



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ELISA CAMARGO KUKULKA

NANOFIBRAS DE PCL ASSOCIADAS AO BIOVIDRO

DOPADO: um novo biomaterial para engenharia tecidual

ELISA CAMARGO KUKULKA

**NANOFIBRAS DE PCL ASSOCIADAS AO BIOVIDRO DOPADO: um
novo biomaterial para engenharia tecidual**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Prótese Dental. Linha de pesquisa: Biomateriais Associados a Agentes Antimicrobianos e Fármacos para Aplicações em Medicina Regenerativa.

Orientador: Prof. Assoc. Dr. Alexandre Luiz S. Borges

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Moreira Bastos Campos

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Kukulka, Elisa Camargo

Nanofibras de PCL associadas ao biovidro dopado: um novo biomaterial para engenharia tecidual. / Elisa Camargo Kukulka. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientador: Alexandre Luiz Souto Borges

Coorientador: Tiago Moreira Bastos Campos

1. Biomateriais. 2. Eletroquímica. 3. Microscopia eletrônica de varredura. 4. Nanofibras. I. Borges, Alexandre Luiz Souto, orient. II. Campos, Tiago Moreira Bastos, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Dr. João Mauricio Ferraz da Silva

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a. Dra. Eliandra de Sousa Trichês

Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 4 de Março de 2021.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Elias e Cintia**, avós, **Antônio e Sônia**, irmãos, **Rafael, Vinicius e Beatriz**, e **família** pelo apoio que sempre me dedicaram e por acreditarem em mim mais do que eu mesma. Tornaram possíveis que eu chegasse até aqui. Meu eterno amor e gratidão.*

*Aos meus **amigos da vida**, que desde sempre estiveram ao meu lado compartilhando os mais diversos sentimentos, acreditando, apoiando e confiando. Vocês foram essenciais.*

AGRADECIMENTOS

*Ao professor **Alexandre Luiz Souto Borges**, que me incentivou à Iniciação Científica e à pós-graduação. Obrigada por todo ensinamento ao longo dos anos, pela oportunidade de ser sua orientada e sempre acreditar no meu potencial, tratando das responsabilidades e compromissos de forma descontraída, o que tornava tudo mais prazeroso e agradável.*

*Ao meu coorientador **Tiago Campos**, que estava sempre com prontidão a ajudar. Agradeço pela paciência, toda ajuda e todo o aprendizado!*

*À minha amiga **Joyce Rodrigues de Souza**, agradeço por toda parceria, por ter realizado mais essa etapa juntas e por estar sempre presente não só nos obstáculos dos trabalhos mas também na vida. Minha eterna gratidão.*

*À minha amiga **Juliani Ribeiro**, que compartilhou comigo toda a sua experiência, conhecimentos e tempo para tornar este trabalho possível. Você tem grande parte no meu desenvolvimento profissional.*

*À professora **Luana Marotta**, pelo apoio, disponibilidade e parceria, o que possibilitou a realização deste trabalho.*

*Aos **colegas de pós-graduação**, pela companhia durante esses anos.*

Aos colegas da seção de pós-graduação, por todo o suporte fornecido.

*Aos colegas do Laboratório de prótese **Fernando, Carlos, Lilian Vilela e Marco Alfredo**, e à **Juliane Damasceno** do departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, pelo carinho e atenção durante toda essa jornada.*

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – ICT UNESP, que me proporcionou experiências e momentos incríveis. Serei eternamente grata à Universidade e a cada profissional que cruzou meu caminho.

*O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 88882.434243/2019-01.*

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu”.

Paulo Beleki

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Biomateriais.....	17
2.2 Eletrofiação.....	18
2.3 Policaprolactona (PCL)	19
2.4 Íons terapêuticos	19
2.5 Tecido ósseo e doenças que acometem.....	24
2.6 Biovidro	25
2.6.1 Rota Sol-gel de produção do Biovidro	25
3 PROPOSIÇÃO.....	27
3.1 Objetivos gerais	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Síntese dos biovidros	29
4.1.1 Biovidro Sol-gel	29
4.1.2 Biovidro Sol-gel Precipitado.....	30
4.2 Síntese das soluções	31
4.2.1 Síntese da solução de PCL	32
4.2.2 Síntese da solução de PCL com biovidro Sol-gel	32
4.2.3 Síntese da solução de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado	32
4.2.4 Síntese da solução de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado dopado com Mg.....	33
4.2.5 Síntese da solução de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado	

dopado com Li.....	33
4.3 Síntese das fibras ultrafinas pela técnica de eletrofiação	34
4.3.1 Síntese dos <i>scaffolds</i>	36
4.3.2 Síntese dos <i>scaffolds</i> de PCL	38
4.3.3 Síntese dos <i>scaffolds</i> de PCL com biovidro Sol-gel.....	38
4.3.4 Síntese dos <i>scaffolds</i> de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado, PCL com biovidro Sol-Gel Precipitado dopado com $Mg(NO_3)_2$ e Síntese dos <i>scaffolds</i> de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado dopado com Li_2CO_3	38
4.4 Caracterização morfológica	39
4.4.1 Análise de superfície com Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo.....	39
4.4.2 Análise do diâmetro médio das fibras	40
4.4.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato ..	40
4.5 Caracterização físico-química.....	41
4.5.1 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)	41
4.5.2 Difratomia de raios X (DRX).....	41
4.5.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	42
4.5.4 Espectroscopia de Raman.....	42
4.6 Caracterização biológica	42
4.6.1 Isolamento de células	42
4.6.2 Protocolo de lavagem	45
4.6.3 Determinação da viabilidade celular (MTT).....	46
4.6.4 Conteúdo de proteína total.....	46
4.6.5 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	47
4.6.6 Formação dos nódulos de mineralização.....	48
4.6.7 Análise de superfície com Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo após cultura celular	48
4.7 Análise estatística	49

5 RESULTADOS	50
5.1 Caracterização morfológica	50
5.1.1 Análise de superfície com Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo	50
5.1.2 Análise do diâmetro médio das fibras	60
5.1.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato ..	62
5.2 Caracterização físico-química	65
5.2.1 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)	65
5.2.2 Difratometria de raios X (DRX)	68
5.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	70
5.2.4 Espectroscopia de Raman.....	72
5.3 Caracterização biológica <i>in vitro</i>	73
5.3.1 Teste de viabilidade celular (MTT)	73
5.3.2 Proteína total	74
5.3.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)	75
5.3.4 Nódulos de mineralização.....	76
5.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	81
6 DISCUSSÃO	83
CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO.....	98

Kukulka EC. Nanofibras de PCL associadas ao biovidro dopado: um novo biomaterial para engenharia tecidual [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

O objetivo do estudo foi sintetizar e caracterizar fibras ultrafinas de policaprolactona (PCL) associadas a um novo biovidro 58S em duas diferentes rotas de produção, produzidas pelo processo de eletrofiação a fim de selecionar a melhor rota para a incorporação de íons terapêuticos e avaliar as diferenças entre as rotas e a influência dos íons. Soluções de PCL puro 20% e contendo 7% de biovidros dopados (10% $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e 5% Li_2CO_3), separadamente, foram submetidas ao processo de eletrofiação, onde foram utilizados três parâmetros fixos: 2 mLh^{-1} de razão de fluxo, 10 kV de voltagem e 12 cm de distância. As fibras obtidas foram caracterizadas morfológica (MEV, análise do diâmetro das fibras e análise da molhabilidade), química (EDS, DRX, FTIR e Raman) e biologicamente (viabilidade celular, conteúdo de proteína total, fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização). Os resultados obtidos mostraram que a melhor rota foi a sol- gel precipitado, que foram dopados com íons terapêuticos (10% $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e 5% Li_2CO_3). Foi observada a aplicabilidade da referida metodologia em confeccionar um biomaterial aprimorado, que agregando as propriedades osteoindutoras do biovidro ao PCL e às dos íons terapêuticos, aplicável à regeneração óssea guiada apresentando respostas físicas, químicas e biológicas favoráveis ao comportamento celular.

Palavras-chave: Biomateriais; Eletroquímica; Microscopia eletrônica de varredura; Nanofibras.

Kukulka EC. PCL nanofibers associated with doped bioglass: a new biomaterial for tissue engineering [dissertation]. São José dos Campos (SP): Paulista State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

The aim of the study was to synthesize and characterize ultrafine polycaprolactone fibers (PCL) associated with a new 58S bioglass in two different production routes, produced by the electrospinning process in order to select the best route for the incorporation of therapeutic ions and differences as a difference between the routes and the influence of the ions. Solutions of pure PCL 20% and containing 7% doped bio-glass (10% Mg (NO₃)₂ and 5% Li₂CO₃), requirements, were submitted to the electrospinning process, where three fixed parameters were used: 2 mLh⁻¹ flow, 10 kV voltage and 12 cm distance. The curved fibers were characterized morphological (SEM, fiber diameter analysis and wettability analysis), chemical (EDS, DRX, FTIR and Raman) and biologically (cell viability, total protein content, alkaline phosphatase and formation of mineralization nodules). The results sought that the best route for a precipitated sol-gel, which were doped with therapeutic ions (10% Mg (NO₃)₂ and 5% Li₂CO₃). It was observed the applicability of the methodology in making an improved biomaterial, which adding the osteoinductive properties of the bioglass to the PCL and those of the therapeutic ions, applicable to guided bone regeneration presenting physical, chemical and biological responses favorable to the cellular behavior.

Keywords: Biomaterials; Electrochemistry; Scanning electron microscopy; Nanofibers.

1 INTRODUÇÃO

Relacionando perda óssea à degeneração, falha de órgãos e tecidos faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias eficientes e de baixo custo, para contribuir na reparação desses problemas e contribuir para a melhora na qualidade de vida da população, especialmente na odontologia (Lima, 2013).

Nesse contexto, os biomateriais se apresentam promissores para tratamento. Um biomaterial tem como definição “um material destinado a fazer interface com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo”(Williams, 2009). Assim, tecnologias são desenvolvidas e aplicadas para suprir a necessidade de substituir ou complementar parte do organismo perdidas por doença ou trauma. Desta maneira, novos biomateriais apresentam-se como produtos versáteis e que atuam, combatem ou reparam inúmeras limitações ou patologias e que apresentam características adequadas para diversas aplicações biomédicas (Lima, 2013), e na área odontológica são materiais utilizados como dispositivos terapêuticos em procedimentos cirúrgicos, especialmente na correção de defeitos ósseos (Bugarin, Garrafa, 2007), área onde a osteogênese pode ficar comprometida devido ao processo de inflamação aguda originado pela invasão bacteriana no espaço regenerativo (Martins, 2015).

O biovidro, ou vidro bioativo, é um tipo de biomaterial que possui a capacidade de se ligar a tecidos hospedeiros (Hench, 2006) com ótima biocompatibilidade e capacidade de ligação óssea, porém apresenta limitações em relação ao uso como membranas devido às suas fracas propriedades mecânicas (Bellucci et al., 2013). Uma membrana deve ser capaz de atuar como um esqueleto temporário para fixação, proliferação e

diferenciação de células progenitoras, além de ser capaz de ser absorvido em igual proporção ao crescimento de novos tecidos (Bellucci et al., 2012).

A capacidade do biovidro de favorecer a adesão e a proliferação de uma ampla variedade de tipos de células sugere o uso em aplicações ósseas e dentárias (Rizwan et al., 2017). Estudos comprovaram que o biovidro apresenta resultados promissores tanto na engenharia de tecidos moles, como na vascularização, no controle da taxa de degradação e promovendo a condrogênese (Baino et al., 2018; Day et al., 2004; Li et al., 2012; Sonny Bal et al., 2010; Stamboulis et al., 2002; Suominen et al., 1996; Tellisi, Ashammakhi, 2012; Verrier et al., 2004; Wu et al., 2013), quanto na engenharia de tecidos duros, como na integração do tecido duro com o implante, na melhorada estabilidade de implantes e no processo de reparação (Anindyajati et al., 2017; Li et al., 2012; Messner, 1994; Shikinami et al., 2004; Zur et al., 2011).

Trabalhos têm sido realizados com a finalidade de melhorar o desempenho mecânico dos vidros bioativos através da incorporação de moléculas semelhantes à matriz extracelular e nanopartículas (Vitale-Brovarone et al., 2005), como as de polímeros, somando a alta biocompatibilidade e características funcionais dos biovidros (capacidade de adesão óssea) com as características estruturais dos polímeros (melhorando o desempenho mecânico do sistema final) (Rizwan et al., 2017).

O biovidro 58S (58% de SiO_2 em massa) devido sua composição e possibilidade de ser produzido via Sol-gel apresenta a formação de hidroxiapatita em sua superfície em menor tempo quando comparado ao biovidro 45S5 (primeiro biovidro produzido), além de apresentar alta bioatividade e tendência a neutralizar o pH ácido causado pela degradação polimérica (Pereira et al., 2013).

Matrizes de nanofibras produzidas por eletrofiação tem despertado grande interesse no campo da regeneração tecidual (Li et al., 2005; Pham et

al., 2006). Muitas composições de polímeros (sintéticos ou naturais) resultam em fibras com diâmetros que variam de dezenas de nanômetros à alguns micrômetros por eletrofiação (Chen et al., 2007; Huang et al., 2003; Li et al., 2007; Matthews et al., 2002; Yoshimoto et al., 2003).

Estudos mostram que a matriz de nanofibras pode direcionar e estimular as células dos tecidos a secretar matriz tecidual e recuperar a função tecidual perdida (Kim et al., 2008) e mostram que nanofibras de PCL produzidas por eletrofiação são eficazes como estimuladoras de regeneração de tecidos, incluindo osso e estimulando a formação de células mesenquimais derivarem da medula óssea a se diferenciarem em osteoblastos (Kim et al., 2008; Li et al., 2007; Yoshimoto et al., 2003).

A policaprolactona (PCL) é um polímero biodegradável e biocompatível muito utilizado como transportador de fármacos e/ou sistema de distribuição de medicamentos de forma lenta e gradual devido à sua excelente permeabilidade à drogas e baixa taxa de degradação (Cai et al., 2000). Fibras de PCL produzidas por eletrofiação utilizadas como membranas para fibrocartilagem apresentam resultados favoráveis como crescimento celular e facilitação da adesão, proliferação e diferenciação de condrócitos (Anindyajati et al., 2017). Estudos também mostram que o alinhamento da fibra foi diretivo para a orientação de células, morfologia, fixação, distribuição e produção de matriz extracelular (Anindyajati et al., 2017; Baker, Mauck, 2007; Koepsell et al., 2011; Li et al., 2007).

Para facilitar a fixação celular, crescimento e formação de novo tecido é interessante a combinação com uma estrutura semelhante a uma trama de fibras. Esta camada biodegradável pode ser feita com biopolímeros, como exemplo fibras de PCL obtidas por eletrofiação (Anindyajati et al., 2017) e ainda há a possibilidade de incorporar elementos bioativos nas fibras de PCL produzidas por eletrofiação.

A eletrofiação é um importante método disponível para a

produção de fibras em escala nanométrica ou submicrométrica. Esta metodologia compreende a aplicação de uma força elétrica sobre um polímero líquido promovendo a ejeção de um jato fino que é alongado e acelerado pelo campo elétrico, seco e é depositado sobre um substrato na forma de uma manta de nanofibras (Reneker, Yarin, 2008).

Recentemente, estudos mostram que a incorporação de elementos bioativos como Ag, Mg, Cu, Sr, Li e Zn em biovidros contribuíram para melhorar as atividades antibacteriana, osteogênica e angiogênica dos biovidros (Douglas et al., 2018; Hoppe et al., 2011; Zhu et al., 2019) e que a incorporação de íons Na^+ diminui a ativação de liberação de sílica do biovidro, fazendo com que a dissolução do biovidro se torne mais rápida e favorecendo a formação da camada de hidroxiapatita antecipadamente (Gomes et al., 2017).

Íons Mg^{+2} , facilitam a produção de hidrogênio em excesso, que proporciona um aumento da alcalinidade local (Gao et al., 2020). Além disso, é considerado, assim como íons Cu, Sr e Zn, como alto promotor terapêutico com forte potencial de formação óssea e redução da reabsorção óssea (Ranga et al., 2019; Tian, Liu, 2015) e quando incorporado em vidros bioativos, além de fornecer melhores propriedades mecânicas, melhora a biocompatibilidade, a capacidade de biodegradação do vidro bioativo e a quantidade de íons Mg^{+2} presente no vidro bioativo está associada à formação de hidroxiapatita (Karakuzu-Ikizler et al., 2020).

Íons Li^+ foram relatados como estimuladores da proliferação e diferenciação osteogênica de células-tronco-mesenquimais da medula óssea, através da ativação da via de sinalização Wnt (Cao et al., 2017). Quando incorporados aos vidros bioativos proporcionam uma maior proliferação e diferenciação osteogênica das células tronco quando comparados aos vidros bioativos puros (Moghanian et al., 2018). Além do estímulo de células ósseas, íons Li^+ também apresentam potencial pró-

angiogênico e quando incorporados em vidros bioativos mostram-se candidatos para o desenvolvimento de novos biomateriais para utilização em regeneração de tecidos vascularizados (Haro Durand et al., 2017).

Considerando os conteúdos abordados, o objetivo desse estudo foi produzir nanofibras de PCL incorporadas com biovidro 58S dopado com íons $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e Li_2CO_3 com o intuito de potencializar o crescimento celular ósseo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais

Biomateriais são materiais, sintéticos ou naturais, que abrangem aspectos da medicina, biologia, química e ciência dos materiais, baseados em princípios da engenharia e que possui diversas aplicações, especificamente na área da saúde, como aplicação terapêutica e de diagnóstico (Ratner et al., 2004).

