

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
Instituto de Ciência e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais

Ana Paula Nogueira Alves

***SCAFFOLDS DE β -TCP/S53P4 OBTIDOS POR IMPRESSÃO
3D: IMPREGNAÇÃO COM ÓLEO DE MELALEUCA E
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS***

São José dos Campos

2021

Ana Paula Nogueira Alves

**SCAFFOLDS DE β -TCP/S53P4 OBTIDOS POR IMPRESSÃO 3D:
IMPREGNAÇÃO COM ÓLEO DE MELALEUCA E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, da Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
Campus São José dos Campos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliandra de Sousa Trichês

São José dos Campos

2021

Alves, Ana Paula Nogueira

Scaffolds de β -TCP/S53P4 obtidos por impressão 3D: impregnação com óleo de melaleuca e avaliação das propriedades biológicas. Ana Paula Nogueira Alves – São José dos Campos, 2021.

xx, 98 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Instituto de Ciência e Tecnologia. Programa de Pós-graduação em Ciências e Engenharia de Materiais.

Título em inglês: β -TCP/S53P4 scaffolds obtained by 3D printing: impregnation with tea tree oil and evaluation of biological properties.

1. β -TCP 2. S53P4 3. *Scaffolds* 4. *Robocasting* 5. Óleo de melaleuca 6. Atividade antibacteriana

Ana Paula Nogueira Alves

**SCAFFOLDS DE β -TCP/S53P4 OBTIDOS POR IMPRESSÃO 3D:
IMPREGNAÇÃO COM ÓLEO DE MELALEUCA E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
São Paulo como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre (a) em Ciências.

Área de Concentração: Engenharia e Ciência de
Materiais

Aprovada em 26 de agosto de 2021.

Presidente da Banca:



Prof.(a) Dr.(a) Eliandra de Sousa Trichês

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a). Ana Paula Fonseca Albers

Prof(a). Dr(a). Dayane Batista Tada

Prof(a). Dr(a). Jorge Vicente Lopes da Silva

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida e por ser meu guia em toda essa jornada. À Nossa Senhora por ser sempre mãe e refúgio nos momentos de dificuldade.

Aos meus familiares, de maneira especial aos meus pais, Doroteia e Leonildo, por sempre me incentivarem e apoiarem ao longo do meu desenvolvimento pessoal e acadêmico, por serem meu porto seguro e meu refúgio em todos os momentos.

Aos meus amigos todos, em especial Amanda e Thales, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Eliandra de Sousa Trichês, por toda paciência, ensinamentos e confiança desde os tempos de iniciação científica.

Aos membros e amigos do Laboratório de Biocerâmicas - BIOCERAM, por toda amizade, companheirismo e ajuda ao longo do desenvolvimento do projeto, de maneira especial àqueles que estiveram me acompanhando mais de perto e sempre tinham uma palavra de conforto: Lílian, Márcia, Verônica, Lucas e Rodrigo.

Aos integrantes do Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos - VITROCER da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) onde desenvolvi a etapa inicial do projeto, em especial Elizangêla Guzi, Igor Maia e o Prof. Dr. Antônio Pedro Novaes.

Aos integrantes do Instituto de Biomateriais da *Friedrich-Alexander-Universität* (FAU) em Erlangen, Alemanha, onde desenvolvi meu estágio e parte dos resultados apresentados nesse trabalho. Agradeço de maneira especial, a doutoranda Marcela Arango Ospina e ao Prof. Dr. Aldo Roberto Boccaccini, pela supervisão e auxílio nas etapas do projeto. Agradeço, também, aos amigos que fiz na Alemanha por todo companheirismo, em especial Guilherme, Ana Cláudia e Johana.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais da UNIFESP, por proporcionar o curso de mestrado. E ao NAPCEM-UNIFESP e todos os técnicos que colaboraram com as análises desenvolvidas.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa concedida tanto para o desenvolvimento do projeto no país (Processo FAPESP: 2019/08141-9), quanto pela bolsa de estágio em pesquisa no exterior - BEPE (Processo FAPESP: 2020/12944-7).

Resumo

O tratamento de problemas ósseos é sempre um ponto importante abordado na engenharia tecidual. Por meio do desenvolvimento de *scaffolds*, busca-se sanar os danos causados por doenças e traumas. Biocerâmicas a base de fosfato de cálcio e vidros bioativos são boas alternativas na produção de *scaffolds*, devido às boas propriedades biológicas e alta biocompatibilidade. Dentre as principais biocerâmicas se destacam o β -fosfato tricálcico (β -TCP) e o vidro bioativo S53P4, pela semelhança mineralógica com o tecido ósseo e alta biocompatibilidade já demonstrados na literatura. Dentre os diversos métodos de fabricação dos *scaffolds*, a técnica de impressão 3D destaca-se devido à possibilidade de obtenção de geometrias personalizadas. Para isso, é necessário que a pasta a ser extrudada tenha suas propriedades reológicas otimizadas. Além da necessidade do desenvolvimento de biomateriais capazes de regenerar o tecido ósseo, é preocupação da engenharia tecidual o tratamento de infecções provenientes de doenças, como a osteomielite, ou procedimentos cirúrgicos. Deste modo, muito se tem estudado acerca da obtenção de *scaffolds* multifuncionais a partir do revestimento com óleos essenciais. Dentre os diversos óleos essenciais existentes, o óleo de melaleuca (do inglês, *Tea Tree Oil* - TTO) é de grande interesse devido sua propriedade antibacteriana. A associação das boas propriedades de *scaffolds* a base de fosfato de cálcio e vidros bioativos com revestimento de óleo essencial é uma alternativa interessante ao tratamento de problemas ósseos. Deste modo, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de *scaffolds* de β -TCP/S53P4 pelo método de impressão 3D e seu revestimento com TTO. Para isso foi feita a otimização das propriedades reológicas da pasta cerâmica e padronização dos parâmetros de impressão. Os *scaffolds* de β -TCP/S53P4 foram caracterizados quanto suas propriedades físico-química, mecânica e morfológica. Na sequência os *scaffolds* foram revestidos com TTO seguindo duas metodologias: solução de

etanol/TTO e gelatina/TTO nas concentrações de 5, 10 e 15% de TTO (% - v/v). Os resultados mostraram que o revestimento com etanol deixa a liberação do TTO mais regular de acordo com o aumento da concentração de TTO e, portanto, maior inibição a bactéria *S. aureus*. No entanto, esse grupo apresentou maior atividade citotóxica em células MG-63. O grupo revestido com gelatina apresentou maior controle na liberação do TTO, devido à formação da camada polimérica pela gelatina, que atuou como barreira de controle à liberação do óleo. Dessa forma, este grupo apresentou baixa citotoxicidade às células e inibiu a formação de colônias de *S. aureus*. De maneira geral, pode-se concluir que o revestimento com gelatina apresentou resultados mais satisfatórios em termos de atividade biológica *in vitro* e antibacteriana. Os resultados obtidos nesse trabalho trazem uma nova alternativa à engenharia tecidual no que tange problemas relacionados às infecções ósseas.

Palavras-chaves: β -TCP, S53P4, *scaffolds*, impressão 3D, óleo de melaleuca, atividade antibacteriana.

Abstract

The treatment of bone problems is always an important concern in tissue engineering. Through the development of scaffolds, it pursues to remedy the damage caused by diseases and traumas. Bioceramics based on β -tricalcium phosphate and bioglass are good alternatives on scaffolds production, due to their good biological properties and high biocompatibility. Among the main bioceramics, β -tricalcium phosphate (β -TCP) and S53P4 bioactive glass stand out, due to their mineralogical similarity with bone tissue and high biocompatibility already demonstrated in the literature. Among the various methods of manufacturing scaffolds, the 3D printing technique stands out due to the possibility of obtaining custom geometries. In this case, it is necessary that the paste to be extruded has its rheological properties optimized. In addition to the need to develop biomaterials capable of regenerating bone tissue, tissue engineering is concerned with treating infections from diseases such as osteomyelitis or surgical procedures. Thus, much has been studied about obtaining multifunctional scaffolds from coating with essential oils. Among the many existing essential oils, tea tree oil (TTO) is of great interest due to its good antibacterial properties. The association of the good properties of scaffolds based on bioceramics with an essential oil coating is an interesting alternative for the treatment of bone problems. Thus, this work aimed to develop scaffolds of β -TCP/S53P4 by the 3D printing method and their coating with tea tree oil. To reach this goal, the rheological properties of the ceramic paste were optimized and the printing parameters standardized. The scaffolds were characterized for their physical and morphological properties. Afterwards, the scaffolds were coated with tea tree oil following two methodologies: using a solution of ethanol/TTO and gelatin/TTO at concentrations of 5, 10 and 15% (% - v/v) of TTO. The results showed that coating with ethanol makes the release of TTO more regular according to the increase in the concentration placed and, therefore, greater inhibition of the *S. aureus* bacteria. However, this coating group showed greater

cytotoxic activity on MG-63 cells. The group coated with gelatin showed greater control in the release of TTO, due to the formation of the polymeric layer by gelatin, which acted as a control barrier to the release of oil. Thus, this group showed low cytotoxicity to cells and inhibited the formation of *S. aureus* colonies. In general, it can be concluded that the gelatin coating showed more satisfactory results in terms of biological and antibacterial activity. The results obtained in this work bring a new alternative to tissue engineering in the treatment of bone problems.

Keywords: β -TCP, S53P4, scaffolds, 3D printing, tea tree oil, antibacterial activity.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Estrutura do tecido ósseo e escala de grandeza. Adaptado de WANG; YEUNG, 2017.	4
Figura 2: Sistema composicional do sistema SiO ₂ -CaO-Na ₂ O-6%P ₂ O ₅ . Em destaque a região E, onde se encontra o S53P4. Adaptado de HULSEN et al., 2016.	12
Figura 3: <i>Scaffolds</i> de β-TCP obtidos por diferentes técnicas: a) réplica da esponja polimérica e b) manufatura aditiva – impressão 3D. <i>Scaffolds</i> desenvolvidos no Laboratório de Biocerâmicas – BIOCERAM.	16
Figura 4: <i>Melaleuca alternifolia</i> : a) planta e suas folhas e b) flores. Adaptado de MOREIRA, 2010.	21
Figura 5: Principais componentes do óleo de melaleuca. Adaptado de MOREIRA, 2010.	22
Figura 6: Fluxograma geral das principais etapas realizadas nesse trabalho.	23
Figura 7: Curvas de distribuição granulométrica dos pós de β-TCP e S53P4 após seus respectivos processos de moagem.	35
Figura 8: Comportamento da viscosidade e tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento: a) pasta de β-TCP e b) pasta de β-TCP/S53P4.	37
Figura 9: Análises em regime oscilatório: a) pastas de β-TCP e b) pastas de β-TCP/S53P4.	38
Figura 10: Curvas de dilatométrica óptica para os pós de β-TCP e S53P4.	40
Figura 11: Difractogramas de raios-X dos pós de β-TCP e S53P4 e dos <i>scaffolds</i> de β-TCP/S53P4: β - β-TCP (JCPDS 09-0169); α - α-TCP (JCPDS 09-0348); * - CaSiO ₃ (JCPDS 027-088); δ - Na _{15.78} Ca ₃ (SiO ₁₂) (JCPDS 01-078-1650); # - NaCaPO ₄ (JCPDS 029-1193).	41
Figura 12: Espectro de FT-IR dos pós de β-TCP e S53P4 e do <i>scaffold</i> de β-TCP/S53P4.	42
Figura 13: Imagens de MEV dos <i>scaffolds</i> de β-TCP/S53P4: a) superfície superior, b) estrutura da seção transversal, c) detalhes do filamento e d) superfície do filamento.	45
Figura 14: Superfície dos filamentos dos <i>scaffolds</i> de β-TCP/S53P4 com e sem revestimento de TTO: a) <i>scaffold</i> sem revestimento, b) EtOH/TTO-5, c) EtOH/TTO-10, d) EtOH/TTO-15, e) Gel/TTO-0, f) Gel/TTO-5, g) Gel/TTO-10 e h) Gel/TTO-15.	47
Figura 15: Molhabilidade por ângulo de contato para os <i>scaffolds</i> de β-TCP/S53P4 revestidos com TTO.	48

Figura 16: Ensaio de liberação para os <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO: a) etanol e b) gelatina.....	50
Figura 17: Difrátogramas de raios-X para os <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 após imersão em SBF: a) Sem revestimento, b) Gel/TTO-0, c) EtOH/TTO-5, d) EtOH/TTO-10, e) EtOH/TTO-15, f) Gel/TTO-5, g) Gel/TTO-10 e h) Gel/TTO-15.	52
Figura 18: Viabilidade celular pelo método indireto dos <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO após 1 e 3 dias de incubação: a) 1 mg/mL e b) 10 mg/mL (* $p < 0.05$ em comparação com o <i>scaffolds</i> sem revestimento).	53
Figura 19: Estudos com célula MG-63 pelo método direto: a) viabilidade por ensaio metabólico WST-8 (* $p < 0.05$ em comparação com o <i>scaffolds</i> sem revestimento) e b) viabilidade por análise de LDH (* $p < 0.05$ em comparação com o controle) dos <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO.	55
Figura 20: Imagens de microscopia de fluorescência com corantes DAPI e rondonina faloidina (barra de escala de 100 μ m) e imagens de MEV (barra de escala de 20 μ m) das células MG-63 fixadas na superfície dos <i>scaffolds</i> sem revestimento, Gel/TTO-0, EtOH/TTO-5, EtOH/TTO-10, EtOH/TTO-15, Gel/TTO-5, Gel/TTO-10 e Gel/TTO-15.	57
Figura 21: Atividade antibacteriana dos <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO após 7 e 24 horas de incubação: a) medidas de densidade óptica b) atividade metabólica da <i>S. Aureus</i> por redução de Alamar <i>blue</i> (* $p < 0.05$ em comparação com o controle).	60
Figura 22: Formação de unidades de colônia para a diluição de 10^{-13} para <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO após 24 horas de incubação: a) Formação de colônias em cada grupo, b) Controle, c) <i>scaffolds</i> sem revestimento, d) Gel/TTO-0, e) EtOH/TTO-5, f) EtOH/TTO-10, g) EtOH-15, h) Gel/TTO-5, i) Gel/TTO-10 e j) Gel/TTO-15.....	62
Figura 23: Curvas de fluxo para a pasta de β -TCP.....	69
Figura 24: Difrátograma de raios X para o <i>scaffold</i> de β -TCP ($\beta = \beta$ -TCP, JCPDS: 09-0169).	70
Figura 25: Fotografias dos <i>scaffolds</i> 3D de β -TCP por estereomicroscopia: a) aumento de 20X; b) aumento de 60X.	71
Figura 26: Micrografias de MEV dos <i>scaffolds</i> 3D de β -TCP: a) aumento de 80X; b) aumento de 120X; c) aumento de 150X.....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição e nomenclatura dos grupos de revestimento.....	29
Tabela 2: Identificação dos grupos funcionais para os pós de β -TCP e S53P4 e para o <i>scaffold</i> de β -TCP/S53P4.....	43
Tabela 3: Valores de porosidade e resistência mecânica para os <i>scaffolds</i> de β -TCP e β -TCP/S53P4.....	44

Lista de Abreviaturas e Siglas

β -TCP	β - fosfato tricálcico
α -TCP	α – fosfato tricálcico
α' -TCP	α' – fosfato tricálcico
γ -TCP	γ – fosfato tricálcico
DAPI	4', 6-diamidina-2-fenilindol
DRX	Difração de raios-X
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH/TTO-5	Etanol/óleo de melaleuca – 5%
EtOH/TTO-10	Etanol/óleo de melaleuca – 10%
EtOH/TTO-15	Etanol/óleo de melaleuca – 15%
FT IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
Gel/TTO-0	Gelatina/sem óleo de melaleuca
Gel/TTO-5	Gelatina/óleo de melaleuca – 5%
Gel/TTO-10	Gelatina/óleo de melaleuca – 10%
Gel/TTO-15	Gelatina/óleo de melaleuca – 15%
HA	Hidroxiapatita
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
LDH	Lactato desidrogenase
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>)
PEG	Polietilenoglicol

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SBF	Fluido corpóreo simulado (do inglês, <i>Simulated body fluid</i>)
TTO	Óleo de melaleuca (do inglês, <i>Tea Tree Oil</i>)

Lista de Símbolos

D_{90}	Diâmetro de 90% das partículas
P	Porcentagem de porosidade
ρ_{scaffold}	Densidade geométrica do <i>scaffold</i>
$\rho_{\beta\text{-TCP}}$	Densidade teórica do β – fosfato tricálcico
ρ_{S53P4}	Densidade teórica do S53P4
τ	Tensão de cisalhamento
γ	Taxa de cisalhamento
τ_y	Tensão de escoamento
K	Parâmetro de viscosidade
n	Expoente de pseudoplasticidade
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda
I	Porcentagem de injetabilidade

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Engenharia tecidual óssea.....	3
2.2. Biomateriais	7
2.3. <i>Scaffolds</i>	13
2.4. <i>Scaffolds multifuncionais</i>	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Síntese e moagem dos pós cerâmicos de β -TCP e S53P4.....	23
3.2. Preparação das pastas cerâmicas.....	24
3.3. Estudo reológico da pasta cerâmica.....	25
3.4. Otimização do ciclo térmico	25
3.5. Produção dos <i>scaffolds</i> via impressão 3D.....	26
3.6. Caracterização dos pós cerâmicos e dos <i>scaffolds</i> de β -TCP e β -TCP/S53P4 sem revestimento	26
3.6.1. Difração a laser.....	26
3.6.2. Difração de raios X (DRX).....	26
3.6.3. Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)	27
3.6.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	27
3.6.5. Porosidade aparente e retração volumétrica	27
3.6.6. Resistência mecânica a compressão	28
3.7. Revestimento dos <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 com TTO	28
3.8. Caracterização dos <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO	29
3.8.1. Microscopia eletrônica de varredura - MEV	29
3.8.2. Determinação da molhabilidade dos <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO	30
3.8.3. Ensaio de liberação do TTO	30
3.9. Ensaio biológicos <i>in vitro</i> dos <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO.....	31
3.9.1. Biomineralização em SBF	31
3.9.2. Viabilidade celular e citotoxicidade	31
3.10. Avaliação da atividade antibacteriana dos <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO.....	33
3.11. Análises estatísticas	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

4.1.	Caracterização dos pós cerâmicos de β -TCP e S53P4.....	34
4.2.	Determinação das propriedades reológicas das pastas cerâmicas	35
4.3.	Otimização do ciclo térmico	39
4.4.	Caracterização dos <i>scaffolds</i> de β -TCP e β -TCP/S53P4 obtidos via impressão 3D	40
4.5.	Caracterização dos <i>scaffolds</i> de β -TCP e β -TCP/S53P4 revestidos com TTO	45
4.5.1.	Ensaio de liberação do TTO	49
4.6.	Ensaio biológicos <i>in vitro</i> dos <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO... 51_Toc82695647	
4.7.	Avaliação da atividade antibacteriana dos <i>scaffolds</i> de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO.....	58
5.	CONCLUSÃO.....	63
5.1.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	64
5.2.	TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESSA PESQUISA 65	
6.	APÊNDICE	66
6.1.	Apêndice I: Estudo preliminar para obtenção das pastas cerâmicas de β -TCP/alginate de sódio: otimização dos parâmetros de processo.....	66
6.1.1.	Justificativa.....	66
6.1.2.	Materiais e métodos	67
6.1.2.1.	Preparação das pastas cerâmicas	67
6.1.2.2.	Testes preliminares de impressão	67
6.1.3.	Resultados e Discussão	68
6.1.4.	Conclusão.....	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. Introdução

Na busca da resolução de problemas ósseos, a engenharia tecidual procura por meio do uso de biomateriais, maneiras de contornar os danos causados por traumas ou doenças (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015) (ABREU; GALDINO, 2017a). Dentre as diversas soluções possíveis, destaca-se o desenvolvimento de *scaffolds*. Esses substratos tridimensionais têm como função servir de apoio temporário às células e estimular a regeneração do tecido (ZHU; WAGNER, 2019).

Dentre os tipos de biomateriais que podem compor os *scaffolds* destaca-se o uso de biocerâmicas a base de fosfatos de cálcio, em especial o β -fosfato tricálcico (β -TCP) que apresenta excelente biocompatibilidade e taxa de reabsorção (PINA; REIS; OLIVEIRA, 2018). Entretanto, para sanar a limitação relacionada à temperatura de transformação da fase β -TCP para α -TCP, que pode diminuir às propriedades mecânicas do *scaffold*, tem-se estudado a associação de aditivos de sinterização a base de vidros bioativos de silicato (HE; TIAN, 2018) (HENCH, 2006). O vidro S53P4 apresenta boas propriedades biológicas e já é usado comercialmente, devido a sua excelente ação antibacteriana no tratamento de infecções e bioatividade (HULSEN et al., 2016) (VAN GESTEL et al., 2017). A associação desses dois tipos de biocerâmicas se mostra promissor ao tratamento de defeitos ósseos.

Existem diversos métodos para a produção de *scaffolds*, entretanto nos últimos anos vem se destacando os métodos baseados em manufatura aditiva (TROMBETTA et al., 2017). Esse tipo de técnica permite a obtenção de *scaffolds* com arquitetura padronizada e personalizada à necessidade do paciente (PENG; ZHANG; DING, 2018). A técnica de impressão 3D, uma das técnicas da manufatura aditiva, permite a obtenção de *scaffolds* com alta padronização de estrutura de poros por meio da extrusão de pastas (BOSE; VAHABZADEH; BANDYOPADHYAY, 2013). Para as pastas cerâmicas, se faz necessário a

otimização de alguns parâmetros para a obtenção de melhores arquiteturas, tais como: tamanho médio de partícula entre 1 e 10 μm ; boa desaglomeração das partículas; escolha do aditivo orgânico e otimização das propriedades reológicas (GALVÁN-CHACÓN et al., 2018) (PENG; ZHANG; DING, 2018). O uso da impressão 3D é considerada bastante promissora para o desenvolvimento de soluções personalizadas aos problemas ósseos.

Outra preocupação da engenharia tecidual se concentra nas infecções que ocorrem no tecido ósseo durante procedimentos cirúrgicos de reparo de danos ou outras doenças, tais como a osteomielite (FANG et al., 2021). O tratamento convencional se baseia no uso de antibióticos, entretanto sabe-se que as bactérias conseguem construir resistência a esse tipo de drogas ao longo do tempo (POLO et al., 2018). De forma a sanar esse problema, muito se tem estudado acerca da obtenção de *scaffolds* multifuncionais (POLO et al., 2018) (AMNA et al., 2021). Uma das formas já relatadas na literatura para a obtenção desses materiais é o recobrimento de *scaffolds* cerâmicos e poliméricos com óleos essenciais (UNALAN; BOCCACCINI, 2021).

Os óleos essenciais são extratos de plantas que apresentam propriedades contra diversos agentes patológicos (MAN et al., 2019). Existe uma gama de tipos de óleos e dentre esses, o óleo de melaleuca (TTO) se mostra bastante promissor ao tratamento de infecções, devido às suas boas propriedades antissépticas, antivirais, antifúngicas e antibacterianas (GALLART-MATEU et al., 2018) (GAO et al., 2020).

Com base no exposto, esse trabalho tem como objetivo principal a obtenção de *scaffolds* de β -TCP/S53P4 por meio da técnica de impressão 3D, além de impregná-los com óleo de melaleuca e avaliar suas propriedades biológicas *in vitro*.

Para atingir esse objetivo, foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- Síntese e caracterização dos pós de β -TCP e S53P4;
- Otimização do preparo e das propriedades reológicas das pastas de β -TCP/S53P4;
- Otimização dos parâmetros de impressão;
- Obtenção e caracterização físico-química, morfológica e mecânica dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4;
- Impregnação do óleo de melaleuca nos *scaffolds* de β -TCP/S53P4;
- Avaliação da resposta biológica *in vitro* e atividade antibacteriana dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com óleo de melaleuca.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Engenharia tecidual óssea

Acidentes, traumas, envelhecimento e fatores genéticos estão entre as causas mais recorrentes das enfermidades ósseas (BOSE; SARKAR, 2020). O investimento nessa área é alto e a tendência é sempre de aumento ano após ano (BOSE; SARKAR, 2020). Na busca por soluções mais eficientes e que visem à melhora na qualidade de vida da população, a engenharia tecidual vem ganhando cada vez mais espaço nas pesquisas.

Segundo Langer e Vacanti (1993), a engenharia tecidual pode ser definida como

--- “*um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido*” (LANGER; VACANTI, 1993).

Pautada nesse objetivo a engenharia tecidual óssea busca, por meio do desenvolvimento de materiais de estrutura específica e otimizada (*scaffolds*), a regeneração e

recuperação do tecido lesionado (BOSE; SARKAR, 2020) (VACANTI; VACANTI, 2013) (LANGER; VACANTI, 2016).

O tecido ósseo é composto de colágeno tipo I e fosfatos de cálcio na forma de hidroxiapatita (HA) na proporção aproximada de 30% e 70%, respectivamente (YAO et al., 2020) (PERIĆ KAČAREVIĆ et al., 2020) (DUNSTAN et al., 2007). A Figura 1 abaixo apresenta a estrutura hierárquica do tecido ósseo.

