

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

OBTENÇÃO DE SCAFFOLD COMPÓSITO COM DEPOSIÇÃO DE  
NANOPARTÍCULAS DE CÉRIO E TRATAMENTO SUPERFICIAL PARA  
APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDO

Ítalo de Matos Oliveira

São Carlos-SP  
2025

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

**OBTENÇÃO DE SCAFFOLD COMPÓSITO COM DEPOSIÇÃO DE**  
**NANOPARTÍCULAS DE CÉRIO E TRATAMENTO SUPERFICIAL PARA**  
**APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDO**

Ítalo de Matos Oliveira

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

Orientador: Dr. Luiz Antonio Pessan

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Samarah Vargas Harb

São Carlos-SP  
2025

## DEDICATÓRIA

A Deus, que me guiou durante todo o tempo dando forças e direção em todo o momento.

À minha noiva, Marina,

Aos meus pais, Elaine e José,

À minha irmã Iara,

Que me apoiaram e me incentivaram durante todo o período de realização deste trabalho.

## VITAE

Técnico em Mecânica Industrial pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (2012).

Bacharel em Engenharia Mecânica pela Universidade Federal de Juiz de Fora (2019).



**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 Dissertação de Mestrado do candidato Ítalo de Matos Oliveira, realizada em 28/02/2025.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Luiz Antonio Pessan (UFSCar)

Profa. Dra. Lidiane Cristina Costa (UFSCar)

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

A Deus, meu alicerce e fonte inesgotável de coragem e sabedoria.

Aos meus orientadores, professor Luiz Antonio Pessan e Samarah Vargas Harb, por todos os ensinamentos e compreensão ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

À minha noiva, Marina Rodrigues, por me encorajar, incentivar e apoiar em todos os momentos.

À minha família, que desde os primeiros passos me incentivou a buscar o conhecimento e investiu na minha formação.

A todos os professores e alunos do nosso grupo de pesquisa pelas discussões e suporte ao longo da execução deste trabalho.

À 3M do Brasil que permitiu me dedicar parcialmente ao Mestrado durante o período de aulas presenciais.

Ao grupo de pesquisa por todo suporte prestado ao longo desse período.

Ao Departamento de Engenharia e Ciência dos Materiais (DEMA).

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 mestrado.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A Prof.<sup>a</sup> 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.

## RESUMO

*Scaffolds* biodegradáveis, fabricados por manufatura aditiva, são promissores na regeneração óssea por mimetizarem a matriz extracelular natural do osso, tanto em arquitetura quanto em propriedades bioquímicas e mecânicas. Atuam como moldes temporários, direcionando o crescimento do tecido ósseo, acelerando a recuperação de pacientes com traumas ortopédicos e reduzindo a necessidade de múltiplas cirurgias. Este estudo investigou a modificação superficial de *scaffolds* compósitos de poli(ácido lático) (PLA)- $\beta$ -fosfato tricálcio ( $\beta$ -TCP) (90:10 m/m%) obtidos via manufatura aditiva, com modificação por plasma, tratamento alcalino e deposição de nanopartículas de óxido de cério (CeONPs) para estimular o crescimento celular ósseo. Filamentos de PLA- $\beta$ -TCP foram obtidos por extrusão e usados para a fabricação dos *scaffolds* por impressão 3D. As superfícies foram tratadas com plasma ou hidróxido de sódio, seguidas da deposição de CeONPs, sintetizadas ou adquiridas comercialmente. A síntese das nanopartículas foi monitorada por espectroscopia UV-Vis, com o pico de absorvância identificado a 270 nm, indicando partículas com raio de aproximadamente 20,5 nm. Os *scaffolds* foram avaliados quanto às propriedades mecânicas (compressão uniaxial), características de superfície (ângulo de contato, Microscopia de Força Atômica - AFM, Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV) e viabilidade celular (Alamar Blue). Os resultados mostraram que os *scaffolds* apresentaram módulos de elasticidade (78-127 MPa) dentro da faixa de valores do osso humano nativo. O ângulo de contato revelou um aumento da hidrofobicidade com tratamento alcalino, e redução com adição de CeONPs. Análises de AFM e MEV indicaram diferenças na rugosidade e morfologia superficial (presença de poros), sendo o grupo tratado com NaOH e CeONP sintetizadas o mais rugoso. No ensaio com células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1), a amostra tratada com plasma e CeONP comerciais apresentou maior proliferação celular. Os resultados destacam o efeito positivo dos tratamentos superficiais na funcionalização da superfície do *scaffold* e o aumento da bioatividade do material com a deposição de CeONPs.

**Palavras-chave:** *scaffold*, manufatura aditiva, compósito, biomaterial, engenharia de tecido ósseo, nanopartículas de óxido de cério.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF A COMPOSITE SCAFFOLD WITH CERIUM NANOPARTICLE DEPOSITION AND SURFACE MODIFICATION FOR APPLICATIONS IN TISSUE ENGINEERING

Biodegradable scaffolds manufactured via additive manufacturing are promising for bone regeneration as they mimic the natural extracellular matrix of bone, both in terms of architecture and biochemical and mechanical properties. They act as temporary templates, guiding bone tissue growth, accelerating the recovery of patients with orthopedic trauma, and reducing the need for multiple surgeries. This study investigated the surface modification of poly(lactic acid) (PLA)- $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) composite scaffolds (90:10 wt/wt%) produced by additive manufacturing, using plasma treatment, alkaline hydrolysis, and deposition of cerium oxide nanoparticles (CeONPs) to stimulate bone cell growth. PLA- $\beta$ -TCP filaments were obtained by extrusion and used to fabricate the scaffolds via 3D printing. The surfaces were treated with plasma or sodium hydroxide, followed by deposition of CeONPs, either synthesized or commercially acquired. The nanoparticle synthesis was monitored by UV-Vis spectroscopy, with an absorbance peak at 270 nm, indicating particles with a radius of approximately 20.5 nm. The scaffolds were evaluated for mechanical properties (uniaxial compression), surface characteristics (contact angle, Atomic Force Microscopy – AFM, Scanning Electron Microscopy – SEM), and cell viability (Alamar Blue assay). The results showed that the scaffolds exhibited elastic moduli (78-127 MPa) within the range of native human bone. Contact angle measurements revealed increased hydrophilicity after alkaline treatment and reduced hydrophilicity after CeONP addition. AFM and SEM analyses showed differences in roughness and surface morphology (presence of pores), with the NaOH and synthesized CeONP group being the roughest. In pre-osteoblastic mouse cell (MC3T3-E1) assays, the sample treated with plasma and commercial CeONPs showed the highest cell proliferation. The results highlight the positive effect of surface treatments on scaffold functionalization and the increased bioactivity of the material with CeONP deposition.

**Keywords:** scaffold; additive manufacturing; composite; biomaterial; bone tissue engineering; cerium oxide nanoparticles.

## **PUBLICAÇÕES**

ROSA, L.G.S.; FONTANA, L.C.; SAGÁS, J.C.; BACKES, E.H.; COSTA, L.C.; PINTO, L.A.; OLIVEIRA, I.M.; PESSAN, L.A.; BECKER, D. Bipolar high-impulse electrophoretic process for cerium nanoparticle deposition on polylactic acid scaffolds. **SURFACE & COATINGS TECHNOLOGY.**

## ÍNDICE DE ASSUNTOS

	Pág.
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
PUBLICAÇÕES.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO.....	5
3.2 MANUFATURA ADITIVA.....	6
3.3 BIOMATERIAIS.....	8
3.3.1 Poli (ácido láctico) (PLA).....	9
3.3.2 PLA- $\beta$ -TCP.....	11
3.3.3 CÉRIO.....	16
3.4 TRATAMENTO SUPERFICIAL DE <i>SCAFFOLDS</i> .....	17
3.4.1 TRATAMENTO SUPERFICIAL COM PLASMA.....	22
3.4.2 ATAQUE QUÍMICO COM NaOH.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 FABRICAÇÃO DO FILAMENTO DE PLA-TCP.....	28
3.2 PRODUÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i> POR MANUFATURA ADITIVA.....	28
3.3 TRATAMENTO SUPERFICIAL POR ATAQUE QUÍMICO.....	29
3.4 TRATAMENTO SUPERFICIAL POR PLASMA.....	29
3.5 SÍNTESE DAS CeONPs.....	31
3.6 DEPOSIÇÃO DAS CeONPs.....	31
3.7 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL (UV-Vis).....	32
3.8 ENSAIO DE COMPRESSÃO.....	32

3.9	ÂNGULO DE CONTATO.....	33
3.10	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA ( <i>AFM</i> ).....	33
3.11	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	33
3.12	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	34
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	SÍNTESE DAS NANO PARTÍCULAS DE CÉRIO.....	36
5.2	ENSAIO DE COMPRESSÃO.....	37
5.3	ÂNGULO DE CONTATO.....	38
5.4	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	39
5.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	42
5.6	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (ALAMAR BLUE) .....	48
6	CONCLUSÕES.....	50
7	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	52
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

**ÍNDICE DE TABELAS**

	Pág.
Tabela 1 - Temperaturas de transição primárias para copolímeros (L/D, L) -PLA [51].	11
Tabela 2 - Composições dos filamentos baseados em PLA desenvolvidos pelo processo de extrusão. [78]	14
Tabela 3 - Efeitos das propriedades físico-químicas dos biomateriais na adesão de células osteoblásticas.	18
Tabela 4 - Revisão das publicações sobre modificações superficiais do PLA. Adaptado de [95]	20
Tabela 5 - Descrição dos grupos testados	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Hierarquia óssea. Adaptado de [22].	6
Figura 2 - Enantiômeros do ácido lático [64]	10
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura de amostras de PLA e PLA/TCP incubadas em SBF por 7 e 21 dias [73].	12
Figura 4 - Atividade metabólica de osteoblastos nos <i>scaffolds</i> determinados pelo ensaio de Alamar Blue (*p < 0,05 e ***p < 0,001). CaCO <sub>3</sub> , carbonato de cálcio; PLA, ácido poli (lático); β-TCP, beta-fosfato tricálcio. Adaptado de [74].	13
Figura 5 - (A) enxerto ósseo de crista íliaca tricortical autóloga; (B) PEEK poli (éter-éter-cetona) e (C) PLA/30% m/m nanopartículas de TCP e travas de PLA/2% m/m nanopartículas de β-TCP. [77]	14
Figura 6 - Estrutura tetraédrica do β-fosfato tricálcio (TCP). Adaptado de [XX].	15
Figura 7 - Diagrama esquemático do processo de aprisionamento [147]	21
Figura 8 - Esquema experimental (próprio autor)	28
Figura 9 - Modelagem dos <i>scaffolds</i> pelo software <i>SolidWorks</i> , seguido do fatiamento pelo software <i>Slic3r</i> e impressão através da interface do software <i>Repetier-Host</i> .	30
Figura 10 - Configuração do reator.	31
Figura 11 - Becker com solução alcoólica de CeONPs.	32
Figura 12 - Captura de tela do teste de ângulo de contato aplicado ao <i>scaffold</i> .	34
Figura 13 - Evolução da absorbância entre 250 e 400 nm. Alíquotas coletadas a cada 15 min por 2 horas.	37
Figura 14 – Resultados do teste de compressão dos <i>scaffolds</i> tratados comparados com a amostra de controle, N=5; (**: p <0.01).	38
Figura 16 - Resultados do teste de ângulo de contato, N=5; *: p <0,05; **: p <0,01.	40
Figura 16 – Resultados topográficos da microscopia de força atômica dos 6 grupos avaliados evidenciando o perfil de rugosidade das superfícies.	41
Figura 18 - Resultados de rugosidade superficial média Sa entre os grupos. Apenas o grupo NAOH-Ce_Sintet possui diferença estatística significativa com relação ao grupo de controle, N=3; *: p <0.05.	42
Figura 19 - Ampliações de 1000X e 5000X dos <i>scaffolds</i> do grupo de controle com 1 e 7 dias de cultura.	43

- Figura 20 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo Ce\_Comercial com 1 e 7 dias de cultura. 44
- Figura 20 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo NAOH-Ce\_Comercial com 1 e 7 dias de cultura. 45
- Figura 21 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo NAOH-Ce\_Sintet com 1 e 7 dias de cultura. 46
- Figura 22 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo NAOH-Ce\_Comerc\_grade com 1 e 7 dias de cultura. 47
- Figura 23 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo NAOH-Ce\_Comerc\_livre com 1 e 7 dias de cultura. 48
- Figura 25 - Resultados do teste de viabilidade celular através do ensaio Alamar Blue. 49

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>ABS</b>	Acrilonitrila-Butadieno-eStireno
<b>ALP</b>	<i>Alkaline Phosphatase</i>
<b>ASTM</b>	<i>American Standard for Testing of Materials</i>
<b>BCP</b>	Fosfato de Cálcio Bifásico
<b>CAD</b>	<i>Computer Aided Design</i>
<b>CAM</b>	<i>Computer Aided Manufacturing</i>
<b>CeONPs</b>	Nanopartículas de Óxido de Cério
<b>CDHA</b>	HidroxiApatita Deficiente em Cálcio
<b>DCPA</b>	Fosfato Dicálcio Anidro
<b>DEMa</b>	Departamento de Engenharia de Materiais
<b>DRX</b>	Difração de Raios X
<b>ECM</b>	<i>Extra Cellular Matrix</i>
<b>EDS</b>	<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FDM</b>	<i>Fused Deposition Modeling</i>
<b>FFF</b>	<i>Fused Filament Fabrication</i>
<b>HA</b>	HidroxiApatita
<b>hBMSCs</b>	<i>Human Bone Mesenchymal Stem Cells</i>
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>LBBM</b>	Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>MSC</b>	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
<b>NP</b>	Nanopartículas
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAA</b>	Poli (ácido acrílico)
<b>PAAm</b>	PoliAcrilAmida
<b>PBAT</b>	Poli (Butileno Adipato- <i>co</i> -Tereftalato)
<b>PCL</b>	Poli ( <i>ε</i> -Caprolactona)
<b>PEG</b>	Poli (Etileno-Glicol)
<b>PHEMA</b>	Poli (HidroxiEtil MetAcrilato)

<b>PLA</b>	Poli (Ácido Láctico)
<b>PLGA</b>	Poli (Ácido Láctico- <i>co</i> -Ácido Glicólico)
<b>PLLA</b>	Poli (Ácido L-Láctico)
<b>PPF</b>	Fumarato de Polipropileno
<b>PVC</b>	Poli (Cloro de Vinila)
<b>RGD</b>	Ácido Arginilglicilaspártico
<b>SLS</b>	<i>Selective Laser Sintering</i>
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TCP</b>	Fosfato Tricálcio
<b>T<sub>g</sub></b>	Temperatura de transição vítrea
<b>TIPS</b>	Thermally Induced Phase Separation
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusão
<b>UFSCar</b>	Universidade Federal de São Carlos
<b>β:</b>	Beta
<b>μ:</b>	Mícron

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2050 o número de idosos no mundo ultrapassará os 2 bilhões de cidadãos [1] e a população brasileira alcançará uma expectativa de vida de 81 anos em 2060, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Com essa mudança demográfica estima-se que em 2060, 26,7% da população brasileira terá 60 anos ou mais [2]. O aumento da expectativa de vida da população leva a uma maior possibilidade de incidência de doenças ósseas como osteoporose e câncer ósseo, além da ocorrência mais frequente de acidentes e traumas que necessitam de procedimentos ortopédicos para a reparação [3].

Os materiais consolidados para fabricação de implantes ósseos são o aço inoxidável (316 L) e o titânio, seja puro ou na forma de ligas[4,5]. O aço inoxidável 316 L é composto por Fe, <0,03% C, 16-18% Cr, 10-14% Ni, 2-3% Mo, <2% Mn, <0,75% Si, <0,01% N, <0,045% P, e <0,03% S, possui um custo relativamente baixo, e por isso sendo utilizado no SUS (Sistema Único de Saúde), porém apresenta problemas quanto a corrosão e liberação de íons tóxicos. O titânio puro e suas ligas, embora apresentem um custo mais alto, vem substituindo o uso de aço inoxidável no sistema particular de saúde, sendo a liga Ti6Al4V o material mais utilizado para implantes atualmente [6].

Embora a liga Ti6Al4V seja mais resistente à corrosão em comparação ao aço inoxidável, altos níveis de detritos de titânio, vanádio e alumínio foram encontrados em tecidos circundantes após exposição por longos períodos e sob condições de desgaste [7, 8]. Outra desvantagem do uso de ligas de titânio como implantes, é a característica inerte de sua superfície, que limita a formação de novo tecido ósseo ao redor do implante, e resulta na incapacidade de alcançar uma osseointegração ideal [9]. Além da toxicidade e da falta de osseointegração, ligas metálicas utilizadas como implante podem induzir a redução na densidade óssea (*stress shielding*), rigidez, infecções, dor crônica, entre outros efeitos colaterais [10].

As várias desvantagens dos implantes metálicos e o crescente envelhecimento da população tem motivado o desenvolvimento de materiais que forneçam uma terapia clínica melhorada [11]. Neste contexto, a engenharia de tecidos é uma área da ciência aplicada que vem demonstrando intensa dedicação para o desenvolvimento de

biomateriais que reparam ou substituam os tecidos, como osso, cartilagem, pele, músculo, entre outros [12]. O termo engenharia de tecidos foi oficialmente cunhado em um workshop da *National Science Foundation* em 1988 para significar “a aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos”[13].

Os biomateriais adequados para a engenharia de tecidos devem atender a alguns critérios bastante desafiadores, por exemplo, fornecer um molde temporário (*scaffold*) para o crescimento do tecido; exibir propriedades mecânicas semelhantes às do tecido hospedeiro; 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; 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*; e, por fim, devem ser de baixo custo e de fácil fabricação em larga escala para permitir que seu uso seja estendido para uma faixa maior da população [10,11,13].

Embora desafiadora, a engenharia de tecidos oferece várias vantagens, como a redução do número de cirurgias associadas à remoção de estabilizadores metálicos e remoção de enxertos, menor tempo de recuperação, custos mais baixos e riscos reduzidos [10]. O implante de engenharia de tecidos fornece um ambiente favorável para o crescimento de células e tecidos, e, portanto, pode ser integrado temporariamente ao tecido existente [10].

Os *scaffolds* podem ser usados para imitar a arquitetura e composição de matrizes extracelulares nativas, fornecendo a base primária para a regeneração de novos tecidos [14]. A tecnologia de manufatura aditiva surgiu como uma ferramenta promissora para a fabricação de *scaffolds* com alta precisão, criando estruturas 3D bioinspiradas [15,16,17]. A disponibilidade de biomateriais com a estabilidade e propriedades desejadas para *scaffolds* de manufatura aditiva é dependente da tecnologia de impressão utilizada. Uma variedade de materiais vem sendo usados para desenvolvimento de *scaffolds*, incluindo materiais poliméricos, cerâmicos, metálicos, e compósitos [18]. Embora os materiais

naturais sejam vantajosos para os processos celulares, o uso de polímeros sintéticos como a poli (caprolactona) (PCL), o poli (ácido láctico) (PLA), e o poli (ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (PLGA) para *scaffolds* resultam em maior resistência mecânica, maior processabilidade e taxas de degradação controláveis [19,20].

BACKES [21], revelou que a incorporação de 10% de  $\beta$ -fosfato tricálcio ( $\beta$ -TCP) na matriz de PLA levou a uma modificação da molhabilidade do material, aumento da proliferação de osteoblastos e a uma maior diferenciação de células tronco, sem alterações significativas nas propriedades reológicas, térmicas e mecânicas. O compósito PLA-10%TCP foi extrudado na forma de filamento e utilizado para impressão de *scaffolds* por manufatura aditiva. Embora a adição de  $\beta$ -TCP tenha melhorado as propriedades biológicas dos *scaffolds*, a incorporação simultânea de outros compostos bioativos pode resultar em um aumento ainda maior dessas propriedades. Nanopartículas de Óxido de Cério (CeONPs), por exemplo, possuem atividade redox que possibilita regular os níveis de espécies reativas de oxigênio, regulando processos celulares essenciais para a regeneração óssea [22,23]. A presença de CeONPs cria um ambiente favorável para a adesão e proliferação de osteoblastos, estimulando a formação de novo tecido ósseo.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de *scaffolds* do compósito poli (ácido lático) (PLA)-10 wt%  $\beta$ -fosfato tricálcio ( $\beta$ -TCP) via manufatura aditiva e modificação da superfície com nanopartículas de óxido de Cério (CeONPs), para estimular o crescimento de células ósseas. Para promover a adesão das células na superfície dos *scaffolds* foram testados dois métodos de tratamento superficial, um tratamento alcalino a base de hidróxido de sódio e a aplicação de plasma.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO

Lesões e defeitos ósseos constituem um recorrente problema clínico, que vem gradualmente aumentando com o envelhecimento da população. A maioria são causados por trauma, porém fraturas patológicas decorrentes de malformações, osteoporose e tumores também são existentes [10]. O padrão atual para solução de problemas ósseos é a cirurgia para alinhar e estabilizar o osso, geralmente com pinos, parafusos, placas ou bastões metálicos, ou, ainda, a completa substituição do osso por implantes metálicos, que é comum especialmente para fraturas de quadril em pacientes idosos [10]. O enxerto ósseo também é uma alternativa, mas requer múltiplas cirurgias e têm uma morbidade associada ao local doador [10]. Recentemente, a engenharia de tecido vem focando esforços no desenvolvimento de uma terapia alternativa baseada no uso de *scaffolds* que sirvam de suporte para a regeneração óssea.

*Scaffolds* utilizados para crescimento ósseo precisam ser porosos para permitir o crescimento de células e transporte de massa eficiente de nutrientes, oxigênio, fatores de crescimento e produtos residuais, e para construções maiores, os poros também devem facilitar a vascularização para evitar a necrose no núcleo [10]. Vários estudos têm revelado que uma maior proliferação de osteoblastos (células de osso) pode ser alcançada pela manipulação da porosidade de enxertos ósseos. A estrutura com poros possui uma grande área superficial, que fornece mais sítios de adsorção para as células [12]. A porosidade dos *scaffolds*, assim como interconectividade entre poros, permeabilidade a fluídos corporais/proteínas e resistência a compressão são algumas das propriedades mais importantes para o sucesso no desenvolvimento de *scaffolds* [24].