Para que seja considerado como um biomaterial o material tem, por obrigatoriedade, que ser biocompatível com os tecidos que irão recebê-lo, ou seja, não provocar respostas negativas aos tecidos, além de induzir respostas do hospedeiro de forma apropriada em uma aplicação específica (Ratner et al., 2004; Williams, 1986).

Entre os diferentes tipos de matérias-primas disponíveis para a confecção de biomateriais podemos citar os metais, ligas metálicas, as cerâmicas, os biovidros, os polímeros e os compósitos, sendo reabsorvíveis, bioativos ou inertes, tendo cada um uma aplicabilidade específica (Pires, 2015).

Dentre as diversas aplicabilidades dos biomateriais podemos citar as próteses de válvulas cardíacas, articulações artificiais para o quadril, lentes oculares (Ratner et al., 2004) e, na área odontológica, os implantes dentais e materiais para correção de defeitos ósseos (Bugarin, Garrafa, 2007; Ratner et al., 2004). Estes biomateriais ainda podem ser produzidos de diversos materiais como o hidrogel, o polietilenoglicol, o ácido polilático, o titânio, a hidroxiapatita e o biovidro, e desenvolvidos para aplicações específicas como para implantes dentais, cicatrização óssea e osseointegração (Ratner et al.,

2004).

2.2 Eletrofiação

Dentre os métodos de produção de biomateriais o processo de eletrofiação tem se mostrado satisfatório para a produção de biomateriais poliméricos em forma de fibras (De Souza et al., 2017). O processo de eletrofiação baseia-se em uma solução polimérica que deve apresentar uma viscosidade suficiente para que quando injetada e um campo eletromagnético pré-definido, a tensão do campo ultrapasse a tensão superficial da solução e possibilite a formação de fibras poliméricas em um aparato coletor (Huang et al., 2003; Santos, 2017; De Souza et al., 2017).

Este método permite a variação de parâmetros ambientais (temperatura e umidade) e do processo (tensão contínua, distância ponta/coletor, razão de fluxo, viscosidade da solução e diâmetro da agulha) que irão influenciar diretamente na morfologia das fibras formadas (Borges et al., 2015; Costa et al., 2011), podendo resultar em fibras de tamanhos diferentes (micrométrica à nanométrica) e com presença ou ausência de defeitos morfológicos, além de permitir a formação de fibras com porosidade, o que permitirá a vascularização sobre a membrana formada pelas fibras eletrofiadas, resultando em adesão e proliferação celular (Thakkar, Misra, 2017).

2.3 Policaprolactona (PCL)

Biopolímeros estão presentes em aplicações biomédicas e de saúde, uma vez que seus nanocompósitos apresentam diversas aplicações como ação antimicrobiana, transporte de medicamentos, diagnóstico de doenças, engenharia de tecidos, cicatrização de feridas e terapia de câncer (Saravanakumar et al., 2018).

Diversos materiais poliméricos podem ser utilizados para a produção de fibras poliméricas pela técnica de eletrofiação, dentre eles a policaprolactona (PCL), polímero escolhido por apresentar boas características, como ser um polímero sintético de excelente biocompatibilidade, bioabsorvível e de baixo custo, além de ser aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) e usado clinicamente como material para liberação de fármacos e de sutura (Wang et al., 2016; Xie et al., 2013). Também é conhecido por ter uma lenta taxa de degradação e por permitir a associação com outros biomateriais (Abdali et al., 2019), além de ser capaz de estimular a diferenciação de células mesenquimais em condrócitos e osteócitos (Anindyajati et al., 2017; Kim et al., 2008; Li et al., 2007).

2.4 Íons terapêuticos

No organismo, os íons terapêuticos atuam relacionados às vias de sinalização celular, caminhando para o equilíbrio tecidual. As interações com íons terapêuticos desempenham funções importantes em relação a distúrbios e doenças metabólicas, como as doenças infecciosas (Mourin et

al., 2012) e a incorporação de elementos bioativos como Ag, Mg, Cu, Sr, Li e Zn em biovidros contribuíram para melhorar as atividades antibacteriana, osteogênica e angiogênica dos biovidros (Douglas et al., 2018; Hoppe et al., 2011; Zhu et al., 2019).

Os íons Mg^{+2} apresentam uma alta taxa de degradação e liberação de hidrogênio. Estudos mostram que sua integridade pode ser mantida por mais de 12 semanas durante o processo de degradação no organismo (Liu et al., 2014). Devido ao fato de *in vivo* se degradar rapidamente sob condições fisiológicas, facilita a produção de hidrogênio em excesso, aumentando a alcalinidade local e melhorando os produtos de corrosão secundária em todo o tecido implantado (Gao et al., 2020).

Mg e suas ligas apresentam excelente biocompatibilidade com a fisiologia humana, além de ser essencial ao metabolismo humano como cofator de diversas enzimas e por íons Mg^{+2} serem bem conhecidos por facilitar a cicatrização de tecidos. Além disso, quando em excesso no organismo, não causam toxicidade celular e são excretados pela urina (Banerjee et al., 2019).

A incorporação de Mg em vidros bioativos fornece melhores propriedades mecânicas, biocompatibilidade e melhor capacidade de biodegradação do vidro e a quantidade de Mg presente no vidro está associada à formação de hidroxiapatita (Karakuzu-Ikizler et al., 2020). A formação de apatita diminui com o aumento das concentrações de Mg. Por isso, o Mg é considerado um dopante em apatita biológica que desempenha papel fundamental nos processos biológicos em implantes (Ranga et al., 2019).

Assim como íons cobre, estrôncio e zinco, o íon magnésio também é considerado como íons com alto potencial promotor terapêutico com forte potencial de formação óssea e redução de reabsorção óssea (Ranga et al., 2019; Tian, Liu, 2015).

O Mg e suas ligas são candidatos promissores para a engenharia de tecidos devido às propriedades mecânicas, trombogênicas e biodegradação. Devido à rápida degradação do Mg *in vivo*, faz-se necessário controlar a sua taxa de degradação utilizando algumas técnicas, como a fabricação de compósitos à base de magnésio e a utilização de nanopartículas bioativas para reforçar a matriz do Mg e melhorar propriedades de bioatividade, degradação e propriedades mecânicas (Khodaei et al., 2019). Estudos relatam que a utilização de Mg à 10% exibe propriedades mecânicas mais altas e taxa de degradação ideal quando comparado a outros percentuais de Mg ou Mg puro, além de apresentar maior resistência à corrosão e maior viabilidade celular (Khodaei et al., 2019).

Os íons Li^+ são elementos importantes no organismo, pois estudos mostram que estimulam a proliferação e diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea através da ativação da via de sinalização Wnt *in vitro*, além de, quando administrados via oral, aumentarem a formação óssea subcondral (Cao et al., 2017).

Li e Sr foram relatados para serem utilizados na engenharia de tecidos ósseos como modificadores da composição de vidros bioativos (Moghanian et al., 2018). Vidros bioativos contendo porcentagens de Li em sua composição mostram que a formação de apatita como um indicador de bioatividade é um fator dependente da quantidade de Li, sendo diminuída em vidros com maior teor de Li (Haro Durand et al., 2017; da Silva et al., 2017).

Além disso, existem estudos que concluíram que a utilização de biovidro contendo Li promoveu formação óssea subcondral e melhoraram a restauração do tecido da cartilagem hialina em modelos de coelhos com defeitos osteocondrais (Cao et al., 2017).

Estudos relatam que íons Li^+ aumentam a taxa de formação óssea pela estimulação de células osteoblásticas e evitam o crescimento de células

osteoclásticas, além de melhorar a massa óssea durante o tratamento de doenças. A presença de íons Li^+ em vidros bioativos ocasionou uma maior proliferação e diferenciação osteogênica em células-tronco mesenquimais quando comparado ao vidro bioativo sem Li em sua composição (Moghanian et al., 2018).

Íons Li^+ também apresentam potencial pró-angiogênico e sua incorporação em vidros bioativos mostra-se como uma estratégia útil para o desenvolvimento de novos biomateriais para utilização em regeneração de tecidos vascularizados (Haro Durand et al., 2017).

Também podem atuar na proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais da medula óssea através da ativação de vias de sinalização como Wnt e Hedgehog e através da inibição da enzima glicogênio sintase cinase-3 (GSK-3) (Zhang et al., 2019). Podem ainda estimular a secreção *in vitro* de fatores de crescimento com ação pró-angiogênica e participar da angiogênese *in vivo* e induzir proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais pela ativação da via canônica Wnt/beta-catenina (Haro Durand et al., 2017).

Além de íons Li^+ melhorarem a proliferação de células tronco, estudos mostram que íons Li^+ aumentam significativamente a proliferação e diferenciação de células do ligamento periodontal (em uma concentração de cerca 17 ppm) (da Silva et al., 2017), após a ativação da via de sinalização Wnt, sugerindo um forte potencial de materiais com Li em sua composição para tratamentos de patologias ósseas e relacionadas à odontologia (Gao et al., 2015). Íons Li^+ também afetam a formação de tecidos, como quando aplicado topicamente na forma de cloreto de Li na polpa dental, promovendo a regeneração da dentina e induzindo a diferenciação de odontoblastos, quando administrado às células da crista neural *in vitro* (da Silva et al., 2017).

Vidros bioativos contendo Li podem liberar de forma terapêutica

níveis de íons Li^+ que estimulam a proliferação de osteoblastos em calvária de ratos e estudos mostram que a atividade da fosfatase alcalina é dependente da dose (da Silva et al., 2017).

Estudos mostram que a presença de íons Li^+ demonstrou um aumento da proliferação *in vitro* apenas em baixas concentrações, cerca de 0,25% em peso (Khan et al., 2016).

Além dos vidros bioativos o Li pode ser incorporado e liberado à partir de materiais odontológicos existentes, não sendo necessário a utilização de uma esponja de colágeno ser cirurgicamente implantada, um material que possa liberar Li rapidamente pode promover o reparo tecidual em tecidos ósseos e dentais (Zhang et al., 2019).

Além disso, o Li reduz a degradação do colágeno através da indução de citocinas da resposta pró-inflamatória em cartilagem e mostra uma melhora na formação de matriz extracelular rica em proteoglicano em cultura condrogênica de células-tronco mesenquimais, resultado satisfatório quando considerado que a cartilagem apresenta dificuldades de regeneração por sua característica avascular (Maçon et al., 2017; Press, 2015).

Concentrações de lítio contendo 3 e 7% inibiram a formação de hidroxiapatita. A liberação de Li de vidros bioativos possui efeitos sobre a proliferação e diferenciação cementogênica de células derivadas do ligamento periodontal através da via de sinalização Wnt e SHH (Maçon et al., 2017).

A atividade osteogênica de células derivadas do ligamento periodontal humano é notavelmente melhorada na cultura com Li 5% em peso em vidros dopados, além do Li melhorar a densidade mineral óssea e reduzir o risco de fraturas em humanos (Wang et al., 2019).

2.5 Tecido ósseo e doenças que o acometem

O tecido ósseo realiza importante função estrutural e funcional (ancoragem de elementos dentários possibilitando a função mastigatória) no corpo humano (Ozcan, Sakerci, 2017). Os ossos são estruturas que estão em constante remodelação. Quando lesados, iniciam o processo de reparo ósseo, formando novo osso através de células osteoblásticas (formação e mineralização de matriz óssea) e eliminando a porção de osso velho através de células osteoclásticas (reabsorção óssea) (Crane, Cao, 2014; Judas et al., 2012).

A doença periodontal, doença infecto-inflamatória, engloba várias doenças que acometem os tecidos periodontais e resultam em perda de inserção e destruição óssea alveolar (como a periodontite), podendo culminar em perda do elemento dental (Highfield, 2009).

Outra condição de perda óssea é a atrofia da crista alveolar por ausência de função após a extração ou perda do elemento dental, podendo ocorrer perda óssea de até 50% em um ano (Kim et al., 2017).

Para recuperar a perda óssea ocasionada por doença periodontal ou ausência de função existe a possibilidade de se realizar técnicas de enxertia para tentar reparar os defeitos ósseos. Os autoenxertos (tecido ósseo retirado do próprio paciente) apresentam propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras ideais para este fim, porém podem apresentar limitações como infecções e sintomatologia dolorosa da área doadora (Yuan et al., 2017).

2.6 Biovidro

Biovidros ou vidros bioativos são exemplos de biomateriais que se ligam fortemente aos tecidos duros devido à presença de silício (Si) na sua degradação e liberação de íons Na, Si_4 e Ca_2 (Kim, 2017), e promovem mineralização óssea e expressão gênica de osteoblastos, além de osteoindutividade e biodegradabilidade superior a outros biomateriais, tornando-os alternativa para o reparo ósseo, na forma de carga ou *scaffolds* (estruturas tridimensionais com uma estrutura porosa utilizados como suporte, que promovem a proliferação celular, ou colonização de células, fornecendo um ambiente estável, auxiliando a remodelagem dos tecidos) (Ziba et al., 2019).

A adição de vidro bioativo à uma matriz polimérica fornece aos compósitos bioatividade e requisitos mecânicos adequados (Ziba et al., 2019).

O biovidro 58S devido a sua composição possibilita sua fabricação pela rota Sol-gel, apresentando a formação de hidroxiapatita em sua superfície em menor tempo comparado ao biovidro 45S5, apresenta uma maior bioatividade e capacidade de neutralizar o pH ácido causado pela degradação polimérica (Pereira et al., 2013).

2.6.1 Rota Sol-gel de produção do Biovidro

A obtenção do biovidro pela rota Sol-gel baseia-se em um processo de química úmida para a produção e envolve hidrólise e condensação de precursores, secagem e estabilização. Neste método, os parâmetros de

processamento podem ser controlados e propriedades como morfologia e composição podem ser controladas (Zheng, Boccaccini, 2017).

O processo pode ocorrer em condições ácidas ou básicas, o que afeta as propriedades do material resultante, como a morfologia e o processo permite a incorporação de íons (Zheng, Boccaccini, 2017). O processamento Sol-gel apresenta como vantagens sobre os métodos tradicionais uma maior pureza e homogeneidade, temperaturas de processamento mais baixas, melhor ligação ao tecido ósseo e melhor degradabilidade e reabsorção *in vivo* (Bejarano et al., 2015).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos Gerais

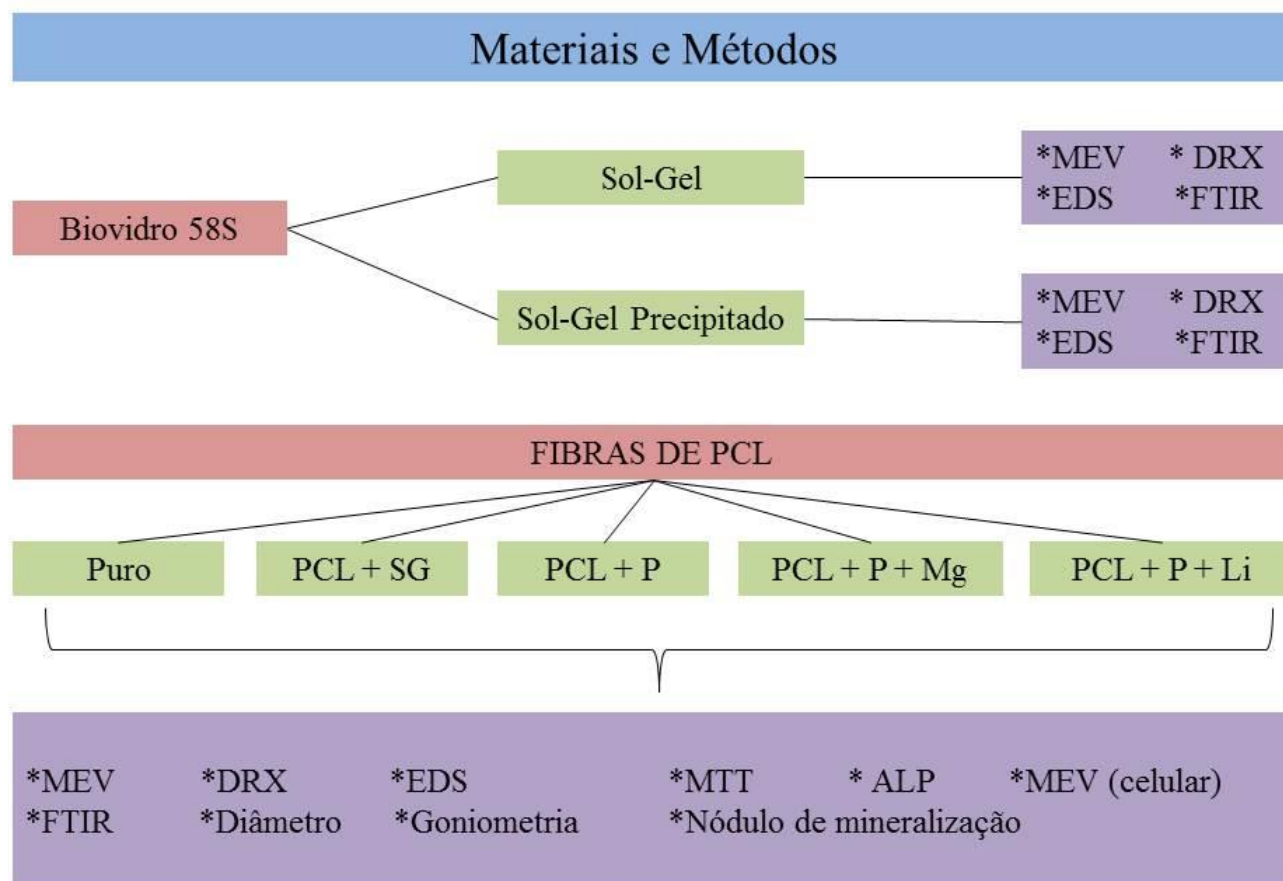
O objetivo do presente estudo foi produzir fibras de PCL associadas ao biovidro 58S dopado com íons Mg^{+2} e Li^{+} produzidas por eletrofiação.

