLICATION IN TISSUE ENGINEERING

The increase in the population's life expectancy has increased the demand for orthopedic procedures aimed at bone repairing, driving the development of new materials to assist in tissue regeneration. In this context, this project aimed to obtain biocomposites for manufacturing bioactive *scaffolds* via 3D printing, aiming at bone regeneration. The biocomposites were based on Ecovio® (Poly(lactic acid) - PLA/ Poly(adipate butylene co-terephthalate) - (PBAT)), hydroxyapatite (HA) and an amino-functionalized derivative of tannin (TN). In the first stage, TN purification was performed to remove impurities from its synthesis process. The next step involved the processing of the Ecovio biocomposites in which both HA and purified tannin (pTN) were incorporated in a proportion of 10wt% each, using an internal mixer. Thermal, rheological, morphological, and mechanical characteristics, as well as printability, bioactivity, and antimicrobial activity, were investigated. In the last stage, Ecovio® *scaffolds* were 3D printed, followed by surface modifications with alkaline treatment and subsequent addition of pTN and HA in order to optimize their biological properties. The morphological, mechanical, wettability, surface roughness, bioactivity, and cell biocompatibility were evaluated. The results showed that the purification of TN was successful and suggest that the addition of pTN and HA did not degrade the polymer matrix, conferring bioactivity and bactericidal efficacy in the compositions with pTN. The superficial modifications were successfully performed regarding the *scaffolds*, optimizing their biological properties, such as bioactivity and biocompatibility, favoring cell proliferation. The biological and mechanical properties of the *scaffolds* showed that the materials developed are compatible with the requirements for application as bone grafts.

Keywords: Ecovio; Tannins; Hydroxyapatite; Bone regeneration; *Scaffolds*; Additive manufacturing.

PUBLICAÇÕES

Harb, S. V.; Kolanthai, E.; Pinto, L. A.; Beatrice, C. A. G.; Bezerra, E. O. T. Backes, E. H.; Costa, L. C.; Seal, S.; Pessan, L. A. Additive manufacturing of bioactive and biodegradable poly (lactic acid)-tricalcium phosphate scaffolds modified with zinc oxide for guided bone tissue repair. *Biomedical Materials*, 19(5), 055018, 2024.

Bezerra, E. O. T.; Beatrice, C. A. G.; Backes, E. H.; Costa, L. C.; Harb, S. V.; Pessan, L. A. Biocompósitos de Ecovio/hidroxiapatita/tanino para aplicações biomédicas. 24º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. Anais...Águas de Lindóia, SP - 06 a 10 de novembro de 2022.

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	i
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
PUBLICAÇÕES.....	ix
SUMÁRIO.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Engenharia de tecido ósseo	7
3.2 Composição de <i>scaffolds</i> para regeneração óssea	9
3.3 Biomateriais com propriedades bactericidas	15
3.4 <i>Scaffolds</i> de PLA/PBAT com HA e/ou taninos.....	19
3.5 Manufatura aditiva	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Materiais.....	27
4.2 Métodos	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1 Caracterização do Tanfloc.....	43
5.2 Caracterização dos biocompósitos produzidos via misturador interno. .	46
5.3 Caracterização dos <i>scaffolds</i>	66
6 CONCLUSÕES	81
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	83
8 REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE A.....	103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Propriedades do Ecovio® contendo 45% de PLA e 55% de PBAT em massa.....	14
Tabela 4.1 - Composições a serem estudadas de Ecovio®, pTN e HA.	30
Tabela 4.2 - Concentração de íons do SBF e do plasma sanguíneo humano.	34
Tabela 4.3 - Nomenclatura e descrição das diferentes formulações de <i>scaffolds</i> com base em Ecovio, tratamentos de NaOH, Tanfloc purificado (pTN) e hidroxiapatita (HA).....	39
Tabela 5.1 - Resultados da análise de EDS (em % de massa) do Tanfloc antes e após diálise.	43
Tabela 5.2 - Dados obtidos das curvas DSC durante o segundo aquecimento.	52
Tabela 5.3 - Dados obtidos das curvas de TGA e DTG.	54
Tabela 5.4 - Propriedades reológicas. A viscosidade inicial (η_0 a $0,02 \text{ s}^{-1}$) e o índice de lei de potência (n) foram extraídos das curvas em estado estacionário, e a frequência quando $G' = G''$ (ω_c) foi obtida das medidas em estado oscilatório.	57
Tabela 5.5 - Resultados obtidos com os ensaios baseados na norma JIZ Z 2801:2010 a partir do contato das amostras contendo pTN com as diferentes cepas bacterianas.	60
Tabela 5.6 - Dimensões dos parâmetros dimensionais dos <i>scaffolds</i> de Ecovio e biocompósito de Ecovio/HA.....	66
Tabela A.1 - Dados usados no cálculo de porosidade dos <i>scaffolds</i>	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estrutura e composição do osso. Adaptado de [65].	8
Figura 3.2 - Estrutura química do PLA. Adaptado de [75].	9
Figura 3.3 - Estrutura química do PBAT. Adaptado de [78].	10
Figura 3.4 - Características do PBAT (Ecoflex®), do PLA e do PBAT/PLA (Ecovio®). Adaptado de [98].	13
Figura 3.5 - (a) Estrutura química de taninos hidrolisáveis. (b) Estrutura química de taninos condensados. Fonte: adaptado de [117].	17
Figura 3.6 - Estrutura química do derivado catiônico de tanino condensados (TN). Adaptado de [120].	18
Figura 3.7 - Esquema dos tipos de técnicas baseadas em extrusão: (a) fabricação de filamentos fundidos; (b) extrusão com rosca e (c) extrusão de seringa. Adaptado de [140].	25
Figura 4.1 - Fluxograma das etapas do projeto	28
Figura 4.2 - Amostras de 8 mm de diâmetro e 3 mm de altura utilizadas no ensaio de compressão.	33
Figura 4.3 - Esquema ilustrativo da metodologia recomendada pela norma JIS Z 2801:2010 para avaliação da atividade antibacteriana. Adaptado de [151].	35
Figura 4.4 - Representação do <i>scaffold</i> projetado no software PrusaSlicer.	36
Figura 4.5 - Material utilizado para impressão 3D dos <i>scaffolds</i> (composições bem-sucedidas na análise de printabilidade).	37
Figura 4.6 - Representação esquemática da modificação superficial dos <i>scaffolds</i> . Adaptado de [154].	39
Figura 5.1 - Imagens de MEV do tanfloc (TN) antes e após 4h (pTN4) e 12h (pTN12) de diálise.	43
Figura 5.2 - (a) Espectros de FTIR do TN antes e após diálise por 4h (pTN4) e 12h (pTN12).	44
Figura 5.3 - (a) Espectro XPS (survey) do TN antes e após purificação. (b) Espectro de alta resolução dos envelopes N1s obtidos na superfície do TN antes e após purificação.	45
Figura 5.4 - Variação do torque em função do tempo de mistura para o Ecovio e as amostras contendo hidroxiapatita (HA) e tanfloc purificado (pTN).	47

Figura 5.5 - Imagens de MEV da secção transversal das amostras processadas no misturador interno (a) Ecovio, (b) Ecovio/pTN, (c) Ecovio/HA e (d) Ecovio/pTN/HA. As imagens da secção transversal no MEV estão sobrepostas com o mapeamento de EDS para cloro (verde), cálcio (vermelho) e fósforo (amarelo).	49
Figura 5.6 - Imagem das amostras prensadas.	50
Figura 5.7 - Curvas de DSC no segundo aquecimento: (a) do Ecovio e dos biocompósitos contendo hidroxiapatita e pTN após processamento no misturador interno; (b) do Ecovio antes do processamento.	51
Figura 5.8 - (a) Curvas de TGA e (b) derivadas das curvas de TGA do Ecovio e biocompósitos contendo HA e pTN.	54
Figura 5.9 - (a) Medidas de reologia em regime permanente e (b-c) oscilatório do Ecovio e das amostras contendo hidroxiapatita e Tanfloc purificado.	56
Figura 5.10 - (a) Curvas tensão versus deformação e (b) módulo elástico para o Ecovio e as composições contendo hidroxiapatita e Tanfloc purificado obtidas no ensaio de compressão uniaxial. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão e comparados ao Ecovio (***: $p < 0,001$).	58
Figura 5.11 - Superfície do (a) Ecovio e das composições (b) Ecovio/pTN, (c) Ecovio/HA e Ecovio/pTN/HA após 21 dias de imersão em SBF.	59
Figura 5.12 - Atividade bactericida (redução logarítmica) de duas diferentes cepas bacterianas após 48 h em contato com as amostras contendo pTN.	61
Figura 5.13 - (a): Imagens de <i>scaffolds</i> impressos em 3D de 10 camadas com geometria de 0-90° das formulações estudadas e em (b) valores do diâmetro e altura destes <i>scaffolds</i> . O modelo projetado foi de 8 mm de diâmetro e 3 mm de altura.	63
Figura 5.14 - Micrografias da vista superior (em destaque) e da secção transversal (quadro menores) dos <i>scaffolds</i> obtidas por meio de MEV.	65
Figura 5.15 - Micrografias dos <i>scaffolds</i> (vista superior) obtidas via MEV antes e após o tratamento superficial com NaOH, pTN e HA.	68
Figura 5.16 - (a) Resultados do módulo de elasticidade e (b) curvas tensão versus deformação dos <i>scaffolds</i> obtidos nos ensaio de compressão. A análise estatística foi expressa em relação ao Ecovio (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).	70
Figura 5.17 - Medidas dos ângulos de contato das amostras tratadas em comparação com a amostra de Ecovio não tratada e do biocompósito Eco-HA. A	

análise estatística foi expressa em relação ao Ecovio (N = 5; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Onde: (Δ) é o valor de desvio padrão menor que 0,5 e onde o arredondamento tende a 0.	71
Figura 5.18 - Rugosidade da superfície dos scaffolds medida por AFM. A análise estatística foi expressa em relação ao Ecovio (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).	73
Figura 5.19 - (a) Imagens 2D e (b) 3D dos scaffolds obtidas via AFM.	75
Figura 5.20 - Superfície dos scaffolds após 21 dias de imersão em SBF.	76
Figura 5.21 - Resultado do ensaio de resazurina após 1 e 7 dias de cultura de osteoblasto (MC3T3-E1) nos scaffolds. A análise estatística foi expressa em relação ao Ecovio sem tratamento (* $p < 0,05$).	79
Figura 5.22 - Imagens de MEV dos osteoblastos aderidos à superfície dos scaffolds após 1 e 7 dias de cultura celular.	80

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ΔH_{cc} : entalpia de cristalização a frio

ΔH_m : entalpia de fusão

ADSC: células tronco derivadas do tecido adiposo

AFM: microscopia de força atômica

BMSCs: células tronco mesenquimais da medula óssea

CA: ácido cítrico

CAD: *computer-aided design*

cHA: hidroxiapatita-citrato

CT: tomografia computadorizada

DSC: calorimetria exploratória diferencial

EDS: espectroscopia por dispersão de energia de raios-X

FFF: *fused filament fabrication*

FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

HA: hidroxiapatita

hMSC: células-tronco mesenquimais humanas

MA: manufatura aditiva

MC3T3-E1: células pré-osteoblásticas de rato

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MG-83: células osteoblásticas

MRI: ressonância magnética

NaOH: hidróxido de sódio

n-HA: nano-hidroxiapatita

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

PBAT: poli(adipato-co-tereftalato de butileno)

PBS: solução salina tamponada

PCA: ágar de contagem de placas

PCL: poli(ϵ -caprolactona)

PDA: polidopamina

PEI: polietilenimina

PGA: poli(ácido glicólico)

PLA: poli(ácido láctico)

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

pTN: tanino purificado

PVA: poli(álcool vinílico)

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SBF: fluido corporal simulado

Tcc: temperatura de cristalização a frio

TCP: β -fosfato tricálcico

Tg: temperatura de transição vítrea

TGA: análise termogravimétrica

TIPS: thermally induced phase separation

Tm: temperatura de fusão

Tmax: temperatura de decomposição máxima

TN: Tanfloc ou derivado de tanino amino-funcionalizado

Tonset: temperatura de início

UFC: unidade formadora de colônia

Xc: grau de cristalinidade

XPS: espectroscopia de fotoelétrons de raios-X

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a expectativa de vida do brasileiro que em 2018 era de 76,2 anos alcançará a idade de 81 anos em 2060, e assim 26,7% da população terá 60 anos ou mais [1]. Com o aumento da expectativa de vida da população, há um crescente aumento da necessidade de procedimentos ortopédicos para reparações ósseas. As doenças associadas ao osso são responsáveis por cerca de metade das doenças crônicas em pessoas acima de 50 anos [2]. O tecido ósseo é conhecido por suas habilidades de cicatrização e/ou autorregeneração. No entanto, defeitos ósseos em grande escala não podem ser completamente curados pelo organismo [3]. Grandes defeitos ou lesões ósseas, causados por trauma (acidentes domésticos e de trânsito), osteoporose, ressecção de tumor ósseo, dentre outros, são sérios problemas em ortopedia e trazem grande prejuízo econômico à saúde pública e perda da qualidade de vida do paciente [2].

Existem várias técnicas para tratar lesões e defeitos ósseos em pacientes, sendo as principais a utilização de ligas metálicas (aço inoxidável e ligas de titânio) e enxertos ósseos [4]. Os tratamentos tradicionais têm várias desvantagens e limitações, como rejeição imunológica, múltiplas intervenções cirúrgicas, susceptibilidade à contaminação por microrganismos, degradação induzida por corrosão de implantes metálicos, perda óssea relacionada à diferença de propriedade mecânica entre metal e osso (*stress shielding*), e falta de osseointegração; todos resultando em uma longa reabilitação ou até mesmo rejeição do implante [5–7].

A engenharia de tecidos tem atraído muita atenção no campo da regeneração de tecidos ósseos porque evita as desvantagens dos tratamentos convencionais. Ela se concentra no uso de biomateriais, células e fatores de crescimento, sozinhos ou em combinação, para facilitar a reparação de defeitos do tecido [8]. Um dos componentes vitais na abordagem de engenharia de tecidos são os *scaffolds* (arcabouços), estruturas que atuam como suportes temporários para regeneração óssea e estimulam o crescimento ósseo vascularizado [9]. Seu propósito é mimetizar a estrutura e função da matriz extracelular (MEC) óssea natural, que possa fornecer um ambiente adequado para promover a adesão, proliferação e diferenciação celular e ter propriedades

físicas apropriadas para o reparo ósseo. *Scaffolds* para regeneração óssea devem ser biodegradáveis para permitir a regeneração completa dos tecidos, e os subprodutos dessa degradação também devem ser não-tóxicos e capazes de serem eliminados do corpo sem interferência com outros órgãos; devem ser biocompatíveis para evitar uma resposta imunológica; devem ter uma estrutura porosa, com poros interconectados, para garantir a penetração celular, a difusão adequada de nutrientes para as células, e permitir a difusão de produtos residuais para fora do *scaffold* [2,10–12].

Scaffolds usados na engenharia de tecidos ósseos podem ser produzidos por diversas técnicas, algumas das mais amplamente usadas são a evaporação do solvente, separação de fases induzidas termicamente, liofilização e eletrofiação [13]. No entanto, o tamanho, a forma e a interconectividade dos poros são difíceis de serem totalmente controlados nessas abordagens [4]. Com a utilização de técnicas de manufatura aditiva, como a impressão 3D baseada em extrusão, é possível a fabricação de *scaffolds* a partir de materiais biodegradáveis e bioativos com morfologia controlada projetados sob medida para aplicação em regeneração óssea.

Os *scaffolds* utilizados para a regeneração óssea podem ser produzidos a partir de diferentes materiais incluindo metais, cerâmicas, polímeros e compósitos. *Scaffolds* metálicos apresentam algumas desvantagens como propriedades mecânicas diferentes do osso e liberação de íons tóxicos, enquanto materiais inorgânicos têm como limitação a fragilidade intrínseca, e *scaffolds* poliméricos apresentam baixa resistência mecânica [14]. Em comparação com materiais inorgânicos e metálicos, materiais poliméricos têm uma taxa de degradação mais controlável, melhor flexibilidade e melhor capacidade de moldagem, o que permite a produção de formas mais complexas [8,10].

Diversos tipos de matrizes poliméricas podem ser usadas para produção de *scaffolds* como a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) [15], poli(ácido láctico) (PLA) [16], poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) [17], quitosana [18] e colágeno [19]. O PLA é um dos mais promissores, sendo um poliéster semicristalino derivado do ácido láctico, produzido a partir de fontes renováveis, com excelentes propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioabsorção [20]. Entretanto o PLA é rígido, frágil, pouco hidrofílico, apresenta baixa deformação

de ruptura, baixa estabilidade térmica e longo período para degradação *in vivo* [21–23]. Uma das alternativas para otimizar as propriedades do PLA é a mistura com outros polímeros biodegradáveis. Um dos polímeros que vem sendo estudado para a formação de blends com o PLA é o poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT). O PBAT é um poliéster biodegradável altamente flexível com baixa cristalinidade, fácil processamento, alto alongamento na ruptura e tem se mostrado um bom material para aumentar a resistência mecânica e térmica do PLA [21,23–25]. Um exemplo de uma blenda com PBAT e PLA comercialmente disponível é o ECOVIO®, que é produzido pela BASF com proporção em massa de 55/45 PBAT/PLA. Compósitos baseados em PLA/PBAT em geral atendem aos requisitos básicos de materiais de engenharia de tecido ósseo em termos de resistência mecânica e biocompatibilidade, e têm as vantagens de baixa densidade e alta tenacidade [26].

Uma alternativa que vem sendo utilizada para melhorar as propriedades de polímeros aplicados em engenharia de tecidos é a adição de materiais cerâmicos. A incorporação de cargas cerâmicas em matrizes poliméricas pode levar a obtenção de materiais compósitos com maior resistência mecânica, e ainda fornecer propriedade bioativa. As biocerâmicas de fosfato de cálcio vêm sendo amplamente usadas em reparos ósseos por serem semelhantes à fase mineral do tecido ósseo natural. Dentre as biocerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita (HA) é uma das mais usadas, apresentando características como biocompatibilidade, osteocondutividade e osteoindutividade devido à semelhança com a composição inorgânica do osso [27]. Os compósitos de polímeros/cerâmicas são materiais bastante promissores para a engenharia de tecidos, pois aliam a flexibilidade, conformabilidade e biodegradabilidade dos polímeros com a bioatividade e melhores propriedades mecânicas das biocargas [28–30].

Embora muitos trabalhos estejam sendo realizados para desenvolver novos materiais para regeneração de tecidos, a pesquisa e o conhecimento sobre os fatores subjacentes à contaminação microbiana relacionada ao implante do *scaffold* que pode levar a severas infecções são menos abrangentes [31]. A contaminação do implante pode levar à necessidade de substituição do material implantado e, em casos mais severos, a morte do paciente [31,32]. Cerca de 2 a 5% dos implantes ortopédicos são agravados por infecção e isso

pode aumentar até 30% no caso de fraturas expostas [33]. Este cenário tem um prognóstico ainda mais assustador devido à crescente resistência das bactérias aos antibióticos usados atualmente. Portanto, é essencial que um *scaffold* para uso regenerativo ósseo apresente propriedades antimicrobianas para prevenir tais infecções. Várias estratégias vêm sendo adotadas com esta finalidade, como por exemplo a incorporação de metais (Ag [34] e Au [35]), nanopartículas de óxidos metálicos (ZnO [36], CeO₂[37], Fe₃O₄ [38]), macromoléculas naturais (quitosana [39], lignina [40], tanino [41]), peptídeos [42] e antibióticos [43] dentro de *scaffolds*. Apesar do sucesso desses agentes antimicrobianos, ainda existem preocupações relacionadas com a toxicidade de metais e à resistência bacteriana para os antibióticos conhecidos [44].

Os polifenóis naturais, como a lignina e tanino, são produtos amplamente encontrados na natureza, em frutas, nozes, sementes, caules e flores, e exibem propriedade antimicrobiana com amplo espectro [45–54]. Esses materiais podem servir como uma abordagem alternativa para ao uso de antibióticos e metais. O derivado catiônico amino-funcionalizado de tanino, comercialmente conhecido como Tanfloc (TN) exibe propriedades como biodegradabilidade, citocompatibilidade e atividade bactericida [55–58] e, portanto é muito promissor para engenharia de tecidos.

Dentro deste cenário, neste presente trabalho foi associado pela primeira vez a blenda Ecovio® com o TN e a hidroxiapatita para produção de *scaffolds* e aplicação na regeneração de tecidos ósseos. Até o presente momento, não há relatos na literatura de trabalhos abordando a produção de *scaffolds* Ecovio® com TN e HA via impressão 3D, ou qualquer outra técnica tradicional de manufatura.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de biocompósitos bioativos e antimicrobianos à base de Ecovio® (blenda PLA/PBAT) com adição de hidroxiapatita (HA) e um derivado amino-funcionalizado de tanino (TN), visando a obtenção de *scaffolds* utilizando impressão 3D como técnica de fabricação e aplicação na engenharia de tecido ósseo.

Os objetivos secundários compreendem a incorporação de HA e TN tanto na forma de compósito, através da mistura com o Ecovio durante o processamento no estado fundido, como na forma de modificação superficial utilizando um tratamento básico com NaOH para ativar a superfície.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Engenharia de tecido ósseo

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar de pesquisa que emprega princípios de química, biologia e engenharia para estudar a interação de tecidos vivos com biomateriais. Os biomateriais devem auxiliar na regeneração de órgãos ou tecidos lesionados [59]. Uma das abordagens mais promissoras nesse sentido é o emprego de biomateriais em forma de *scaffolds* (arcabouços) que atuam como suportes temporários para promoverem a adesão e proliferação de células [60].

Scaffolds utilizados para regeneração de tecido ósseo precisam ser porosos para permitir o crescimento de células e transporte de nutrientes, oxigênio, fatores de crescimento e produtos residuais, e para arquiteturas maiores, os poros também devem facilitar a vascularização para evitar a necrose no núcleo [10]. *Scaffolds* para regeneração óssea comumente apresentam poros entre 100 e 800 μm , permitindo uma adequada troca de nutrientes e facilitando o crescimento celular, o que contribui para a eficácia na formação do tecido ósseo [61]. Além da porosidade, outras propriedades importantes para o sucesso dos *scaffolds* são a interconectividade entre poros (60-80%), resistência mecânica, para suportar a carga imposta pelo corpo, a biodegradabilidade e a taxa de degradação [62]. Também deve ser biocompatível, para permitir a atividade celular normal sem provocar qualquer efeito tóxico local ou sistêmico [63].

O osso é composto basicamente de hidroxiapatita (HA) e colágeno, que se combinam formando duas estruturas: osso esponjoso (ou trabecular) e cortical (Figura 3.1). O osso trabecular corresponde a parte interna do osso e é esponjoso por natureza, com porosidade de 50–90 vol%. O osso cortical é a camada externa densa do osso com menos de 10 vol% de porosidade. Ambos os tipos de osso sofrem remodelação dinâmica, maturação, diferenciação e reabsorção que são controladas por meio de interações entre os osteócitos, osteoblastos e células osteoclásticas. Os osteoblastos são os principais responsáveis pela formação de osso novo, enquanto os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção de osso maduro. Esse processo dinâmico

envolvendo osteoclastos e osteoblastos é conhecido como remodelação óssea e é responsável pela manutenção de um osso saudável [4,64,65].

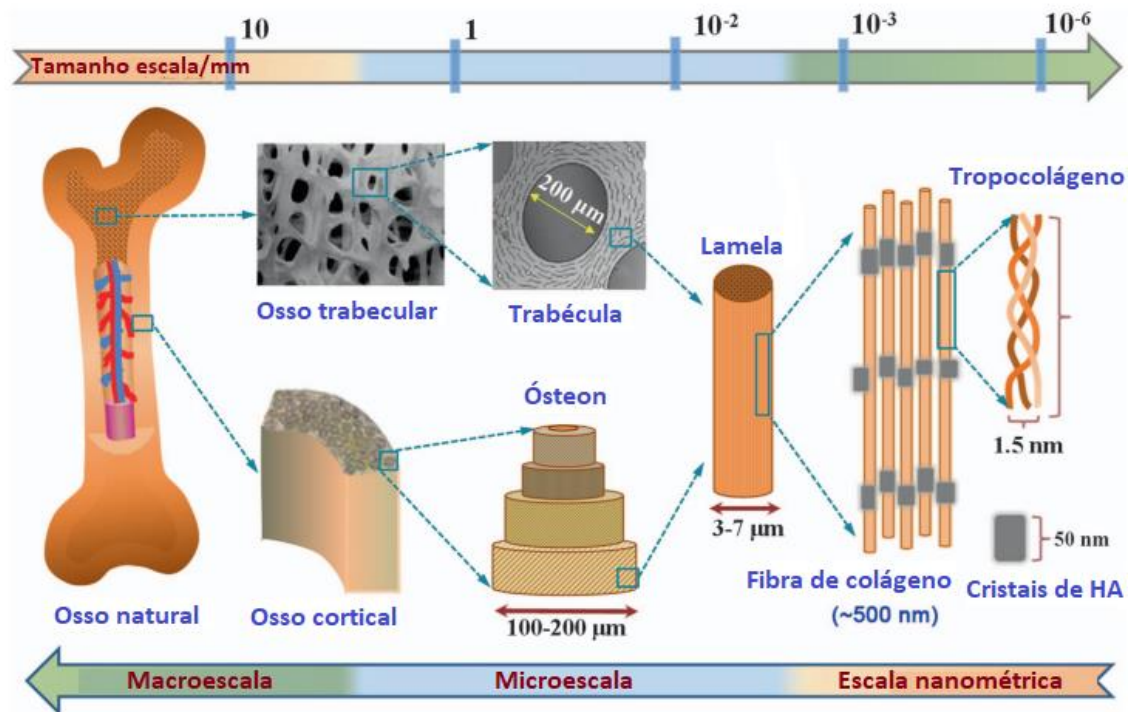


Figura 3.1 - Estrutura e composição do osso. Adaptado de [65].

Fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), apresentam boa biocompatibilidade, osteocondutividade (capacidade de proliferar células ósseas) e osteoindutividade (capacidade de induzir a diferenciação de células-tronco em células osteogênicas, levando à formação de tecido ósseo) devido à semelhança com a composição inorgânica do osso [27]. A HA vem sendo combinada com diferentes matrizes poliméricas naturais e sintéticas biodegradáveis, como poli(ϵ -caprolactona) (PCL) [66], poli(ácido láctico) (PLA) [67], poli(ácido glicólico) (PGA) [68], poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) [69], poli(adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT) [25], quitosana [70] e colágeno [69]. Polímeros sintéticos possuem algumas vantagens, como: (i) são produzidos sob condições controladas e, portanto, exibem propriedades reprodutíveis e controle de impurezas, (ii) exibem uma taxa de degradação controlada, (iii) possibilidade de projetar ou ajustar as propriedades mecânicas e de fabricar formas complexas, (iv) pode ser produzido a custos reduzidos, em grandes quantidades e com longo tempo de validade

[71]. No tópico a seguir, serão abordados em detalhes os materiais utilizados nesse estudo.

3.2 Composição de *scaffolds* para regeneração óssea

3.2.1 Poli(ácido láctico) – PLA

O PLA é um poliéster alifático sintético, termoplástico e biodegradável. É sintetizado a partir do ácido láctico obtido de fontes renováveis como amido de milho e cana de açúcar [72,73]. O PLA dispõe de características interessantes, tais como biocompatibilidade e absorção biológica (gera subprodutos atóxicos, presentes no metabolismo de animais e microrganismos), além de fácil processabilidade no estado fundido e baixo impacto ambiental [74]. A Figura 3.2 representa a estrutura química do PLA.

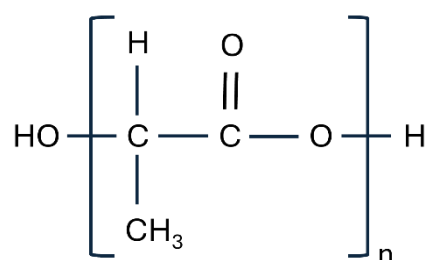


Figura 3.2 - Estrutura química do PLA. Adaptado de [75].

O PLA tem um vasto campo de aplicações, abrangendo desde o setor de embalagens até a área biomédica. Suas propriedades notáveis, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, o tornam especialmente adequado para fins médicos como suturas, implante oral, liberação controlada de medicamentos e *scaffolds* para engenharia de tecidos [75,76]. Apesar de todas suas vantagens, algumas propriedades do PLA como fragilidade, rigidez, baixa deformação de ruptura e baixa estabilidade térmica limitam sua aplicação em larga escala [21,24]. Diversos estudos relataram que a mistura de PLA com outros polímeros é uma das melhores soluções para melhorar suas propriedades, particularmente com polímeros mais flexíveis, como o poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) [21,24,77].

3.2.2 Poli(butileno adipato co-tereftalato) – PBAT

O PBAT é um copolímero biodegradável da classe dos poliésteres alifáticos-aromáticos, proveniente de fontes fósseis, comercializado pela BASF com o nome de Ecoflex® [78]. Sua biodegradabilidade se deve ao grupo adipato de butileno (segmento BA) e sua estabilidade mecânica ao grupo tereftalato de butileno (segmento BT), resultando em fortes propriedades de alongamento (700%) [79], como representado na Figura 3.3. Foi relatado que o copoliéster alifático-aromático com unidades aromáticas na faixa de 35–55 mol% oferece um balanço ideal entre biodegradabilidade e propriedades físicas [80].

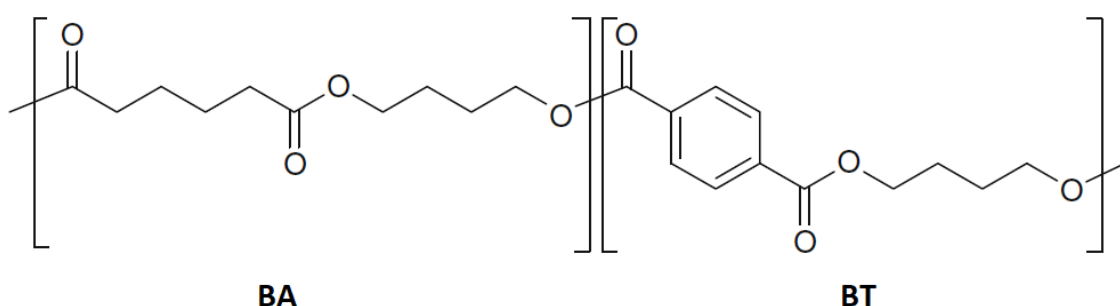


Figura 3.3 - Estrutura química do PBAT. Adaptado de [78].

O PBAT apresenta fácil processabilidade e propriedades mecânicas similares a do polietileno de baixa densidade [81]. Além disso, é biocompatível, flexível e possui maior alongamento na ruptura que muitos poliésteres biodegradáveis [82,83]. Em relação ao uso de PBAT para fins biomédicos, este polímero tem sido muito pouco estudado, apenas alguns artigos relatam a possibilidade de seu uso para algumas aplicações clínicas [84,85]. Apesar de terem poucos relatos acerca de suas propriedades *in vivo*, diversos estudos demonstraram que o PBAT não apresenta citotoxicidade [82,86,87].