Materiais para reparação de tecido ósseo têm mimetizado a composição e/ou estrutura natural do osso [12]. Os ossos são formados por estruturas nano, micro e macro porosas compostas essencialmente por matriz extracelular (*extra cellular matrix* - ECM), principalmente colágeno disposto em nanofibras com diâmetro de 50 a 500 nm, e cristais de hidroxiapatita (HA;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) com 10-60 nm de comprimento e 2-6 nm de largura orientadas na mesma direção das fibras de colágeno [25]. A estrutura composta de nanofibras (fibrilas) de colágeno mineralizado se alinham e se organizam de maneira a formar estruturas de ordem superior e, eventualmente, um osso cheio [10] (Figura 1). A

organização hierárquica do osso e seu padrão alinhado em forma de hélice explicam a combinação paradoxal de rigidez e tenacidade do osso.

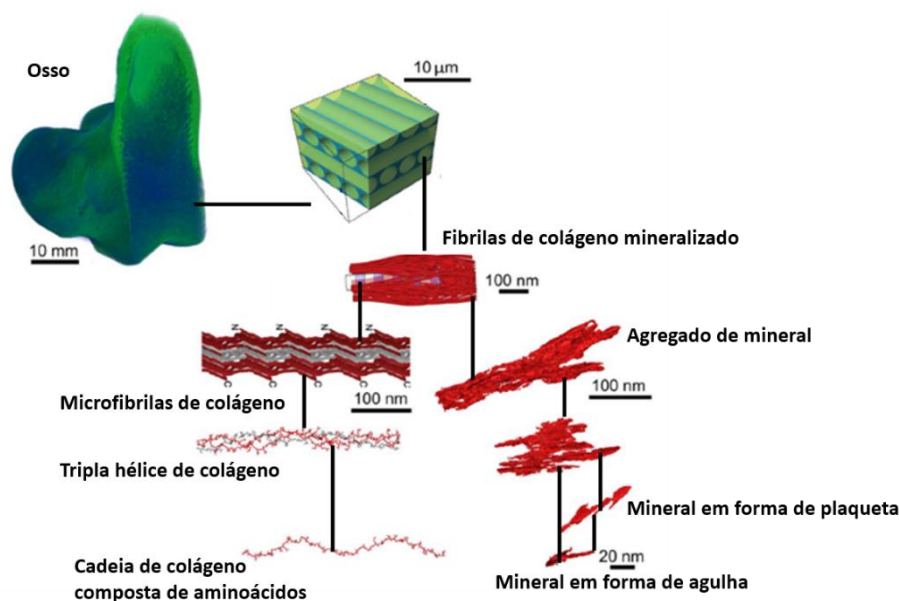


Figura 1 Hierarquia óssea. Adaptado de [26].

### 3.2 MANUFATURA ADITIVA

As tecnologias disponíveis para fabricação de *scaffolds* podem ser divididas em duas categorias principais: convencional e prototipagem rápida. 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*), e eletrofição; esses 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 [27].

As técnicas de prototipagem rápida (manufatura aditiva), como estereolitografia, fabricação por filamento fundido (*fused filament fabrication – FFF*), sinterização seletiva a laser (*selective laser sintering - SLS*) e bioimpressão, foram introduzidas recentemente com o objetivo de superar as limitações das convencionais. Estas técnicas utilizam processos de fabricação aditiva (também definidos como manufatura aditiva) que fabricam o objeto 3D final via deposição de camadas sobrepostas, utilizando materiais

líquidos, sólidos ou na forma de pós [27]. Em geral, essas técnicas não utilizam solventes orgânicos tóxicos, e permitem um maior controle da geometria do material, levando a uma maior biocompatibilidade.

A tecnologia de prototipagem rápida baseia-se na possibilidade de obter objetos (*computer aided-manufacturing* - CAM) a partir de uma definição de modelo 3D (*computer-aided design* - CAD). Os sistemas CAD/CAM incluem três componentes: uma ferramenta/scanner de digitalização que transforma a geometria em dados digitais que podem ser processados por um computador; um software que produz um conjunto de dados legível por uma máquina de fabricação; e uma tecnologia de fabricação que transforma o conjunto de dados no produto desejado. Recentemente, esse sistema tem sido aplicado a partir de imagens médicas de pacientes adquiridas com técnicas não invasivas, como a ressonância magnética e a tomografia computadorizada [27].

Dentre os processos de manufatura aditiva existentes, o mais popular é o chamado Deposição no Estado Fundido (*Fused Deposition Modeling* - FDM ®), também conhecido como Fabricação de Filamento Fundido (*Fused Filament Fabrication* - FFF) devido a sua acessibilidade econômica, facilidade de uso e variedade de materiais comercialmente disponíveis [16].

Entre as técnicas de manufatura aditiva, a fabricação de filamentos fundidos (FFF) tem como vantagens: utilização de equipamentos simples e baratos, não utiliza solventes tóxicos, possibilita o uso de mais de um tipo de material na produção de um mesmo *scaffold* [28], e fornece flexibilidade no manuseio e processamento dos materiais [27]. A maior desvantagem desta técnica é sua resolução limitada, que permite controlar a espessura de camada entre 50-400  $\mu\text{m}$  [29,30]. As variáveis controláveis, como por exemplo tipo de material, velocidade de impressão e a espessura da camada (dependendo do diâmetro do bico de extrusão), resulta em *scaffolds* com morfologia ajustável [31].

Os principais desafios da técnica de FFF são a escolha do material a ser utilizado, que devem ter propriedades reológicas específicas, e a pré-fabricação de filamentos com propriedades consistentes, como o diâmetro, ao longo material (rolo de filamento) [31]. Os termoplásticos, como poli(ácido láctico) (PLA), policarbonato (PC), poli(tereftalato de etileno) (PET), nylon (PA) e o copolímero de acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) são comumente utilizados [32], mas para bioaplicações os materiais poliméricos ou

compósitos que vêm sendo estudados são o PCL [33], PLA [33], PCL-TCP [34], PLGA [35], PLA-TCP [36] entre outros.

### 3.3 BIOMATERIAIS

Um biomaterial pode ser definido como "um material projetado para tomar uma forma que pode direcionar, por meio de interações com sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico" [37]. A interação do biomaterial com as células é dependente da composição, topografia e propriedades mecânicas do material. Para conseguir a biomimética da matriz extracelular, materiais poliméricos, cerâmicos e compósitos polímero-cerâmica têm sido desenvolvidos [38, 39, 40].

Os polímeros utilizados como biomateriais se enquadram em duas categorias: natural ou sintética. 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 longa durabilidade [27].

Os polímeros sintéticos têm sido investigados para aplicações biológicas em grande parte devido a sua capacidade para se adequar à cinética de degradação e suas propriedades físicas [31,41,42,43]. Dentro da classe dos polímeros sintéticos, os poliésteres alifáticos têm atraído a atenção das pesquisas, como por exemplo a policaprolactona (PCL), poli (ácido láctico-*co*-glicólico) PLGA, poli (óxido de etileno) (PEO), poli (3-hidroxi butirato) (PHB), sendo o PLA o polímero sintético considerado um dos biopolímeros mais promissores [42,44,45,46,47]. Apesar das boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e a previsibilidade da cinética de degradação do PLA, ele não fornece uma superfície favorável para a fixação e proliferação celular devido à falta de sinais específicos reconhecíveis para as células. Portanto, o PLA vem sendo modificado com compostos bioativos, como por exemplo os fosfatos de cálcio [48,49,50,51,52].

A combinação de PLA com fosfatos de cálcio é especialmente interessante para aplicação óssea. Fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ),  $\beta$ -fosfato tricálcio ( $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) e fosfato de cálcio bifásico (BCP, uma combinação

de HA e TCP), apresentam boa biocompatibilidade, osteocondutividade e osteoindutividade [53, 54, 55] devido à semelhança com a composição inorgânica do osso [12]. Entretanto, suas aplicações clínicas são restritas por causa de sua fragilidade inerente e má capacidade de forma [56]. Yuan *et al.* observaram um alto potencial osteoindutivo para cerâmicas contendo  $\beta$ -TCP quando comparado com HA pura [57,58]. Compósitos de PLA-  $\beta$ -TCP, PLA-HA e PLA-BCP vêm mostrando resultados promissores em relação as propriedades mecânicas e bioatividade [48,49,50,51,52].

Nejati *et al.* [48] estudaram compósitos de nano e micro HA com PLA fabricados pelo método de separação de fase induzida termicamente. A adição de micro HA aumentou o módulo de compressão de 2,4 MPa para 13,7 MPa e aumentou a afinidade celular observada através do formato espreado das células para os compósitos com HA, especialmente para nano HA, embora os autores não mencionem o percentual de HA. Resultados semelhantes foram obtidos com a incorporação de  $\beta$ -TCP e BCP [49]. Nanocompósitos de PLA/  $\beta$ -TCP (1 % em massa) produzidos pelo método de eletrofiliação levou a nucleação de apatita após incubação em solução de fluido de corpo simulado (SBF) por 3 dias [50]. Compósitos PLA-BCP utilizando BCP quimicamente modificado por L-lactídeo, melhoraram a interação interfacial entre o BCP e a matriz do polímero e, portanto, levaram a uma maior resistência à compressão [52].

### 3.3.1 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 [59,60]. Suas características tais como biocompatibilidade e absorção biológica (gera subprodutos atóxicos, presentes no metabolismo de animais e microrganismos), além de boas propriedades mecânicas, fácil processabilidade no estado fundido e baixo impacto ambiental [61] o colocam como um material de interesse no campo dos biomateriais. O PLA tem sido usado amplamente na manufatura aditiva por ter um ponto de fusão considerado baixo [62,63,64,65,66,67,68,69,70].

Uma característica importante do PLA é sua capacidade de existir de duas formas ópticas: isômeros D e L (Figura 2). O ácido láctico extraído da fermentação consiste em 99,5% do isômero L. A razão entre as formas D e L pode ser controlada no processo, e impacta fortemente as propriedades do material [71] [72].

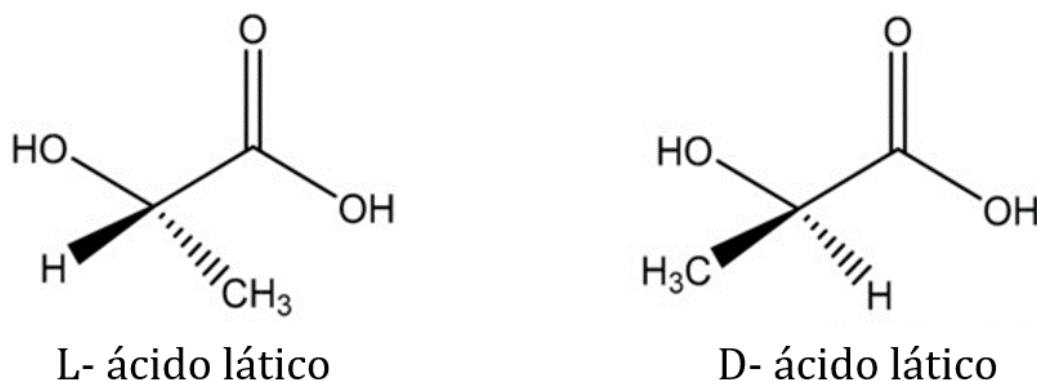


Figura 2 - Enantiômeros do ácido láctico [73]

Dependendo da estereoquímica e do histórico térmico, no estado sólido, o PLA pode estar tanto na fase amorfa como na fase semicristalina [74]. Abaixo da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) o PLA tem comportamento frágil, e acima dessa temperatura o PLA amorfo altera a característica rígida para borrachosa e culmina em um comportamento de líquido viscoso com a elevação da temperatura [74]. Na temperatura ambiente o PLA é relativamente rígido [75], embora sua  $T_g$  seja baixa, na faixa dos 55-65 °C [76,77], com sua temperatura de fusão ( $T_m$ ) de 160 °C [60]. A composição estereoquímica bem como a massa molar tem uma forte relação com a  $T_g$ . De forma geral, com o aumento da massa molar a  $T_g$  aumenta e, aumentando o percentual do estereoisômetro L, a  $T_g$  também aumenta [71,78].

O grau de cristalinidade dos polímeros é uma importante propriedade e pode ser determinada pelo percentual da amostra na região cristalina versus o percentual na fase amorfa [42]. Para o PLA, o histórico térmico e sua composição tem efeito na morfologia dos cristais de PLA [74]. A composição (L/D) vai influenciar o grau de cristalinidade. Diversas propriedades dos polímeros são afetadas pelo grau de cristalinidade incluindo, mas não limitado à dureza, tensão de escoamento, rigidez e ponto de fusão [42]. Para o PLA, o grau de cristalinidade também vai influenciar sua taxa de degradação, considerando que a quebra hidrolítica das cadeias tendem a ocorrer na região amorfa [79]. O grau de cristalinidade depende por sua vez de fatores estruturais e externos tais como regularidade espacial, rigidez da cadeia, forças intermoleculares, isomeria, volume, aditivos e uma segunda fase [80]. Mehta *et al.* [71]) e Garlotta [60]) fizeram uma extensa revisão da influência da isomeria nas propriedades do PLA. A Tabela 1 mostra a variação

das temperaturas de transição vítrea,  $T_g$ , e de fusão,  $T_m$ , para copolímeros (L/D,L)PLA em diferentes concentrações.

Tabela 1 - Temperaturas de transição primárias para copolímeros (L/D, L) -PLA [60].

<b>Razão de Copolímeros</b>	<b>Temperatura de transição vítrea (°C)</b>	<b>Temperatura de fusão (°C)</b>
100/0 (L/D,L)-PLA	63	178
95/5 (L/D,L)-PLA	59	164
90/10 (L/D,L)-PLA	56	150
85/15 (L/D,L)-PLA	56	140
80/20 (L/D,L)-PLA	56	(125) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Temperatura de fusão obtida pela cristalização por deformação.

### 3.3.2 PLA- $\beta$ -TCP

Os compósitos de PLA- $\beta$ -TCP foram relatados como o estado da arte no campo de engenharia de tecidos para cirurgia maxilofacial [81]. Backes *et al.* [82] desenvolveram e caracterizaram compósitos de PLA/ $\beta$ -TCP com diferentes concentrações de  $\beta$ -TCP: 5, 10 e 25% em massa. As amostras com concentrações de 5 e 10% em massa apresentaram comportamento reológico similar ao PLA puro. Na matriz com 25% de  $\beta$ -TCP foi possível identificar aglomeração e redução na estabilidade térmica. Biocompatibilidade e bioatividade foram avaliadas por ensaio de incubação do material compósito em SBF por 7 e 21 dias combinada com posterior análise superficial utilizando as técnicas microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios X (DRX) em busca de sinais da formação de hidroxiapatita carbonada, que foi confirmada no teste de 21 dias de incubação. Na imagem de MEV (Figura 3) é possível observar traços de nucleação de fosfatos de cálcio na superfície do material nas amostras de 5 e 10% em massa, após 21 dias. Devido à similaridade reológica com o PLA puro, filamentos de 1,75 mm de diâmetro foram utilizados para produzir parafusos utilizando a técnica de manufatura aditiva.

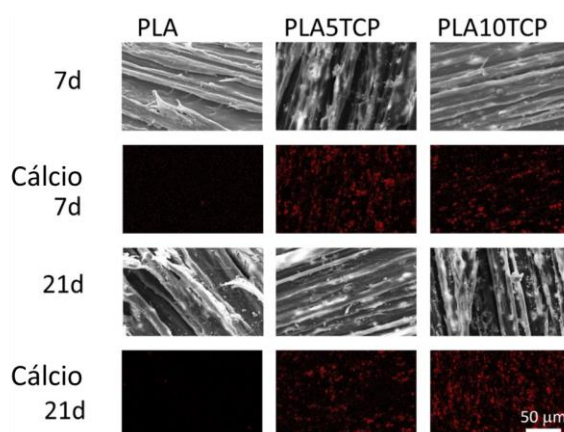


Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura de amostras de PLA e PLA/TCP incubadas em SBF por 7 e 21 dias [82].

Donate *et al.*[83] realizaram testes morfológicos, mecânicos e biológicos em *scaffolds* produzidos utilizando compósitos de PLA/TCP e PLA/CaCO<sub>3</sub> pela técnica de manufatura aditiva. Os autores investigaram uma concentração fixa de 5% m/m para cada aditivo e uma combinação dos dois (2,5% de cada). Ambos os aditivos aumentaram a hidrofobicidade, porosidade e rugosidade dos *scaffolds* levando a um aumento significativo na atividade metabólica de células osteoblásticas humanas (Figura 4). Em um outro trabalho, Chen *et. al* [84] demonstraram que uma superfície hidrofílica e rugosa se apresentou mais propícia para a fixação de células.

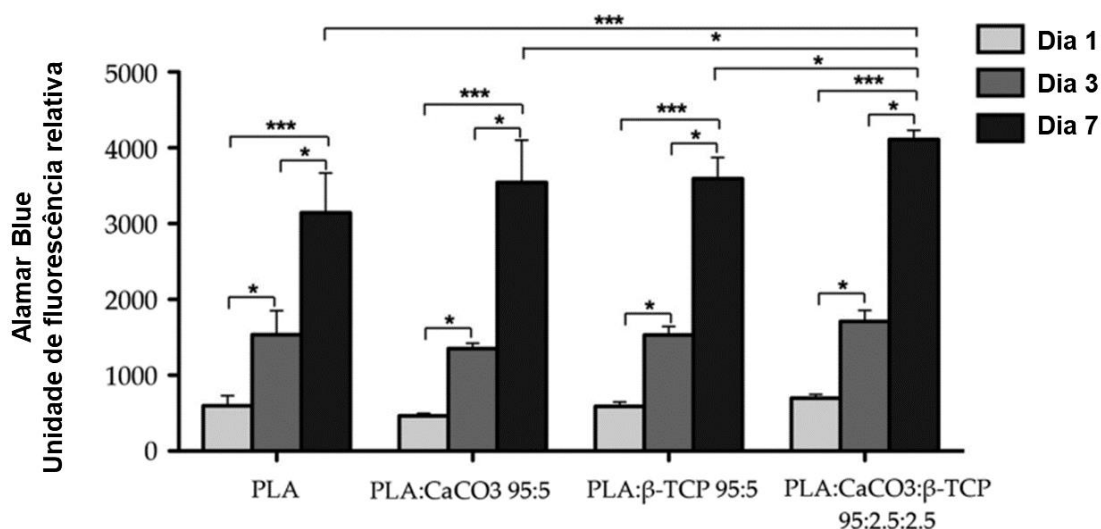


Figura 4 - Atividade metabólica de osteoblastos nos *scaffolds* determinados pelo ensaio de Alamar Blue (\* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ ). CaCO<sub>3</sub>, carbonato de cálcio; PLA, ácido poli (lático); β-TCP, beta-fosfato tricálcio. Adaptado de [74].

Wozna *et al.* [85] estudaram compósitos de PLA/TCP e PLA/HA utilizando a técnica de sinterização seletiva a laser (SLS – *Selective Laser Sintering*). Testes microbiológicos e mecânicos foram realizados em três variações de materiais e os resultados obtidos indicaram um aumento na concentração de osteoblastos na superfície dos materiais com maiores teores de HA e TCP. Foram estudados materiais com as seguintes concentrações: PLA/20% HA, PLLA/30% HA e PLLA/30% TCP. O compósito com 30% em massa de β- TCP apresentou o maior crescimento de osteoblastos dentre os materiais testados após 21 dias de incubação.

Cao *et al.* [86] estudaram compósitos de PLA com nanopartículas de TCP em um estudo *in vivo*. A concentração adotada foi de 30% de nanopartículas de TCP sobre a matriz de PLA. Foram estudados 3 materiais (Figura 5), sendo os dois primeiros materiais comerciais e o último, objeto de avaliação dos pesquisadores: (A) enxerto ósseo de crista ilíaca tricortical autóloga; (B) PEEK poli (éter-éter-cetona) e (C) PLA/30% nanopartículas de TCP. Os resultados encontrados após 12 semanas mostraram que os enxertos de PLA/30% nanopartículas de TCP apresentaram melhores resultados do que os enxertos convencionais: autólogo e PEEK [86].

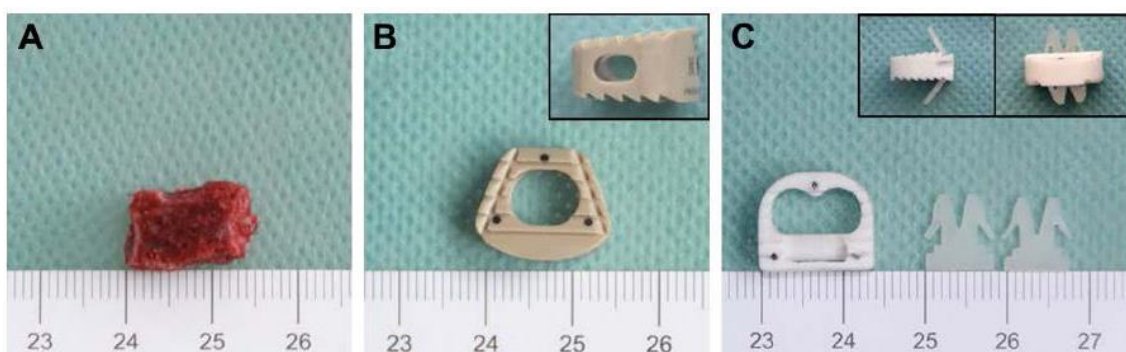


Figura 5 - (A) enxerto ósseo de crista íliaca tricortical autóloga; (B) PEEK poli (éter-éter-cetona) e (C) PLA/30% m/m nanopartículas de TCP e travas de PLA/2% m/m nanopartículas de  $\beta$ -TCP. [86]

Em um outro artigo, Backes *et al.*[78] produziram filamentos adequados para a manufatura aditiva utilizando diferentes combinações de PLA, HA e TCP em uma extrusora dupla-rosca. Na sequência, os filamentos foram utilizados para a produção de *scaffolds* utilizando a técnica de FFF com diferentes geometrias. A adição de HA e TCP tornaram os *scaffolds* bioativos, estimulando o crescimento de fosfatos de cálcio após a incubação em SBF. Além disso, os *scaffolds* impressos suportaram a fixação, proliferação, e diferenciação celular. A Tabela 2 mostra as concentrações e materiais utilizados [87].

Tabela 2 - Composições dos filamentos baseados em PLA desenvolvidos pelo processo de extrusão. [87]

Amostras	PLA (m%)	HA (m%)	TCP (M%)
PLA	100	0	0
PLA5HA	95	5	0
PLA10HA	90	10	0
PLA5TCP	95	5	5
PLA10TCP	90	10	10

Os fosfatos de cálcio, como o  $\beta$ -fosfato tricálcio ( $\beta$ -TCP), figura (6), e a hidroxiapatita (HA) estão entre as biocerâmicas mais utilizadas na área médica. Dentre os vários fosfatos de cálcio existentes, o  $\beta$ -TCP tem atraído muita atenção na pesquisa médica devido a uma série de propriedades que o tornam um material apropriado para a

fabricação de implantes ósseos. Dentre essas propriedades pode-se citar a sua biocompatibilidade, capacidade de osteocondução e reabsorção quando implantado [88,89].