3.2 Objetivos Específicos

Produzir e caracterizar membranas a partir de nanofibras de PCL associadas a um novo biovidro 58S dopado com íons Mg^{+2} e com Li^{+} produzidas pelo processo de eletrofiação e analisar morfológica, química e biologicamente, a fim de confeccionar um novo biomaterial para utilização em regeneração tecidual guiada com uma maior probabilidade sucesso na formação óssea.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1 – Fluxograma metodológico



Legenda: Fluxograma dos grupos de materiais produzidos e os testes realizados com cada material. **PCL)** Fibras de policaprolactona. **PCL+SG)** Fibras de policaprolactona com biovidro Sol-gel. **PCL+P)** Fibras de policaprolactona com biovidro Sol-gel Precipitado. **PCL+P+Mg)** Fibras de policaprolactona com biovidro Sol-gel Precipitado dopado com íons magnésio. **PCL+P+ Li)** Fibras de policaprolactona com biovidro Sol-gel Precipitado dopado com íons lítio. **MEV)** Microscopia Eletrônica de Varredura. **DRX)** Difractometria de raios X. **EDS)** Espectroscopia por dispersão em energia. **FTIR)** Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. **Diâmetro)** Análise do diâmetro médio das fibras. **Goniometria)** Análise da molhabilidade. **MTT)** Ensaio de viabilidade celular. **ALP)** Análise de fosfatase alcalina. **MEV celular)** Microscopia Eletrônica de Varredura após cultura celular. **Nódulo de mineralização)** Análise da formação de nódulo ósseo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os materiais utilizados estão listados na Tabela 1

Tabela 1 – Materiais utilizados para a produção dos biomateriais

Material	Descrição	Fabricante
PCL	Polímero à base de policaprolactona (Éster)	Sigma-Aldrich
Acetona	Acetona pura	Sigma-Aldrich
Biovidro	60% de SiO_2 , 36% de CaO e 4% de P_2O_5 (Porcentagem em mol)	Produção própria
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	10%	Sigma-Aldrich
Li_2CO_3	5%	Sigma-Aldrich
Bicarbonato de amônio	99,5 % T	Sigma-Aldrich

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1 Síntese dos biovidros

4.1.1 Biovidro Sol-gel

Para a preparação do biovidro pela rota Sol-gel, foi utilizado ácido silícico como precursor pelo processo Sol-gel. Uma solução de 1mol/L de metasilicato de sódio (Na_2SiO_3) foi usado como precursor na obtenção do ácido silícico. Em seguida, a solução obtida foi misturada com uma resina de

troca iônica (IR120 – *Rohm and Haas*) levando a uma troca entre os íons H^+ e Na^+ . Posteriormente, essa mistura foi filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo e sua concentração determinada por meio de titulação do ácido silícico com hidróxido de sódio padronizado.

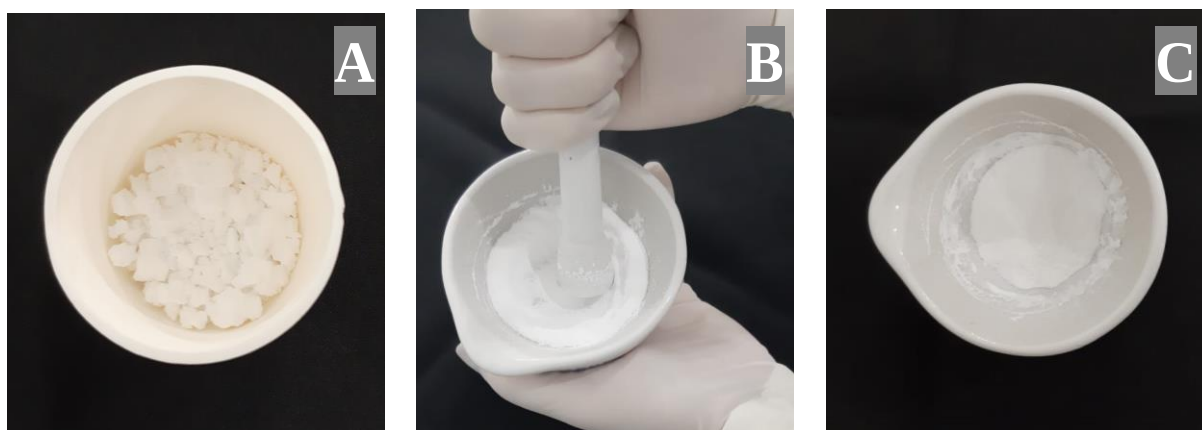
Para titulação, foram formuladas três soluções de 1 g de NaOH, 25 mL de água destilada e do 20 mL de SiO_2 em um béquer de 600 mL. Aproximadamente 3 mL de HF foram adicionadas na solução para a neutralização da soda, formando SiF_6 , indicada por uma cor azulada na solução. Essa mistura foi titulada com NaOH padronizada até o fim da reação, com a formação de $Si(OH)_4$, indicada pela cor azul-esverdeado, e o volume utilizado da soda foi anotado. Em seguida, 200 mL de água em ebulição foram adicionadas na solução e a titulação prosseguiu até que a solução apresentasse uma coloração de azul intenso. A partir do volume utilizado, calculou-se a concentração do ácido silícico.

Para a síntese do biovidro pelo processo Sol-gel, preparou-se uma solução de ácido silícico com cloreto de cálcio, cloreto de sódio e fosfato de amônio na proporção 60% de SiO_2 ; 36% de $CaCl$ e 4% de P_2O_5 em mol. A solução então foi secada em estufa por 1 dia a uma temperatura de $100^\circ C$ e calcinada à $500^\circ C$ por 5h. Após, o biovidro foi macerado e peneirado (Figura 2).

4.1.2 Biovidro Sol-gel Precipitado

Para a produção do biovidro Sol-gel Precipitado foi utilizado como base 250 mL da solução de biovidro Sol-gel já produzido e acrescido uma mistura contendo 200 mL de água deionizada e 20 g de bicarbonato de amônio P.A. e levado em ultrassom de ponteira por 3 minutos.

Figura 2 – Processo de finalização do biovidro 58S produzido



Legenda: A) Biovidro após o processo de calcinação. B) Biovidro após o processo de calcinação sendo macerado através de pistilo e almofariz para posterior processo de peneiração. C) Aspecto final do biovidro produzido.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Síntese das soluções

Foram preparadas 5 soluções, originando 5 grupos distintos de fibras ultrafinas:

- Solução de PCL
- Solução de PCL com biovidro Sol-gel
- Solução de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado
- Solução de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado dopado com $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$
- Solução de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado dopado com Li_2CO_3

4.2.1 Síntese da solução de PCL

Foi preparada uma solução de policaprolactona (PCL) 20% (dissolução de 1,6 g de PCL aferida em balança de precisão em 8 mL de acetona) e ficou sob agitação constante em agitador magnético (IKARH Basic,Staufen, Alemanha) por 24 horas e foi levado ao ultrassom de ponteira por 15 minutos (Figura 3).

4.2.2 Síntese da solução de PCL com biovidro Sol-gel

A partir da síntese da solução de PCL, foi acrescentando 7% em massa de biovidro.Sol-gel e 3,2 mL de acetona à solução, levado em agitador magnético (IKARH Basic,Staufen, Alemanha) até total dissolução e em ultrassom de ponteira por 15 minutos (Figura 3).

4.2.3 Síntese da solução de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado

A partir da síntese da solução de PCL, foi acrescentando 7% em massa de biovidro.Sol-gel Precipitado e 3,2 mL de acetona à solução, levado em agitador magnético (IKARH Basic, Staufen, Alemanha) até total dissolução e em ultrassom de ponteira por 15 minutos (Figura 3).

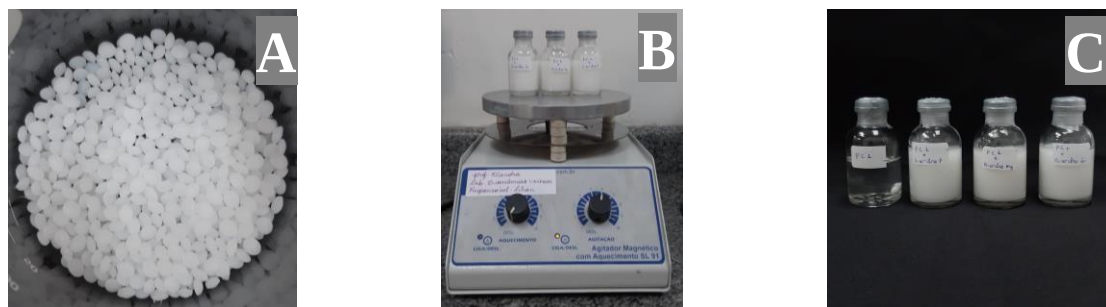
4.2.4 Síntese da solução de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado dopado com Mg

A partir da síntese da solução de PCL, foi acrescentando 7% em massa de biovidro. Sol-gel Precipitado dopado com 10% de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (Khodaei et al., 2019) e 3,2 mL de acetona à solução, levado em agitador magnético (IKARH Basic, Staufen, Alemanha) até total dissolução e em ultrassom de ponteira por 15 minutos (Figura 3).

4.2.5 Síntese da solução de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado dopado com Li

A partir da síntese da solução de PCL, foi acrescentando 7% em massa de biovidro. Sol-gel Precipitado dopado com 5% de Li_2CO_3 e 3,2 mL de acetona à solução, levado em agitador magnético (IKARH Basic, Staufen, Alemanha) até total dissolução e em ultrassom de ponteira por 15 minutos (Figura 3).

Figura 3 – Síntese das soluções de PCL e PCL com as diferentes composições de biovidro



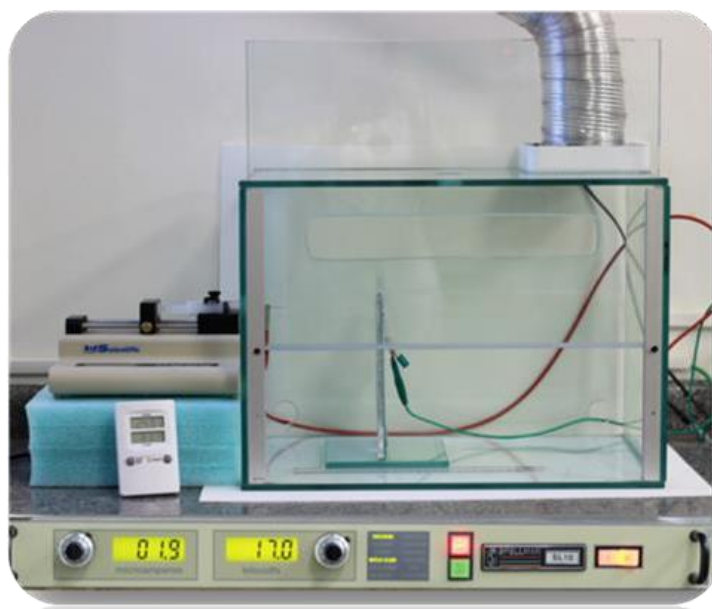
Legenda: A) Grânulos de PCL utilizados para o preparo das soluções. B) As soluções foram mantidas em agitador magnético após a dissolução do PCL em acetona e após a adição de biovidro. C) Aspecto final das soluções de PCL e PCL com biovidro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Síntese das fibras ultrafinas pela técnica de eletrofiação

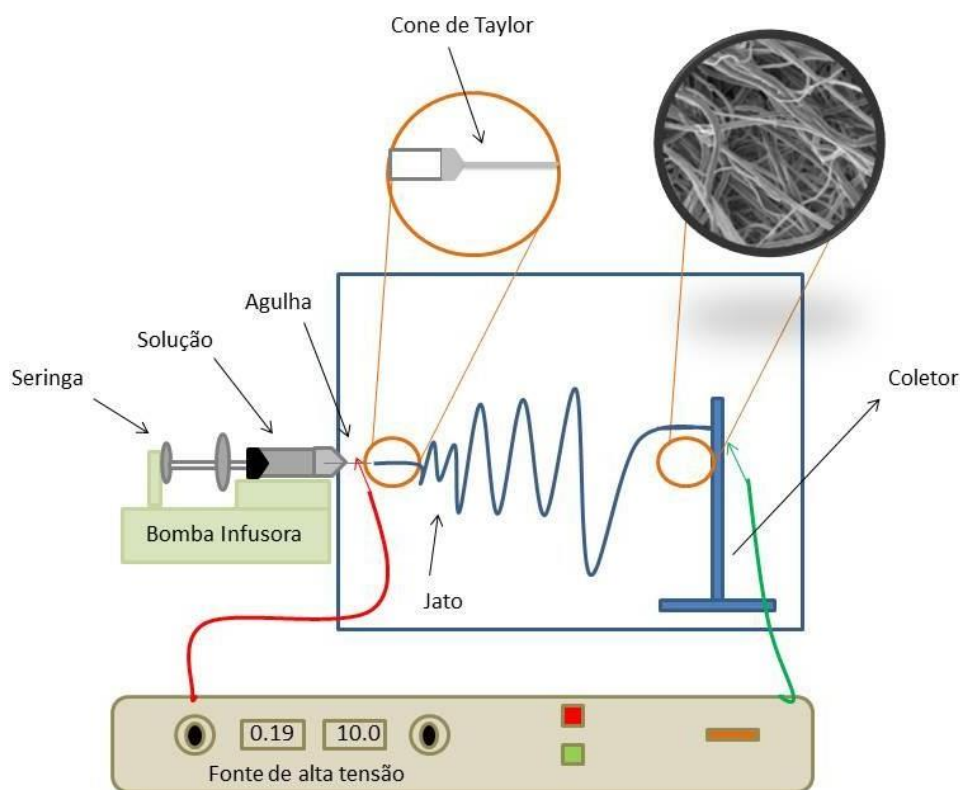
Para a síntese das fibras ultrafinas, foi utilizado o equipamento de eletrofiação (montagem própria), sendo sua estrutura composta por uma fonte de alta tensão, uma seringa plástica de 5 ml com agulha de ponta reta e diâmetro do orifício de 0,7 mm (Figuras 4 e 5). O processo de eletrofiação possui algumas variáveis que visam otimizar o processo de síntese, podendo ser modificada a tensão, fluxo da solução e a distância da ponta da agulha ao anteparo. O processo de sintetização foi realizado no Laboratório de Bioengenharia e Biomateriais do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP.

Figura 4 – Aparato de eletrofiação utilizado para a produção das fibras



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 – Esquema de componentes do processo de eletrofiação

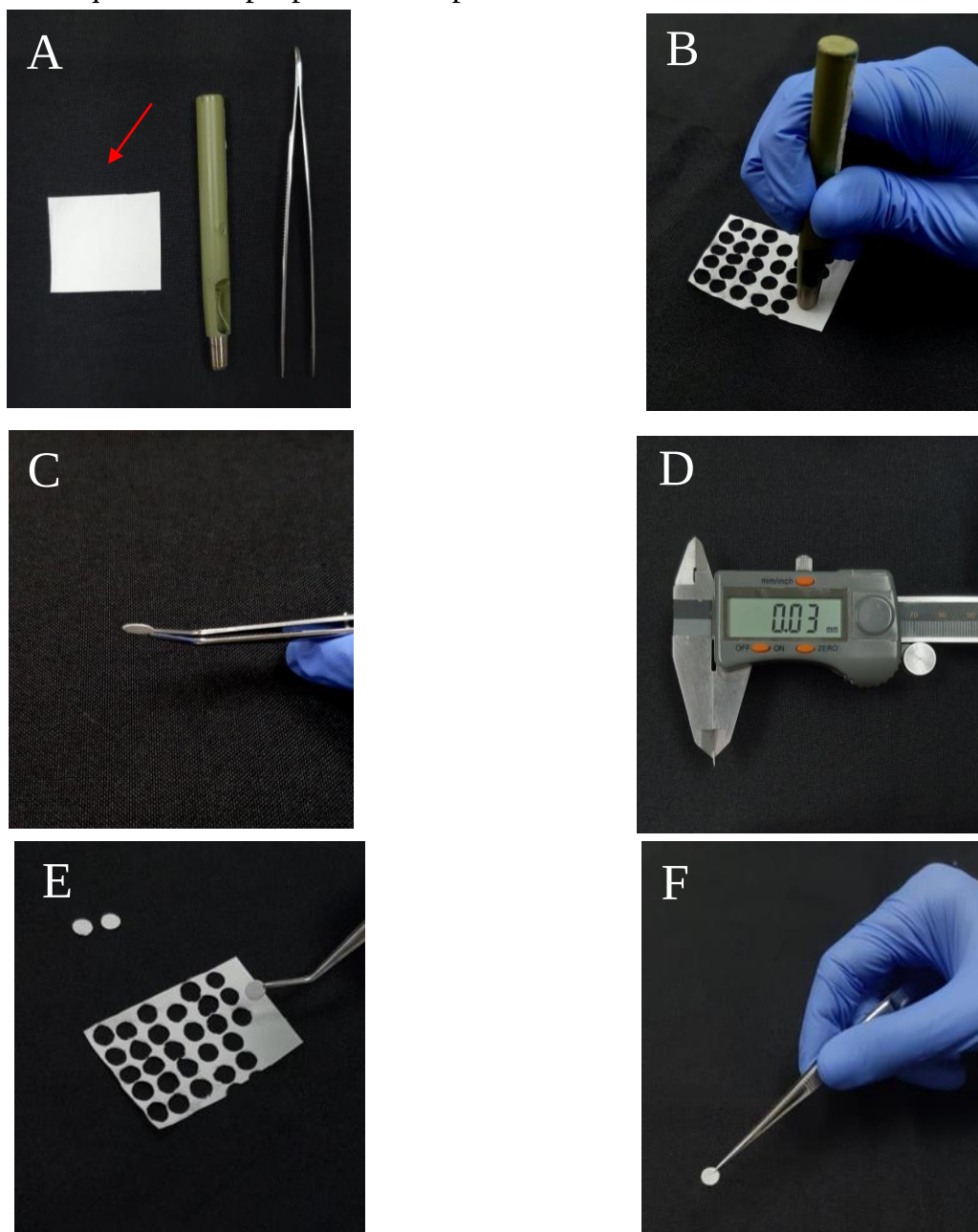


Legenda: O processo de eletrofiação se dá a partir de uma solução polimérica colocada em uma seringa com agulha de ponta reta e acoplada em uma bomba infusora com velocidade de fluxo determinada. Através de uma fonte de alta tensão com eletrodos acoplados na agulha e aparato coletor, determina-se a tensão e a distância. Quando a tensão superficial da solução é ultrapassada pela tensão do campo elétrico formado, a solução é ejetada em forma de fibras poliméricas até o aparato coletor. . Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.1 Síntese dos *scaffolds*

O processo de eletrofiação, gerou mantas de fibras ultrafinas, de onde foram produzidos *scaffolds* de 6 mm de diâmetro com o auxílio de um instrumento circular cortante (Figura 6) para a utilização nos testes de caracterização.