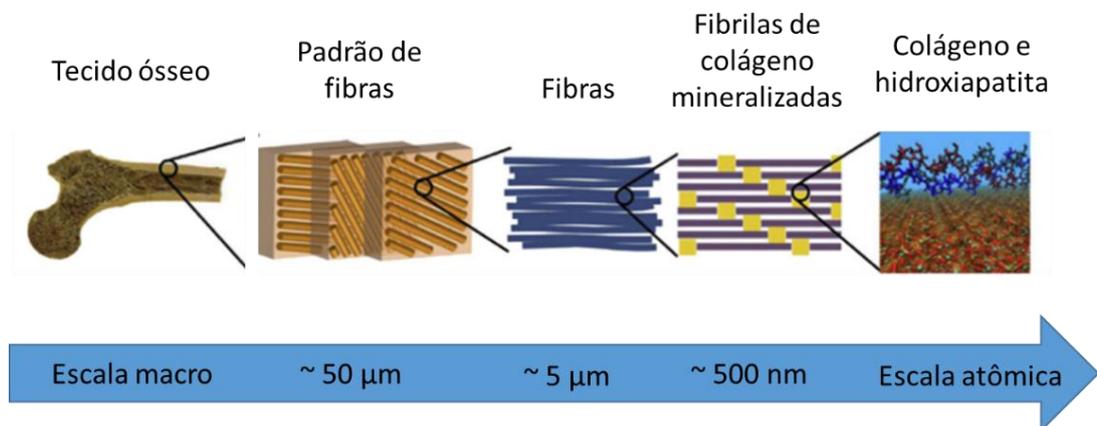


Figura 1: Estrutura do tecido ósseo e escala de grandeza. Adaptado de WANG; YEUNG, 2017.

Existem dois tipos de ossos, que se diferenciam pela sua arquitetura em nível macroscópico: o trabecular, que possui entre 30 e 90% de porosidade e resistência mecânica variando entre 2 e 12 MPa e o cortical, um osso mais denso, que apresenta de 5 a 30% de porosidade e resistência mecânica de 100 a 230 MPa (PERIĆ KAČAREVIĆ et al., 2020). A regulação do metabolismo, formação e remodelagem de ambos os tipos de ossos ficam a cargo, principalmente, dos dois tipos de células presentes: os osteoblastos e os osteoclastos (YAO et al., 2020). Os osteoblastos são responsáveis pela formação do novo tecido, enquanto

os osteoclastos atuam na reabsorção óssea (PERIĆ KAČAREVIĆ et al., 2020) (DUNSTAN et al., 2007).

Tanto a dureza quanto a resistência mecânica, características do tecido ósseo, são definidas na organização de sua estrutura em escala nanométrica por meio do processo de biomineralização (PERIĆ KAČAREVIĆ et al., 2020) (DUNSTAN et al., 2007). Tal processo consiste na deposição de cristais de HA pelos osteoblastos em vazios da estrutura óssea. Um tecido mais biomineralizado é certamente mais rígido e, conseqüentemente, mais frágil, resultando em maior propensão a fraturas (PERIĆ KAČAREVIĆ et al., 2020). Nesse aspecto, os mecanismos de regulação da presença de cálcio são essenciais para reverter uma possível tendência a fratura (PERIĆ KAČAREVIĆ et al., 2020) (FONSECA et al., 2014) (DUNSTAN et al., 2007).

Modelagem e remodelagem são mecanismos de regulação que acontecem dinamicamente, sendo responsáveis pela recuperação do osso mediante a uma fratura ou enfermidade (PERIĆ KAČAREVIĆ et al., 2020) (WANG; YEUNG, 2017). Enquanto a modelagem ocorre sem um processo prévio de reabsorção, a remodelagem acontece após esse evento (WANG; YEUNG, 2017). O processo de modelagem tem início na infância e segue até a idade adulta, tendo a função de definir tamanho e forma de osso, além de conferir resistência a esforços de flexão que surgem ao longo do tempo (WANG; YEUNG, 2017). A remodelagem óssea é uma etapa contínua ao longo da vida, atuando na manutenção das funções ósseas e substituindo o tecido danificado por um novo (WANG; YEUNG, 2017). Estima-se que, ao ano, uma pessoa tenha cerca de 25% do osso trabecular e 3% do cortical removidos e substituídos para a manutenção de suas funções (WANG; YEUNG, 2017).

O reparo do tecido ósseo ocorre em duas etapas. A primária ou direta acontece quando o tamanho da fratura é estável e menor que 0,1 mm (WANG; YEUNG, 2017). A formação do

novo tecido ocorre sem a necessidade de tecidos cartilagosos e conjuntivos (WANG; YEUNG, 2017). A etapa secundária ou indireta, por sua vez, é mais comum e ocorre com fraturas maiores que a etapa primária (WANG; YEUNG, 2017). Nesse caso, processos de coagulação do sangue, respostas inflamatórias e outros acontecem para auxiliar na recuperação do tecido (WANG; YEUNG, 2017). Mesmo com a ação de todos esses mecanismos e processos, grandes lesões podem não ser passíveis de recuperação sem uma interferência externa e daí surge à necessidade dos enxertos (BOSE; VAHABZADEH; BANDYOPADHYAY, 2013) (WANG; YEUNG, 2017).

Ao atingir uma dada proporção onde os mecanismos de recuperação não são capazes de lidar com a regeneração do tecido, quando a perda de massa óssea atinge o dobro do diâmetro do osso lesionado, o defeito passa a ser tratado como um “defeito ósseo de tamanho crítico” (SELA; BAB, 2012) (WANG; YEUNG, 2017) (PERIĆ KAČAREVIĆ et al., 2020). Diversas podem ser as causas desses defeitos como: doenças ósseas, cirurgias de correção e problemas de desenvolvimento (WANG; YEUNG, 2017) (PERIĆ KAČAREVIĆ et al., 2020). Nesses casos, existe a necessidade de uma intervenção médica e do uso de aparatos de suporte na recuperação do tecido lesionado.

O autoenxerto é tido como “padrão ouro” para a solução desse tipo de problema por ser altamente compatível e possuir superfície recoberta de células que estimulam a osseointegração, ou seja, a junção com o tecido no ambiente ao redor (BOSE; SARKAR, 2020)(BOYAN et al., 2011). Entretanto, por ser extraído do próprio paciente, o uso de autoenxerto requer mais de um procedimento cirúrgico, resultando em aumento do custo do tratamento, riscos de infecções e dores ao paciente (BOSE; SARKAR, 2020)(BOYAN et al., 2011). Outro problema associado ao autoenxerto é a sua baixa disponibilidade em muitos casos (BOYAN et al., 2011).

O aloenxerto é uma outra opção utilizada na busca do tratamento de defeitos ósseos (BOSE; SARKAR, 2020). Derivado de um outro doador, normalmente pode ser aplicado em regiões de defeitos maiores e possui alta disponibilidade quando comparado ao autoenxerto (BOSE; SARKAR, 2020) (BOYAN et al., 2011). No entanto, por ser extraído de outro indivíduo, é frequente a ocorrência de infecções e rejeições do organismo do paciente (BOYAN et al., 2011). Nos casos de sucesso, futuras cirurgias de correção são necessárias levando a um aumento nos riscos e custos do procedimento (BOSE; SARKAR, 2020) (BOYAN et al., 2011).

Outras opções disponíveis são os xenoenxertos (aqueles cuja extração vem de um indivíduo de outra espécie) (BOYAN et al., 2011) e tratamento com uso de drogas que auxiliam na regulação do metabolismo ósseo (YAO et al., 2020), cuja eficácia pode não ser totalmente satisfatória.

Tendo em vista maximizar a eficácia de metodologias já adotadas e reduzir seus possíveis efeitos adversos há a necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos (YAO et al., 2020). Nesse contexto, a engenharia tecidual óssea busca projetar soluções, utilizando materiais com características específicas e que possam reverter os danos causados por enfermidades ósseas e garantir maior qualidade de vida à população (LANGER; VACANTI, 1993) (BOSE; SARKAR, 2020).

2.2. Biomateriais

O uso de aparatos para reparação de danos ao organismo não é atual, há registros que desde 2000 AC, no Egito Antigo, suturas feitas de ouro e linho eram utilizadas em pequenas operações (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015) (RATNER et al., 2013). Já os Maias

utilizavam conchas para substituição de dentes em 600 DC (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015) (RATNER et al., 2013) e possivelmente alcançaram a osteointegração desse material (RATNER et al., 2013), ou seja, o implante se difundiu de tamanha forma no tecido que não pode ser separado dele sem ocasionar fratura (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018). Apesar desses apontamentos antigos, o interesse e desenvolvimento de biomateriais ganhou força a partir do século passado (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015) (RATNER et al., 2013).

Estudos iniciais buscavam a obtenção de materiais que pudessem substituir um determinado tecido lesionado, sem que houvesse grande interação e funcionalidade do material (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Com o avanço das pesquisas ao longo do tempo, foi deixado para trás o foco apenas no material em si e na sua inércia e iniciou-se uma busca por interação entre esse e o organismo. Dessa forma, o material ganharia funcionalidade a partir de sua ação biológica no tecido, estimulando sua regeneração (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015) (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018). Assim características como biocompatibilidade, a habilidade de provocar uma resposta apropriada considerando uma aplicação específica, sem efeitos negativos ao tecido hospedeiro (RATNER et al., 2013) (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018) (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012), e bioatividade, que se refere a capacidade de cumprir uma função específica através de pré-requisitos físicos, químicos, mecânicos e biológicos do sistema hospedeiro (WILLIAMS, 2009), tornaram-se propriedades essenciais no desenvolvimento dessa classe de materiais. Hoje em dia, diversos biomateriais são produzidos e podem ser poliméricos, metálicos, cerâmicos ou compósitos e ter capacidade bioativa, biorreabsorvível, biodegradável ou mesmo quase inerte (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018).

Diversas definições foram dadas ao termo “biomaterial” até que Willians (2009) chegou a uma definição bastante aceita atualmente, onde se consta que:

--- *“um biomaterial é uma substância que foi desenvolvida para uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, por controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em medicina humana ou veterinária”* (WILLIAMS, 2009) (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018).

O avanço do desenvolvimento na área de biomateriais trouxe também movimentações consideráveis no mercado nas últimas décadas (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). No ano de 2008 o mercado global movimentou cerca de US\$ 25,6 bilhões, onde a maior parte dessa movimentação ocorreu nos Estados Unidos (cerca de 43%) (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Em 2012 houve um crescimento que atingiu US\$ 44 bilhões e que passou por um progresso até superar os US\$ 80 bilhões em 2017 (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). No caso do mercado brasileiro, as cifras passaram de US\$ 690 milhões em 2010 para aproximadamente US\$ 1,7 bilhões em 2015, demonstrando um progresso considerável no mercado nacional (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). O maior interesse pelo desenvolvimento desse tipo de material está diretamente relacionado com o envelhecimento da população, somados aos crescentes casos de problemas ósseos (como osteoporose) e acidentes (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015) (ABREU; GALDINO, 2017b).

As biocerâmicas são comumente aplicadas em reparos ósseos. Essas podem ser classificadas em: quase inerte, aquelas que demonstram passividade no ambiente vizinho ao implante, além de serem aplicadas normalmente como suporte estrutural (zircônia e alumina); bioativas, que provocam uma resposta biológica após o contato com o tecido ósseo (cerâmicas vítreas e biovidros) e reabsorvíveis, que são caracterizadas por sofrerem absorção gradual do corpo, sendo importante que essa taxa de absorção seja semelhante ao crescimento do tecido (fosfatos de cálcio) (MALA; RUBY CELSIA, 2018) (PINA; REIS; OLIVEIRA, 2018). Como exemplo das biocerâmicas mais utilizadas, destacam-se a apatita sintética, minerais de fosfatos de cálcio, biovidros e vitrocerâmicas (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY; 2013)

(MALA; RUBY CELSIA, 2018) (PINA; REIS; OLIVEIRA, 2018) (KHANG; KIM; LEE, 2007).

Os fosfatos tricálcicos (TCP) $[Ca_3(PO_4)_2]$ são frequentemente utilizados em tratamentos ósseos por apresentarem alta biocompatibilidade, serem reabsorvíveis e estimularem a osteocondução (MALA; RUBY CELSIA, 2018) (PINA; REIS; OLIVEIRA, 2018). Outra propriedade interessante dos fosfatos tricálcicos é a sua razão Ca/P, que define características importantes dos fosfatos de cálcio tais como sua taxa de degradação (RATNER et al., 2013) (CHAAIR; LABJAR; BRITEL, 2017). Quanto menor o valor da razão, maior a taxa que o material é degradado pelo organismo (RATNER et al., 2013) (CHAAIR; LABJAR; BRITEL, 2017). No caso do TCP essa razão é de 1,5, enquanto que na hidroxiapatita é de 1,67, ou seja, o TCP é mais solúvel em meio biológico e mais facilmente degradável pelo organismo (RATNER et al., 2013) (CHAAIR; LABJAR; BRITEL, 2017). A reabsorção deste material está baseada em fenômenos de produção de ácidos aliada a processos de fagocitose de partículas quando implantados *in vivo* (RATNER et al., 2013). Esses fosfatos possuem quatro fases polimórficas: β , de estrutura romboédrica, cuja estabilidade se mantém até temperaturas próximas entre 1125 e 1290 °C; α , de estrutura monoclinica e estável entre 1125 a 1430 °C; α' , que se apresenta estável apenas em altas temperaturas (acima de 1430 °C) e γ , que é difícil obtenção, apenas com pressões elevadas (RATNER et al., 2013) (CHAAIR; LABJAR; BRITEL, 2017) (RODRIGUES et al., 2012). A fase β é de grande interesse no desenvolvimento de tratamentos ósseos devido a sua alta velocidade de reabsorção, além de ser um material de fácil obtenção e altamente biocompatível (RATNER et al., 2013) (CHAAIR; LABJAR; BRITEL, 2017) (RODRIGUES et al., 2012).

Apesar de suas boas propriedades, o β -TCP apresenta uma limitação que está relacionada com sua temperatura de transformação de fase $\beta \rightarrow \alpha$ (RATNER et al., 2013)

(CHAAIR; LABJAR; BRITEL, 2017) (HE; TIAN, 2018). Quando isso ocorre há formação de defeitos no material, devido a diferença de densidade entre as fases, prejudicando as propriedades mecânicas do β -TCP (RODRIGUES et al., 2012) (HE; TIAN, 2018). Como solução para este fenômeno, pode-se utilizar aditivos de sinterização que atuam deslocando a temperatura de transformação de fase para valores maiores ou podem formar fase líquida durante o processo de sinterização. A fase líquida formada penetra e preenche os microporos formados, garantindo uma maior resistência mecânica da matriz β -TCP (HE; TIAN, 2018).

Dentre os materiais utilizados como aditivos de sinterização destacam-se os vidros bioativos de silicato que foram inicialmente estudados pelo professor Larry L. Hench, no final da década de 60 (RATNER et al., 2013) (HENCH, 2006) (MASSERA et al., 2012) (HULSEN et al., 2016). Durante seus experimentos, Hench analisou um sistema composicional de cerâmicas na tentativa de projetar composições capazes de estabelecer ligação com tecidos ósseos (RATNER et al., 2013) (HENCH, 2006) (MASSERA et al., 2012) (HULSEN et al., 2016). Os resultados de seus estudos mostram a eficácia desse tipo de material para a engenharia tecidual a partir da formação de uma camada de hidroxiapatita (HA) após algum tempo depois da sua ligação com o tecido a ser regenerado (RATNER et al., 2013) (HENCH, 2006) (MASSERA et al., 2012) (HULSEN et al., 2016).

O Bioglass® 45S5 (45% SiO₂, 24,5% CaO, 24,5% Na₂O e 6% P₂O₅ (% - em massa)), tornou-se uma das composições mais utilizadas devido à facilidade na sua preparação e excelente resposta bioativa (HENCH; ETHRIDGE, 1985) (STROGANOVA; MIKHAILENKO; MOROZ, 2003). Entretanto, outras formulações de vidro bioativos são investigadas. No final da década de 80, na Finlândia, uma outra composição foi fortemente estudada com o intuito de conhecer novos materiais bioativos, sendo chamado de vidro bioativo S53P4 (BAINO, 2019). O biovidro S53P4 (53% de SiO₂, 23% de Na₂O, 20% de CaO e 4% de P₂O₅ - % em massa) (MASSERA et al., 2012) (VAN GESTEL et al., 2017),

fabricado comercialmente como BonAlive® (HULSEN et al., 2016) (BAINO, 2019), tem se mostrado um material bastante promissor, devido a possibilidade do seu uso clínico, efeito antibacteriano, alta taxa de osteoindução (HULSEN et al., 2016) (BAINO, 2019) e na substituição de enxertos ósseos convencionais (VAN GESTEL et al., 2017).

A Figura 2 abaixo mostra o diagrama composicional do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-6\%P}_2\text{O}_5$ estudado pelo professor Hench. O biovidro S53P4 se encontram na região E, caracterizada pelas composições capazes de se ligar a tecidos moles e duros e são ativadores gênicos, o que auxilia na regeneração do tecido (HULSEN et al., 2016) (HENCH, 2006).

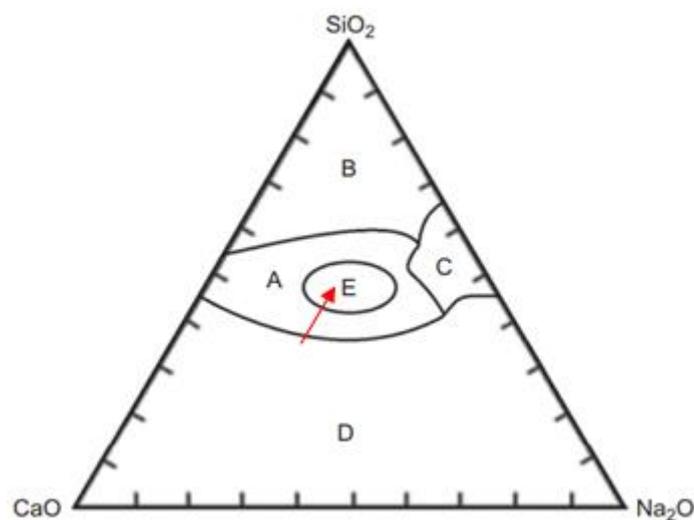


Figura 2: Sistema composicional do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-6\%P}_2\text{O}_5$. Em destaque a região E, onde se encontra o S53P4. Adaptado de HULSEN et al., 2016.

Estudos apontam os bons resultados do S53P4 no tratamento de problemas ósseos (HULSEN et al., 2016) (VAN GESTEL et al., 2017). Sua ação antibacteriana está relacionada ao aumento localizado do pH e da pressão osmótica quando entra em contato com o fluido corpóreo e se inicia um processo de liberação de íons (HULSEN et al., 2016) (VAN GESTEL et al., 2017). É esse processo o responsável pela formação de uma camada de sílica no próprio

biovidro, e essa camada, então, induz a cristalização de hidroxiapatita (HA), através da precipitação de fosfatos de cálcio (VAN GESTEL et al., 2017). Após a formação da camada de HA alguns processos subsequentes ocorrem, como a inserção de colágeno, fatores de crescimento e proteínas dentro da HA, estimulando a formação de uma estrutura integrada (HULSEN et al., 2016). Além disso, a superfície do S53P4 possui a capacidade de adsorver seletivamente proteínas, o que viabiliza a ligação com o tecido ósseo (HULSEN et al., 2016) (VAN GESTEL et al., 2017). Essa ligação formada já foi estudada e comprovada com testes *in vivo* e *in vitro* e mostram o potencial do uso desse tipo de biomaterial na engenharia tecidual (VAN GESTEL et al., 2017). O S53P4 apresenta taxa de reabsorção ligeiramente lenta (BAINO, 2019), portanto aliado ao β -TCP é possível obter, ao mesmo tempo, um material com boas propriedades mecânicas e com taxa de reabsorção adequada tornando-o viável para ser usado na engenharia tecidual.

O S53P4 é muito utilizado da forma de grânulos (HULSEN et al., 2016) (VAN GESTEL et al., 2017), no entanto para otimizar sua aplicação pode-se buscar formas de adaptar sua estrutura de maneira personalizada à necessidade do paciente, como na forma de *scaffold*. (VAN GESTEL et al., 2017) (PELTOLA; KINNUNEN; AITASALO, 2008).

2.3. Scaffolds

No caso específico de resolução de problemas ósseos, o uso de autoenxerto é conhecido como “padrão ouro” para atuar como substituto do tecido lesionado (ZHU; WAGNER, 2019), porém nem sempre esse tipo de solução está disponível. Dessa forma, uma opção interessante é a inserção de um suporte temporário produzido a partir de um biomaterial específico, que seja capaz de estimular a reparação da lesão, os chamados *scaffolds* (ZHU; WAGNER, 2019). Esse tipo de biomaterial atua como um suporte tridimensional capaz de facilitar processos de proliferação, diferenciação de células e

crescimento tecidual, além de manter boa estabilidade mecânica (ZHU; WAGNER, 2019) e estimular processos de reparação óssea (MANZANO; VALLET-REGÍ, 2012) (ZHU; WAGNER, 2019).

Para se obter bons *scaffolds* algumas características são fundamentais tais como porosidade, tamanho e interconectividade de poros, pois são esses aspectos que influenciam na facilidade de acesso das células e em interações entre elas (ZHU; WAGNER, 2019). Alta porosidade otimiza a acomodação de células bem como a vascularização, apesar de reduzir a resistência mecânica do material (RATNER et al., 2013) (MANZANO; VALLET-REGÍ, 2012). A interconectividade de poros maximiza a área superficial, que geralmente levam a maiores taxas de degradação (ZHU; WAGNER, 2019). Já o tamanho adequado de poros varia de acordo com o tipo de célula a ser cultivada; no caso de tratamento ósseo o diâmetro necessário é de no mínimo 100 μm (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY; 2013) (MARQUES et al., 2017). Além disso, a seleção do material que vai compor o *scaffold* requer uma atenção especial, pois sua taxa de reabsorção deve ser similar a taxa de crescimento do novo tecido (RATNER et al., 2013) (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY; 2013).

Scaffolds podem ser obtidos a partir de diferentes materiais (MOHANDAS et al., 2018) (JAIDEV; CHATTERJEE, 2019) (CHLANDA et al., 2019), entretanto para o tratamento ósseo é comum o uso de biocerâmicas a base de fosfato de cálcio, devido a semelhança mineralógica desses materiais com o tecido ósseo (RATNER et al., 2013) (DE SIQUEIRA et al., 2019) (MANZANO; VALLET-REGÍ, 2012), além de excelente capacidade de osteocondução (DE SIQUEIRA et al., 2019) (DENG; CHANG; WU, 2019).

A obtenção de *scaffolds* cerâmicos pode ser feita por diferentes rotas de processamento, tais como, réplica de esponjas poliméricas (SOUSA et al., 2005) (SUNG et al., 2012) (PADMANABHAN et al., 2013); método de *gelcasting* e emulsão (SOUSA et al.,

2009) (GE, Huibin et al., 2014) (DASH; SARKAR; BHATTACHARYYA, 2015) e *freeze casting* (ZUO; ZENG; JIANG, 2010) (HONG et al., 2009). Todos esses métodos são capazes de produzir *scaffolds* com boas propriedades, porém a reprodutibilidade e o personalização das propriedades do *scaffold* fica comprometida. Para sanar essas limitações, muito se tem estudado nos últimos anos sobre a manufatura aditiva (TROMBETTA et al., 2017) (CHEN et al., 2019) (PENG; ZHANG; DING, 2018). Existem diferentes formas de funcionamento desse método, sendo baseados na matéria-prima em forma de pó ou pasta, por exemplo (TROMBETTA et al., 2017) (CHEN et al., 2019), mas de maneira geral é feito inicialmente um projeto detalhado da geometria desejada em *software* computacional, seguido da impressão do material camada por camada (TROMBETTA et al., 2017) (PENG; ZHANG; DING, 2018), seja por laser seletivo, jateamento ou extrusão do material (CHEN et al., 2019) (PENG; ZHANG; DING, 2018). Essa técnica tem sido muito aplicada para tratamentos ósseos utilizando biocerâmicas devido aos bons resultados obtidos nesse tipo de aplicação (TROMBETTA et al., 2017) (PENG; ZHANG; DING, 2018). A Figura 3 mostra *scaffolds* de β -TCP obtidos por réplica da esponja polimérica (Figura 3-a) e por manufatura aditiva (utilizando impressão 3D) (Figura 3-b).