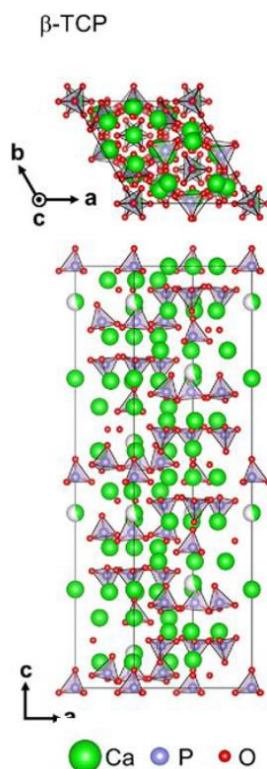


Figura 6 - Estrutura tetraédrica do  $\beta$ -fosfato tricálcio (TCP). Adaptado de [90].

Apesar dos avanços obtidos com PLA-TCP, desafios importantes ainda permanecem. Entre eles, destacam-se a limitação na indução da diferenciação osteogênica e a necessidade de aprimorar a funcionalização superficial dos scaffolds para promover respostas celulares mais específicas. Nesse contexto, surge o interesse crescente pelo uso de nanopartículas bioativas, como o óxido de cério ( $\text{CeO}_2$ ), cujas propriedades antioxidantes e pró-diferenciação celular têm se mostrado promissoras em estudos recentes. A seguir, será discutida a aplicação do cério como aditivo funcional na superfície de scaffolds, com o objetivo de ampliar seu potencial terapêutico na regeneração óssea.

### 3.3.3 CÉRIO

Além dos fosfatos de cálcio, outros aditivos que vêm sendo estudados para aumentar a proliferação de osteoblastos e/ou para promover diferenciação de células-tronco em osteoblastos são: (I) alguns óxidos como MgO, SiO<sub>2</sub> e CeO<sub>2</sub>, (II) fatores de crescimento angiogênico e (III) peptídeos. As células-tronco são autorrenováveis e apresentam um potencial inerente de diferenciar-se em vários tipos celulares, como células de osso, cartilagem, gordura etc. Esse potencial de diferenciação vem sendo amplamente explorado na terapia regenerativa. Durante a regeneração dos tecidos, acredita-se que as células-tronco saiam do seu nicho e migram, enxertam e se diferenciam dentro do microambiente tecidual [11].

Elementos de terras raras, como cério (Ce), lantânio (La) e itérbio (Yb), existem em ossos saudáveis, e o conteúdo de acúmulo muda com a idade [91]. Nos últimos anos, o elemento cério foi incorporado em biovidros para melhorar as funções dos osteoblastos [92,93,94,95,96,97,98,99]. No entanto, os mecanismos de osteogênese do cério continuam sendo controversos, geralmente considerados como a ativação da via de sinalização BMP-TGFβ [100], SMAD1/5/8 [101], ou ERK [22].

Lu *et al.* [22] incorporaram micropartículas de biovidro contendo nanopartículas de óxido de cério (Ce-BG) em uma matriz de quitosana através da técnica de liofilização. A presença de óxido de cério nos *scaffolds* promoveu rapidamente a proliferação e diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (*hBMSCs*), como confirmado pela regulação positiva de marcadores relacionados à osteogênese, como OCN, ALP e COL-1 [22]. Modelos *in vivo* de defeitos cranianos em ratos revelaram que os *scaffolds* de quitosana-Ce-BG aceleraram a deposição de colágeno, a formação de osteoblastos e a regeneração óssea em comparação com os *scaffolds* contendo apenas quitosana-BG [22]. Nanopartículas de CeO<sub>2</sub> foram também adicionadas em matriz de PLGA, através da mistura do pó de óxido de cério com soluções poliméricas em diclorometano (*solvent casting*), e posterior obtenção de *scaffolds* em moldes pré-estampados [23]. Os autores observaram que os *scaffolds* de PLGA-CeO<sub>2</sub> apresentaram uma maior capacidade para promover o crescimento de células-tronco mesenquimais derivadas de murinos (MSCs), comparado com o PLGA puro [23].

Recentemente, também foi demonstrado que as nanopartículas de CeO<sub>2</sub> possuem atividade anticancerígena, anti-inflamatória e bactericida, através da modulação dos

níveis de espécies reativas de oxigênio, e, portanto, podem ser úteis em aplicações biomédicas para proteger as células contra danos por radiação, estresse oxidativo, inflamação e contaminação por micro-organismos [102,103]. Li e coautores incorporaram 10 e 30% de  $\text{CeO}_2$  em revestimentos de hidroxiapatita depositados em liga de  $\text{Ti6Al4V}$ , pela técnica de pulverização por plasma, para promover respostas osteogênicas e reduzir reações inflamatórias [104]. A adição de  $\text{CeO}_2$  nos revestimentos conferiu propriedade anti-inflamatória e resultou em melhores comportamentos osteogênicos das células-tronco mesenquimais (BMSCs) em termos de proliferação celular, atividade da fosfatase alcalina (ALP) e formação de nódulos mineralizados, comparados a hidroxiapatita pura [104].

Diante das limitações dos compósitos convencionais, como PLA-TCP, na promoção da diferenciação osteogênica, a incorporação de aditivos funcionais tem se mostrado uma estratégia promissora para potencializar a bioatividade dos scaffolds. Nesse contexto, nanopartículas de óxidos metálicos, especialmente o óxido de cério ( $\text{CeO}_2$ ), vêm ganhando destaque por apresentarem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e capacidade de modular vias de sinalização celular relacionadas à osteogênese. No entanto, para que esses benefícios se manifestem de forma eficaz, é fundamental considerar não apenas a composição do material, mas também as características da superfície do scaffold, como rugosidade, molhabilidade e topografia. Tais propriedades influenciam diretamente na adesão, ancoragem e proliferação celular, podendo ser moduladas por diferentes tratamentos superficiais, sejam eles químicos, físicos ou por deposição de filmes bioativos. Assim, a associação entre a funcionalização superficial e o uso de nanopartículas como o  $\text{CeO}_2$  surge como uma abordagem sinérgica capaz de otimizar a interação entre biomateriais e células osteoblásticas, ampliando o potencial terapêutico dos scaffolds na engenharia de tecidos ósseos.

### **3.4 TRATAMENTO SUPERFICIAL DE SCAFFOLDS**

Os aditivos utilizados para aumentar a bioatividade dos polímeros sintéticos podem ser adicionados diretamente na composição do material, produzindo compósitos, ou depositados na forma de filme sobre a superfície polimérica. Ambas as estratégias vêm sendo muito exploradas. A produção de compósitos normalmente favorece as

propriedades mecânicas do material, enquanto a deposição de filmes bioativos favorece a adesão e proliferação celular.

Uma variedade de polímeros naturais e biomacromoléculas têm sido depositados na superfície de *scaffolds* de PLA para melhorar sua biocompatibilidade. Rasal *et al.* [105] reporta que a interação superficial do PLA com outros materiais é importante em numerosas aplicações médicas. Funcionalidades superficiais tais como hidroflicidade, rugosidade e topografia são geralmente requeridas e precisam ser otimizadas. A Tabela 3 abaixo traz os efeitos das propriedades físico-químicas dos biomateriais na adesão osteoblástica.

Tabela 3 - Efeitos das propriedades físico-químicas dos biomateriais na adesão de células osteoblásticas.

<b>Propriedades Superficiais</b>	<b>Efeitos na adesão osteoblástica</b>
Topografia	A superfície rugosa aparenta ser mais propícia à adesão celular [106,107]. Entretanto, quando a rugosidade da superfície está acima de 2,19 $\mu\text{m}$ , por sua vez, o material inibirá a adesão das células osteoblásticas [108]. Anselme <i>et al.</i> provaram que a adesão da célula pode ser promovida por uma superfície de menor repetibilidade [109].
Molhabilidade	A superfície hidrofílica é mais propícia para a fixação de células [110,111]. Há uma faixa ideal de molhabilidade da superfície para adesão da célula ( $<60^\circ$ ) [112].
Carga superficial	No estágio inicial, os osteoblastos com carga negativa natural de proteína de superfície podem aderir aos materiais com carga positiva [113]. Com a absorção da proteína circundante e a formação da matriz proteica, a superfície do material 'carregado positivamente' é modificada em um que seja favorável à adesão de osteoblastos [114,115,116].
Porosidade	O tamanho dos poros em torno de 120 $\mu\text{m}$ foi mais favorável para a adesão de osteoblastos [117,118], enquanto o tamanho dos poros de 325 $\mu\text{m}$ tem um melhor desempenho na osseointegração precoce [118].
Bioatividade superficial	Proteínas ECM [119,120], sequência RGD [121,122] e citocinas [123] provaram ter o potencial de promover a ancoragem de células osteoblásticas.

As células osteoblásticas aderem aos biomateriais de forma indireta, e este processo pode ser dividido em pré-revestimento, ancoragem, adesão focalizada e espalhamento. A estratégia para melhoramento da adesão de células osteoblásticas em biomateriais tradicionalmente tem foco no ajuste da topografia de superfície (como rugosidade), química de superfície (como energia de superfície), molhabilidade, carga superficial, tamanho dos poros e bioatividade superficial [84].

As mudanças superficiais podem ser classificadas como permanentes (acoplamento covalente de grupos funcionais) ou temporárias (acoplamentos não-covalentes). A Tabela 4 traz um resumo dos principais tipos de tratamentos, permanentes ou temporários, espécies ativas, vantagens e desvantagens e a respectiva referência.

Tabela 4 - Revisão das publicações sobre modificações superficiais do PLA. Adaptado de [105]

Tratamento	Espécies ativas na superfície		Vantagens	Desvantagens	Referências
Tratamento alcalino	Ácidos carboxílicos e hidroxilas		Baixo custo	Degradação do polímero	[45,124,125,126,127,128,129,130,131]
Foto ativação	Quitosana Poliacrilamida (PAAm) Poli (ácido metacrílico) (PMAA) Poli (hidroxietil metacrilato) (PHEMA) Poli (ácido acrílico) (PAA)		Baixo custo Reações amenas Seletividade da luz UV	Dificuldade de obter uma alta densidade de enxerto/grupos ativos	[127,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,135,146]
Revestimento via deposição/adsorção	Apatitas Fibronectina Colágeno Vitronectina Trombospondina Tenascina	Laminina Enactina Peptídeos RGD (Ácido arginino-glicino-espártico) Copolímero PLA/PEG	Protocolo simples e conveniente	Adsorção passiva pode induzir adsorção competitiva de outros materiais no sistema e mudar a configuração das espécies adsorvidas	[124,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156]
Aprisionamento	Alginatos Quitosana Gelatina	Poli (L- lisina) PEG Poli (ácido aspártico)	Aumento significativo da hidrofiliidade	Uso de solventes não biocompatíveis	[157,158,159,160,161]
Aditivos Migratórios	Poli (metil metacrilato-r-polioxi-etileno metacrilato) (p(MMA-r-POEM)) modificado com Arg-Gly-Asp (RGD) peptídeos Poli (óxido etilênico) -poli (óxido propilênico) ( <i>Pluronic</i> ) Poli (D, L- ácido láctico) -poli (etileno glicol) e derivativos RGD		Aumento da ancoragem de fibroblastos Aumento da hidrofiliidade Aumento da adesão de condrócitos	Caráter temporário	[162,163,164]
Plasma (hélio, oxigênio, nitrogênio, amônia)	Grupos aminas, ácidos carboxílicos, hidroxilas		Aumento da hidrofiliidade Adesão celular Incorporação de grupos funcionais capazes de fazer ligação covalente	Caráter temporário; Podem degradar o PLA	[165,166,167,168,169,170,171,172,173,174]

Das modificações não permanentes temos o revestimento de superfície envolvendo a deposição/adsorção das espécies modificantes na superfície do polímero. Tipicamente o PLA tem sido coberto com apatita biomimética; proteínas da matriz extracelular tais como fibronectina, colágeno, vitronectina, trombospondina, tenascina, laminina e entactina; e peptídeos, como por exemplo o RGD. No revestimento via deposição/adsorção, as espécies são depositadas na superfície do PLA sem necessariamente haver uma modificação no polímero.

No aprisionamento, uma solução solvente/não solvente é previamente aplicada sobre o polímero para que moléculas que usualmente não são adsorvidas pelo PLA possam ser ancoradas no material (Figura 7). Além disso, esse método não necessita de grupos terminais reativos na cadeia. A profundidade do aprisionamento pode chegar a 10-20  $\mu\text{m}$ .

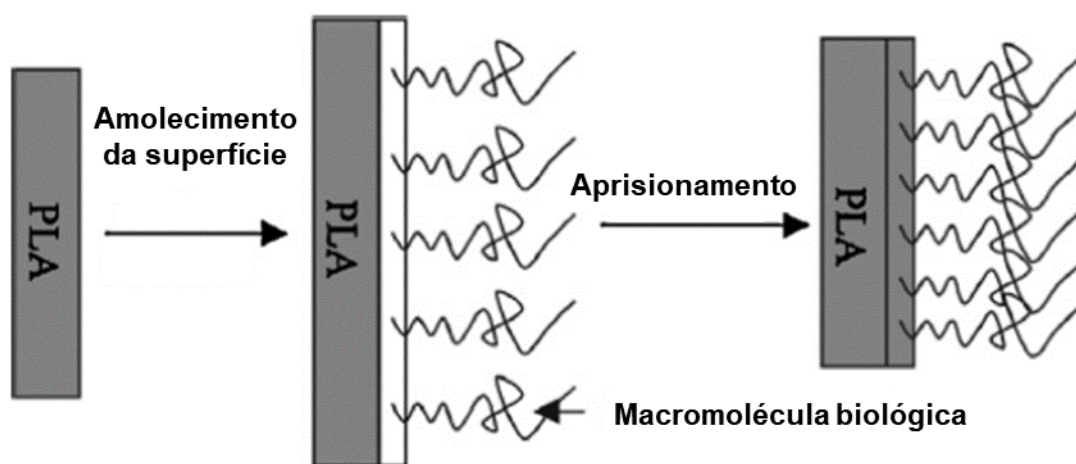


Figura 7 - Diagrama esquemático do processo de aprisionamento [157]

A técnica de aditivos migratórios consiste na utilização de materiais com grupos funcionais específicos que são misturados na matriz de PLA. Esses aditivos possuem certo grau de mobilidade na matriz conforme há uma variação de temperatura.

Embora o recobrimento de forma não covalente possa trazer resultados positivos na bioatividade do PLA, a ligação fraca entre os aditivos e o PLA pode levar a uma rápida lixiviação do composto bioativo. Algumas estratégias vêm sendo adotadas para ligar de forma covalente os compostos bioativos na superfície do PLA, entre elas o uso de tratamento alcalino, foto ativação, e aplicação de plasma. Estes tratamentos podem introduzir grupos reativos na estrutura do PLA, e assim facilitar a modificação química.

Muitos pesquisadores têm utilizados estes tratamentos apenas para aumentar a hidrofiliabilidade e rugosidade do PLA, sem adição de nenhum revestimento.

### 3.4.1 TRATAMENTO SUPERFICIAL COM PLASMA

O plasma, geralmente referido como o quarto estado da matéria, é frequentemente definido como um gás ionizado altamente energético, quase neutro, que conduz a eletricidade e é gerado pela transmissão de uma certa quantidade de energia (sob a forma de calor ou de um forte campo eletromagnético) a um gás. A energia fornecida resulta em elétrons altamente energéticos, que transferem sua energia para os átomos através de colisões, quebrando a estrutura atômica e ionizando as partículas de gás. Conseqüentemente, a excitação (parcial), dissociação, e processos de ionização ocorrerão como resultado dessas colisões [175]. Como exemplo, uma descarga de radiofrequência (RF) produzirá uma região luminosa nas proximidades das placas ativadoras ou bobina; esta região brilhante é um plasma "frio" que consiste em espécies ionizadas, elétrons livres (aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  elétrons/cm<sup>3</sup>), radicais livres (ou átomos da dissociação das moléculas), moléculas ou átomos excitados, assim como gás inalterado. Os íons se recombinam rapidamente com os elétrons livres à medida que saem da região luminosa. O brilho visto, por exemplo com oxigênio, é principalmente devido a esta reação de recombinação. [165].

O tratamento superficial por plasma começou na década de 1960 [166] e na última década tem sido usado para melhorar a hidrofiliabilidade superficial e a afinidade celular do PLA. Hirotsu *et al.* [167] trataram folhas de PLA extrudadas com plasmas de oxigênio, hélio e nitrogênio para melhorar a molhabilidade. Khorasani *et al.* [170] melhoraram a molhabilidade e aderência de células nervosas em filmes de PLA produzidos pelo método de casting utilizando plasma de oxigênio.

Embora o tratamento de plasma tenha sido usado com sucesso para melhorar a molhabilidade do PLA e a afinidade celular, o principal inconveniente desta técnica é que a eficácia da modificação superficial é parcialmente perdida devido ao rearranjo superficial das espécies geradas [171]. As espécies geradas se reordenam através de movimentos macromoleculares ativados termicamente para minimizar a energia superficial, fazendo com que o efeito do tratamento do plasma não seja permanente [168,171,172,173]. Yang *et al.* [168] descobriram que os efeitos poderiam ser mantidos

mantendo as amostras a baixa temperatura (0-4 °C). A mobilidade das cadeias moleculares de superfície foi significativamente reduzida a temperaturas muito mais baixas que a  $T_g$  do PLA (55 °C). Como esta faixa de temperatura (0-4 °C) é muito mais baixa do que a fisiológica bem como a temperatura ambiente, este método de estabilização pode não ser prático.

Uma estratégia que vem sendo empregada é a utilização do plasma como ativador da superfície, para então funcionalizar com compostos bioativos. Yang *et al.* [168] aplicaram tratamento de plasma usando amônia (NH<sub>3</sub>) para melhorar a hidrofiliabilidade e afinidade celular de *scaffolds* porosos de PLA preparados por uma técnica de lixiviação particulada. O plasma de NH<sub>3</sub> gerou grupos aminas reativos nos *scaffolds* de PLA, que ancoraram um filme de colágeno através de interações polares e ligações de hidrogênio. Após a modificação superficial, os *scaffolds* mostraram melhor aderência celular de fibroblastos de pele humana [169]. Theerakarunwong *et al.* imobilizaram nanopartículas de dióxido de titânio dopadas com íons de ferro (III) na superfície de um filme de PLA utilizando um plasma de argônio e silício com o objetivo de promover a atividade antimicrobiana e apontaram a existência de ligações covalentes entre a superfície modificada pelo tratamento e as nanopartículas [176].

### 3.4.2 ATAQUE QUÍMICO COM NaOH

O PLA dissolve-se em muitos solventes orgânicos comuns, incluindo clorofórmio, diclorometano, dioxano, acetato de etila, tolueno, triclorometano e *p*-xileno, mas não se dissolve em água, álcoois e hidrocarbonetos não-substituídos. O poli (D, L -ácido láctico) racêmico dissolve-se em acetona, dimetilformamida e tetraidrofurano [45].

Além disso, o PLA não possui nenhum grupo de cadeias laterais reativas. Ambas estas características representam um desafio na modificação da superfície do PLA utilizando solventes ecologicamente corretos. A hidrólise de superfície alcalina é uma maneira fácil de gerar grupos funcionais reativos, tais como ácidos carboxílicos (-COOH) e hidroxilas (-OH) no PLA [124] através da quebra das ligações éster (C-O-C) do polímero. O ácido carboxílico resultante no PLA podem ser então conjugados com espécies modificadoras de superfície contendo amina (-NH<sub>2</sub>) ou grupos hidroxila (-OH). Tipicamente, os grupos ácidos são ativados primeiro com pentacloreto de fósforo (PCl<sub>5</sub>)

[125], cloreto de tionila ( $\text{SOCl}_2$ ) [126] ou carbodiimidias solúveis em água [127], e então conjugado covalentemente com aminas ou hidroxilas.

Cai *et al.* [128] modificaram o PLA com um filme de quitosana utilizando tratamento alcalino. Os autores primeiramente fizeram um tratamento alcalino no PLA utilizando 1 M NaOH, o qual levou a formação de grupos carboxílicos; posteriormente, 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida foi utilizado para ligar esses grupos carboxílicos do PLA de forma covalente com os grupos aminas da quitosana. A fixação e proliferação de osteoblastos foram significativamente melhoradas como resultado deste tratamento. Yang *et al.* [129] hidrolisaram a superfície do PLA tratando-os com uma mistura de 0,25 M NaOH/etanol para melhorar sua hidrofiliabilidade e afinidade celular. A baixa concentração da solução alcalina foi utilizada para evitar uma degradação de massa significativa. O etanol foi capaz de aumentar o ataque nucleofílico do hidróxido de sódio sobre as ligações de ésteres do PLA.

Diversas estratégias têm sido investigadas para superar a baixa bioatividade do poli(ácido láctico) (PLA), material amplamente utilizado na engenharia tecidual óssea devido à sua biodegradabilidade e processabilidade. Entre essas estratégias, destacam-se os tratamentos superficiais, que visam melhorar propriedades como hidrofiliabilidade, rugosidade e funcionalização química, promovendo, assim, maior adesão e proliferação celular. Dentre os métodos mais utilizados, estão o tratamento alcalino com soluções de NaOH, capaz de introduzir grupos funcionais reativos na superfície do PLA, e o tratamento por plasma, que altera a superfície sem comprometer a integridade estrutural do material. Com base nesses avanços, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de scaffolds do compósito PLA-10 wt%  $\beta$ -TCP por manufatura aditiva, seguidos de modificação superficial com nanopartículas de óxido de cério (CeONPs), reconhecidas por seu potencial osteoindutor. Para favorecer a adesão celular, foram aplicadas e comparadas duas abordagens de tratamento superficial: ataque alcalino com hidróxido de sódio e ativação por plasma.