3.2.3 Blendas poliméricas

As blendas poliméricas têm se destacado como uma abordagem prática que oferece uma alternativa para a obtenção de materiais poliméricos com propriedades que, em geral, não podem ser encontradas em um material individual, expandindo as possibilidades para diversas aplicações, desde o setor de embalagens a setores mais avançados como a aeronáutica e biomédico [88].

As blendas poliméricas são misturas físicas de dois ou mais tipos de polímeros, que, quando combinados, exibem características únicas, decorrentes da interação entre os componentes individuais. Essas interações podem ocorrer em nível molecular, afetando a morfologia, a cristalinidade e as propriedades mecânicas, térmicas e de processamento das blendas. Para ser considerada uma blenda, os compostos devem conter uma concentração superior a 2% em massa do segundo componente minoritário [89]. Uma das vantagens das blendas poliméricas é a habilidade de combinar características específicas de cada componente, resultando em materiais com propriedades sob medida para aplicações específicas. Além disso, o desenvolvimento de uma blenda é economicamente mais viável do que a síntese de um novo polímero [90].

As blendas poliméricas podem ser classificadas em três categorias principais com base na miscibilidade de seus componentes: miscíveis, parcialmente miscíveis e imiscíveis. Nas blendas miscíveis, os polímeros se dissolvem uns nos outros em escala molecular, resultando em uma única fase homogênea. Por outro lado, nas blendas parcialmente miscíveis, os polímeros formam múltiplas fases, mas ainda exibem um grau de interação entre as fases ou miscibilidade em nível molecular em uma faixa de composição específica. Já nas blendas imiscíveis, os polímeros não se misturam em nível molecular, formando fases distintas [91,92].

A determinação da miscibilidade das blendas poliméricas pode ser realizada por meio de diversas técnicas de caracterização. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) pode ser utilizada para observar a morfologia da blenda, ilustrando a presença de fases distintas ou uma única fase homogênea. Adicionalmente, técnicas como a calorimetria exploratória diferencial (DSC) podem fornecer informações sobre a temperatura de transição vítrea (T_g), indicando miscibilidade ou imiscibilidade. Por exemplo, quando as curvas de DSC exibem duas T_g distintas e idênticas às dos componentes puros, isso sugere que se trata de uma blenda imiscível, com fases separadas. Entretanto, em sistemas restritos ou com baixa mobilidade de fases, isso pode não ser claramente observado. Por outro lado, quando se observa uma única T_g com valor intermediário às dos componentes puros, diz-se que a blenda é miscível, apresentando uma única fase homogênea [93,94]. Essas técnicas de caracterização são essenciais para compreender as propriedades e

comportamento das blendas poliméricas, orientando o desenvolvimento de materiais com aplicações específicas na engenharia de tecidos ósseos e outras áreas da ciência dos materiais.

A morfologia das blendas poliméricas desempenha um papel crucial na determinação de suas propriedades finais, referindo-se à organização espacial dos componentes poliméricos na mistura, incluindo tamanho, forma e distribuição. Nas blendas imiscíveis, essa morfologia geralmente envolve uma fase dispersa dentro de uma matriz contínua, que pode apresentar diferentes formas, como gotículas, esferas, lâminas ou fibras, com a proporção dos componentes influenciando a organização das fases e a quantidade de interfaces. Em certos casos, quando as proporções se aproximam, surge a co-continuidade, onde não há distinção clara entre as fases dispersas e a matriz, resultando em propriedades distintas das blendas com morfologias tradicionais [95,96].

No contexto da regeneração óssea, as blendas poliméricas têm despertado grande interesse devido à sua capacidade de combinar as características desejáveis de diferentes polímeros, como o PLA e o PBAT. Blendas compostas de PBAT e PLA comercialmente disponíveis, tendem a ter separação macrofásica e apresentar duas Tg diferentes. Sendo assim, blendas de PLA/PBAT não modificadas são imiscíveis[97].

3.2.4 Ecovio®

O Ecovio® consiste em uma família de blendas poliméricas comerciais, produzidas pela BASF, compostas de diferentes proporções de PLA (biopolímero rígido e frágil proveniente de fontes renováveis) e PBAT (polímero de origem fóssil, flexível e resistente) e obtidas por meio do processo de extrusão [78]. Trata-se de uma blenda 100% biodegradável e totalmente compostável. Seu processo de decomposição no solo se dá dentro de poucas semanas, em condições adequadas, de acordo com as normas internacionais EN 13432 (europeia) e a ASTM D6400 (norte-americana) [78,98]. A blenda usada nesse trabalho é dada em uma proporção em massa de 55/45 de PBAT e PLA, respectivamente. Na blenda Ecovio, a presença do PLA em menor quantidade contribui para aumentar a rigidez do PBAT, oferecendo um equilíbrio entre a flexibilidade e a resistência mecânica dos dois polímeros [99]. Aliando as

propriedades mecânicas de seus materiais constituintes, como mostra a Figura 3.4, o Ecovio® apresenta-se como um termoplástico semiflexível e com uma resistência mecânica considerável, indicado para a produção de filmes para agricultura, embalagens e sacolas plásticas em geral [98]. Mas outras aplicações incluem embalagens de alimentos [78], bloqueadores de radiação ultravioleta [100], filtros para tratamento de água [101], sistemas de liberação de fármacos [102], e *scaffolds* para engenharia de tecidos [103].

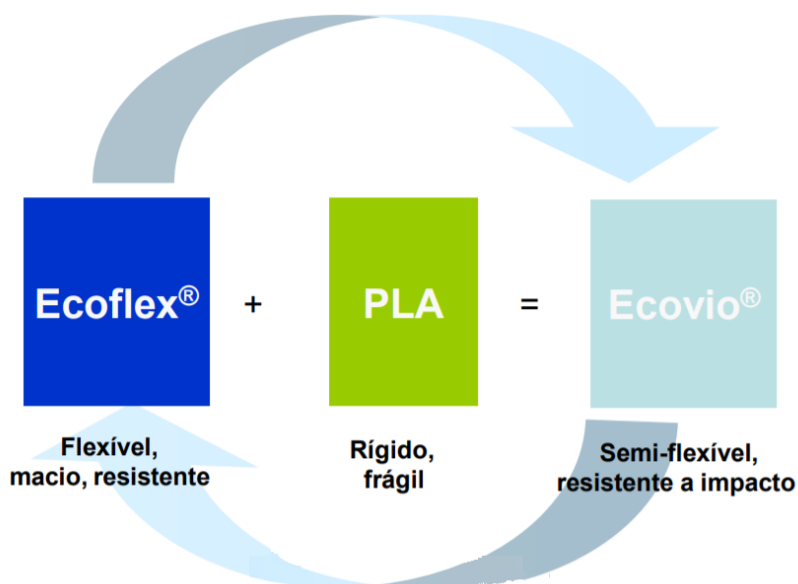


Figura 3.4 - Características do PBAT (Ecoflex®), do PLA e do PBAT/PLA (Ecovio®). Adaptado de [98].

O Ecovio® apresenta estrutura morfológica semicristalina e aspecto translúcido. Por se tratar de uma blenda imiscível, apresenta dois pontos de fusão: 150-160 °C (PLA) e 110-120 °C (PBAT), entretanto, é termicamente estável até 230 °C [104,105]. É possível de ser obter uma blenda com diferentes características mecânicas a depender da proporção dos seus componentes, devido às propriedades mecânicas distintas entre o PBAT e o PLA. As propriedades mecânicas e térmicas do Ecovio® contendo 45% de PLA são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Propriedades do Ecovio® contendo 45% de PLA e 55% de PBAT em massa.

Propriedades	Valor	Unidade
Massa específica	1240 - 1260	Kg m ⁻³
Ponto de fusão	110 - 155	°C
Módulo elástico	2240 - 2680	MPa
Resistência à tração	40 - 56	MPa
Resistência máxima	20 - 27	MPa
Elongação	38 - 56	%

Fonte: adaptado de [105].

O processo de biodegradação do Ecovio® se deve à presença de grupos éster nas cadeias principais dos polímeros que o compõe. Este tipo de grupo funcional é hidrolisável, facilitando assim a biodegradação do polímero [105]. Por se tratar de uma blenda constituída por dois polímeros termoplásticos, o Ecovio® pode ser reprocessado e reciclado, no qual seus produtos podem ser obtidos por extrusão, injeção, sopro ou termoformagem [78].

Diante das suas características, o Ecovio® se mostra como um material promissor para aplicação na biomedicina, porém é praticamente inexplorado ainda. Um exemplo de aplicação na área médica foi reportado por Antunes e co-autores [102], que sintetizaram nanofibras a base de Ecovio® para liberação controlada de fármaco (Cilostazol) para doenças arteriais. As nanofibras foram obtidas pela técnica de eletrofiação e demonstraram eficiência em tratamentos de curto (abaixo de 6h) e longo prazo (12h). Após uma pesquisa bibliográfica extensa e detalhada não foi encontrado na literatura pesquisas que abordam a obtenção de *scaffolds* da blenda polimérica comercial Ecovio® para aplicação na área de engenharia de tecidos ósseos, fazendo com que essa proposta de pesquisa apresente um cunho inédito.

3.2.5 Hidroxiapatita (HA)

Os fosfatos de cálcio, como o β-fosfato tricálcico (TCP) e a hidroxiapatita (HA) estão entre as biocerâmicas mais utilizadas na área médica. A

hidroxiapatita ocupa um lugar de destaque por apresentar-se quimicamente e estruturalmente muito similar à fase mineral do osso, preenchendo pré-requisitos biológicos importantes para sua interação com meios orgânicos, tais como bioatividade e osteocondutividade, as quais consistem na capacidade do material formar ligações químicas com os ossos, ocasionando uma melhor adesão do implante, bem como, acelerando o crescimento de um novo osso ao seu redor [106]. A fórmula química da hidroxiapatita estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 [107]. Porém, a HA geralmente não é estequiométrica em ossos humanos devido à deficiência de cálcio, apresentando relações Ca/P variando de 1,5 a 1,67, afetando suas propriedades biológicas e mecânicas [67].

HA é uma escolha natural quando se trata de pesquisas na área de engenharia de tecido ósseo, pois é um componente importante dos tecidos duros de vertebrados e constitui cerca de 60-70% da massa óssea e 98% da massa do esmalte dentário. *Scaffolds* puramente a base de HA podem ter propriedades biológicas ótimas, mas são geralmente caracterizados por serem rígidos e frágeis. Por esta razão, uma abordagem de compósito visando a combinação de HA com polímeros é frequentemente preferida [108].

3.3 Biomateriais com propriedades bactericidas

Apesar de inúmeras pesquisas abordando o desenvolvimento de suportes porosos voltado para engenharia de tecidos ósseos, a preocupação com a ação de microrganismos após implantação do biomaterial ainda é pouco abordada [31]. Após a cirurgia para incorporação de implantes, 20 a 25% sofrem contaminação do implante ou do tecido adjacente com microrganismos, que podem levar a neessidade de substituição do material implantado e, em severos casos, a morte do paciente [31]. O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é o micróbio que mais causa infecções em implantes ortopédicos, compreendendo até dois terços de todos os patógenos e pode causar uma série de doenças, desde pequenas infecções de pele até doenças potencialmente fatais, como pneumonia, meningite e sepse [109,110]. A adesão bacteriana é o primeiro e mais importante passo na infecção do implante, e é um processo complexo

fortemente influenciado por fatores como composição e morfologia do material [109].

Esse quadro se torna ainda mais preocupante, quando é levado em consideração a resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis atualmente, que tem se tornado cada vez maior. Estima-se que a morte por infecções resistentes a medicamentos resulte em uma mortalidade maior do que o câncer em 2050, causando um número de mortes de aproximadamente 10 milhões de pessoas [111]. Dentro desse contexto, o desenvolvimento de *scaffolds* para aplicações biomédicas com propriedades antimicrobianas mostram-se uma excelente alternativa para o uso de antibióticos. A incorporação de agentes bactericidas em *scaffolds* tem o objetivo de proteger o paciente instantaneamente e efetivamente contra infecções após a cirurgia.

Dentre os materiais utilizados como agentes bactericidas, destacam-se as nanopartículas de prata, selênio, zinco, cério, ouro, cobre e titânio, quitosana e polifenóis naturais como a lignina e taninos [40,45,112]. Ainda existe um certo receio quanto à toxicidade relacionada aos metais, fazendo com que a procura por materiais de origem natural tenha sido cada vez maior nos últimos anos. A quitosana é um dos biopolímeros mais estudados na área biomédica, sendo um polissacarídeo derivado de crustáceos (animais com exoesqueletos duros) que apresenta excelentes propriedades biológicas, como biodegradabilidade e atividades antibacteriana e cicatrizante de feridas [113]. A quitosana exibe propriedades antibacterianas através de grupos amino carregados positivamente no esqueleto de quitosana que se ligam à membranas bacterianas carregadas negativamente, induzindo o rompimento da membrana [112]. No entanto, *scaffolds* à base de quitosana já foram amplamente estudados e aplicados no campo da engenharia tecidual [55,114,115].

Os taninos são estruturas fenólicas naturais presentes em inúmeras espécies vegetais, particularmente no hemisfério sul. Eles são úteis para ajudar as plantas na defesa contra insetos e fungos [52]. Taninos possuem atividade antimicrobiana devido à grande quantidade de grupos fenólicos ácidos em suas estruturas [116]. Os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados (Figura 3.5). Os taninos hidrolisáveis são formados basicamente por moléculas de ácido gálico ligadas em unidades de açúcares (glicose). Já os

condensados são mais abundantes e incluem oligômeros e polímeros de unidades flavonoides (unidades de favan-3-ol) [117,118].

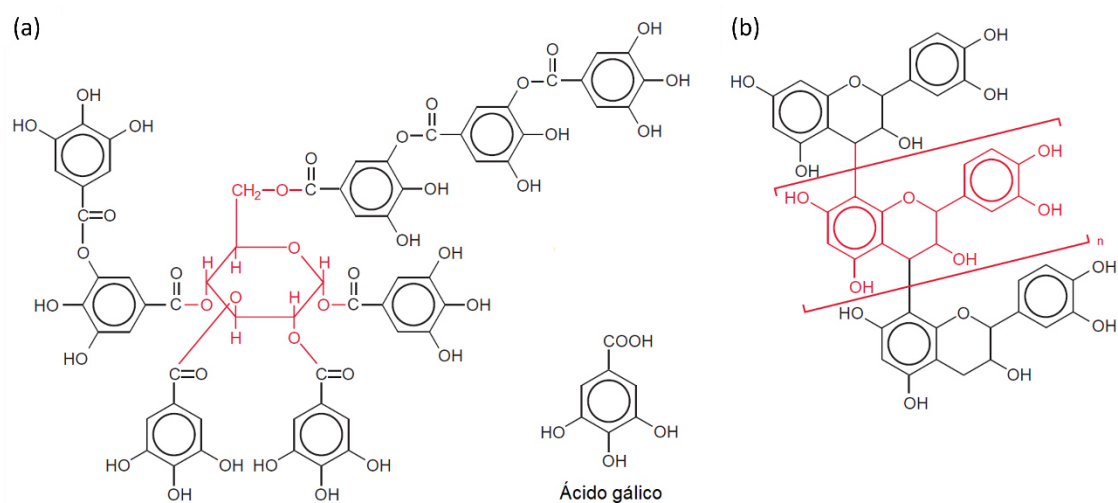


Figura 3.5 - (a) Estrutura química de taninos hidrolisáveis. (b) Estrutura química de taninos condensados. Fonte: adaptado de [117].

Nessa pesquisa foi utilizado um derivado de tanino amino-funcionalizado comercializado sob o nome Tanfloc (TN). O TN é obtido a partir de taninos naturais condensados, extraído da *Acacia mearnsii*, popularmente rotulada de Acácia Negra. O TN é produzido em escala industrial pela empresa TANAC S.A. O TN é amplamente utilizado como agente de coagulação-floculação no tratamento de águas residuais e efluentes, como uma alternativa ao uso de agentes de coagulação tradicionais, tais como o sulfato de alumínio e o sulfato de ferro (II). A síntese do TN é obtida pela reação de taninos condensados com ácido fórmico e cloreto de amônio [119]. A estrutura do TN é afetada por processos de hidrólise-hidratação, principalmente em condições alcalinas extremas ($\text{pH} > 9,0$) [57]. O TN é um composto orgânico que apresenta caráter catiônico, devido a grupos amino ($\text{pK}_a = 6,0$) em cada unidade repetitiva de sua estrutura (Figura 3.6), conferindo-lhe excesso de densidade de carga positiva em condições de pH inferiores a 6,0. Os cátions orgânicos do TN são estabilizados por contra íons cloreto. O TN tem uma grande distribuição de massa molar ($61 \pm 45 \text{ kDa}$) [58].

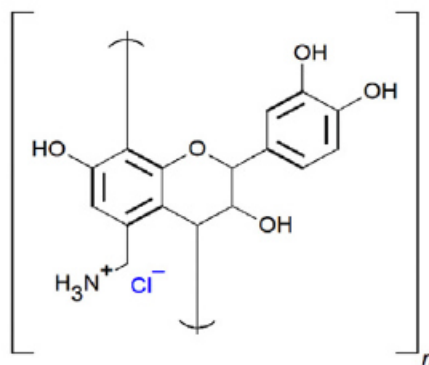


Figura 3.6 - Estrutura química do derivado catiônico de tanino condensados (TN). Adaptado de [120].

O TN apresenta as mesmas propriedades dos taninos condensados, tais como solubilidade, atividade antioxidante e potencial quelante sobre metais tóxicos [121]. Além disso o TN e taninos condensados possuem propriedades como ação antimicrobiana, citocompatibilidade, hemocompatibilidade e redução de colesterol [55]. O mecanismo de ação antimicrobiana do TN se dá através da presença dos grupos fenólicos e amino em sua estrutura. Grupos amino protonados podem romper a parede celular microbiana carregada negativamente, ocasionando a morte de microrganismos [55]. Já os grupos fenólicos podem acidificar o meio em que os microrganismos se encontram. Esse processo também pode levar à ruptura da membrana citoplasmática de bactérias [120,122].

Foi demonstrado em diversos estudos que o TN possui ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* [55,57,58,118,120,122]. Estudos mostraram também a aplicação de TN na produção de revestimentos para a modificação de superfícies. Câmara e coautores [123] produziram revestimentos através da técnica camada por camada (*layer-by-layer*), no qual foram associadas camadas de TN, heparina e sulfato de condroitina sobre o substrato de vidro oxidado, e os resultados mostraram que os revestimentos suportam a adesão, crescimento e diferenciação de células tronco derivadas do tecido adiposo (*adipose derived stem cells* - ADSC). Em um outro estudo, revestimentos com multicamadas de TN e heparina, depositados em superfície de nanotubos de titânio, melhoraram a taxa de diferenciação osteogênica de células ADSCs, bem como a deposição mineral óssea [56]. Da Cruz *et al.* [55], em um estudo recente, desenvolveram

hidrogéis a base de poli(álcool vinílico) (PVA) e TN em diversas proporções em massa. Foi demonstrado que o hidrogel na razão 90/10 de PVA/TN suporta a fixação e proliferação de células tronco mesenquimais da medula óssea (*bone marrow mesenchymal stem cells* - BMSCs) após 7 dias de cultura. Portanto, fica evidente que o TN se apresenta como um material adequado para aplicações como suportes porosos na engenharia de tecidos ósseos.

3.4 **Scaffolds de PLA/PBAT com HA e/ou taninos.**

O desenvolvimento de *scaffolds* a partir de compósitos poliméricos com cargas bioativas tem despertado grande interesse na área de engenharia de tecidos. Esses materiais combinam as vantagens dos polímeros com as propriedades específicas das cargas, resultando em atributos superiores e promissores em relação aos materiais individuais, como melhores propriedades mecânicas e biológicas. Nesse tópico será explorado e discutido artigos relevantes envolvendo *scaffolds* de PLA/PBAT com HA e/ou taninos.

Kang *et al.* [103], prepararam *scaffolds* de PLA/PBAT para engenharia de tecidos usando um método de separação de fase induzida por solvente. As blendas de PLA/PBAT foram preparadas nas seguintes proporções em massa: 100:0, 80:20, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80 e 0:100. A morfologia dos *scaffolds* mostrou que o aumento da concentração de PBAT influenciou significativamente o tamanho dos poros e a morfologia das paredes, resultando em menor porosidade e poros menores. Essa estrutura contribuiu para maior resistência à tração e alongamento na ruptura. O *scaffold* de PLA/PBAT 50/50 apresentou resistência à tração de 3,02 MPa, superando o PLA puro, que apresentou 0,3 MPa. Além disso, a elongação na ruptura foi cinco vezes maior que a do PLA puro (3,8%), melhorando significativamente a flexibilidade e ductilidade devido à adição de PBAT. A molhabilidade dos *scaffolds* porosos indicou uma estrutura favorável para a absorção de água, diretamente relacionada ao tamanho e porosidade dos poros. Além disso, a estrutura dos *scaffolds* mostrou alta capacidade de suportar a adesão e proliferação de células fibroblásticas. Nesse sentido, um vasto campo de pesquisa está aberto para ser explorado, inclusive na área médica.

Em um estudo conduzido por Yan *et al.* [26], foram preparados compósitos de nano-hidroxiapatita (n-HA), PLA, PBAT e celulose microcristalina (MCC) por meio do método de mistura de solução, utilizando proporções de n-HA variando de 0 a 10% em massa, PLA de 85,5 a 76,5%, PBAT de 9,5 a 8,5%, e MCC mantida em 5%.. A n-HA atuou como agente nucleante, e a MCC foi adicionada para facilitar a degradação dos materiais. Comparado ao compósito sem n-HA, a cristalinidade dos compósitos com 6% em massa de n-HA aumentou em 62%. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostraram que o n-HA estava uniformemente disperso nos compósitos quando a proporção de n-HA era inferior a 6% em massa, enquanto uma aglomeração de n-HA apareceu na proporção de adição de 10% em massa. O teste de tração demonstrou que a resistência à tração dos compósitos com diferentes proporções de adição superou as necessidades dos materiais de engenharia de tecido ósseo. A introdução de n-HA nos compósitos obtidos simulou a composição e estrutura do osso nativo, sugerindo um potencial de utilidade e aplicação na engenharia de tecidos ósseos. Embora os autores sugiram a aplicação para regeneração óssea, nenhum teste biológico foi realizado.

Em um estudo recente, Fang *et al.* [124] desenvolveram um compósito de *scaffold* à base de PLA/PBAT (80% em massa de PLA e 20% em massa de PBAT), com nHA e EDTMPA (ácido etilenodiamina-tetrametilenofosfônico) como cargas de reforço, fabricado por um processo simples de extrusão. A adição de nHA e EDTMPA melhorou a bioatividade e as propriedades mecânicas dos *scaffolds*, tornando-os adequados para aplicações em engenharia de tecido ósseo. Os *scaffolds* demonstraram excelente compatibilidade com células osteoblásticas e promoveram a deposição de fosfato de cálcio, essencial para a regeneração óssea.

Suttiat *et al.* [125] desenvolveram um *scaffold* poroso de PLA/PBAT (70:30 em massa) para engenharia de tecido ósseo usando uma técnica de espumação a gás e lixiviação de partículas, seguida de biomineralização assistida por polidopamina (PDA). O *scaffold* foi revestido com PDA por imersão em uma solução de dopamina, criando uma superfície bioativa. A subsequente imersão em fluido corporal simulado (SBF) facilitou a deposição de cristais de nHA na camada de PDA, melhorando as propriedades osteogênicas do *scaffold*. Esse

processo melhorou significativamente a bioatividade, as propriedades mecânicas e a compatibilidade com células osteoblásticas (MG-63), tornando-o um candidato promissor para aplicações em engenharia de tecido ósseo.

Em um outro estudo, Liu *et al.* [126] desenvolveram *scaffolds* de microfibras porosas oca composto de uma combinação de PLA, PBAT e PVA por meio de eletrofiação coaxial para uso em cicatrização de feridas. Os resultados mostraram que a manutenção da proporção em massa PLA:PBAT em 7:3 resultou em compósitos de alta qualidade, com aumento de 36,25% na tenacidade e 4,9% na biodegradabilidade em comparação com o PLA puro. Ensaio de cicatrização *in vivo* sugerem que os compósitos carregados podem promover efetivamente a cicatrização de feridas no 13º dia. Além disso, a adição de CRT-15, uma molécula com propriedades terapêuticas, facilitou a cultura celular, acelerou a cicatrização e controlou eficientemente a liberação do medicamento. Os compósitos funcionais de microfibras PLA/PBAT@CRT-15 também reduziram a resposta inflamatória, promoveram a regeneração epidérmica e aumentaram a deposição de colágeno, indicando seu potencial como curativo para feridas.

Reis e coautores [127] modificaram o Ecovio (PBAT/PLA) com 1, 3 e 5% em massa de bio-hidroxiapatita obtida a partir de resíduos de casca de ovo. Os compósitos foram preparados por extrusão seguida de moldagem por injeção; eles apresentaram um aumento significativo de 15% nas propriedades de tração em comparação com a blenda PLA/PBAT e não mostraram citotoxicidade em relação às células fibroblásticas de camundongo NIH-3T3.

Scaffolds de PLA, PBAT e poliésteres em geral apresentam baixa adesão celular e mineralização óssea devido à sua natureza hidrofóbica [128,129]. Essa limitação também pode resultar em rejeição biológica, uma vez que os materiais são reconhecidos como partículas estranhas pelo corpo. As propriedades da superfície de um material de *scaffold* desempenham um papel fundamental na adesão, proliferação e funções subsequentes das células [130,131]. A modificação superficial surge com uma alternativa para otimizar suas propriedades, tornando-os mais biocompatíveis e propícios para engenharia de tecidos. Essa modificação altera a superfície hidrofóbica para hidrofílica e permite a fixação de moléculas bioativas, fatores de crescimento ou

medicamentos, aprimorando as propriedades biológicas do *scaffold* e promovendo a regeneração tecidual [132].

De acordo com Mohd Sabee *et al* [133] diferentes tratamentos de superfície podem ser aplicados aos *scaffolds*, tais como tratamentos por plasma, aprisionamento físico de pequenas moléculas funcionais, aminólise e hidrólise. Comparado a estas outras técnicas de modificação de superfície, o tratamento alcalino é menos demorado, menos trabalhoso e mais econômico, além de ser mais eficaz na penetração de estruturas porosas e na formação de ligações covalentes fortes [134]. Trata-se de uma estratégia simples e eficaz, que envolve a imersão dos *scaffolds* em soluções básicas, como o hidróxido de sódio (NaOH). Este processo resulta na hidrólise das ligações éster dos poliésteres devido ao ataque nucleofílico dos íons hidróxido no carbono carbonílico, levando à incorporação de grupos hidroxila (-OH) e ao aumento da rugosidade da superfície, o que melhora a hidrofiliabilidade da matriz polimérica, além de promover melhor adesão e proliferação celular [135]. Estudos *in vivo* mostraram que *scaffolds* a base de poliéster tratados com NaOH aumentaram a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana em comparação com *scaffolds* não tratados, resultando em maior formação óssea, demonstrando a eficácia desse método simples e eficiente para a modificação de superfícies degradáveis [136].

Um estudo realizado por Jaidev e Chatterjee [128] explora o aprimoramento da atividade osteogênica em *scaffolds* de PLA impressos em 3D por meio de modificação de superfície. Os pesquisadores utilizaram tratamento alcalino, seguido de enxerto de polietilenimina (PEI) e ácido cítrico (CA) nos *scaffolds* de PLA e, posteriormente, os revestiram com hidroxiapatita deficiente em cálcio (PLA-HaP) por imersão em SBF. Essa modificação não apenas melhorou a rugosidade da superfície dos *scaffolds*, mas também alterou a energia superficial, o que contribuiu para o aumento da molhabilidade, como indicado pela diminuição do ângulo de contato da água de 124° para 78°. As estruturas de PLA-HaP modificadas apresentaram aproximadamente 50% a mais de adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais humanas (hMSC) e o dobro de deposição mineral em comparação com o PLA não modificado, destacando sua maior bioatividade e adequação para aplicações em engenharia de tecido ósseo.

Em outro estudo realizado por Martin e colaboradores [137] foram desenvolvidos *scaffolds* multifuncionais de PLA via manufatura aditiva para regeneração óssea. O processo de fabricação envolveu impressão 3D, hidrólise alcalina (NaOH) e um método de revestimento com colágeno, minociclina e nanopartículas de hidroxiapatita-citrato que aprimorou a rugosidade da superfície e alterou a energia superficial, favorecendo o aumento. O processo de fabricação envolveu impressão 3D, hidrólise alcalina (NaOH) e um método de revestimento usando colágeno, minociclina e nanopartículas de hidroxiapatita-citrato que aprimorou a rugosidade da superfície e alterou a energia superficial, favorecendo o aumento a hidrofiliabilidade, reduzindo o ângulo de contato da água de 45° para 17°. Os *scaffolds* apresentaram significativa atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e promoveram a adesão, proliferação e diferenciação osteogênica de células-tronco (hMSC), conforme evidenciado pelo aumento da expressão de genes osteogênicos (RUNX2, OCN, OPN). Esses resultados indicam que os *scaffolds* projetados possuem propriedades antimicrobianas e osteogênicas aprimoradas, tornando-os adequados para aplicações em engenharia de tecido ósseo.

3.5 Manufatura aditiva

As técnicas disponíveis para fabricação de *scaffolds* podem ser divididas em duas categorias principais: convencional e manufatura aditiva. Técnicas convencionais incluem evaporação de solvente e lixiviação de partículas (*solvent-casting and particle leaching*), liofilização (*freeze drying*), separação de fases termicamente induzida (*thermally induced phase separation - TIPS*), formação de espuma por gás (*gas foaming*), processo de formação por pó (*powder-forming process*), processo sol-gel, e eletrofiação; parte desses métodos são subtrativos, nos quais partes do material são removidas de um bloco inicial para alcançar a conformação desejada. As principais desvantagens incluem a capacidade limitada de controlar a geometria do material e o uso de solventes orgânicos que podem comprometer a viabilidade celular [13].

Para fabricar *scaffolds* com geometria uniforme ou com maior complexidade, é utilizada a impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva (MA). Nos *scaffolds* fabricados utilizando MA a interconectividade dos

poros e a porosidade podem ser controladas. Além disso, extraindo informação anatômica do paciente utilizando tomografia computadorizada (CT) ou imagens por ressonância magnética (MRI), e gerando um modelo CAD (*computer-aided design*) é possível obter *scaffolds* personalizados de acordo a necessidade do paciente [138]. As técnicas de MA utilizam processos de fabricação aditiva que fabricam o objeto 3D final via deposição de camadas sobrepostas, utilizando materiais líquidos, sólidos ou na forma de pós. Em geral, essas técnicas não utilizam solventes orgânicos tóxicos, e permitem um maior controle da geometria do material, levando a uma maior biocompatibilidade [13].