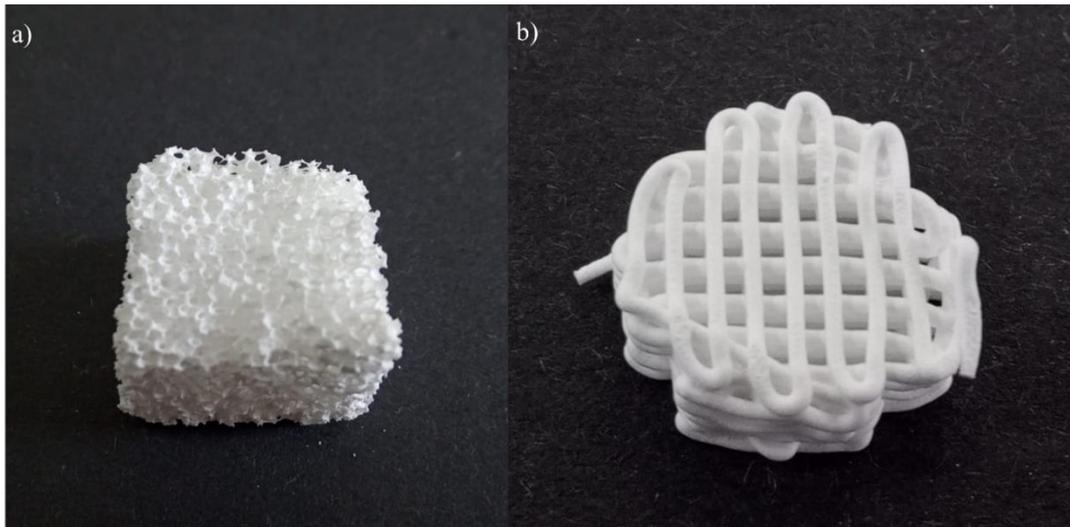


Figura 3: *Scaffolds* de β -TCP obtidos por diferentes técnicas: a) réplica da esponja polimérica e b) manufatura aditiva – impressão 3D. *Scaffolds* desenvolvidos no Laboratório de Biocerâmicas – BIOCERAM.

A impressão 3D, um dos tipos de manufatura aditiva baseados em extrusão, também conhecida como *robocasting* ou extrusão direta de pasta (do inglês *Direct Ink Writing - DIW*), tem sido amplamente estudada devido à possibilidade de se obter *scaffolds* personalizados à necessidade de cada paciente, além de possibilitar a construção de uma estrutura com porosidade interconectada, geometria e tamanho de poros adequados para cada aplicação (TROMBETTA et al., 2017) (BOSE; VAHABZADEH; BANDYOPADHYAY, 2013) (ZHANG et al., 2015) (YAN et al., 2018). Outras vantagens desse método são a produção de *scaffolds* com maior controle de propriedades físico-químicas, a partir da adequação de sua microestrutura (BOSE; VAHABZADEH; BANDYOPADHYAY, 2013) (YAN et al., 2018). Além disso, esse tipo de técnica abre possibilidades maiores para a obtenção de *scaffolds* com características adequadas para liberação controlada de fármacos e melhores interações com as células (TROMBETTA et al., 2017). A obtenção de *scaffolds* cerâmicos por impressão 3D parte de uma pasta com reologia adequada, que entra na máquina

e passa por um processo de extrusão de acordo com a geometria estipulada previamente (TROMBETTA et al., 2017) (PENG; ZHANG; DING, 2018) (ROOHANI-ESFAHANI; NEWMAN; ZREIQAT, 2016). Alguns exemplos desse método são a obtenção de implantes para o reparo de danos no crânio partindo dos dados de tomografia ou ressonância magnética do paciente (COMESAÑAA et al., 2010), da mesma forma que aparatos para cirurgias no quadril (ZHANG et al., 2015).

A adequação das propriedades dos *scaffolds* para aplicações em engenharia tecidual necessita do cuidado com alguns aspectos fundamentais: primeiramente, a pasta cerâmica precisa ter um módulo elástico (G') relativamente alto quando a tensão de cisalhamento (τ_y) for maior que 200 Pa, o que permite melhor coesão da pasta e a possibilidade de fabricar estruturas maiores (PENG; ZHANG; DING, 2018). Outro aspecto importante é o seu comportamento pseudoplástico que precisa ter um afinamento reversível com viscosidade na faixa de 10-100 Pa.s sob altas taxas de cisalhamento, o que garante a extrusão da pasta e retenção de sua forma (PENG; ZHANG; DING, 2018). Finalmente, a desaglomeração das partículas da pasta e sua estabilidade devem ser garantidas, para que não haja entupimento do bico do cabeçote da impressora e que ocorra boa interação entre o aditivo e as partículas cerâmicas para possibilitar maior fluidez do material (MARQUES et al., 2017) (PENG; ZHANG; DING, 2018).

Outros aspectos também são importantes para o bom desempenho do material aplicado a impressão 3D via extrusão direta de pasta, tais como: o tamanho de partícula situado entre 1-10 μm , que permite a obtenção de uma pasta cerâmica com maior teor de sólidos (GALVÁN-CHACÓN et al., 2018); teor de sólidos maximizado, com valor acima de 40% (%-vol), para garantir maior rigidez da peça formada (MARQUES et al., 2019); velocidade de impressão, pois pode gerar defeitos na peça quando não ajustada (TROMBETTA et al., 2017) (PENG; ZHANG; DING, 2018) (ROOHANI-ESFAHANI; NEWMAN; ZREIQAT, 2016);

diâmetro do bico de impressão (MARQUES et al., 2017) (MARQUES et al., 2019); parâmetros de secagem e sinterização, que precisam ser considerados para eliminação da fase orgânica do material e maior densificação (MARQUES et al., 2019) (BOSE et al., 2018). Outro parâmetro bastante importante é a escolha adequada do tipo e quantidade de aditivos da pasta, pois garante sua fluidez no canal de impressão e a coesão da estrutura impressa, bem como análise da injetabilidade da pasta cerâmica (TROMBETTA et al., 2017) (ZHANG et al., 2015) (ROOHANI-ESFAHANI; NEWMAN; ZREIQAT, 2016). Trombetta e colaboradores destacam que o uso de alginato como aditivo na preparação de *scaffolds* a base de fosfatos de cálcio auxilia na viabilidade e proliferação celular, devido às boas características obtidas na pasta (TROMBETTA et al., 2017). Chen e colaboradores destacaram que o uso de polietilenoglicol (PEG) evita a formação de defeitos superficiais no *scaffold* de ZrO_2 após a impressão (CHEN et al., 2019).

A obtenção de *scaffolds* a base de fosfatos de cálcio e vidro bioativos já é reportada na literatura. Miranda e colaboradores estudaram parâmetros de processamento para impressão 3D de *scaffolds* de β -TCP, partindo de uma pasta de 40% (%-vol.) de sólidos e concluíram que a maximização do teor de sólidos é necessária para aumentar a resistência mecânica do material, além de utilizar baixas velocidades de impressão (entre 10 e 30 mm/s) para evitar a criação de defeitos na morfologia do *scaffold* (MIRANDA et al., 2006). Também foi feito um amplo estudo dos parâmetros de sinterização dos *scaffolds* após a impressão, para obter bons resultados de densificação e tomar os cuidados necessários para evitar a transformação de fase β para a fase α (MIRANDA et al., 2006).

Galván-Chacón e colaboradores fizeram estudos acerca da extrusão de pastas cerâmicas a base β -TCP e biovidro 45S5, com 40% (%-vol.) de sólidos, onde foi variada a proporção entre β -TCP e 45S5 (GALVÁN-CHACÓN et al., 2018). Os resultados mostraram que a incorporação de biovidro na pasta reduz a temperatura de sinterização do material, que

pode ser feita entre 1000 e 1100 °C, pois a densificação foi conseguida por meio da formação de fase líquida de biovidro durante a sinterização (GALVÁN-CHACÓN et al., 2018). Além disso, os resultados mostraram que o uso de carboximetil celulose (CMC) como aditivo na pasta, apesar de ser bastante benéfico para biovidros, causa um efeito deletério na densificação do β -TCP (GALVÁN-CHACÓN et al., 2018). Tal resultado sugere o estudo de outros tipos de aditivos poliméricos em pastas que contenham fosfatos de cálcio.

2.4. *Scaffolds multifuncionais*

Além dos reparos por perda de massa óssea, outra preocupação recorrente da engenharia tecidual se encontra na resolução de infecções. Tais problemas podem ocorrer devido a doenças, como a osteomielite, e mesmo durante o procedimento cirúrgico de reparo ósseo (COONEY; COONEY, 2011) (SALMAN; MCGRAW; NAFFAA, 2021). Dentre as possíveis soluções, a mais comum ainda é a administração de antibióticos. Entretanto, sabe-se que a alta dosagem é necessária em alguns casos e isso pode causar danos aos rins do paciente e demais partes do organismo (POLO et al., 2018). Além disso, sabe-se que a bactéria pode criar resistência aos antibióticos empregados, tornando ainda mais complexo o tratamento (SIENKIEWICZ et al., 2017) (POLO et al., 2018). Dentro desse contexto, o interesse na obtenção de *scaffolds* multifuncionais, capazes de regenerar o tecido e tratar infecções, tem crescido nos últimos anos. Como alternativa ao uso de antibióticos, tem-se buscado na fitoterapia uma solução ao tratamento de infecções, como o uso de óleos essenciais (UNALAN; BOCCACCINI, 2021).

Óleos essenciais podem ser extraídos de raízes, cascas, folhas e flores de diversos tipos de planta (MAN et al., 2019). Esses extratos naturais normalmente apresentam propriedades interessantes, tais como atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral,

dependendo de sua composição (MAN et al., 2019)(UNALAN; SLAVIK; et al., 2019). Diferentes óleos essenciais já foram reportados na literatura demonstrando boa ação bactericida. El Fawal e colaboradores desenvolveram um *scaffolds* polimérico com óleo essencial de orégano e alcançaram bons resultados contra os seguintes microorganismos *S. aureus* e *E. coli* (EL FAWAL et al., 2021). Unalan e colaboradores obtiveram boa atividade antibacteriana em *scaffolds* poliméricos carregados com óleo de hortelã-pimenta (UNALAN; SLAVIK; et al., 2019). Além disso, os autores também observaram um aumento na atividade antibacteriana com o aumento da quantidade de óleo essencial utilizada, sem trazer toxicidade às células (UNALAN; SLAVIK; et al., 2019). Em *scaffolds* cerâmicos, também já existem bons resultados da incorporação de óleos essenciais. Polo e colaboradores funcionalizaram *scaffolds* a base de fosfato de cálcio bifásico com vanilina, um componente de óleo essencial de baunilha, e seus resultados alcançaram boas propriedades antibacterianas contra *E. coli* sem apresentar toxicidade à fibroblastos L929 (POLO et al., 2018). Amna e colaboradores alcançaram bons resultados de atividade antibacteriana contra *S. aureus* em *scaffolds* de hidroxiapatita revestidos com óleo essencial de *Nigella Sativa*, sem causar toxicidade a mioblastos C2C12 (AMNA et al., 2021). Unalan e colaboradores obtiveram boa atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* em *scaffolds* de biovidro 45S5 recobertos com proteína de soja e óleo de canela (UNALAN et al., 2021). Então, acredita-se que o recobrimento de *scaffolds* com óleo essencial é uma alternativa promissora ao desenvolvimento de *scaffolds* multifuncionais.

Dentre os diferentes tipos de óleos essenciais conhecidos, o óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) (do inglês, *Tea Tree Oil* - TTO) apresenta elevado interesse comercial. O TTO é nativo da Austrália e apresenta propriedades tais como antisséptica, antioxidante, antiviral, antifúngica e antibacteriana (GALLART-MATEU et al., 2018)(GAO et al., 2020b). A Figura 4 mostra a planta e a flor da *Melaleuca alternifolia*.



Figura 4: *Melaleuca alternifolia*: a) planta e suas folhas e b) flores. Adaptado de MOREIRA, 2010.

A composição do TTO é rica em terpenos e derivados, acima de 48% de acordo com a norma ISO 4730 (STANDARDIZATION; NORMALISATION, 1987), componentes responsáveis pela boa performance contra diversos agentes patológicos que causam infecções na pele e ossos (SATHIYASEELAN et al., 2021). A Figura 5 apresenta as moléculas dos principais componentes do TTO.

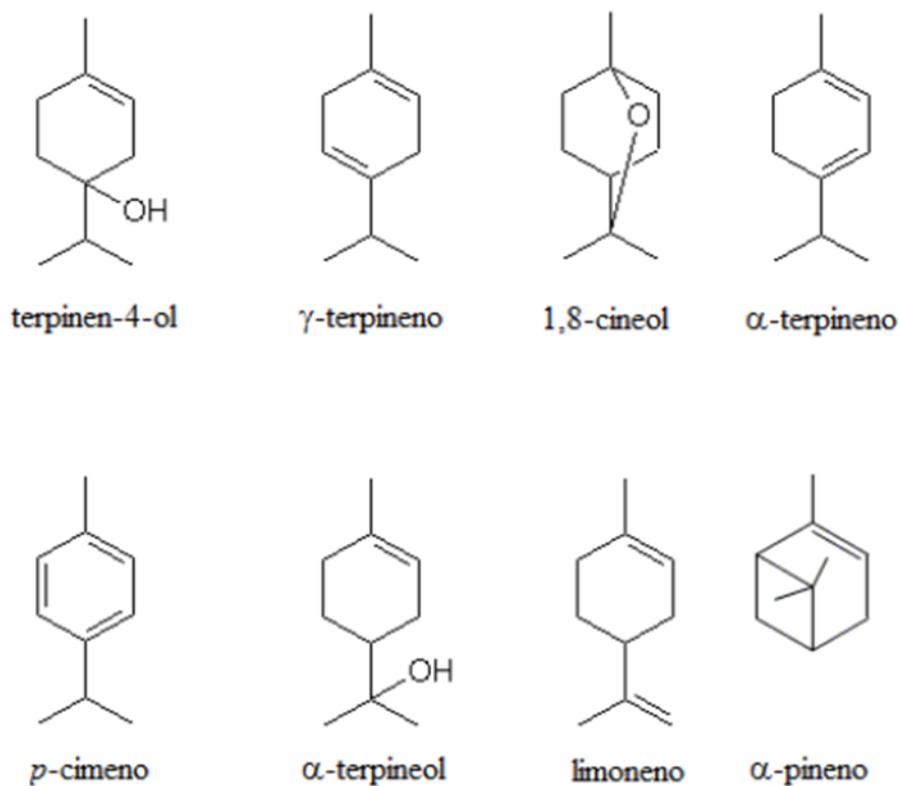


Figura 5: Principais componentes do óleo de melaleuca. Adaptado de MOREIRA, 2010.

Entretanto, com base na revisão de literatura feita neste trabalho, não há relatos da associação do TTO a *scaffolds* a base de biocerâmicas. O desenvolvimento deste tipo de material pode ser uma alternativa ao tratamento de infecções associado à regeneração óssea.

3. Materiais e Métodos

A Figura 6 apresenta um fluxograma geral das principais etapas realizadas nesse trabalho.

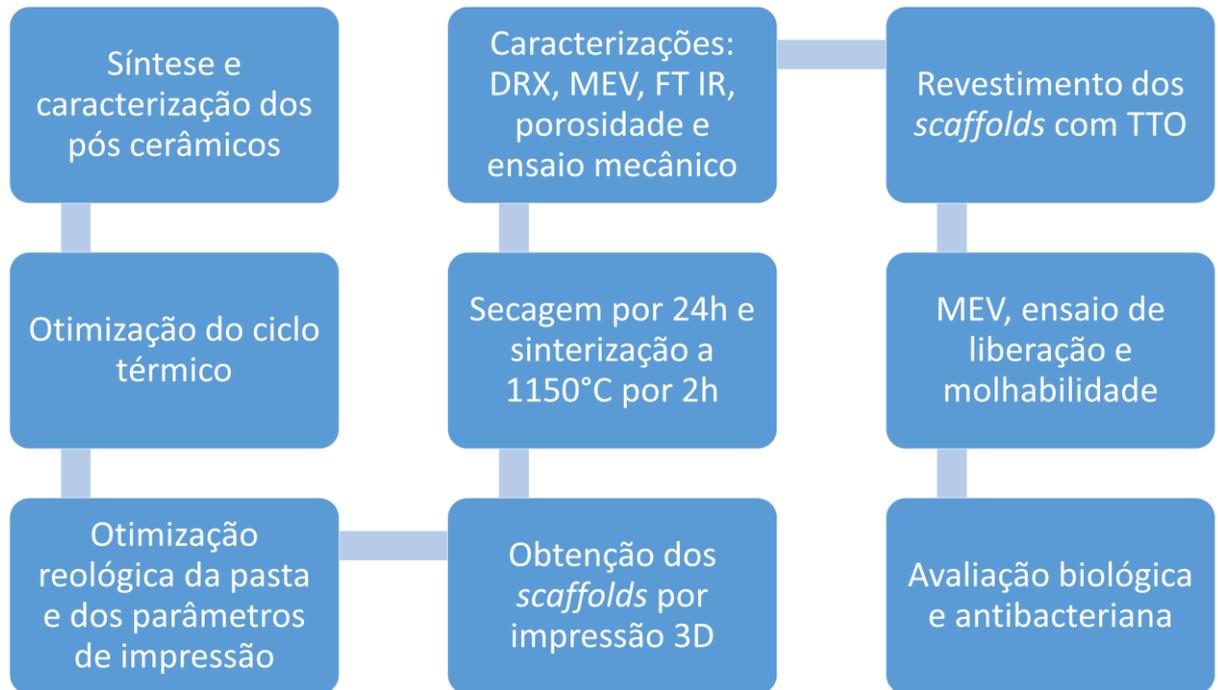
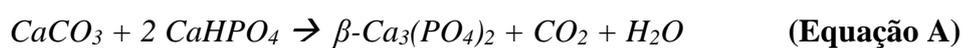


Figura 6: Fluxograma geral das principais etapas realizadas nesse trabalho.

3.1. Síntese e moagem dos pós cerâmicos de β -TCP e S53P4

O pó de β -TCP foi obtido por reação em estado sólido do carbonato de cálcio (CaCO_3 - Synth) e fosfato de cálcio bibásico anidro (CaHPO_4 - Synth) na razão molar de 1:2, conforme Equação A. Em seguida foi realizada a calcinação da mistura dos reagentes em $1050\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 horas, em forno mufla (EDG 10P-S).



Com a finalidade de reduzir o tamanho de partícula e homogeneizar sua distribuição, foi realizada moagem via úmida por 12 horas (esferas de alumina, diâmetro = 6 mm), em moinho de bolas (MA-500, Marconi), partindo-se de uma suspensão aquosa com 30% (% - em massa) de sólidos e adicionando-se 1,75% em relação a massa do pó de dispersante, poliacrilato de amônio (DARVAN[®] C-N, Vanderbilt Minerals, LLC). Após a secagem, o pó moído foi desaglomerado em peneira, malha 200 mesh.

O biovidro S53P4 (cuja composição é definida por 53% SiO₂, 23% Na₂O, 20% de CaO e 4% P₂O₅ - % em massa) (MASSERA et al., 2012) (VAN GESTEL et al., 2017) foi obtido por fusão, a partir dos carbonatos precursores, a 1360 °C por 30 minutos, seguida de resfriamento rápido. Uma vez sintetizado, o S53P4 foi submetido ao seguinte processo de cominuição: moagem a seco (esferas de zircônia, diâmetro = 5 mm) até atingir um tamanho de partícula menor que 106 µm, e em seguida, moagem via úmida (esferas de zircônia, diâmetro = 2,5 mm) por 36 horas. Ambos os processos foram realizados em moinho de bolas (MA-500, Marconi). O pó foi desaglomerado em peneira, malha 200 mesh.

3.2. Preparação das pastas cerâmicas

As pastas cerâmicas de β -TCP e β -TCP/S53P4 foram preparadas com teor de sólidos total de 53% (% - em massa), utilizando como aditivos de processamento uma solução de Pluronic F127 (Sigma Aldrich) na concentração de 20% (% - em massa) e polietilenoglicol (PEG 400 – Synth) no teor de 2,5% (% - em massa). As pastas foram preparadas em um misturador de hélice (RW 20 S32, IKA[®] Works Inc.). Lopes e colaboradores mostraram que a adição de 7,5% - em massa de biovidro 45S5 contribui para o aumento da resistência mecânica do *scaffold* de β -TCP/BG 45S5, bem como suas propriedades biológicas (LOPES et

al., 2016). O teor de 7,5% - em massa de biovidro foi escolhido para a preparação das pastas de β -TCP/S53P4. O Apêndice I apresenta resultados dos estudos preliminares de preparação da pasta com diferentes aditivos orgânicos. Este estudo foi base para a formulação final apresentada no trabalho.

3.3. Estudo reológico da pasta cerâmica

A caracterização reológica das pastas cerâmicas de β -TCP e β -TCP/S53P4 foi realizada por reometria rotacional (Rheostress 6000, Haake), utilizando geometria cone-placa ($2^\circ/35$ mm) com *gap* de 105 mm. Foram analisados os comportamentos da viscosidade e tensão em função da taxa de cisalhamento, variando de 10^{-2} a 100 s^{-1} . O comportamento viscoelástico das pastas foi determinado pela análise em modo oscilatório, variando a tensão de 0,1 a 1000 Pa em 1 Hz, visando a determinação dos módulos elástico (G') e viscoso G'' .

3.4. Otimização do ciclo térmico

As análises de dilatometria óptica foram realizadas com a finalidade de analisar a influência da temperatura na expansão e retração volumétrica do material e, dessa forma, determinar o ciclo térmico a ser adotado para os *scaffolds* após impressão. Essa etapa foi realizada no Laboratório VITROCER, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC em parceria com o Prof. Dr. Antônio Pedro Novaes de Oliveira. As medidas foram feitas para os pós de β -TCP e S53P4 utilizando um dilatômetro óptico (Misura – Expert System) operando até 1200 °C, sob taxa de 10 °C/ min.

3.5. Produção dos *scaffolds* via impressão 3D

Os *scaffolds* de β -TCP e β -TCP/S53P4 foram impressos em impressora 3D (DuraPrinter - E01), com geometria cilíndrica (diâmetro = 14 mm e altura = 5 mm) e padrão de porosidade estipulado em software *Repetier Host* (70%). Foi utilizado um bico de impressão com diâmetro de 580 μ m e velocidade de 10 mm/s. Após a impressão, os *scaffolds* foram secos a temperatura ambiente e umidade controlada por 24 horas e, posteriormente, sinterizados (Jung, LF00914) a 1150 °C, por 120 minutos.

3.6. Caracterização dos pós cerâmicos e dos *scaffolds* de β -TCP e β -TCP/S53P4 sem revestimento

3.6.1. Difração a laser

A determinação do tamanho e distribuição de partículas de ambos os pós após moagem foi realizada em um difratômetro a laser (Cilas, 1190e). Foi preparada uma suspensão aquosa para o β -TCP e uma suspensão em isopropanol (Dinâmica) para o S53P4, utilizando poliacrilato de amônio (Darvan C-N) como agente dispersante. A suspensão foi homogeneizada em ultrassom de ponta (Hielscher, UP200S) por 10 minutos.

3.6.2. Difração de raios X (DRX)

Para determinação das fases cristalinas formadas do pó de β -TCP após síntese e dos *scaffolds* após tratamento térmico e da estrutura não cristalina do pó S53P4 foi realizada a difração de raios X (Rigaku, Ultima IV). Os parâmetros adotados foram: radiação $\text{CuK}\alpha$,

filtro Ni, varredura $2\theta = 10$ a 60° , passo angular de $0,02^\circ/\text{s}$, velocidade angular de $10^\circ/\text{min}$, 45 kV e 30 mA.

3.6.3. Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

O módulo vibracional dos grupos moleculares dos pós de β -TCP e S53P4 e dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 foi determinado por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR – Shimadzu, IRAffinity-1S) de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.6.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos *scaffolds* sem revestimento foi analisada em microscópio eletrônico de varredura (MEV - Auriga, Carl Zeiss) após recobrimento com tinta de prata e revestimento com ouro (Pumped Sputter Coater, QuorumQ150T Turbo).

3.6.5. Porosidade aparente e retração volumétrica

Para a determinação da porosidade aparente dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 foi adotando o método geométrico, que leva em conta a densidade teórica, $\rho_{\text{teórico}}$, que é calculada de acordo com a proporção de cada um dos pós e suas respectivas densidades (Equação B) ($\rho_{\beta\text{-TCP}} = 3,07\text{ g/cm}^3$ e $\rho_{\text{S53P4}} = 2,64\text{ g/cm}^3$) e a densidade geométrica (ρ_{scaffold}) obtida a partir da medida das dimensões (altura e diâmetro) e da massa das amostras. A Equação C representa o método de obtenção da porosidade geométrica.

$$\rho_{\text{teórico}} = X \times 3,07 + Y \times 2,64 \quad \text{(Equação B)}$$

$$P = \left[1 - \left(\frac{\rho_{scaffold}}{\rho_{teórico}} \right) \right] * 100 \quad \text{(Equação C)}$$

A retração volumétrica dos *scaffolds* foi medida em comparação com as dimensões programadas para impressão (diâmetro de 12 mm e altura de 24 mm). A Equação D apresenta o cálculo da retração volumétrica dos *scaffolds*, onde $V_{programado}$ é o volume estipulado no *software* e $V_{sinterizado}$ é o volume do *scaffold* após sinterização.

$$\left(\frac{V_{programado} - V_{sinterizado}}{V_{programado}} \right) \times 100 \quad \text{(Equação D)}$$

3.6.6. Resistência mecânica a compressão

A resistência mecânica dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 foi determinada por ensaio de compressão uniaxial (Emic, DL20000, Célula 5 kN) a temperatura ambiente com velocidade de carregamento de 0,5 mm.min⁻¹. Foram utilizados 10 *scaffolds* em cada ensaio e esses foram impressos com geometria cilíndrica nas dimensões: 12 mm de diâmetro e 24 mm de altura.