Figura 6 – Sequência do preparo dos espécimes



Legenda: A) Materiais utilizados para realizar a confecção dos espécimes (recortador circular e pinça). Manta de fibras indicadas pela seta. B) Perfuração da manta produzida com o recortador circular. C) Remoção dos espécimes da manta com o auxílio de uma pinça. D) Visão do espécime por vista frontal. E) Visão do espécime por vista lateral. E) Espessura do espécime aferida por paquímetro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2 Síntese dos *scaffolds* de PCL

A solução de PCL foi colocada em uma seringa de plástico com agulha de 0,7 mmØ e submetida ao processo de eletrofiação sob três parâmetros fixos: 1 mLh⁻¹ de razão de fluxo, 10 kV de voltagem e 12 cm de distância. Foram eletrofiados 8 mL da solução e os *scaffolds* foram obtidos.

4.3.3 Síntese dos *scaffolds* de PCL com biovidro Sol-gel

A solução de PCL com biovidro Sol-gel foi colocada em uma seringa de plástico com agulha de 0,7 mmØ e submetida ao processo de eletrofiação sob três parâmetros fixos: 2 mLh⁻¹ de razão de fluxo, 10 kV de voltagem e 12 cm de distância. Foram eletrofiados 11,2 mL da solução e os *scaffolds* foram obtidos.

4.3.4 Síntese dos *scaffolds* de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado, PCL com biovidro Sol-gel Precipitado dopado com Mg(NO₃)₂ e PCL com biovidro Sol-gel Precipitado dopado com Li₂CO₃

As soluções foram colocadas em uma seringa de plástico com agulha de 0,7 mmØ e submetidas ao processo de eletrofiação sob três parâmetros fixos: 2 mLh⁻¹ de razão de fluxo, 10 kV de voltagem e 12 cm de distância. Foram eletrofiados 11,2 mL de cada solução e os *scaffolds* foram obtidos. Ouve variação de fluxo de 1 mLh⁻¹(fibras de PCL puro) para 2 mLh⁻¹

(demais fibras) devido à alteração da viscosidade das soluções ao adicionar biovidro.

4.4 Caracterização morfológica

4.4.1 Análise de superfície com Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo

Para analisar a topografia superficial das NFs, foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JEOL/JSM-5310, Tóquio, Japão) com canhão de emissão de campo “*Field Emission Gun*” (FEG) (Tescan/Vega 3, Brno, República Tcheca) instalados no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE). Para isso, as amostras foram posicionadas em uma plataforma de alumínio (stub), auxiliado por uma fita dupla face de carbono (3M, Sumaré SP, Brasil) e metalizadas com uma camada fina de ouro (80 Å), que foi depositado através de vaporização iônica (*sputtering*) na máquina metalizadora (*Emitech SC 7620, Sputter Coater, Quorum Technologies, Newhaven, Reino Unido*) por 130 s com uma corrente de 10-15 mA em vácuo de 130 mTorr e à uma taxa de metalização de 3,5 nm/min. As imagens foram obtidas no MEV com detector de elétrons secundários (ES), projetados sobre a superfície da amostra; e também por meio do detector de elétron retro espalhado (BSE). As magnificações utilizadas foram de 1.000 X, 5.000 X e 10.000X.

4.4.2 Análise do diâmetro médio das fibras

O diâmetro das fibras foi obtido utilizando o software ImageJ (Versão 1.44, National Public of Health) por meio das micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) do Laboratório de Apoio à Pesquisado Departamento Materiais Odontológicos e Prótese (ICT-UNESP), onde amostras de 0,5 x 0,5 cm da folha de alumínio de cada padrão morfológico gerado das nanofibras foram recobertos com ouro (SC7620 Mini Sputer Coater/Glow Discharge System, Emitech, East Sussex, RU) e analisados para avaliar a morfologia, alinhamento, diâmetro e quantidade das fibras. Foram analisadas 1 micrografia por grupo com 45 mensurações de diâmetro em regiões distintas, sendo 45 análises para cada imagem. Os resultados do diâmetro médio das fibras para cada grupo foram apresentados em estatística descritiva (média e desvio- padrão) e inferencial com nível de significância de 5%.

4.4.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato

Para a análise de molhabilidade, foram preparadas 3 amostras de cada grupo de fibras. A medição do ângulo de contato médio foi realizada por meio de um goniômetro (Ramé Hart-Inc, 100-00-115, Montain Lakes, Nova Jersey, EUA) com a técnica de gota séssil com 1 líquido: água destilada. Previamente à análise, cada amostra foi manuseada com luvas cuidadosamente para evitar contaminação. Uma seringa graduada para dispersão gradual (série 100-10-12- 22, calibre 22) com agulha hidrofóbica deposita a gota e o ângulo de contato médio direito e esquerdo é calculado

pelo programa computacional (DROPimage Advanced Software). Os ângulos de contato médios da água foram calculados pelo próprio programa.

4.5 Caracterização físico-química

4.5.1 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)

Para realização de análise qualitativa da composição química dos elementos químicos das fibras, foi utilizado um espectrômetro por dispersão de energia (EDS) (Bruker Nano GmbH 410, Berlin, Alemanha) associado ao *software* Espirit 1.9 (Bruker, Berlin, Alemanha) no MEV (Inspect S50, FEI Company, Brno, República Tcheca) do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento Materiais Odontológicos e Prótese (ICT-UNESP).

4.5.2 Difractometria de raios X (DRX)

Para realização de análise qualitativa do padrão de difratometria, as amostras analisadas foram preparadas no formato 3x3 cm e posicionadas no aparelho de DRX, (Shimadzu XRD7000, radiação $\text{CuK}\alpha$, $2\theta = 20-80^\circ$, 30 mA, 40 kV). Instituto Tecnológico de Aeronáutica -ITA, São José dos Campos.

4.5.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A composição química da superfície das fibras foi analisada utilizando o espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (Parkin- Elmer, modelo Spectrum GX) no modo UATR na região do médio 500-4000 cm^{-1} , 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} através do programa Spectrom Saurch Plus. Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA, São José dos Campos.

4.5.4 Espectroscopia de Raman

Uma amostra de cada grupo foi submetida à espectroscopia de Raman para análise da composição estrutural do material. As medidas de espectroscopia Raman foram realizadas utilizando o modelo do sistema Renishaw 2000 (HoribaScientific, Palaiseau France – Instituto Tecnológico de Aeronáutica – ITA, São José dos Campos), equipado com um laser de íons de Ar (514,5 nm).

4.6 Caracterização biológica

4.6.1 Isolamento de células

Os procedimentos para isolamento celular e testes *in vitro* foram

realizados no Laboratório de Estudos Interdisciplinar de Células (LEIC) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP. Para o desenvolvimento da parte *in vitro*, o trabalho foi submetido ao comitê de ética do ICT-Unesp. Os animais doadores de células que foram utilizados neste trabalho foram os mesmos utilizados no estudo aprovado sob o comitê de ética 05/2020, a fim de contemplar as diretrizes do CONCEA dos 3Rs (Cazarin et al., 2004).

A eutanásia dos ratos machos, *Rattus norvegicus* (Wistar albinos) com idade média de 90 dias que foram utilizados como doadores de células da medula óssea de fêmures foi realizada utilizando o triplo da dose anestésica recomendada para o peso dos animais. A solução anestésica foi composta da combinação dos fármacos cloridrato de xilazina 10 mg/kg (Anasedan® - Vetbrands, Jacaréi - Brasil), substância sedativa e relaxante muscular; e Cloridrato de Ketamina 100 mg/kg (Dopalen® – Vetbrands, Jacaréi - Brasil) e administrada via intramuscular. Após confirmação da instalação da anestesia, os animais foram submetidos ao procedimento de guilhotina.

Em seguida, foi realizada a técnica de isolamento de células da medula óssea de fêmures conforme descrita previamente por Maniatopoulos (Maniatopoulos et al., 1988). Após a remoção dos fêmures, todo o tecido muscular foi retirado, e o osso foi lavado com soluções de meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco) suplementado com gentamicina (500 µg/mL) (Gibco) por 15 minutos. Em seguida a peça óssea foi levada para o fluxolaminar onde as epífises foram removidas e a diáfise foi lavada com 20 mL de meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (500 µg/mL) (Gibco). Após 3 lavagens, as células estavam isoladas e foram colocadas em recipientes para cultura de 25 mL e 75 cm² (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil) para o cultivo. Essas células foram mantidas em um meio de cultura para garantir sua viabilidade e mantidas em

estufa à uma temperatura de 37°C com umidade atmosférica contendo 5% de CO₂. A seleção das células mesenquimais ocorreu pela sua capacidade de adesão ao poliestireno, sendo expandidas até atingirem mais de 80% da ocupação do recipiente.

Previamente a cultura celular, todas as amostras foram submetidas à esterilização em raio ultravioleta (UV) por 30min. Os grupos avaliados foram:

- a) grupo C: controle celular - células mesenquimais plaqueadas sem biomaterial;
- b) grupo PCL: células mesenquimais plaqueadas com PCL;
- c) grupo PCL-SG: células mesenquimais plaqueadas com o compósito de PCL/Biovidro Sol-gel;
- d) grupo PCL-P: células mesenquimais plaqueadas com o compósito de PCL/Biovidro precipitado;
- e) grupo PCL-P+Mg: células mesenquimais plaqueadas com o compósito de PCL/Biovidro precipitado dopado com magnésio;
- f) grupo PCL-P+Li: células mesenquimais plaqueadas com o compósito de PCL/Biovidro precipitado dopado com lítio.

Para o plaqueamento celular, após a confluência, inicialmente o meio do frasco de cultura foi aspirado com auxílio de pipeta sorológica e descartado, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado ao frasco 3 mL da solução de tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), para que as células se desprendam do fundo do frasco. Em seguida, o conteúdo de tripsina foi neutralizado com 6 mL de meio alfa MEM, transferido para um tubo Falcon de 15 mL (TTP, Biosystems, Curitiba, Brasil) e centrifugado em 5000 rpm por 5 min a 25 °C (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, USA) com consequente formação do pellet (agregado de células). O

sobrenadante do pellet foi descartado, as células ressuspensas em meio alfa MEM suplementado com 5 mg/mL de ácido ascórbico (Neon) e 2,16 g de beta glicerofosfato (Sigma-Aldrich ref 50020) e distribuídas nos poços das placas de 96 poços contendo as amostras. O plaqueamento celular ocorreu com 5.000 células/poço, após a contagem celular realizada pelo contador automático Countess® (Invitrogen, EUA). Previamente ao plaqueamento, as amostras foram colocadas nos poços e foi acrescentado meio de cultura, até a obtenção do volume final de 1mL. O meio de cultura foi trocado dos poços a cada dois dias. O desenvolvimento das células foi avaliado por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany).

Todas as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e mantidas até o momento dos testes. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993-5 e em duplicata, sendo que cada duplicata foi um *pool* de células provenientes do fêmur de três animais.

Todos os testes foram realizados de acordo com as descrições previamente publicadas por nosso grupo de pesquisa (do Prado et al., 2015).

Previamente aos testes as amostras foram cortadas no diâmetro da placa de 96 poços com *punch* e submetidas ao protocolo de lavagem. A seguir foram realizados os testes descritos neste projeto.

4.6.2 Protocolo de lavagem

Previamente aos testes de análise biológica realizados os *scaffolds* foram submetidos a um protocolo de lavagem para esterilização.

Foram colocados em 100 µL de álcool 70% e mantidos por 15 minutos. Em seguida, foram lavados 2 vezes com 100 µL de PBS e

esterilizados em luz UV por 30 minutos.

4.6.3 Determinação da viabilidade celular (MTT)

Após 7 dias de cultura celular, foi realizada a análise quantitativa de células viáveis. Esse teste foi realizado por meio da exposição das células ao corante MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) e avaliação espectrofotométrica do corante incorporado. Em todos os grupos foi preparada uma solução de MTT em uma fração de 0,5 mg/ml em PBS preparada, procedendo-se em seguida à incubação junto às células com esta solução por 4 hora a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂. Após esse período, a solução de MTT foi removida e adicionada a 500 µl da solução de DMSO (*Dimethyl Sulfoxide* - Dimetilsulfóxido) que permaneceu nos poços por 10 min em estufa de CO₂ a 37°C. A seguir a placa foi colocada sob agitação por 10 min para solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 100µl foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços (Greiner) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular.

4.6.4 Conteúdo de proteína total

A proteína total foi quantificada após 7 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes, com PBS a 37 °C, e preenchidos

com 2 ml de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich), para extração das proteínas.

Após 30 min, 1 ml da solução de cada poço foi misturada com 1 ml da solução de Lowry (SigmaAldrich) e deixado por 20 min à temperatura ambiente. A esta mistura foi acrescentado 1 ml de reagente de Folin e Ciocalteau (Sigma-Aldrich) e deixado por 30 min à temperatura ambiente. A seguir, a absorbância foi aferida a 680 nm em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900). O conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em $\mu\text{g/mL}$.

4.6.5 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Foi determinada a ALP após 7 dias de cultura celular, nos mesmos lisados utilizados para quantificar a proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica). Inicialmente, 50 μl de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 ml de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1. À solução, foi acrescentada alíquota de 50 μl dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 min a 37°C em banho-maria. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 ml de 32 Na_2CO_3 a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir de curva-padrão usando a timolftaleína.

4.6.6 Formação dos nódulos de mineralização

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 14 dias de cultura. Para tanto, as células aderidas foram lavadas em 200 μ L de solução de Hank's (Sigma) a 37°C por duas vezes e as células foram fixadas em 200 μ L de álcool 70% por 1 h a 4°C. Em seguida, o álcool foi retirado e os poços lavados com 200 μ L PBS (Cultilab) por duas vezes. Posteriormente, o PBS foi retirado, a cultura celular lavada com 200 μ L de água deionizada por duas vezes e corada com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma), pH 4,2, por 15 min à temperatura ambiente. Depois disso, cada poço foi lavado várias vezes com intuito de retirar o excesso de corante e as placas deixadas por 24 h em temperatura ambiente para secagem total dos poços. Depois da secagem, os poços foram avaliados qualitativamente em relação à formação de nódulos de matriz mineralizada. Essa análise qualitativa foi baseada em avaliações microscópicas das formações nodulares de matriz mineralizada, as quais foram fotografadas com câmera digital (Sony Digital F828, CyberShot, 8.0 megapixels) acoplada em microscópio de luz invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40 C, Alemanha).

4.6.7 Análise de superfície com Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo após cultura celular

Os *scaffolds*, após cultura celular de 5 dias, foram submetidos à fixação pelo método de graduação de etanol. Os *scaffolds* foram lavados 2 vezes com 200 μ L de PBS. Em seguida, foram mantidos em 200 μ L de metanol por 20 minutos e em concentrações alternadas de álcool (10%, 25%, 50%, 75% e

100%) por 20 minutos cada concentração.

Para analisar a topografia superficial das NFs, foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JEOL/JSM-5310, Tóquio, Japão) com canhão de emissão de campo “*Field Emission Gun*” (FEG) (Tescan/Vega 3, Brno, República Tcheca) instalados no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE). Para isso, as amostras foram posicionadas em uma plataforma de alumínio (stub), auxiliado por uma fita dupla face de carbono (3M, Sumaré SP, Brasil) e metalizadas com uma camada fina de ouro (80 Å), que foi depositado através de vaporização iônica (sputtering) na máquina metalizadora (Emitech SC 7620, Sputter Coater, Quorum Technologies, Newhaven, Reino Unido) por 130 s com uma corrente de 10-15 mA em vácuo de 130 mTorr e à uma taxa de metalização de 3,5 nm/min. As imagens foram obtidas no MEV com detector de elétrons secundários (ES), projetados sobre a superfície da amostra; e também por meio do detector de elétron retro espalhado (BSE). As magnificações utilizadas foram de 1.000 X.