Dentre as principais tecnologias de MA utilizadas para a fabricação de *scaffolds*, estão as baseadas em extrusão, que podem ser classificadas em três técnicas: fabricação de filamentos fundidos (*fused filament fabrication* – FFF), MA por extrusão via rosca e MA por extrusão em seringa (Figura 3.7). A primeira funciona com base no princípio de fundir filamentos termoplásticos, normalmente ABS ou PLA, e extrudá-los através de um bico aquecido. Na manufatura aditiva por extrusão com rosca, a dinâmica envolve alimentar grânulos de polímero em um mecanismo rosqueado dentro de um barril aquecido. Enquanto a rosca se move, o polímero fundido é empurrado através de um bico, com a taxa de extrusão controlada pela velocidade de rotação da rosca. Embora o sistema de rosca possua um módulo de alimentação mais complexo em comparação com outros métodos, ele oferece a potência necessária para materiais de alta viscosidade. Por fim, nos sistemas de manufatura aditiva por extrusão de seringa, material no estado sólido (na forma de pó, pellets ou grânulos) é colocado em uma seringa, onde o material é fundido e a impressora pressiona o êmbolo a uma taxa controlada para extrudar o material através de um bico [139–141].

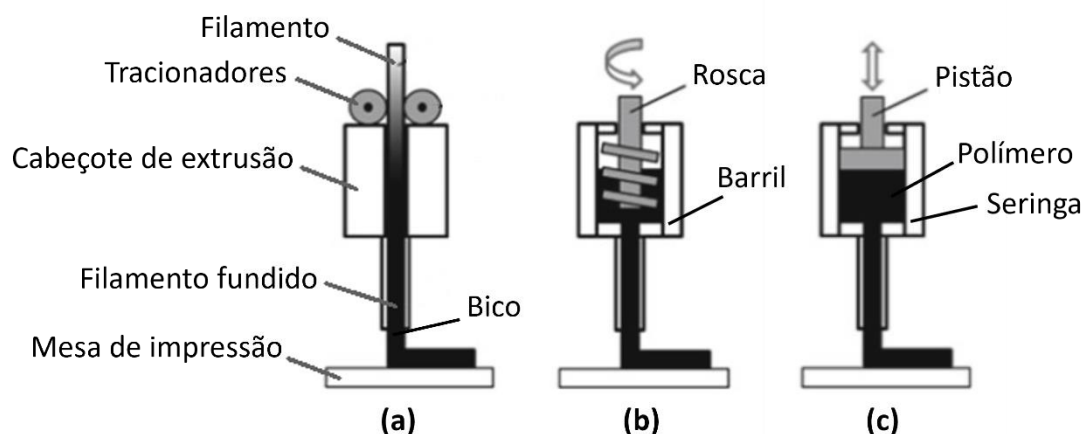


Figura 3.7 - Esquema dos tipos de técnicas baseadas em extrusão: (a) fabricação de filamentos fundidos; (b) extrusão com rosca e (c) extrusão de seringa. Adaptado de [140].

A impressão 3D usando extrusão por seringa oferece várias vantagens, especialmente em engenharia de tecidos. Esta técnica permite o uso de uma ampla gama de materiais, incluindo hidrogéis, biopolímeros e compósitos, fornecendo a flexibilidade essencial para aplicações biomédicas onde propriedades mecânicas específicas e biocompatibilidade são necessárias [142,143]. A extrusão por seringa também permite um maior controle na deposição de materiais, possibilitando a confecção de geometrias complexas e estruturas finas, crucial para fabricar *scaffolds* com porosidade e propriedades mecânicas sob medida [144]. O método é particularmente adequado para produzir *scaffolds* que suportam o crescimento celular e a regeneração de tecidos, permitindo a formação de poros interconectados que facilitam o fluxo de nutrientes e a remoção de resíduos, mimetizando a matriz extracelular [145]. Além disso, possibilita a produção de implantes e dispositivos específicos para o paciente, o que é crítico na medicina regenerativa para garantir a integração e função adequadas [146]. A técnica também suporta impressão multimaterial, permitindo a criação de estruturas complexas com propriedades variadas em uma única impressão, essencial para dispositivos multifuncionais e materiais gradientes [147]. Além disso, as configurações de extrusão por seringa são relativamente simples e econômicas em comparação com outras tecnologias de

impressão 3D, tornando-as acessíveis a uma gama mais ampla de instituições de pesquisa e indústrias, facilitando assim a inovação e o desenvolvimento [148].

Neste trabalho, foi associada pela primeira vez a combinação do polímero comercial Ecovio® com HA e TN para a produção de *scaffolds* voltados à engenharia de tecidos ósseos. Até o momento, não há registros na literatura sobre a produção de *scaffolds* compostos por Ecovio®/TN, Ecovio®/HA, e Ecovio®/TN/HA via impressão 3D. Além disso, também não foram encontrados relatos sobre a modificação superficial de *scaffolds* de Ecovio® utilizando tratamento alcalino combinado com TN e HA visando a otimização de propriedades biológicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O Ecovio® (L BX 8145) foi doado pela empresa BASF e trata-se de uma blenda polimérica com 55% em massa de PBAT e 45% em massa de PLA. O material foi recebido em forma de grânulos (pellets).

O polímero catiônico amino-funcionalizado, denominado de Tanfloc SG (TN) foi gentilmente doado pela TANAC S.A (Montenegro-RS, Brasil), na forma de pó. A membrana para diálise (Spectra/Por®1, peso molecular de corte de 6-8 kDa) foi adquirida da empresa Spectrum Labs.

A hidroxiapatita (HA) com composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ foi adquirida da empresa Sigma Aldrich® na forma de pó, com pureza maior que 90% e tamanho médio de partícula de 4,58 μm .

Os reagentes (listado abaixo) para a produção do SBF foram adquiridos da Sigma-Aldrich e o protocolo para a produção seguiu os procedimentos descritos na norma ISO 10993:

- Cloreto de sódio (NaCl);
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3);
- Cloreto de potássio (KCl);
- Fosfato de hidrogênio de dipotássio tri-hidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$);
- Cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- Cloreto de cálcio (CaCl_2);
- Sulfato de sódio (Na_2SO_4);
- Tris(hidroximetil)aminometano ($((\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2)$);
- Ácido clorídrico (HCl).

4.2 Métodos

Para melhor condução e organização, o trabalho foi dividido em três etapas, a primeira está relacionada a purificação e caracterização do Tanfloc (TN). A segunda etapa trata-se da caracterização do Ecovio e dos biocompósitos de Ecovio contendo tanino purificado e hidroxiapatita, após serem produzidos via misturador interno e conformados por prensagem uniaxial. A terceira e última

etapa deste trabalho focou na modificação superficial de *scaffolds* impressos 3D a base de Ecovio utilizando tratamento básico para ativar a superfície do material e promover a adição de TN e HA. As etapas do desenvolvimento deste projeto são apresentadas de maneira resumida na Figura 4.1,

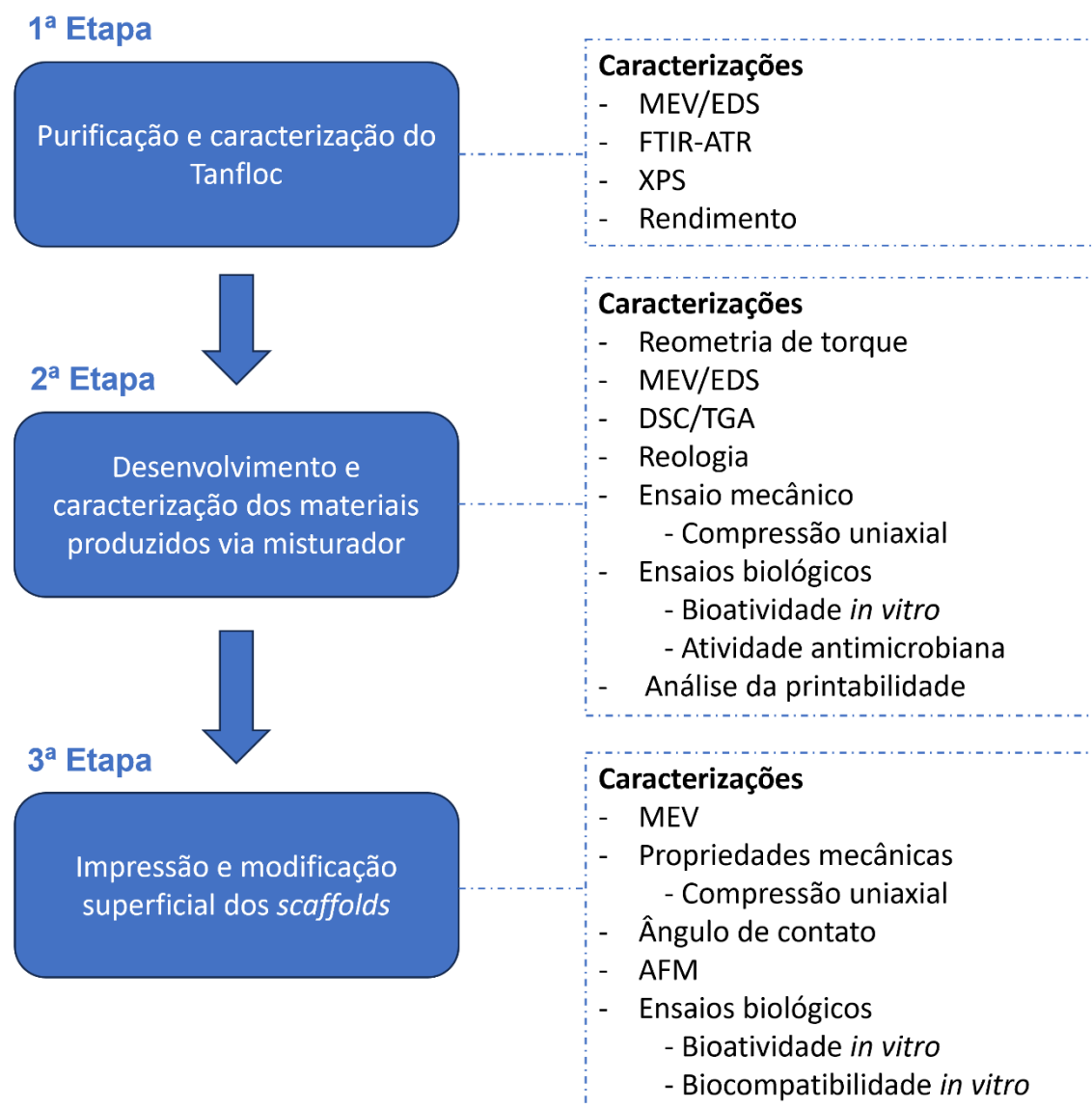


Figura 4.1 - Fluxograma das etapas do projeto

4.2.1 Primeira etapa: purificação e caracterização do Tanfloc

- Purificação do Tanfloc.

O processo de diálise foi utilizado para remoção de impurezas (íons de cálcio, potássio e cloreto) do Tanfloc (TN) [120]. O TN (10 g) foi primeiramente dissolvido em 50 mL de solução aquosa de ácido acético (1,0% vol/vol) e filtrado

a vácuo em um funil de Buchner para remover eventuais partículas de madeira. Em seguida, a solução de TN foi dialisada em 1,6 L de água deionizada a 25 °C por 4 h e 12 h usando membranas de diálise, sem troca de água. Após a diálise, a solução de TN foi congelada a -20 °C em tubos cônicos e liofilizada durante 72 h (LS 3000, TERRONI) para uso posterior. Então, o material foi caracterizado e o rendimento do processo foi estimado. Para isso, considerou-se a massa de TN inicial (10,0 g) usada no preparo da solução que foi dialisada e a massa de TN presente no material dialisado e liofilizado (massa final de TN). Este processo foi realizado em triplicata ($n = 3$) para cálculo do rendimento.

- Caracterização morfológica.

Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips XL-30 FEG acoplado a um sistema de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) foi usado para caracterizar a estrutura e composição do TN antes e após a purificação. As amostras foram recobertas por uma fina camada de ouro.

- Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).

Os espectros de FTIR do TN antes e após a purificação foram obtidos em espectrofotômetro de refletância total atenuada (ATR) (Varian 640-IR) na faixa de 600 a 2000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} obtida após o acúmulo de 64 varreduras.

- Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS).

A análise XPS do TN antes e após purificação foi realizada utilizando um K-alpha XPS (Thermo Scientific) com uma fonte monocromática de raios-X Al K α . A varredura foi realizada para identificar os elementos presentes nas amostras, seguindo estas condições: 20 varreduras, energia de passagem de 200 eV, passos de 1,0 eV e 400 μm de ponto de raios X. O software CasaXPS foi utilizado para analisar os dados e calcular a porcentagem atômica de cada elemento.

4.2.2 Segunda etapa: desenvolvimento e caracterização dos materiais produzidos via misturador interno e moldados por prensagem

- Processamento via misturador interno acoplado a um reômetro de torque

As combinações do pTN e HA com o Ecovio® foram primeiramente testadas por Haake, para analisar o torque da mistura fundida. Foram testados o Ecovio® e suas combinações com pTN e HA em diversas proporções (Tabela 4.1). As amostras foram processadas em uma câmara de mistura acoplada a um reômetro de torque Haake, modelo Rheomix 600p, com rotores contra-rotacionais e semi interpenetrantes do tipo roller, temperatura de 170 °C, e tempo de mistura de 5 minutos, a uma rotação de 60 rpm. Para aprimorar a homogeneização da blenda com o pTN e HA durante a fase de processamento, o Ecovio passou por um pré-tratamento em um moinho de facas (Wittmann) seguido de secagem em uma estufa a vácuo a 40 °C até a massa constante. Previamente ao processamento no misturador interno, tanto o Ecovio quanto pTN e HA, foram submetidos a um processo de secagem a vácuo, com temperaturas de 40 °C para o Ecovio e o tanino, e 110 °C para a hidroxiapatita, ao longo de um período de 24 horas. Logo em seguida, os componentes foram misturados nas proporções desejadas por meio de um processo de tamboreamento manual.

Tabela 4.1 - Composições a serem estudadas de Ecovio®, pTN e HA.

Amostras	Ecovio (% m/m)	pTN (%m/m)	HA (% m/m)
Ecovio	100	0	0
Ecovio/pTN	90	10	0
Ecovio/HA	90	0	10
Ecovio/pTN/HA	80	10	10

- Preparação de amostras prensadas

Após a preparação das formulações no misturador interno, os materiais resultantes foram granulados manualmente com auxílio de artefato cortante, secos a 40 °C por 24 horas sob vácuo e, posteriormente, uma parte deste

material foi utilizado para conformação de placas por meio da moldagem por compressão.

Foram produzidas placas com dimensão de 70 x 16 x 3 mm, utilizando um molde de produção simultânea de 3 placas em uma prensa hidráulica (Marconi, modelo MA098/A) por 5 min a 9 Ton e 160 °C e, subsequentemente, resfriado sob pressão (3 ton até a temperatura da prensa atingir 60°C) / resfriamento por banho em água (2 minutos).

- Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de DSC foi empregada para avaliar a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), temperatura de cristalização a frio (T_{cc}) e grau de cristalinidade do Ecovio e dos biocompósitos. As curvas foram obtidas utilizando o equipamento da TA Instruments, modelo Q2000, com nitrogênio como gás de arraste, em fluxo contínuo de 50 mL/min. A análise foi conduzida de acordo com o seguinte protocolo: aquecimento de 0 °C a 200 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, resfriamento a 0 °C e reaquecimento a 200 °C na mesma taxa de aquecimento. Os valores de T_g , T_m , entalpia de fusão (ΔH_m) e entalpia de cristalização a frio (ΔH_{cc}) foram obtidos utilizando o software TA - Universal Analysis 2000 e utilizados para calcular o grau de cristalinidade (X_c) utilizando a seguinte Equação 4.1:

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_m - \Delta H_{cc}}{W_{PLA} \times \Delta H_m^0} \times 100 \quad (4.1)$$

onde ΔH_m^0 é a entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina (PLA $\Delta H_m^0 = 93,7 \text{ J g}^{-1}$) [149], e W_{PLA} é a fração em massa de PLA no material. As medições foram realizadas em triplicata. A T_g do PBAT, que está na faixa de -40 °C, não foi avaliada.

- Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica do Ecovio e dos biocompósitos foi avaliada por meio da técnica de TGA, aquecendo as amostras de 25 a 800 °C, à uma taxa de 20 °C min⁻¹, sob atmosfera de N₂ em um equipamento da TA Instruments, modelo Q50. A temperatura de início (T_{onset}), a temperatura de decomposição

máxima ($T_{\max}$) e o resíduo a 800 °C foram determinados utilizando o software TA - Universal Analysis 2000. As medições foram realizadas em triplicata.

- Caracterização reológica

As propriedades reológicas das amostras prensadas foram avaliadas medindo a viscosidade em função da taxa de cisalhamento (regime estacionário) e os módulos de armazenamento e perda em função da frequência (regime oscilatório) sob atmosfera de N_2 em um reômetro de tensão controlada, modelo AR-G2 (TA Instruments), com geometria de placas paralelas (diâmetro de 25 mm e espaçamento de 1 mm entre as placas). Os testes foram realizados a 170°C, mesma temperatura usada no reômetro de torque Haake, com uma faixa de taxa de cisalhamento de 0,01 a 100 s^{-1} e uma faixa de frequência de 0,1 a 500 $rad\ s^{-1}$. O tempo necessário para atingir o regime de cisalhamento estacionário foi previamente medido para cada material a partir dos testes de superação de estresse. As medições no regime oscilatório foram realizadas aplicando uma amplitude de deformação dentro do regime viscoelástico linear para cada material (na ordem de 0,1 a 10%).

- Caracterização microestrutural

Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips XL-30 FEG acoplado a um sistema de espectroscopia por dispersão de energia de raios-X (EDS) para caracterizar a morfologia da blenda e a distribuição do pTN e HA nos biocompósitos. Amostras do Ecovio e dos biocompósitos na forma de uma barra retangular foram fraturadas criogenicamente em nitrogênio líquido. As amostras foram fixadas em suportes de alumínio com fita condutiva dupla face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro antes da análise.

- Caracterização mecânica

A caracterização mecânica do Ecovio e dos biocompósitos foi realizada por meio de testes de compressão uniaxial, de acordo com a norma ASTM D 695-15. As amostras usadas foram estampadas das placas prensadas e possuíam diâmetro de 8 mm e altura de 3 mm (Figura 4.2), a estampagem foi realizada utilizando um vazador em aço. Os ensaios foram realizados em uma

máquina universal de ensaios Instron, modelo 5569, usando uma célula de carga de 500 N, pré carga de 15 N, velocidade de travessa de 1,3 mm/min e utilizando o software Bluehill 2.15. Foram medidas pelo menos 7 amostras para cada formulação.

A análise comparativa entre os valores médios de módulo elástico foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

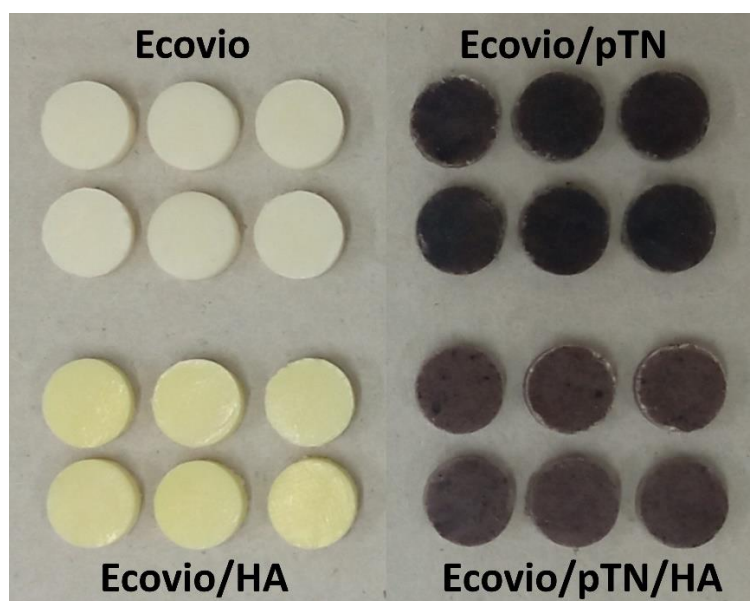


Figura 4.2 - Amostras de 8 mm de diâmetro e 3 mm de altura utilizadas no ensaio de compressão.

- Ensaio in vitro de bioatividade

O teste de fluido corporal simulado (SBF) foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade de mineralização dos biocompósitos a base de Ecovio. O ensaio foi realizado de acordo com a ISO 23317. As amostras foram imersas na solução SBF a 37 °C por 21 dias, e após o período determinado, as amostras foram lavadas com água ultrapura, secas em dessecador, e analisadas por MEV para avaliar a formação de fosfatos de cálcio na superfície dos biocompósitos. A solução de SBF foi preparada conforme sugerido por Kokubo e Takadama [150], que contém íons presentes no plasma sanguíneo humano, os quais são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Concentração de íons do SBF e do plasma sanguíneo humano.

Ion	Concentração (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma sanguíneo	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Fonte: [150].

- Atividade antimicrobiana

Os ensaios antimicrobianos foram realizados baseado na metodologia proposta pela norma JIS (*Japanese Industrial Standard*) Z 2801:2010 “*Antibacterial products - Test for antibacterial activity and efficacy*”, utilizando corpos de prova (4 x 4 cm) que foram esterilizados com álcool 70% e gazes estéreis. Cepas de bactérias gram-positiva e gram-negativa, respectivamente *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, ATCC 27853), foram utilizadas como microrganismos de teste. As culturas bacterianas foram preparadas a partir de estirpes conservadas em ágar gelose, sendo posteriormente incubadas em caldo nutritivo por 16 a 20 horas, ajustadas para uma concentração de 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹), e diluídas para uma concentração de trabalho entre $2,5 \times 10^5$ e 10×10^5 UFC mL⁻¹. Um volume de 144 µL da suspensão bacteriana foi aplicado sobre a superfície de cada corpo de prova, que foram acomodados dentro de placas de Petri. Em seguida, os corpos de prova foram cobertos com um filme plástico de polietileno (PE) esterilizado e inerte (3 x 3 cm), levando à formação de uma fina camada do inóculo em íntimo contato com a superfície dos corpos de prova (Figura 4.3). O PE por ser inerte, foi utilizado também como corpo de prova controle. As amostras foram então incubadas a 35 ± 1 °C e 85% de umidade relativa por 48 horas. Esse período de incubação foi estendido para 48 horas, ao invés das 24 horas geralmente utilizadas, devido ao fato de que as amostras em estudo são destinados a aplicações biomédicas, como implantes, que podem permanecer em contato com o organismo humano por longos períodos, ou até meses, antes de se degradarem completamente. Após a incubação, as amostras foram lavadas com solução salina tamponada (PBS - *Phosphate buffered saline*) e as diluições seriadas foram cultivadas em ágar de contagem de placas (PCA - *Plate Count Agar*) para determinar o número

de bactérias viáveis por cm². A atividade bactericida foi calculada com base na redução logarítmica das células viáveis, conforme a equação 4.2:

$$R = U_t - A_t \quad (4.2)$$

onde R representa a redução logarítmica (atividade bactericida do material testado), U_t é a média logarítmica das células viáveis no controle e A_t é a média logarítmica das células viáveis nas amostras testadas. De acordo com a norma, o material é considerado eficaz, ou seja, apresenta atividade bactericida, se o valor de R for igual ou superior a 2,0 log. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

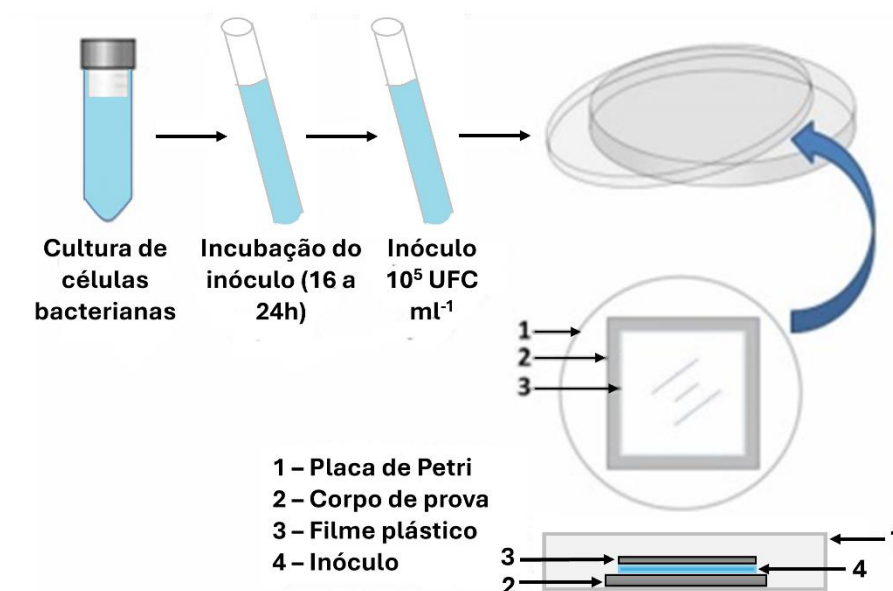


Figura 4.3 - Esquema ilustrativo da metodologia recomendada pela norma JIS Z 2801:2010 para avaliação da atividade antibacteriana. Adaptado de [151].

- Análise da printabilidade

Com o intuito de avaliar a eficácia de impressão das composições mencionadas na Tabela 4.1, *scaffolds* em forma cilíndrica foram projetados, com diâmetro de 8 mm e altura de 3 mm. O modelo tridimensional foi criado utilizando o software PrusaSlicer e dividido em 10 camadas de 300 µm de altura, com poros de 400 µm (42% de preenchimento e 58% de porosidade). A largura dos filamentos foi definida como 400 µm, com uma rotação de 90° entre as camadas

alternadas. Para determinar quais formulações ofereciam melhor capacidade de impressão, foram realizadas medições do diâmetro e da altura de três *scaffolds* para cada formulação, utilizando um paquímetro digital. A Figura 4.4 apresenta a estrutura de um *scaffold* projetado para impressão neste estudo.

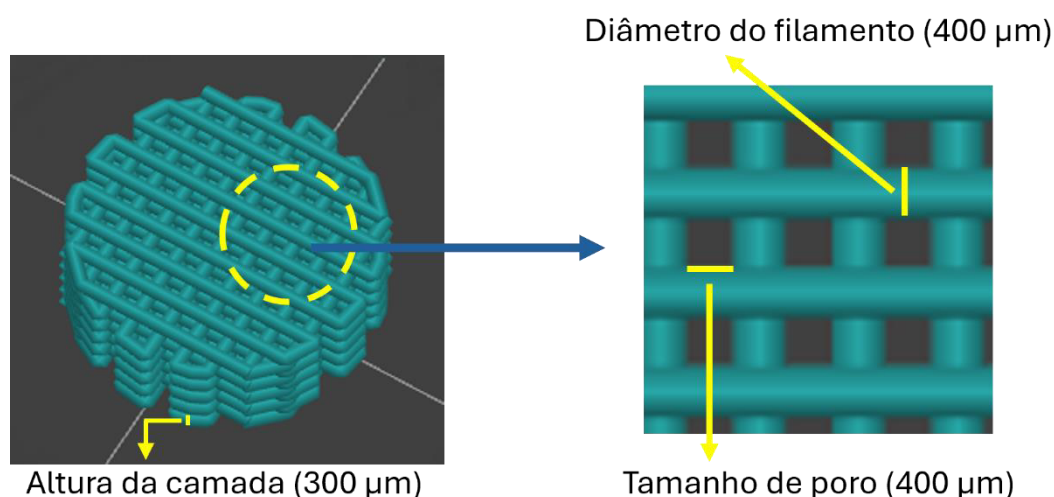


Figura 4.4 - Representação do *scaffold* projetado no software PrusaSlicer.

A impressora 3D utilizada neste trabalho foi adquirida da empresa 3D Biotechnology Solutions (modelo Genesis II). Este equipamento possui uma seringa metálica destinada à impressão por extrusão a quente, a partir de pellets ou pó. Ela possui uma plataforma móvel e aquecida, gabinete semifechado, ajuste de nivelamento manual e capacidade máxima de impressão de 100 x 140 x 100 mm. A gestão da impressão e do funcionamento da impressora foi realizada através do software Repetier-Host, que possui uma interface de fácil utilização e permite a conexão com a impressora 3D via USB.

Os parâmetros de impressão (temperatura e velocidade de impressão) dos *scaffolds* foram definidos após vários testes. A velocidade inicial adequada foi de 5 mm/s, sendo reduzida para cerca de 3,3 mm/s após a 4ª camada para otimizar o processo, enquanto a temperatura de impressão definida foi de 165 °C. Os materiais empregados na impressão foram preparados a partir do processamento no misturador interno (sem prensagem), seguido de fragmentação em pequenos grânulos, e secagem a vácuo a 50 °C por 48 horas. A Figura 4.5 mostra os materiais utilizados, obtidos a partir do misturador interno

(sem prensagem) e fragmentados em pequenos grânulos. O material de estudo foi inserido diretamente na seringa metálica e aquecido para impressão.



Figura 4.5 - Material utilizado para impressão 3D dos *scaffolds* (composições bem-sucedidas na análise de printabilidade).

A arquitetura dos *scaffolds* impressos (das composições bem-sucedidas na análise de printabilidade) foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura utilizando o equipamento Tescan MIRA FEG operado na tensão de aceleração de 5 kV. Foram analisados a face superior e transversal das amostras que foram fraturadas. Antes da análise, estas amostras foram fixadas em suportes de alumínio com fita condutiva dupla face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro. As micrografias obtidas foram analisadas por meio do software ImageJ para medição de parâmetros dimensionais como: diâmetro do filamento, tamanho de poro e altura da camada.

A porosidade (%) dos *scaffolds* foi calculada analisando as densidades dos *scaffolds* impressos, medindo os pesos e volumes das estruturas usando a equação 4.3 [152].

$$P\% = \left(1 - \frac{\rho_e}{\rho_t}\right) \times 100 \quad (4.3)$$

onde ρ_e é a densidade experimental dos *scaffolds* e ρ_t é a densidade teórica do Ecovio ($\cong 1,25 \text{ g/cm}^3$) ou do biocompósito Ecovio/HA ($1,44 \text{ g/cm}^3$). A

densidade experimental é avaliada medindo a massa, altura, diâmetro e volume dos *scaffolds* com base nas seguintes relações (Equações. 4.4a e 4.4b):

$$volume = \pi r^2 h \quad (4.4a)$$

$$densidade = massa/volume \quad (4.4b)$$

4.2.3 Terceira etapa: caracterização dos *scaffolds*

- Modificação superficial dos *scaffolds*

A metodologia proposta para a modificação superficial de *scaffolds* de Ecovio, visando a melhoria da hidrofiliabilidade e a incorporação de HA e pTN para conferir propriedades bioativas e antimicrobianas, baseou-se em trabalhos anteriores [153,154]. Inicialmente, os *scaffolds* de Ecovio foram imersos em solução de NaOH (1 M) por uma hora, utilizando apenas água ultrapura. Em seguida, o pTN ou HA, ou uma combinação de ambos conforme as quantidades determinadas (1 g de pTN ou HA; ou 1 g de pTN + 1 g de HA) foi adicionado a 40 mL de água ultrapura e submetido a ultrassom pulsado a 50% de potência por 15 minutos para obter uma suspensão homogeneamente dispersa. Os *scaffolds* foram então imersos na suspensão contendo o pTN e/ou HA e expostos ao ultrassom por 30 minutos. Finalmente, os *scaffolds* recobertos com pTN e/ou HA foram lavados três vezes com água ultrapura para remover partículas não ancoradas e secos em estufa a vácuo a 40°C por 24 horas. A Figura 4.6 ilustra o procedimento da modificação superficial dos *scaffolds*. Os *scaffolds* foram nomeados usando abreviações dos componentes presentes na formulação conforme apresentado na Tabela 4.3.