#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 8 traz uma visão geral do projeto. Foram manufacturados *scaffolds* a partir dos filamentos de PLA-TCP(90:10 % em massa) que seguiram para uma limpeza com água destilada para remoção de resíduos de cola usado para ancoragem do material na base de impressão e posterior condicionamento em estufa vácuo à 40 °C por 48 h. Dessas amostras iniciais, foram reservados alguns *scaffolds* para serem usados como Controle. Na sequência, parte dos *scaffolds* foram imersas em uma solução de CeONP comercial a uma concentração de 0,43 g / 200 ml de etanol - esse grupo foi denominado “Ce\_Comercial”. Parte do grupo inicial recebeu um tratamento superficial por ataque químico através de um banho em solução de 0,5 M NaOH/etanol por 30 min e posteriormente foi imerso em uma solução de CeONP comerciais a uma concentração de 0,1% massa/volume de etanol – esse grupo foi denominado NaOH-Ce\_Comercial. Um outro grupo de *scaffold* denominado NaOH-Ce\_Sintet recebeu o mesmo tratamento superficial por ataque químico do grupo A1, porém, foi imerso em uma solução de CeONP sintetizada no laboratório a partir de nitrato de cério hexa hidratado e hidróxido de lítio. Todos os grupos passaram por um processo de enxágue e posteriormente foram secos em estufa a vácuo por 48 h a 40 °C. A Tabela 5 resume os grupos de amostras e suas diferenças.

Tabela 5 - Descrição dos grupos testados

<b>Grupo</b>	<b>Descrição</b>
Controle	<i>Scaffolds</i> sem tratamento de superfície ou aplicação de CeONP. O grupo avaliará a eficácia do tratamento de superfície e a aplicação de CeONP comercial e sintetizada
Ce_Comercial	<i>Scaffolds</i> banhados em CeONP comercial (0,43g/200ml de etanol abs.), sem tratamento com NaOH. Esse grupo será usado para avaliar a eficácia isolada do tratamento de superfície com CeONP comerciais.
NaOH-Ce_Comercial	<i>Scaffolds</i> tratados com NaOH, com a aplicação de CeONP comercial (0,1% m/v), para avaliar o efeito combinado do tratamento com NaOH e a aplicação de CeONP comercial;
NaOH-Ce_Sintet	<i>Scaffolds</i> tratados com NaOH, com aplicação de CeONP sintetizada, para avaliar o efeito combinado do tratamento com NaOH e da aplicação de CeONP sintetizada;
Plasma_Ce_Comerc_grade	<i>Scaffolds</i> tratados com plasma (scaffold presos em uma grade e eletrodo submerso no fluido) revestidos com CeONPs comerciais;
Plasma_Ce_Comerc_livre	<i>Scaffolds</i> tratados com plasma (scaffold imersos em solução de CeONP sob agitação mecânica e o próprio tubo agindo como eletrodo) revestidos com CeONPs comerciais;

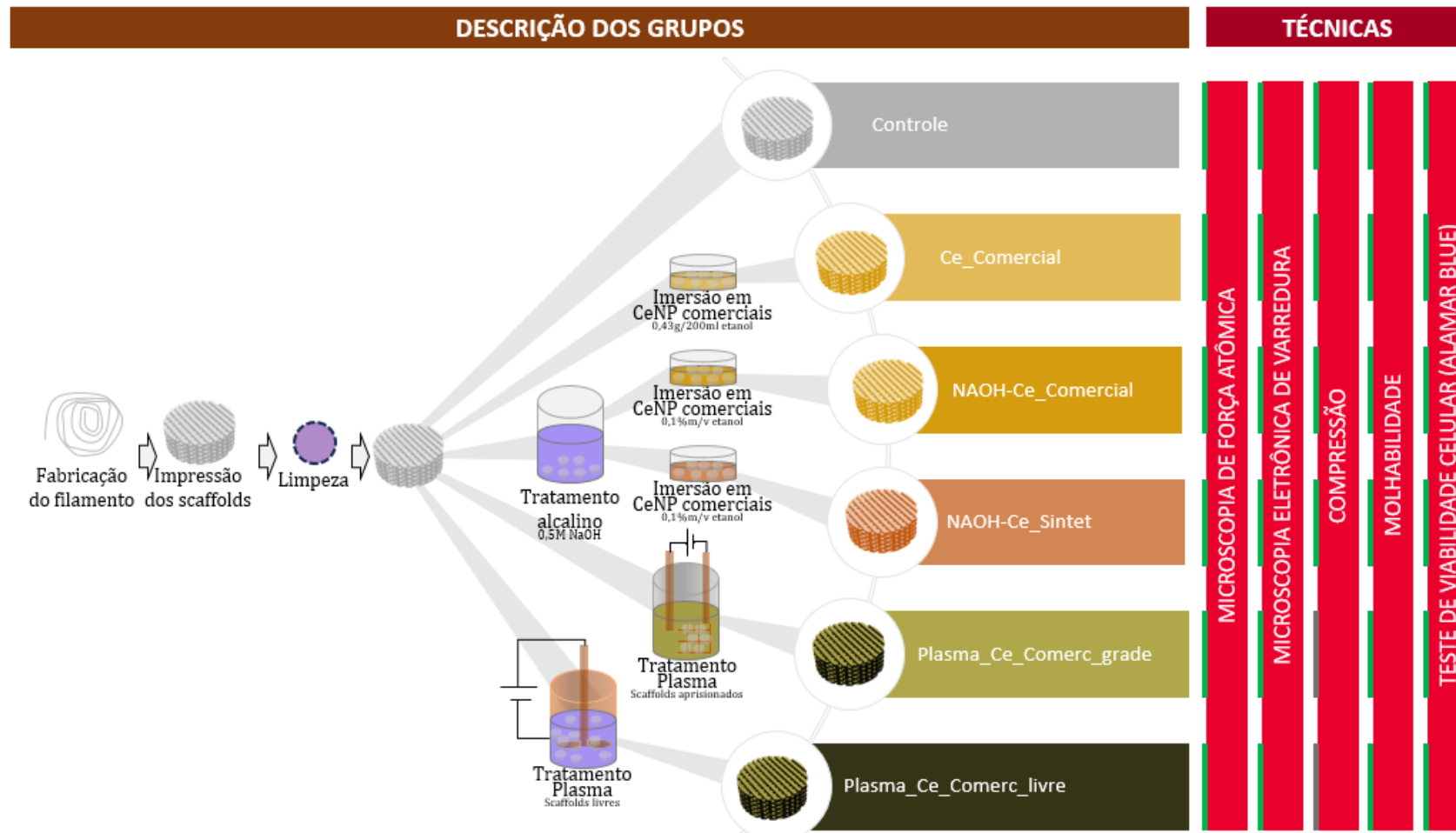


Figura 8 - Esquema experimental (próprio autor)

### 3.1 FABRICAÇÃO DO FILAMENTO DE PLA-TCP

O PLA (*Biopolymer 2003D*) foi comprado da empresa *NatureWorks* na forma de pellets, com teor de 4,30 % (m/m) do isômero D. Os pellets foram moídos criogenicamente usando um moinho de martelo *Mikro-Bantam®* (*Hosokawa Micron Powder Systems*). O PLA em pó foi seco em estufa a vácuo a 60 °C por 1 h e 80 °C por 4 h, e mantido em dessecador até ser usado.

O TCP (*nanoXIM-TCP200*,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) foi adquirido comercialmente da empresa FLUIDINOVA (Portugal), possui pureza maior que 90% e tamanho médio de partícula de 6,24  $\mu\text{m}$ .

Antes da extrusão do filamento de PLA-10 wt. % TCP, o PLA foi seco em estufa a vácuo a 60 °C por 12 h, e o TCP em estufa com circulação de ar a 100 °C por 12 h. Após a secagem, os materiais foram pesados (405 g de PLA e 45 g TCP) e misturados em saco plástico para homogeneização. Utilizou-se uma extrusora dupla-rosca corrotacional (MT19TC, *B&P Process Equipament and Systems*) com diâmetro de rosca de 19 mm,  $L/D = 25$ , velocidade da rosca de 30 rpm, perfil de temperatura de 170, 175, 175, 175, 175, 175 °C, alimentação de 1 Kg  $\text{h}^{-1}$ , e obteve-se filamentos com 1,65 - 1,85 mm de espessura, que atenderam a espessura necessária para a realização da impressão dos *scaffolds*. O grau de cristalinidade do material produzido foi avaliado por Backes [21] e o valor encontrado foi baixo, <1%.

### 3.2 PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS POR MANUFATURA ADITIVA

*Scaffolds* foram produzidos via manufatura aditiva através da técnica de fabricação de filamento fundido (FFF) usando um equipamento da marca Sethi, modelo S3, disponível no Laboratório de Manufatura Aditiva (DEMa/UFSCar). A temperatura de extrusão utilizada foi de 175 °C, temperatura de mesa de 55 °C, velocidade de impressão 20  $\text{mm s}^{-1}$  (primeira camada a 10  $\text{mm s}^{-1}$ ), diâmetro de bico de 400  $\mu\text{m}$  e cola bastão 3M para adesão do material na mesa. As amostras foram projetadas usando o *software SolidWorks®* com o objetivo de mimetizar o tamanho dos poros ósseos, fatiadas usando o *software Slic3r* e impresso com o *software Repetier-Host*, que permite o controle da impressora Sethi S3 (Figura 9). Os *scaffolds* apresentam geometria cilíndrica

com 8 mm de diâmetro, 10 camadas, 300  $\mu\text{m}$  de espaçamento entre os filamentos (tamanho dos poros) e padrão de disposição 0-90°.

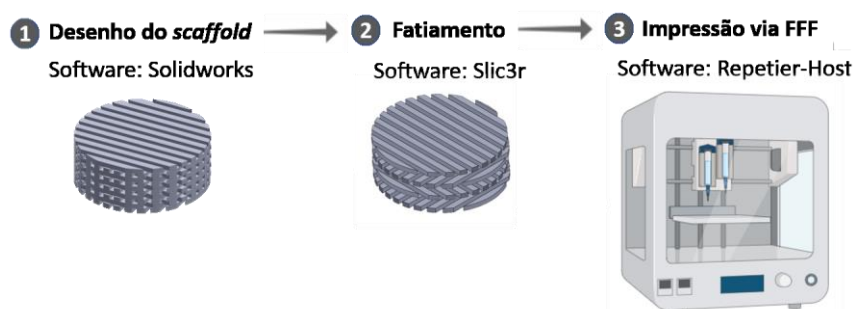


Figura 9 - Modelagem dos *scaffolds* pelo software *SolidWorks*, seguido do fatiamento pelo software *Slic3r* e impressão através da interface do software *Repetier-Host*.

### 3.3 TRATAMENTO SUPERFICIAL POR ATAQUE QUÍMICO

Parte dos *scaffolds* foram tratados utilizando o método de hidrólise superficial alcalina por este ser uma maneira simples de criar grupos funcionais reativos. Os *scaffolds* foram imersos em solução etanólica de 0,5 M NaOH por 30 min e posteriormente enxaguados com água destilada por três vezes e seca a 40 °C sob vácuo por 48 h.

### 3.4 TRATAMENTO SUPERFICIAL POR PLASMA

O tratamento da superfície com plasma foi feito de forma simultânea a deposição de CeONPs, por se tratar de um método *in situ* realizado em parceria com a UDESC (Universidade do Estado de Santa Catarina). A Figura 10 apresenta o esquema dos reatores. O primeiro, mostrado na Figura 10(a), consiste em um recipiente de cobre atuando como eletrodo acionado, um isolante de polímero e uma haste de aço inoxidável funcionando como eletrodo aterrado, girando a 2340 rpm. Três escovas de grafite conectadas às laterais do eletrodo aterrado garantem o contato elétrico, com os eletrodos posicionados a aproximadamente 1,0 cm de distância [194].

A Figura 10(b) representa outra configuração, composta por um béquer de borossilicato contendo a suspensão, coberto por uma tampa de polímero, dois eletrodos de aço inoxidável e uma grade de aço inoxidável para fixar os *scaffolds* no eletrodo acionado. O béquer é imerso em um banho de ultrassom para garantir a dispersão das nanopartículas ao longo do experimento, com uma distância entre os eletrodos de 4,0 cm.

Ambos os sistemas estão conectados a um osciloscópio Tektronix™ TDS 2024B para medir as formas de onda de tensão e corrente. Um resistor ( $10\ \Omega$ ) auxilia na medição da corrente. Como fonte de energia, é utilizado um gerador de plasma pulsado bipolar assimétrico DC (ABiPPS) fornecido pela SUPPLIER DC [177].

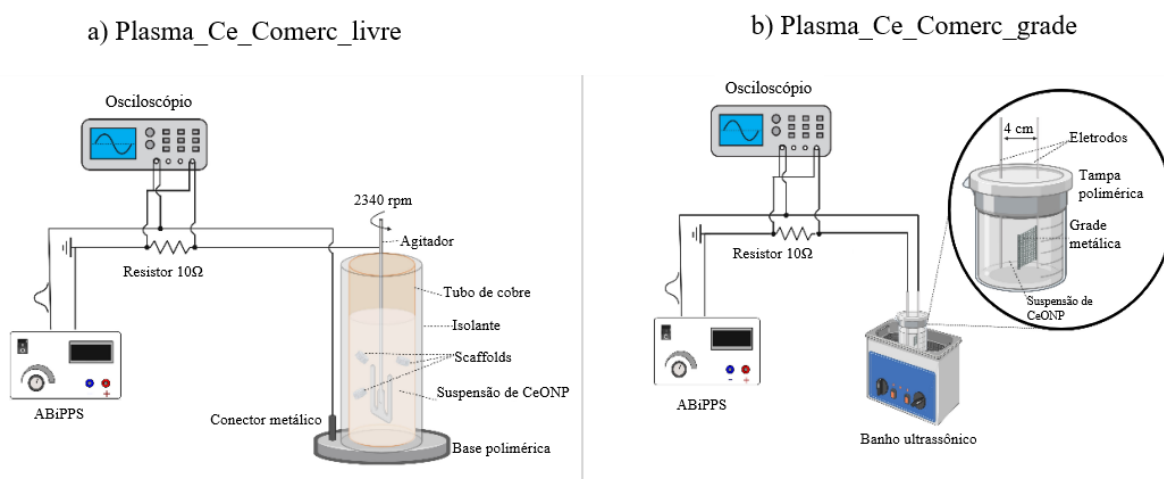


Figura 10 - Configuração do reator.

Na primeira configuração os *scaffolds* de PLA-TCP foram inseridos juntamente com a solução de nanopartículas no tubo de cobre, sob agitação para assegurar a homogeneidade e impedir a formação de precipitados. Na segunda configuração os *scaffolds* foram presos em uma grade e o eletrodo submerso no fluido. Para ambas as amostras, foi utilizado nanopartículas de óxido de Cério obtidas comercialmente (Alfa Aesar, pureza de 99,5% e diâmetro médio das partículas na faixa de 15 a 30 nm). As nanopartículas de Cério foram dissolvidas em água acidificada (pH 2,  $\text{HNO}_3$ ) usando um ultrassom de ponta (SONICSTM VCX 750) por 30 min. A concentração das suspensões de óxido de cério foi fixada em 0,1% (massa/volume) em todos os ensaios. Findado o ensaio, os *scaffolds* foram removidos com o auxílio de uma peneira metálica e lavados três vezes com água deionizada, sendo posteriormente mantidos por dois dias no dessecador para a retirada de umidade.

### 3.5 SÍNTESE DAS CeONPs

As nanopartículas de óxido de Cério foram produzidas a partir de nitrato de cério (III) hexahidratado ( $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich) e hidróxido de lítio (LiOH, Sigma-Aldrich), utilizando etanol anidro (Sigma-Aldrich) como solvente. Primeiramente 1,086 g de  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foram dissolvidos em 50 mL de etanol anidro, e 0,03 g de LiOH foram dissolvidos em 50 mL de etanol, com auxílio do banho de ultrassom por 10 min. A solução contendo nitrato de cério foi colocada em agitação vigorosa a 25 °C, e então a solução de lítio foi adicionada gota a gota. Após a finalização do gotejamento, esta solução foi agitada por até 2 h, monitorando a formação das CeONPs por espectroscopia de UV-visível utilizando o equipamento Varian Cary 50 Probe na faixa de 200-400 nm. A adição de LiOH levou a uma cor laranja da solução, indicando a oxidação de  $\text{Ce}^{3+}$  para  $\text{Ce}^{4+}$  (Figura 11).



Figura 11 - Becker com solução alcoólica de CeONPs.

### 3.6 DEPOSIÇÃO DAS CeONPs

As nanopartículas de óxido de cério sintetizadas e CeONPs comerciais (99.5% min, 15-30 nm, #44960, CAS#: 1306-38-3, Alfa Aesar) foram depositadas nos *scaffolds* de PLA-TCP sem tratamento de superfície e com tratamento de NaOH.

Para deposição das CeONPs (comerciais e sintetizadas), os *scaffolds* foram mergulhados em solução contendo CeONPs sob agitação por 30 min. Após esse período os *scaffolds* foram enxaguados três vezes utilizando água destilada, e secos em estufa à vácuo por 48 h a 40 °C.

### 3.7 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL (UV-Vis)

A técnica de UV-Vis foi utilizada para estimar o tamanho das partículas de Cério durante e após a síntese para que o crescimento e/ou aglomeração das nanopartículas pudesse ser acompanhado. As análises de espectroscopia na região do UV visível foram realizadas no equipamento Varian Cary 50 Probe na faixa de 200-400 nm. Truffault *et al.* reportaram a presença de um pico de absorção na faixa de 290 nm, correspondendo a energia de banda (*band gap*) de cerca de 3.3 eV, caracterizando a formação de nanopartículas de Cério [178, 179] durante a análise por UV-Vis de uma solução de CeONP. O valor do *band gap* ( $E_g$ ) das nanopartículas nesse trabalho foi determinado a partir dos espectros UV-vis usando a seguinte relação (1):

$$E_g = \frac{h \cdot c}{\lambda_c} \quad (1)$$

onde  $\lambda_c$  é o comprimento de onda do pico, determinado a partir da intersecção da tangente da borda de absorção com o eixo do comprimento de onda [180]. O tamanho das partículas de CeO<sub>2</sub> foi estimado utilizando uma equação simplificada derivada por Brus [181], baseada no modelo de massa efetiva. No regime de pontos quânticos, a energia de confinamento do primeiro estado eletrônico por ser aproximada conforme equação abaixo (2):

$$E_g = E_g^{bulk} + \frac{\hbar_0^2 \pi^2}{2r^2} \left( \frac{1}{m_e^* m_0} + \frac{1}{m_h^* m_0} \right) - \frac{1.8e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r} \quad (2)$$

onde  $r$  é o raio da partícula,  $m_e^*$  e  $m_h^*$  são respectivamente as massas dos elétrons e vacâncias e  $E_g$  é o valor do intervalo de banda determinada graficamente e com o auxílio da equação (1). Para o Cério,  $E_g^{bulk} = 3,2 \text{ eV}$ ,  $m_e^* = m_h^* = 0,4$  e  $\epsilon = 24,5$  [178].

### 3.8 ENSAIO DE COMPRESSÃO

Testes de compressão foram realizados de acordo com a norma ASTM D 695.24, utilizando os *scaffolds* cilíndricos, que foram comprimidos a uma taxa de 0,5 mm min<sup>-1</sup>, usando uma carga de 5 kN. A partir das curvas tensão vs. deformação obtidas, foram calculados o módulo de compressão das amostras submetidas a diferentes procedimentos.

Os ensaios foram realizados em uma máquina universal de teste Instron, modelo 5569, disponível no DEMa/UFSCar.

### 3.9 ÂNGULO DE CONTATO

A análise de ângulo de contato foi realizada com o objetivo de avaliar a molhabilidade do material (Figura 12). A análise foi realizada nos *scaffolds* utilizando-se um equipamento Biolin, modelo THETA FLEX PLUS. Foram realizadas 5 medições em cada amostra com 5  $\mu\text{L}$  de água destilada.

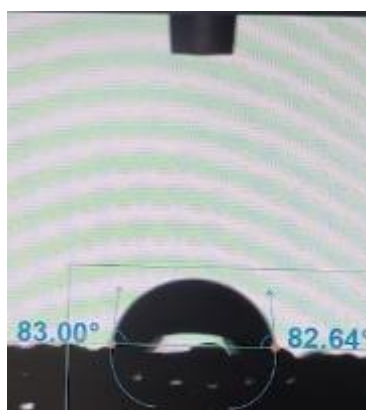


Figura 12 - Captura de tela do teste de ângulo de contato aplicado ao *scaffold*.

### 3.10 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A técnica de AFM foi utilizada para análise da topografia e rugosidade superficial dos *scaffolds* no modo contato, para observar o efeito do tratamento alcalino, da aplicação de plasma, e principalmente da deposição de CeONP na superfície dos *scaffolds*. Foi utilizado o equipamento Bruker modelo Nanoscope V *multimode*, disponível no LCE (Laboratório de Caracterização Estrutural do DEMa, UFSCar). Foram obtidas três imagens de 5 x 5  $\mu\text{m}$  de cada amostra, e obtido o valor da rugosidade superficial média (Sa) usando o software Gwyddion.

### 3.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a morfologia superficial do *scaffold* e para determinar a presença e morfologia das células ancoradas sobre a superfície dos *scaffolds*. As análises foram realizadas no equipamento Philips XL-30 FEG localizado no LCE (Laboratório de Caracterização Estrutural do DEMa, UFSCar)

operando a uma voltagem de 15 kV. As amostras foram coladas em *stubs* de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro para viabilizar a análise.

### 3.12 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os ensaios biológicos foram realizados em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM), localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar.

As amostras foram esterilizadas com álcool 70% sob luz UV de ambos os lados por 15 minutos. Após a esterilização, as amostras foram enxaguadas com solução tampão fosfato (PBS), colocadas em uma placa de 48 poços e pré-incubadas com 500  $\mu$ L de meio contendo 89% v/v de  $\alpha$ -MEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Vitrocell) e 1% de antibiótico-antimicótico (Vitrocell) por 24 horas em incubadora (série II 3110, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C, com umidade controlada e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a pré-incubação, células pré-osteoblásticas de camundongo (MC3T3-E1), previamente cultivadas, foram semeadas nas amostras utilizando 500  $\mu$ L com densidade celular de 50.000 células, sendo as placas incubadas por 1 e 7 dias a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, com troca de meio a cada 2 a 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  $\mu$ L de uma solução de meio/resazurina (90/10) foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada em ambiente escuro por 4 horas a 37 °C. Três amostras por composição foram analisadas, incluindo três controles negativos contendo solução de resazurina livre de células. Em seguida, 100  $\mu$ L da solução de todas as amostras foram transferidos para uma nova placa, onde a medição de absorbância foi realizada utilizando o leitor de placas SpectraMax i3 - Molecular Devices (570 nm e 600 nm). Todos os testes biológicos foram realizados em quintuplicata, e os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism usando *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE DAS NANO PARTÍCULAS DE CÉRIO

A síntese das nanopartículas de óxido Cério usando hidróxido de lítio e nitrato de prata foi acompanhada usando a técnica UV-Vis (Figura 13). A cada 15 minutos da reação uma alíquota foi retirada da solução e analisada usando um espectrofotômetro na faixa do UV visível. Foi observado o surgimento de um pico em 270 nm com o decorrer da reação, correspondente a formação das nanopartículas de óxido de Cério.