3.7. Revestimento dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 com TTO

As etapas descritas abaixo foram desenvolvidas durante estágio no exterior (BEPE FAPESP - processo 2020/12944-7) realizado no Instituto de Biomateriais da *Friedrich-Alexander-Universität* (FAU), em Erlangen – Alemanha, sob supervisão do Prof. Dr. Aldo Roberto Boccaccini.

O revestimento dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 com TTO foi realizado de duas maneiras distintas, onde o teor de TTO foi de 5, 10 e 15% (v/v) para ambas. No primeiro, o

TTO (Phytoterápica®) foi solubilizado em etanol (Synth) por meio de agitação magnética por 30 minutos, à temperatura ambiente. Os *scaffolds* foram imersos nesta solução e secos em capela até evaporação total do etanol. Para o segundo tipo de revestimento, foi preparada uma solução aquosa de gelatina de 2,5% - em massa (Sigma Aldrich) em agitação magnética a 40 °C. Após 15 minutos de agitação, foi adicionado TTO e a solução foi misturada durante mais 15 minutos. Os *scaffolds* foram imersos nessa solução, após seu resfriamento, por 3 minutos e secos na capela por 24 horas. A Tabela 1 resume a nomenclatura adotada para ambos os grupos de revestimento:

Tabela 1: Composição e nomenclatura dos grupos de revestimento.

Composição dos <i>scaffolds</i>	Nomenclatura
Etanol/Óleo de melaleuca 5%	EtOH/TTO-5
Etanol/Óleo de melaleuca 10%	EtOH/TTO-10
Etanol/Óleo de melaleuca 15%	EtOH/TTO-15
Gelatina/Óleo de melaleuca 5%	Gel/TTO-5
Gelatina/Óleo de melaleuca 10%	Gel/TTO-10
Gelatina/Óleo de melaleuca 15%	Gel/TTO-15

3.8. Caracterização dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO

3.8.1. Microscopia eletrônica de varredura - MEV

A morfologia e avaliação da superfície dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO foi verificada por microscopia eletrônica de varredura (MEV - Auriga, Carl-Zeiss).

3.8.2. Determinação da molhabilidade dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO

O ângulo de contato dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO foi medido para determinar a molhabilidade e verificar a influência do revestimento na superfície. Pastilhas com a mesma composição dos *scaffolds* foram preparados para garantir uma superfície plana para a medição. As pastilhas foram preparadas em uma prensa de 1,5 ton, após a secagem da pasta e sua transformação em pó. 0,3 g deste pó foi usado para cada pastilha. Após o preparo, as pastilhas foram sinterizadas a 1150 °C por 2 horas em forno (Therm Concept). O ângulo de contato (Kruss, DSA30) foi medido com uma gota de água de 10 μ L. Foram utilizadas duas pastilhas e as medições foram feitas em quatro regiões diferentes de cada pastilha. Foi considerado o valor médio do ângulo de contato.

3.8.3. Ensaio de liberação do TTO

O ensaio de liberação do TTO foi realizado para os *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO em um espectrômetro UV-vis (Analytikjena, Specord 40) para 212 nm. Uma curva de calibração foi determinada previamente diluindo TTO em solução tampão fosfato salino PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) (diluições de 10^{-4} a 10^{-5}) para ser usada como parâmetro de concentração. Para o estudo de liberação, três *scaffolds* de cada grupo foram imersos em 2 mL de PBS e colocados em uma incubadora (IKA, KS 40000i) a 37 °C e 90 rpm. A liberação foi determinada por 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 5 horas, 7 horas, 1 dia, 3 dias e 7 dias.

3.9. Ensaios biológicos *in vitro* dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO

3.9.1. Biomineralização em SBF

A bioatividade dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO foi analisada em fluido corpóreo simulado (do inglês, *Simulated Body Fluid - SBF*), seguindo a metodologia determinada por Kokubo e colaboradores (KOKUBO, T. et al., 1990) (KOKUBO, Tadashi; TAKADAMA, 2006). Foram considerados todos os grupos de revestimentos, *scaffolds* revestidos apenas com gelatina (2,5% - em massa) (denominados Gel/TTO-0) e *scaffolds* não revestidos. Foi realizada a difração de raios X (DRX) (Rigaku, Ultima IV) para analisar a formação de hidroxiapatita em 3, 7 e 14 dias de ensaio.

3.9.2. Viabilidade celular e citotoxicidade

A viabilidade celular dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO foi avaliada pelos métodos indireto e direto usando células MG-63 semelhantes a osteoblastos.

Para a viabilidade celular indireta, os *scaffolds* foram macerados e esterilizados com luz ultravioleta por 2 horas. As partículas de cada amostra foram misturadas com meio de cultura de células em uma concentração de 10 mg/mL e incubadas por 24 horas a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4200 rpm e o sobrenadante foi separado e diluído para obter a concentração de 1 mg/mL. Portanto, duas concentrações foram utilizadas nos estudos, 10 mg/mL e 1 mg/mL. 10^5 células MG-63 foram semeadas por poço em uma placa de 24 poços e 1 mL do sobrenadante da amostra foi colocado em contato com as células de cada poço e incubadas a 37 °C e 5% de atmosfera de CO₂. As células com o meio de cultura foram utilizadas como amostra de controle. Após 1 e 3 dias de incubação, a viabilidade celular foi quantificada com o ensaio metabólico WST-8.

Para a viabilidade celular pelo método direto, os *scaffolds* foram esterilizados com luz ultravioleta por 2 horas. 10^5 células MG-63 foram semeadas gota a gota em cada *scaffolds* e 1 mL de meio de cultura de células (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM - Thermo Fisher ScientificTM, suplementado com 10% de FCS e 1% de penicilina-estreptomicina) foi adicionado por poço em placa de 24 poços. As amostras foram incubadas a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 3 e 7 dias. A viabilidade celular foi quantificada com o ensaio metabólico WST-8. Após cada tempo de incubação, o meio de cultura de células foi removido e posteriormente incubado com meio de cultura de células contendo solução de WST-8 a 1% (v/v) (Kit de contagem de células - 8: Sigma Aldrich) por 3 horas. Após a incubação, 100 µL foram transferidos para uma placa de 96 poços em triplicata e a absorbância foi medida a 450 nm usando um leitor de placas (FLUOstar Omega, BMG Labtech).

A viabilidade celular também foi avaliada com análise de lactato desidrogenase (do inglês, *Lactic Dehydrogenase* - LDH) (Sigma Aldrich). As células foram lavadas com Dubelcco's tampão fosfato salino (do inglês, *Dubelcco's phosphate buffered saline* - DPBS) e 1 mL de tampão de quebra por *scaffold* foi adicionado e incubado durante 30 min. As amostras foram centrifugadas e incubadas por 30 min com uma mistura principal contendo solução de substrato à base de lactato desidrogenase do ensaio de viabilidade *in vitro*, solução de corante de LDH e cofator de ensaio de LDH. A absorbância foi medida a 490 e 690 nm.

As células foram fixadas nos *scaffolds* e tingidas para avaliação morfológica. 4',6-diamidina-2-fenilindol (DAPI - Thermo Fisher ScientificTM) e rodamina faloidina (Thermo Fisher ScientificTM) foram usados para tingir o núcleo e o citoesqueleto das células, respectivamente. Imagens de microscopia de fluorescência e de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas usando um AxioScope A.1 (Carl Zeiss, Jena) e (Auriga, Carl-Zeiss, Jena), respectivamente.

3.10. Avaliação da atividade antibacteriana dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO

A atividade antibacteriana dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 com TTO revestidos foi avaliada contra o microorganismo *S. aureus*. Os *scaffolds* foram esterilizados com luz ultravioleta por 2 horas. 10^5 - 10^6 bactérias (*S. aureus*) em 1 mL de meio foram colocadas em contato com os *scaffolds* e incubadas a 37 ° C e 120 rpm. A suspensão de bactérias sem *scaffolds* foi considerada como controle. Após 7 e 24 horas, as medidas de turbidez foram realizadas a partir da densidade óptica do meio em 600 nm. Após 24 horas, a atividade metabólica da bactéria foi avaliada medindo a redução de Alamar *blue*. A contagem de formação de unidades de colônia foi feita com base numa diluição de 10^{-13} após 24 horas.

3.11. Análises estatísticas

Os ensaios de viabilidade celular, citotoxicidade e antibacterianos foram analisados por ANOVA e teste de Tukey usando Origin (OriginLab, Northampton, MA) com o nível de significância $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização dos pós cerâmicos de β -TCP e S53P4

A Figura 7 mostra a distribuição de tamanho de partícula dos pós de β -TCP e S53P4 após a etapa de moagem. O pó de β -TCP apresentou diâmetro médio igual a $1,58 \mu\text{m}$ e uma distribuição de tamanho de partículas estreita, apresentando $D_{90} = 2,80 \mu\text{m}$ e $D_{10} = 0,63 \mu\text{m}$. O pó de S53P4 apresentou um diâmetro médio igual a $10,34 \mu\text{m}$, e uma larga distribuição de partículas, apresentando $D_{90} = 18,95 \mu\text{m}$ e $D_{10} = 2,87 \mu\text{m}$ quando comparado com o pó de β -TCP. Segundo Galván-Chacón e colaboradores, para que a pasta apresente bom comportamento durante a extrusão, os pós devem apresentar D_{90} inferior a $10 \mu\text{m}$ (GALVÁN-CHACÓN et al., 2018). Nota-se que o pó de β -TCP apresenta uma distribuição ideal para o processo de extrusão. No entanto, o pó de S53P4 apresenta um D_{90} maior de que $10 \mu\text{m}$ mesmo após intenso processo de moagem. Porém, como a quantidade de S53P4 adicionada na pasta é menor quando comparada a quantidade de β -TCP, não houve comprometimento na mistura dos pós e no processo de extrusão da pasta.

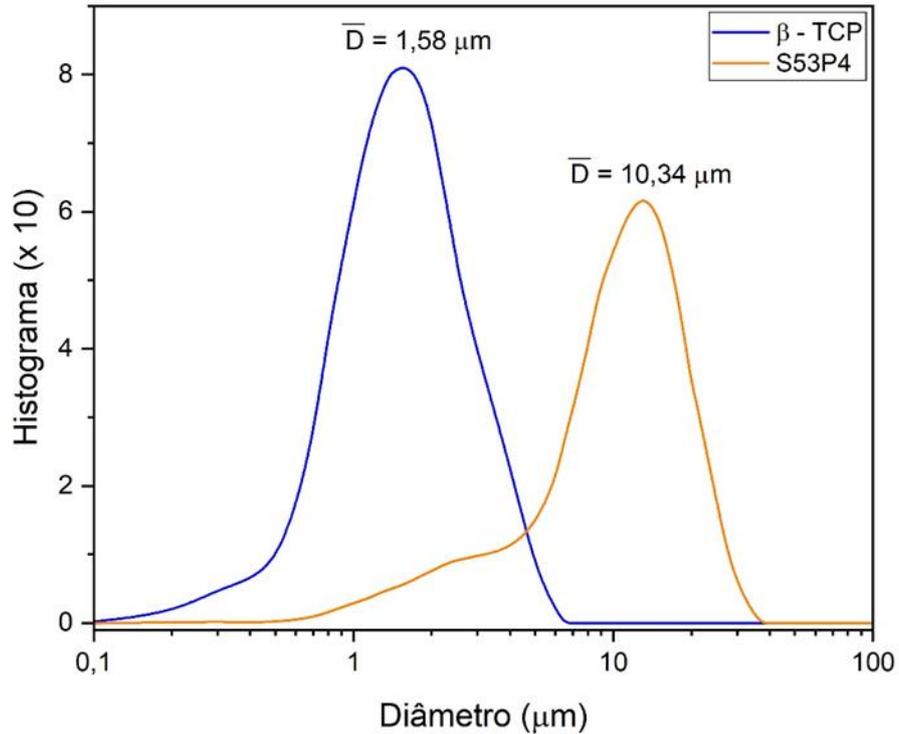


Figura 7: Curvas de distribuição granulométrica dos pós de β-TCP e S53P4 após seus respectivos processos de moagem.

4.2. Determinação das propriedades reológicas das pastas cerâmicas

O modelo reológico de Herschel-Bulkley é um guia para a determinação das propriedades de pastas cerâmicas em impressão 3D (GADEA et al., 2021) (PENG; ZHANG; DING, 2018). A Equação E apresenta esse modelo, onde τ e γ são, respectivamente, a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento aplicadas durante o processo de impressão, τ_y é a tensão de escoamento, K é o parâmetro de viscosidade e n o expoente de pseudoplasticidade (PENG; ZHANG; DING, 2018).

$$\tau = \tau_y + K \times \gamma^n \quad \text{(Equação E)}$$

A Figura 8 apresenta o comportamento reológico das pastas de β -TCP e β -TCP/S3P4 (Figura 8-a e 8-b, respectivamente). Ambas as composições seguem o modelo de Herschel-Bulkley, com $0 < n < 1$, o que indica um comportamento pseudoplástico. Em outras palavras, ocorre o fluxo da pasta apenas após ser atingido certo valor de tensão de escoamento, o que causa uma diminuição na viscosidade enquanto durar a liberação da tensão imposta (GADEA et al., 2021). É nesse momento em que ocorre o aumento de viscosidade, garantindo a estrutura do *scaffolds* impresso (GADEA et al., 2021) (TABARD et al., 2021). De acordo com Peng e colaboradores, uma pasta cerâmica otimizada para o processo de impressão 3D precisa apresentar viscosidade entre 10 e 100 Pa.s, de forma a permitir a integridade dos filamentos e a impressão de estruturas maiores (PENG; ZHANG; DING, 2018). Como pode ser observado na Figura 8, ambas as composições de pasta apresentam tais propriedades. Dessa forma, pode-se afirmar que o teor de sólidos, o processo de mistura e os aditivos orgânicos utilizados foram adequados para a otimização das pastas cerâmicas.

Nas análises oscilatórias (Figura 9-a e 9-b para pastas de β -TCP e β -TCP/S53P4, respectivamente), observa-se que enquanto a pasta é forçada além de τ_y , o módulo G' tende a se reduzir, devido à quebra da rede polimérica do Pluronic F127 após certo valor de tensão (FEILDEN et al., 2016). O módulo G'' sofre um aumento no início, devido o atrito dentro da pasta e após o cruzamento dos módulos (onde $G'=G''$), G'' se atinge maiores valores que G' , por conta das propriedades viscoelásticas da pasta (FEILDEN et al., 2016). Feilden e colaboradores estudaram pastas a base de hidrogéis de Pluronic F127 e obtiveram resultados similares (FEILDEN et al., 2016).

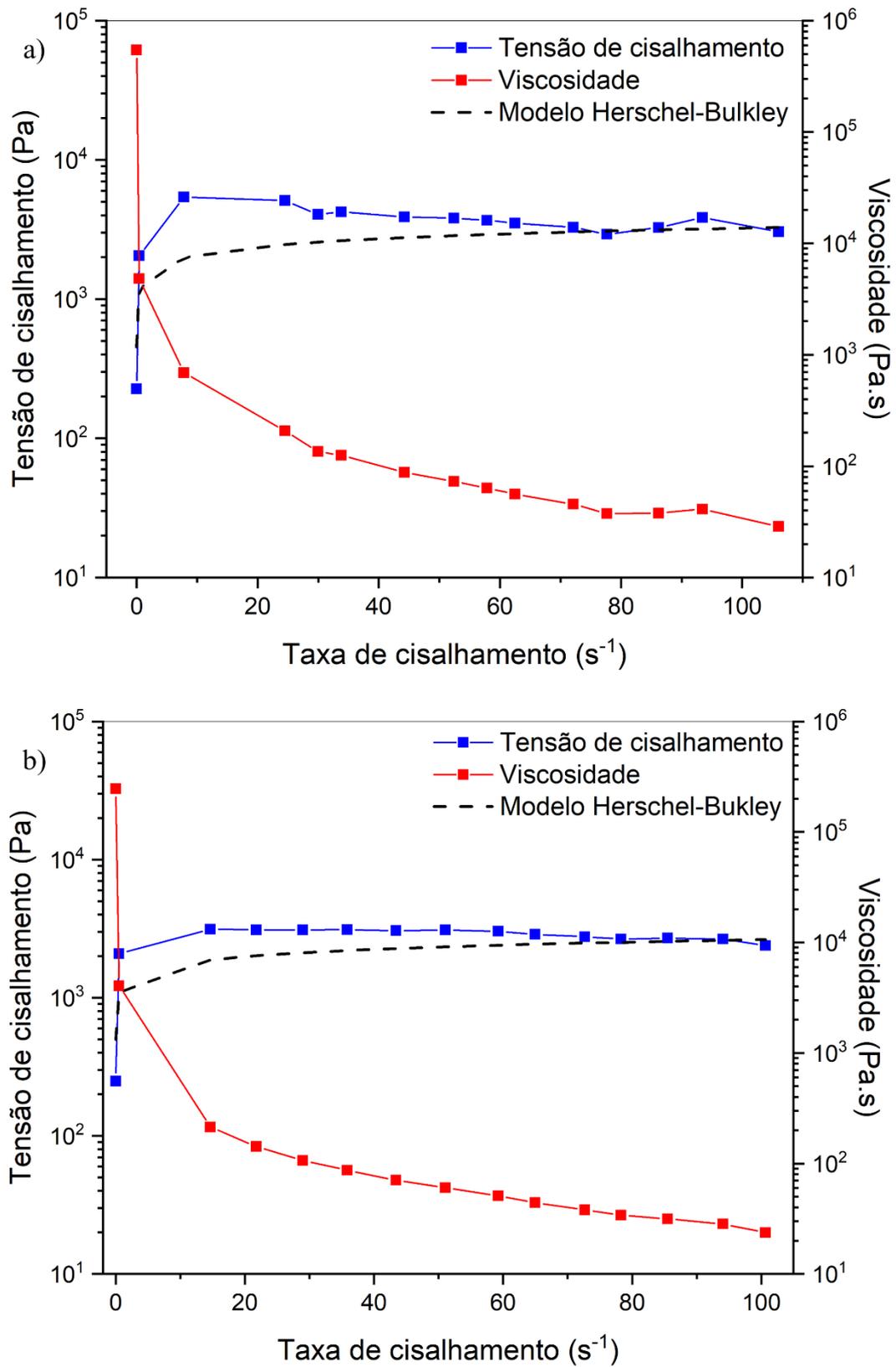


Figura 8: Comportamento da viscosidade e tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento: a) pasta de β -TCP e b) pasta de β -TCP/S53P4.

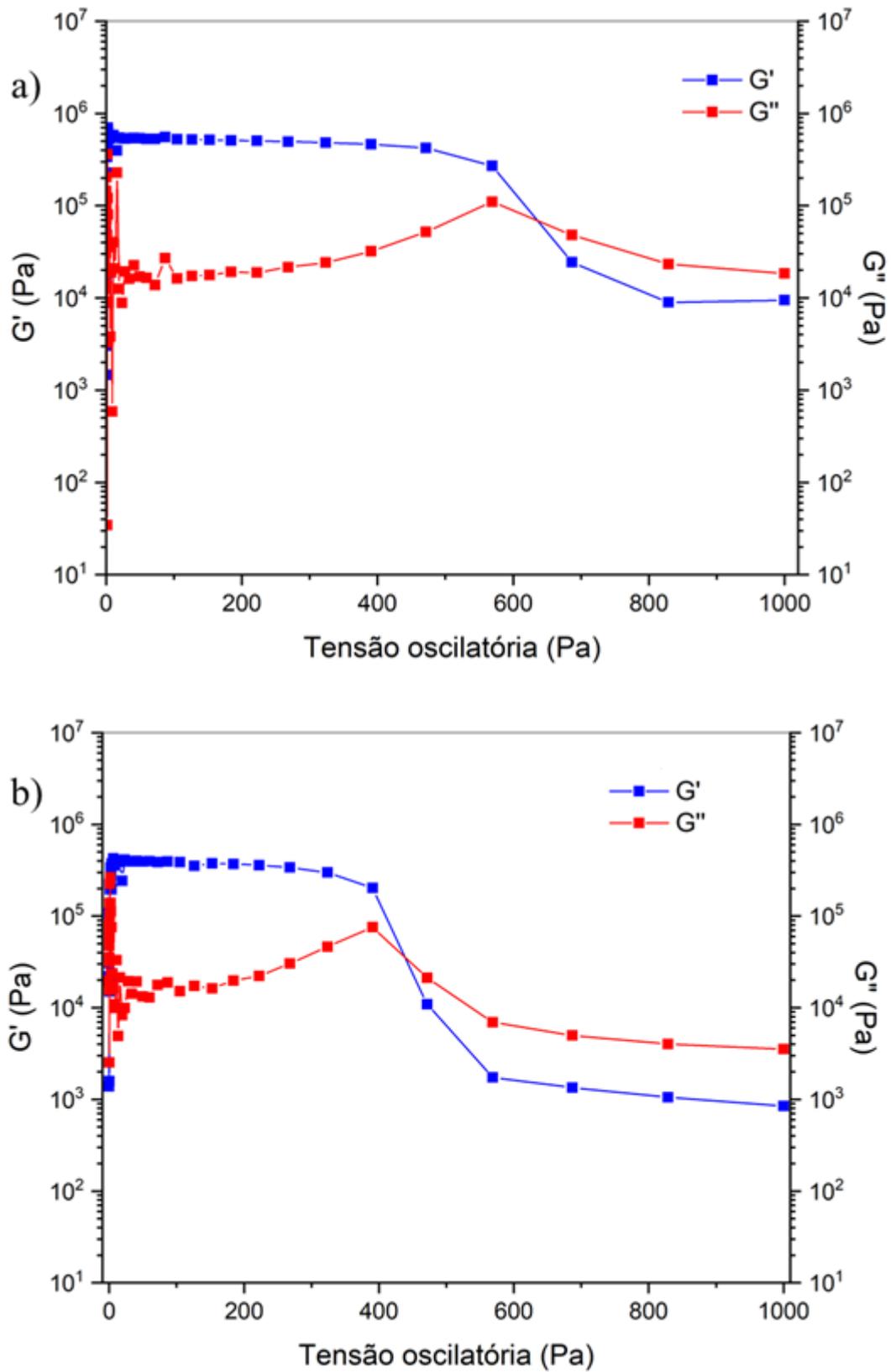


Figura 9: Análises em regime oscilatório: a) pastas de β -TCP e b) pastas de β -TCP/S53P4.

4.3. Otimização do ciclo térmico

As curvas de dilatométrica óptica para os pós de β -TCP e S53P4 são apresentados na Figura 10. Com relação ao pó de S53P4, pode-se observar que nenhum evento relevante ocorre antes de 590 °C. Entre as temperaturas de 590 e 670 °C ocorre a cristalização do material, onde é possível verificar uma acentuada retração linear. Entre as temperaturas de 670 e 880 °C o material se mantém estável. A partir de 880 °C ocorre dilatação volumétrica do mesmo. Esse evento se estende até 1060 °C onde há o pico de fusão do S53P4, que é totalmente concluída em 1150 °C. Os resultados para o β -TCP mostram que não há considerável variação no volume do material durante toda a análise. Em 1050 °C, quando o S53P4 funde, observa-se uma retração suave na amostra. Com base nesses resultados, foi possível concluir que a temperatura ótima para a sinterização dos *scaffolds* é igual a 1150 °C. Nessa temperatura, o biovidro atinge sua temperatura de fusão, permitindo o preenchimento dos microporos da matriz de β -TCP. Assim, é esperado que o biovidro atue como reforço, elevando a resistência mecânica do *scaffold* de β -TCP (LOPES et al., 2016) (BAINO; CADDEO; VITALE-BROVARONE, 2020).

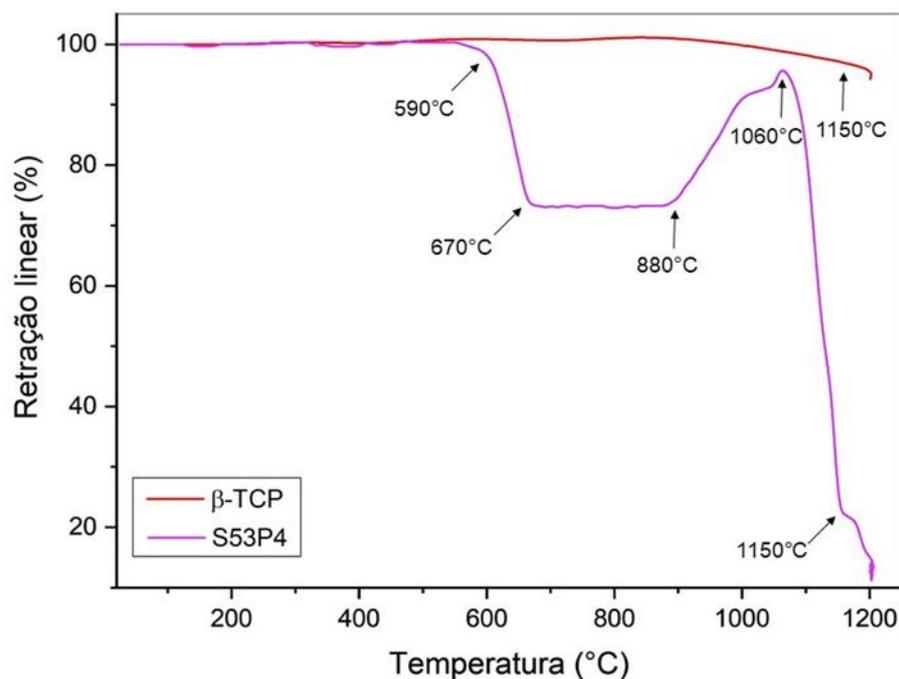


Figura 10: Curvas de dilatométrica óptica para os pós de β -TCP e S53P4.