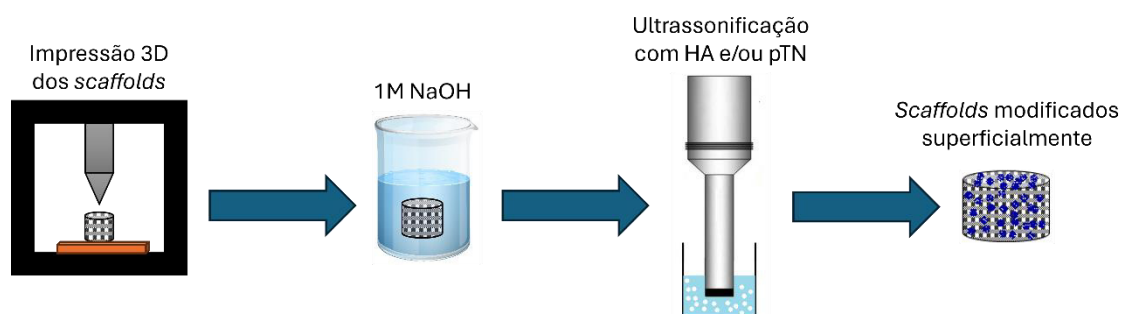


Figura 4.6 - Representação esquemática da modificação superficial dos *scaffolds*. Adaptado de [154].

Tabela 4.3 - Nomenclatura e descrição das diferentes formulações de *scaffolds* com base em Ecovio, tratamentos de NaOH, Tanfloc purificado (pTN) e hidroxiapatita (HA).

Composição	Nomenclatura	Descrição
Ecovio	Eco	<i>Scaffold</i> à base de Ecovio sem qualquer tratamento.
Ecovio + NaOH	Eco-N	<i>Scaffold</i> à base de Ecovio tratado com NaOH
Ecovio + NaOH + HA	Eco-N-HA	<i>Scaffold</i> à base de Ecovio tratado com NaOH e com HA.
Ecovio + NaOH + pTN	Eco-N-pTN	<i>Scaffold</i> à base de Ecovio tratado com NaOH e com pTN.
Ecovio + NaOH + pTN + HA	Eco-N-pTN-HA	<i>Scaffold</i> à base de Ecovio tratado com NaOH e com pTN e HA.
Ecovio + HA	Eco-HA	<i>Scaffold</i> obtido a partir do biocompósito Ecovio com HA sem tratamento adicional.

- Caracterização morfológica

A morfologia dos *scaffolds* antes e após a modificação superficial foi avaliada por MEV utilizando o equipamento Tescan MIRA FEG operado na tensão de aceleração de 5 kV. Foram analisados a face superior das amostras.

Antes da análise, estas amostras foram fixadas em suportes de alumínio com fita condutiva dupla face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro.

- Caracterização mecânica

A caracterização mecânica dos *scaffolds* foi realizada por meio de testes de compressão uniaxial, de acordo com a norma ASTM D 695-15, em uma máquina universal de ensaios Instron, modelo 5569, usando uma célula de carga de 500 N, velocidade de travessa de 1,3 mm/min e utilizando o software Bluehill 2.15. Foram medidos pelo menos 7 *scaffolds* para cada formulação.

A análise comparativa entre os valores médios de módulo elástico foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

- Ângulo de contato

A análise de ângulo de contato foi realizada com o objetivo de avaliar a molhabilidade dos *scaffolds* descritos na Tabela 4.3. Os *scaffolds* foram colocados em uma plataforma plana, e gotas com 7 µL de água ultrapura foram dispensadas com um tensiômetro óptico (Biolin Scientific - Attension, TF3000-Plus). O ângulo de contato foi medido após 10 s utilizando o software OneAttension. Foram realizadas cinco medidas para cada composição.

- Rugosidade da superfície

A microscopia de força atômica (AFM) foi utilizada para avaliar a rugosidade dos *scaffolds*. Um microscópio Bruker, modelo Multimode 8, foi utilizado no modo ScanAsyst (contato automático). Utilizando o software Gwyddion, os valores de rugosidade RMS (root mean square) da superfície dos *scaffolds* foram obtidos a partir da imagem topográfica com 5 µm x 5 µm. Três medidas foram realizadas para cada amostra, e a rugosidade média ± desvio padrão foi calculada.

- Ensaio in vitro de bioatividade

O teste de fluido corporal simulado (SBF) foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade de mineralização dos *scaffolds*. O ensaio foi realizado conforme descrito na seção anterior. Após 21 dias, as amostras foram lavadas com água ultrapura, secas em dessecador, e analisadas por MEV para avaliar a formação de fosfatos de cálcio na superfície dos *scaffolds*.

- Avaliação in vitro da biocompatibilidade utilizando células MC3T3-E1

As amostras foram esterilizadas com álcool a 70% e luz UV em ambos os lados por 15 minutos. Após a esterilização, as amostras foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS), colocadas em uma placa de 48 poços e pré-incubadas com 1000 µL do meio contendo 89% v/v de α -MEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Vitrocell) e 1% de antibiótico-antimicótico (Vitrocell) por 24 horas em uma incubadora (série II 3110, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C, umidificada e contendo 5% de CO₂. Após a pré-incubação, células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1), previamente cultivadas, foram semeadas nas amostras usando uma gota de 50 µL com 50.000 células e as placas foram incubadas por 30 minutos. Em seguida, 450 µL de meio foram adicionados adicionalmente a cada poço e as placas foram incubadas por 1 e 7 dias a 37 °C com 5% de CO₂, trocando o meio a cada 2 - 3 dias. Após o primeiro dia de cultivo, as amostras foram transferidas para uma nova placa de cultura.

Seguindo o protocolo do fornecedor, o ensaio de resazurina (#R7017, Millipore-Sigma) foi utilizado para avaliar a proliferação celular. Após 1 e 7 dias de cultura, o meio foi removido, 500 µL de uma solução de meio/resazurina (90/10) foi adicionada por poço e a placa foi incubada no escuro por 4 horas a 37 °C. Três amostras por composição foram analisadas, incluindo três controles negativos contendo solução de resazurina livre de células. Posteriormente, 100 µL da solução de todas as amostras foi transferida para uma placa onde a medida de absorbância foi realizada em um leitor de placas SpectraMax i3 - Molecular Devices (570 nm e 600 nm). As análises estatísticas entre os grupos amostrais foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$.

A adesão e proliferação celular foi avaliada também por MEV. Após 1 e 7 dias de cultura, o meio foi removido e as amostras foram lavadas com 1 ml de PBS por 2 vezes. Em seguida, 1 ml da solução de glutaraldeído (concentração de 2,5% em PBS) foi inserido a cada poço contendo a amostra e deixado por 30 minutos. Após este tempo a solução foi removida e as amostras lavadas 2 vezes com PBS. Logo em seguida as mesmas passaram por uma série de desidratação com etanol nas concentrações de 50, 70, 90 e 100 %. Após a desidratação, as amostras foram secas em dessecador sob vácuo e posteriormente submetidas à metalização com ouro. As imagens de MEV foram obtidas em um equipamento Tescan MIRA FEG operado na tensão de aceleração de 5 kV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização do Tanfloc

Tanfloc foi purificado por diálise para remover ácido fórmico e íons cloreto de seu processo de síntese [120]. A diálise foi realizada durante 4 horas (pTN4) e 12 horas (pTN12). A Figura 5.1 mostra as imagens de MEV do Tanfloc antes e depois da diálise. O Tanfloc comercial apresenta íons de cloreto, cálcio e potássio, que promovem a formação de partículas esféricas com uma superfície lisa. Os íons de cloreto formam interações iônicas com o nitrogênio positivo do Tanfloc; e os íons de cálcio e potássio podem interagir com os elétrons da ligação C=C fenólica do Tanfloc. Após a diálise, os íons de cloreto, cálcio e potássio são removidos, e a estrutura é perturbada, como observado na Figura 5.1 para pTN4 e pTN12 [118]. A análise de EDS (em % de massa) revelou que o processo de diálise removeu as impurezas conforme Tabela 5.1. Os dois tempos de diálise (4 e 12 horas) produziram resultados muito semelhantes.

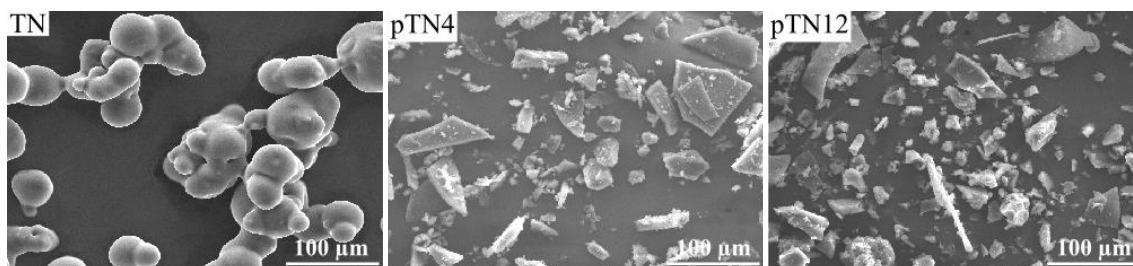


Figura 5.1 - Imagens de MEV do tanfloc (TN) antes e após 4h (pTN4) e 12h (pTN12) de diálise.

Tabela 5.1 - Resultados da análise de EDS (em % de massa) do Tanfloc antes e após diálise.

Íon	TN (%m)	pTN4 (%m)	pTN12 (%m)
K ⁺	0,68%	0,01%	0,02%
Ca ²⁺	0,15%	0,02%	0,01%
Cl ⁻	16,43%	9,60%	8,08%

Os espectros FTIR do Tanfloc antes e depois da diálise (Figura 5.2) mostraram diferenças significativas, confirmando a remoção de impurezas após o processo de diálise. O deslocamento da banda de 1462 cm⁻¹ (TN) para 1458

cm^{-1} (pTN12 e pTN4), e o deslocamento da banda de 1608 cm^{-1} (TN) para 1602 cm^{-1} (pTN12 e pTN4), referentes ao estiramento da ligação C=C de grupos fenólicos, indicam a remoção dos íons de cálcio e potássio. Além disso, o espectro do Tanfloc apresenta uma banda em 1735 cm^{-1} , atribuída aos grupos éster de taninos hidrolisados, que foram extraídos junto com os taninos condensados da casca da *Acacia mearnsii*, popularmente chamada de Acácia Negra. O desaparecimento dessa banda nos taninos purificados (pTN4 e pTN12) evidenciou a eficiência da purificação na remoção do tanino hidrolisado [57].

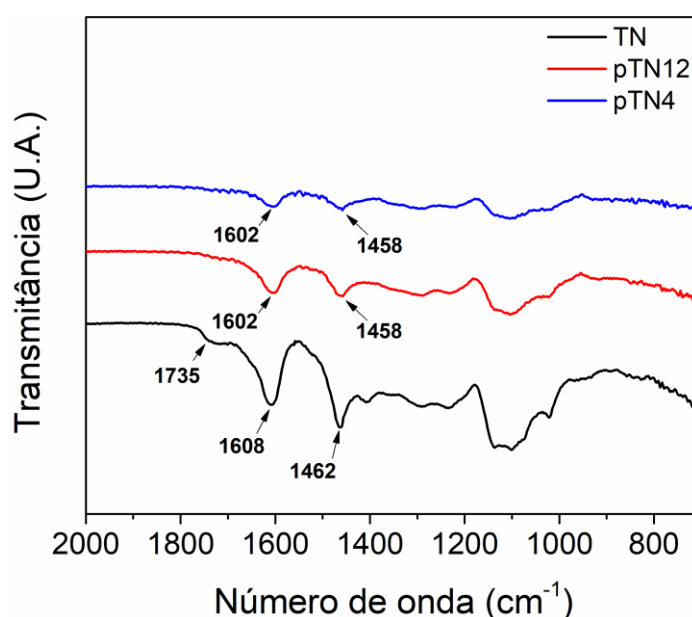
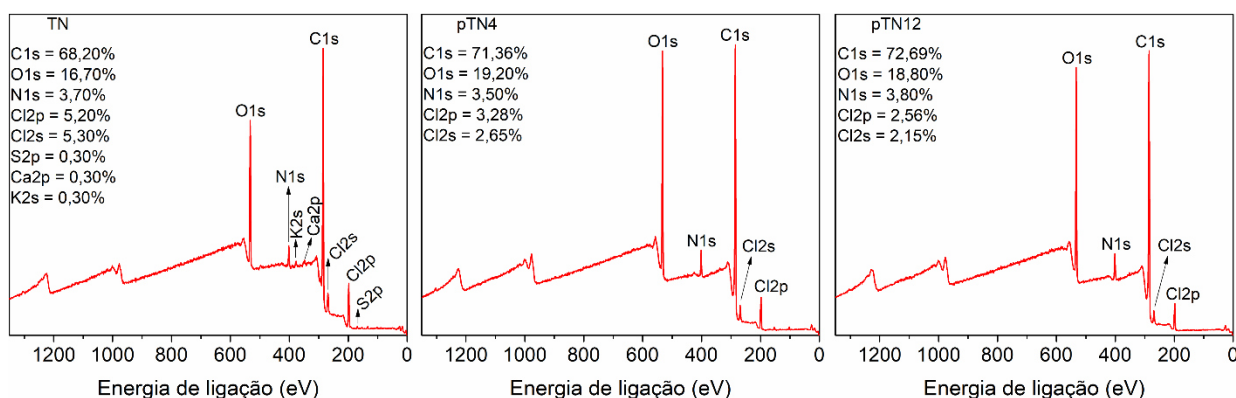


Figura 5.2 - (a) Espectros de FTIR do TN antes e após diálise por 4h (pTN4) e 12h (pTN12).

Os resultados de XPS também confirmaram a purificação do Tanfloc (Figura 5.3(a)). Após a diálise, a concentração de cloro diminuiu de 10,5 at% (TN) para 5,93 at% (pTN4) e 4,71 at% (pTN12). Além disso, o procedimento de diálise removeu potássio (0,30 at.%), cálcio (0,30 at.%) e enxofre (0,30 at.%) do Tanfloc. Os espectros de XPS obtidos de TN, pTN4 e pTN12 mostraram picos característicos para carbono (C1s, 284 eV), oxigênio (O1s, 532 eV) e nitrogênio (N1s, 399 eV), como esperado devido à sua estrutura química. Os espectros de XPS de alta resolução para N1s de tanino antes e após a purificação são mostrados na Figura 5.3(b). Os grupos químicos $-\text{NH}_3$ e $-\text{NH}_2$ são identificados no tanino purificado (pTN4 e pTN12). A porção funcionalizada com amino

relacionada à estrutura do TN é confirmada pela ocorrência das funcionalidades -NH_2 ($\sim 399,7$ eV) e -NH_3^+ ($\sim 401,8$ eV) [120]. Durante o processo de diálise, o TN purificado mantém tanto grupos amino protonados quanto não protonados, aumentando ligeiramente a forma não protonada. Isso pode ocorrer devido ao pH da água de diálise (aproximadamente 5,5), que está próximo do pK_a do grupo amino protonado ($\text{pK}_a = 6,0$), conforme relatado em outros estudos [120,155].

(a)



(b)

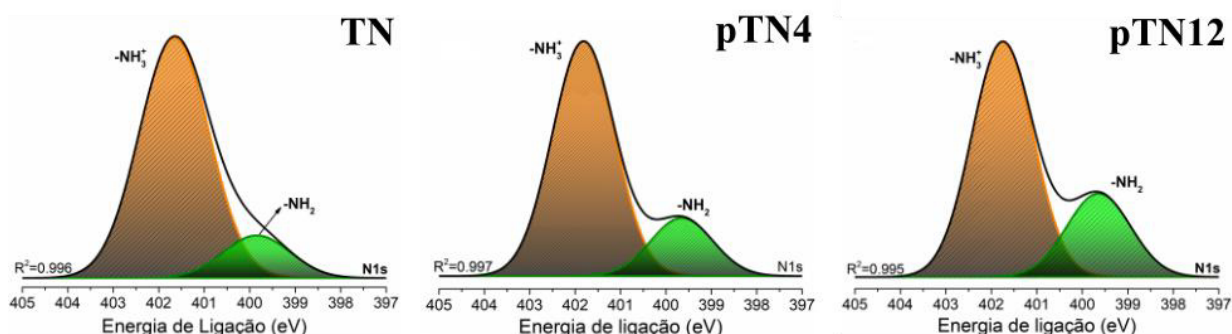


Figura 5.3 - (a) Espectro XPS (survey) do TN antes e após purificação. (b) Espectro de alta resolução dos envelopes N1s obtidos na superfície do TN antes e após purificação.

Os resultados de MEV-EDS, FTIR e XPS mostraram que o processo de diálise é eficaz para a purificação do Tanfloc. Considerando a pureza semelhante obtida após 4 e 12 horas de diálise, e o maior rendimento obtido em 4 horas (56%), em comparação com 5,8% para 12 horas, o tempo de 4 horas foi escolhido para a fabricação dos biocompósitos. Para discussões posteriores, o tanino purificado selecionado (diálise de 4 horas) foi chamado de pTN.

5.2 Caracterização dos biocompósitos produzidos via misturador interno.

- Processamento no misturador interno

Os biocompósitos foram produzidos por processamento em fusão em um misturador interno acoplado a um reômetro de torque. A Figura 5.4 apresenta as curvas de torque em função do tempo para o Ecovio puro e amostras contendo pTN e HA (conforme Tabela 4.1). Os resultados mostram que a adição de 10% em massa de HA causou um notável aumento no torque de equilíbrio do Ecovio de 0,5 Nm para 1,0 N m, sugerindo uma maior resistência ao fluxo. Esse comportamento é consistente com estudos que relatam o aumento de torque em poliésteres na presença de cargas inorgânicas, como a hidroxiapatita [156]. A HA atua como uma restrição adicional ao movimento das cadeias poliméricas e reduz o limiar para o emaranhamento dessas cadeias, o que contribui para o aumento do torque observado durante o processamento [156].

Já a adição de 10% em massa de pTN não resultou em variação de torque. Esse resultado pode estar associado à natureza do tanino, que pode agir como um compatibilizante ou aditivo que não provoca um aumento considerável na viscosidade do sistema.

A adição simultânea de 10% em massa de HA e 10% em massa de tanino resultou em um valor de torque de equilíbrio ligeiramente mais alto (1,1 N m) do que o biocompósito Ecovio/HA. Esse aumento pode ser atribuído a uma possível interação sinérgica entre o pTN e a HA, que melhora a dispersão das partículas na matriz polimérica e aumenta a resistência ao fluxo. Na literatura há registros de formação de redes de interações físicas entre taninos e hidroxiapatita [157,158].

Esses resultados sugerem que não houve degradação severa do polímero na presença de pTN e HA; portanto, o processamento em fusão é adequado para a fabricação do biocompósito.

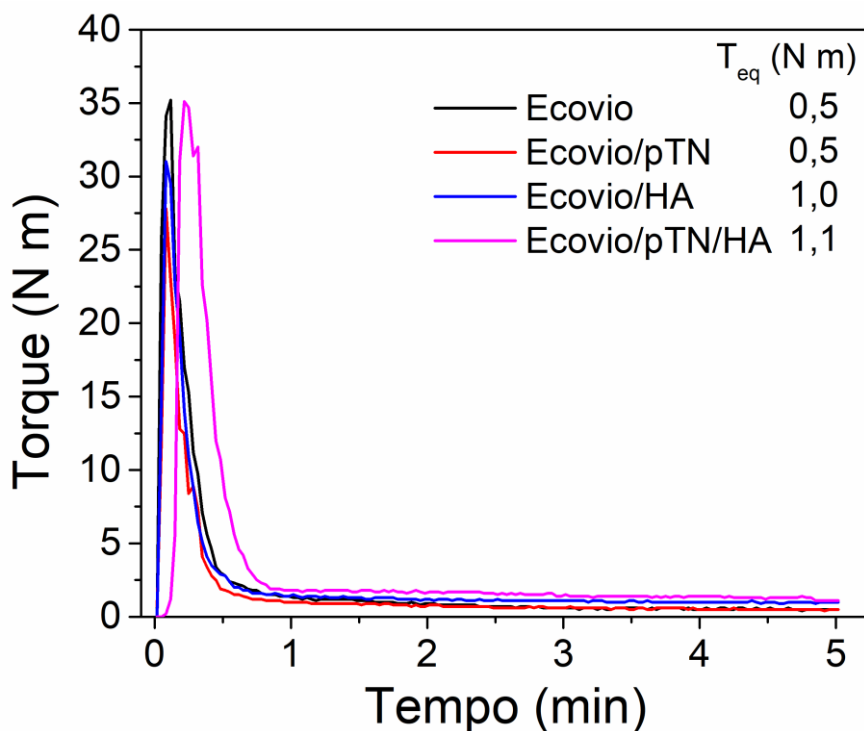


Figura 5.4 - Variação do torque em função do tempo de mistura para o Ecovio e as amostras contendo hidroxiapatita (HA) e tanfloc purificado (pTN).

- Caracterização morfológica

A Figura 5.5 ilustra as micrografias das amostras prensadas, que foram criofraturadas em secção transversal. As imagens de MEV demonstram que a inclusão de Tanfloc e HA influenciam a morfologia do Ecovio. A micrografia do Ecovio revela uma superfície com uma estrutura bifásica, composta por regiões de aspecto rugoso, correspondentes ao PBAT (superfície de fratura dúctil), e regiões de aspecto liso, associadas ao PLA (fratura frágil). Essa diferença é consistente com o fato de que o PLA possui uma temperatura de transição vítrea (T_g) em torno de 60 °C, o que tende a resultar em uma fratura mais lisa em comparação ao PBAT ($T_g \cong -40^\circ\text{C}$). Essas características, indicadas na imagem por setas, sugerem que se trata de uma blenda imiscível.

A imagem de MEV-EDS do Ecovio/pTN mostra que microscopicamente, o pTN aparenta estar mal distribuído e disperso de forma irregular, com alguns aglomerados na matriz polimérica. No entanto, em uma escala macroscópica, o material parece homogêneo, com coloração uniforme. A cor natural mais escura do Tanfloc confere as amostras com tanino uma aparência mais escura (Figura 5.6), indicando uma mistura adequada entre o tanino e o Ecovio.

A imagem de MEV do Ecovio/HA revela uma seção transversal áspera e densa em comparação com a amostra de Ecovio. O biocompósito exhibe partículas de HA que têm uma morfologia irregular e estão uniformemente dispersas, com alguns pequenos aglomerados dentro da matriz, como indicado pelos elementos químicos cálcio e fósforo no EDS. Essa dispersão sugere uma boa dispersão e distribuição da HA; portanto, adicionar HA pode melhorar as propriedades térmicas e mecânicas do biocompósito.

A adição simultânea de pTN e HA resultou em uma área mais rugosa. A análise de EDS indicou a presença de cloro, cálcio e fósforo, componentes do pTN e do HA. A análise de EDS sugere ainda que a distribuição de pTN é melhorada quando o HA é incorporado simultaneamente. O aumento no torque de equilíbrio (Figura 5.4) resultante da adição de HA ao Ecovio indica maiores tensões viscosas, permitindo uma melhor distribuição do pTN. Portanto, a presença de HA pode ter influenciado as condições de processamento, melhorando assim a mistura e dispersão geral de todos os componentes. Além disso, a interação entre o HA e o pTN potencialmente facilita a dispersão uniforme das partículas de pTN dentro da matriz. É importante notar que os taninos têm sido relatados formando redes com a hidroxiapatita [157,158].

Um fato a ser observado nas micrografias com a adição de HA (Figuras 5.5 (c) e (d)) é a mudança na morfologia, apresentando uma co-continuidade. Quando HA é adicionada ao sistema, ela pode atuar como um agente compatibilizante, promovendo uma maior interação entre as fases da blenda e favorecendo uma distribuição mais homogênea. Isso pode resultar em uma estrutura onde ambas as fases, PLA e PBAT, formam uma rede interconectada, característica da morfologia co-contínua.

Essa morfologia co-contínua é mais provável de se formar quando há uma compatibilização efetiva entre as fases, o que pode ser induzido pela presença de partículas de enchimento como a HA. Essas partículas podem se posicionar na interface entre as fases, reduzindo a energia interfacial e facilitando a formação de uma rede co-contínua. A ausência dessa morfologia nas amostras de Ecovio e Ecovio/pTN indica que, sem a presença de HA, a interação entre as fases de PLA e PBAT não é forte o suficiente para promover essa estrutura.

Além disso, a presença de HA pode alterar as propriedades reológicas da mistura, aumentando a viscosidade relativa das fases e dificultando a

segregação de uma das fases, o que também favorece a formação de uma morfologia co-contínua. Portanto, a combinação de HA com pTN na blenda parece ajudar a estabilizar a microestrutura e promover uma distribuição mais equilibrada das fases do material.

Essa explicação é consistente com a literatura, que muitas vezes relata o papel das partículas inorgânicas como agentes que promovem a compatibilização e estabilização da morfologia co-contínua em blendas de polímeros imiscíveis [159,160].

Quanto a localização preferencial das cargas, através da análise de EDS, observa-se que aparentemente a HA tem uma tendência a se concentrar mais na interface entre as fases, reforçando a tese de que ela pode estar atuando como um compatibilizante físico, estabilizando a interface entre o PLA e o PBAT, o que é coerente com a literatura sobre o comportamento de partículas inorgânicas em blendas imiscíveis mencionado anteriormente. Já o pTN parece ter uma localização preferencial na fase PLA.

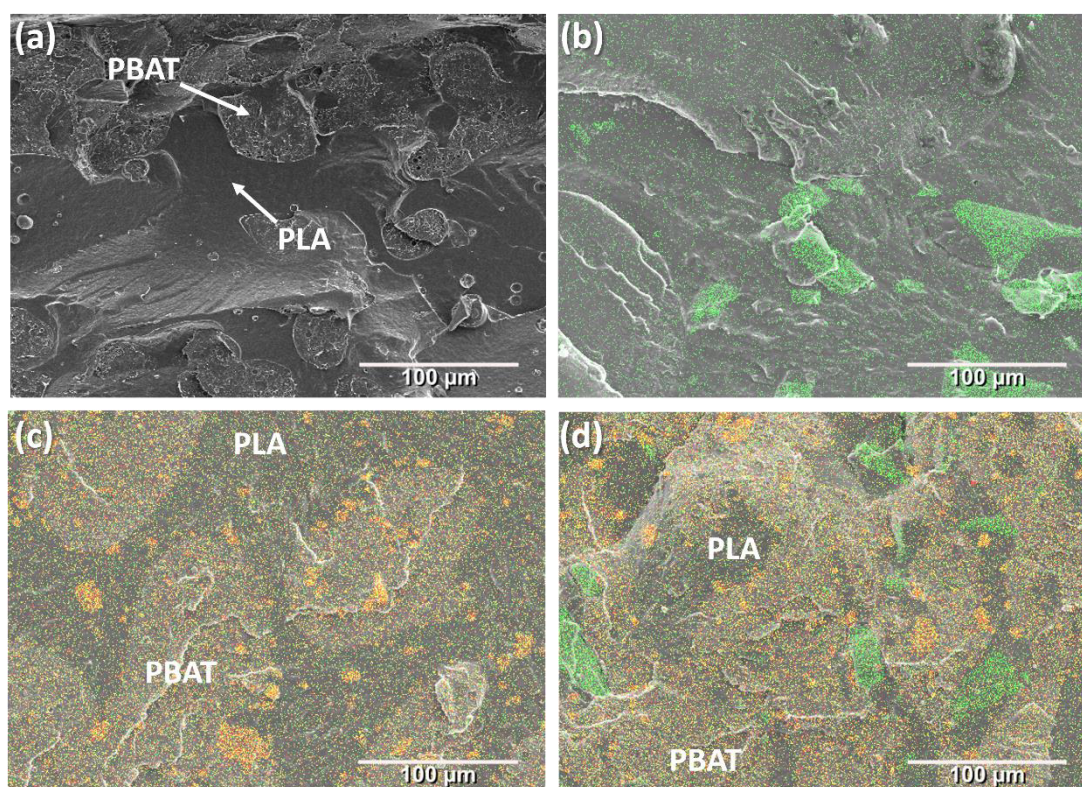


Figura 5.5 - Imagens de MEV da secção transversal das amostras processadas no misturador interno (a) Ecovio, (b) Ecovio/pTN, (c) Ecovio/HA e (d) Ecovio/pTN/HA. As imagens da secção transversal no MEV estão sobrepostas

com o mapeamento de EDS para cloro (verde), cálcio (vermelho) e fósforo (amarelo).

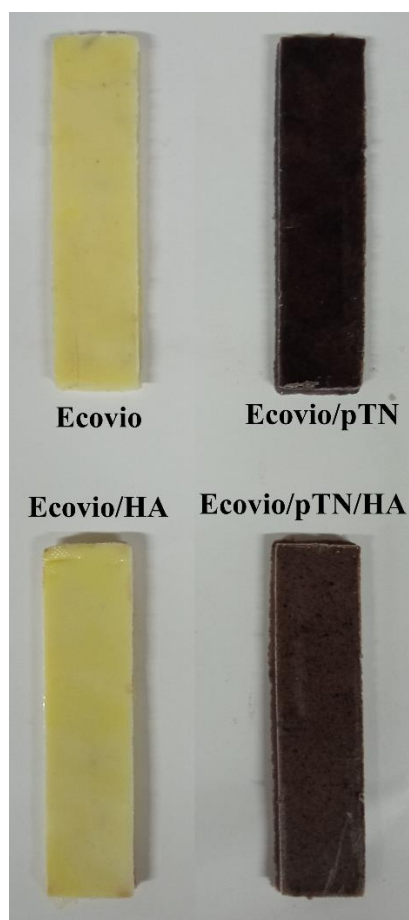


Figura 5.6 - Imagem das amostras prensadas.

- Caracterização térmica

Os resultados de DSC obtidos da 2ª curva de aquecimento (Figura 5.7 (a) e Tabela 5.2) mostram a presença de uma temperatura de transição vítrea (T_g) em torno de 60 °C, referente ao PLA [24]. Com a presença de HA e pTN, a temperatura de transição vítrea não sofre variações significativas.

Aproximadamente a 125 °C, um pico exotérmico corresponde à cristalização a frio do conteúdo de PLA no Ecovio. Esse processo envolve a reorganização de regiões amorfas em regiões cristalinas devido à maior flexibilidade e mobilidade macromolecular com o aumento da temperatura [161,162]. HA e pTN no Ecovio levam a uma cristalização a frio mais perceptível, implicando em cristalização incompleta durante o ciclo de resfriamento do DSC.