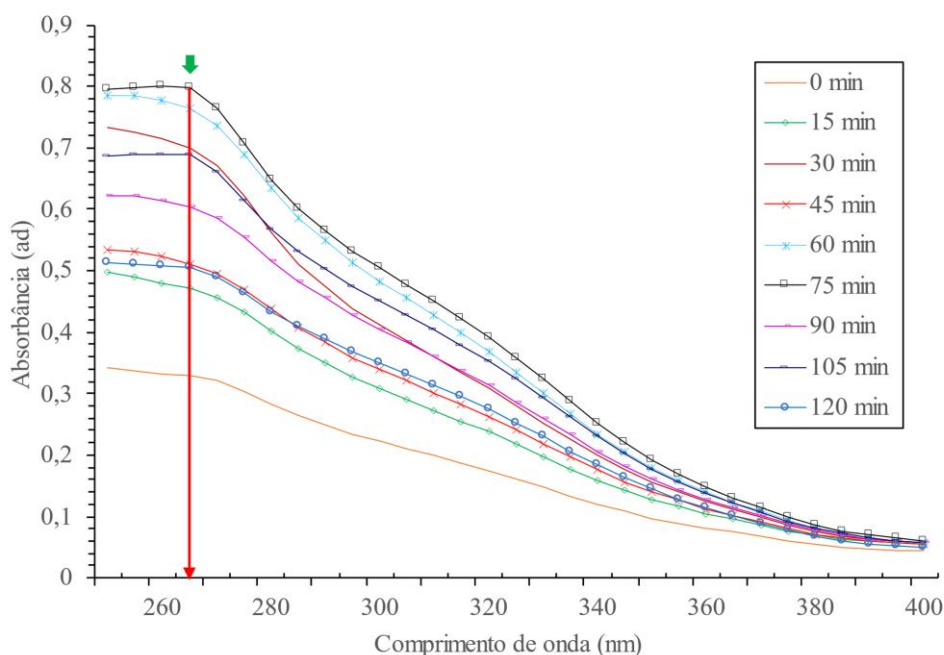


Figura 13 - Evolução da absorbância entre 250 e 400 nm. Alíquotas coletadas a cada 15 min por 2 horas.

O tamanho das partículas foi calculado usando a Equação 2. Considerando  $E_g^{bulk} = 3,2 \text{ eV}$ ,  $\hbar_0 = 1,054 \times 10^{-34} \text{ J.s}$ ,  $m_e^* = m_h^* = 0,4$ ,  $m_0 = 9,1093837 \times 10^{-31}$ ,  $e = 2,71828$ ,  $\varepsilon_0 = 8,86163 \times 10^{-12} \frac{\text{C}^2}{\text{Nm}^2}$  e  $\varepsilon = 24,5$ , chegou-se ao resultado de  $\text{raio} = 20,5 \text{ nm}$  para o tamanho de partícula. Esse tamanho é comparável com o das partículas comerciais também em estudo nesse trabalho, que possui diâmetro entre 15 e 30 nm. Uma das vantagens de sintetizar a nanopartícula é que ela se encontra bastante dispersa.

## 5.2 ENSAIO DE COMPRESSÃO

A estrutura óssea é composta por diferentes arranjos a depender da região analisada. Uma camada mais externa (osso cortical) possui módulo de elasticidade maior (7-30GPa) enquanto a camada interna (osso esponjoso) possui módulo significativamente menor (50-500 MPa) [182]. *Scaffolds* com geometrias diferentes podem levar a variações das propriedades mecânicas. Portanto além da composição do material a arquitetura também tem grande influência em suas propriedades [33].

O ensaio de compressão uniaxial permite comparar os *scaffolds* impressos com geometria cilíndrica, poros de 300  $\mu\text{m}$ , e padrão de disposição 0-90°. Os valores médios de módulo de compressão dos *scaffolds* são apresentados na Figura 14 e esses valores foram determinados na região linear entre 2 e 8% de deformação das curvas tensão x deformação do ensaio de compressão uniaxial para os grupos Controle, Ce\_Comercial, NAOH\_Ce\_Comercial e NAOH-Ce\_Sintet.

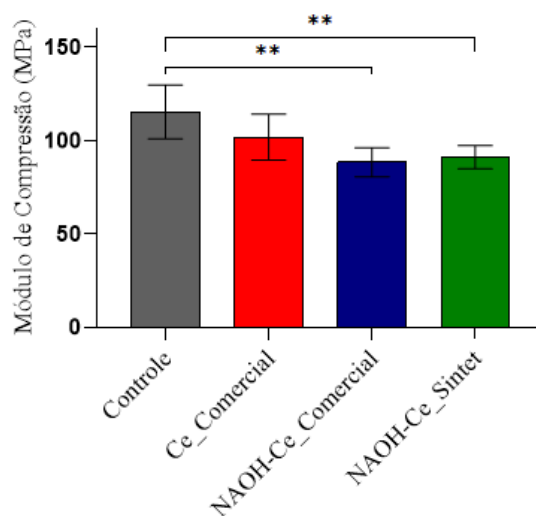


Figura 14 – Resultados do teste de compressão dos *scaffolds* tratados comparados com a amostra de controle, N=5; (\*\*:  $p < 0.01$ ).

Os módulos de elasticidade medidos variaram entre 78 e 127 MPa indicando uma pequena variação no comportamento dos materiais testados. O grupo de controle (*scaffold* PLA-TCP sem tratamento) exibiu uma faixa mais ampla de valores, de 97 a 137 MPa, sendo o grupo que teve o maior módulo entre as amostras testadas. O grupo Ce\_Comercial apresentou valores de módulo que variaram entre 85 e 114 MPa e não apresentou

diferença estatística quando comparado com a amostra de controle, o que era de se esperar considerando que nenhum tratamento que pudesse comprometer a estrutura do *scaffold* foi aplicado. O módulo de elasticidade do grupo NAOH-Ce\_Comercial variou entre 78 e 100 MPa, com uma diminuição significativa em comparação com o grupo Controle. O tratamento do *scaffold* com uma solução etanólica de NaOH pode ter provocado uma perda significativa de massa como reportado por Yang [129]. O grupo NAOH-Ce\_Sintet também apresentou diminuição significativa do módulo de compressão em comparação com o controle, variando entre 83 e 97 MPa. Embora o tratamento alcalino ocasione uma diminuição da resistência mecânica do material, os valores obtidos ainda estão dentro da faixa reportada para o osso esponjoso humano, e, portanto, os materiais em estudo são adequados para a aplicação em engenharia de tecido ósseo.

### 5.3 ÂNGULO DE CONTATO

Superfícies hidrofílicas são propícias para a adesão celular [183]. O PLA puro apresenta valores de ângulo de contato com água variando entre 75 e 85° [184, 185,186]. Embora hidrofílico, valores ainda menores são mais adequados para promover a adesão celular. Em um de seus trabalhos, BACKES [21] reportou o efeito positivo da incorporação de 10% em massa. TCP em PLA, levando a uma diminuição do ângulo de contato para 70°. Com o objetivo de avaliar indiretamente a energia superficial dos *scaffolds* foram realizados ensaios de ângulo de contato e os resultados estão compilados na Figura 15. Os resultados indicam que apenas os grupos Plasma\_Ce\_Comerc\_grade e Plasma\_Ce\_Comerc\_livre apresentaram um aumento significativo quando comparados com o grupo de controle. Esses dois grupos apresentaram diferença estatística com relação a todos os outros grupos, exceto entre si. Os valores para o grupo de controle variaram entre 72 e 89°, próximo ao reportado previamente por BACKES [21].

Não foi possível identificar uma diferença significativa entre os grupos que receberam o tratamento por hidrólise alcalina superficial quando comparados com os *scaffolds* de referência. Embora seja conhecido que o tratamento superficial com NaOH reduza o ângulo de contato do PLA [129], o tratamento seguinte com nanopartículas de CeONP deve ter contrabalanceado esse efeito, levando a um aumento do ângulo de contato ou ainda que o tratamento superficial com plasma não tenha um efeito positivo na redução do ângulo de contato.

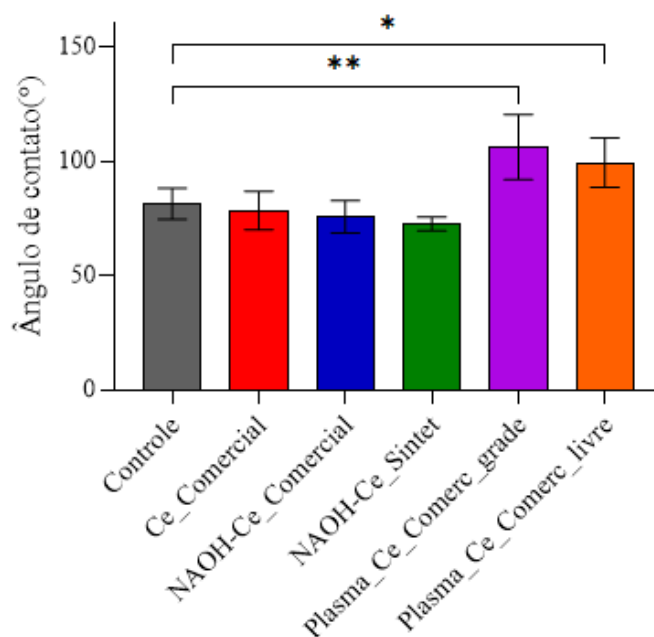


Figura 16 - Resultados do teste de ângulo de contato, N=5; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

#### 5.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica é uma técnica bastante interessante no contexto de modificação superficial de materiais para aplicações no campo de engenharia de tecidos pois permite identificar fatores topográficos que influenciam a maneira como as células se proliferam, organizam e dão origem a um novo tecido [187,188,189].

Existem diversas formas de caracterizar uma superfície através de informações topográficas de rugosidade. Wennerberg e Albraktsson[190] propuseram que parâmetros bidimensionais como Ra (rugosidade média) e Rq (rugosidade quadrática média) como as medidas mais aplicáveis para a caracterização de *scaffolds* para aplicações biomédicas [191]. A técnica de AFM permite determinar a rugosidade média superficial ( $S_a$ ), sendo essa uma versão expandida da Ra (linear). Os valores foram determinados a partir de análises utilizando o software Gwyddion. A Figura 16 mostra um gráfico topográfico dos 6 grupos analisados nesse estudo.

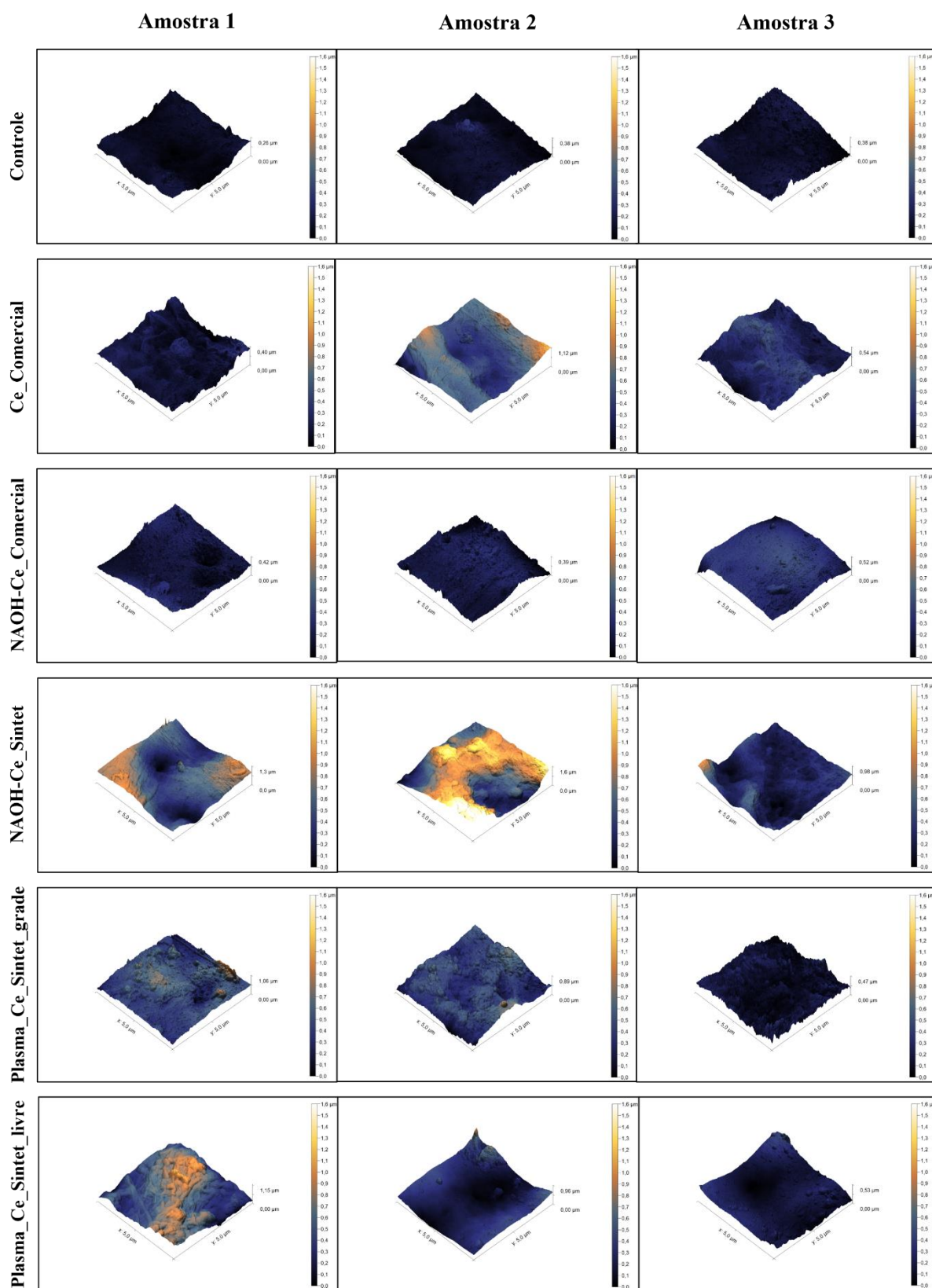


Figura 16 – Resultados topográficos da microscopia de força atômica dos 6 grupos avaliados evidenciando o perfil de rugosidade das superfícies.

Os resultados de rugosidade superficial média apresentados na Figura 17 indicam uma grande variação entre os grupos. A rugosidade média do grupo controle foi a menor encontrada entre todos os outros grupos, indicando que os tratamentos por hidrólise superficial alcalina e tratamento com plasma foram efetivos em alterar a rugosidade superficial dos *scaffolds*. Apesar de observarmos uma tendência de aumento na rugosidade média das amostras, ao utilizarmos o teste one-way ANOVA, somente a comparação controle *versus* NaOH-Ce-Sintet apresentou aumento estatisticamente significativo. O aumento da rugosidade dos *scaffolds* induz a adesão celular aumentando o intertravamento mecânico precoce de células osteoblásticas [106, 107], limitado a 2,19  $\mu\text{m}$ , limite que pode inibir a adesão celular [108]. A rugosidade superficial na escala nanométrica pode aumentar a adesão celular significativamente [192,193].

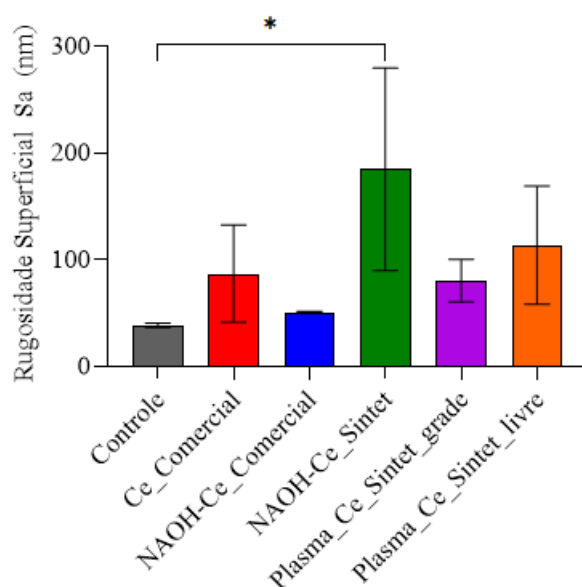


Figura 18 - Resultados de rugosidade superficial média Sa entre os grupos. Apenas o grupo NAOH-Ce\_Sintet possui diferença estatística significativa com relação ao grupo de controle, N=3; \*:  $p < 0.05$ .

## 5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada nesse trabalho para identificar a presença e morfologia das células na superfície dos *scaffolds* bem como aspectos morfológicos da superfície. Cada grupo foi analisado com ampliações de 1000x e 5000x, após 1 dia e 7 dias de cultivo celular sobre os *scaffolds*. Nas amostras com 7 dias de cultura o aspecto superficial dos *scaffolds* não se alterou quando comparado com as amostras de 1 dia, porém, com relação à morfologia celular e ao número de células, é possível notar diferenças.

Na amostra controle (Figura 18) é possível identificar células com perímetro bem definido (apontado com seta vermelha na ampliação de 1000x e em destaque com a linha vermelha tracejada na ampliação de 5000x). A superfície do *scaffold* se mostrou bem homogênea, sem grandes depressões ou padrões repetitivos. Na amostra do grupo controle, com 7 dias de cultura não foi possível identificar a presença de aglomerados de células e o perfil superficial permaneceu homogêneo.

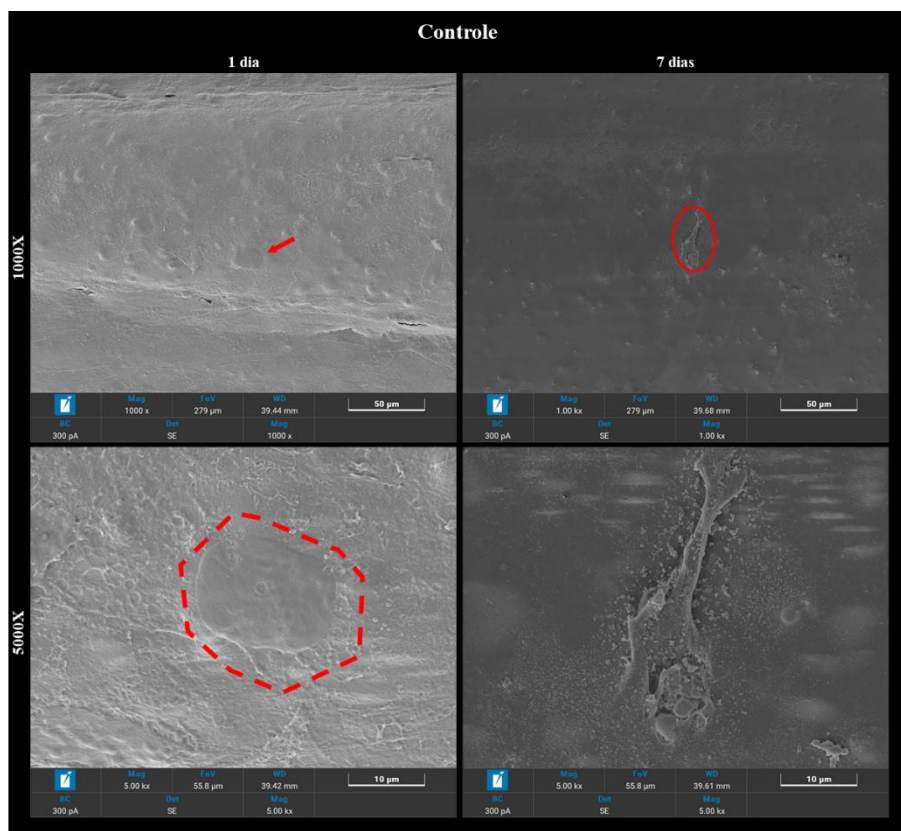


Figura 18 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo de controle com 1 e 7 dias de cultura.

Assim como na amostra controle, as células identificadas na amostra Ce\_Comercial (Figura 19) possuem um perímetro bem definido ((apontado com seta vermelha na ampliação de 1000x e em destaque com a linha vermelha tracejada na ampliação de 5000x), com padrão circular não alongado. Na superfície é possível ver algumas irregularidades suaves. Na mesma amostra, para 7 dias de cultura foi possível identificar grandes aglomerados de células com perfil de borda esticado (destacado com a elipse vermelha com traço contínuo), evidenciando pontos de ancoragem na superfície do *scaffold*.

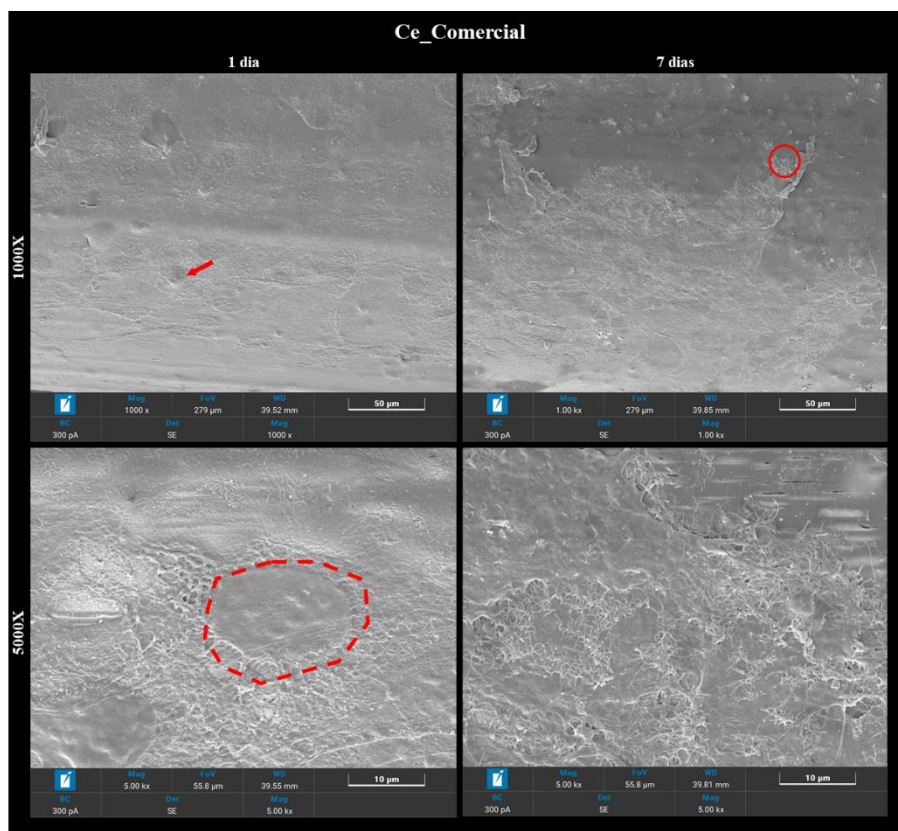


Figura 19 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo Ce\_Comercial com 1 e 7 dias de cultura.