4.4. Caracterização dos *scaffolds* de β -TCP e β -TCP/S53P4 obtidos via impressão 3D

Os difratogramas dos pós de β -TCP, S53P4 e dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 são apresentados na Figura 11. Para o S53P4 não foi formada nenhuma fase cristalina, conforme esperado para um material vítreo. Para o pó de β -TCP apenas o padrão relacionado à fase cristalina de β -TCP (JCPDS 09-0169) foi verificado, indicando que a temperatura e tempo de calcinação adotados na síntese foram adequados. Com relação ao difratograma dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4, nota-se a formação majoritária da fase cristalina de β -TCP (JCPDS 09-0169). Entretanto, também há a formação de fase cristalina de α -TCP (JCPDS 09-0348). Na presença dos íons de sílica, liberados pelo S53P4, durante o processo de sinterização, ocorre a transformação da fase β -TCP para α -TCP em temperaturas mais baixas, 1150 °C (LOPES et al., 2016) (HUA et al., 2021). A diferença de densidade entre as fases α e β -TCP (2,86 e 3,07 g/cm³, respectivamente)

poderia ser um problema causando um efeito deletério nas propriedades mecânicas do *scaffolds*, devido à formação de microtrincas na matriz de β -TCP (HE; TIAN, 2018). No entanto, durante o processo de sinterização, o S53P4 funde, formando uma fase líquida, que preenche a microporosidade e as microtrincas formadas pela transformação de fase (HE; TIAN, 2018). Além disso, também é possível observar a formação de outras fases, tais como: wollastonita (CaSiO_3 – JCPDS 027-088), alta-combeita ($\text{Na}_{15.78}\text{Ca}_3(\text{SiO}_{12})$ – JCPDS 01-078-1650) e renanita (NaCaPO_4 – JCPDS 029-1193), que são resultantes do processo de cristalização de vidros silicatos, como o S53P4. Desse modo, o S53P4 torna-se uma vitrocerâmica. Esses resultados corroboram com os obtidos por Spirandeli e colaboradores em *scaffolds* de β -TCP com biovidro 45S5 (SPIRANDELI et al., 2020).

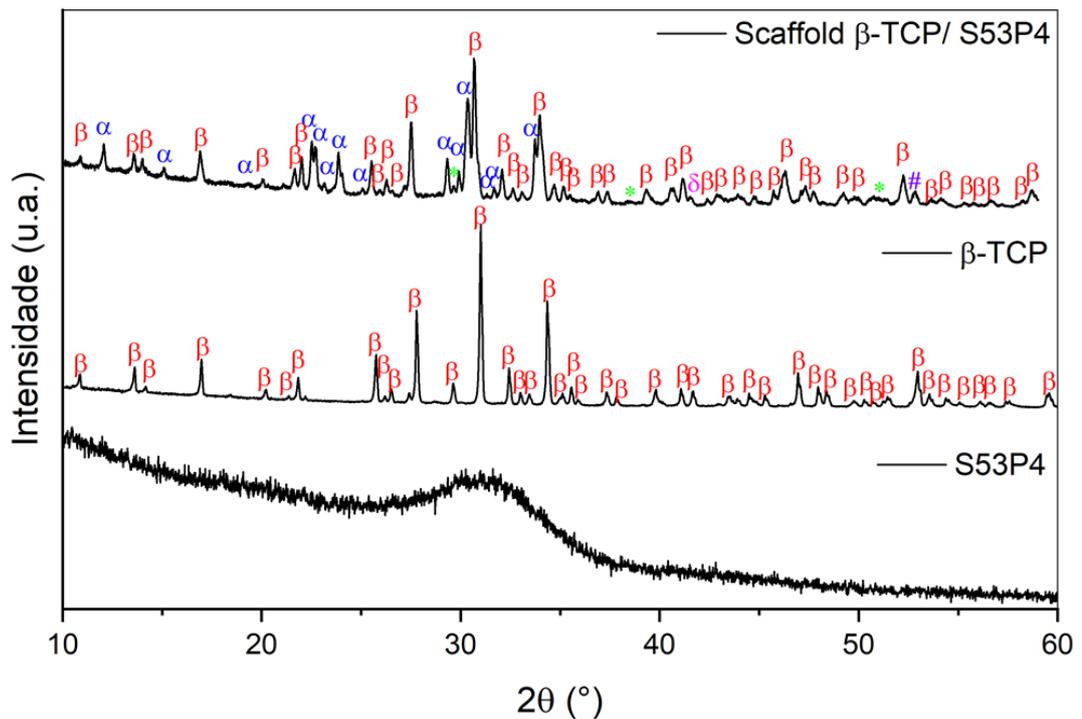


Figura 11: Difrátogramas de raios-X dos pós de β -TCP e S53P4 e dos scaffolds de β -TCP/S53P4: β - β -TCP (JCPDS 09-0169); α - α -TCP (JCPDS 09-0348); * - CaSiO_3 (JCPDS 027-088); δ - $\text{Na}_{15.78}\text{Ca}_3(\text{SiO}_{12})$ (JCPDS 01-078-1650); # - NaCaPO_4 (JCPDS 029-1193).

Os espectros de FT-IR dos pós de β -TCP e S53P4 e do *scaffold* de β -TCP/S53P4 são apresentados na Figura 12 e os respectivos grupos funcionais são mostrados na Tabela 3. Os eventos mais relevantes ocorrem entre 2000 e 400 cm^{-1} . Para o pó de β -TCP é possível observar bandas atribuídas ao grupo fosfato (PO_4^{3-}) (HUANG et al., 2021) enquanto que para o S53P4 observa-se bandas referentes aos grupos SiO_2 e CO_2^{3-} (AUNIQ; HIRUN; BOONYANG, 2020). Para o *scaffold* de β -TCP/S53P4 observa-se a presença do grupo fosfato assim como no pó de β -TCP. Uma vez que o *scaffold* é majoritariamente composto por β -TCP, a presença dos grupos SiO_2 e CO_2^{3-} é sobreposta pelo grupo PO_4^{3-} . No entanto, ao comparar esses resultados com as análises de difração de raios X, verifica-se que há influência do S53P4 na estrutura dos *scaffolds* (AUNIQ; HIRUN; BOONYANG, 2020).

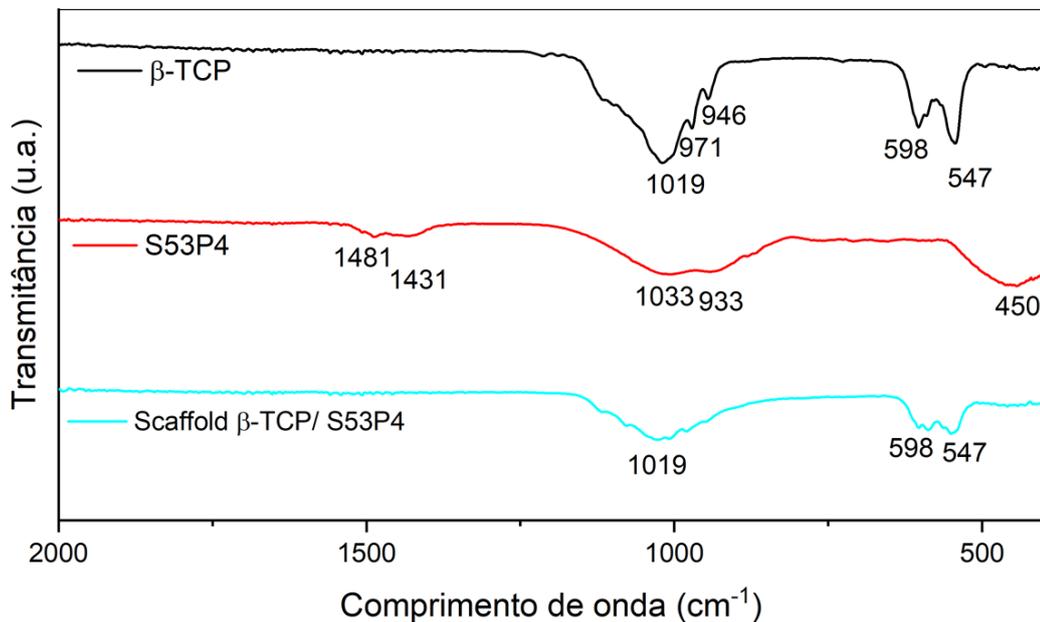


Figura 12: Espectro de FT-IR dos pós de β -TCP e S53P4 e do *scaffold* de β -TCP/S53P4.

Tabela 2: Identificação dos grupos funcionais para os pós de β -TCP e S53P4 e para o *scaffold* de β -TCP/S53P4.

Grupo funcional	Comprimento de onda (cm^{-1})		
	β -TCP	S53P4	<i>Scaffold</i> β -TCP/S53P4
PO_4^{3-}	547, 598, 946, 971 e 1019	-	547, 598 e 1019
SiO_2	-	450, 933 e 1033	-
CO_2^{3-}	-	1431 e 1481	-

A porosidade, resistência mecânica à compressão e retração volumétrica dos *scaffolds* de β -TCP e β -TCP/S53P4 são apresentadas na Tabela 3. Nota-se que os *scaffolds* de β -TCP apresentam porosidade mais próxima do valor estipulado no *software* computacional (70%). Mas um aumento nesse valor ocorre devido ao intumescimento do polímero (Pluronic F127). Para os *scaffolds* de β -TCP/S53P4 houve uma diminuição no valor de porosidade e retração volumétrica quando comparada com a projetada inicialmente. Isso ocorre porque durante a sinterização dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4, o vidro funde e preenche a microporosidade da matriz de β -TCP, de forma a ocorrer maior retração volumétrica. A resistência mecânica dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 é significativamente superior aos *scaffolds* de β -TCP, atingindo a faixa de resistência mecânica do osso trabecular (2-12 MPa) (MARQUES et al., 2017). Acredita-se que o vidro fundido, por capilaridade, preencheu os microporos da matriz de β -TCP (LOPES et al., 2016) (BAINO, 2019) e conseqüentemente aumentou a resistência mecânica, assim como atuou na redução da porosidade final e retração volumétrica dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4. Dessa forma, os *scaffolds* de β -TCP/S53P4 foram escolhidos para as próximas etapas do projeto.

Tabela 3: Valores de porosidade e resistência mecânica para os *scaffolds* de β -TCP e β -TCP/S53P4.

Composição do <i>scaffold</i>	Porosidade (%)	Resistência mecânica à compressão (MPa)	Retração volumétrica (%)
β -TCP	$73,65 \pm 2,76$	$0,35 \pm 0,07$	$39,36 \pm 3,27$
β -TCP/S53P4	$52,97 \pm 2,53$	$2,53 \pm 1,02$	$61,75 \pm 1,08$

A Figura 13 apresenta as micrografias da seção transversal dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4. Observa-se que a geometria dos *scaffolds* é customizada e há um padrão entre os filamentos, esse padrão é característico do processo de impressão 3D e das propriedades reológicas da pasta cerâmica, que possibilitaram a estabilidade dos filamentos (Figura 13-a) e 13-b)). Os detalhes do filamento revelam a porosidade formada devido à decomposição da fase orgânica (Figura 13-b)) e da microporosidade entre os grãos da matriz de β -TCP (Figura 13-c)).

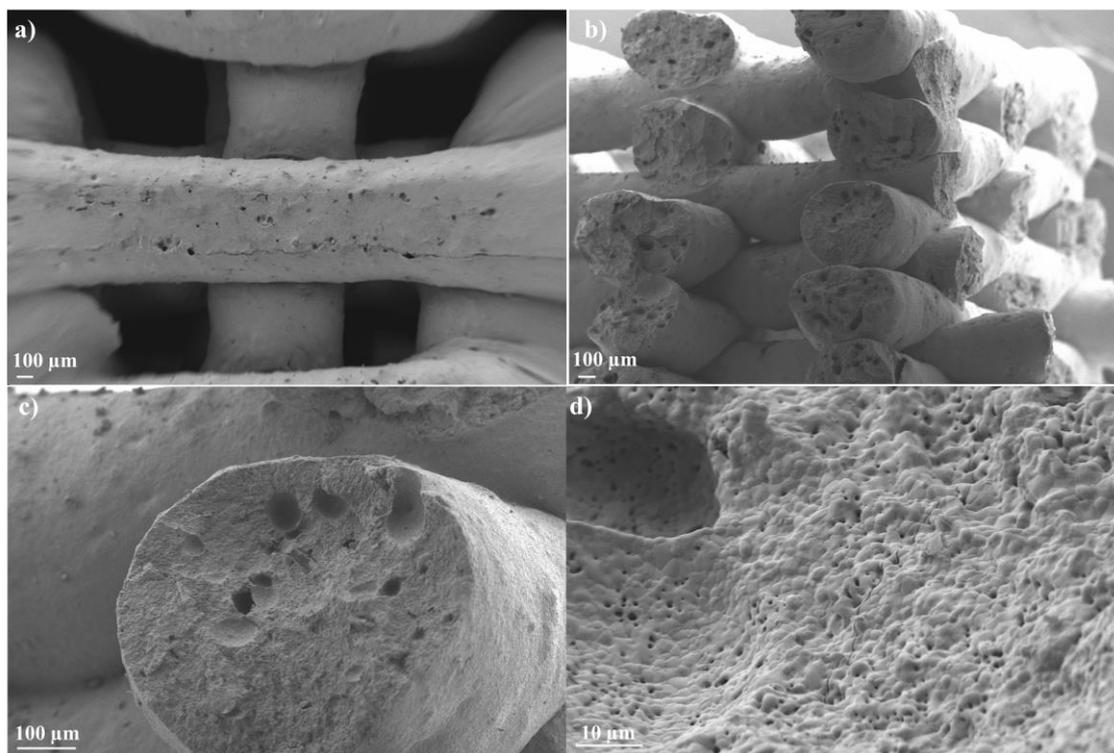


Figura 13: Imagens de MEV dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4: a) superfície superior, b) estrutura da seção transversal, c) detalhes do filamento e d) superfície do filamento.

4.5. Caracterização dos *scaffolds* de β -TCP e β -TCP/S53P4 revestidos com TTO

A morfologia de superfície dos *scaffolds* com e sem revestimento é mostrada na Figura 14. No grupo com revestimento a base de solução de etanol observa-se a formação de pontos de tonalidade cinza escuro ao longo do filamento, o que pode ser atribuído ao TTO na superfície. Para o grupo revestido com gelatina não se observa esses pontos cinza escuro, indicando a formação de uma camada de polímero sobre o filamento e recobrendo o TTO. O mesmo é observado para os *scaffolds* que receberam revestimento de gelatina sem o óleo (Gel/TTO-0). Com relação aos *scaffolds* sem revestimento, não é observado pontos cinza escuro ou uma camada na superfície do filamento, indicando a diferença entre os processos de revestimento adotados. Reiter e colaboradores também encontraram uma suave camada

polimérica originária do recobrimento de gelatina em *scaffolds* de biovidro 45S5 (REITER et al., 2019).

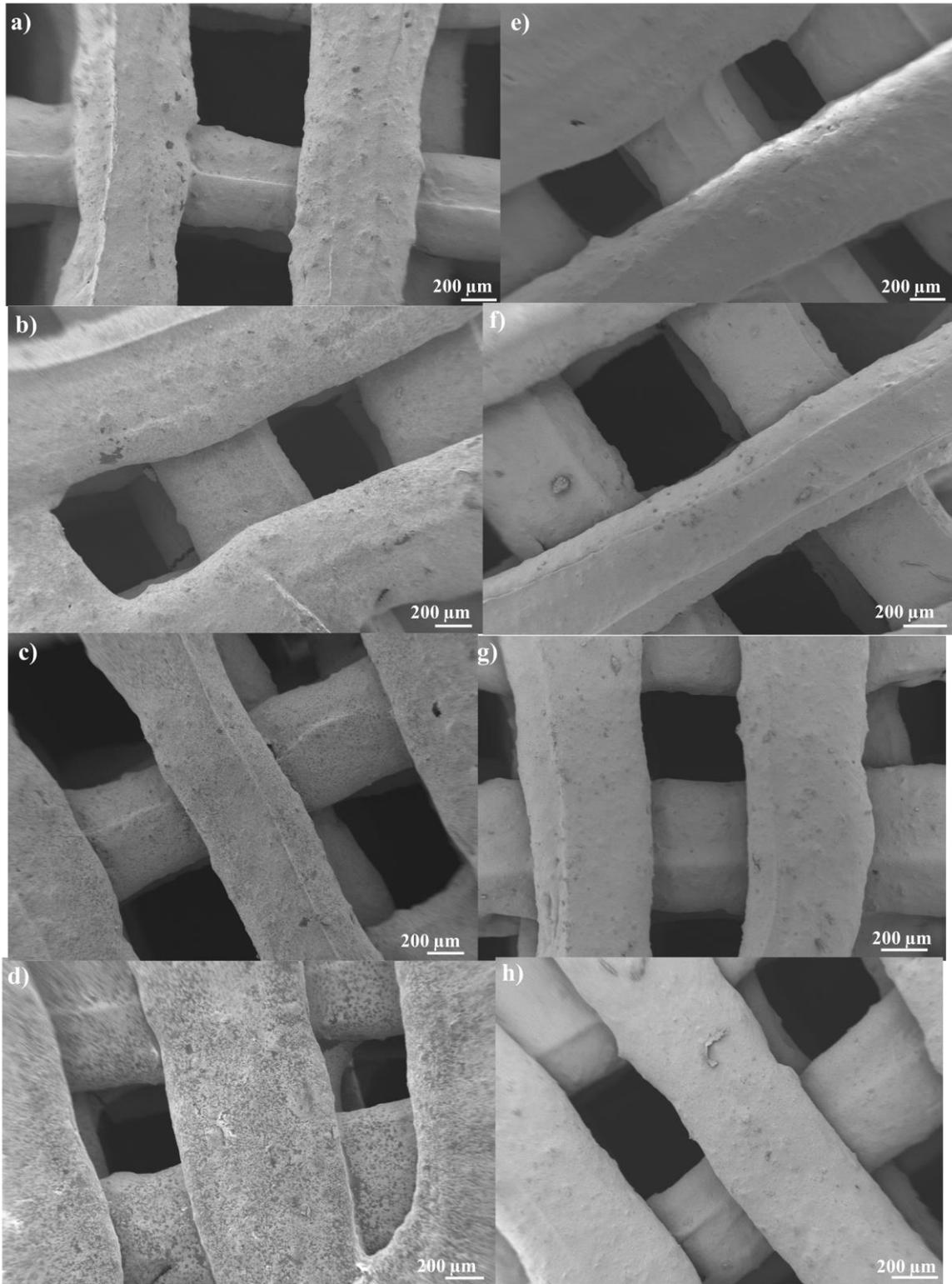


Figura 14: Superfície dos filamentos dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 com e sem revestimento de TTO: a) *scaffold* sem revestimento, b) EtOH/TTO-5, c) EtOH/TTO-10, d) EtOH/TTO-15, e) Gel/TTO-0, f) Gel/TTO-5, g) Gel/TTO-10 e h) Gel/TTO-15.

Os resultados de molhabilidade por meio de medidas de ângulo de contato são mostrados na Figura 15. Em comparação ao grupo sem revestimento, em todos os tipos de revestimento aplicados apresentaram maior comportamento hidrofóbico, devido à camada de revestimento aderida na superfície das amostras. Para o grupo revestido com etanol/TTO, o aumento da quantidade de TTO causa um aumento na hidrofobicidade, conforme reportado na literatura quando há adição de óleo na superfície do material (UNALAN; SLAVIK; et al., 2019) (UNALAN; ENDLEIN; et al., 2019). Já para o grupo revestido com gelatina, nem mesmo a maior adição de TTO causou diferença nos valores de ângulo de contato obtido. Neste caso, observa-se que a camada polimérica formada pela gelatina na superfície do material é a responsável pelo comportamento hidrofóbico (OCAK; GÜLÜMSER; BALOĞLU, 2011) e tem mais efeito que a maior adição de TTO.

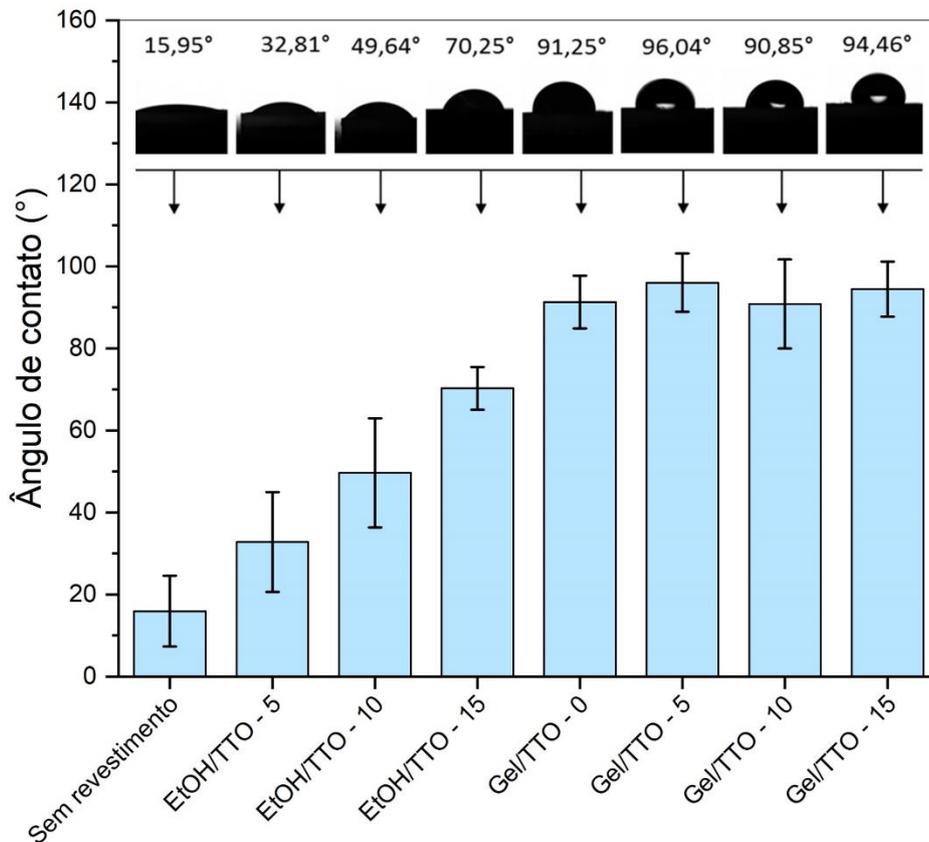


Figura 15: Molhabilidade por ângulo de contato para os *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO.

4.5.1. Ensaio de liberação do TTO

Os resultados de liberação do TTO em função do tempo são mostrados na Figura 16-a) para o grupo revestido com etanol/TTO e 16-b) para o grupo revestido com gelatina. Em relação ao grupo revestido com etanol/TTO, nota-se que há um aumento na concentração de TTO liberada com o aumento da quantidade de TTO incorporada. Já para o grupo revestido com gelatina, observa-se que não há um comportamento regular de liberação em relação à quantidade de TTO adicionada. Até 24 horas (1 dia), os *scaffolds* revestidos com etanol/TTO apresentam liberação de TTO mais acelerada. Passado esse período, a liberação do óleo torna-se estável até 168 horas (7 dias). Um comportamento diferente é observado para o grupo revestido com gelatina. Considerando o desvio padrão, observa-se que a liberação de TTO é similar em todas as concentrações utilizadas. Tal fato deve-se pela formação de uma camada polimérica pela gelatina na superfície do *scaffolds*, que acaba por atuar como uma barreira à liberação do TTO (OCAK; GÜLÜMSER; BALOĞLU, 2011). Considerando que a mesma concentração de solução de gelatina (2,5% - em massa) foi usada em todas as condições, esperava-se que a liberação do TTO ocorresse de forma similar. Comparando os dois tipos de revestimentos empregados, pode-se afirmar que um comportamento mais regular foi obtido para o grupo revestido com etanol/TTO.