4.7 Análise estatística

Todos os dados (MTT, fosfatase alcalina e proteína total) foram plotados e foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p = 0,05$) para a análise estatística. Para os dados de diâmetro e goniometria a estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão) foi realizada e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p = 0,05$) para a goniometria e análise de variância 1- fator (ANOVA) ($p = 0,05$) para o diâmetro.

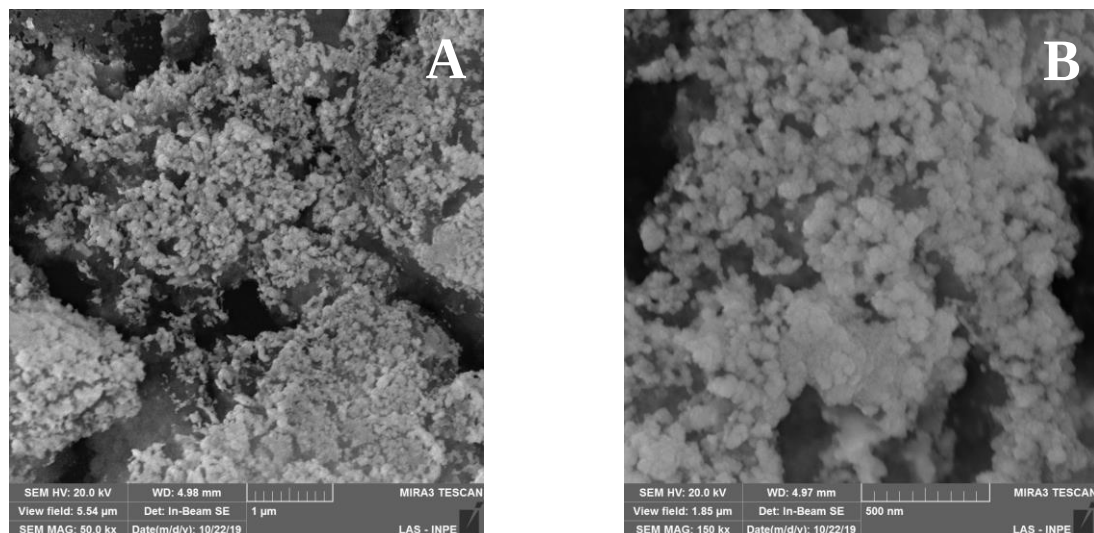
5 RESULTADOS

5.1 Caracterização morfológica

5.1.1 Análise de superfície com Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo

A partir da análise em MEV das partículas de biovidro 58S preparados pelas rotas Sol-gel e Sol- Gel Precipitado podemos observar que os biovidros produzidos pelas duas diferentes rotas apresentam diferenças em relação ao tamanho das partículas, sendo o biovidro produzido pela rota Sol-gel Precipitado o que apresentou menores partículas quando comparado com o biovidro produzido pela rota sol- gel (Figuras 7 e 8).

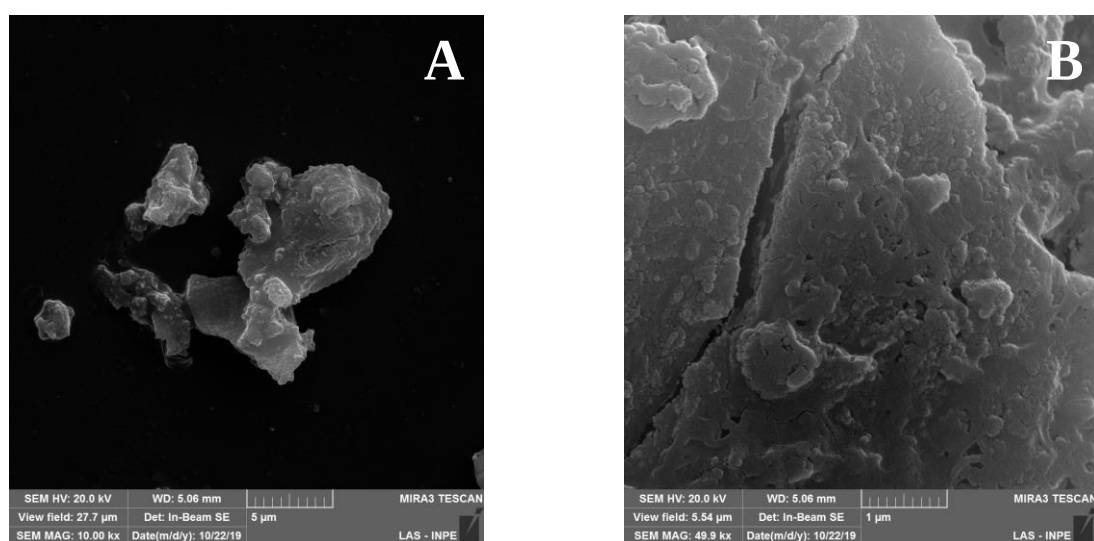
Figura 7 – Micrografias de partículas de biovidro 58S produzido pela rota Sol-Gel Precipitado



Legenda: A) Micrografia do biovidro em aumento de 50.000 X. B) Micrografia do biovidro em aumento de 150.000 X.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Micrografias de partículas de biovidro 58S produzido pela rota Sol-Gel

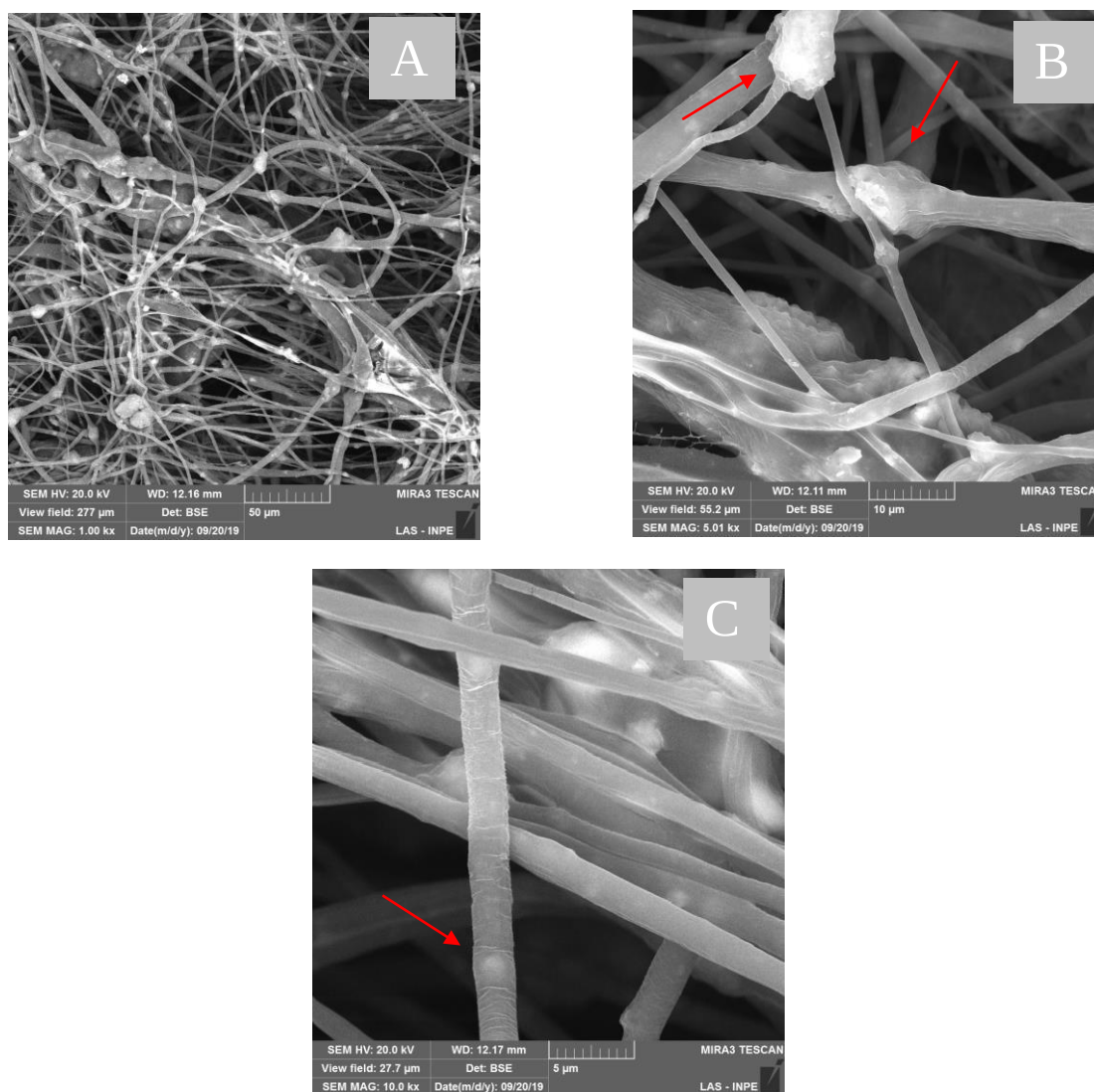


Legenda: A) Micrografia do biovidro em aumento de 10.000 X. Pode ser observado o aspecto irregular das partículas do biovidro. B) Micrografia do biovidro em aumento de 50.000 X.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da análise em MEV para os grupos de fibras ultrafinas produzidos por eletrofiação à partir de soluções contendo PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel e PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado podemos observar que apesar de apresentarem diferença morfológica entre os grupos, em ambos pode-se observar uma satisfatória produção de fibras com ausência de defeitos (*BEADS*) e com a possibilidade de observar a presença de partículas de biovidro no interior e na superfície das fibras produzidas (Figuras 9 e 10), e podendo ser comparadas às fibras produzidas a partir da solução de PCL sem a adição de biovidro (Figura 11).

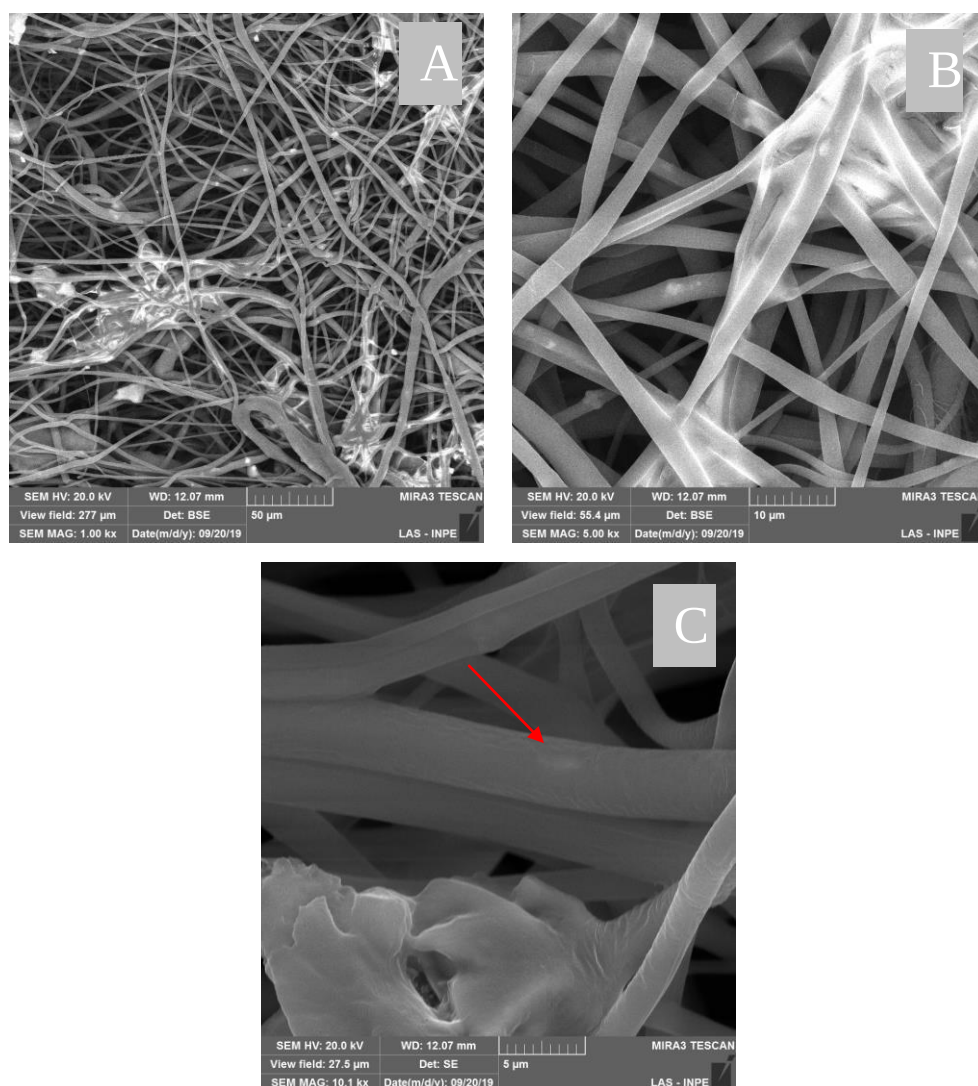
Figura 9 – Micrografias de fibras ultrafinas de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado



Legenda: A) Fibras produzidas pelo processo de eletrofiação em aumento de 1.000 X, podendo ser observado a numerosa formação de fibras. B) Fibras produzidas pelo processo de eletrofiação em aumento de 5.000 X, podendo ser distinguido pela tonalidade a fibra de PCL e os aglomerados de biovidro apontados pelas setas. C) Fibras produzidas pelo processo de eletrofiação em aumento de 10.000 X, podendo ser observado partículas de biovidro no interior da fibra produzida, apontado pela seta.

Fonte: Elaborado pelo autor.

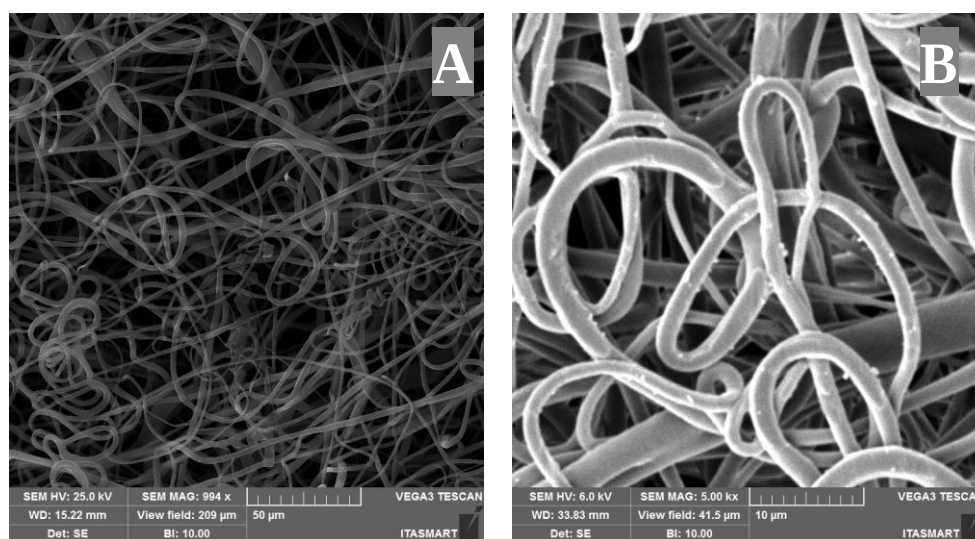
Figura 10 – Micrografias de fibras ultrafinas de PCL com biovidro Sol-gel



Legenda: Legenda: A) Fibras produzidas pelo processo de eletrofiação em aumento de 1.000 X, podendo ser observado a numerosa formação de fibras. B) Fibras produzidas pelo processo de eletrofiação em aumento de 5.000 X, podendo ser distinguido pela tonalidade a fibra de PCL e a presença de partículas de biovidro, que apresenta-se em tonalidade mais clara. C) Fibras produzidas pelo processo de eletrofiação em aumento de 10.000 X, podendo ser observado partículas de biovidro no interior da fibra produzida, apontado pela seta.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Micrografias de fibras ultrafinas de PCL sem a adição de biovidro



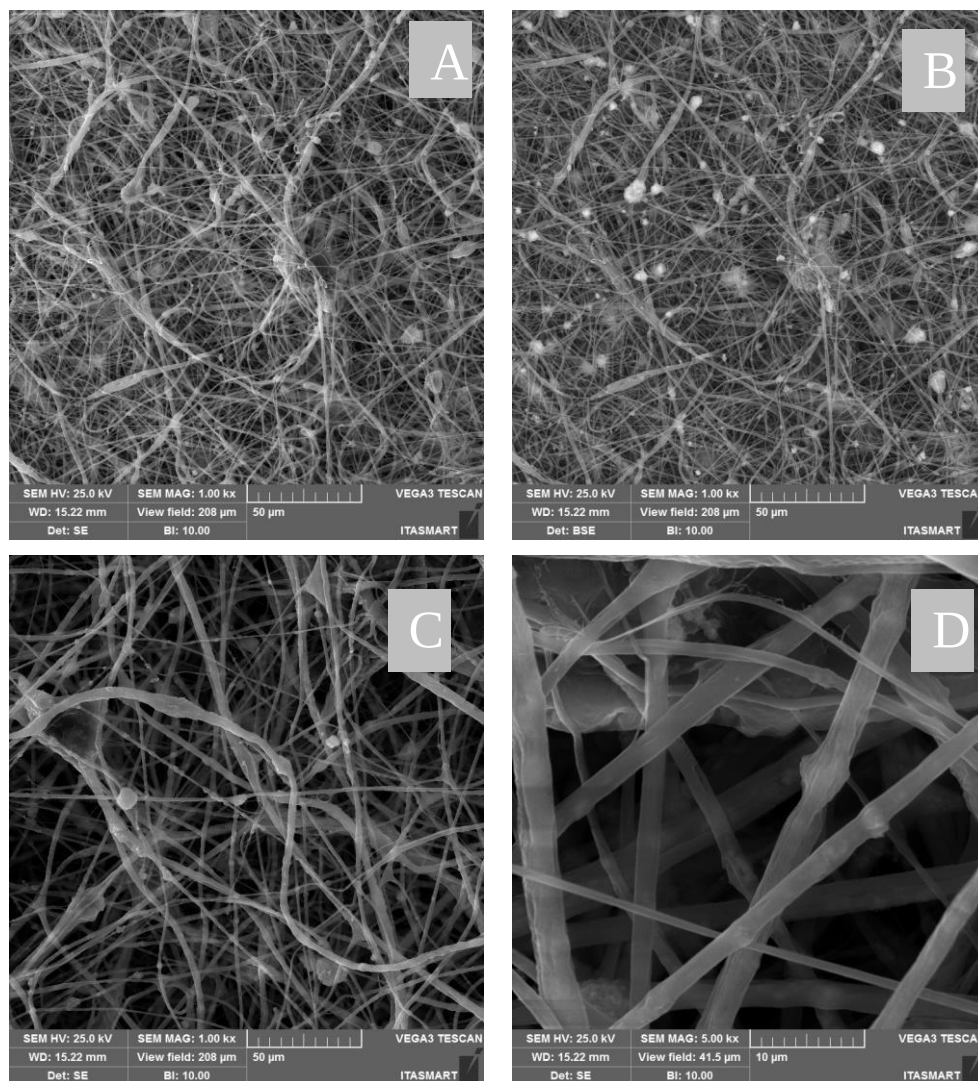
Legenda: A) Fibras produzidas pelo processo de eletrofiação em aumento de 1.000 X, podendo ser observado a numerosa formação de fibras. B) Fibras produzidas pelo processo de eletrofiação em aumento de 5.000 X, podendo ser observado a uniformidade das fibras produzidas e a ausência de defeitos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Considerando os resultados apresentados, optou-se pela utilização do biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado para realizar a dopagem com íons terapêuticos, devido a produção de partículas menores e mais uniformes.