Nas amostras dos grupos NAOH-Ce\_Comercial (Figura 20) e NAOH-Ce\_Sintet (Figura 21), observa-se um padrão morfológico distinto das amostras analisadas previamente. Foi identificada uma porosidade superficial, com diâmetro de poros variando entre 5 e 10 µm.

No grupo NAOH-Ce\_Comercial, as células apresentaram morfologia alongada. Além disso, verificou-se que as células utilizaram os espaços porosos como pontos de ancoragem, aderindo-se às bordas desses poros, conforme evidenciado nas micrografias obtidas em 5000x de ambas as amostras (NAOH-Ce\_Comercial e NAOH-Ce\_Sintet).

Na amostra NAOH-Ce\_Sintet, nas ampliações de 1000x e 5000x, observou-se que a maioria dos poros superficiais estava recoberta por material celular, apresentando uma estrutura semelhante a uma rede filamentosa, característica também identificada no *scaffold* NAOH-Ce\_Comercial.

Após 7 dias de cultura, na amostra do grupo NAOH-Ce\_Comercial, verificaram-se grandes aglomerados celulares, aparentemente originados a partir das células ancoradas nos poros, que possivelmente atuaram como pontos iniciais de adesão. Os poros estão distribuídos de forma homogênea ao longo da região analisada. As células apresentaram um perfil de borda bastante estirado (apontado com seta vermelha na ampliação de 1000x e em destaque com a linha vermelha tracejada na ampliação de 5000x). De maneira semelhante, na amostra do grupo NAOH-Ce\_Sintet, foi possível identificar múltiplos aglomerados celulares interconectados, com um perfil de borda igualmente estirado sobre a superfície do *scaffold*.

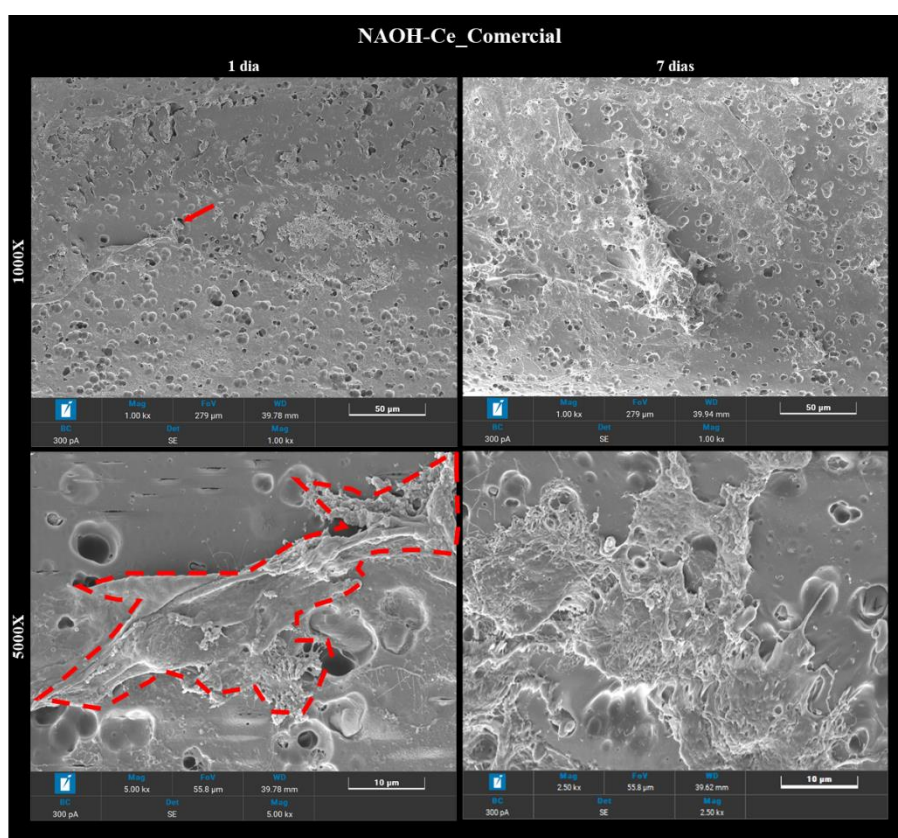


Figura 20 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo NAOH-Ce\_Comercial com 1 e 7 dias de cultura.

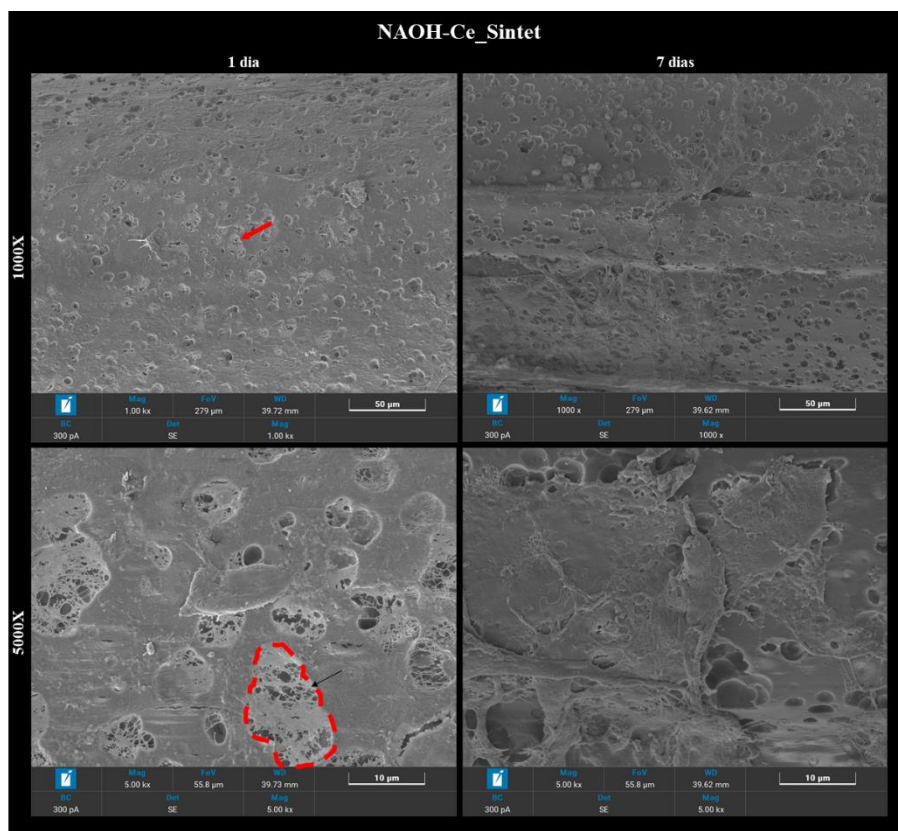


Figura 21 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo NAOH-Ce\_Sintet com 1 e 7 dias de cultura.

As imagens das amostras dos grupos Plasma\_Ce\_Comerc\_grade (Figura 22) e Plasma\_Ce\_Comerc\_livre (Figura 23) indicam a ausência de padrões de porosidade repetitiva, ao contrário do observado nos grupos NAOH-Ce\_Comercial e NAOH-Ce\_Sintet. As células identificadas nessas amostras apresentam morfologia alongada, porém sem contornos bem definidos, conforme evidenciado na ampliação de 5000x do grupo Plasma\_Ce\_Comerc\_livre.

Após 7 dias de cultura, foi possível observar a formação de grupos celulares em ambas as amostras (Plasma\_Ce\_Comerc\_grade e Plasma\_Ce\_Comerc\_livre), embora de maneira mais dispersa em comparação com os demais grupos analisados. No grupo Plasma\_Ce\_Comerc\_grade, as células apresentaram um perfil de borda estirado, semelhante ao observado nos outros grupos. Já no grupo Plasma\_Ce\_Comerc\_livre, identificou-se a presença de um agrupamento celular com um padrão de crescimento radial.

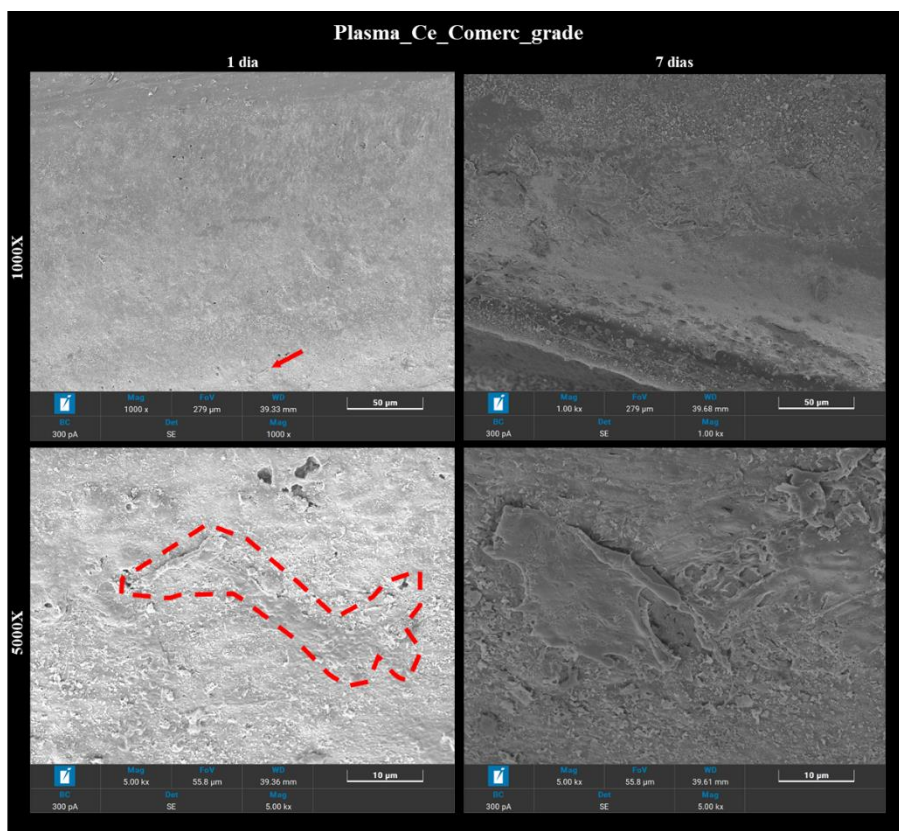


Figura 22 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo NaOH-Ce\_Comerc\_grade com 1 e 7 dias de cultura.

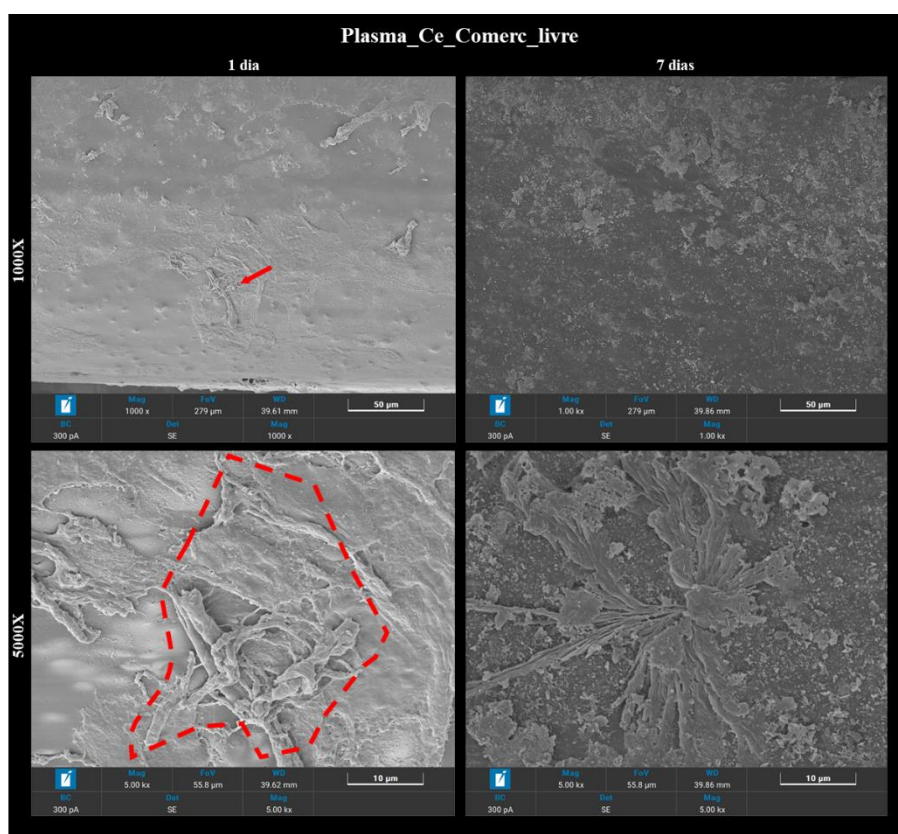


Figura 23 - Ampliações de 1000X e 5000X dos *scaffolds* do grupo NAOH-Ce\_Comerc\_livre com 1 e 7 dias de cultura.

Em todas as amostras onde a deposição de CeONP foi realizada observou-se uma maior quantidade de células e um maior espraiamento ou alongamento, fato que indica sua bioatividade.

## 5.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (ALAMAR BLUE)

Para avaliar a proliferação de células osteoblásticas nos *scaffolds* estudados foi realizado o ensaio de citotoxicidade utilizando Alamar Blue (Figura 24). Para avaliar a proliferação de células nesse ensaio é utilizado um corante azul (resazurina) que após metabolização pelas células é reduzido em sua forma de resuforina que através de análise espectrofotométrica é possível calcular um percentual de redução quando comparado com a resazurina 100% oxidada. Quanto maior a redução, maior a viabilidade celular.

O ensaio de viabilidade celular com Alamar Blue demonstrou que todos os grupos tratados apresentaram comportamento não citotóxico após 1 e 7 dias de incubação com células MC3T3-E1, indicando boa compatibilidade inicial dos *scaffolds* com as células

pré-osteoblásticas. A ausência de citotoxicidade é um requisito fundamental para scaffolds destinados à engenharia de tecidos ósseos, e resultados semelhantes foram relatados por Yang et al. [129], que observaram boa viabilidade celular em scaffolds de PLA modificados com NaOH.

Com 7 dias de cultivo, observou-se um aumento geral na proliferação celular em todos os grupos, com destaque para o grupo tratado com plasma e funcionalizado com CeONPs comerciais (Plasma\_Ce\_Comerc\_livre), que apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p = 0,0192$ ). Esse resultado é particularmente relevante, pois indica que a presença residual de nanopartículas de cério na superfície pode exercer um efeito benéfico sobre a proliferação celular. Acredita-se que esse efeito esteja relacionado às propriedades redox do  $\text{CeO}_2$ , capazes de modular o microambiente celular, favorecendo a adesão e proliferação celular, como discutido por Stodolak et al. [50].

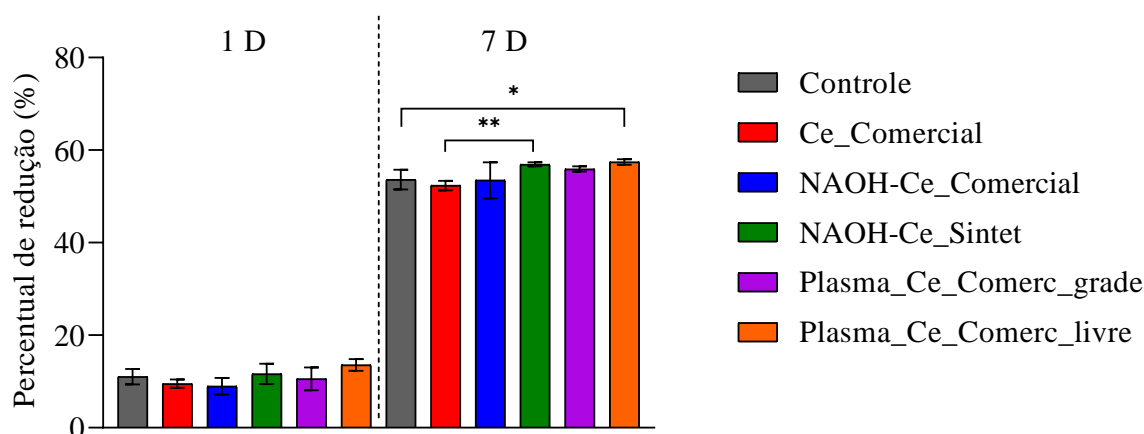


Figura 25 - Resultados do teste de viabilidade celular através do ensaio Alamar Blue.

## 6 CONCLUSÕES

Através desse trabalho foi possível estudar o efeito do tratamento superficial em *scaffolds* produzidos por manufatura aditiva combinado com a deposição superficial de nanopartículas de óxido de Cério, com o objetivo de melhorar a viabilidade celular, buscando otimizar propriedades estruturais e biológicas para aplicações em engenharia de tecido ósseo.

A síntese de nanopartículas de óxido de cério foi bem-sucedida, com a determinação do diâmetro das partículas em aproximadamente 41 nm, de acordo com os dados da espectrofotometria UV-Vis. Esse tamanho obtido é adequado pois pode influenciar diretamente na interação das partículas com as células.

O ensaio de compressão revelou diferenças significativas entre os grupos, especialmente entre os grupos de controle e os grupos NAOH-Ce\_Comercial e NAOH-Ce\_Sintet, que apresentaram menores valores de módulo de compressão. Isso pode estar relacionado ao tratamento superficial com hidróxido de sódio, que afetou a rigidez do material. O grupo de controle, por sua vez, demonstrou melhores propriedades mecânicas, destacando-se como o mais adequado quando comparado aos demais grupos. Apesar dos grupos NAOH-Ce\_Comercial e NAOH-Ce\_Sintet apresentarem os menores valores de módulo de elasticidade, os valores encontrados são compatíveis com a aplicação em engenharia de tecidos ósseos nas camadas internas (50-500 MPa) ou para aplicações em áreas que requerem uma menor resistência mecânica.

Os testes de ângulo de contato indicaram diferenças significativas entre os grupos Plasma\_Ce\_Comerc\_grade e Plasma\_Ce\_Comerc\_livre em comparação ao grupo de controle, sugerindo que os tratamentos de modificação superficial influenciaram a energia superficial dos *scaffolds*, o que pode ter impacto na adesão celular. No entanto, o tratamento por hidrólise alcalina (NAOH-Ce\_Comercial e NAOH-Ce\_Sintet) não apresentou diferenças significativas em relação ao controle, indicando que a modificação superficial não alterou substancialmente a interação com a superfície no que tange ao ângulo de contato.

A microscopia de força atômica (AFM) revelou diferenças na rugosidade superficial dos *scaffolds*, com o grupo de referência apresentando a menor rugosidade. O grupo NAOH-Ce\_Sintet, com tratamento por hidrólise alcalina, apresentou as maiores rugosidades, o que pode ter influenciado a adesão celular. A análise topográfica foi

complementar às observações de microscopia eletrônica, que mostrou que os tratamentos superficiais induziram a formação de poros e influenciaram a morfologia celular, com células mais alongadas e aderidas nos poros nos grupos NAOH-Ce\_Comercial e NAOH-Ce\_Sintet.

O ensaio de viabilidade celular (Alamar Blue) revelou que todos os *scaffolds* foram biocompatíveis, sem sinais de citotoxicidade, e mostraram uma boa capacidade de suporte à proliferação celular, com destaque para o grupo Plasma\_Ce\_Comerc\_livre, que obteve melhores resultados em comparação aos outros grupos, incluindo o grupo de referência. A maior viabilidade celular observada no grupo Plasma\_Ce\_Comerc\_livre indica que a modificação superficial realizada por plasma com os *scaffolds* livres na solução foi eficaz para estimular a proliferação celular osteoblástica.

Em resumo, os resultados mostram que os tratamentos de modificação superficial e a síntese das nanopartículas de óxido de cério influenciaram positivamente as propriedades topográficas e biológicas dos *scaffolds*, sem comprometer a resistência mecânica. O grupo Plasma\_Ce\_Comerc\_livre demonstrou superioridade em termos de viabilidade celular, o que sugere que o tratamento com plasma e modificações superficiais podem ser promissores para a engenharia de tecidos ósseos. Essas descobertas abrem caminho para a otimização de *scaffolds*, visando melhorar a integração e regeneração óssea em aplicações biomédicas.

## 7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Avaliar estratégias de aumento da resistência mecânica dos *scaffolds* para aplicações em estruturas ósseas que demandem um módulo de elasticidade maior.
- Estudar a viabilidade celular em testes de longa duração superiores a 30 dias.
- Investigar o uso da deposição superficial de outras nano partículas bioativas como nanopartículas de prata.
- Análise da interação de diferentes tipos celulares em testes de viabilidade celular in vitro para simular um ambiente mais complexo da regeneração óssea.
- Estudo do tempo de degradação dos *scaffolds* in vitro.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ageing and Health | WHO. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health#:~:text=By%202050%2C%20the%20world's%20population,2050%20to%20reach%20426%20million.>>. Acesso em 19/03/2023.
- [2] 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.
- [3] QU, H.; FU, H.; HAN, Z.; SUN, Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC Advances*, v. 9, n. 45, p. 26252–26262, 2019.
- [4] MANIVASAGEM, G.; DURGALAKSHMI, D.; RAJAMANICKAM, A. Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention - A Review. *Recent Patents on Corrosion Science*, 2(1), 40-54, 2010.
- [5] GHOSH, S.; INDRAKUMAR, S.; GHOSH, S.; GOPAL, V.; NILAWAR, S.; MANIVASAGEM, G.; KESAVE, J.; CHATTERJEE, K. Surface nanocrystallization enhances the biomedical performance of additively manufactured stainless steel. *J. Mater. Chem. B*, 11, 9697-9711, 2023.
- [6] WANG, K.; The use of titanium for medical applications in the USA, *Materials Science and Engineering A*, v. 213, n. 1–2, p. 134–137, 1996.
- [7] MATUSIEWICZ, H. Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles - A systematic analytical review, *Acta Biomaterials*, v. 10, n. 6, p. 2379–2403, 2014.
- [8] GEEPREL, A. G.; NIINOMI, M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 20, p. 407–415, 2013.
- [9] LI, G.; CAO, H.; ZHANG, W.; DING, X.; YANG, G.; QIAO, Y.; LIU, X.; JIANG, X. Enhanced Osseointegration of hierarchical micro/nanotopographic titanium fabricated by microarc oxidation and electrochemical treatment, *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 8, n. 6, p. 3840–3852, 2016.
- [10] HOLZWARTH, J. M.; MA, P. X. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, v. 32, n. 36, p. 9622–9629, 2011.