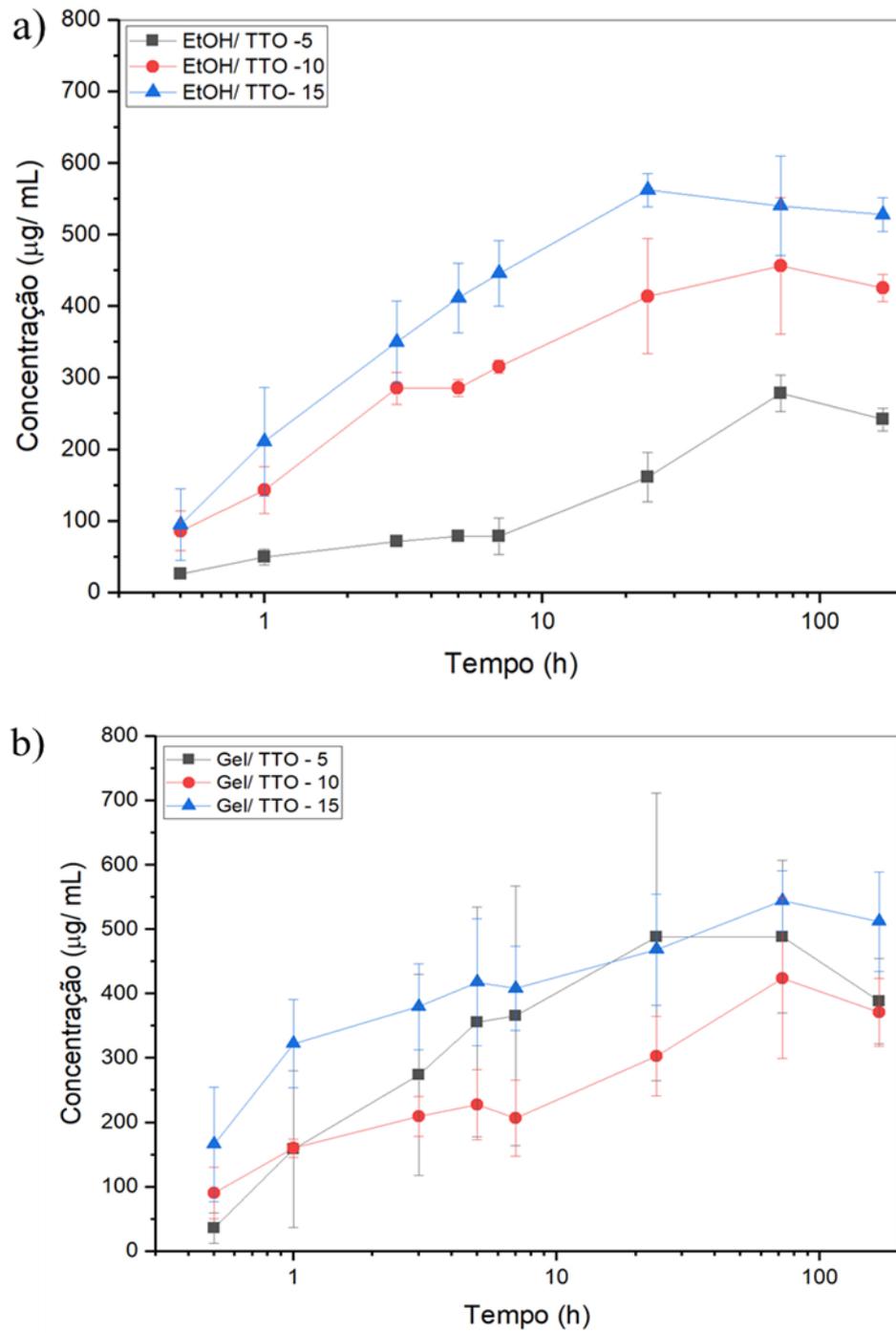
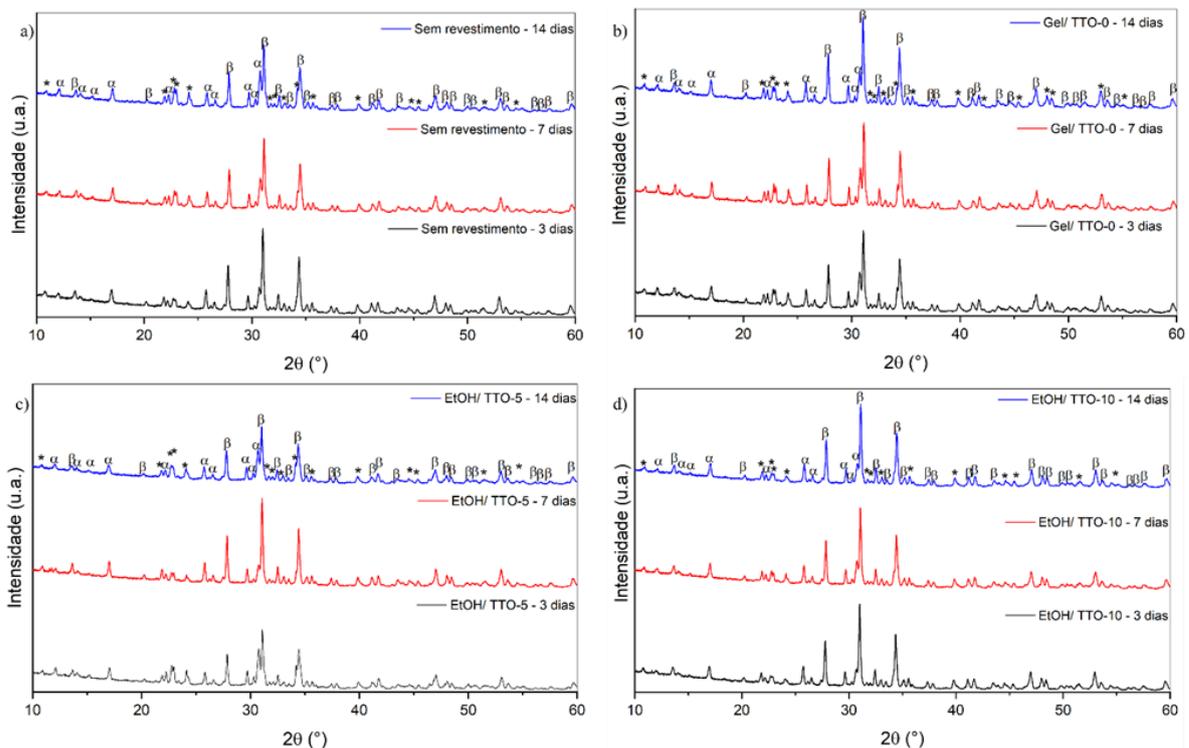


Figura 16: Ensaio de liberação para os *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO: a) etanol e b) gelatina.

4.6. Ensaios biológicos *in vitro* dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO

Os difratogramas de raios-X para todas as composições de revestimento submetidas ao ensaio de bioatividade em SBF por 3, 7 e 14 dias são mostrados na Figura 17. Pode-se observar que os resultados são bastante similares entre todas as composições e tempos de ensaio. Há a formação da fase cristalina da hidroxiapatita (JCPDS 09-0432) em todos os casos. Nota-se também que há a formação de outras fases, originárias da cristalização do S53P4, tais como renanita, alta-combeita e wollastonita foram sobrepostas pela formação de hidroxiapatita. Também houve a presença da fase β -TCP (JCPDS 09-0169) e α -TCP (JCPDS 09-0348), conforme esperado. Estes resultados corroboram com os obtidos por Spirandeli e colaboradores, que notaram a sobreposição da fase da hidroxiapatita frente às fases formadas pela cristalização do vidro (SPIRANDELI et al., 2020). Uma vez que todos os resultados foram similares, pode-se afirmar que o processo de revestimento empregado não exerceu influência na bioatividade dos *scaffolds*. Em todos os casos, foi possível obter bioatividade em SBF, devido à formação da hidroxiapatita.



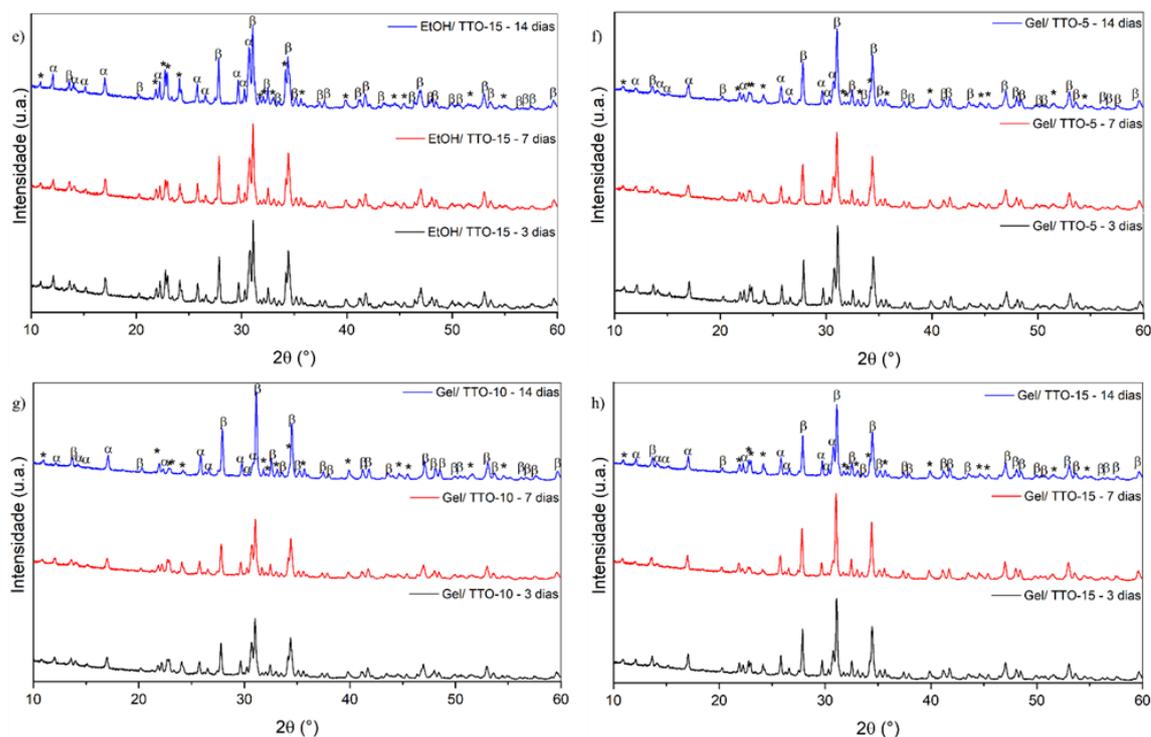


Figura 17: Difratomogramas de raios-X para os *scaffolds* de β -TCP/S53P4 após imersão em SBF: a) Sem revestimento, b) Gel/TTO-0, c) EtOH/TTO-5, d) EtOH/TTO-10, e) EtOH/TTO-15, f) Gel/TTO-5, g) Gel/TTO-10 e h) Gel/TTO-15.

A Figura 18 apresenta os resultados de viabilidade celular pelo método indireto dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4. Os ensaios foram realizados com concentração de 1 e 10 mg/mL (Figuras 18-a) e 18-b), respectivamente). De maneira geral, observa-se que a concentração de 1 mg/mL apresenta maior viabilidade celular que 10 mg/mL após 3 dias de incubação. Mesmo assim, a viabilidade para 10 mg/mL se mantém satisfatória, atingindo níveis acima de 70% em todas as condições, após 3 dias de incubação. A única diferença significativa entre *scaffolds* com e sem revestimento foi observada para o grupo EtOH/TTO-15, que apresentou menor viabilidade celular após um dia de incubação. Em todas as demais condições, foi apresentada viabilidade celular semelhante a dos *scaffolds* sem revestimento, indicando que, de maneira geral, a adição de TTO não foi prejudicial às células MG-63.

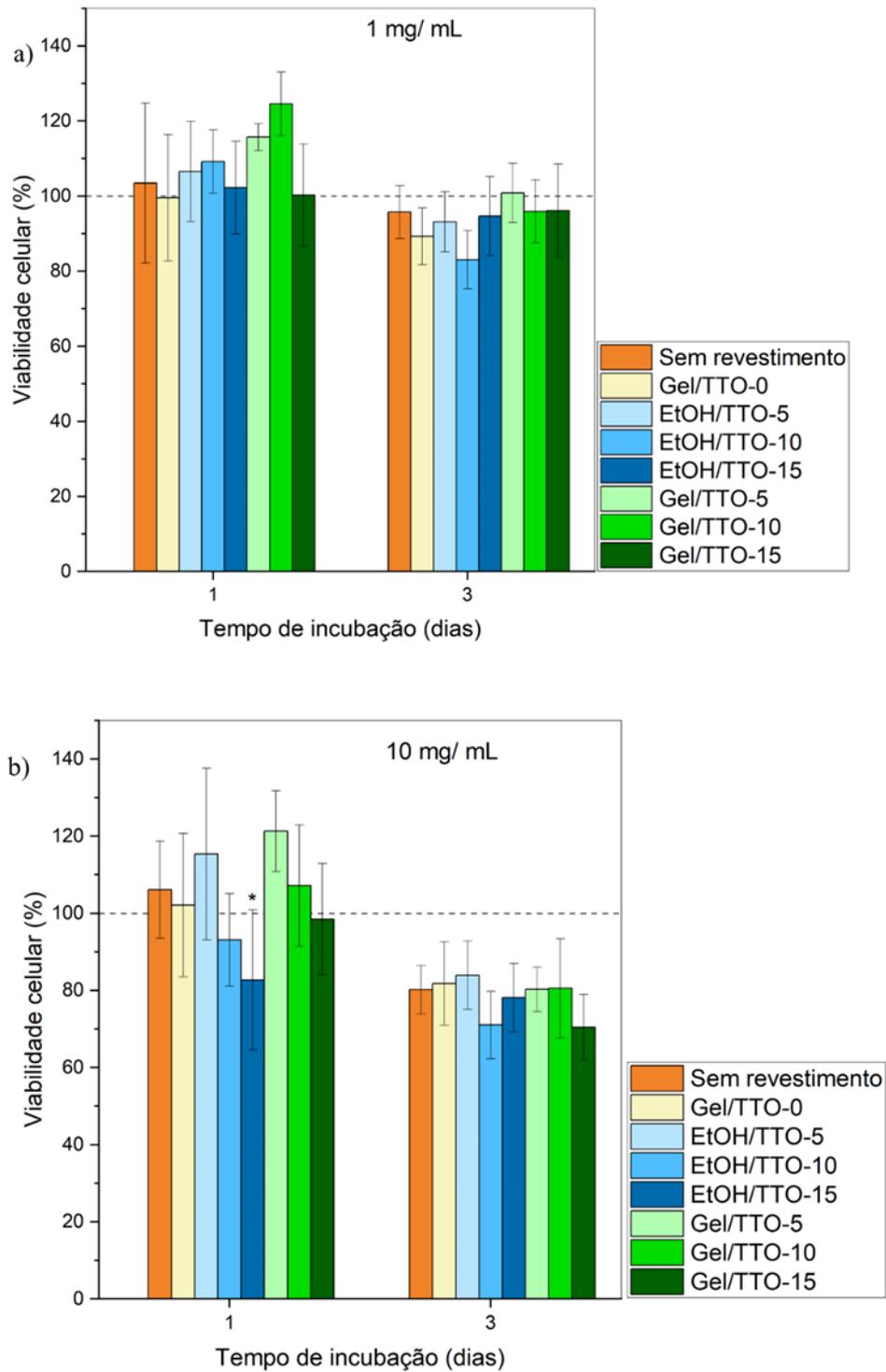


Figura 18: Viabilidade celular pelo método indireto dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO após 1 e 3 dias de incubação: a) 1 mg/mL e b) 10 mg/mL (* $p < 0.05$ em comparação com o *scaffolds* sem revestimento).

Os resultados de viabilidade celular por ensaio metabólico WST-8 e por análise de LDH obtidos pelo método direto são apresentados nas Figuras 19-a) e 19-b), respectivamente. Comparando os dois tipos de revestimento empregados, nota-se que o grupo revestido com gelatina apresentou resultados mais satisfatórios do que o grupo revestido com etanol/TTO, levando em conta os dois tipos de ensaio. Após 3 dias de incubação apenas o grupo EtOH/TTO-15 exibe menor viabilidade celular que o grupo sem revestimento. Em contrapartida, *scaffolds* revestidos com gelatina e TTO apresentaram resultados satisfatórios de análise de LDH, em comparação ao grupo revestido com etanol/TTO. Estes resultados mostram que o revestimento com gelatina colabora para a proliferação celular, conforme estudos da literatura (RAMALINGAM et al., 2019) (UNALAN; ENDLEIN; et al., 2019). De maneira especial, o grupo Gel/TTO-5 apresenta resultados de análise de LDH similares ao *scaffold* sem revestimento e Gel/TTO-0, que obtiveram baixa toxicidade às células, mesmo após 7 dias de incubação. O revestimento com etanol e TTO exibiu baixa viabilidade celular e alta citotoxicidade para todas as concentrações utilizadas.

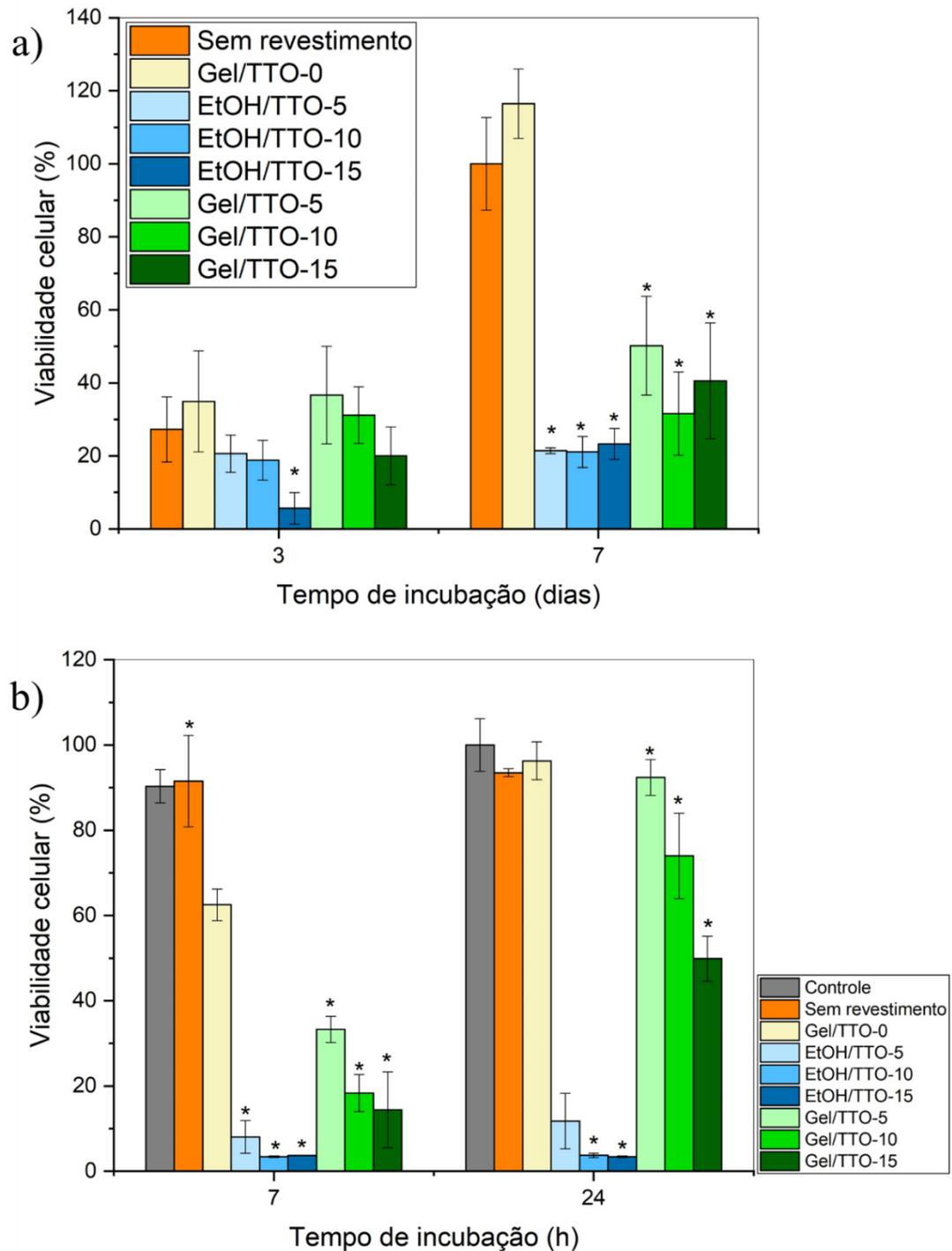


Figura 19: Estudos com célula MG-63 pelo método direto: a) viabilidade por ensaio metabólico WST-8 (* $p < 0.05$ em comparação com o *scaffolds* sem revestimento) e b) viabilidade por análise de LDH (* $p < 0.05$ em comparação com o controle) dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO.

A Figura 20 apresenta as imagens obtidas por microscopia de fluorescência e por microscopia eletrônica de varredura após a fixação das células. *Scaffolds* sem revestimento e revestidos apenas com gelatina (Gel/TTO-0) apresentaram uma grande quantidade de pontos verdes e um bom espalhamento da cor vermelha ao longo do filamento, indicando uma grande quantidade de núcleos de célula e uma rede bem espalhada do citoesqueleto na superfície dos *scaffolds*. Os revestimentos Gel/TTO-5 e Gel/TTO-10 também obtiveram uma boa adesão celular, contendo um elevado número de núcleos de células e a formação da rede de citoesqueleto ao longo da superfície dos filamentos dos *scaffolds*. Gel/TTO-15 e todo o grupo revestido com etanol/TTO apresentou baixa adesão celular, contendo apenas poucos núcleos espalhados ao longo da superfície e ausência da formação da rede de citoesqueleto das células, o que indica que as mesmas se encontram aderidas e vivas. Mesmo assim, o revestimento Gel/TTO-15 apresenta melhores resultados em comparação a todo o grupo revestido por etanol. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade, de forma que a camada formada pela gelatina de maneira a controlar a liberação de TTO e sua ação prejudicial às células. Tais resultados também reforçam a melhora na resposta biológica dos *scaffolds* obtida com o revestimento de gelatina.

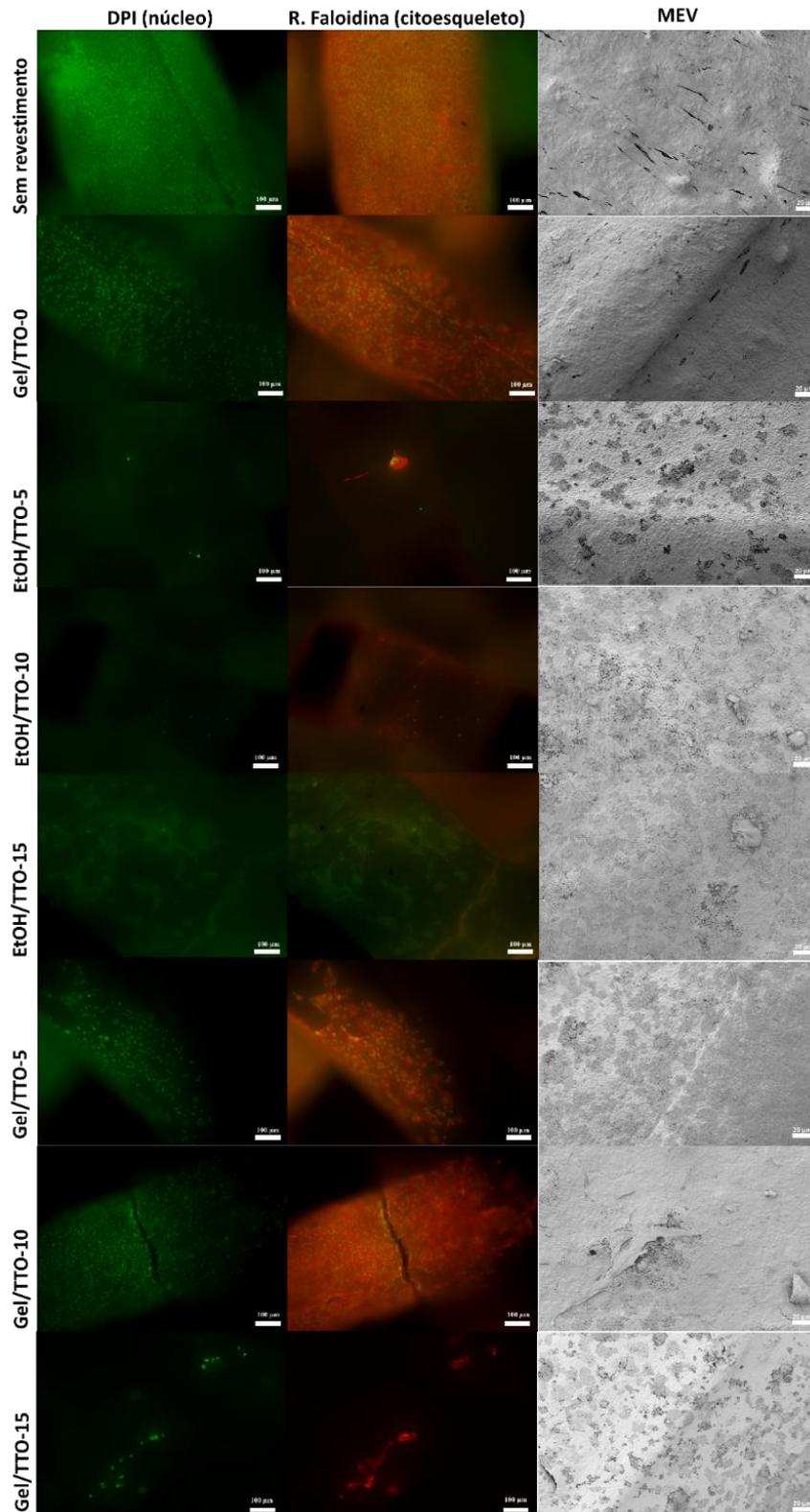


Figura 20: Imagens de microscopia de fluorescência com corantes DAPI e rondomina faloidina (barra de escala de 100 μm) e imagens de MEV (barra de escala de 20 μm) das células MG-63 fixadas na superfície dos *scaffolds* sem revestimento, Gel/TTO-0, EtOH/TTO-5, EtOH/TTO-10, EtOH/TTO-15, Gel/TTO-5, Gel/TTO-10 e Gel/TTO-15.