A presença de pTN e HA induziu a entalpias de cristalização a frio mais altas, temperaturas de cristalização a frio mais baixas e graus de cristalização reduzidos. Esse efeito nota-se maior quando a hidroxiapatita foi combinada com pTN (Ecovio/pTN/HA), indicando que a presença desses componentes dificultaram a cristalização das frações de PLA durante o processamento, fazendo com que a cristalização ocorresse durante o aquecimento no DSC [163]. A diminuição da cristalinidade do PLA é benéfica para aplicações biomédicas, já que o PLA amorfo se degrada mais rapidamente do que o cristalino. O longo tempo de reabsorção do PLA (meses a anos) é uma preocupação séria na área de engenharia de tecidos, pois a velocidade da degradação do material deve ser semelhante à regeneração do tecido [164].

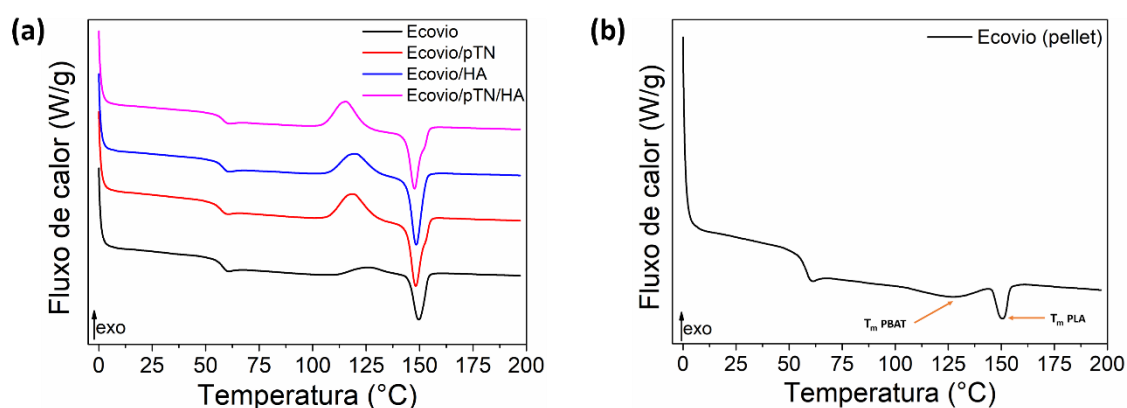


Figura 5.7 - Curvas de DSC no segundo aquecimento: (a) do Ecovio e dos biocompósitos contendo hidroxiapatita e pTN após processamento no misturador interno; (b) do Ecovio antes do processamento.

Tabela 5.2 - Dados obtidos das curvas DSC durante o segundo aquecimento.

Amostra	$T_{g\text{ PLA}}$ (°C)	T_{cc} (°C)	ΔH_{cc} (J g ⁻¹) 1)	$T_{m1\text{ PLA}}$ (°C)	$T_{m2\text{ PLA}}$ (°C)	ΔH_m (J g ⁻¹)	X_c^a (%)
Ecovio	58 ± 0*	125 ± 0*	2 ± 0*	149 ± 0	—	6 ± 0*	10 ± 1
Ecovio/pTN	57 ± 0*	118 ± 1	9 ± 1	148 ± 1	153 ± 0* ^b	11 ± 1	5 ± 2
Ecovio/HA	58 ± 0*	120 ± 1	6 ± 0*	149 ± 0*	—	9 ± 0*	7 ± 0*
Ecovio/pTN/HA	58 ± 1	115 ± 1	7 ± 0*	147 ± 0*	153 ± 1 ^b	9 ± 0*	6 ± 0*

Onde: * são valores de desvio padrão menores que 0,5 e onde o arredondamento tende a 0; ^a cristalinidade relacionada ao PLA; ^b aparece como um ombro.

A formação de cristais durante o segundo aquecimento resultou em um pico de fusão bimodal em aproximadamente 147-149 °C (T_{m1}) e em torno de 153 °C (T_{m2}). Esses picos correspondem a dois tipos diferentes de cristais resultantes da formação de pequenos cristais imperfeitos que posteriormente se transformam em cristais mais estáveis através da fusão e recristalização [163,165]. Esse pico duplo é comum em poliésteres, e sua presença é justificada na literatura por um mecanismo de fusão/recristalização/refusão [24,162]. Nas amostras Ecovio/pTN e Ecovio/pTN/HA, os dois picos de fusão aparecem como um ombro em temperaturas mais altas, sugerindo a presença de uma pequena quantidade de cristalitos imperfeitos com uma distribuição bimodal de tamanho [163]. Como mencionado, a presença simultânea de pTN e HA resultou em um maior impacto na cristalização, consequentemente afetando o processo de fusão.. A sobreposição entre a região de fusão do PBAT e a região de cristalização a frio do PLA nos compósitos de PLA/PBAT dificulta a determinação da temperatura de fusão do PBAT nas misturas e pode levar a uma subestimação possível de ΔH_{cc} do PLA. Essa subestimação pode causar erros no cálculo do grau de cristalinidade e nos valores de T_{cc} [24,162]. Portanto, os valores reais do grau de cristalinidade podem ser ainda menores do que os apresentados na Tabela 5.2.

O Ecovio trata-se de uma blenda imiscível, na Figura 5.7 (a) não é possível observar isso, mas na curva de DSC obtida no 2° aquecimento (Figura 5.7(b)) do material antes do processamento no misturador interno, observou-se

dois picos relacionados aos pontos de fusão de PBAT e PLA, em torno de 127 °C e 151 °C, respectivamente, indicando a imiscibilidade da blenda, dados semelhantes foram relatados na literatura [102]. Na curva DSC do Ecovio após o processamento no misturador interno (Figura 5.7 (a)), o pico de fusão relacionado ao PBAT não é mostrado, o que pode ser explicado pelo fato de estar na mesma faixa de temperatura que o pico de cristalização a frio referente à fase PLA [162,166].

As curvas de TGA (Figura 5.8 (a)) e a Tabela 5.3 mostraram que todas as composições são termicamente estáveis abaixo de 330 °C, o que é adequado para processamento em altas temperaturas. A adição de HA aumentou ligeiramente a temperatura de início de decomposição (T_{onset}) do Ecovio de 347 °C para 351 °C, enquanto na amostra com tanino (Ecovio/pTN), houve uma redução em T_{onset} para cerca de 332 °C. No entanto, nas amostras com HA e pTN simultaneamente (Ecovio/pTN/HA), a redução foi atenuada. A presença da HA contrabalançou o efeito do tanino.

A redução da T_{onset} na presença de pTN ocorre devido ao efeito catalítico do tanino. Sendo um polifenol, o pTN possui grupos funcionais que interagem com a matriz polimérica, acelerando a degradação, especialmente em polímeros como PLA. Essa interação diminui a estabilidade térmica do compósito, reduzindo a energia de ativação necessária para iniciar a degradação e, conseqüentemente, abaixando a T_{onset} , esse feito foi observado em nanocompósitos de PLA com tanino [167]. No entanto, quando HA é adicionada junto ao tanino, essa queda na T_{onset} é atenuada. Em um estudo conduzido por Kadhim *et al.* [168], foi desenvolvido um compósito biodegradável à base de PBAT e HA, sugerem que cargas inorgânicas como a HA podem exercer um efeito de proteção na matriz polimérica, reduzindo a taxa de perda de massa durante a decomposição Além disso, a melhora da estabilidade térmica nos compósitos pode ser atribuída também a uma sólida interação” entre a HA e cadeias do PBAT.

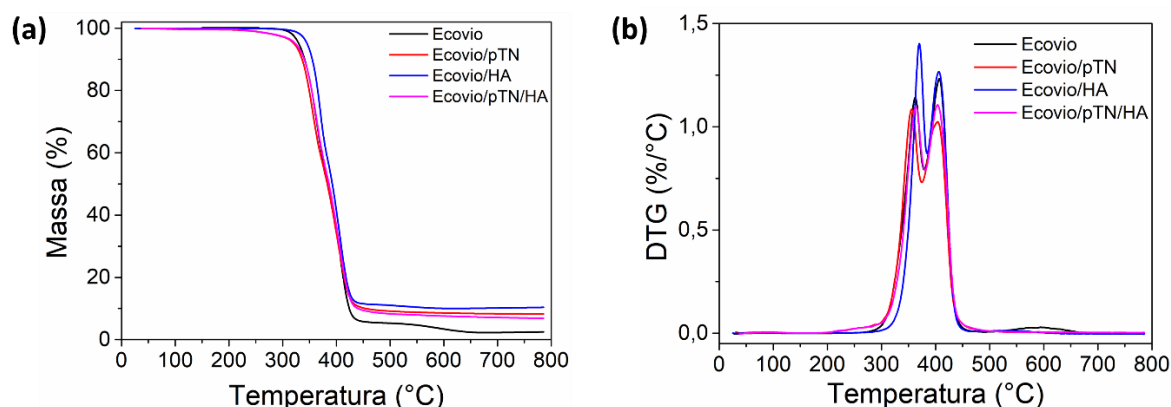


Figura 5.8 - (a) Curvas de TGA e (b) derivadas das curvas de TGA do Ecovio e biocompósitos contendo HA e pTN.

Tabela 5.3 - Dados obtidos das curvas de TGA e DTG.

Amostra	T _{onset} (°C)	T _{max} - PLA (°C)	T _{max} - PBAT (°C)	Resíduo (%)
Ecovio	347 ± 1	360 ± 3	407 ± 1	2 ± 1
Ecovio/pTN	332 ± 1	356 ± 0*	403 ± 0*	8 ± 0*
Ecovio/HA	351 ± 0*	369 ± 1	406 ± 0*	10 ± 0*
Ecovio/pTN/HA	345 ± 2	364 ± 1	403 ± 1	14 ± 2

Onde: * são valores de desvio padrão menores que 0,5 e onde o arredondamento tende a 0.

A primeira derivada das curvas termogravimétricas (DTG) (Figura 5.8 (b)) exibe decomposição em dois passos, onde o primeiro evento corresponde à decomposição do PLA e o segundo está relacionado à decomposição do PBAT [102,162]. As temperaturas relacionadas a cada etapa estão mostradas na Tabela 5.3. O PBAT possui uma maior estabilidade térmica do que o PLA, o que pode ser atribuído à presença de uma unidade aromática em sua estrutura molecular [169].

Foi observada uma massa residual em todas as amostras, incluindo a blenda, o que pode ser explicado pelos anéis de benzeno na estrutura do PBAT, que normalmente resultam em uma maior quantidade de carbono remanescente [170]. Da mesma forma, o teor de massa residual nas amostras com tanino pode

estar relacionado à sua natureza aromática [57,118]. Esses fatores contribuem para um aumento na massa residual das amostras. Todos os biocompósitos contendo HA apresentaram resíduo semelhante às composições nominais, indicando que esta carga foi incorporada efetivamente na matriz polimérica.

- Caracterização reológica

A Figura 5.9 e a Tabela 5.4 apresentam os resultados das medidas nos regimes estacionário e oscilatório realizadas a 170 °C. No estado estacionário, o Ecovio não apresenta um patamar Newtoniano em baixas taxas de cisalhamento, mas uma viscosidade que continua a diminuir com o aumento da taxa de cisalhamento até 10 s⁻¹. Com um valor inicial de viscosidade medido em 0,02 s⁻¹ (η_0) de 157 Pa s e um índice de lei de potência (n) medido entre 0,05 e 5 s⁻¹ de 0,63; esse comportamento difere dos termoplásticos tradicionais devido à sua estrutura macromolecular, uma vez que o desemaranhamento das cadeias ocorre a partir de deformações aplicadas muito baixas. A adição de pTN levou a uma diminuição na viscosidade (η_0 de 78 Pa s, respectivamente) em baixas taxas de cisalhamento, indicando que ele pode atuar como agente lubrificante entre as macromoléculas. Embora a T_{onset} das amostras contendo pTN tenha sido ligeiramente reduzida em relação ao Ecovio, os resultados de TGA indicam que essa diminuição na estabilidade térmica ocorre em temperaturas significativamente mais altas que as condições de processamento (170°C), sugerindo que a degradação térmica do pTN durante o processamento pode ser considerada mínima. Por outro lado, a adição de HA, mesmo na presença de tanino, aumentou a viscosidade em baixas taxas de cisalhamento devido à restrição física causada por essa micropartícula [171].

Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') foram avaliados em função da frequência de oscilação (ω , entre 0,1 e 500 rad s⁻¹). Todas as amostras apresentaram um comportamento predominantemente viscoso ($G'' > G'$) em baixas frequências de oscilação. O aumento da frequência implica em um tempo de resposta mais curto do material à deformação aplicada; portanto, uma inversão de comportamento ($G' > G''$) foi observada em altas frequências (Tabela 5.4) apenas para Ecovio. As interações entre as partículas de tanino ou hidroxiapatita e a blenda Ecovio podem não ser suficientemente fortes para criar

uma estrutura de rede estável que confira um comportamento elástico ao material. Também vale ressaltar que a presença de hidroxiapatita nas amostras pode levar à formação de uma rede de interações físicas dentro da matriz de Ecovio, o que está de acordo com a análise de MEV-EDS indicando uma boa dispersão e distribuição entre os dois componentes. Esse comportamento pode aumentar a viscosidade do material em altas frequências, levando a um comportamento mais viscoso. Além disso, as interações de ligação de hidrogênio entre as moléculas de tanino e hidroxiapatita podem criar uma rede mais forte de partículas interconectadas conforme mencionado anteriormente [157,158], resultando em um comportamento elástico.

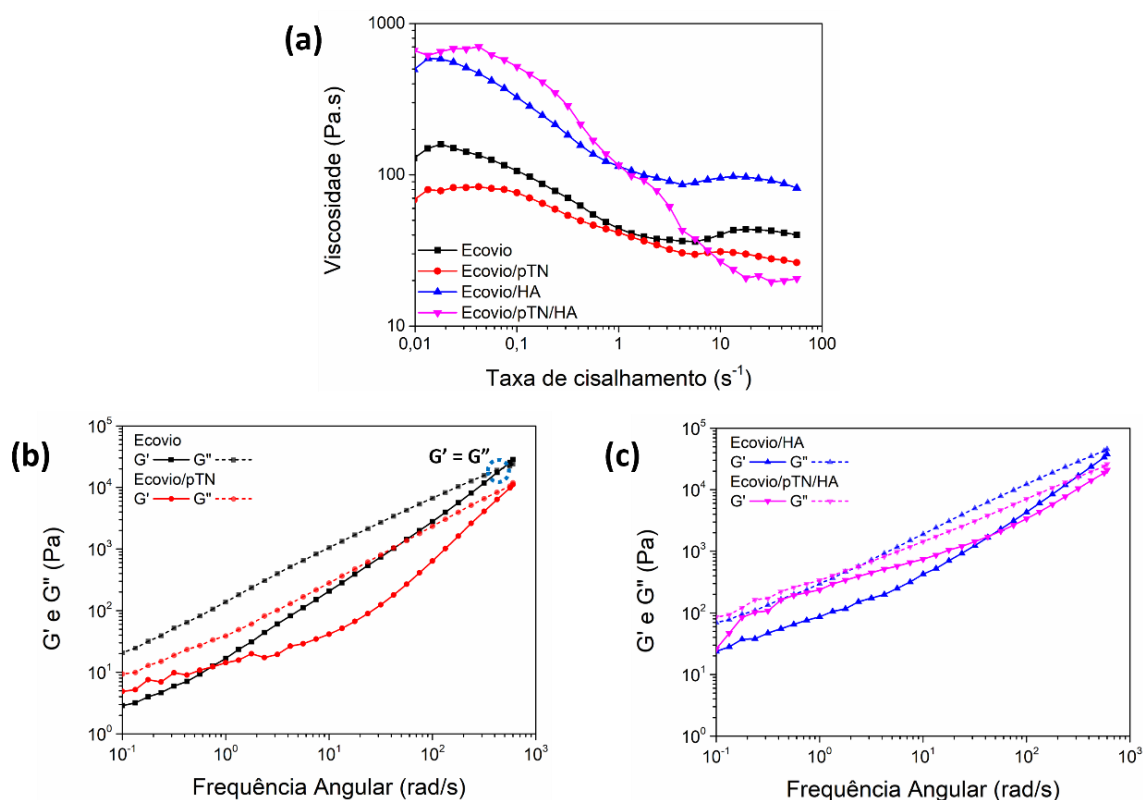


Figura 5.9 - (a) Medidas de reologia em regime permanente e (b-c) oscilatório do Ecovio e das amostras contendo hidroxiapatita e Tanfloc purificado.

Tabela 5.4 - Propriedades reológicas. A viscosidade inicial (η_0 a $0,02 \text{ s}^{-1}$) e o índice de lei de potência (n) foram extraídos das curvas em estado estacionário, e a frequência quando $G'=G''$ (ω_c) foi obtida das medidas em estado oscilatório.

Amostra	Regime permanente		Regime oscilatório
	η_0 (Pa.s)	n	ω_c (rad/s)
Ecovio	157	0,63	474
Ecovio/pTN	78	0,76	---
Ecovio/HA	583	0,54	---
Ecovio/pTN/HA	646	0,41	---

- Caracterização mecânica

A Figura 5.10 apresenta o módulo elástico do Ecovio e suas composições com pTN e HA, calculado com base na região linear entre 5% e 10% de deformação das curvas de tensão versus deformação obtidas por meio de um ensaio de compressão uniaxial. As amostras foram analisadas utilizando uma célula de carga de 500 N e não apresentaram fratura na carga máxima. O Ecovio puro apresentou um módulo de elasticidade médio de $44,7 \pm 2,7 \text{ MPa}$. A composição Ecovio/pTN exibiu valor de módulo de $32,6 \pm 3,3 \text{ MPa}$. A adição de 10% em massa de pTN levou a uma redução significativa no módulo em comparação com o Ecovio puro; a redução foi de cerca de 25%. Esse resultado provavelmente está associado à baixa dispersão do tanino no Ecovio, como ilustrado nas imagens de MEV-EDS (Figura 5.5), devido à incompatibilidade do tanino hidrofílico com os polímeros hidrofóbicos, resultando em baixa adesão na amostra Ecovio/pTN. Além das características interfaciais, o tamanho da carga pode ter afetado a distribuição de tensão entre o Ecovio e o tanino, gerando pontos de concentração de tensão e, assim, levando à ineficiência na transferência de tensão durante o ensaio de compressão. Este mesmo comportamento já foi observado em trabalhos com adição de tanino em uma matriz de PLA [172,173].

Os valores do módulo de elasticidade nos biocompósitos Ecovio/HA e Ecovio/pTN/HA foram de $46,8 \pm 2,4$ e $40,6 \pm 3,6 \text{ MPa}$, respectivamente. Observa-se que adicionar HA junto com pTN minimiza a redução do módulo de elasticidade do Ecovio quando comparado com a redução observada na amostra Ecovio/pTN. Esse comportamento está associado à capacidade de reforço da

HA para matrizes poliméricas de PLA [174], e blendas de PLA/PBAT [127]. A presença de HA proporcionou uma maior dispersão do tanino no Ecovio, como observado nas imagens de MEV-EDS, devido às maiores tensões viscosas impostas. Todas as composições apresentaram valores de módulo de elasticidade dentro da faixa requerida para engenharia de tecidos de ligamentos (25 - 93 MPa) e ossos (10 - 2000 MPa) [175,176].

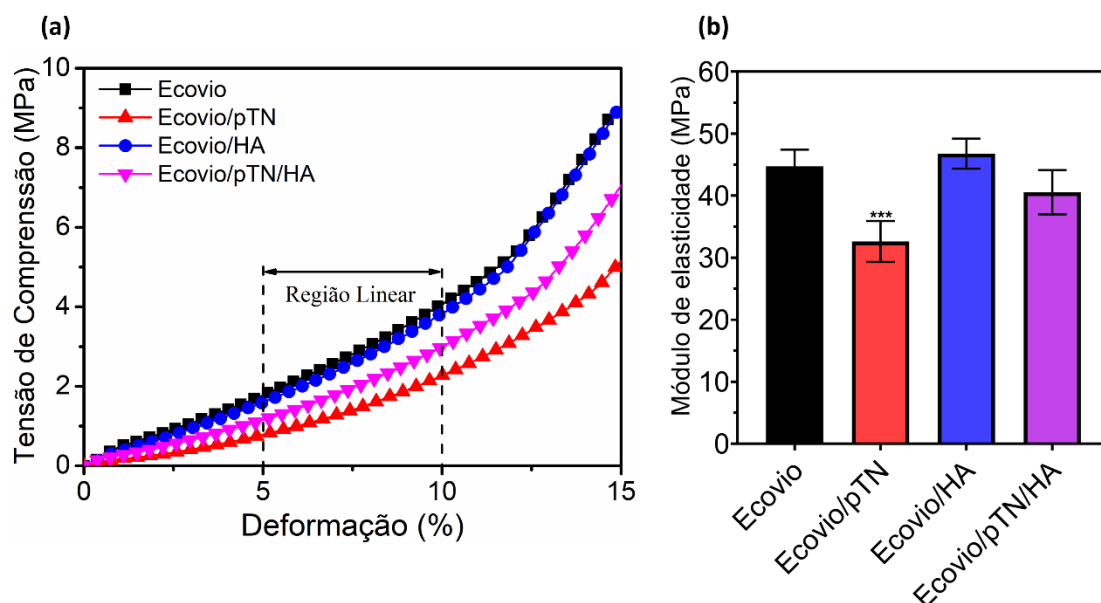


Figura 5.10 - (a) Curvas tensão versus deformação e (b) módulo elástico para o Ecovio e as composições contendo hidroxiapatita e Tanfloc purificado obtidas no ensaio de compressão uniaxial. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão e comparados ao Ecovio (***: $p < 0,001$).

- Ensaio in vitro de bioatividade

A bioatividade in vitro dos biocompósitos produzidos foi avaliada por imersão em fluido corporal simulado (SBF) durante um período de 21 dias, observando-se a formação de novos fosfatos de cálcio em suas superfícies. Este ensaio serve como uma abordagem inicial para avaliar a capacidade do material de suportar a regeneração óssea, um fator crítico para seu sucesso em engenharia de tecido ósseo [177,178]. Os resultados são apresentados na Figura 5.11.

Foi observado que as composições contendo pTN e HA exibiram a formação de fosfatos de cálcio em suas superfícies, após 21 dias de imersão das

amostras em SBF. Em contraste, isso não foi observado na amostra Ecovio, já que a blenda PLA/PBAT inerentemente não possui propriedades bioativas [125]. Sabe-se que a presença de HA nos biocompósitos aumenta a bioatividade promovendo a mineralização [67,178]. O Tanfloc pode ter contribuído para esse efeito ligando-se a íons de cálcio presentes no SBF. O alto teor de grupos fenólicos e amina do Tanfloc permitem que ele se ligue efetivamente a esses íons, potencialmente promovendo a deposição de fosfatos de cálcio em suas superfícies [56]. De maneira interessante, os resultados também sugerem que o pTN apresenta propriedades bioativas, favorecendo a mineralização óssea. Portanto, as composições contendo HA e pTN mostraram propriedades bioativas, evidenciadas pelo grande número de partículas depositadas na superfície.

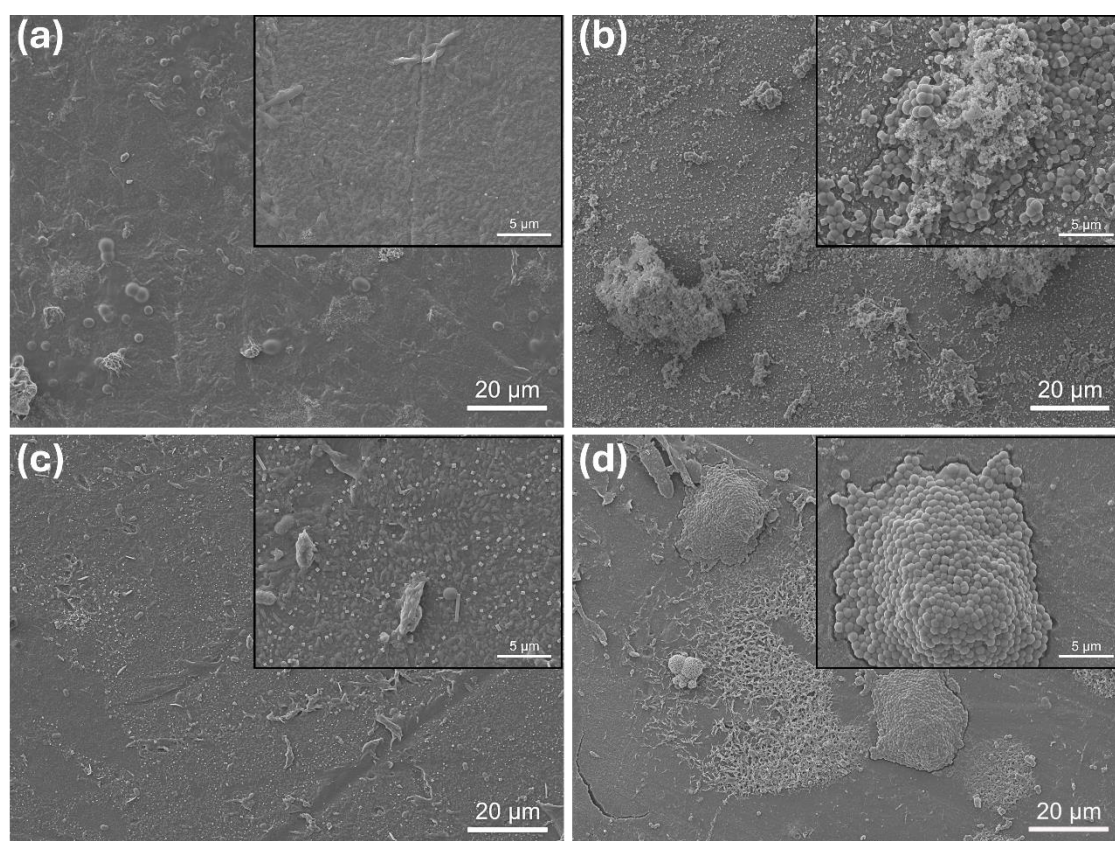


Figura 5.11 - Superfície do (a) Ecovio e das composições (b) Ecovio/pTN, (c) Ecovio/HA e Ecovio/pTN/HA após 21 dias de imersão em SBF.

- Ensaio antimicrobiano

Para aplicações em engenharia de tecidos ósseos, a prevenção de infecções é crucial para o sucesso do tratamento, por isso é de suma importância o uso de materiais com propriedades bactericida em dispositivos médicos. A atividade antimicrobiana das composições contendo pTN (Ecovio/pTN e Ecovio/pTN/HA) foram avaliadas contra as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* com base na norma JIS Z 2801:2010. As amostras sem pTN também foram testadas, mas como esperado (já que não possuem características antimicrobianas), não apresentaram atividade bactericida. A Tabela 5.5 mostra os resultados em log da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após 48 horas de incubação em contato com o controle e amostras. As cepas bacterianas usadas foram escolhidas devido à sua relevância clínica, sendo as mais comumente associadas à infecções em implantes médicos, podendo agravar processos inflamatórios, aumentando o tempo e custo de recuperação do paciente [179].

Tabela 5.5 - Resultados obtidos com os ensaios baseados na norma JIS Z 2801:2010 a partir do contato das amostras contendo pTN com as diferentes cepas bacterianas.

	Controle (log ₁₀ UFC ml ⁻¹)	Ecovio/pTN (log ₁₀ UFC ml ⁻¹)	Ecovio/pTN/HA (log ₁₀ UFC ml ⁻¹)
<i>S. aureus</i>	7,51 ± 0,14	1,00 ± 0	1,71 ± 0,58
<i>P. aeruginosa</i>	6,66 ± 0,13	1,42 ± 0,40	1,00 ± 0

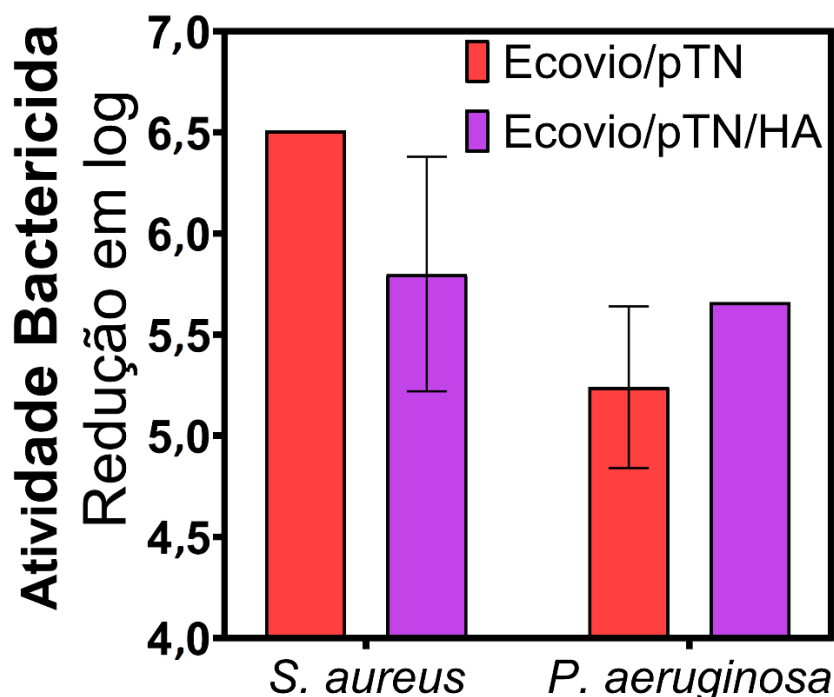


Figura 5.12 - Atividade bactericida (redução logarítmica) de duas diferentes cepas bacterianas após 48 h em contato com as amostras contendo pTN.

Os resultados mostrados na Figura 5.12 demonstraram uma visível eficácia bactericida, com reduções logarítmicas superiores ao dobro determinado pela norma ($\geq 2,0$ log). Durante a contagem das placas de Petri em algumas amostras, não se observou formação de colônias bacterianas, resultando em valores idênticos em todas as réplicas ($1,00 \log_{10}$ UFC ml^{-1}) e, consequentemente, desvio padrão nulo. Nota-se também que há uma maior sensibilidade da bactéria *S. aureus* em relação a *P. aeruginosa* em relação à atividade bactericida das amostras contendo pTN. Isso pode ser atribuída às diferenças em suas estruturas celulares. Bactérias gram-positiva, como a *S. aureus*, possuem uma parede celular espessa de peptidoglicano, que é mais vulnerável à ação antimicrobiana dos taninos. Em contraste, bactérias gram-negativa, como a *P. aeruginosa*, tem uma membrana externa adicional que dificultam a penetração e a ação dos taninos, resultando em uma menor sensibilidade [122].

Os mecanismos de atividade antimicrobiana do pTN, estão associados às suas propriedades catiônicas e fenólicas. Os flavonoides presentes no tanino

têm a capacidade de formar complexos com proteínas solúveis e membranas celulares microbianas, podendo levar ao rompimento das membranas bacterianas, e consequente morte das células [118]. Além disso, o tanino contém grupos aminos ($-\text{NH}_3^+$) que interagem eletrostaticamente com a membrana celular bacteriana, que são carregadas negativamente [57,122]. Essa interação aumenta a permeabilidade da membrana, promovendo o vazamento de materiais intracelulares, como desidrogenase láctica, ácidos nucleicos e glicose, e suprimindo o transporte de nutrientes para as células bacterianas [120]. Esses eventos culminam na morte das bactérias. Esses mecanismos explicam a eficácia antimicrobiana observada nas amostras testadas. Os achados deste estudo corroboram com informações de outros trabalhos publicados, evidenciando a capacidade bactericida do Tanfloc [55,57,58,118,120,122].