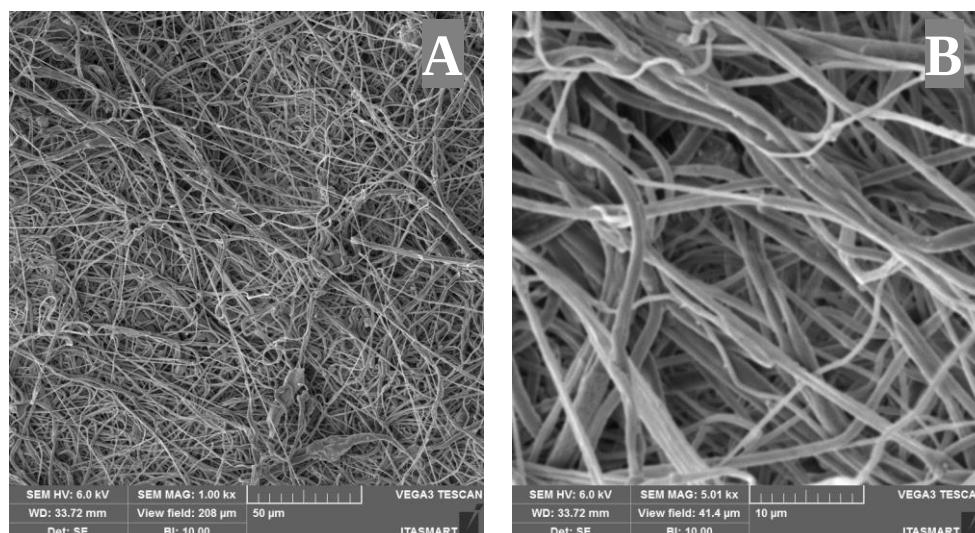
A partir da análise em MEV para os grupos de fibras ultrafinas produzidos por eletrofiação à partir de soluções contendo PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopados com Mg e Li podemos realizar uma comparação da morfologia e padrão de formação das fibras e compará-las entre si e em relação às fibras produzidas à partir da solução contendo PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado sem a adição de íons terapêuticos (Figura 12 e 13).

Figura 12 – Micrografias de fibras ultrafinas de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado com presença de íons terapêuticos



Legenda: A e B) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com íons Mg^{+2} produzidas pelo processo de eletrospinning em aumento de 1.000 X e 5.000X. C e D) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com íons Li^{+} produzidas pelo processo de eletrospinning em aumento de 1.000 X e 5.000X. Em ambas as imagens pode ser observado uma numerosa formação de fibras e a presença de biovidro nas fibras produzidas. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Micrografias de fibras ultrafinas de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado com ausência de íons terapêuticos



Legenda: A e B) Fibras produzidas pelo processo de eletrofição em aumento de 1.000X e 5.000X, podendo ser observado a numerosa formação de fibras, sua uniformidade e ausência de defeitos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

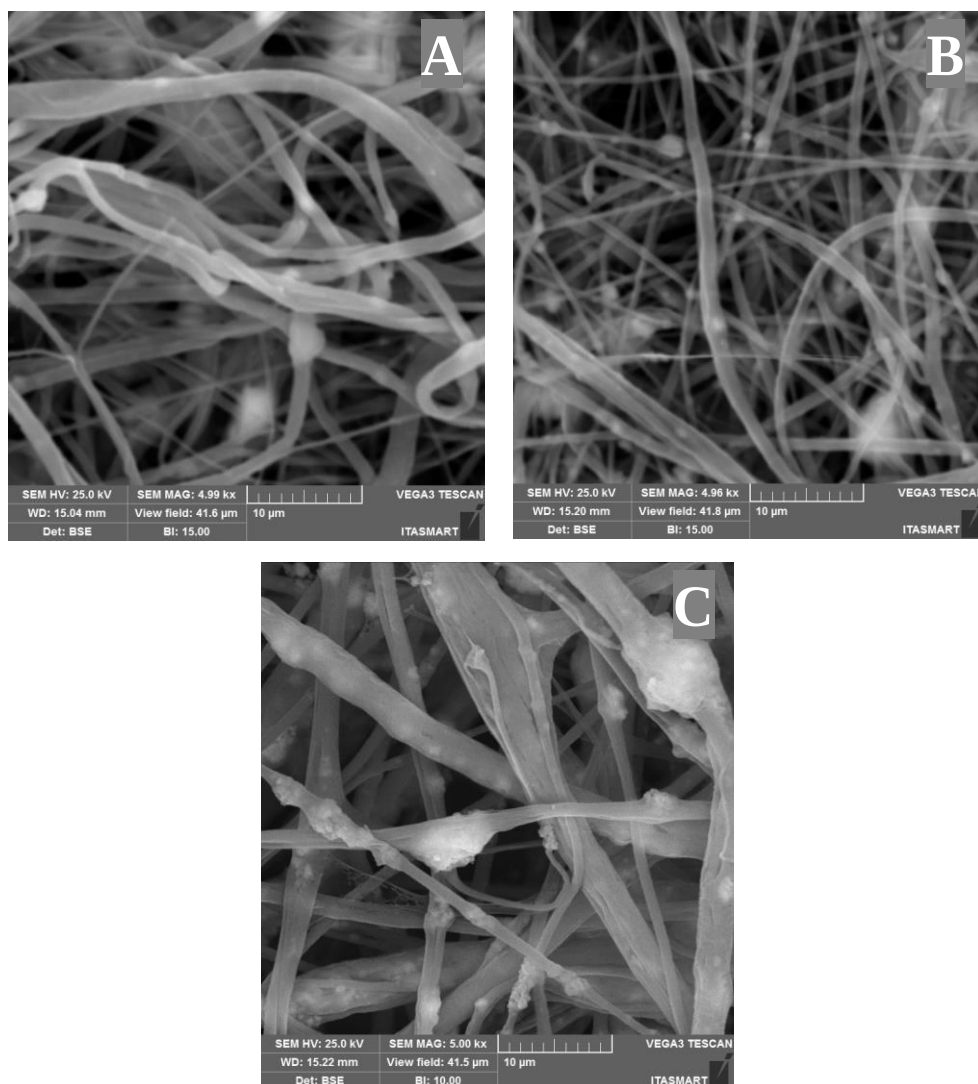
A partir da comparação das figuras 12 e 13 podemos observar que as fibras produzidas à partir da solução de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg apresentam uma maior formação de grumos de fibra e biovidro quando comparados com às fibras produzidas à partir da solução de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li e com às fibras produzidas à partir da solução de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado sem íons.

Ainda é possível observar que às fibras produzidas à partir da solução de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg foram as que apresentaram uma maior quantidade de fibras eletrofiadas e às fibras produzidas à partir da solução de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li foram as que

apresentaram uma menor quantidade de fibras eletrofiadas quando comparadas entre si e com às fibras produzidas à partir da solução de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado sem íons terapêuticos.

Em relação à presença do biovidro nas fibras podemos ainda observar e comparar as micrografias retro-espalhadas (Figura 14), onde se torna possível uma melhor visualização das partículas de biovidro devido ao maior contraste em relação às fibras e onde é possível observar que as fibras produzidas à partir da solução de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li foram as que apresentaram melhor visualização das partículas de biovidro no interior das fibras.

Figura 14 – Micrografias retroespalhadas de fibras ultrafinas de PCL com biovidro Sol-gel Precipitado com ausência e presença de íons terapêuticos



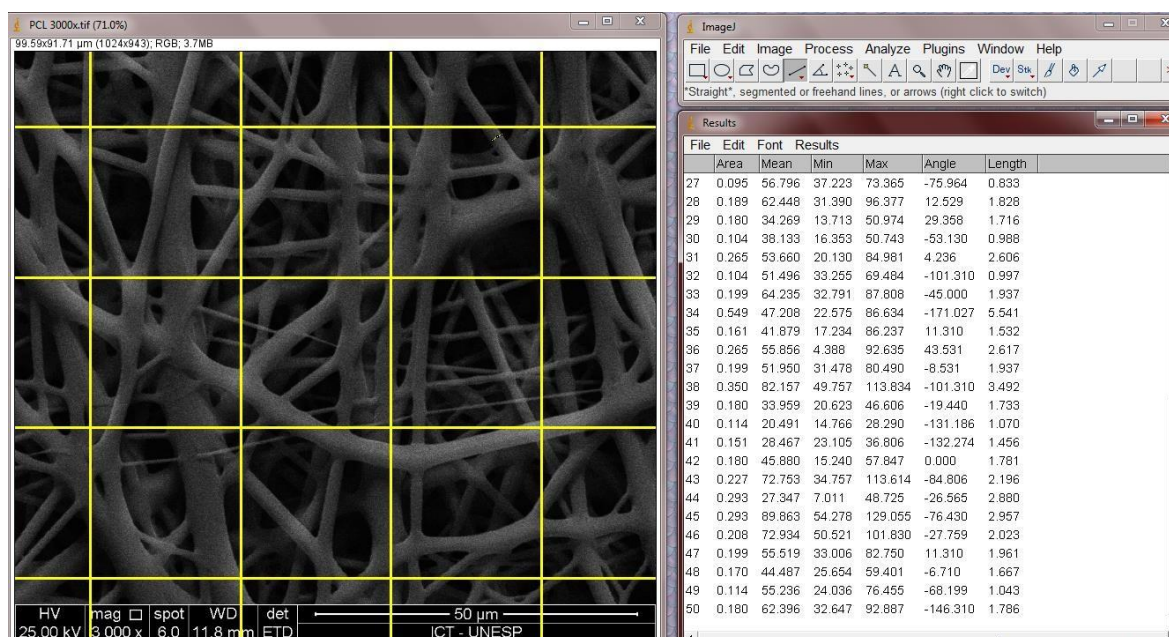
Legenda: A) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado sem íons terapêuticos produzidas pelo processo de eletrofiação. B) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com íons Mg^{+2} produzidas pelo processo de eletrofiação. C) Fibrasde PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com íons Li^{+} produzidas pelo processo de eletrofiação. Aumento de 5.000X.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2 Análise do diâmetro médio das fibras

Por meio de imagens utilizando o software ImageJ (Figura 15), os valores obtidos para média e desvio-padrão podem ser observados na Tabela 2.

Figura 15 – Software ImageJ utilizado para medir o diâmetro das fibras



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos resultados obtidos pelo diâmetro médio das fibras (Figura 16) foi observado que o grupo PCL apresentou fibras com os maiores diâmetros e foi estatisticamente semelhantes ao grupo PCL/P+Li. O grupo PCL/P+Mg apresentou fibras com os menores diâmetros e foi estatisticamente semelhante ao grupo PCL/P e PCL/SG.

Analisando os dados da Tabela 2 podemos observar que o grupo de fibras PCL apresentou fibras com os maiores diâmetros quando comparado aos demais grupos. As fibras do grupo PCL P apresentou fibras menores em relação ao grupo de fibras PCL SG, assim como as partículas de biovidro 58S produzidos pela rota Sol-gel Precipitado apresentou partículas menores em relação ao biovidro 58S produzidos pela rota Sol-gel. As fibras do grupo PCL P Mg apresentou fibras com os menores diâmetros em relação aos demais grupos, o que pode ser inferido pela presença do íon Mg e as fibras do grupo PCL P Li apresentou fibras com diâmetros maiores que os grupos PCL SG, PCL P e PCLP Mg, o que pode ser inferido pela presença do íon Li e uma possível necessidade futura de buscas para melhorar a eletrofiação deste grupo através de novas associações de parâmetros de eletrofiação.

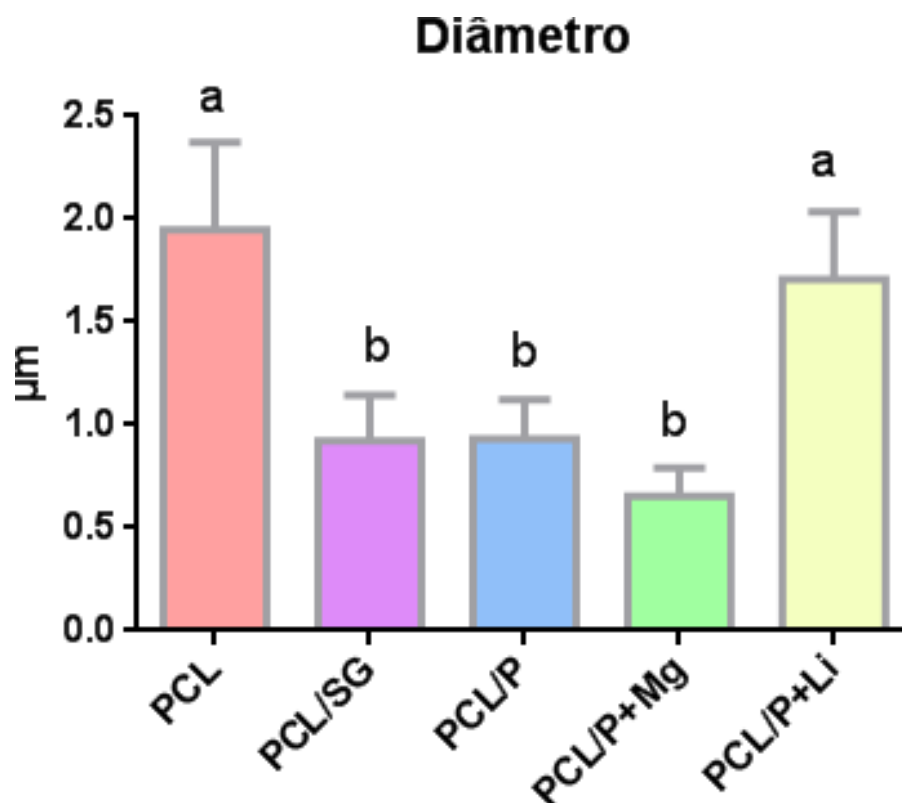
Tabela 2 – Valores de média e desvio-padrão para os grupos de fibras obtidas por eletrofiação

Diâmetro (μm)				
PCL	PCL SG	PCL P	PCL P Mg	PCL P Li
1,92 $\pm$ 0,89	0,93 $\pm$ 0,46	0,90 $\pm$ 0,40	0,67 $\pm$ 0,28	1,69 $\pm$ 0,66

Legenda: Dados de média $\pm$ desvio-padrão em μm . PCL) Fibras de PCL sem biovidro. PCL SG) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. PCL P) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL P Mg) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg. PCL P Li) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Valores de diâmetro médio das fibras



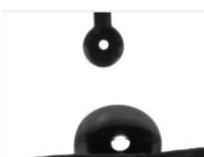
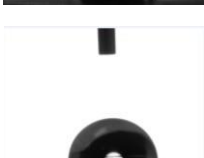
Legenda: Dados de média±desvio-padrão em µm. PCL) Fibras de PCL sem biovidro. PCL SG) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. PCL P) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL P Mg) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg. PCL P Li) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato

Os resultados obtidos através da análise da molhabilidade pelo ângulo de contato dos grupos de fibras podem ser observados em valores médios na Tabela3.