Hayes e colaboradores reportaram que a toxicidade do TTO ocorre entre 20 a 2800 $\mu\text{g/mL}$ para a maioria dos tipos de células humanas (HAYES et al., 1997). Homeyer e colaboradores encontraram resultados em que a citotoxicidade do TTO estaria também conectada ao tempo de exposição ao óleo (HOMEYER et al., 2015). Söderberg e colaboradores reportaram que a atividade citotóxica do TTO ocorre para concentrações acima de 100 $\mu\text{g/mL}$ após 1 hora de exposição (SÖDERBERG; JOHANSSON; GREF, 1996). De acordo com o ensaio de liberação, os *scaffolds* de β -TCP/S53P4 apresentaram um comportamento de liberação lento e alcançaram concentrações acima das reportadas por Söderberg e colaboradores, cerca de 200 a 500 $\mu\text{g/mL}$ após 7 dias. Portanto, isso explica a citotoxicidade de todas as composições revestidas com TTO.

No entanto, mesmo após 7 dias de exposição, os *scaffolds* de β -TCP/S53P4 contendo TTO apresentaram alta viabilidade de células MG-63 nos ensaios indiretos, demonstrando que a quantidade de TTO liberada no primeiro dia possuía baixa citotoxicidade, independentemente do tipo de revestimento empregado. Comparando os *scaffolds* com e sem TTO nos ensaios diretos, uma diminuição na viabilidade celular é observada. Entretanto, *scaffolds* revestidos com gelatina e baixas concentrações de TTO (5 e 10%) apresentaram citotoxicidade baixa e similar ao *scaffolds* sem revestimento, além de obterem boa adesão celular conforme apresentado nas imagens de microscopia de fluorescência.

4.7. Avaliação da atividade antibacteriana dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO

A atividade antibacteriana dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 com e sem revestimento foi avaliada contra *S. aureus*. Medidas de densidade óptica para 7 e 24 horas de incubação são mostradas na Figura 21-a). A Figura 21-b) apresenta os resultados de viabilidade da bactéria

por medidas de redução de Alamar *blue*. Com relação aos *scaffolds* revestidos com etanol/TTO, os maiores teores de TTO (10 e 15%) apresentaram menores valores de turbidez. Após 7 horas de incubação, todas as composições contendo TTO e o *scaffolds* sem revestimento também apresentaram menor turbidez do que o controle, indicando que o TTO e o S53P4 apresentaram ação antibacteriana. Após 24 horas de incubação, o grupo sem revestimento não apresentou atividade bactericida, mostrando a inabilidade do S53P4 em maiores tempos de incubação. Com exceção do grupo EtOH/TTO-5, todos os revestimentos empregados foram capazes de inibir o crescimento da bactéria, com menores valores de turbidez do que o grupo controle. Com relação aos resultados de redução de Alamar *blue*, observa-se que a adição de TTO teve diferença significativa na atividade antibacteriana em todas as condições de revestimento. Pode-se observar que as maiores reduções acontecem para os grupos EtOH/TTO-10 e EtOH/TTO-15. Para EtOH/TTO-5 a redução de Alamar *blue* não é significativa quando comparada com as demais condições do grupo revestido com etanol. Para o grupo revestido com gelatina, resultados similares foram obtidos para todas as concentrações de TTO adotadas.

O óleo de melaleuca é conhecido pela sua boa propriedade antibacteriana (OCAK; GÜLÜMSER; BALOĞLU, 2011) (GAO et al., 2020b) (LEE et al., 2013). Os componentes a base de terpenos são os principais responsáveis na inibição de *S. aureus*. A incorporação de TTO e a otimização do revestimento são importantes para o desempenho da liberação e ação do TTO contra bactérias (GE, Yan; GE, 2015). De maneira geral, pode-se afirmar que o revestimento com etanol/TTO em maiores teores de TTO foi positivo para a inibição de *S. aureus*. Com relação ao grupo revestido com gelatina, não houve diferença significativa na inibição com o aumento de TTO, nas três concentrações utilizadas.

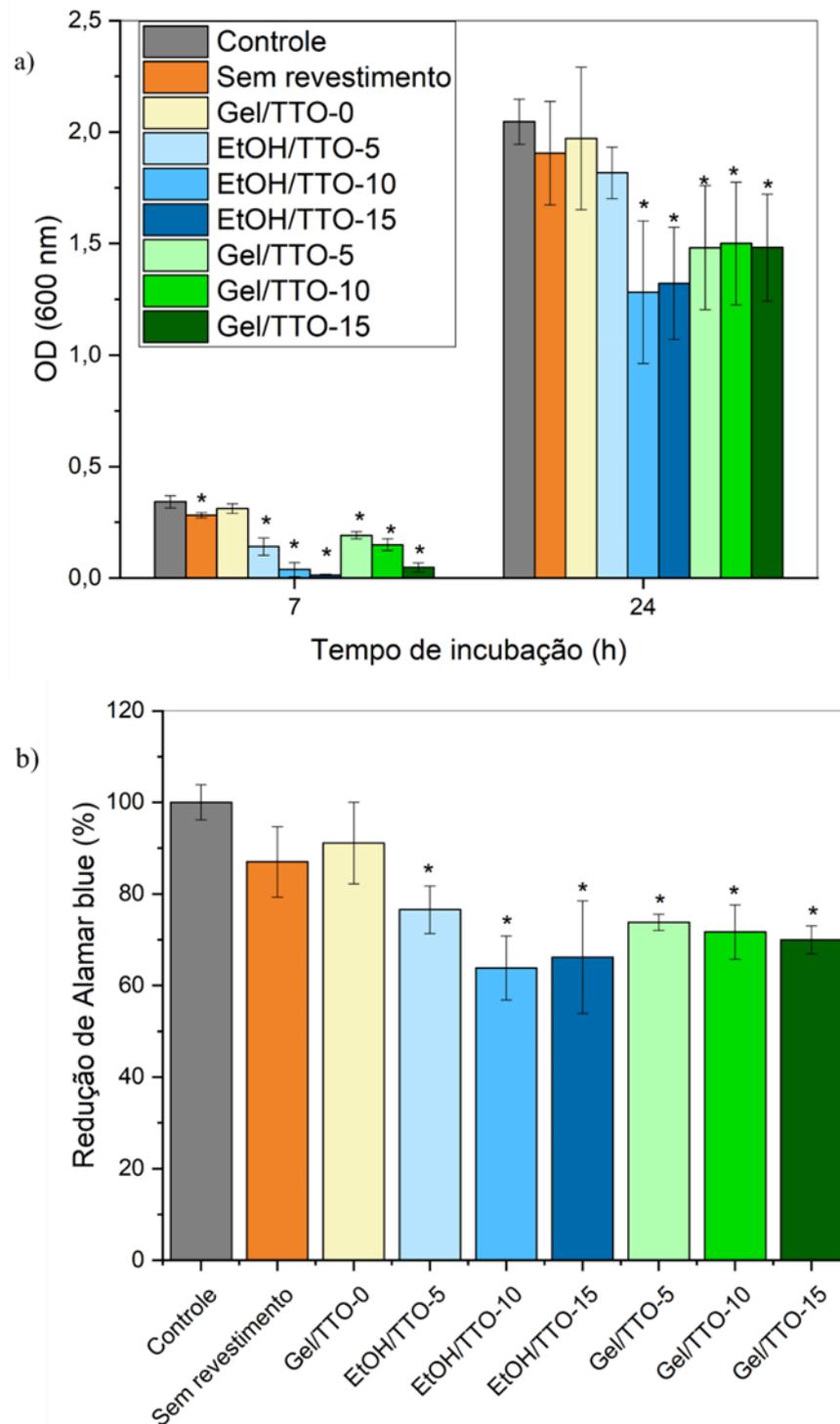


Figura 21: Atividade antibacteriana dos *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO após 7 e 24 horas de incubação: a) medidas de densidade óptica b) atividade metabólica da *S. Aureus* por redução de Alamar blue (* $p < 0.05$ em comparação com o controle).

O gráfico da contagem de formação de colônias e as imagens de cada placa Petri para a diluição de 10^{-13} após 24 horas de incubação é apresentado na Figura 22. Comparando com o controle, a adição de TTO causa um decréscimo na formação de colônias em todos os revestimentos empregados. Para o grupo revestido com etanol/TTO, a menor formação de colônias foi obtida para 5% TTO, já para o grupo de gelatina tal fato foi alcançado para 10% de TTO. Comparando os dois tipos de revestimentos adotados, nota-se que o revestimento com gelatina apresenta maior inibição à formação de colônias do que o grupo revestido com etanol/TTO. Esse resultado mostra que mesmo com a formação da barreira de gelatina, responsável pelo controle da liberação de TTO (OCAK; GÜLÜMSER; BALOĞLU, 2011), esse tipo de revestimento foi mais efetivo na inibição da formação de novas colônias de bactéria. A turbidez do grupo revestido com gelatina atingiu valores superiores ao grupo revestido com etanol, porém sabe-se que a biomassa morta pode influenciar nas medidas de densidade óptica, o que justifica a melhor ação do grupo revestido com gelatina frente a formação de novas colônias de bactéria. De maneira geral, comparando ambos os métodos de revestimento adotados, observa-se que o grupo revestido com gelatina apresentou melhor performance do que o grupo revestido com etanol/TTO, de forma a ter menor citotoxicidade a células MG-63, ao mesmo tempo em que apresentou inibição satisfatória a bactéria *S. aureus*.

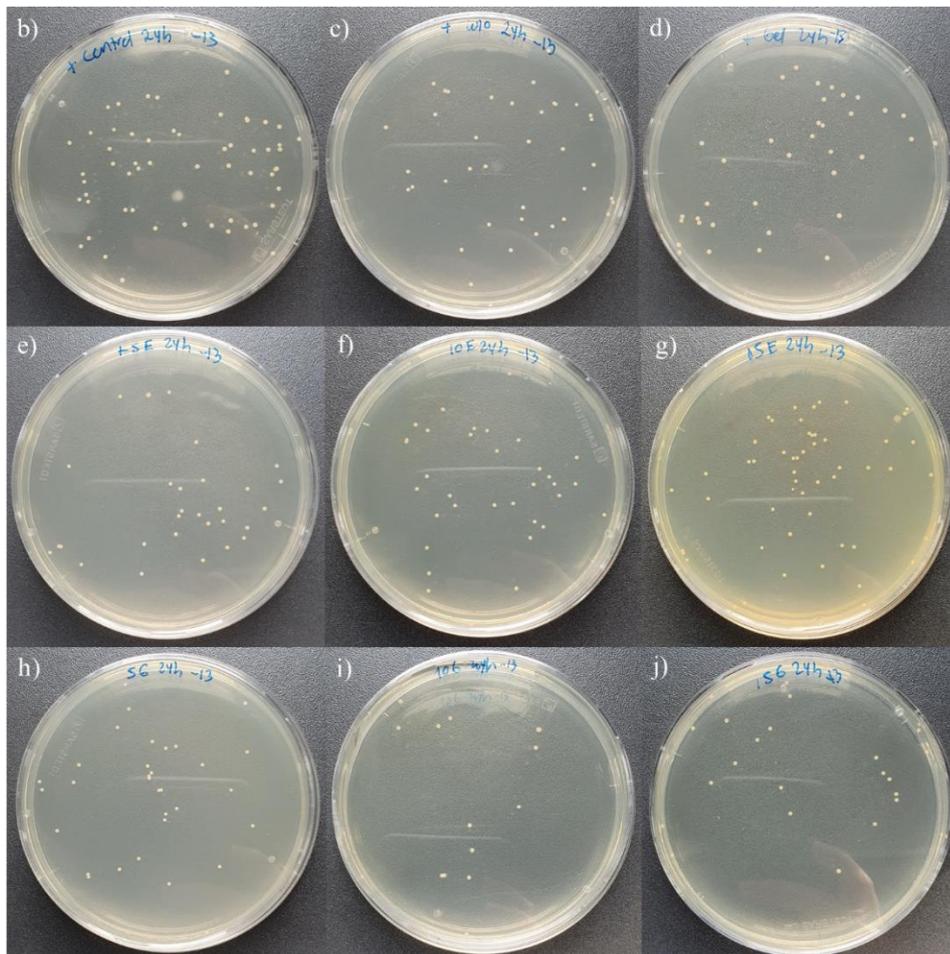
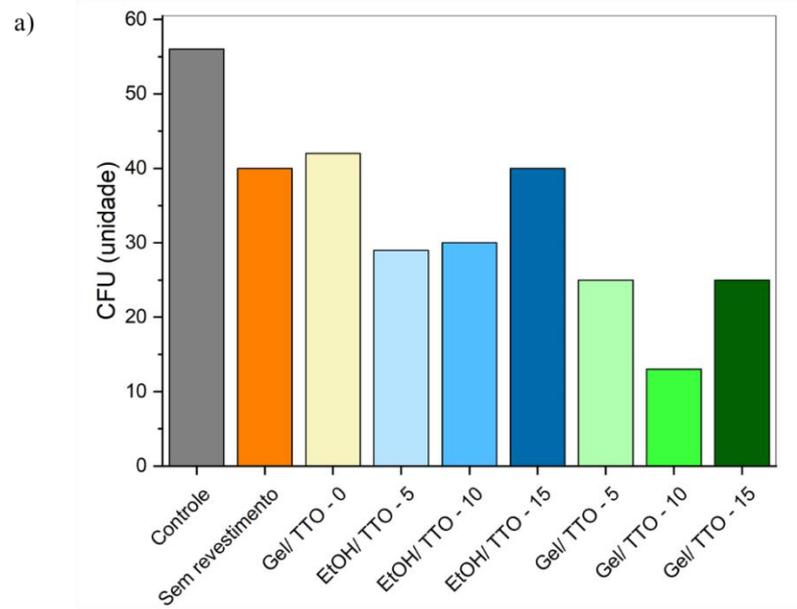


Figura 22: Formação de unidades de colônia para a diluição de 10^{-13} para *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com TTO após 24 horas de incubação: a) Formação de colônias em cada grupo, b) Controle, c) *scaffolds* sem revestimento, d) Gel/TTO-0, e) EtOH/TTO-5, f) EtOH/TTO-10, g) EtOH-15, h) Gel/TTO-5, i) Gel/TTO-10 e j) Gel/TTO-15.

5. Conclusão

Conclui-se que os *scaffolds* de β -TCP/S53P4 foram obtidos com sucesso pelo método de impressão 3D e a incorporação do óleo de melaleuca se mostrou eficaz na inibição do crescimento do microorganismo *S. aureus*.

As pastas cerâmicas de β -TCP e β -TCP/S53P4 apresentaram um comportamento reológico adequado, seguindo o modelo de Herschel-Bulkley, para o processamento por impressão 3D obtendo um padrão de estrutura sem ocorrências de colapso. A adição de S53P4 foi benéfica para o aumento de resistência mecânica dos *scaffolds*, a qual passou de $0,35 \pm 0,07$ MPa para $2,37 \pm 1,02$ MPa, atingindo o nível de resistência do osso trabecular. Devido a essa melhora, *scaffolds* de β -TCP/S53P4 foram escolhidos para a continuidade dos estudos.

Em relação as duas metodologias de revestimento com óleo de melaleuca aplicadas, os resultados do ensaio de liberação, molhabilidade e imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que o revestimento com etanol/TTO permite uma maior exposição do TTO, contando com um padrão de liberação e hidrofobicidade regular com o aumento da concentração de TTO utilizada. Com relação ao revestimento de gelatina, foi observado que esse polímero forma uma camada na superfície do *scaffolds*, sendo responsável por atuar como uma barreira de controle à liberação do TTO.

A avaliação da atividade antibacteriana dos *scaffolds* frente à bactéria *S. aureus* demonstrou que o aumento no teor de TTO, colabora positivamente para a inibição do patógeno. Em comparação aos tipos de revestimento empregados, *scaffolds* revestidos com etanol apresentaram maior inibição nas medidas de densidade óptica e na viabilidade por

redução de Alamar *blue*. Entretanto, *scaffolds* revestidos com gelatina foram mais eficientes em evitar a formação de novas colônias de bactéria.

Nos ensaios de viabilidade celular por WST-8 e análise de LDH, foi observado que *scaffolds* revestidos com etanol/TTO apresentaram menor adesão e proliferação celular. Já *scaffolds* revestidos com gelatina alcançaram melhores resultados. Acredita-se que a barreira formada pela camada de gelatina tenha sido benéfica para o controle da citotoxicidade do TTO e também um ambiente agradável a adesão das células MG-63. Dessa forma, pode-se concluir que o revestimento de gelatina com TTO obteve melhor desempenho.

Os resultados aqui apresentados se mostraram relevantes na obtenção de *scaffolds* de geometria personalizada e multifuncionais possíveis de serem aplicados na engenharia tecidual, abrindo espaço para novas pesquisas no âmbito do desenvolvimento de soluções para problemas e infecções ósseas.

5.1. Sugestões para trabalhos futuros

Esse trabalho apresentou êxito na obtenção de *scaffolds* de β -TCP/S53P4 revestidos com óleo de melaleuca. Para a obtenção de melhores resultados, propõe-se as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Desenvolvimento de *scaffolds* com diferentes geometrias pelo método de impressão 3D;
- Maior incorporação de S53P4, buscando verificar sua influência na resposta biológica *in vitro* e atividade antibacteriana frente a outros microorganismos;

- Otimização do revestimento dos *scaffolds* com gelatina e óleo de melaleuca, visando obter um maior controle da liberação do óleo e, assim, controlar sua toxicidade e maximizar sua atividade antibacteriana;
- Estudo da ação dos *scaffolds* revestidos com óleo de melaleuca frente a outros agentes patogênicos;
- Estudo da aplicação dos *scaffolds* revestidos em ensaios *in vivo*.

5.2. Trabalhos gerados a partir dos resultados dessa pesquisa

ALVES, A. P. N., OLIVEIRA, R. L. M. S, ALVES, A. P. N., FERREIRA, I. M., DE MORAES, E. G., OLIVEIRA, A. P. N., OSPINA, M. A., HARTMANN, M., BOCCACCINI, A. R., TRICHÊS, E. S. **3D printed β -TCP/ S53P4 bioactive glass composite scaffolds coated with tea tree oil: optimization and evaluation of the antibacterial activity.** Submetido e aceito: 31st Conference of the European Society for Biomaterials – ESB, Porto, Portugal, Setembro, 2021.

OLIVEIRA, R. L. M. S, ALVES, A. P. N., FERREIRA, I. M., DE MORAES, E. G., OLIVEIRA, A. P. N., MOTISUKE, M., TRICHÊS, E. S. **Scaffolds vitrocerâmicos derivados de biovidro S53P4 por impressão 3D.** 64^o Congresso Brasileiro de Cerâmica – CBC, Águas de Lindóia, Brasil. Dezembro/ 2020.

ARAÚJO, A. F.; ALVES, A. P. N.; MOTISUKE, M. TRICHÊS, E. S. **Desenvolvimento e manufatura de uma mini injetora para pastas cerâmicas.** VII Simpósio de Ciência e Engenharia de Materiais - SiCEMat, São José dos Campos, Brasil Outubro/2019. Prêmio Mérito Científico.

6. Apêndice

6.1. Apêndice I: Estudo preliminar para obtenção das pastas cerâmicas de β -TCP/alginate de sódio: otimização dos parâmetros de processo

6.1.1. Justificativa

O desenvolvimento de *scaffolds* por manufatura aditiva (MA) tem sido considerado uma potencial solução para problemas ósseos, colaborando com o progresso da engenharia tecidual. Dentre as muitas técnicas de MA, o método de impressão 3D se destaca pela obtenção de estruturas de alta complexidade a partir da extrusão de pastas cerâmicas (SONG et al., 2020).

A otimização do preparo da pasta cerâmica tem forte influência nas propriedades do *scaffold* obtido. A determinação do teor de sólidos, escolha do tipo e concentração de aditivos orgânicos, método de mistura e caracterização reológica são importantes aspectos a serem considerados durante a etapa de preparação das pastas cerâmicas (PENG; ZHANG; DING, 2018).

Dentre os materiais utilizados para obtenção de pastas, os fosfatos tricálcicos (TCPs) são de grande interesse devido a sua alta biocompatibilidade, alta taxa de reabsorção e estímulo a osteocondução (MA et al., 2019). Dentre as fases que constituem dos TCPs, a fase β se destaca por ser de fácil obtenção e altamente biocompatível (RATNER et al., 2013) (CHAAIR; LABJAR; BRITEL, 2017) (RODRIGUES et al., 2012).

Para a formação da pasta cerâmica, diversos aditivos podem ser utilizados, tais como alginate de sódio e polietilenoglicol (PEG), cuja eficiência nesse tipo de aplicação já é demonstrada na literatura (WANG et al., 2020).

A otimização das propriedades da pasta cerâmica garante sua adequação ao processo de impressão 3D, e viabiliza a produção de *scaffolds* com potencial uso na engenharia tecidual. Dessa forma, este estudo tem como objetivo trazer um conhecimento preliminar da obtenção de pastas cerâmicas de β -TCP, bem como testes iniciais de impressão.

6.1.2. Materiais e métodos

6.1.2.1. Preparação das pastas cerâmicas

Essa etapa foi realizada no Laboratório VITROCER da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC em parceria com o Prof. Dr. Antônio Pedro Novaes de Oliveira no mês de julho de 2019.

A pasta de β -TCP preparada contendo 53% - wt. de sólidos e 2,5% - wt. de polietilenoglicol (PEG 400 – Synth) e 2% - wt de solução de alginato de sódio (Vetec - V003384) O PEG foi utilizado para melhorar a adesão entre as camadas impressas, enquanto o alginato atuou como ligante. A pasta foi homogeneizada em misturador de hélice (RW 20 S32, IKA® Works Inc., EUA) por 10 min. Foi retirada uma pequena alíquota da pasta e levada para avaliação reológica em reômetro rotacional (Hooke Viscotester IQ). Avaliou-se o comportamento da viscosidade e tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, variando-a de 0 a 600 s⁻¹.

6.1.2.2. Testes preliminares de impressão

Os *scaffolds* de β -TCP foram impressos em impressora 3D (DuraPrinter - E01), com geometria de paralelepípedo (25 x 25 x 15 mm) e padrão de porosidade estipulado em

software Repetier Host (60%). Foi utilizado um bico de impressão com diâmetro de 580 μm e velocidade de 10 mm/s. Após a impressão os *scaffolds* passaram por secagem a temperatura ambiente e umidade controlada por 24 horas e, posteriormente, sinterização a 1150 $^{\circ}\text{C}$, por 120 minutos.

Os *scaffolds* foram caracterizados por difração de raios X (DRX) (Rigaku – Ultima IV) para identificação das fases cristalinas formadas; estereomicroscopia (Feldmann - FWL SMZ - 7,5/FWL – 150) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (FEI - INSPECT S50) para avaliação da sua morfologia, após preparação ceramográfica (lixas 220 e 1200).

A porosidade dos *scaffolds* foi determinada a partir do método geométrico, que leva em conta a densidade teórica ($\rho_{\text{teórico}} = \rho_{\beta\text{-TCP}} = 3,07 \text{ g/cm}^3$) e a densidade geométrica (ρ_{scaffold}) obtida a partir da medida das dimensões (altura e diâmetro) e da massa das amostras. A Equação F representa o método de obtenção da porosidade geométrica.

$$P = \left[1 - \left(\frac{\rho_{\text{scaffold}}}{\rho_{\text{teórico}}} \right) \right] * 100 \quad \text{(Equação F)}$$

Para verificar a resistência mecânica dos *scaffolds* realizou-se ensaios de compressão uniaxial (Emic DL20000, Célula 2 kN) a temperatura ambiente com velocidade de carregamento de 1 mm.min-1.

6.1.3. Resultados e Discussão

A Figura 23 apresenta a caracterização reológica da pasta de $\beta\text{-TCP}$, a partir das curvas de tensão de cisalhamento e viscosidade em relação à taxa de cisalhamento. Observa-se um comportamento da tensão similar a um fluido de Bingham, padrão típico de suspensões

que contém aditivos poliméricos (EQTESADI et al., 2014). Nesse caso ocorre perda gradual da estrutura enovelada das moléculas do polímero, inicialmente em repouso, tornando-as alinhadas ao fluxo submetido pelo aumento da taxa de cisalhamento (EQTESADI et al., 2014). Ao mesmo tempo nota-se que a viscosidade é reduzida conforme a taxa de cisalhamento aumenta, comportamento similar ao de um material com características pseudoplásticas. Ambas as observações demonstram, segundo os critérios de Peng e colaboradores, a possibilidade de extrusão da pasta juntamente com a retenção da forma da peça final (PENG; ZHANG; DING, 2018). Entretanto, é necessário constatar que a viscosidade da pasta se situa nos valores mínimos dos critérios sugeridos por Peng e colaboradores (em torno de 10 Pa.s) (PENG; ZHANG; DING, 2018), de forma que a peça final possa sofrer alguns defeitos na estrutura. Acredita-se que esse efeito possa ser revertido com o aumento do teor de sólidos ou ajuste na concentração do aditivo polimérico, fatores que interferem diretamente na viscosidade da pasta.