- [11] MAHONY, O.; TSIGKOU, O.; IONESCU, C.; MINELLI, C.; LING, L.; HANLY, R.; SMITH, M. E.; STEVENS, M. M.; JONES, J. R. Silica-gelatin hybrids with tailorable degradation and mechanical properties for tissue regeneration, *Advanced Functional Materials*, v. 20, n. 22, p. 3835–3845, 2010.
- [12] ZHU, Y.; ZHANG, K.; ZHAO, R.; YE, X.; CHEN, X.; XIAO, Z.; YANG, X.; ZHU, X.; ZHANG, K.; FAN, Y.; ZHANG, X. 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, 2017.
- [13] BRIEN, F. J. O. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.
- [14] WEI, G.; MA, P. X. Nanostructured Biomaterials for Regeneration. *Advanced Functional Materials*, 18, 3568-3582, 2008.
- [15] PELTOLA, S. M. et al. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of medicine*, v. 40, n. 4, p. 268–280, 2008.
- [16] TANIKELLA, N.G.; WITTBRODT, B.; PEARCE, J.M. Tensile strength of commercial polymer materials for fused filament fabrication 3D printing. *Additive Manufacturing*, 15, 40–47, 2017.
- [17] CUAN-URQUIZO, E.; BAROCIO, E.; TEJADA-ORTIGOZA, V.; PIPES, R. B.; RODRIGUEZ, C. A.; ROMAN-FLORES, A. Characterization of the Mechanical Properties of FFF Structures and Materials: A Review on the Experimental, Computational and Theoretical Approaches. *Materials*, v.12, ed. 6, 2019.
- [18] PANDEY, A.; SINGH, G.; SINGH, S.; JHA, K.; PRAKASH, C. 3D printed biodegradable functional temperature-stimuli shape memory polymer for customized scaffoldings, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Volume 108, 103781, 2020.
- [19] CHEN, M.; LE, D. Q.; BAATRUP, A.; NYGAARD, J. V.; HEIN, S.; BJERRE, L.; KASSEM, M.; ZOU, X.; BUNGER, C. Self-assembled composite matrix in a hierarchical 3-D scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7, 2244-2255, 2011.
- [20] PETER, S. J.; MILLER, M. J.; YASKO, A.W.; YASZEMSKI, M. J.; MIKOS, A.G. Polymer Concepts in Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, 43, 422-427, 1998.

- [21] BACKES, Eduardo. Desenvolvimento de biocompósito de poli (ácido láctico) /biocargas para impressão 3D de scaffolds para engenharia de tecidos ósseos. 2020 144 p. Tese de Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais, UFSCar, São Carlos, 2020.
- [22] LU, B.; ZHU, D.-Y. ; YIN, J.-H.; XU, H.; ZHANG, C.-Q.; KE, Q.-F.; GAO, Y.; GUO, Y.-P. Incorporation of cerium oxide in hollow mesoporous bioglass scaffolds for enhanced bone regeneration by activating ERK signaling pathway. *Biofabrication*, v. 11, 2019.
- [23] MANDOLI, C.; PAGLIARI, F.; PAGLIARI, S.; FORTE, G.; DI NARDO, P.; LICOCCIA, S.; TRAVERSA, E. Stem Cell Aligned Growth Induced by CeO<sub>2</sub> Nanoparticles in PLGA scaffolds with improved bioactivity for regenerative medicine. *Adv. Funct. Mater.*, v. 20, 1617, 2010.
- [24] CHARLES-HARRIS, M.; KOCH, M. A.; NAVARRO, M.; LACROIX, D.; ENGEL, E.; PLANELL, J. A. A PLA/calcium phosphate degradable composite material for bone tissue engineering: an in vitro study, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 19, p. 1503–1513, 2008.
- [25] WEBSTER, T. J.; MASSA-SCHLUETER, E. A.; SMITH, J. L.; SLAMOVIICH, E. B. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations, *Biomaterials*, v. 25, n. 11, p. 2111–2121, 2004.
- [26] REZNIKOV, N.; BILTON, M.; LARI, L.; STEVENS, M. M.; KRÖGER, R. Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale, *Science*, v.80, v. 360, p. 1–10, 2018.
- [27] ROSETI, L.; PARISI, V.; PETRETTA, M.; CAVALLO, C.; DESANDO, G.; BARTOLOTTI, I.; GRIGOLO, B. Scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and new perspectives, *Mater. Sci. Eng. C*, v. 78, p. 1246–1262, 2017.
- [28] NAQUI, A.; SWAIN, Z.; MACKAY, ME. Dual Material Fused Filament Fabrication via Core-Shell Die Design. *ACS APPLIED POLYMER MATERIALS*, v. 5, p. 2481-2489, 2023.
- [29] REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.

- [30] BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, p. 13–21, 2005.
- [31] CHIA, H. N.; WU, B. M. Recent advances in 3D printing of biomaterials, *Journal of Biological Engineering*, v. 9, n. 4, p. 1–14, 2015.
- [32] PRATAMA, J.; CAHYONO, S.I.; SUYITNO, S.; MUFLIKHUN, M.A.; SALIM, U.A.; MAHARDIKA, M.; ARIFVIANTO, B. A Review on Reinforcement Methods for Polymeric Materials Processed Using Fused Filament Fabrication (FFF). *Polymers*, 13, 4022, 2021.
- [33] KORPELA, J.; KOKKARI, A.; KORHONEN, H.; MALIN, M. Biodegradable and bioactive porous scaffold structures prepared using fused deposition modeling, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, v. 101B, n. 4, p. 610–619, 2013.
- [34] RAI, B.; TEOH, S. H.; HO, K. H.; HUTMACHER, D. W.; CAO, T.; CHEN, F.; YACOB, K. The effect of rhBMP-2 on canine osteoblasts seeded onto 3D bioactive polycaprolactone scaffolds, *Biomaterials*, v. 25, p. 5499–5506, 2004.
- [35] HEE, S.; DAE, P.; PARK, S.; WON, J. Scaffolds for bone tissue engineering fabricated from two different materials by the rapid prototyping technique: PCL versus PLGA, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 23, n. 11, p. 2671–2678, 2012.
- [36] XIONG, Z.; YAN, Y.; WANG, S.; ZHANG, R.; ZHANG, C. Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low-temperature deposition, *Scripta Materialia*, v. 46, n. 11, p. 771–776, 2002.
- [37] WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30, 5897-5909, 2009.
- [38] LEE, H.; AHN, S.; BONASSAR, L. J.; KIM, G. Cell(MC3T3-E1)-Printed Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/Alginate Hybrid Scaffolds for Tissue Regeneration. *Macromolecular Rapid Communications*, 34, 142-149, 2013.
- [39] SHIM, J. H.; KIM, J. Y.; PARK, M.; PARK, J.; CHO, D.W. Development of a hybrid scaffold with synthetic biomaterials and hydrogel using solid freeform fabrication technology. *Biofabrication*, 3, 034102, 2011.
- [40] LEE, J. S.; HONG, J. M.; JUNG, J. W.; SHIM, J. H.; OH, J. H.; CHO, D.W. 3D printing of composite tissue with complex shape applied to ear regeneration. *Biofabrication*, 6, 024103, 2014.

- [41] TYLER, B.; GULLOTI, D.; MANGRAVITI, A.; UTSUKI, T.; BREM, H. Polylactic Acid (PLA) Controlled Delivery Carriers for Biomedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, v.107, p. 163–175, 2016.
- [42] FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. Physical and Mechanical Properties of PLA, and Their Functions in Widespread Applications – A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 107, p. 367–392, 2016.
- [43] SINGH, S.; RAMAKRISHNA, S.; SINGH, R. Material Issues in Additive Manufacturing: A Review. *Journal of Manufacturing Processes*. v. 25, p. 185–200, 2017.
- [44] LUNT, J. Large-Scale Production, Properties and Commercial Applications of Polylactic Acid Polymers. *Polymer Degradation Stability*. v. 59, p. 145–152, 1998.
- [45] SÖDERGÅRD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog Polym Sci*, 27, 1123–1163, 2002.
- [46] VASENINA, I. V.; LAPUT, O. A.; KURZINA, I. A. Regularities of PLA Mechanical Property Modification under Ion Implantation Conditions. *Vacuum*, v. 187, p. 110105, 2021.
- [47] OKSIUTA, Z.; JALBRZYKOWSKI, M.; MYSTKOWSKA, J.; ROMANCZUK, E.; OSIECKI, T. Mechanical and Thermal Properties of Poly lactide (PLA) Composites Modified with Mg, Fe, and Polyethylene (PE) Additives. *Polymers*, v. 12, p. 2939, 2020.
- [48] 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, 2008.
- [49] VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J.M.; Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progress in Solid State Chemistry*, v. 32, ed. (1–2), p. 1–31, 2004.
- [50] STODOLAK, E.; GÓRA, A.; ZYCH, Ł.; SZUMERA, M. Bioactivity of fibrous polymer based nanocomposites for application in regenerative medicine, *Materials Science Forum*, v. 714, p. 229–236, 2012.
- [51] LEE, J.; LEE, Y.; RIM, N.; JO, S.; LIM, Y.; SHIN, H. Development and characterization of nanofibrous poly(lactic-co-glycolic acid)/biphasic calcium phosphate composite scaffolds for enhanced osteogenic differentiation, *Macromolecular Research*, v. 19, ed. 2, p. 172–179, 2011.

- [52] WEIZHONG, Y.; GUANGFU, Y.; DALI, Z.; LIJUN, Y.; LINHONG, C. Surface-modified biphasic calcium phosphate/poly(L-lactide) biocomposite, *Journal of Wuhan University of Technology, Materials Science Edition*, v. 29, p. 81–86, 2007.
- [53] TANG, Z.; LI, X.; TAN, Y.; FAN, H.; ZHANG, X. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Regen Biomater.* ;5(1):43–59, 2018.
- [54] WANG, L.; ZHANG, B.; BAO, C.; HABIBOVIC, P.; HU, J.; ZHANG, X. Ectopic osteoid and bone formation by three calcium-phosphate ceramics in rats, rabbits and dogs. *PLoS ONE*. 9(9): e107044, 2014.
- [55] CHENG, L.; WANG, T.; ZHU, J.; CAI, P. Osteoinduction of calcium phosphate ceramics in four kinds of animals for 1 year: dog, rabbit, rat, and mouse. *Transplant Proc.* 48(4):1309–14, 2016.
- [56] COOKE, F.W. *Ceramics in orthopedic surgery. Clinical orthopaedics and related research*, v. 276, p. 135–46, 1992.
- [57] YUAN,H.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; DE GROOT, K.; DE BRUJIN, J.D. A comparison of bone Formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 78, ed.1, p. 139-147, a 2006.
- [58] YUAN,H.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; DE GROOT, K.; DE BRUJIN, J.D. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. *Tissue Engineering*, v. 12, p. 1607-1615, b 2006.
- [59] BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. *Revista eletrônica de materiais e Processos*, v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011.
- [60] GARLOTTA, D. A literature review of poly(lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*, v. 9, n. 2, 2001.
- [61] CARRASCO, F. PAGÈS, P.; GÁMEZ-PÉREZ, J.; SANTANA, O. O.; MASPOCH, M. L. 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, 2010.

- [62] BROUNSTEIN, Z.; YEAGER, C. M.; LABORIAU, A. Development of Antimicrobial PLA Composites for Fused Filament Fabrication. *Polymers*. v. 13, p. 580, 2021.
- [63] KAO, C.-T.; LIN, C.-C.; CHEN, Y.-W.; YEH, C.-H.; FANG, H.-Y.; SHIE, M.-Y. Poly(Dopamine) Coating of 3D Printed Poly(Lactic Acid) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 56, p. 165–173, 2015.
- [64] SHERWOOD, J. K.; RILEY, S. L.; PALAZZOLO, R.; BROWN, S. C.; MONKHOUSE, D. C.; COATES, M.; GRIFFITH, L. G.; LANDEEN, L. K.; RATCLIFFE, A. A Three-Dimensional Osteochondral Composite Scaffold for Articular Cartilage Repair. *Biomaterials*. v. 23, p. 4739–4751, 2002.
- [65] MEYVA-ZEYBEK, Y.; KAYANAK, C. A Comparative Study for the Behavior of 3D-PRINTED and Compression Molded PLA/POSS Nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 138, p. 50246, 2021.
- [66] MITRIN, B. I.; CHAPEK, S. V.; SADYRIN, E. V.; SWAIN, M. V. Mechanical Properties and Failure Mechanisms of 3D-Printed PLA Scaffolds: A Preliminary Study. *IOP Conference Series. Materials Science Engineering*, v. 1029, p. 12074, 2021.
- [67] BAPTISTA, R.; GUEDES, M. Morphological and Mechanical Characterization of 3D Printed PLA Scaffolds with Controlled Porosity for Trabecular Bone Tissue Replacement. *Materials Science & Engineering C*, v. 118, p. 111528, 2021.
- [68] ANTICH, C.; DE VICENTE, J.; JIMENEZ, G.; CHOCARRO, C.; CARRILLO, E.; MONTAGNEZ, E.; GÁLVEZ-MARTÍN, P.; MARCHAL, J. A. BioInspired Hydrogel Composed of Hyaluronic Acid and Alginate as a Potential Bioink for 3D Bioprinting of Articular Cartilage Engineering Constructs. *Acta Biomaterialia*. v. 106, p. 114–123, 2020.
- [69] ALIZADEH-OSGOUEI, M.; LI, Y.; VAHID, A.; ATAEE, A.; WEN, C. High Strength Porous PLA Gyroid Scaffolds Manufactured via Fused Deposition Modeling for Tissue-Engineering Applications. *Smart Materials in Medicine*, v. 2, p. 15–25, 2021.
- [70] THEUS, A. S.; NING, L.; HWANG, B.; GIL, C.; CHEN, S.; WOMBWELL, A.; MWHTA, R.; SWEPOOSHAN, V. Bioprintability: Physiomechanical and Biological Requirements of Materials for 3D Bioprinting Processes. *Polymers*, v. 12, p. 2262, 2020.

- [71] MEHTA, R.; KUMAR, V.; BHUNIA, H.; UPADHYAY, S. N. Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review. *Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews*, v. 45, p. 325–349, 2005.
- [72] LIAO, H.-T.; WU, C.-S. Preparation and Characterization of Ternary Blends Composed of Polylactide, Poly(εCaprolactone) and Starch. *Materials Science and Engineering A*, v. 515, p. 207–214, 2009.
- [73] LI, G.; ZHAO, M.; XU, F.; YANG, B.; LI, X.; MENG, X.; TENG, L.; SUN, F.; LI, Y. Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid, *Molecules*, v. 25, p. 5023, 2020.
- [74] HENTON, D.; GRUBER, P.; LUNT, J.; RANDALL, J. *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*; Mohanty, A., Misra, M., Druzal, L., CRC Press: Boca Raton, 2005.
- [75] JACOBSEN, S.; FRITZ, H. G.; DEGEE, P.; DUBOIS, P.; JEROME, R. Polylactide (PLA)-a New Way of Production. *Polymer Engineering and Science*, v. 39, p. 1311–1319, 1999.
- [76] BLACKBURN, R. S. and E. Textile Institute (Manchester). *Biodegradable and Sustainable Fibres*; Lightning Source UK Ltd.: Cambridge; Milton Keynes UK, Woodhead, 2005.
- [77] AVINC, O.; KHODDAMI, A. Overview of Poly(Lactic Acid) (PLA) Fibre: Part I: Production, Properties, Performance, Environmental Impact, and End-Use Applications of Poly(Lactic Acid) Fibres. *Fibre Chemistry*, v. 41, p. 391–401, 2009.
- [78] HAMAD, K.; KASEEM, M.; YANG, H. W.; DERI, F.; KO, Y. G. Properties and Medical Applications of Polylactic Acid: A Review. *Express Polymer Letters*, v. 9, p. 435–455, 2015.
- [79] ELSAWY, M. A.; KIM, K.-H.; PARL, J.-W.; DEEP, A. Hydrolytic Degradation of Polylactic Acid (PLA) and Its Composites. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. v. 79, p. 1346–1352, 2017.
- [80] CANEVAROLO JR, S. V. *Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*, São Paulo: Artilber Editora, 2013.
- [81] HUTMACHER, D. W. et al. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 55, n. 2, p. 203–216, May 2001.

- [82] BACKES, E.H., PIRES, L. D., SELIESTRE-DE-ARAÚJO, H. S., COSTA, L. C., PASSADOR, F. R., PESSAN, L. A. Development and characterization of printable PLA/beta-TCP bioactive composites for bone tissue applications. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 138, ed.5, 2021.
- [83] DONATE, R.; MONZÓN, M.; ZAIDA, O.; WANG, L.; RIBEIRO, V.; PESTANA, D.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. Comparison between calcium carbonate and  $\beta$ -tricalcium phosphate as additives of 3D printed scaffolds with polylactic acid matrix. *Journal of Tissue Engineering Regeneration Medicine*, 14, 272-283, 2020.
- [84] CHEN, S., GUO, Y., LIU, R., WU, S., FANG, J., HUANG, B., LI, Z.; CHEN, Z.; CHEN, Z. Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 164, p. 58–69, 2018.
- [85] WOZNA, A. E.; JUNKA, A.; HOPPE, V. W. Influence of the different composites (PLA/PLLA/HA/beta-TCP) contents manufactured with the use of additive laser technology on the biocompatibility. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, v. 23, ed.3, p. 169-180, 2021.
- [86] CAO, L.; CHEN, Q.; JIANG, L. B.; YIN, X. F.; BIAN, C.; WANG, H. R.; MA, Y. Q.; LI, X. Q.; LI, X. L.; DONG, J. Bioabsorbable self-retaining PLA/nano-sized  $\beta$ -TCP cervical spine interbody fusion cage in goat models: an in vivo study. *International Journal of Nanomedicine*, v.12, p. 7197-7205, 2017.
- [87] BACKES, E. H.; FERNANDES, E. M.; DIOGO, G. S.; MARQUES, C. F.; SILVA, T. H.; COSTA, L. C.; PASSADOR, F. R.; REIS, R. L.; PESSAN, L. A. Engineering 3D printed bioactive composite scaffolds based on the combination of aliphatic polyester and calcium phosphates for bone tissue regeneration. *Materials Science & Engineering C- Materials for Biological Applications*, v. 122, 2021.
- [88] GHOSH, R. et al. Biocompatibility and drilling performance of beta tricalcium phosphate : Yttrium phosphate bioceramic composite. *Ceramics International*, v. 42, n. 7, p. 8263–8273, May 2016.
- [89] KOVÁCS, K. et al. Comparative study of  $\beta$ -tricalcium phosphate mixed with platelet-rich plasma versus  $\beta$ -tricalcium phosphate, a bone substitute material in dentistry. *Acta veterinaria Hungarica*, v. 51, n. 4, p. 475–484, 2003

- [90] MATSUNAGA, K. et al. First-principles calculations of divalent substitution of Ca<sup>2+</sup> in tricalcium phosphates. *Acta Biomaterialia*, v. 23, p. 329–337, Sep.2015.
- [91] ZAICHICK, S.; ZAICHICK, V.; KARANDASHEV, V.; NOSENKO, S. Accumulation of rare earth elements in human bone within the lifespan. *Metallomics*, v. 3, 186, 2011.
- [92] SHRUTI, S.; SALINAS, A. J.; MALAVASI, G.; LUSVARDI, G.; MENABUE, L.; FERRARA, C.; MUSTARELLI, P.; VALLET-REGÌ, M. Structural and in vitro study of cerium, gallium and zinc containing sol–gel bioactive glasses. *J. Mater. Chem.*, v. 22 13698 2012.
- [93] SHRUTI, S.; SALINAS, A. J.; LUSVARDI, G.; MALAVASI, G.; MENABUE, L.; VALLET-REGÌ, M. Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium- and zinc-containing glasses. *Acta Biomater.*, v. 9, p. 4836-4844, 2013.
- [94] NICOLINI, V.; GAMBUZZI, E.; MALAVASI, G.; MENABUE, L.; MENZIANI, M. C.; LUSVARDI, G.; PEDONE, A.; BENEDETTI, F.; LUCHES, P.; D'ADDATO, S.; VALERI, S. Evidence of catalase mimetic activity in Ce<sup>3+</sup>/Ce<sup>4+</sup> doped bioactive glasses. *J. Phys. Chem. B*, v. 119, 4009, 2015.
- [95] NICOLINI, V.; GAMBUZZI, E.; MALAVASI, G.; MENABUE, L.; MENZIANI, M. C.; LUSVARDI, G.; PEDONE, A.; BENEDETTI, F.; LUCHES, P.; D'ADDATO, S.; VALERI, S. Evidence of catalase mimetic activity in Ce<sup>3+</sup>/Ce<sup>4+</sup> doped bioactive glasses. *J. Phys. Chem. B*, v. 119, 4009, 2015.
- [96] DELIORMANLI, A. M. Electrospun cerium and gallium containing silicate based 13-93 bioactive glass fibers for biomedical applications. *Ceram. Int.*, v. 42, 897, 2016.
- [97] BENEDETTI, F.; LUCHES, P.; D'ADDATO, S.; VALERI, S.; NICOLINI, V.; PEDONE, A.; MENZIANI, M. C.; MALAVASI, G. Structure of active cerium sites within bioactive glasses. *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 100, 5086, 2017.
- [98] MORAIS, D. S.; FERNANDES, S.; GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H.; SAMPAIO, P.; FERRAZ, M. P.; SANTOS, J. D.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S. Novel cerium doped glass-reinforced hydroxyapatite with antibacterial and osteoconductive properties for bone tissue regeneration. *Biomed. Mater.*, v. 10, 055008, 2015.
- [99] KARAKOTI, A. S.; TSIGKOU, O.; YUE, S.; LEE, P. D.; STEVENS, M. M.; JONES, J. R.; SEAL, S. Rare earth oxides as nanoadditives in 3-D nanocomposite scaffolds for bone regeneration. *J. Mater. Chem.*, v. 20, p. 8912–8919, 2010.