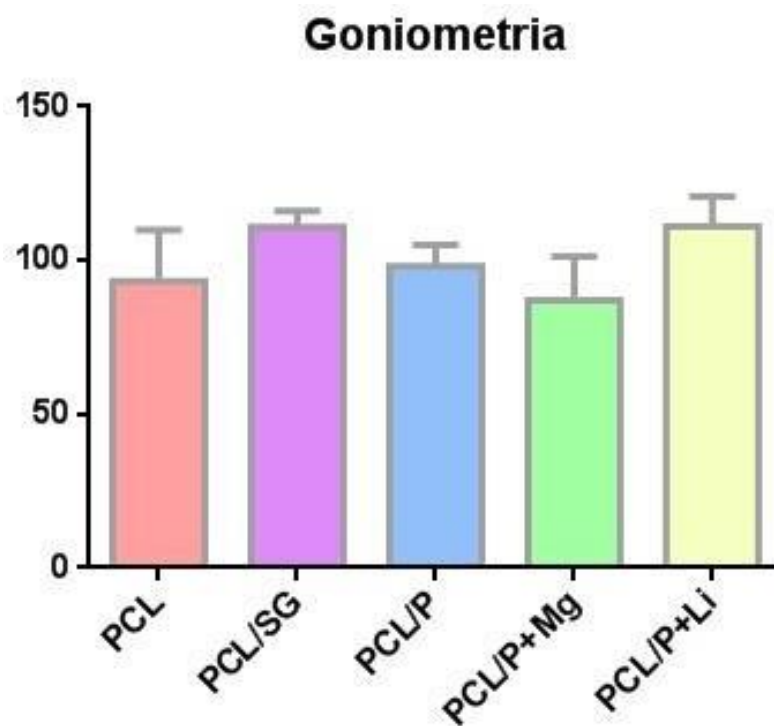
Tabela 3 – Dados médios do ângulo de contato para as fibras de PCL e PCL com biovidro

Grupo	Imagem	Média do ângulo médio
PCL		$93,31^{\circ} \pm 16,65$
PCL SG		$110,83^{\circ} \pm 5,17$
PCL P		$98,24^{\circ} \pm 6,76$
PCL P Mg		$87,09^{\circ} \pm 14,26$
PCL P Li		$111,07^{\circ} \pm 9,76$

Legenda: PCL) Fibras de PCL sem biovidro. PCL SG) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. PCL P) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL P Mg) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg. PCL P Li) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Valores da análise do ângulo de contato



Legenda: PCL) Fibras de PCL sem biovidro. PCL SG) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. PCL P) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL P Mg) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg. PCL P Li) Fibras de PCL com Biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos resultados obtidos pela análise da molhabilidade (Figura 17) foi observado que todos os grupos são estatisticamente semelhantes. O grupo PCL/SG e o grupo PCL/P+Mg apresentou fibras com os menores ângulos de contato.

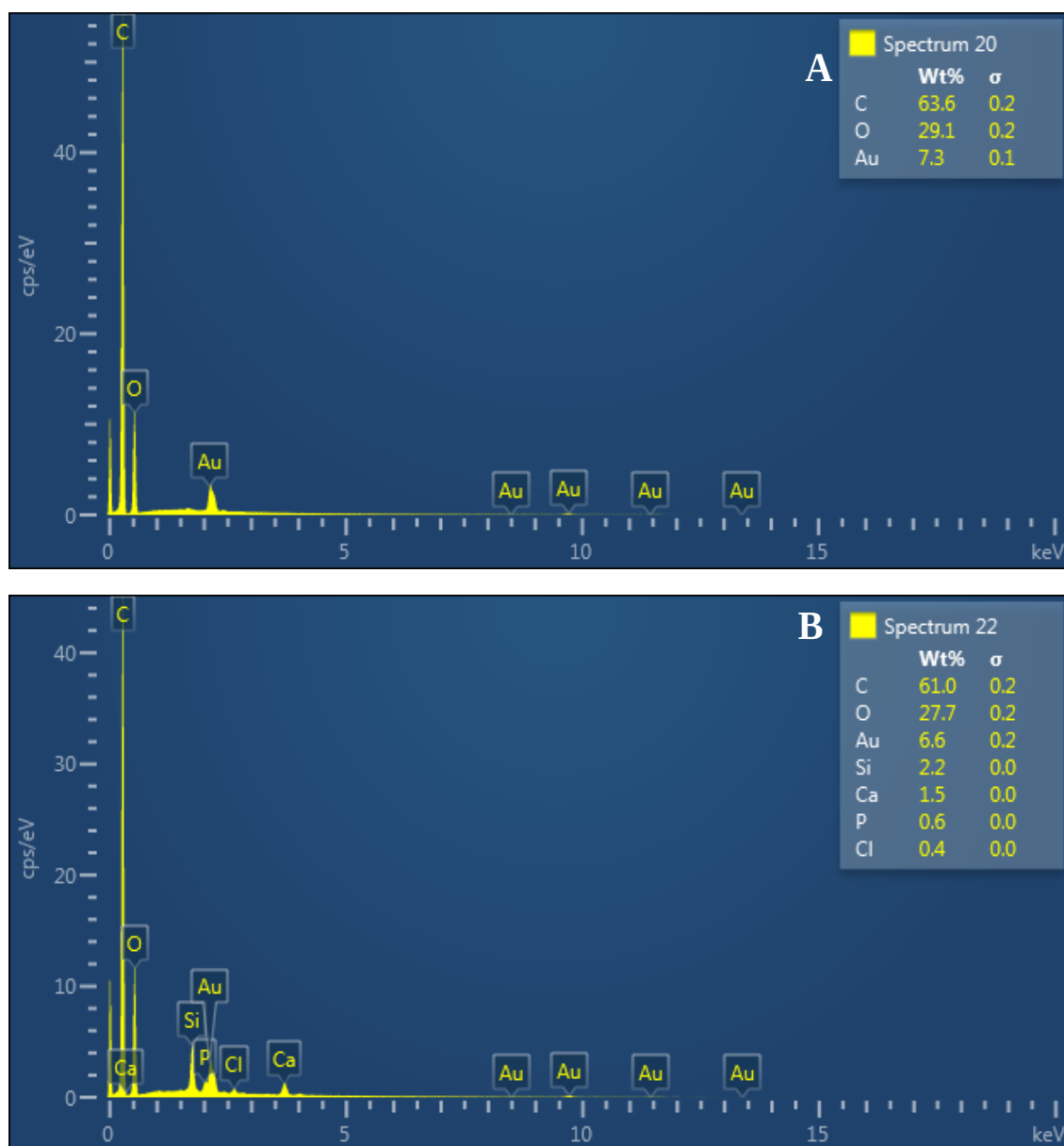
Os dados da análise da molhabilidade mostram o caráter hidrofóbico das fibras produzidas em todos os grupos, característico do polímero utilizado, apresentando ângulos de contato médios de 87,09° a 111,07°.

5.2 Caracterização físico-química

5.2.1 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)

Os dados obtidos por EDS realizados nas fibras produzidas apresentam os elementos químicos presente nas fibras e comprovam a presença dos materiais utilizados para a produção. Para as fibras de PCL podemos observar os elementos carbono e oxigênio, característicos do polímero utilizado. Para as fibras de PCL com biovidro Sol-gel e Sol-gel Precipitado podemos observar os elementos carbono, oxigênio, cálcio, silício e cloro, característicos do biovidro produzido. As análises químicas com os componentes de cada grupo de fibras pode ser observado na Figuras 18, 19 e 20.

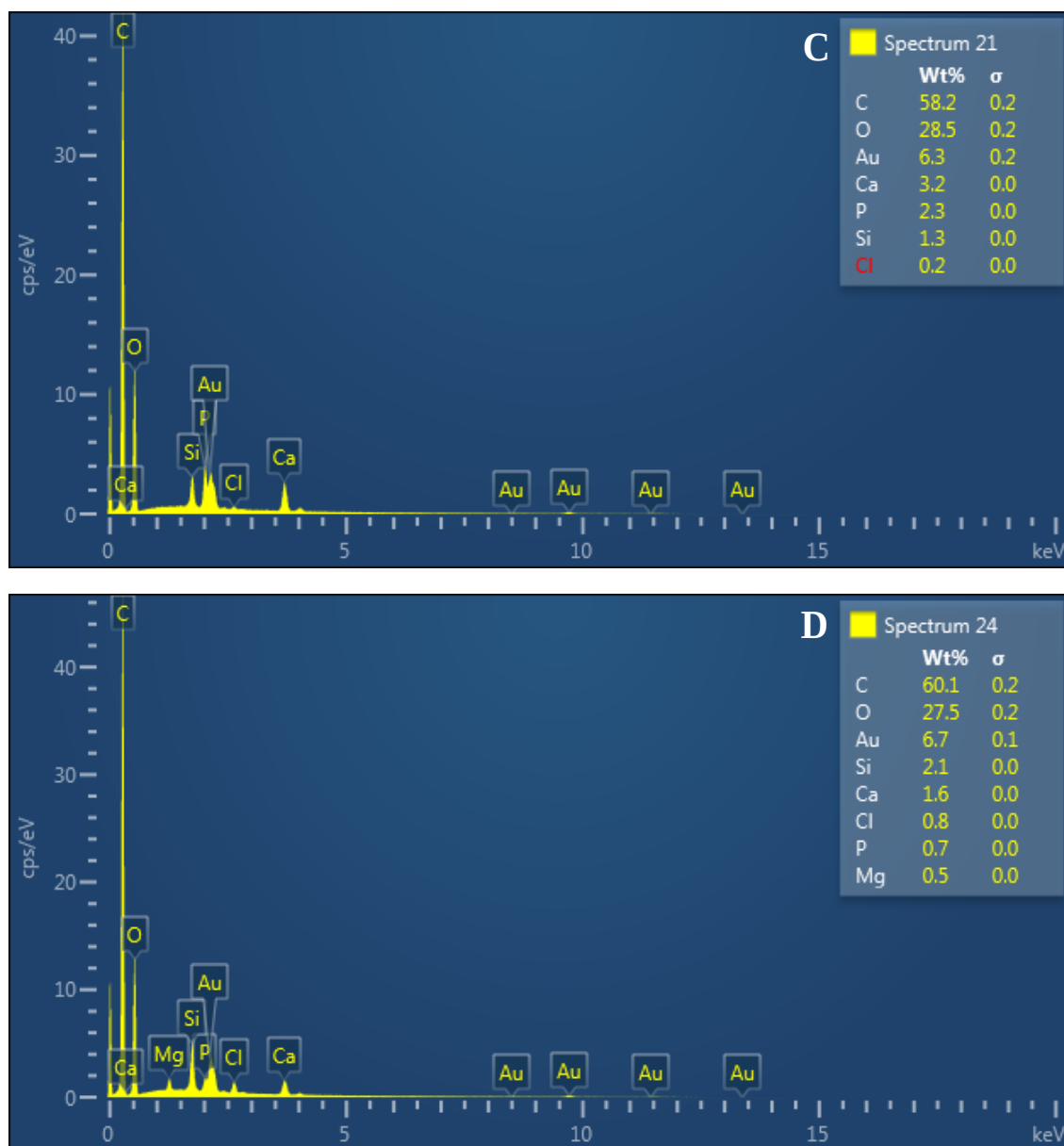
Figura 18 – Análise química por espectroscopia de raios X por dispersão em energia



Legenda: A) EDS referente às fibras de PCL. B) EDS referente às fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

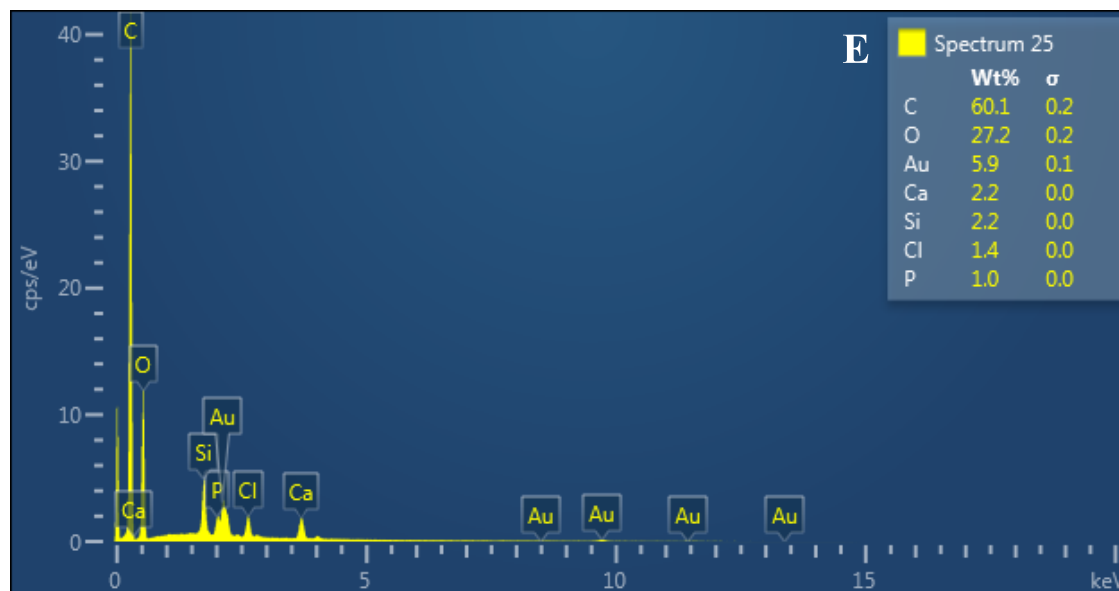
Figura 19 – Análise química por espectroscopia de raios X por dispersão em energia



Legenda: C) EDS referente às fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. D) EDS referente às fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com íons Mg^{+2} .

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Análise química por espectroscopia de raios X por dispersão em energia



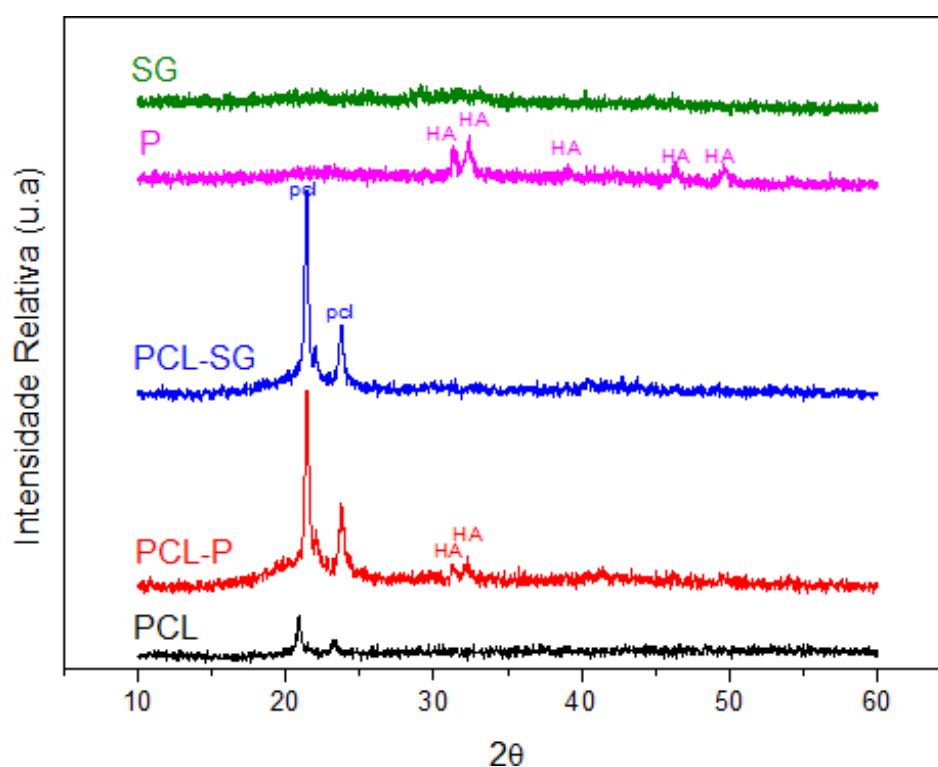
Legenda: E) EDS referente às fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com íons Li^+ .
 Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Difractometria de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X para as fibras de PCL e PCL com biovidro são mostrados nas Figuras 21 e 22. O padrão “SG” mostra-se sem picos de difratometria devido à característica amorfa do biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. O padrão “P” mostra-se característico de um material amorfo como o biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado e evidencia picos de hidroxiapatita precipitados do biovidro. No padrão “PCL” o gráfico apresenta picos de difratometria característicos do polímero utilizado para a produção das fibras. Nos padrões “PCL-SG” e “PCL-P” o gráfico apresenta uma exacerbação dos picos característicos do

polímero utilizado, o que pode ter sido provocado pela presença dos biovidros nas fibras, além de no padrão “PCL-P” apresentar picos característicos da precipitação de hidroxiapatita assim como no padrão “P”. O padrão “Mg” apresenta picos de CaMgSiO_6 que mostram que o Mg foi incorporado à estrutura do material, sendo um indicativo de homogeneidade e o padrão “Li” mostra uma ausência de cristalização de fases que sejam diferentes do padrão “P” controle.