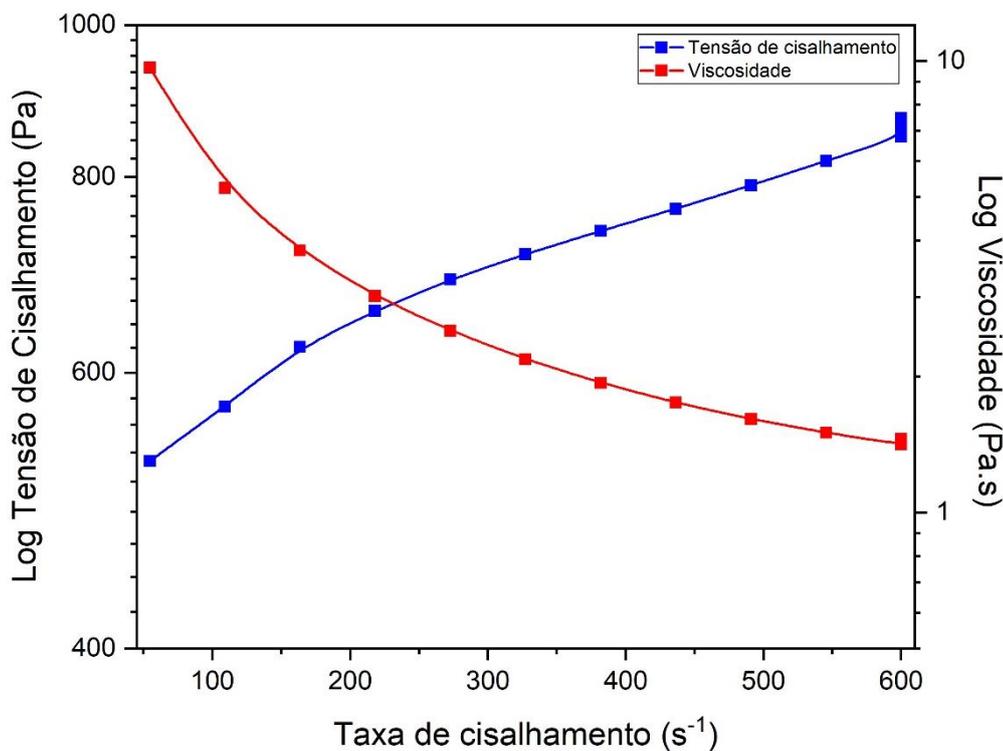


Figura 23: Curvas de fluxo para a pasta de β -TCP.

O difratograma de raios X dos *scaffolds* de β -TCP é demonstrado na Figura 24. É possível observar apenas a presença da fase β -TCP (JCPDS- 09-0169), demonstrando que não houve formação de outras fases durante o processamento e a sinterização.

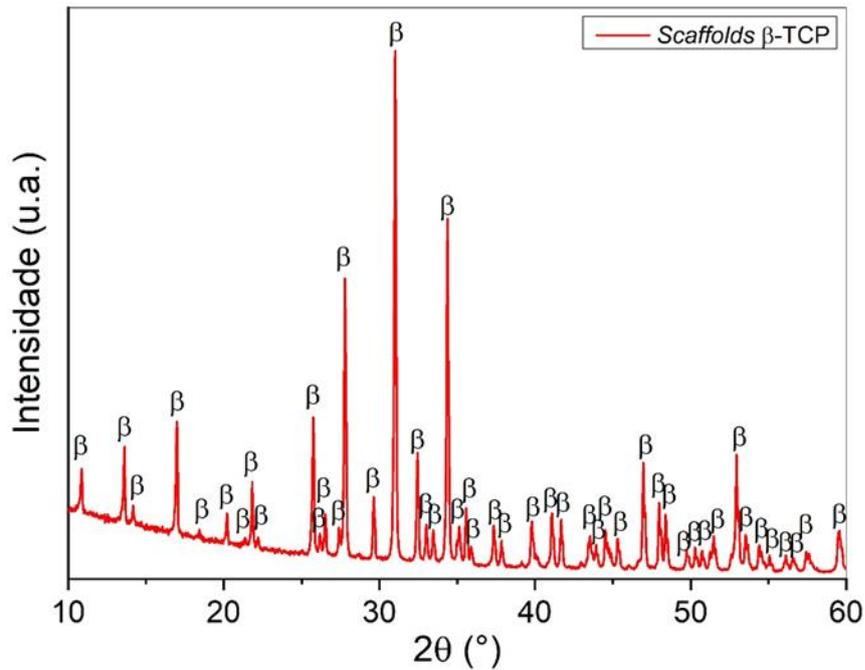


Figura 24: Difratograma de raios X para o *scaffold* de β -TCP (β = β -TCP, JCPDS: 09-0169).

As Figuras 25-a) e 25-b) apresentam imagens da morfologia dos *scaffolds* obtidas em estereomicroscópio, após preparação ceramográfica. É possível observar, na Figura 25-a) que, de maneira geral, a acomodação das camadas de pasta durante a impressão foi satisfatória, pois não foi observado colapso na estrutura da base. Entretanto, a Figura 25-b) mostra pequenos defeitos de coesão na área central do *scaffold*. Acredita-se que esses defeitos possam ser originados por conta das características reológicas da pasta.

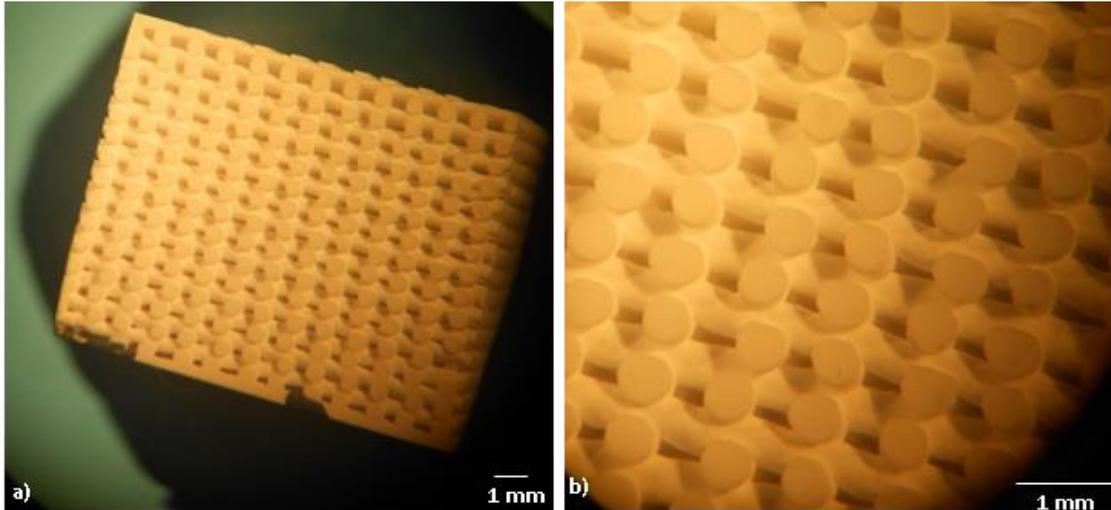


Figura 25: Fotografias dos *scaffolds* 3D de β -TCP por estereomicroscopia: a) aumento de 20X; b) aumento de 60X.

As micrografias dos *scaffolds* de β -TCP são mostradas nas Figuras 26-a), 26-b) e 26-c). Conforme observado nas imagens de estereomicroscopia, as micrografias da Figura 20 comprovam que os *scaffolds* apresentam não uniformidade de arranjo dos filamentos em determinados pontos. Essa observação pode estar relacionada às propriedades reológicas da pasta, que apresenta viscosidade relativamente baixa. Acredita-se que o aumento do teor de sólidos ou ajuste na concentração dos aditivos possa influenciar positivamente na otimização do comportamento reológico da pasta e sanar esses defeitos na estrutura do *scaffold*. Também é possível observar que a parede do filamento não apresenta defeitos (tais como diferença de diâmetro ao longo do mesmo) o que leva a crer que apesar da baixa viscosidade da pasta não houve problemas de formação do filamento durante a extrusão.

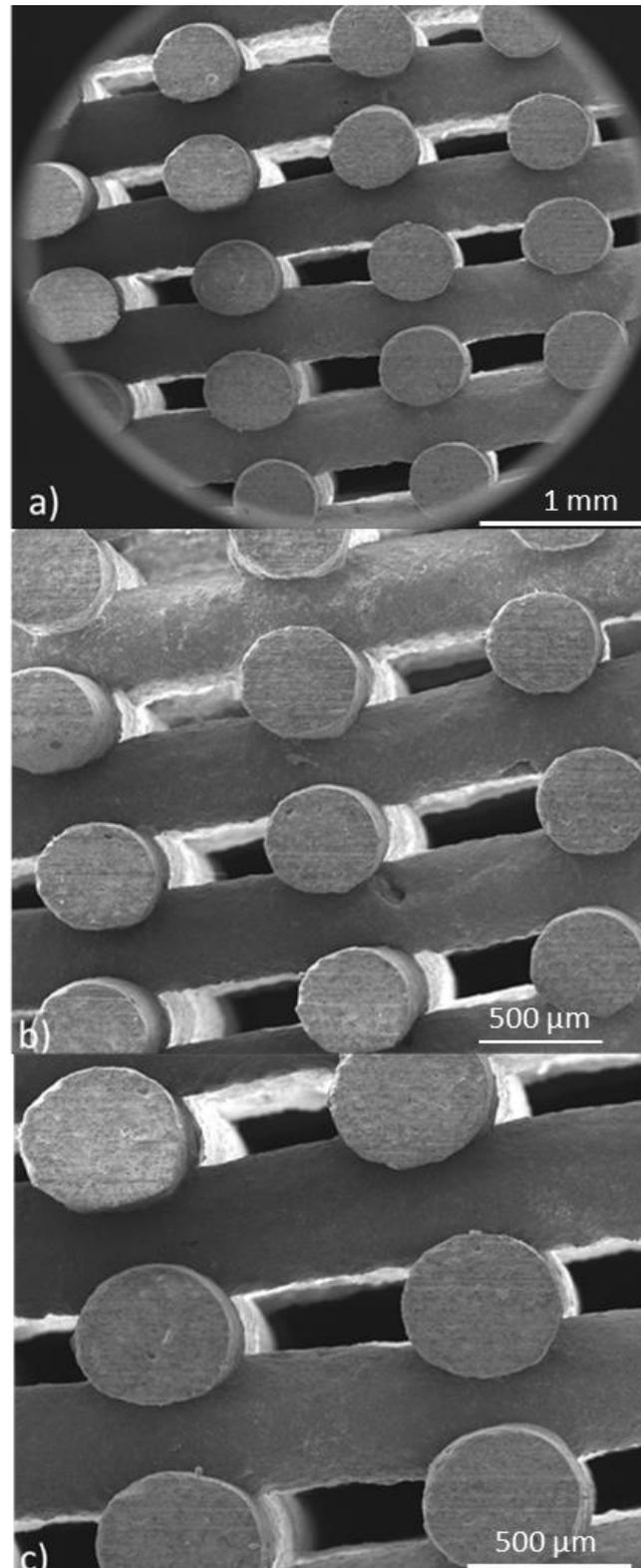


Figura 26: Micrografias de MEV dos *scaffolds* 3D de β -TCP: a) aumento de 80X; b) aumento de 120X; c) aumento de 150X.

A porosidade dos *scaffolds* de β -TCP foi de $63,3 \pm 2,0$ % e a resistência à compressão obtida foi de $6,8 \pm 2,2$ MPa. Tais resultados mostram que, apesar dos defeitos de acomodação na região central dos *scaffolds*, a resistência mecânica atinge valores dentro da faixa obtida para o osso esponjoso (2-12 MPa) (MARQUES et al., 2017) e a porosidade calculada se encontra dentro do projetado no *software*. Por conta da uniformidade obtida na estrutura de poros pelo método de impressão 3D, torna-se possível elevar a resistência mecânica da estrutura porosa. Entretanto, para aplicações envolvendo engenharia tecidual é necessário a presença de maior porosidade, associado à resistência mecânica. Dessa forma, a otimização dos parâmetros da pasta cerâmica e do processo se torna essencial para o desenvolvimento de *scaffolds* cerâmicos com adequadas propriedades.

6.1.4. Conclusão

Com o estudo preliminar foi possível caracterizar pastas de β -TCP contendo alginato de sódio e polietilenoglicol como aditivos, bem como realizar testes iniciais de impressão e caracterização de *scaffolds*. De maneira geral, os *scaffolds* obtidos nessa etapa apresentaram boa resistência mecânica devido à coesão e características reológicas da pasta extrudada. Entretanto, observou-se que a viscosidade da mesma se encontra nos valores mínimos dos critérios seguidos, de forma que defeitos do arranjo dos filamentos pudessem ser observados. Acredita-se que o ajuste em alguns fatores determinantes das propriedades reológicas como teor de sólidos e adequação dos aditivos orgânicos possam contribuir positivamente para a adequação da pasta cerâmica.

Referências Bibliográficas

- ABREU, M S; GALDINO, A G S. Caracterização microestrutural de compósitos de hidroxiapatita-alumina confeccionados pelo método da esponja polimérica TT. *Cerâmica*, v. 63, p. 34–38, 2017.
- AMNA, T. et al. Nigella Sativa-Coated Hydroxyapatite Scaffolds: Synergetic Cues to Stimulate Myoblasts Differentiation and Offset Infections. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. [publicado online antes da impressão, 16 de junho de 2021] , 2021.
- ARAÚJO, A. F. et al. Desenvolvimento e manufatura de uma mini injetora para pastas cerâmicas. *Simpósio de Ciência e Engenharia de Materiais*, 7, 2019, São José dos Campos.
- BAINO, F. *Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Ophthalmological Applications*. Elsevier Ltd., 2019.
- BAINO, F.; CADDEO, S.; VITALE-BROVARONE, C. Sintering effects of bioactive glass incorporation in tricalcium phosphate scaffolds. *Materials Letters*, v. 274, p. 128010, 2020.
- BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, v. 30, p. 546–554, 2012.
- BOSE, S.; SARKAR, N. natural medicinal compounds in bone tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, v. 38, p. 404–417, 2020.
- BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today*, v. 16, p. 496–504, 2013.
- BOYAN, B. D. et al. Bone tissue grafting and tissue engineering concepts. *Orthopedic surgery - fracture fixation, bone grafting, tendon and ligament repair*. Elsevier Ltd., v.6, p. 237-255, 2011.
- CHEN, Z. et al. 3D printing of ceramics: A review. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 39, p. 661–687, 2019.
- COMESAÑAA, R. et al. Tree-dimensional laser-assisted processing of bioceramics. *Physics Procedia*, v. 5, p. 193–201, 2010.
- COONEY, D. R.; COONEY, N. L. Gas gangrene and osteomyelitis of the foot in a diabetic patient treated with tea tree oil. *International Journal of Emergency Medicine*, v. 4, p. 2–5, 2011.
- DASH, Smruti Rekha; SARKAR, Ritwik; BHATTACHARYYA, Santanu. Gel casting of hydroxyapatite with naphthalene as pore former. *Ceramics International*, vol. 41, p. 3775-3790, 2015.
- EL FAWAL, G. et al. Fabrication of scaffold based on gelatin and polycaprolactone (PCL) for wound dressing application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 63, p. 1-8, 2021.
- FANG, B. et al. Extracellular matrix scaffold crosslinked with vancomycin for multifunctional antibacterial bone infection therapy. *Biomaterials*, v. 268, p.1-14, 2021.

- FEILDEN, E. et al. Robocasting of structural ceramic parts with hydrogel inks. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 36, p. 2525–2533, 2016.
- GADEA, C. et al. Hybrid inks for 3D printing of tall BaTiO₃-based ceramics. *Open Ceramics*. v. 6, p.100110 , 2021.
- GALLART-MATEU, D. et al. Fast authentication of tea tree oil through spectroscopy. *Talanta*, v. 189, p. 404–410, 2018.
- GALVÁN-CHACÓN, V. P. et al. Elucidating the role of 45S5 bioglass content in the density and flexural strength of robocast β -TCP/45S5 composites. *Ceramics International*, v. 44, p. 12717–12722, 2018.
- GAO, Fan et al. Long-lasting anti-bacterial activity and bacteriostatic mechanism of tea tree oil adsorbed on the amino-functionalized mesoporous silica-coated by PAA. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 188, p. 110784, 2020.
- GE, H. et al. Fabrication and microstructure of porous SiC ceramics using suspension emulsions as pore-forming agents. *Ceramics International*, v. 40, p. 11705–11711, 2014.
- GE, Y.; GE, M. Sustained broad-spectrum antimicrobial and haemostatic chitosan-based film with immersed tea tree oil droplets. *Fibers and Polymers*, v. 16, p. 308–318, 2015.
- HE, F.; TIAN, Y. Improvements in phase stability and densification of β -tricalcium phosphate bioceramics by strontium-containing phosphate-based glass additive. *Ceramics International*, v. 44, p. 11622–11627, 2018.
- HENCH, L. L. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 17, p. 967–978, 2006.
- HOMEYER, D. C. et al. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on filamentous fungi and toxicity to human cells. *Medical Mycology*. v. 53, p. 285-294 , 2015.
- HONG, C. et al. Ultra-high-porosity zirconia ceramics fabricated by novel room-temperature freeze-casting. *Scripta Materialia*, v. 60, p. 563–566, 2009.
- HUA, S. et al. Microstructures and properties of 45S5 bioglass® & BCP bioceramic scaffolds fabricated by digital light processing. *Additive Manufacturing*, v. 45, p. 102074, 2021.
- HUDECKI, A.; KIRYCZYŃSKI, G.; ŁOS, M. J. Biomaterials, definition, overview. *Stem cells and biomaterials for regenerative medicine*, Elsevier, p. 85–98, 2018.
- HULSEN, D. J. et al. S53P4 bioactive glass. *Management of Periprosthetic Joint Infections*, p. 69-80, 2016.
- KHANG, G.; KIM, M. S.; LEE, H. B. *Manuals in biomedical research: a manual for biomaterials/scaffold fabrication technology*. World Scientific, 2007.
- KOKUBO, T. et al. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 24, p. 721–734, 1990.
- KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, v. 27, p. 2907–2915, 2006.
- KUNJALUKKAL PADMANABHAN, S. et al. Wollastonite/hydroxyapatite scaffolds with

improved mechanical, bioactive and biodegradable properties for bone tissue engineering. *Ceramics International*, v. 39, p. 619–627, 2013.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Advances in tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 51, p. 8–12, 2016.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. *Tissue Engineering. Science*, v. 260, p. 920–923, 1993.

LEE, C. J. et al. Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 21, p. 169–176, 2013.

LOPES, J. H. et al. Hierarchical structures of β -TCP/45S5 bioglass hybrid scaffolds prepared by gelcasting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 62, p. 10–23, 2016.

MA, Y. et al. 3D printing of bioglass-reinforced β -TCP porous bioceramic scaffolds. *Journal of Materials Science*, v. 54, n. 14, p. 10437–10446, 2019.

MALA, R.; RUBY CELSIA, A. S. Bioceramics in orthopaedics: A review. *Fundamental Biomaterials: Ceramics*. pp. 195-221, 2018.

MAN, A. et al. Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. *Pathogens*, v. 8, p. 1–11, 2019.

MASSERA, J. et al. Crystallization mechanism of the bioactive glasses, 45S5 and S53P4. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 95, p. 607–613, 2012.

MOREIRA, T. M. S. Estudo da composição química, citotoxicidade e alvos da atividade antifúngica de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) e de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae). Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, p. 153, 2010.

OCAK, B.; GÜLÜMSER, G.; BALOĞLU, E. Microencapsulation of melaleuca alternifolia (tea tree) oil by using simple coacervation Method). *Journal of Essential Oil Research*, v. 23, p. 58–65, 2011.

PELTOLA, M.; KINNUNEN, I.; AITASALO, K. Reconstruction of orbital wall defects with bioactive glass plates. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 66, p. 639–646, 2008.

PENG, E.; ZHANG, D.; DING, J. Ceramic robocasting: recent achievements, potential, and future developments. *Advanced Materials*, v. 30, p. 1–14, 2018.

PERIĆ KAČAREVIĆ, Ž. et al. An introduction to bone tissue engineering. *International Journal of Artificial Organs*, v. 43, p. 69–86, 2020.

PINA, S.; REIS, R. L.; OLIVEIRA, J. M. *Ceramic biomaterials for tissue engineering*. Elsevier Ltd., 2018.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quimica Nova*, v. 38, p. 957–971, 2015.

POLO, L. et al. Antimicrobial activity of commercial calcium phosphate based materials functionalized with vanillin. *Acta Biomaterialia*. v. 81, p. 293-303, 2018.

RAMALINGAM, R. et al. Poly- ϵ -caprolactone/gelatin hybrid electrospun composite

nanofibrous mats containing ultrasound assisted herbal extract: Antimicrobial and cell proliferation study. *Nanomaterials*, v. 9, 2019.

RATNER, B. D et al. A history of biomaterials artificial hearts and organ perfusion. *biomaterials science: An Introduction to Materials in Medicine*, p. xli–liii, 2013.

REITER, T. et al. Bioactive glass based scaffolds coated with gelatin for the sustained release of icariin. *Bioactive Materials*, v. 4, p. 1–7, 2019.

ROOHANI-ESFAHANI, S. I.; NEWMAN, P.; ZREIQAT, H. Design and Fabrication of 3D printed Scaffolds with a Mechanical Strength Comparable to Cortical Bone to Repair Large Bone Defects. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–8, 2016.

SALMAN, R.; MCGRAW, M.; NAFFAA, L. Chronic Osteomyelitis of Long Bones: Imaging Pearls and Pitfalls in Pediatrics. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 2021.

SATHIYASEELAN, A. et al. Chitosan-tea tree oil nanoemulsion and calcium chloride tailored edible coating increase the shelf life of fresh cut red bell pepper. *Progress in Organic Coatings*, v. 151, p. 106010, 2021.

SELA, J. J.; BAB, I. A. Principles of bone regeneration. *Principles of Bone Regeneration*, p. 1–154, 2012.

SIENKIEWICZ, M. et al. The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. *Burns*, v. 43, p. 310–317, 2017.

SÖDERBERG, T. A.; JOHANSSON, A.; GREF, R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology*, v. 107, p. 99–109, 1996.

SOUSA, E. de et al. Espumas vítreas do sistema Li₂O-ZrO₂-SiO₂-Al₂O₃ produzidas pelo processo gelcasting. *Cerâmica*, v. 55, p. 157–162, 2009.

SOUSA, E. et al. LZSA glass ceramic foams prepared by replication process. *Advances in Applied Ceramics*, v. 104, p. 22–29, 2005.

SPIRANDELI, B. R. et al. Evaluation of colloidal and polymeric routes in sol-gel synthesis of a bioactive glass-ceramic derived from 45S5 bioglass. *Ceramics International*, v. 46, p. 20264–20271, 2020.

STANDARDIZATION, F O R; NORMALISATION, D E. *International Standard Iso*. v. 1987, 1987.

SUNG, J. H. et al. Production of porous calcium phosphate (CaP) ceramics with highly elongated pores using carbon-coated polymeric templates. *Ceramics International*, v. 38, p. 93–97, 2012.

TABARD, L. et al. Robocasting of highly porous ceramics scaffolds with hierarchized porosity. *Additive Manufacturing*, v. 38, p. 101776, 2021.

TROMBETTA, R. et al. 3D Printing of Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 45, p. 23–44, 2017.

UNALAN, I. et al. Antibacterial and antioxidant activity of cinnamon essential oil laden 45S5 bioactive glass / soy protein composite scaffolds for the treatment of bone infections and oxidative stress. *Materials Science and Engineering C*, p. 143393, 2021.

UNALAN, I.; ENDLEIN, S. J.; et al. Evaluation of electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofiber mats containing clove essential oil for antibacterial wound dressing. *Pharmaceutics*, v. 11, p. 570, 2019.

UNALAN, I.; SLAVIK, B. et al. Physical and antibacterial properties of peppermint essential oil loaded poly (ϵ -caprolactone) (PCL) electrospun fiber mats for wound healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, p. 1–11, 2019.

UNALAN, I.; BOCCACCINI, A. R. Essential oils in biomedical applications: recent progress and future opportunities. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, v. 17, p. 100261, 2021.

VACANTI, J. P.; VACANTI, C. A. The history and scope of tissue engineering. Fourth Edition. p. 3-8, Elsevier, 2013.

VAN GESTEL, N. A.P. et al. Composition dependent mechanical behaviour of S53P4 bioactive glass putty for bone defect grafting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 69, p. 301–306, 2017.

WANG, W.; YEUNG, K. W.K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, v. 2, p. 224–247, 2017.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, v. 30, p. 5897–5909, 2009.

YAN, Q. et al. A review of 3d printing technology for medical applications. *Engineering*, v. 4, p. 729–742, 2018.

YAO, D. et al. Bone metabolism regulation: implications for the treatment of bone diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 129, p. 110494, 2020.

ZHANG, Y. et al. Constructing a 3D-printable, bioceramic sheathed articular spacer assembly for infected hip arthroplasty. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas*, v. 9, p. 13–19, 2015.

ZHU, Y.; WAGNER, W. R. Chapter 30 - Design Principles in Biomaterials and Scaffolds. p. 505-522, Elsevier Inc., 2019.

ZUO, K. H.; ZENG, Y. P.; JIANG, D. Effect of polyvinyl alcohol additive on the pore structure and morphology of the freeze-cast hydroxyapatite ceramics. *Materials Science and Engineering C*, v. 30, p. 283–287, 2010.