- [100] LIU, D.-D. ; ZHANG, J.-C.; ZHANG, Q.; WANG, S.-X.; YANG, M.-S. TGF- $\beta$ /BMP signaling pathway is involved in cerium promoted osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.*, v. 114, 1105, 2013.
- [101] HU, Y.; DU, Y.; JIANG, H.; JIANG, G. S. Cerium promotes bone marrow stromal cells migration and osteogenic differentiation via Smad1/5/8 signaling pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v. 7, 5369, 2014.
- [102] TANG, L.; CHENG, J. Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application. *Nano Today*, v. 8, n. 3, p. 290–312, 2013.
- [103] VALLIANT, E. M.; ROMER, F.; WANG, D.; MCPHAIL, D. S.; SMITH, M. E.; HANNA, J. V.; JONES, J. R. Bioactivity in silica/poly( $\alpha$ -glutamic acid) sol–gel hybrids through calcium chelation. *Acta Biomater.*, v. 9, n. 8, p. 7662–7671, 2013.
- [104] LI, K.; SHEN, Q.; XIE, Y.; YOU, M.; HUANG, L.; ZHENG, X. Incorporation of cerium oxide into hydroxyapatite coating regulates osteogenic activity of mesenchymal stem cell and macrophage polarization. *J. Biomater. Appl.*, v. 31, p. 1062-1076, 2017.
- [105] RASAL, R.M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, E. H. Poly(lactic acid) modifications, *Progress in Polymer Science*, 35,338–356, 2010.
- [106] COSTA, D.O.; PROWSE, P.D.; CHRONES, T.; SIMS, S.M.; HAMILTON, D.W.; RIZKALLA, A.S.; DIXON, S.J.; The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials*, v. 34, p. 7215–7226, 2013.
- [107] SHEN, N.; DING, H.; BOWERS, R.; YU, Y.; PENCE, C.N.; OZBOLAT, I.T.; STANFORD, C.M. Surface micropatterning of pure titanium for biomedical applications via high energy pulse laser peening. *Journal of Micro and Nano-Manufacturing*, v. 3, 2015.
- [108] ANSELME, K.; BIGERELLE, M.; NOEL, B.; DUFRESNE, E.; JUDAS, D.; LOST, A.; HARDOUIN, P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 49, p. 155–166, 2000.
- [109] ANSELME, K.; BIGERELLE, M.; NOËL, B.; LOST, A.; HARDOUIN, P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth, *Journal of Biomedical Materials Research*. v. 60, p. 529-540, 2010.

- [110] WANG, C.; WANG, J.; SONG, W. The Researches on Cells Adhesion on the Biocompatible Polymer Surface with Superwettability, *Frontiers in Bioengineering & Biotechnology*, v. 4, 2016.
- [111] JO, S.; KANG, S.M.; PARK, S.A.; KIM, W.D.; KWAK, J.; LEE, H. Enhanced adhesion of preosteoblasts inside 3D PCL scaffolds by polydopamine coating and mineralization. *Macromolecular Bioscience*, v.13, p. 1389–1395, 2013.
- [112] AHN, H.H.; LEE, I.W.; LEE, H.B.; KIM, M.S. Cellular behavior of human adipose-derived stem cells on wettable gradient polyethylene surfaces. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, p. 2075, 2014.
- [113] HAMDAN, M.; BLANCO, L.; KHRAISAT, A. TRESGUERES, I.F. Influence of Titanium Surface Charge on Fibroblast Adhesion. *Clinical Implant Dentistry and related research*, v.8, p.32-38, 2006.
- [114] BACAKOVA, L.; FILOVA, E.; PARIZEK, M.; RUMML, T.; SVORCIK, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 739-767, 2011.
- [115] HUGHES, D.E.; SALTER, D.M.; DEDHAR, S.; SIMPSON, R. Integrin expression in human bone. *Journal of bone and mineral research*, v. 8, p. 527–533, 1993.
- [116] HEALY, K.E.; THOMASN, C.H.; REZANIA, A.; KIM, J.E.; MCKEOWN, P.J.; LOM, B.; HOCKBERGER, P.E. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials*, v. 17, p. 195–208, 1996.
- [117] KLAWITTER, J.J.; BAGWELL, J.G.; WEINSTEIN, A.M.; SAUER, B.W. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 10, p. 311-323, 1976.
- [118] MURPHY, C.M.; HAUGH, M.G.; O'BRIEN, F.J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 31, p. 461–466, 2010.
- [119] RICO, P.; RODRÍGUEZ FERNANDEZ, J.C.; MORATAL, D.; ALTANKOV, G.; MONLEÓN, P.M.; SALMERÓNSÁNCHEZ, M. Substrate-induced assembly of fibronectin into networks: influence of surface chemistry and effect on osteoblast adhesion. *Tissue Engineering Part A*, v. 15, p. 3271–3281, 2009.
- [120] MORRA, M.; CASSINELLI, C.; MEDA, L.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. Surface analysis and effects on interfacial bone microhardness of

collagen-coated titanium implants: a rabbit model. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, v. 20, p. 23-30, 2005.

[121] SWAN, E.E.; POPAL, K.C.; DESAI, T.A. Peptide-immobilized nanoporous alumina membranes for enhanced osteoblast adhesion. *Biomaterials*, v. 26, p. 1969–1976, 2005.

[122] CHOLLET, C.; CHANSEAU, C.; REMY, M.; GUIGNANDON, A.; BAREIELLE, R.; LABRUGÈRE, C.; BORDENAVE, L.; DURRIEU, M.C. The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces. *Biomaterials*, v. 30, p. 711–720, 2009.

[123] CAO, C.; SONG, Y.; YAO, Q.; YAO, Y.; WANG, T.; HUANG, B.; GONG, P. Preparation and preliminary in vitro evaluation of a bFGF-releasing heparin-conjugated poly(-caprolactone) membrane for guided bone regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer edition*, v. 26, p. 600-616, 2015.

[124] WANG, S.; CUI, W.; BEI, J. Bulk and surface modifications of polylactide. *Anal Bioanal Chem*, 381, 547–556, 2005.

[125] LUO, N.; STEWART, M.J.; HIRT, D.E.; HUSSON, S.M.; SCHWARK, D.W. Surface modification of ethylene-co-acrylic acid copolymer films: addition of amide groups by covalently bonded amino acid intermediates. *J Appl Polym Sci*, 92, 1688–1694, 2004.

[126] ZHANG, P.; HE, C.; CRAVEN, R.D.; EVANS, J.A.; FAWCET, N.C.; WU, Y.; TIMMONS, R. B. Subsurface formation of amide in polyethylene-co-acrylic acid film: a potentially useful reaction for tethering biomolecules to a solid support. *Macromolecules*, 32, 2149–2155, 1999.

[127] JANORKAR, A.V.; LUO, N.; HIRT, D.E. Surface modification of an ethyleneacrylic acid copolymer film: grafting amine-terminated linear and branched architectures. *Langmuir*, 20, 7151–7158, 2003.

[128] CAI, K.; YAO, K.; CUI, Y.; LIN, S.; YANG, Z.; LI, X.; XIE, H.; QING, T.; LUO, J. Surface modification of poly(d,l-lactic acid) with chitosan and its effects on the culture of osteoblasts in vitro. *J Biomed Mater Res*, 60, 398–404, 2002.

[129] YANG, J.; WAN, Y.Q.; WANG, S.G.; TU, C.F.; CAI, Q.; BEI, J.Z.; WANG, S. Enhancing the cell affinity of macroporous poly(l-lactide) cell scaffold by a convenient surface modification method. *Polym Int*, 52, 1892–1899, 2003.

- [130] ZHU, Y.B.; GAO, C.Y.; LIU, X.Y., HE, T.; SHEN, J.C. Immobilization of biomacromolecules onto aminolyzed poly(l-lactic acid) toward acceleration of endothelium regeneration. *Tissue Eng*, 10, 53–61, 2004.
- [131] JANORKAR, A.V.; FRITZ; E.W.; BURG, K.J.L; METTERS, A.T.; HIRT, D.E. Grafting amine-terminated branched architectures from poly(l-lactide)film surfaces for improved cell attachment. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 81B, 142–152, 2007.
- [132] MA, H.; DAVIS, R.H.; BOWMAN, C.N.; A novel sequential photoinduced living graft polymerization. *Macromolecules*, 33, 331–335, 2000.
- [133] RAHANE, S.B.; KILBEY, S.M.; METTERS, A.T. Kinetics of surface-initiated photoiniferter-mediated photopolymerization. *Macromolecules*, 38, 8202–8210, 2005.
- [134] ZHAO, B.; BRITAIN, W.J. Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules. *Prog Polym Sci*, 25, 677–710, 2000.
- [135] ZHU, A; ZHANG, M.;WU, J.; SHEN, J. Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive heterobifunctional crosslinking reagent on PLA surface. *Biomaterials*, 23, 4657–4665, 2002.
- [136] STEFFENS, G.C.M.; NOTHDURF, L.; BUSE, G.; THISSEN, H.; HÖCKER, H. KLEE, D. High density binding of proteins and peptides to poly(d,l-lactide) grafted with polyacrylic acid. *Biomaterials*, 23, 3523–3531, 2002.
- [137] KIMURA, Y.; SHIROTANI, K.; YAMANE, H.; KITAO, T. Ring-opening polymerization of 3(S)-[(Benzyloxycarbonyl)methyl]-1,4-dioxane- 2,5-dione: a new route to a poly( $\alpha$ -hydroxy acid) with pendant carboxyl groups. *Macromolecules*, 21, 3338–3340, 1988.
- [138] JANOKAR, A.V.; METTERS, A.T.; HIRT, D.E. Modification of poly(lactic acid) films: enhanced wettability from surface-confined photografting and increased degradation rate due to an artifact of the photografting process. *Macromolecules*, 37, 9151–9159, 2004.
- [139] RASAL, R.M.; BOHANNON, B.G.; HIRT, D.E. Effect of the photoreaction solvent on surface and bulk properties of poly(lactic acid) and poly(hydroxyalkanoate) films. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 85B, 564–572, 2008.

- [140] JANORKAR, A.V.; PROULX, S.E.; METTERS, A.T.; HIRT, D. E.; Surface-confined photopolymerization of single- and mixed-monomer systems to tailor the wettability of poly(l-lactide) film. *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 44, 6534–6543, 2006.
- [141] JANORKAR, A.V.; METTERS, A.T.; HIRT, D.E. Degradation of poly(l-lactide) films under ultraviolet-induced photografting and sterilization conditions. *J Appl Polym Sci*, 106, 1042–1047, 2007.
- [142] EDLUND, U., KÄLLROT, M. ALBERTSSON, A.C. Källrot M, Albertsson AC. Single-step covalent functionalization of polylactide surfaces. *J Am Chem Soc*, 127, 8865–8871, 2005.
- [143] KÄLLROT, M. EDLUND, U.; ALBERTSSON, A.C. Surface functionalization of degradable polymers by covalent grafting. *Biomaterials*, 27, 1788–1796, 2006.
- [144] TSUJI, H.; IKADA, H. Blends of crystalline and amorphous poly(lactide). III. Hydrolysis of solution-cast blend films. *J Appl Polym Sci*, 63, 855–863, 1997.
- [145] KÄLLROT, M. EDLUND, U.; ALBERTSSON, A.C. Covalent grafting of poly(lactide) to tune the in vitro degradation rate. *Biomacromolecules*, 8, 2492–2496, 2007.
- [146] EDLUND, U. DÅNMARK, S. ALBERTSSON, A.C. A strategy for the covalent functionalization of resorbable polymers with heparin and osteoinductive growth factor. *Biomacromolecules*, 9, 901–905, 2008.
- [147] CHEN, Y.; MAK, A.F.T.; WANG, M.; LI, J. WONG, M.S.; PLLA scaffolds with biomimetic apatite coating and biomimetic apatite/collagen composite coating to enhance osteoblast-like cells attachment and activity. *Surf Coat Technol*, 201, 575–580, 2006.
- [148] ATTHOF, B.; HILBORN, J. Protein adsorption onto polyester surfaces: is there a need for surface activation? *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 80B, 121–130, 2007.
- [149] EID, K.; CHEN, E.; GRIFFITH, L; GLOWACKI, J. Effect of RGD coating on osteocompatibility of PLGA-polymer disks in a rat tibial wound. *J Biomed Mater Res*, 57, 224–231, 2001.
- [150] KUBIES, D.; MACHOVÁ, L.; BRYNDA, E.; LUKÁS, J.; RYPÁČEK, F. Functionalized surfaces of polylactide modified by Langmuir–Blodgett films of amphiphilic block copolymers. *J Mater Sci Mater Med*, 14, 143–149, 2003.

- [151] BLACK, F.E.; HARTSHORNE, M.; DAVIES, M.C.; ROBERTS, C.J.; TENDLER, S.J.B.; WILLIAMS, P.M.; SHAKESHEFF, K.M. Surface engineering and surface analysis of a biodegradable polymer with biotinylated end groups. *Langmuir*, 15, 3157–3161, 1999.
- [152] QUIRK, R.A.; CHAN, W.C.; DAVIES, M.C.; TENDLER, S.J.B.; SHAKESHEFF, K.M. Poly(llysine)–GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid). *Biomaterials*, 22, 865–872, 2001.
- [153] HEALY, K.E.; THOMAS, C.H.; REZANIA, A.; KIM, J.E.; MCKEOWN, P.J., LOM, B., HOCKBERGER, P.E.; Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials*, 17, 195–208, 1996.
- [154] GROSS, G.W.; RHOADES, B.K.; AZZAZYM H.M.E; WU, M.C. The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosens Bioelectron*, 10, 553–567, 1995.
- [155] WANG, Y.; LAI, H.H.; BACHMAN, M.; SIMS, C.E.; LI, G.P.; ALLBRITTON, N.L. Covalent micropatterning of poly(dimethylsiloxane) by photografting through a mask. *Anal Chem*, 77, 7539–7546, 2005.
- [156] LIN, C.C.; CO, C.C.; HO, C.C. Micropatterning proteins and cells on polylactic acid and poly(lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, 26, 3655–3662, 2005.
- [157] ZHU, H.; JI, J.; SHEN, J. Surface engineering of poly(dl-lactic acid) by entrapment of biomacromolecules. *Macromol Rapid Commun*, 23, 819–823, 2002.
- [158] QUIRK, R.A.; DAVIES, M.C.; TENDLER, S.J.B.; SHAKESHEFF, K.M. Surface engineering of poly(lactic acid) by entrapment of modifying species. *Macromolecules*, 33, 258–260, 2000.
- [159] QUIRK, R.A.; DAVIES, M.C.; TENDLER, S.J.B.; CHAN, W.C.; SHAKESHEFF, K.M. Controlling biological interactions with poly(lactic acid) by surface entrapment modification. *Langmuir*, 17, 2817–2820, 2001.
- [160] ZHANG, J.; ROBERTS, C.J.; SHAKESHEFF, K.M. DAVIES, M.C.; TENDLER, S.J.B. Microand macrothermal analysis of a bioactive surface-engineered polymer formed by physical entrapment of poly(ethylene glycol) into poly(lactic acid). *Macromolecules*, 36, 1215–1221, 2003.

- [161] CAI, K.; YAO, K.; HOU, X.; WANG, Y.; HOU, Y.; YANG, Z.; Improvement of the functions of osteoblasts seeded on modified poly(d,l-lactic acid) with poly(aspartic acid). *J Biomed Mater Re*, 62, 283–291, 2002.
- [162] IRVINE, D.J.; RUZETTE, A.G.; MAYES, A.M.; GRIFFITH, L.G.; Nanoscale clustering of RGD peptides at surfaces using comb polymers. 2. Surface segregation of comb polymers in polylactide. *Biomacromolecules*, 2, 545–556, 2001.
- [163] KISS, É.; BERTÓTI, I.; VARGHA-BUTLER, E.I.; XPS and wettability characterization of modified poly(lactic acid) and poly(lactic/glycolic acid) films. *J Colloid Interface Sci*, 245, 91–98, 2002.
- [164] YU, G.; JI, J. ZHU, H. SHEN, J. Poly(d,l-lactic acid)-block-(ligand-tethered poly(ethylene glycol)) copolymers as surface additives for promoting chondrocyte attachment and growth. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 76B, 64–75, 2006.
- [165] HALL, J.R.; WESTERDAHL, C.A.L.; DEVINE, A.T.; BODNAR, M.J. Activated gas plasma surface treatment of polymers for adhesive bonding. *J Appl Polym Sci*, 13, 2085–2096, 1969.
- [166] WANNG, C.X.; REN, Y.; QIU, Y.P. Penetration depth of atmospheric pressure plasma surface modification into multiple layers of polyester fabrics. *Surf Coat Technol*, 202, 77–83, 2007.
- [167] HIROTSU, T.; NAKAYAMA, K.; TSUJISAKA, T.; MAS, A.; SCHUE, F. Plasma surface treatments of melt-extruded sheets of poly(l-lactic acid). *Polym Eng Sci*, 42, 299–306, 2002.
- [168] YANG, J.; SHI, G.X.; WANG, C.G.; BEI, J.Z.; CAO, Y.L.; SHANG, Q.; YANG, G.; WANG, W. Fabrication and surface modification of macroporous poly(l-lactic acid) and poly(l-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. *J Biomed Mater Res*, 62, 438–446, 2002.
- [169] YANG, J.; BEI, J.Z.; WANG, S.G.; Enhanced cell affinity of poly(d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. *Biomaterials*, 23, 2607–2614, 2002.
- [170] KHORASANI, M.T.; MIRZADEH, H.; IRANI, S. Plasma surface modification of poly(l-lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) films for improvement of nerve cells adhesion. *RadPhys Chem*, 77, 280–287, 2008.

- [171] XIMING, X.; GENGENBACH, T.R.; GRIESSER, H.J.; Changes in wettability with time of plasma modified perfluorinated polymers. *J Adhes Sci Technol*, 6, 1411–1431, 1992.
- [172] OCCHIELLO, E.; MORRA, M.; MORINI, G.; GARBASSI, F.; HUMPHREY, P. Oxygenplasma-treated polypropylene interfaces with air, water, and epoxy resins. Part I. Air and water. *J Appl Polym Sci*, 42, 551–559, 1991.
- [173] SAFINIA, L.; DATAN N.; HÖHSE, M.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. Towards a methodology for the effective surface modification of porous polymer scaffolds. *Biomaterials*, 26, 7537–7547, 2005.
- [174] WAN, Y.; TU, C.; YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. Influences of ammonia plasma treatment on modifying depth and degradation of poly(l-lactide) scaffolds. *Biomaterials*, 27, 2699–2704, 2006.
- [175] CONRADS, H.; SCHMIDT, M. Plasma Generation and plasma sources. *Plasma Sources Science & Technology*, v. 9, ed. 4, p. 441-454, 2000.
- [176] THEERAKARUNWONG, C.; TUNMA, S.; BOONYANAWAN, D.; Plasma assisted immobilization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles onto PLA surface to promote the antimicrobial activity. *Chiang Mai Journal of Science*, 41, ed. 5.2, p. 1361-1374, 2014.
- [177] SCHOLTZ, J.S.; FONTANA, L.C.; MEZARоба, M. Asymmetric Bipolar Plasma Power Supply to Increase the Secondary Electrons Emission in Capacitive Coupling Plasmas, *IEEE Transactions on Plasma Science* 46, 2999–3007, 2018.
- [178] TRUFFAULT, L.; MAGNANI, P.; HAMMER, P.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S.H. Structural and optical features of ureasiloxane–polyethylene oxide hybrids containing CeO<sub>2</sub> nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 471, p. 73-80, 2015.
- [179] POLEZHAEVA, O.-S.; YAROSHINSKAYA, N.V.; IVANOV, V.-K. Synthesis of nanosized ceria with controlled particle sizes and bandgap widths. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, v. 52, p. 1184–1188, 2007.
- [180] NEDELJKOVIC, J.M.; PATEL, R.-C.; KAUFMAN, P.; JOYCE-PRUDEN, C.; O'LEARY, N. Synthesis and optical properties of quantum-size metal sulfide particles in aqueous solution. *Journal of Chemical Education*, v.70, p. 342–345, 1993.
- [181] BRUS, L. Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory, *Journal of Physical Chemistry*, v. 90, p. 2555–2560, 1986.

- [182] HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J. T.; LAM, C. X. F.; TAN, K. C.; LIM, T. C. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v. 1, p. 245–60, 2007.
- [183] CLARK, P. Cell behaviour on micropatterned surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 657-661, 1994.
- [184] BURG, K. J. L. et al. Parameters affecting cellular adhesion to polylactide films. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 10, n. 2, p. 147– 161, Jan. 1999.
- [185] BARAN, E.; ERBIL, H. Surface Modification of 3D Printed PLA Objects by Fused Deposition Modeling: A Review. *Colloids and Interfaces*, v. 3, n. 2, p. 43, 29 Mar. 2019.
- [186] ZHOU, H.; LAWRENCE, J. G.; BHADURI, S. B. Fabrication aspects of PLACaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: A review. *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 6, p. 1999–2016, Jul. 2012.
- [187] ARNOLDI, M.; FRITZ, M.; BAUERLEIN, E.; RADMACHER, M.; SACKMANN, E.; BOULBITCH, A. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys. Rev. E* , 62, 1034–1044, 2000.
- [188] Charras, G.T.; Lehenkari, P.P.; Horton, M.A. Atomic force microscopy can be used to mechanically stimulate osteoblasts and evaluate cellular strain distributions. *Ultramicroscopy* 2001, 86, 85–95.
- [189] FOTIADIS, D.; SCHEURING, S.; MÜLLER, S.A.; ENGEL, A.; MÜLLER, D.J. Imaging and manipulation of biological structures with afm. *Micron*, 33, 385–397, 2002.
- [190] WANG, Y.; XU, C.; JIANG, N.; ZHENG, L.; ZENG, J.; QIU, C.; YANG, H.; XIE, S. Quantitative Analysis of the Cell-Surface Roughness and Viscoelasticity for Breast Cancer Cells Discrimination Using Atomic Force Microscopy. *Scanning*, 9999, 1–6, 2016.
- [191] MARRESE, M.; GUARINO, V.; AMBROSIO, L. Atomic Force Microscopy: A Powerful Tool to Address Scaffold Design in Tissue Engineering. *J. Funct. Biomater*, 8, 7,. 2017.
- [192] IGLIC, A.; GONGADZE.; KABASO, D.; BAUER; SCHMUKI, P.; SLIVNIK; VAN RIENER, U. Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface. *International Journal of Nanomedicine*, 1801, 2011.
- [193] SOLAR, P.; KYLIÁN, O.; MAREK, A.; VANDROVCOVÁ, M.; BACÁKOVÁ, L.; HANUS, J.; BIEDERMAN, H. Particles induced surface nanoroughness of titanium

surface and its influence on adhesion of osteoblast-like MG-63 cells. *Applied Surface Science*, 324, 99–105, 2015.

[194] SEGUNDO, E.H.; FONTANA, L.C.; RECCO, A.A.C.; SCHOLTZ, J.S.; NESPOLO VOMSTEIN, M.A.; BECKER, D.. Graphene nanosheets obtained through graphite powder exfoliation in pulsed 39 underwater electrical discharge, *Mater Chem Phys*, 217, 1–4, 2018.