- Análise da printabilidade

A avaliação da capacidade de impressão dos materiais envolve alguns requisitos fundamentais, como a precisão dimensional das peças em comparação com o modelo de impressão, a habilidade de extrudar um filamento contínuo cujo diâmetro se aproxime ao máximo do diâmetro do bico de impressão, além de reproduzir com fidelidade a forma do objeto desejado. No caso das formulações estudadas, a printabilidade foi verificada utilizando o material triturado após o processamento no misturador interno. Foram realizados vários testes, nos quais *scaffolds* cilíndricos de 8 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram impressos, com geometria de 0 – 90° e 10 camadas, apresentando poros de 0,4 mm (42% de preenchimento e 58% de porosidade). As temperaturas de impressão utilizadas variaram de 163 a 170 °C, até que fosse possível obter um filamento contínuo e alcançar a precisão dimensional das peças em relação ao modelo projetado.

Nos testes de printabilidade apenas as composições Ecovio e Ecovio/HA foram possíveis de imprimir ao contrário das formulações contendo tanino. Na amostra Ecovio/pTN, o fluxo de material foi muito inconstante, mesmo ajustando-se a temperatura de impressão. Esse problema pode ser atribuído à presença do tanino, que ao ser aquecido, tem tendência a expandir, criando vazios dentro da seringa. Essa expansão descontrolada do tanino altera a densidade do

material e pode gerar bolhas de ar ou zonas de baixa pressão, resultando em um fluxo intermitente e inconsistente durante a extrusão. Já a composição com pTN e HA, o material não conseguiu fluir pelo bico da seringa, resultando em obstrução completa. Mesmo após a limpeza do barril e do bico e o corte do material em pedaços menores, o problema persistiu. A presença de hidroxiapatita pode ter aumentado a viscosidade do compósito conforme mostrado anteriormente nas análises reológicas, dificultando o fluxo do material através do canal de extrusão. Além disso, a combinação do tanino e da hidroxiapatita pode ter aumentado a tendência à formação de aglomerados, o que levou ao entupimento da seringa.

Na Figura 5.13 são mostradas os *scaffolds* obtidos das formulações Ecovio e Ecovio/HA.

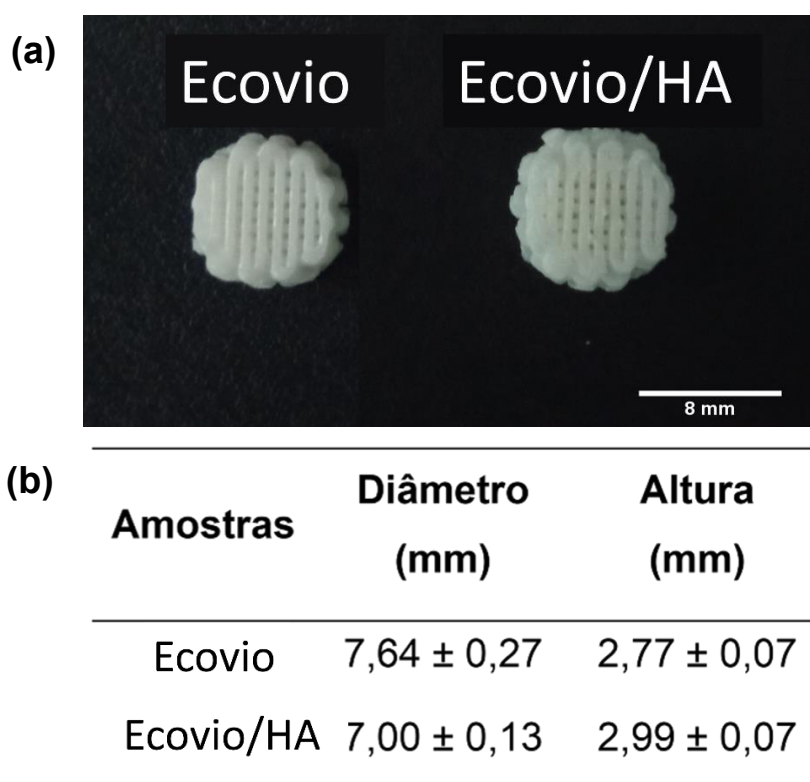


Figura 5.13 - (a): Imagens de *scaffolds* impressos em 3D de 10 camadas com geometria de 0-90° das formulações estudadas e em (b) valores do diâmetro e altura destes *scaffolds*. O modelo projetado foi de 8 mm de diâmetro e 3 mm de altura.

A arquitetura dos *scaffolds* impressos foram analisadas por MEV, e a Figura 5.14 apresenta a superfície superior e seção transversal dos *scaffolds* da blenda e do biocompósito com HA. Os resultados da análise dos parâmetros dimensionais estão apresentados na Tabela 5.6. A partir dos resultados obtidos, é evidente que o diâmetro dos filamentos e os tamanhos dos poros estão significativamente diferentes dos valores projetados de 400 μm , com uma variação de até cerca de 30%. A variação observada pode ser atribuída a uma série de fatores. Durante a impressão, efeitos de relaxação do processo de deposição do filamento (estiramento do filamento) podem ocorrer, causando uma pequena deformação e achatamento do filamento [180].

A viscosidade do material desempenha um papel crucial na qualidade da impressão 3D [156]. No caso do compósito com hidroxiapatita, que apresenta uma viscosidade maior (conforme relatado anteriormente nos ensaios reológicos), os filamentos resistem mais ao fluxo durante a extrusão. Isso pode resultar em filamentos mais espessos e, possivelmente, achatados. A presença da hidroxiapatita aumenta a viscosidade do compósito, alterando suas propriedades de fluxo e a morfologia dos filamentos após a extrusão. Por outro lado, a blenda, com uma viscosidade menor, permite uma maior deformação dos filamentos após a extrusão, resultando em uma maior variação no tamanho dos poros e no diâmetro dos filamentos, como observado nas micrografias.

Além disso, segundo relatado em trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa [181], a taxa de extrusão na impressora pode variar, o que pode resultar em filamentos de largura maior ou menor ao longo da impressão e tamanhos de poros variados. Essa variação pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a purga inicial, a quantidade de material fundido na seringa, e a viscosidade do material. Durante a impressão, se a pressão na cavidade da seringa cair devido à quantidade de material já extrudado, a velocidade do êmbolo pode não ser suficiente para manter uma taxa de extrusão constante. Isso pode resultar em parâmetros microestruturais que divergem do valor projetado.

Por outro lado, os valores calculados da altura da camada mostraram uma variação bem menor (8-9%) em relação ao valor projetado de 300 μm . Isso sugere que o controle da altura da camada é mais preciso e consistente, o que

é uma característica positiva do processo de impressão 3D utilizado. Na Tabela 5.6 é mostrado também os valores calculados de porosidade dos *scaffolds*, que ficaram próximos do projetado. Mais detalhes sobre os cálculos da porosidade se encontram no APÊNDICE A deste trabalho.

Os resultados indicam que os *scaffolds* possuem uma porosidade adequada e tamanhos de poros dentro da faixa ideal para promover a osteocondução e a proliferação celular, favorecendo a regeneração óssea. Conforme relatado na literatura, estruturas com pelo menos 50% de porosidade e tamanhos de poros entre 200 e 800 μm são promissoras para a reconstrução de tecido ósseo [182].

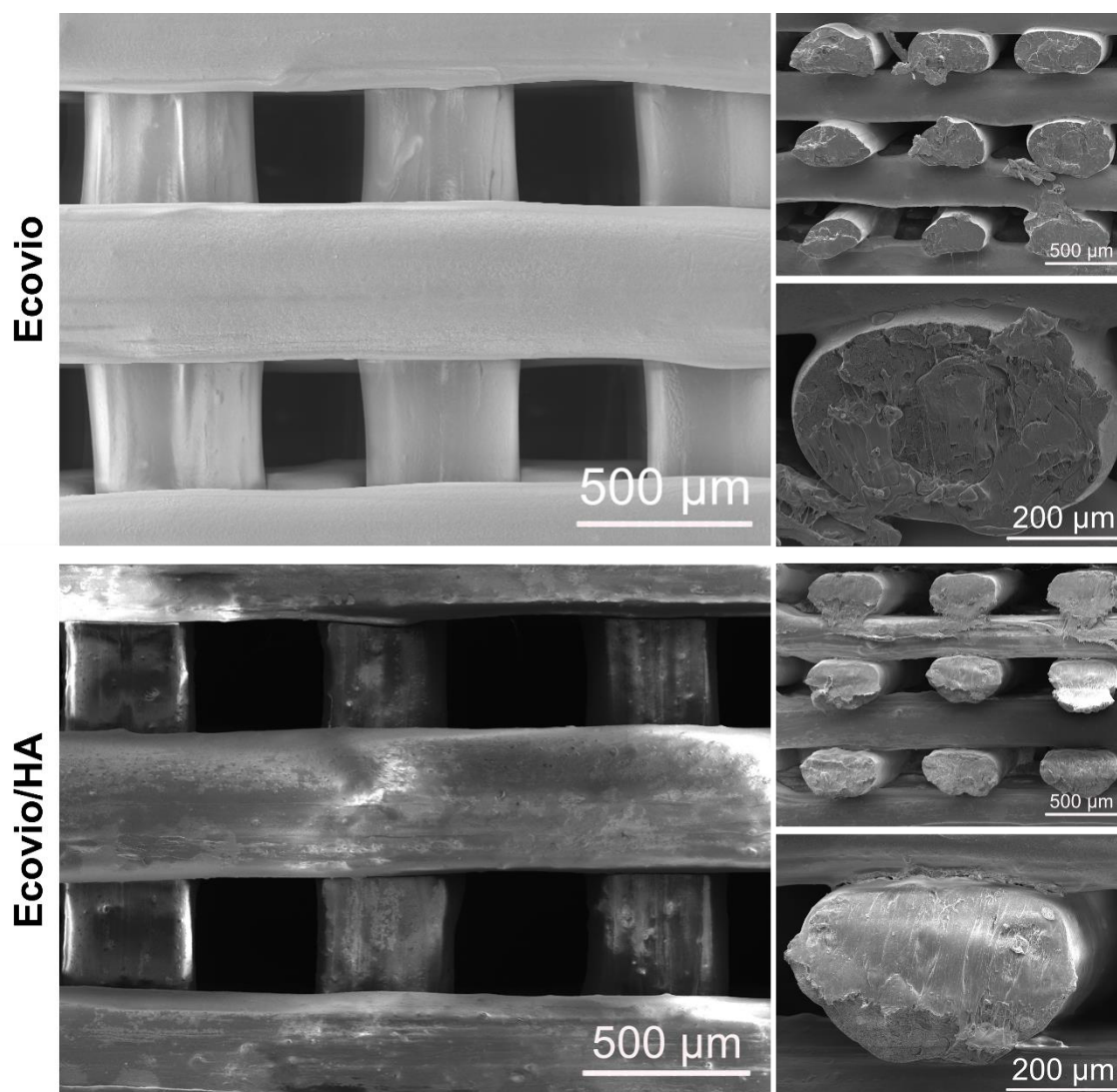


Figura 5.14 - Micrografias da vista superior (em destaque) e da secção transversal (quadro menores) dos *scaffolds* obtidas por meio de MEV.

Tabela 5.6 - Dimensões dos parâmetros dimensionais dos *scaffolds* de Ecovio e biocompósito de Ecovio/HA.

Amostras	Diâmetro filamento (μm)		Tamanho de poro (μm)	Altura da camada (μm)	Porosidade (%)
	Horizontal	Vertical			
Ecovio	531 ± 64	288 ± 41	291 ± 91	273 ± 28	57 ± 2
Ecovio/HA	491 ± 26	290 ± 30	328 ± 19	275 ± 21	50 ± 3
Projetado	400	400	400	300	58

5.3 Caracterização dos *scaffolds*

- Caracterização morfológica

Após os testes de printabilidade (seção anterior) indicarem a impossibilidade de impressão 3D das composições com pTN, optou-se por realizar um tratamento superficial com NaOH e posterior adição de HA e pTN como revestimento nos *scaffolds* de apenas do Ecovio, visando melhorar a interação da blenda com as células, além de conferir propriedades bioativas e antimicrobianas aos *scaffolds*. A análise das micrografias obtidas da superfície por MEV (Figura 5.15) revela diferenças significativas na superfície dos *scaffolds* poliméricos à base de PLA/PBAT, antes e após a modificação superficial.

Na blenda (Eco) a superfície da amostra apresenta uma morfologia mais suave e uniforme, sem a presença de partículas ou aglomerados. Na amostra com tratamento de NaOH, a superfície é um pouco mais rugosa, indicando presença de alguns vazios e resíduos de NaOH (indicados pelas setas na micrografia) em comparação com a amostra não tratada. O tratamento com NaOH é conhecido por induzir a hidrólise e a subsequente ruptura das cadeias poliméricas, resultando em uma superfície mais rugosa e porosa, que pode facilitar a adesão e proliferação celular [135].

A amostra tratada com NaOH e HA, exibe uma superfície ainda mais rugosa e porosa, com a presença de aglomerados de partículas de HA. Superfície semelhante apresenta a amostra tratada com NaOH e pTN, mas com a presença de aglomerados de pTN e aparentemente um pouco menos rugosa em relação à amostra tratada com NaOH e HA. Finalmente, a amostra tratada

com NaOH e posterior adição de pTN e HA, apresenta uma combinação das características observadas nas amostras tratadas com HA e com pTN.

Em suma, a análise das micrografias de MEV das diferentes amostras de *scaffolds* PLA/PBAT indicam a eficácia do tratamento alcalino e a efetiva modificação da superfície dos *scaffolds* com HA e pTN. Estas modificações podem melhorar significativamente as propriedades dos *scaffolds*, aumentando a adesão e proliferação de células, e tornando-os mais adequados para aplicações específicas na engenharia de tecidos.

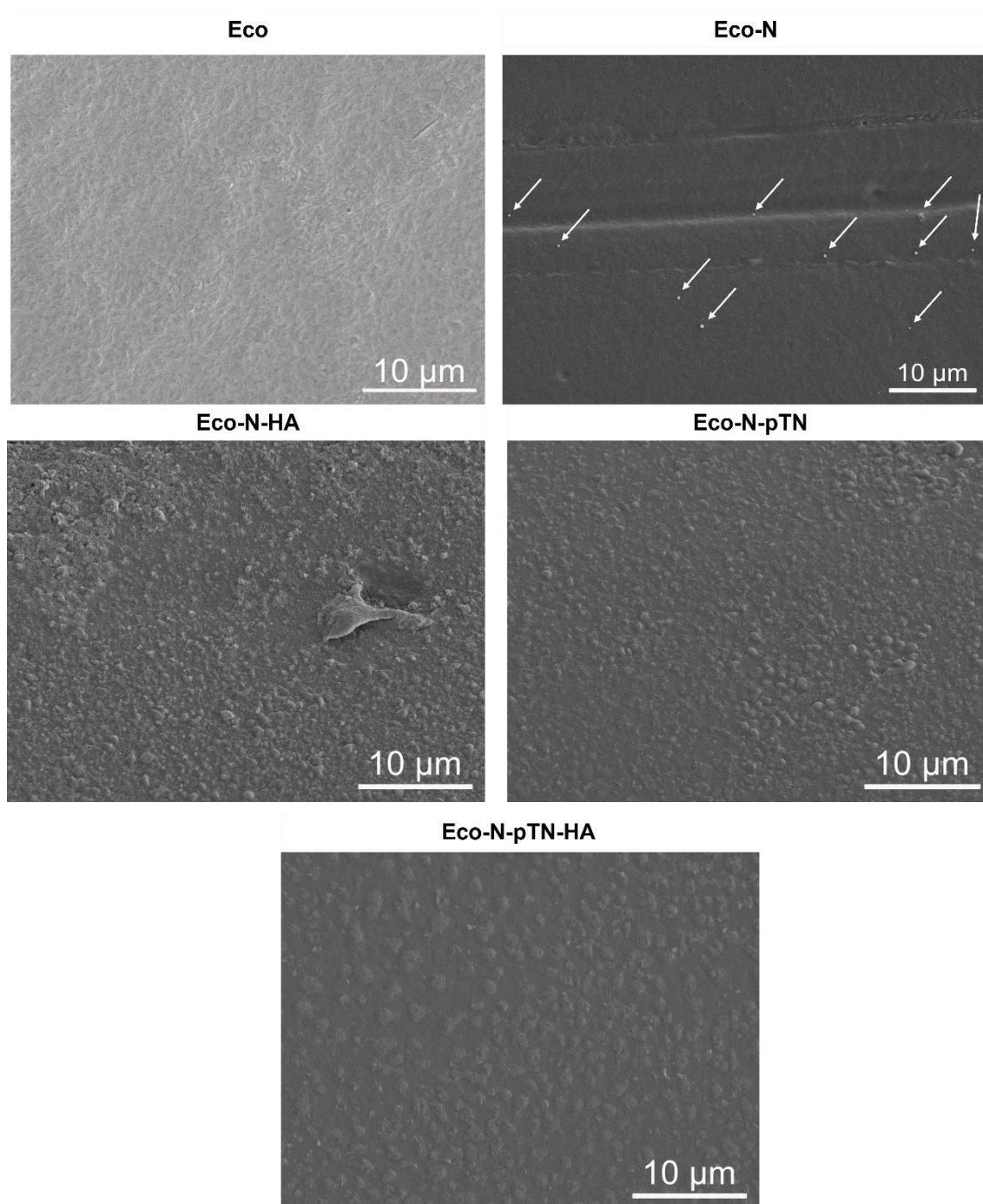


Figura 5.15 - Micrografias dos scaffolds (vista superior) obtidas via MEV antes e após o tratamento superficial com NaOH, pTN e HA.

- Caracterização mecânica

Os *scaffolds* com e sem tratamento superficial foram submetidos a testes de compressão uniaxial para avaliar suas propriedades mecânicas, replicando as demandas que os ossos enfrentam durante o movimento humano. A Figura 5.16 mostra os valores do módulo elástico dos *scaffolds*, os quais foram obtidos

a partir da análise da região linear das curvas tensão versus deformação, especificamente de 30% a 40% de deformação.

Observou-se que o tratamento com NaOH resultou em uma redução estatisticamente significativa do módulo de elasticidade da blenda de 22,27 MPa para 15,27 MPa. Esta diminuição pode ser atribuída a possíveis alterações na estrutura da blenda induzidas pelo NaOH, como um aumento na porosidade ou uma modificação na morfologia, que poderiam resultar em uma diminuição da rigidez do material. A aplicação de um tratamento alcalino tem se mostrado influente na qualidade e na alteração da estrutura de *scaffolds*, o que pode resultar em mudanças nas características mecânicas. Isso inclui possíveis reduções no módulo elástico em *scaffolds* poliméricos produzidas por manufatura aditiva [134].

A incorporação de HA nos *scaffolds* de PBAT/PLA mostrou um efeito interessante na manutenção do módulo de elasticidade. No caso do tratamento com NaOH, o módulo de elasticidade foi de 19,39 MPa, enquanto no compósito sem tratamento, alcançou 22,47 MPa. Embora esses valores não apresentem um aumento expressivo em relação à amostra Eco, a presença de HA contribuiu para minimizar a diminuição do módulo de elasticidade, sugerindo que, mesmo que distribuída de maneira não uniforme, a HA desempenha um papel importante na preservação das propriedades mecânicas do material.

A adição de pTN aos *scaffolds* tratados com NaOH resultou em um módulo de elasticidade de 16,48 MPa, enquanto a combinação de pTN e HA após o tratamento com NaOH (Eco-N-pTN-HA) apresentou um módulo de 17,10 MPa. Embora a adição de pTN possa ter influenciado contribuindo para uma leve redução na rigidez, é importante destacar que essas variações em relação à amostra tratada com NaOH sem adição de pTN e HA foram sutis. Esses resultados indicam que a presença de pTN e HA, mesmo em um cenário onde a rigidez é ligeiramente reduzida, não comprometeu significativamente as propriedades mecânicas quando comparado ao tratamento com NaOH isolado (Eco-N).

Os valores de módulo elástico apresentados pelos *scaffolds* se encontram dentro da faixa normal do osso trabecular humano (10 – 2000 MPa) [175], podendo ter possível aplicação como enxertos ósseos esponjosos, do ponto de vista mecânico.

O tratamento alcalino, embora possa alterar as propriedades mecânicas, tem como objetivo principal aumentar a hidrofiliicidade. Isso pode melhorar as propriedades biológicas, incluindo biocompatibilidade, adesão e proliferação celular. Assim, o tratamento alcalino equilibra as propriedades mecânicas e biológicas, podendo ser otimizado para atender às necessidades específicas dependendo da aplicação.

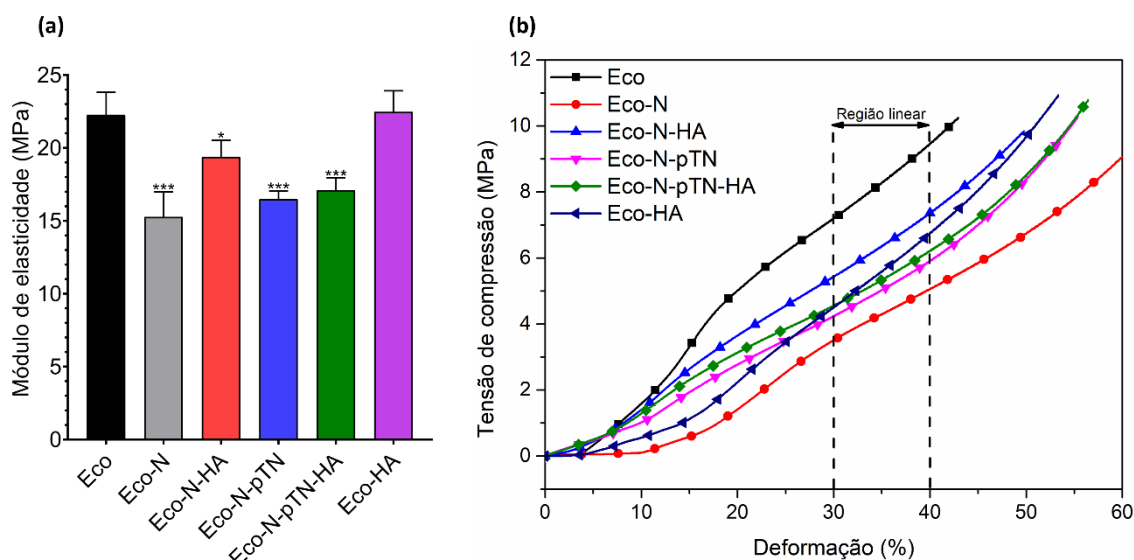


Figura 5.16 - (a) Resultados do módulo de elasticidade e (b) curvas tensão versus deformação dos scaffolds obtidos nos ensaio de compressão. A análise estatística foi expressa em relação ao Ecovio (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

- Ângulo de contato

A hidrofiliicidade é uma das propriedades de superfície fundamentais que influenciam a aplicação prática de *scaffolds* na engenharia de tecidos. Superfícies muito hidrofóbicas não são favoráveis para a aderência e migração celular [134]. Para isso medidas de ângulo de contato foram realizadas para avaliar a hidrofiliicidade das superfícies tratadas. Testes iniciais foram conduzidos em *scaffolds*. No entanto, nas amostras tratadas, o ângulo de contato era quase zero, indicando um completo espalhamento ou absorção da gota na amostra. Isso pode ser devido à estrutura dos *scaffolds*, que possuem uma microestrutura porosa e não apresentam uma superfície uniforme. Portanto, não foi possível avaliar apropriadamente o efeito do tratamento superficial na molhabilidade. Por isso, as avaliações foram conduzidas em amostras sólidas

de Ecovio prensadas e estampadas, no formato de discos (como descrito na etapa 4.2.2), nas quais foram submetidas aos diferentes tratamentos com NaOH, pTN e HA. Os resultados dessas análises estão apresentados na Figura 5.17.

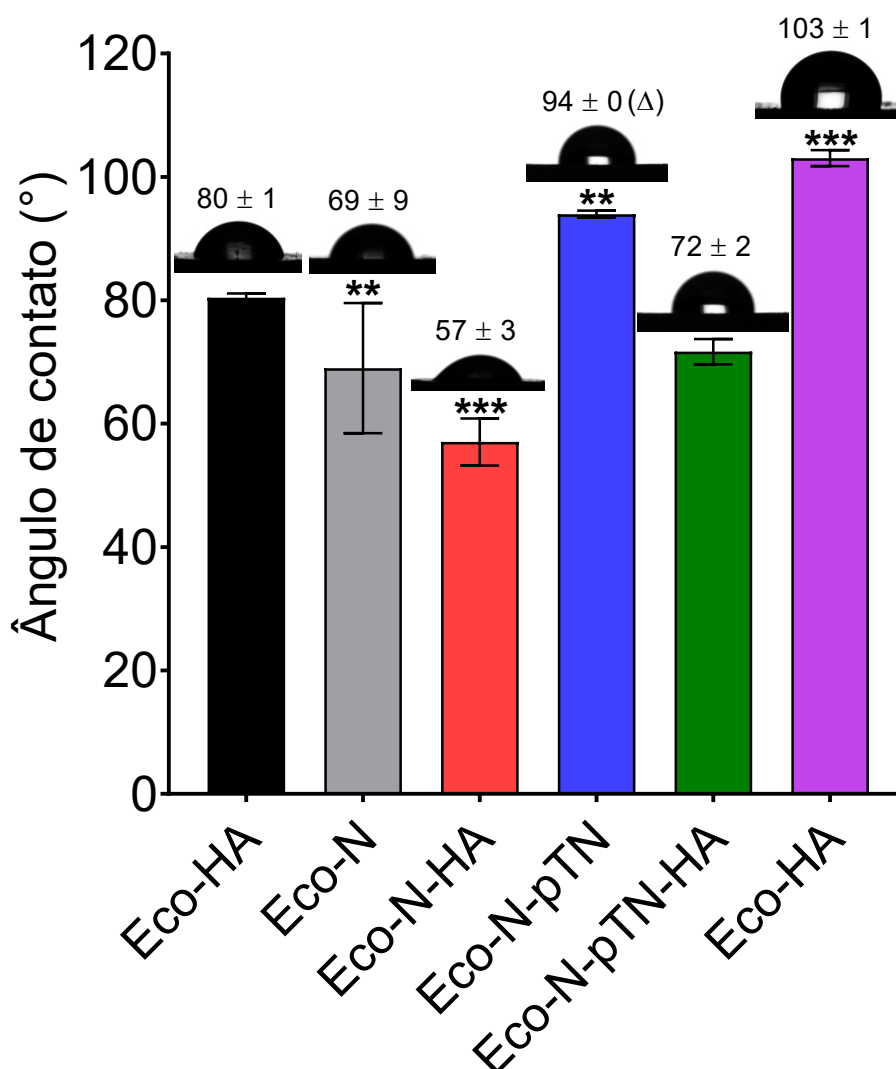


Figura 5.17 - Medidas dos ângulos de contato das amostras tratadas em comparação com a amostra de Ecovio não tratada e do biocompósito Eco-HA. A análise estatística foi expressa em relação ao Ecovio (N = 5; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Onde: (Δ) é o valor de desvio padrão menor que 0,5 e onde o arredondamento tende a 0.

Os resultados da análise revelaram uma série de alterações significativas na hidrofilicidade da superfície do Ecovio, em resposta a diferentes tratamentos. Inicialmente, observou-se que o tratamento com NaOH reduziu

consideravelmente o ângulo de contato de 80° para 69°, indicando um aumento na hidrofiliabilidade. No entanto, a adição de pTN à superfície com NaOH pareceu contrabalançar esse efeito, elevando o ângulo para 94°, sugerindo uma característica levemente hidrofóbica na amostra. Em contrapartida, a inclusão de HA após tratamento alcalino resultou em um ângulo de contato significativamente menor, de 57°, evidenciando uma superfície altamente hidrofílica, desejável para aplicações biomédicas. A combinação de NaOH com pTN e HA apresentou um ângulo intermediário de 72°, enquanto a amostra de Ecovio com HA sem tratamento exibiu o maior ângulo de 103°, denotando uma superfície mais hidrofóbica.

Ao analisar os resultados em conjunto, foi possível concluir que o tratamento com NaOH desempenha um papel crucial na melhoria da hidrofiliabilidade das amostras de Ecovio, especialmente quando combinado com HA. É de conhecimento que tratamentos alcalinos, dentre eles o NaOH, favorecem a diminuição do ângulo de contato em superfícies, ocasionando um aumento da hidrofiliabilidade [183]. Por outro lado, a adição de pTN não apresentou benefícios significativos para a hidrofiliabilidade após o tratamento com NaOH. A combinação de pTN com HA no tratamento parece atenuar o aumento da hidrofobicidade causada pelo tanino. Além disso, as amostras tratadas com NaOH e HA exibiram características superficiais mais promissoras para a engenharia de tecidos ósseos, sugerindo um potencial aumento na bioatividade e na adesão celular, aspectos essenciais para aplicações biomédicas [134,156].

As propriedades superficiais de um material implantável desempenham um importante papel no crescimento tecidual [156]. A modificação superficial com NaOH aumenta significativamente o processo de mineralização, o que pode ser benéfico para regeneração de tecidos [184]. Os resultados demonstrados acerca da molhabilidade ressaltam a importância dos tratamentos superficiais na modificação das propriedades do material, visando atender às demandas específicas de diferentes aplicações biomédicas.

- Rugosidade da superfície

As propriedades de superfície de materiais para implantes, como a rugosidade e a reatividade química, são fundamentais para a adesão e

proliferação celular, influenciando diretamente o crescimento de novo tecido. Superfícies mais rugosas aumentam a área de contato e fornecem mais sítios de ancoragem para as células, promovendo uma melhor integração celular, essencial para o sucesso de *scaffolds* em aplicações médicas. [185,186]. Os resultados de rugosidade (rugosidade média quadrática, RMS) são exibidos na Figura 5.18.

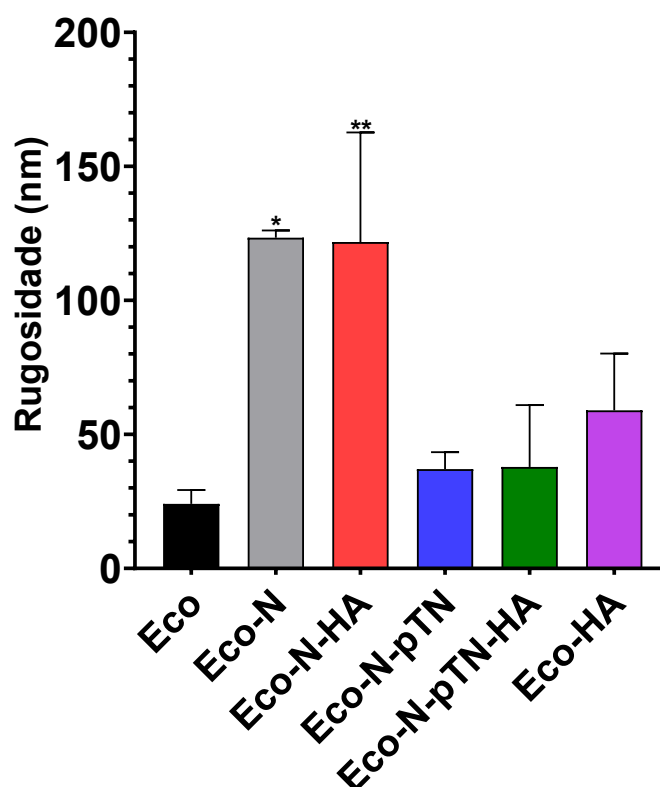


Figura 5.18 - Rugosidade da superfície dos scaffolds medida por AFM. A análise estatística foi expressa em relação ao Ecovio (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

A análise de rugosidade por AFM dos *scaffolds* de Ecovio revelou mudanças significativas após a modificação superficial com tratamento alcalino (NaOH) e a adição de HA e pTN. Os *scaffolds* da blenda apresentaram uma rugosidade de 24,1 nm, servindo como referência para as demais.

Após o tratamento alcalino (Eco-N), observou-se um aumento expressivo da rugosidade para 123,4 nm (* $p < 0,05$), indicando que o tratamento químico criou uma superfície mais irregular. Essa alteração na topografia é esperada, pois o tratamento alcalino tende a remover componentes superficiais, expondo áreas mais reativas e gerando maior rugosidade [135],

Na amostra Eco-N-HA, que combina o tratamento alcalino com a adição de hidroxiapatita, a rugosidade média permaneceu elevada (121,8 nm), sem diferença estatística significativa em relação a Eco-N, sugerindo que a hidroxiapatita não alterou substancialmente a topografia já modificada pelo tratamento alcalino.

Por outro lado, a incorporação de tanino após o tratamento alcalino (Eco-N-pTN) resultou em uma rugosidade média de 37,1 nm, significativamente menor do que a amostra Eco-N. A adição de tanino parece ter suavizado a superfície, possivelmente devido à interação do tanino com a matriz polimérica, formando uma camada mais uniforme. A inclusão de hidroxiapatita nesta mistura (Eco-N-pTN-HA) manteve a rugosidade em 37,8 nm, sugerindo que a combinação de tanino e hidroxiapatita não altera significativamente a topografia em relação a amostra Eco-N-pTN.

Finalmente, o *scaffold* composto pelo biocompósito Eco-HA (sem NaOH), apresentou uma rugosidade intermediária de 59,0 nm. Essa rugosidade, maior que a da blenda, mas menor que as amostras tratadas alcalinamente, pode ser atribuída à incorporação direta das partículas de hidroxiapatita, que aumentam a irregularidade da superfície, mas não de forma tão intensa quanto o tratamento alcalino.

Os resultados obtidos pela análise de AFM indicam que o tratamento alcalino e a adição de HA e pTN modificaram com sucesso a superfície dos *scaffolds* de PBAT/PLA, evidenciado pelo aumento significativo na rugosidade em comparação com a amostra (Eco) não tratada, o que é reforçado pelas imagens 2D (Figura 5.19 (a)) e 3D de AFM (Figura 5.19 (b)). corroborando com os resultados de MEV mostrados anteriormente. Os resultados indicam que o tratamento alcalino é o fator predominante para o aumento da rugosidade superficial, com significância estatística confirmada para as amostras Eco-N e Eco-N-HA em relação à amostra Eco. Já a adição de tanino parece ter um efeito contrário, suavizando a superfície das amostras tratadas, enquanto a hidroxiapatita contribui para a manutenção ou aumento moderado da rugosidade, dependendo das condições da amostra.

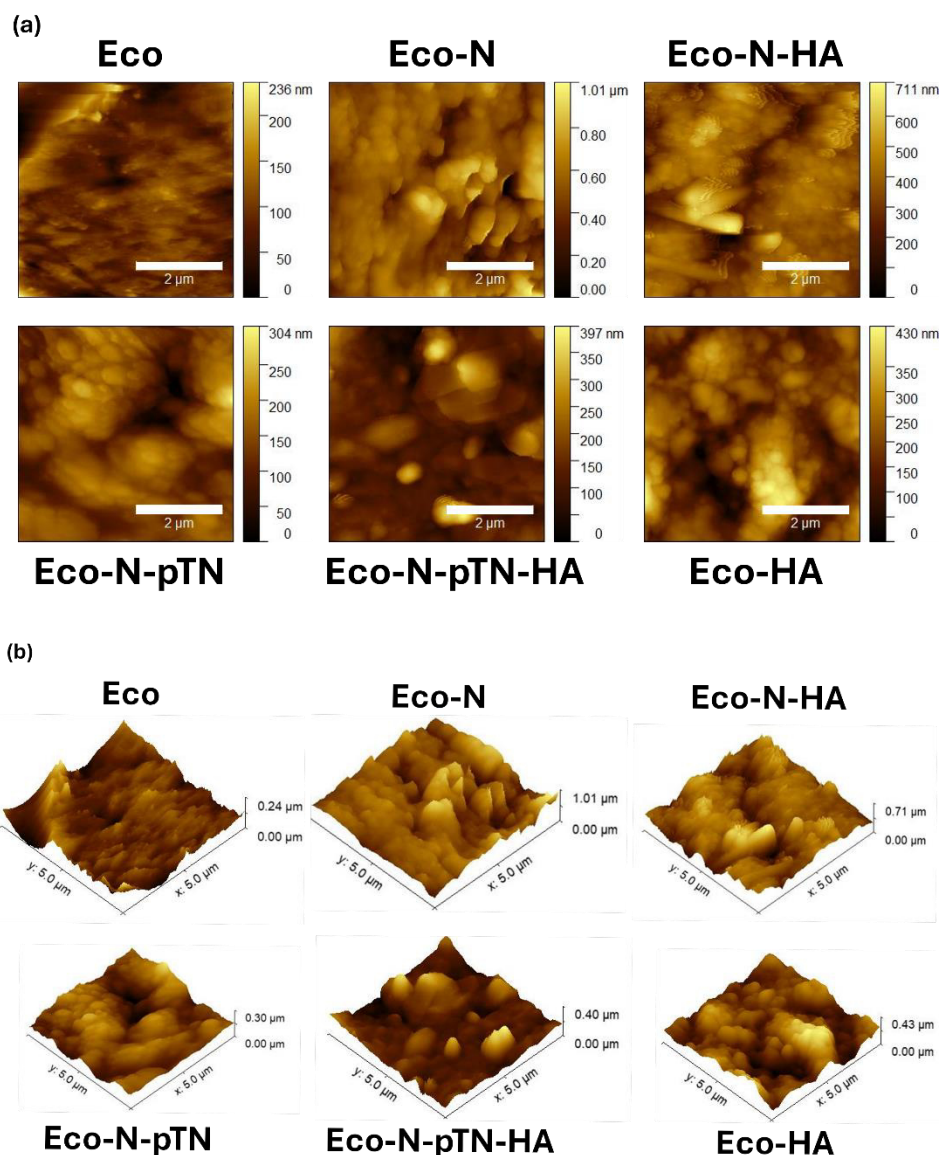


Figura 5.19 - (a) Imagens 2D e (b) 3D dos scaffolds obtidas via AFM.

- Avaliação *in vitro* da bioatividade

A bioatividade *in vitro* dos scaffolds produzidos (com e sem tratamento superficial) foi avaliada através do método de imersão em fluido corporal simulado (SBF), observando-se a formação de fosfatos de cálcio em suas superfícies após 21 dias. Os resultados são apresentados na Figura 5.20.

Nos scaffolds produzidos, observou-se a formação de fosfatos de cálcio na superfície dos scaffolds após tratamento alcalino e posterior incremento de pTN e HA (Eco-N-HA, Eco-N-pTN e Eco-N-pTN-HA). O Ecovio não é bioativo [125], o que explica a ausência de formação de fosfatos de cálcio, tanto na amostra não-tratada quanto na tratada com NaOH isolado (Eco-N). Embora o

tratamento alcalino possa aumentar a rugosidade superficial e introduzir grupos carboxílicos, essas modificações não são suficientes para induzir a formação de fosfatos de cálcio na ausência de componentes bioativos, como hidroxiapatita ou outros agentes osteoindutores.

No entanto, a formação de fosfatos de cálcio observada nos *scaffolds* tratados com NaOH e posterior adição de hidroxiapatita e tanino sugere que o tratamento alcalino pode ter contribuído para melhorar a adesão e a interação do pTN e HA na superfície, promovendo a bioatividade. O tratamento com NaOH tende a aumentar a rugosidade e a criar grupos funcionais na superfície do polímero, facilitando a nucleação de fosfatos de cálcio e a interação com as cargas bioativas, que desempenham um papel crucial na indução dessa mineralização. Os efeitos da HA e do pTN, devido às suas propriedades biológicas, já foram discutidos em tópicos anteriores sobre a bioatividade dos compósitos, reforçando sua importância na melhoria da bioatividade dos *scaffolds*.

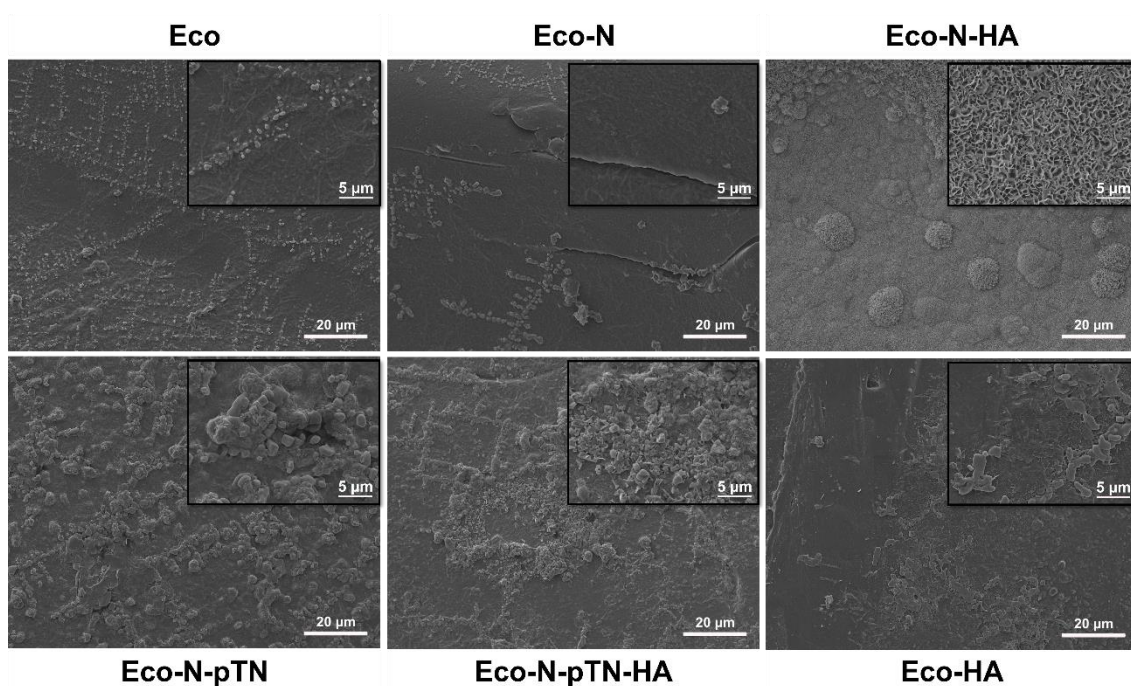


Figura 5.20 - Superfície dos scaffolds após 21 dias de imersão em SBF.

- Avaliação in vitro da biocompatibilidade

A citotoxicidade dos *scaffolds* e a proliferação de osteoblastos foram avaliadas por meio de medidas de viabilidade celular, via ensaio de resazurina (ou Alamar Blue) após 1 e 7 dias de cultura. A resazurina é um corante azul que é internalizado pelas células. As células vivas mantêm um ambiente redutor, no qual a resazurina é metabolicamente reduzida a um composto rosa altamente fluorescente, a resorufina, que é liberado livremente das células [187]. A quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis, pois células mortas ou danificadas não conseguem realizar essa redução. A viabilidade celular é então determinada pela intensidade da fluorescência ou absorbância da resorufina, quantificada por um espectrofotômetro ou leitor de placas de fluorescência [118].

Ao observar-se os resultados obtidos (Figura 5.21) após 1 dia, nota-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as amostras. Isso sugere que todos os *scaffolds* apresentaram uma superfície adequada para adesão celular, independentemente de quaisquer tratamentos adicionais. Essa homogeneidade inicial pode ser atribuída à ausência de interações prolongadas entre as células e os materiais, uma vez que o período de cultivo ainda é relativamente curto. Após 7 dias de cultivo celular, os resultados apresentaram um aumento expressivo na viabilidade celular, indicando a capacidade dos materiais desenvolvidos de estimular a proliferação das células ao longo do tempo. Entretanto, duas amostras se destacam: aquela submetida ao tratamento alcalino de NaOH e a amostra constituída pelo biocompósito Ecovio e HA. Ambas apresentaram uma viabilidade significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação com a amostra de controle (Eco), que não recebeu tratamento algum. Essa observação sugere que o tratamento superficial de NaOH e a presença de HA podem potencializar a interação entre as células e o *scaffold*, promovendo um ambiente mais propício para a proliferação celular a longo prazo.

O NaOH pode ter desempenhado um papel na modificação da superfície do material, devido à introdução de grupos hidrofílicos (carboxila e hidroxila), melhorando suas propriedades de adesão celular, enquanto a HA pode ter proporcionado um ambiente bioativo que estimula a adesão e o crescimento

celular [133,134,188]. Tem sido reportado na literatura que o tratamento de NaOH em *scaffolds* a base de poliésteres aumenta a hidrofilicidade e a rugosidade, melhorando a proliferação e a fixação celular, e aprimorando suas propriedades para engenharia de tecidos [153,156]. Os resultados anteriores demonstrados em ângulo de contato e AFM dos *scaffolds* nesta pesquisa corroboram com esses dados. A adição de pTN e HA após tratamento alcalino parece não ter influenciado significativamente a viabilidade celular, uma vez que as amostras tratadas com pTN e/ou HA não diferiram estatisticamente da amostra de controle após 7 dias de cultivo. Isso sugere que o tanino e a hidroxiapatita em interação com NaOH pode não ter contribuído de forma significativa para a promoção da viabilidade celular nesse contexto específico. Porém, é importante notar que os resultados indicam que tanto o pTN quanto a HA não são citotóxicas para as células, conforme relatado em estudos anteriores com Tanfloc [57,118,123] e HA [67,156,178]. Embora não explorada, a bioatividade da HA pode favorecer outras funções celulares, como por exemplo a diferenciação de células-tronco. Quanto ao Tanfloc, sua propriedade antimicrobiana o torna interessante. Essas características fazem com que o pTN e HA sejam atrativos para uso em *scaffolds* destinados à regeneração óssea.

A adesão e proliferação celular de osteoblastos após 1 e 7 dias de cultura celular nos *scaffolds* foram confirmadas através da análise de imagens obtidas por MEV (Figura 5.22). Nas imagens é possível ver uma maior adesão e proliferação de células na superfície dos *scaffolds* após 7 dias de cultura.

Em suma, os resultados do ensaio fornecem evidências do impacto dos diferentes tratamentos e composições de *scaffolds* a base de Ecovio na viabilidade celular ao longo do tempo. Além disso, é importante destacar que a blenda comercial de Ecovio (PLA/PBAT) demonstrou não ser citotóxica. Isso indica que ela pode ser aplicada para uso em *scaffolds* na engenharia de tecidos, um campo onde pouquíssimos trabalhos têm relatado o uso desta blenda comercial. Essas descobertas são de grande importância para o desenvolvimento de materiais biomédicos mais eficazes, capazes de fornecer um suporte adequado para as células durante a regeneração tecidual e outras aplicações clínicas.

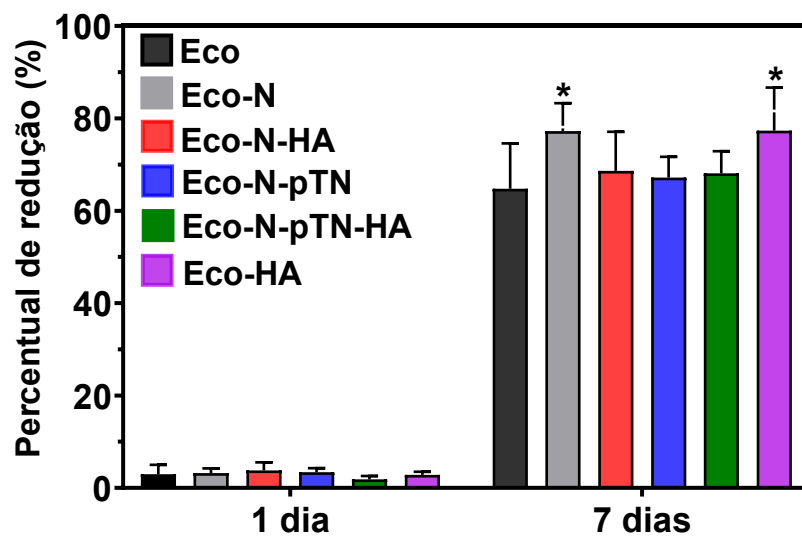


Figura 5.21 - Resultado do ensaio de resazurina após 1 e 7 dias de cultura de osteoblasto (MC3T3-E1) nos scaffolds. A análise estatística foi expressa em relação ao Ecovio sem tratamento (* $p < 0,05$).

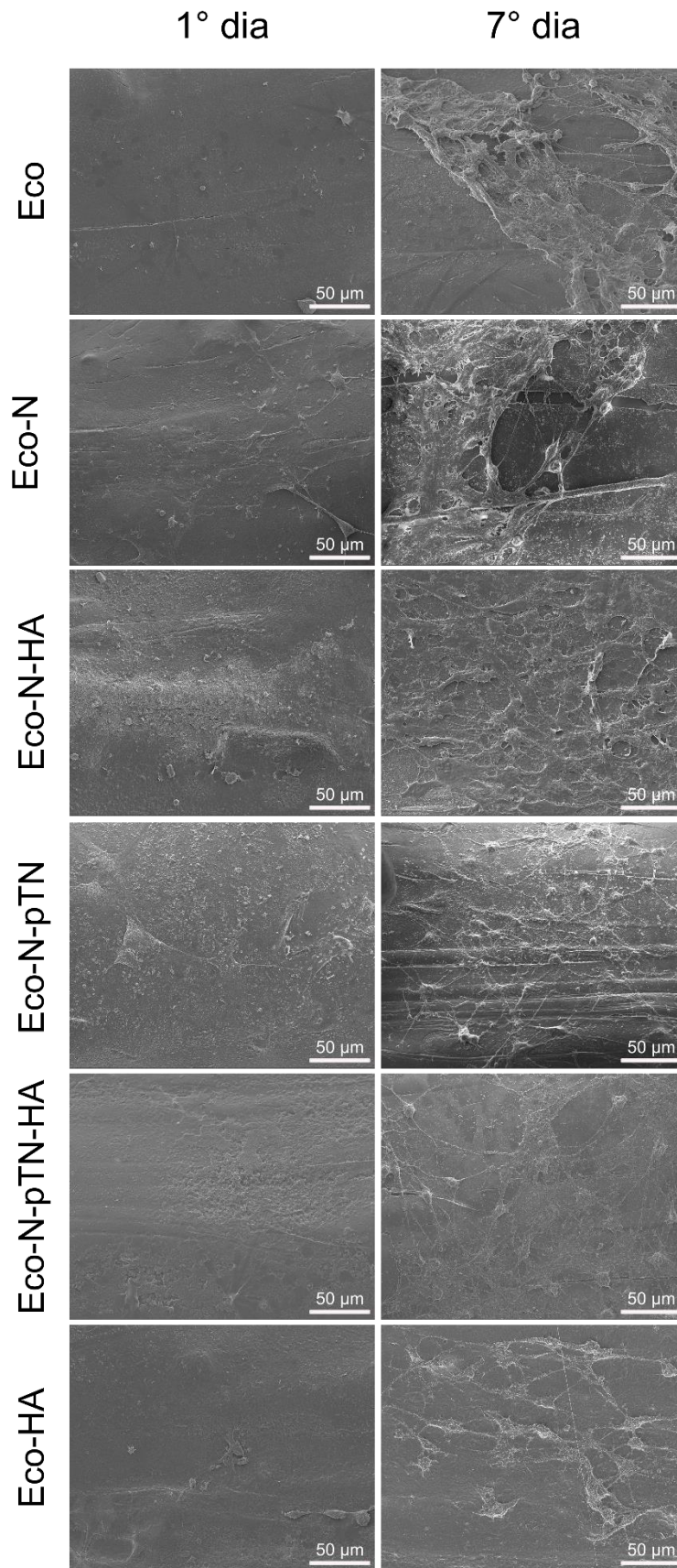


Figura 5.22 - Imagens de MEV dos osteoblastos aderidos à superfície dos scaffolds após 1 e 7 dias de cultura celular.

6 CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos novos biocompósitos à base de Ecovio (PLA/PBAT), tanino amino-funcionalizado (TN) e hidroxiapatita (HA) visando aplicações biomédicas. A possibilidade de fabricação de *scaffolds* utilizando impressão 3D potencializa o uso desses materiais devido a precisão, a automatização e a possibilidade de personalização fornecidas por esta tecnologia. O desenvolvimento de *scaffolds* bioativos e bactericidas obtidos por impressão 3D tem grande potencial de aplicação na engenharia de tecido ósseo.

A purificação do TN foi bem-sucedida, garantindo a remoção de impurezas por meio de diálise em tempos de 4 e 12 horas. As caracterizações por MEV-EDS, FTIR e XPS indicaram que ambos os tempos de purificação foram eficazes, com a escolha do tempo de 4 horas visando otimizar o rendimento.

Os resultados de reometria de torque e análises térmicas confirmaram que a HA e pTN não degradaram a blenda PLA/PBAT, mesmo após o processamento em altas temperaturas. As micrografias de MEV-EDS revelaram uma dispersão irregular do pTN na matriz, melhorada pela adição de HA. As análises reológicas mostraram que a adição de pTN reduziu a viscosidade do Ecovio, enquanto o HA aumentou em baixas taxas de cisalhamento. Todas as amostras exibiram comportamento viscoso predominante em baixas frequências, com inversão observada apenas para o Ecovio em altas frequências.

Os testes mecânicos revelaram uma redução no módulo de elasticidade com a adição de pTN, atribuída à má adesão e dispersão das partículas. No entanto, a adição de HA mitigou essa redução, e todas as composições apresentaram valores de elasticidade adequados para aplicações em ligamentos, tendões e engenharia de tecidos ósseos. As propriedades biológicas, incluindo bioatividade e atividade antimicrobiana, foram promissoras. Os biocompósitos com HA e pTN favoreceram a deposição de fosfatos de cálcio em SBF, indicando bioatividade, e mostraram eficácia bactericida nas amostras contendo pTN.

Nos ensaios de printabilidade, utilizando impressora 3D com extrusor de seringa, observou-se que as composições contendo pTN não puderam ser impressos, provavelmente devido à expansão significativa do pTN ao ser

aquecido, o que contribuiu para a criação de vazios dentro do extrusor. Além disso, a combinação com HA pode ter levado à formação de aglomerados, resultando no entupimento da seringa. E os *scaffolds* impressos de Ecovio e o seu biocompósito com HA apresentaram tamanhos de poros e porosidade adequada para aplicação na engenharia de tecidos ósseos.

Por fim, a modificação da superfície dos *scaffolds* de Ecovio, através de tratamento alcalino e adição de pTN e HA, otimizou suas propriedades biológicas. O tratamento alcalino influenciou positivamente a rugosidade e hidrofiliabilidade da superfície, enquanto a adição posterior de pTN e HA a superfície favoreceu a bioatividade dos *scaffolds*. Ensaios de viabilidade celular, demonstraram que as amostras são biocompatíveis e que a modificação superficial favoreceu a adesão e proliferação celular, indicando potencial aplicação na regeneração óssea.

O objetivo principal deste trabalho foi atingido com sucesso. O trabalho desenvolvido demonstra que os biocompósitos à base de Ecovio®, HA e TN tanto na forma de biocompósitos como por meio de ativação superficial apresentam um desempenho satisfatório nos requisitos da área e representam uma alternativa promissora para aplicação em engenharia de tecidos ósseos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Explorar outras técnicas de impressão 3D que não envolvam altas temperaturas, evitando problemas com a expansão do tanino e a formação de aglomerados com HA;
- Realizar testes de atividade antimicrobiana em *scaffolds* modificados superficialmente com tanino;
- Avaliar a degradação *in vitro* dos *scaffolds*;
- Realizar modificações superficiais em *scaffolds* de Ecovio com HA para otimizar os resultados biológicos;
- Explorar mais a fundo a modificação superficial dos *scaffolds*, incluindo o uso de HA na forma nanométrica e outras cargas bioativas para potencializar a bioatividade e propriedades mecânicas.

8 REFERÊNCIAS

- [1] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Projeções da População** | **IBGE**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9109-projecao-da-populacao.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 23 jun. 2021.
- [2] QU, H. et al. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. **RSC Advances**, v. 9, n. 45, p. 26252–26262, 2019.
- [3] MORENO MADRID, A. P. et al. Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 100, p. 631–644, 1 Jul. 2019.
- [4] BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. Bone tissue engineering using 3D printing. **Materials Today**, v. 16, n. 12, p. 496–504, 1 Dec. 2013.
- [5] VIDAL, L. et al. Reconstruction of Large Skeletal Defects: Current Clinical Therapeutic Strategies and Future Directions Using 3D Printing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 61, 2020.
- [6] AFEWERKI, S. et al. Advances in dual functional antimicrobial and osteoinductive biomaterials for orthopaedic applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 24, p. 102143, 1 Feb. 2020.
- [7] HARB, S. V. et al. Hydroxyapatite and β -TCP modified PMMA-TiO₂ and PMMA-ZrO₂ coatings for bioactive corrosion protection of Ti6Al4V implants. **Materials Science and Engineering C**, v. 116, p. 111149, 1 Nov. 2020.
- [8] ZHANG, Y. et al. Polymer Fiber Scaffolds for Bone and Cartilage Tissue Engineering. **Advanced Functional Materials**, v. 29, n. 36, p. 1903279, 1 Sep. 2019.
- [9] JONES, J. R. et al. **Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation**. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine. **Anais...SAGE Publications**Sage UK: London, England, 29 Dec. 2010
- [10] HOLZWARTH, J. M.; MA, P. X. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9622–9629, 1 Dec. 2011.
- [11] MAHONY, O. et al. Silica-gelatin hybrids with tailorable degradation and mechanical properties for tissue regeneration. **Advanced Functional Materials**,

v. 20, n. 22, p. 3835–3845, 23 Nov. 2010.

[12] O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 1 Mar. 2011.

[13] ROSETI, L. et al. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 1246–1262, 1 Sep. 2017.

[14] HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2529–2543, 15 Dec. 2000.

[15] BACKES, E. H. et al. Polycaprolactone usage in additive manufacturing strategies for tissue engineering applications: A review. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 110, n. 6, p. 1479–1503, 1 Jun. 2022.

[16] BACKES, E. H. et al. Fabrication of Biocompatible Composites of Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite Envisioning Medical Applications. **Polymer Engineering and Science**, v. 60, n. 3, p. 636–644, 1 Mar. 2020.

[17] PARK, J. W. et al. High strength PLGA/hydroxyapatite composites with tunable surface structure using PLGA direct grafting method for orthopedic implants. **Composites Part B: Engineering**, v. 178, p. 107449, 1 Dec. 2019.

[18] TENTOR, F. R. et al. Scaffolds based on chitosan/pectin thermosensitive hydrogels containing gold nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1186–1194, 2017.

[19] CHEN, L. et al. Biomimetic porous collagen/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 37, p. 45271, 5 Oct. 2017.

[20] CHOU, Y. C. et al. Development of a three-dimensional (3D) printed biodegradable cage to convert morselized corticocancellous bone chips into a structured cortical bone graft. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 595, 20 Apr. 2016.

[21] AL-ITRY, R.; LAMNAWAR, K.; MAAZOUZ, A. Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 10, p. 1898–1914, Oct. 2012.

[22] BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, v. 15, n. 1, p. 13–21, Mar.

2005.

[23] RIGOLIN, T. R. et al. Chemical modification of poly(lactic acid) and its use as matrix in poly(lactic acid) poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends. **Polymer Testing**, v. 63, p. 542–549, 2017.

[24] ARRUDA, L. C. et al. Influence of chain extender on mechanical, thermal and morphological properties of blown films of PLA/PBAT blends. **Polymer Testing**, v. 43, p. 27–37, 2015.

[25] RIBEIRO NETO, W. A. et al. Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. **Polymer Degradation and Stability**, v. 120, p. 61–69, 22 Jun. 2015.

[26] YAN, D. et al. Study on the properties of PLA/PBAT composite modified by nanohydroxyapatite. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, n. 5, p. 11895–11904, 1 Sep. 2020.

[27] ZHU, Y. et al. Bone regeneration with micro/nano hybrid-structured biphasic calcium phosphate bioceramics at segmental bone defect and the induced immunoregulation of MSCs. **Biomaterials**, v. 147, p. 133–144, 1 Dec. 2017.

[28] NEJATI, E.; MIRZADEH, H.; ZANDI, M. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite rods/poly(L-lactide acid) composite scaffolds for bone tissue engineering. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 39, n. 10, p. 1589–1596, 1 Oct. 2008.

[29] CUI, Y. et al. The nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with L-lactic acid oligomer for bone repair. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 7, p. 2680–2692, 1 Sep. 2009.

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

[31] JAKOBSEN, T. H. et al. Implants induce a new niche for microbiomes. **APMIS**, v. 126, n. 8, p. 685–692, 1 Aug. 2018.

[32] SARAVANAN, S. et al. Preparation, characterization and antimicrobial activity of a bio-composite scaffold containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-silver for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 2, p. 188–193, 1 Aug. 2011.

[33] RADHAKRISHNAN, S. et al. Fabrication of 3D printed antimicrobial polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications. **Materials**

Science and Engineering C, v. 118, 1 Jan. 2021.

[34] ZHANG, Y. et al. 3D-printed bioceramic scaffolds with antibacterial and osteogenic activity. **Biofabrication**, v. 9, n. 2, p. 025037, 20 Jun. 2017.

[35] LI, H. et al. Advances in the application of gold nanoparticles in bone tissue engineering. **Journal of biological engineering**, v. 14, p. 1–15, 2020.

[36] NASAJPOUR, A. et al. A Multifunctional Polymeric Periodontal Membrane with Osteogenic and Antibacterial Characteristics. **Advanced Functional Materials**, v. 28, n. 3, p. 1703437, 17 Jan. 2018.

[37] LI, H. et al. The advances of ceria nanoparticles for biomedical applications in orthopaedics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 7199–7214, 2020.

[38] BHOWMICK, A. et al. Novel magnetic antimicrobial nanocomposites for bone tissue engineering applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 32, p. 25437–25445, 9 Mar. 2015.

[39] MARTINS, A. F. et al. Chitosan/iota-carrageenan and chitosan/pectin polyelectrolyte multilayer scaffolds with antiadhesive and bactericidal properties. **Applied Surface Science**, v. 502, p. 144282, 1 Feb. 2020.

[40] WITZLER, M. et al. Lignin-derived biomaterials for drug release and tissue engineering. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1885, 27 Jul. 2018.

[41] KACZMAREK, B. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials-A minireview. **Materials**, v. 13, n. 14, 2020.

[42] JOHNSON, C. T.; GARCÍA, A. J. Scaffold-based Anti-infection Strategies in Bone Repair. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 3, p. 515–528, 1 Mar. 2015.

[43] MOURIÑO, V.; BOCCACCINI, A. R. Bone tissue engineering therapeutics: Controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 209–227, 6 Feb. 2010.

[44] IBRAHIM, D. M. et al. Bioactive and elastic nanocomposites with antimicrobial properties for bone tissue regeneration. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 5, p. 3313–3325, 18 May 2020.

[45] DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174–181, 1 Apr. 2012.

[46] REDONDO, L. M. et al. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. **Frontiers in Microbiology**, v. 5,

n. MAR, p. 118, 27 Mar. 2014.

[47] PARK, J. et al. Antimicrobial spray nanocoating of supramolecular Fe(III)-tannic acid metal-organic coordination complex: Applications to shoe insoles and fruits. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 1 Dec. 2017.

[48] CHUNG, K. T. et al. Tannins and human health: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421–464, 1998.

[49] ERAKOVIC, S. et al. Novel Bioactive Antimicrobial Lignin Containing Coatings on Titanium Obtained by Electrophoretic Deposition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12294–12322, 11 Jul. 2014.

[50] DONG, X. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1629–1634, 1 Nov. 2011.

[51] UPTON, B. M.; KASKO, A. M. Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: Review and perspective. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2275–2306, 14 Dec. 2016.

[52] LOCHAB, B.; SHUKLA, S.; VARMA, I. K. Naturally occurring phenolic sources: Monomers and polymers. **RSC Advances**, v. 4, n. 42, p. 21712–21752, 19 May 2014.

[53] SARJIT, A.; WANG, Y.; DYKES, G. A. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. **Food Microbiology**, v. 46, p. 227–233, 1 Apr. 2015.

[54] COPPO, E.; MARCHESE, A. Antibacterial Activity of Polyphenols. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 380–390, 27 Aug. 2014.

[55] CRUZ, J. A. DA et al. Poly(vinyl alcohol)/cationic tannin blend films with antioxidant and antimicrobial activities. **Materials Science and Engineering C**, v. 107, p. 110357, 1 Feb. 2020.

[56] SABINO, R. M. et al. Tanfloc/heparin polyelectrolyte multilayers improve osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on titania nanotube surfaces. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117079, 1 Jan. 2021.

[57] FACCHI, D. P. et al. Polyelectrolyte complexes based on alginate/tanfloc: Optimization, characterization and medical application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 129–138, 2017.

[58] BEZERRA, E. DE O. T. et al. The cooling of blends in water supports durable, thermo-responsive, and porous gelatin-polyphenolic tannin assemblies with

antimicrobial activities. **Materials Today Communications**, v. 26, p. 101883, 1 Mar. 2021.

[59] PINA, S.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. **Advanced Materials**, v. 27, n. 7, p. 1143–1169, 2015.

[60] OKAMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1487–1503, 2013.

[61] ABBASI, N. et al. Porous scaffolds for bone regeneration. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 1 Mar. 2020.

[62] CHARLES-HARRIS, M. et al. A PLA/calcium phosphate degradable composite material for bone tissue engineering: An in vitro study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 4, p. 1503–1513, 12 Apr. 2008.

[63] SERRA, I. R. et al. Production and characterization of chitosan/gelatin/ β -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 55, p. 592–604, 26 Jun. 2015.

[64] LOPES, D. et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, v. 185, p. 240–275, 1 Dec. 2018.

[65] GAO, C. et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. **Bone Research**, v. 5, n. 17059, p. 1–33, 21 Dec. 2017.

[66] GAO, X. et al. Polydopamine-templated hydroxyapatite reinforced polycaprolactone composite nanofibers with enhanced cytocompatibility and osteogenesis for bone tissue engineering. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 5, p. 3499–3515, 10 Feb. 2016.

[67] BACKES, E. H. et al. Fabrication of Biocompatible Composites of Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite Envisioning Medical Applications. **Polymer Engineering & Science**, v. 60, n. 3, p. 636–644, 1 Mar. 2020.

[68] YEO, T. et al. Promoting bone regeneration by 3D-printed poly(glycolic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 94, p. 343–351, 25 Feb. 2021.

[69] NGIAM, M. et al. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. **Bone**, v. 45, n. 1, p. 4–16, 1 Jul. 2009.

- [70] BRUN, V. et al. Chitosan/hydroxyapatite hybrid scaffold for bone tissue engineering. **Bio-medical materials and engineering**, v. 24, n. 1, p. 63–73, 1 Jan. 2014.
- [71] KOH, K. S. et al. Bone regeneration using silk hydroxyapatite hybrid composite in a rat alveolar defect model. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 59–68, 1 Jan. 2018.
- [72] BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011.
- [73] GARLOTTA, D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, n. 2, 2001.
- [74] CARRASCO, F. et al. Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 2, p. 116–125, 1 Feb. 2010.
- [75] RUDNIK, E. **Compostable Polymer Materials**. First edit ed. Oxford: Elsevier, 2008.
- [76] LIM, L.-T.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic acid). **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 8, p. 820–852, 2008.
- [77] AL-ITRY, R.; LAMNAWAR, K.; MAAZOUZ, A. Reactive extrusion of PLA, PBAT with a multi-functional epoxide: Physico-chemical and rheological properties. **European Polymer Journal**, v. 58, p. 90–102, 1 Sep. 2014.
- [78] SIEGENTHALER, K. O. et al. Ecoflex® and Ecovio®: Biodegradable, Performance-Enabling Plastics. In: RIEGER B., KÜNKEL A., COATES G., REICHARDT R., DINJUS E., Z. T. (Ed.). **Synthetic Biodegradable Polymers**. [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 91–136.
- [79] SHAHLARI, M.; LEE, S. Mechanical and morphological properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) and poly(lactic acid) blended with organically modified silicate layers. **Polymer Engineering and Science**, v. 52, n. 7, p. 1420–1428, 1 Jul. 2012.
- [80] SHI, X. Q.; ITO, H.; KIKUTANI, T. Characterization on mixed-crystal structure and properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) biodegradable fibers. **Polymer**, v. 46, n. 25, p. 11442–11450, 28 Nov. 2005.
- [81] LONG, Z. et al. Effect of polybutylene adipate terephthalate on the properties of starch/polybutylene adipate terephthalate shape memory composites.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 240, p. 124452, 15 Jun. 2023.

[82] FUKUSHIMA, K. et al. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 6, p. 1331–1351, 1 Aug. 2012.

[83] WENG, Y. X. et al. Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. **Polymer Testing**, v. 32, n. 5, p. 918–926, 1 Aug. 2013.

[84] JAO, W. C. et al. Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, n. 8, p. 543–553, 1 Aug. 2010.

[85] FUKUSHIMA, K.; RASYIDA, A.; YANG, M. C. Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 80–81, p. 291–298, 1 Aug. 2013.

[86] GOES, A. M. et al. Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorilonita. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 34–41, 2012.

[87] BRANCIFORTI, M. C. et al. Poly (Butylene adipate-co-terephthalate) and poly (ϵ -caprolactone) and their bionanocomposites with cellulose nanocrystals: Thermo-mechanical properties and cell viability study. **Journal of Renewable Materials**, v. 7, n. 3, p. 269–277, 2019.

[88] SILVA, D. F. et al. Blendas poliméricas: conceitos, obtenção e aplicações. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 8, n. 1, p. 58–77, 21 Apr. 2016.

[89] PASSADOR, F. R.; PESSAN, L. A.; RODOLFO, A. Estado de mistura e dispersão da fase borrachosa em blendas PVC/NBR. **Polímeros**, v. 16, n. 3, p. 174–181, 2006.

[90] SILVA, P. T. V. DA et al. Evolution of morphology and mechanical properties of PA6/AES blends compatibilized with EPDM-MA. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e210101018791, 8 Aug. 2021.

[91] SPERLING, L. H. **Polymeric multicomponent materials: an introduction**. New York: John Wiley & Sons, Ltd, 1997.

[92] UTRACKI, L. A.; MUKHOPADHYAY, P.; GUPTA, R. K. **Polymer blends: Introduction**. [s.l.] Springer Netherlands, 2014.

[93] ARRIGHI, V. et al. Miscibility Criterion in Polymer Blends and its

Determination. In: **Encyclopedia of Polymer Blends**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2010. p. 153–198.

[94] AID, S. et al. Experimental study of the miscibility of ABS/PC polymer blends and investigation of the processing effect. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 25, 5 Jul. 2017.

[95] STARÝ, Z. Thermodynamics and Morphology and Compatibilization of Polymer Blends. In: **Characterization of Polymer Blends: Miscibility, Morphology and Interfaces**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 93–132.

[96] CARDINAELS, R.; MOLDENAERS, P. Morphology development in immiscible polymer blends. In: **Polymer Morphology: Principles, Characterization, and Processing**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 348–373.

[97] SU, S. Prediction of the miscibility of pbat/pla blends. **Polymers**, v. 13, n. 14, p. 2339, 2 Jul. 2021.

[98] HARADA, J. “**Linha de Plásticos Biodegradáveis, Compostáveis e de Fontes Renováveis, Normas.**” Disponível em: <http://moodle.stoa.usp.br/file.php/1066/2011/palestra_Julio_Harada_Biopolicos.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2021.

[99] JIANG, L.; ZHANG, J. Biodegradable and Biobased Polymers. In: **Applied Plastics Engineering Handbook: Processing, Materials, and Applications: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 127–143.

[100] MOHR, L. C. et al. Titanium dioxide nanoparticles applied as ultraviolet radiation blocker in the polylactic acid biodegradable polymer. **Polymer Testing**, v. 77, p. 105867, 1 Aug. 2019.

[101] FACCHI, D. P. et al. Composite filter with antimicrobial and anti-adhesive properties based on electrospun poly(butylene adipate-co-terephthalate)/poly(lactic acid)/Tween 20 fibers associated with silver nanoparticles. **Journal of Membrane Science**, v. 650, p. 120426, 15 May 2022.

[102] ANTUNES, L. R. et al. Electrospun poly(lactic acid) (PLA)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) nanofibers for the controlled release of cilostazol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 333–342, 1 Jul. 2021.

[103] KANG, Y. et al. Preparation of open-porous stereocomplex PLA/PBAT scaffolds and correlation between their morphology, mechanical behavior, and

cell compatibility. **RSC Advances**, v. 8, n. 23, p. 12933–12943, 3 Apr. 2018.

[104] BASF. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - ecovio® F2224**. Disponível em:

<https://documents.basf.com/f77aa2f5859d285b1ac542248a426d58296a0547/MSDS_000000000030593361_pt.pdf?response-content-disposition=inline>.

Acesso em: 26 jun. 2021.

[105] MUNHOZ, P. M. et al. Poly(butylene adipate co-terephthalate)/poly (lactic acid) (PBAT/PLA) blend characterization processed by electron beam. **International Nuclear Atlantic Conference**, 2019.

[106] SWETHA, M. et al. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 1, p. 1–4, 1 Jul. 2010.

[107] YOUSEFI, A.-M. et al. Physical and biological characteristics of nanohydroxyapatite and bioactive glasses used for bone tissue engineering. **Nanotechnology Reviews**, v. 3, n. 6, p. 527–552, 2014.

[108] GRITSCH, L. et al. Chitosan/hydroxyapatite composite bone tissue engineering scaffolds with dual and decoupled therapeutic ion delivery: Copper and strontium. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 40, p. 6109–6124, 2019.

[109] RIBEIRO, M.; MONTEIRO, F. J.; FERRAZ, M. P. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. **Biomatter**, v. 2, n. 4, p. 176–194, 2012.

[110] UMAR ASLAM KHAN, M. et al. Development of porous, antibacterial and biocompatible GO/n-HAp/bacterial cellulose/ β -glucan biocomposite scaffold for bone tissue engineering. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 102924, 1 Feb. 2021.

[111] O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations** **Review on Microbial Resistant**. [s.l.] Government of the United Kingdom, 2016. Disponível em: <<https://apo.org.au/sites/default/files/resource-files/2016-05/apo-nid63983.pdf>>.

[112] ZHANG, B. G. X. et al. Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 11878–11921, 4 Jul. 2014.

[113] ALVES, N. M.; MANO, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical

modifications for biomedical and environmental applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 5, p. 401–414, 1 Dec. 2008.

[114] KIM, I. Y. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 1–21, 1 Jan. 2008.

[115] AHMED, S. et al. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 1166, p. 849–862, 2016.

[116] MAILLOA, M. N. et al. Antimicrobial activities of tannins extract from Guava leaves (*Psidium guajava* L) on pathogens microbial. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 3, n. 1, p. 236–241, 2014.

[117] HELDT, H.-W.; PIECHULLA, B. Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. In: **Plant Biochemistry**. [s.l.] Academic Press, 2011. p. 431–449.

[118] MARTINS, A. F. et al. Novel poly(ϵ -caprolactone)/amino-functionalized tannin electrospun membranes as scaffolds for tissue engineering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 525, p. 21–30, 2018.

[119] MANGRICH, A. S. et al. Química verde no tratamento de águas: Uso de coagulante derivado de tanino de acacia mearnsii. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 2–15, 2014.

[120] FACCHI, S. P. et al. Polycationic condensed tannin/polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers prevent microbial adhesion and proliferation. **European Polymer Journal**, v. 130, p. 109677, 5 May 2020.

[121] BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J. Municipal wastewater treatment by modified tannin flocculant agent. **Desalination**, v. 249, n. 1, p. 353–358, 2009.

[122] SABINO, R. M. et al. Enhanced hemocompatibility and antibacterial activity on titania nanotubes with tanfloc/heparin polyelectrolyte multilayers. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 108, n. 4, p. 992–1005, 1 Apr. 2020.

[123] CÂMARA, P. C. F. DA et al. Novel cationic tannin/glycosaminoglycan-based polyelectrolyte multilayers promote stem cells adhesion and proliferation. **RSC Advances**, v. 9, n. 44, p. 25836–25846, 13 Aug. 2019.

[124] FANG, Y.-G. et al. Preparing novel polylactic acid based bone scaffold composites with enhanced calcium phosphate deposition behavior and bioactivity via simple one-step melt extrusion. **Journal of Applied Polymer Science**, p.

e55970, 6 Jul. 2024.

[125] SUTTIAT, K.; WATTANUTCHARIYA, W.; MANASPON, C. Preparation and characterization of porous poly(lactic acid)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PLA/PBAT) scaffold with polydopamine-assisted biomineralization for bone regeneration. **Materials**, v. 15, n. 21, p. 7756, 3 Nov. 2022.

[126] LIU, Y. et al. Hollow porous PLA/PBAT composite microfibers with enhanced toughness and prolonged drug release for wound healing. **Materials & Design**, v. 237, p. 112624, 1 Jan. 2024.

[127] REIS, P. R. S. et al. Development of biocomposite materials from biodegradable polymer and bio-hydroxyapatite derived from eggshells for biomedical applications. In: **Minerals, Metals and Materials Series**. [s.l.] Springer International Publishing, 2019. p. 571–581.

[128] JAIDEV, L. R.; CHATTERJEE, K. Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment stem cell response. **Materials & Design**, v. 161, p. 44–54, 5 Jan. 2019.

[129] LI, X. et al. Melting centrifugally spun ultrafine poly butylene adipate-co-terephthalate (PBAT) fiber and hydrophilic modification. **RSC Advances**, v. 11, n. 43, p. 27019–27026, 2 Aug. 2021.

[130] MOHD SABEE, M. M. S. et al. Osteoblasts migration, attachment and human bone marrow-mesenchymal stem cells osteogenic differentiation towards surface engineered and growth factors conjugated poly(lactic acid) microspheres. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 31, n. 45, p. 1–12, 1 May 2020.

[131] SUAMTE, L. et al. Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. **Smart Materials in Manufacturing**, v. 1, p. 100011, 1 Jan. 2023.

[132] ABDUL HAMID, Z. A.; THAM, C. Y.; AHMAD, Z. Preparation and optimization of surface-engineered poly(lactic acid) microspheres as a drug delivery device. **Journal of Materials Science**, v. 53, n. 7, p. 4745–4758, 1 Apr. 2018.

[133] MOHD SABEE, M. M. S. et al. Characterization and in vitro study of surface modified PLA microspheres treated with NaOH. **Journal of Polymer Materials**, v. 33, p. 191–200, 1 Mar. 2016.

- [134] CHEN, W. et al. Alkali treatment facilitates functional nano-hydroxyapatite coating of 3D printed polylactic acid scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 120, p. 111686, 1 Jan. 2021.
- [135] DONATE, R.; ALEMÁN-DOMÍNGUEZ, M. E.; MONZÓN, M. On the effectiveness of oxygen plasma and alkali surface treatments to modify the properties of polylactic acid scaffolds. **Polymers**, v. 13, n. 10, p. 1643, 18 May 2021.
- [136] WANG, S. et al. Fabrication and application of a 3D-printed poly- ϵ -caprolactone cage scaffold for bone tissue engineering. **BioMed Research International**, v. 2020, n. 1, p. 2087475, 1 Jan. 2020.
- [137] MARTIN, V. et al. Engineering a multifunctional 3D-printed PLA-collagen-minocycline-nanoHydroxyapatite scaffold with combined antimicrobial and osteogenic effects for bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 101, p. 15–26, 1 Aug. 2019.
- [138] NARAYAN, R.; LEE, Y.-S. (EDS.). **Printed Biomaterials: Novel Processing and Modeling Techniques for Medicine and Surgery**. New York: Springer, 2010.
- [139] GLEADALL, A. et al. Review of additive manufactured tissue engineering scaffolds: relationship between geometry and performance. **Burns & Trauma**, v. 6, 1 Dec. 2018.
- [140] CALORE, A. R. et al. Additive Manufacturing Using Melt Extruded Thermoplastics for Tissue Engineering. In: **Computer-Aided Tissue Engineering. Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana, New York, NY, 2021. v. 2147p. 75–99.
- [141] LIU, J. et al. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Engineering. **3D Printing**, 5 Nov. 2018.
- [142] MELCHELS, F. P. W. et al. Additive manufacturing of tissues and organs. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 8, p. 1079–1104, 1 Aug. 2012.
- [143] MALDA, J. et al. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. **Advanced Materials**, v. 25, n. 36, p. 5011–5028, 1 Sep. 2013.
- [144] HUANG, Y. et al. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 8, p. 1600734, 1 Aug. 2017.
- [145] BILLIET, T. et al. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 6020–6041, 1

Sep. 2012.

[146] GROLL, J. et al. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. **Biofabrication**, v. 8, n. 1, p. 013001, 8 Jan. 2016.

[147] NING, L.; CHEN, X. A brief review of extrusion-based tissue scaffold bio-printing. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 8, p. 1600671, 1 Aug. 2017.

[148] ROGERS, C. I. et al. 3D printed microfluidic devices with integrated valves. **Biomicrofluidics**, v. 9, n. 1, p. 016501, 13 Jan. 2015.

[149] ANDRZEJEWSKI, J. et al. Development of Toughened Blends of Poly(lactic acid) and Poly(butylene adipate- co-terephthalate) for 3D Printing Applications: Compatibilization Methods and Material Performance Evaluation. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 17, p. 6576–6589, 4 May 2020.

[150] KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 1 May 2006.

[151] SOUZA, M. T. et al. Broad-spectrum bactericidal activity of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 6, p. 730–733, 1 Dec. 2017.

[152] JANMOHAMMADI, M. et al. Effect of Pore Characteristics and Alkali Treatment on the Physicochemical and Biological Properties of a 3D-Printed Polycaprolactone Bone Scaffold. **ACS Omega**, v. 8, n. 8, p. 7378–7394, 28 Feb. 2023.

[153] ZHOU, Z. X. et al. Facile Strategy on Hydrophilic Modification of Poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds for Assisting Tissue-Engineered Meniscus Constructs In Vitro. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 507624, 1 May 2020.

[154] CUI, Z. et al. Porous 3-D thermoplastic polyurethane (TPU) scaffold modified with hydroxyapatite (HA) nanoparticles using an ultrasonic method. **Journal of Materials Science**, v. 54, n. 16, p. 11231–11242, 30 Aug. 2019.

[155] BONIFÁCIO, E. et al. A tannin-polymer adsorbent created from the freezing-thawing method for removal of metal-complex acid black 172 and methylene blue from aqueous solutions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 351, p. 118682, 1 Apr. 2022.

[156] BACKES, E. H. et al. Development of poly(ϵ -polycaprolactone)/hydroxyapatite composites for bone tissue regeneration. **Journal of Materials Research**, v. 36, n. 15, p. 3050–3062, 14 Aug. 2021.

- [157] BAI, S. et al. Bioinspired Mineral–Organic Bone Adhesives for Stable Fracture Fixation and Accelerated Bone Regeneration. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 5, p. 1908381, 1 Jan. 2020.
- [158] CAO, J. et al. Bioinspired mineral–organic hybridization strategy to produce a green high performance soybean meal based adhesive. **Journal of Cleaner Production**, v. 299, p. 126939, 2021.
- [159] FILIPPONE, G.; ROMEO, G.; ACIERNO, D. Role of Interface Rheology in Altering the Onset of Co-Continuity in Nanoparticle-Filled Polymer Blends. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 296, n. 7, p. 658–665, 12 Jul. 2011.
- [160] ZHANG, M. et al. Morphology and rheology of poly(l-lactide)/polystyrene blends filled with silica nanoparticles. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 3, p. 1339–1347, 3 Feb. 2012.
- [161] YAO, Q. et al. Micromorphology, mechanical, crystallization and permeability properties analysis of HA/PBAT/PLA (HA, hydroxyapatite; PBAT, poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate); PLA, polylactide) degradability packaging films. **Polymer International**, v. 69, n. 3, p. 301–307, 1 Mar. 2020.
- [162] ÇOBAN, O. et al. Mechanical and thermal properties of volcanic particle filled PLA/PBAT composites. **Polymer Composites**, v. 39, n. S3, p. E1500–E1511, 1 Jun. 2018.
- [163] CAMPO, A. DEL et al. Accelerated disintegration of compostable Ecovio polymer by using ZnO particles as filler. **Polymer Degradation and Stability**, v. 185, p. 109501, 1 Mar. 2021.
- [164] SHASTEEN, C.; CHOY, Y. BIN. Controlling degradation rate of poly(lactic acid) for its biomedical applications. **Biomedical Engineering Letters**, v. 1, n. 3, p. 163–167, 14 Aug. 2011.
- [165] MA, P. et al. Green Antibacterial Nanocomposites from Poly(lactide)/Poly(butylene adipate-co-terephthalate)/Nanocrystal Cellulose-Silver Nanohybrids. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 12, p. 6417–6426, 5 Dec. 2016.
- [166] PONCE, G. et al. Biocomposites of polylactic acid/ poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends loaded with quinoa husk agro-waste: thermal and mechanical properties. **Journal of Polymer Research**, v. 29, n. 8, p. 1–13, 1 Aug. 2022.

- [167] AINALI, N. M. et al. Thermal Stability and Decomposition Mechanism of PLA Nanocomposites with Kraft Lignin and Tannin. **Polymers** **2021**, Vol. **13**, Page **2818**, v. 13, n. 16, p. 2818, 22 Aug. 2021.
- [168] KADHIM, M. A. et al. Towards sustainable electronics: High-performance biodegradable polymer-based dielectric composite utilizing hydroxyapatite from cattle bone waste. **Journal of Energy Storage**, v. 101, p. 113905, 10 Nov. 2024.
- [169] HE, H. et al. Study on structure and properties of biodegradable PLA/PBAT/organic-modified MMT nanocomposites. **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, v. 35, n. 4, p. 503–520, 1 Apr. 2022.
- [170] LIU, T. et al. Facile fabrication of fully biodegradable and biorenewable poly (lactic acid)/poly (butylene adipate-co-terephthalate) in-situ nanofibrillar composites with high strength, good toughness and excellent heat resistance. **Polymer Degradation and Stability**, v. 171, p. 109044, 1 Jan. 2020.
- [171] GEVEN, M. A. et al. Micro-porous composite scaffolds of photo-crosslinked poly(trimethylene carbonate) and nano-hydroxyapatite prepared by low-temperature extrusion-based additive manufacturing. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 28, n. 10, p. 1226–1232, 1 Oct. 2017.
- [172] ANWER, M. A. S. et al. Comparison of the thermal, dynamic mechanical and morphological properties of PLA-Lignin & PLA-Tannin particulate green composites. **Composites Part B: Engineering**, v. 82, p. 92–99, 2015.
- [173] CRESNAR, K. P. et al. Kraft Lignin/Tannin as a Potential Accelerator of Antioxidant and Antibacterial Properties in an Active Thermoplastic Polyester-Based Multifunctional Material. **Polymers (Basel)**, v. 14, n. 8, 1 Apr. 2022.
- [174] BERNARDO, M. P. et al. PLA/Hydroxyapatite scaffolds exhibit in vitro immunological inertness and promote robust osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells without osteogenic stimuli. **Scientific Reports** **2022** **12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 11 Feb. 2022.
- [175] ALMELA, T. et al. Simulation of cortico-cancellous bone structure by 3D printing of bilayer calcium phosphate-based scaffolds. **Bioprinting**, v. 6, p. 1–7, 1 Jun. 2017.
- [176] GUIMARÃES, C. F. et al. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. **Nature Reviews Materials**, v. 5, n. 5, p. 351–370, 21 Feb. 2020.
- [177] SIQUEIRA, L. et al. Influence of the addition of β -TCP on the morphology,

thermal properties and cell viability of poly (lactic acid) fibers obtained by electrospinning. **Materials Science and Engineering: C**, v. 52, p. 135–143, 1 Jul. 2015.

[178] BACKES, E. H. et al. Engineering 3D printed bioactive composite scaffolds based on the combination of aliphatic polyester and calcium phosphates for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 122, p. 111928, 1 Mar. 2021.

[179] PANT, J. et al. Antibacterial 3D bone scaffolds for tissue engineering application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 107, n. 4, p. 1068–1078, 1 May 2019.

[180] TURNER, B. N.; STRONG, R.; GOLD, S. A. A review of melt extrusion additive manufacturing processes: I. Process design and modeling. **Rapid Prototyping Journal**, v. 20, n. 3, p. 192–204, 2014.

[181] PINTO, L. A. **Desenvolvimento e caracterização de biocompósitos de blendas TPU/PCL com hidroxiapatita para produção de scaffolds bioativos via impressão 3D**. 2 Aug. 2022. 127 f. Universidade Federal de São Carlos. 2 Aug. 2022.

[182] MOHAMMADI ZERANKESHI, M.; MOFAKHAMI, S.; SALAHINEJAD, E. 3D porous HA/TCP composite scaffolds for bone tissue engineering. **Ceramics International**, v. 48, n. 16, p. 22647–22663, 15 Aug. 2022.

[183] SCHNEIDER, M. et al. Surface Etching of 3D Printed Poly(lactic acid) with NaOH: A Systematic Approach. **Polymers**, v. 12, n. 8, p. 1711, 30 Jul. 2020.

[184] BARTNIKOWSKI, M. et al. A comprehensive study of acid and base treatment of 3D printed poly(ϵ -caprolactone) scaffolds to tailor surface characteristics. **Applied Surface Science**, v. 555, p. 149602, 30 Jul. 2021.

[185] HARB, S. V. et al. Effect of silicon dioxide and magnesium oxide on the printability, degradability, mechanical strength and bioactivity of 3D printed poly (lactic acid)-tricalcium phosphate composite scaffolds. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. 1–20, 19 Oct. 2023.

[186] MAJHY, B.; PRIYADARSHINI, P.; SEN, A. K. Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth – facile surface modification for enhanced cell culture. **RSC Advances**, v. 11, n. 25, p. 15467–15476, 21 Apr. 2021.

[187] UZARSKI, J. S. et al. Essential design considerations for the resazurin reduction assay to noninvasively quantify cell expansion within perfused

extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 129, p. 163–175, 1 Jun. 2017.

[188] THADAVIRUL, N.; PAVASANT, P.; SUPAPHOL, P. Improvement of dual-leached polycaprolactone porous scaffolds by incorporating with hydroxyapatite for bone tissue regeneration. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 25, n. 17, p. 1986–2008, 22 Nov. 2014.

APÊNDICE A

Para calcular a densidade do *scaffold* compósito (Ecovio/HA), usou-se a regra das misturas para materiais compósitos. Este método considera as frações de peso e densidades de cada componente para encontrar a densidade geral. A fórmula é:

$$\rho_c = \frac{w_1 \times \rho_1 + w_2 \times \rho_2}{w_1 + w_2}$$

onde:

- ρ_c é a densidade do compósito.
- w_1 e w_2 são as frações de peso dos componentes.
- ρ_1 e ρ_2 são as densidades dos componentes.

Para o compósito:

- $w_{\text{Ecovio}} = 0,90$
- $w_{\text{HA}} = 0,10$
- $\rho_{\text{Ecovio}} = 1,25 \text{ g/cm}^3$
- ρ_{HA} é de aproximadamente $3,16 \text{ g/cm}^3$

Inserir esses valores na fórmula obtém:

$$\rho_c = (0,90 \times 1,25) + (0,10 \times 3,16) / (0,90 + 0,10)$$

$$\rho_c = (1,125) + (0,316) / (1)$$

$$\rho_c = 1,441 \text{ g/cm}^3$$

Portanto, a densidade do *scaffold* compósito Ecovio/HA é de aproximadamente $1,44 \text{ g/cm}^3$.

Dados usados no cálculo da porosidade de acordo com a equação 4.3:

Tabela A.1 - Dados usados no cálculo de porosidade dos *scaffolds*.

	Massa (g)	h (cm)	D (cm)	Volume (cm³)	Densidade teórica (g/cm³)	Densidade experimental (g/cm³)	Porosidade (%)
Ecovio	0,0689	0,2915	0,6935	0,1101	1,25	0,6257	49,9403
	0,062	0,291	0,689	0,1085	1,25	0,5714	54,2848
	0,0692	0,28	0,716	0,1127	1,25	0,6138	50,8954
	0,0855	0,2905	0,751	0,1287	1,25	0,6644	46,8455
	0,0855	0,2955	0,736	0,1257	1,25	0,6801	45,5932
Ecovio/HA	0,0689	0,2945	0,717	0,1189	1,44	0,5794	59,7614
	0,0775	0,297	0,705	0,1159	1,44	0,6685	53,5790
	0,0726	0,306	0,7025	0,1186	1,44	0,6121	57,4920
	0,0661	0,2925	0,6865	0,1083	1,44	0,6105	57,6023
	0,0716	0,3065	0,688	0,1139	1,44	0,6284	56,3632

Porosidade média (%):

- Ecovio: **57 ± 2**;
- Ecovio/HA: **49,5 ± 3**