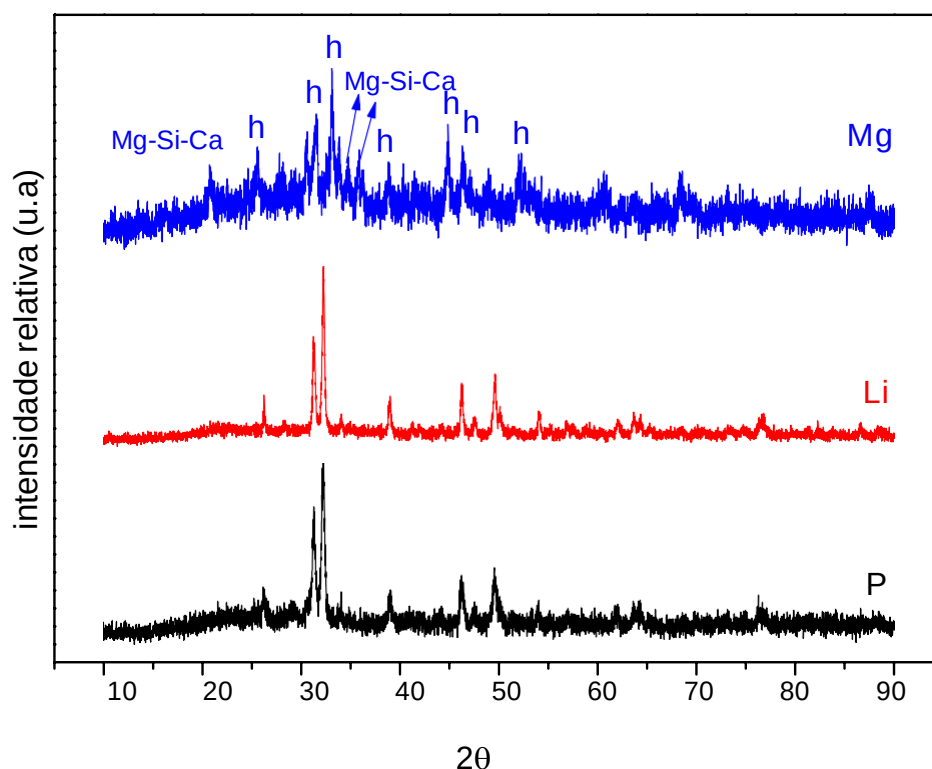
Figura 21 – Difratomogramas dos biomateriais produzidos



Legenda: SG) Pó de biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. P) Pó de biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL-SG) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. PCL-P) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL) Fibras de PCL.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 - Difratomogramas dos biomateriais produzidos



Legenda: Mg) Pó de biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg. Li) Pó de biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li. P) Pó de biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado.

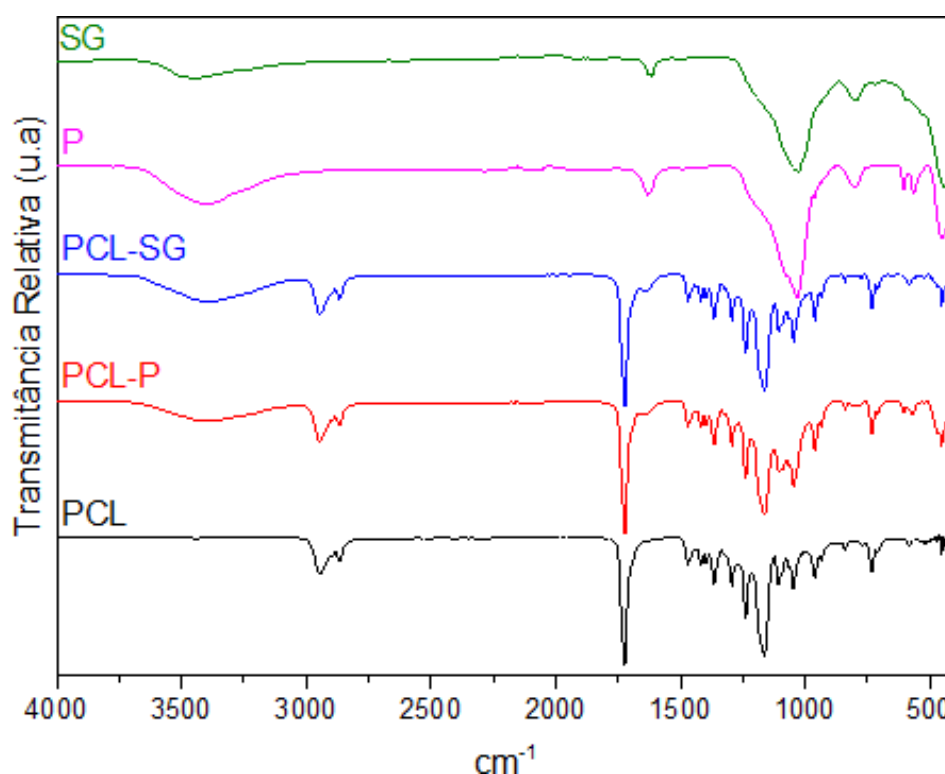
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Através da análise de FTIR das fibras de PCL com os biovidros foi possível observar bandas referente às estruturas químicas sílica (Si-O-Si), fosfato (PO_4) e grupo silanol (SiOH), o qual é responsável pela intensa adesão celular ao material (Souza, 2014). Durante a análise das fibras de PCL sem biovidro foi possível observar bandas características do polímero

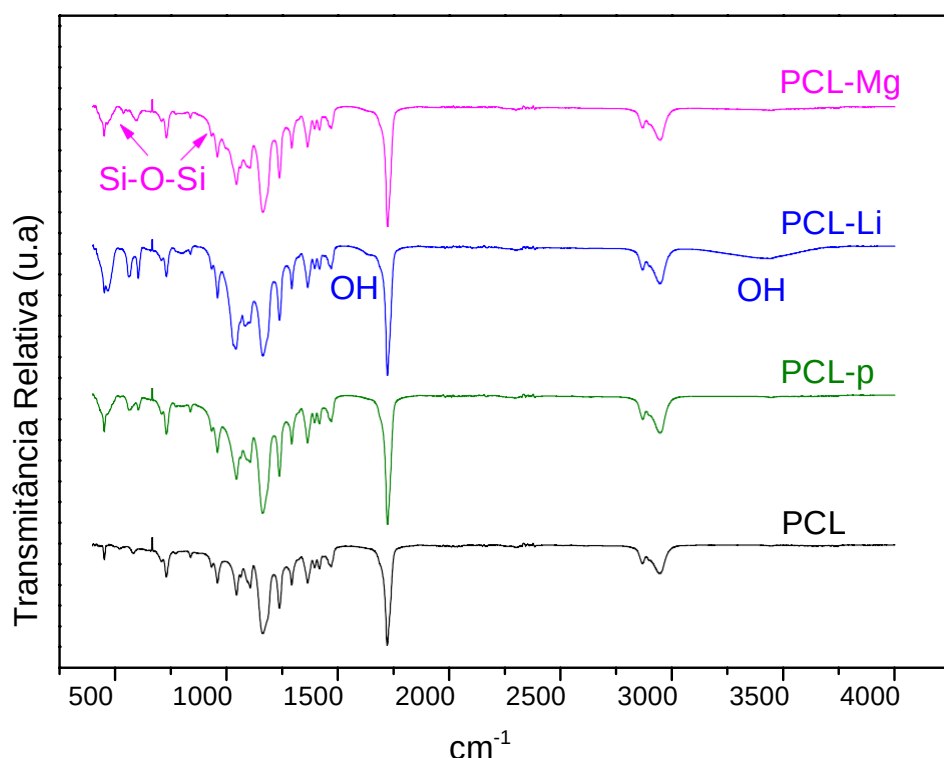
puro, evidenciando que não houve alteração da composição química do polímero durante o processo de eletrofiação das fibras produzidas (Figuras 23 e 24).

Figura 23 – Espectro de infravermelho dos materiais produzidos



Legenda: SG) Partículas de biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. P) Partículas de biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL-SG) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. PCL-P) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL) Fibras de PCL.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Espectro de infravermelho dos materiais produzidos



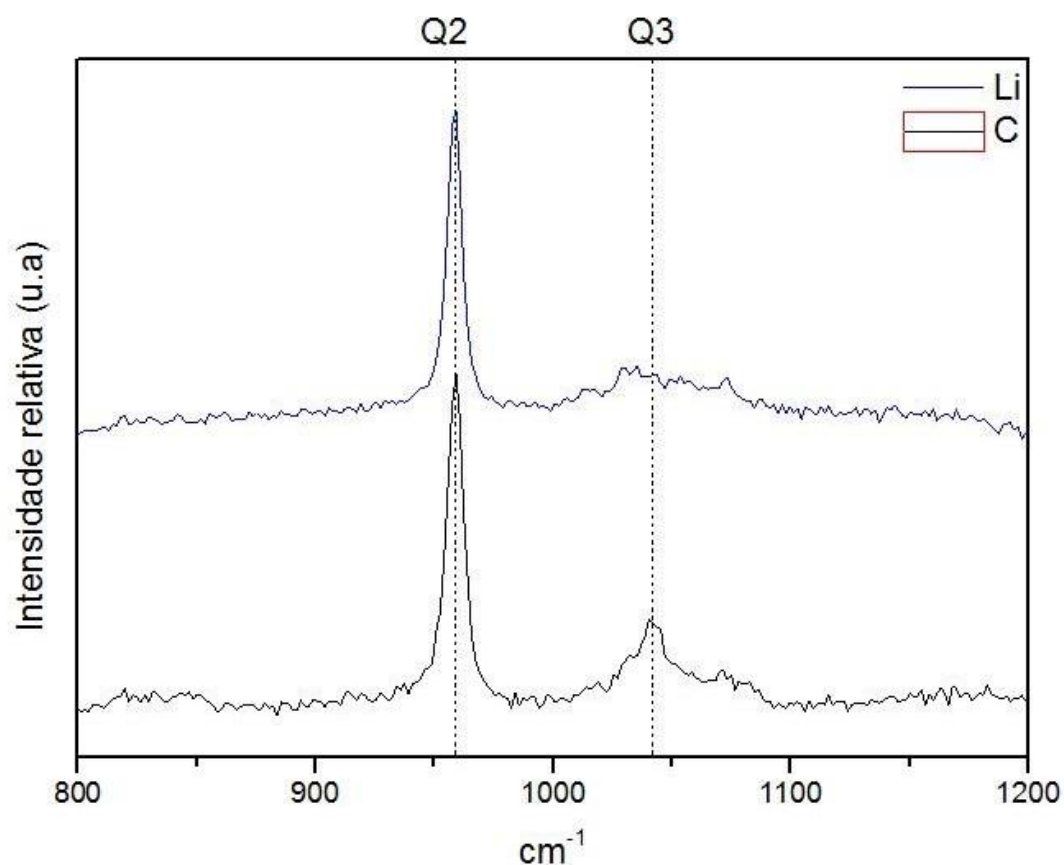
Legenda: PCL-Mg) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg. PCL-Li) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li. PCL-P) Fibras de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL) Fibras de PCL.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.4 Espectroscopia de Raman

Através dos dados obtidos pela espectroscopia de Raman (Figura 25) foi observado que para o grupo Li que a redução de Q3 e o aumento de Q2 são indicativos da incorporação de hetero-átomos na rede, sendo um forte indicativo da incorporação do lítio na rede vítrea. Os demais grupos não obtiveram resultado devido à fluorescência causada pelos grupos OH, artefato que impede que tenha um espectro de qualidade suficiente para determinar as ligações químicas presentes no material.

Figura 25 – Espectros de Raman para os biovidros sol-gel precipitado e sol-gel precipitado dopado com Li



Legenda: Espectros de Raman. Q2 e Q3) Grupos de ligações siloxanas. Li) Biovidro produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li. C) Grupo controle de biovidro produzido pela rota Sol-gel Precipitado. Fonte: Elaborado pelo autor.

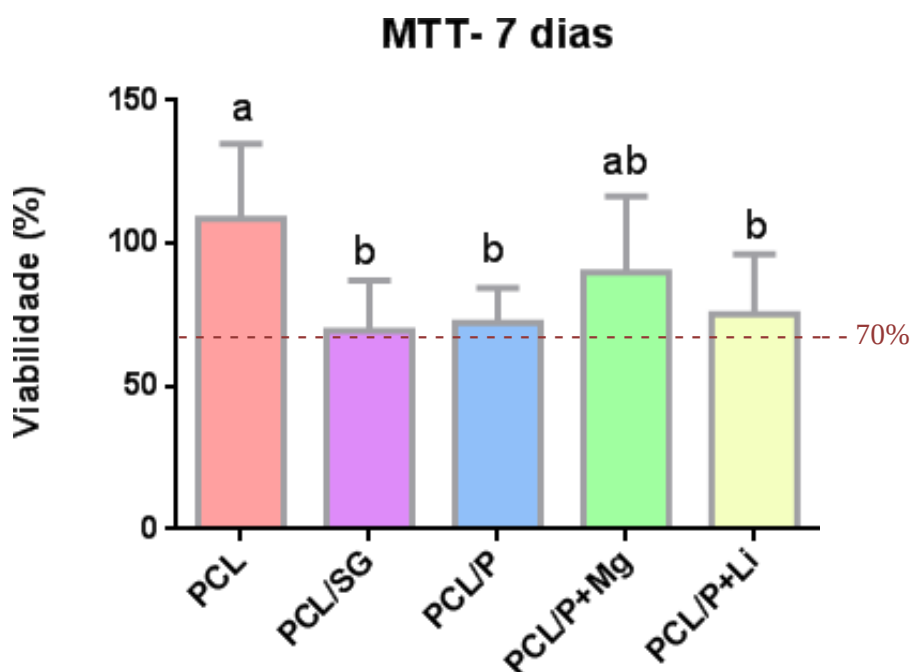
5.3 Caracterização biológica *in vitro*

5.3.1 Teste de viabilidade celular (MTT)

A partir dos resultados obtidos para o teste de MTT (Figura 26) foi observado que todos os grupos experimentais apresentaram viabilidade

celular acima de 70%. O grupo PCL apresentou o maior valor de MTT e foi estatisticamente semelhante ao grupo PCL/P+Mg ($p>0,05$). Os grupos PCL/SG, PCL/P e PCL/P+Li foram estatisticamente semelhantes entre si e ao grupo PCL/P+Mg.

Figura 26 – Valores de viabilidade celular



Legenda: PCL) *Scaffold* de PCL. PCL/SG) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. PCL/P) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL/P+Mg) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg. PCL/P+Li) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li.

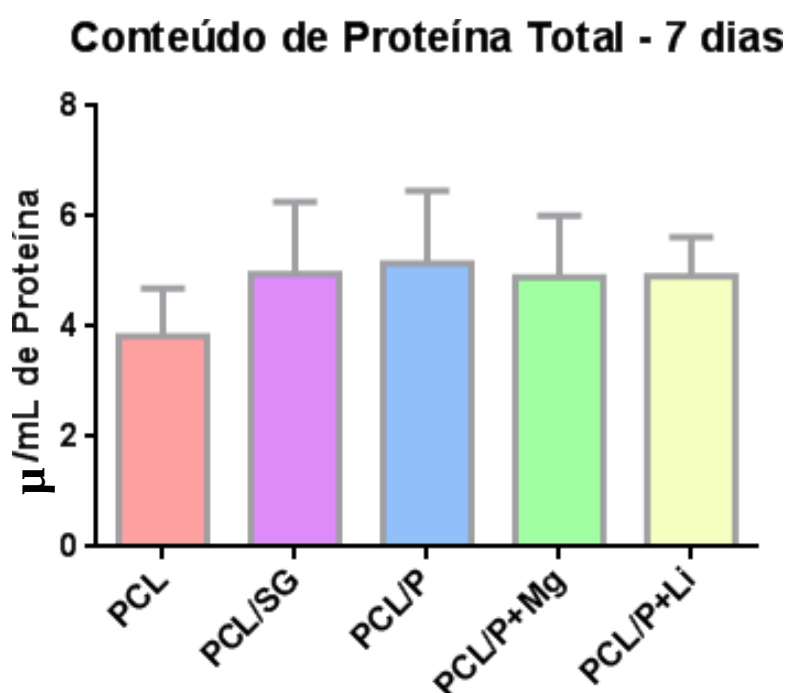
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.2 Proteína Total

Nos resultados obtidos para o teste de proteína total (Figura 27) foi observado que todos os grupos foram estatisticamente semelhantes entre si.

O grupo PCL/P apresentou o maior valor do conteúdo de proteína total e o grupo PCL apresentou o menor valor do conteúdo de proteína total.

Figura 27 – Valores do conteúdo de proteína total



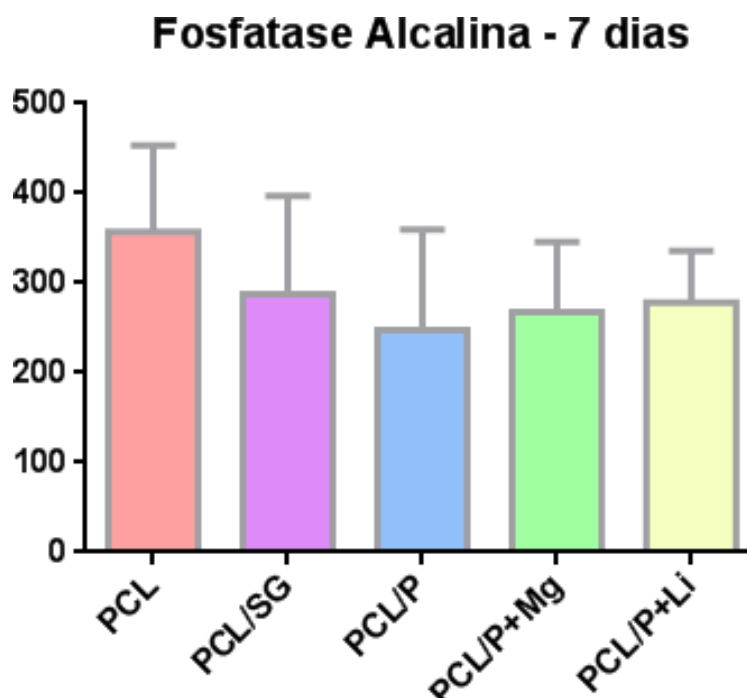
Legenda: PCL) *Scaffold* de PCL. PCL/SG) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. PCL/P) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL/P+Mg) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg. PCL/P+Li) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

Nos resultados obtidos para o teste de ALP (Figura 28) observou-se que todos os grupos foram estatisticamente semelhantes entre si. O grupo PCL apresentou o maior valor de ALP e o grupo PCL/P apresentou o menor valor do conteúdo de ALP.

Figura 28 – Valores da atividade da fosfatase alcalina



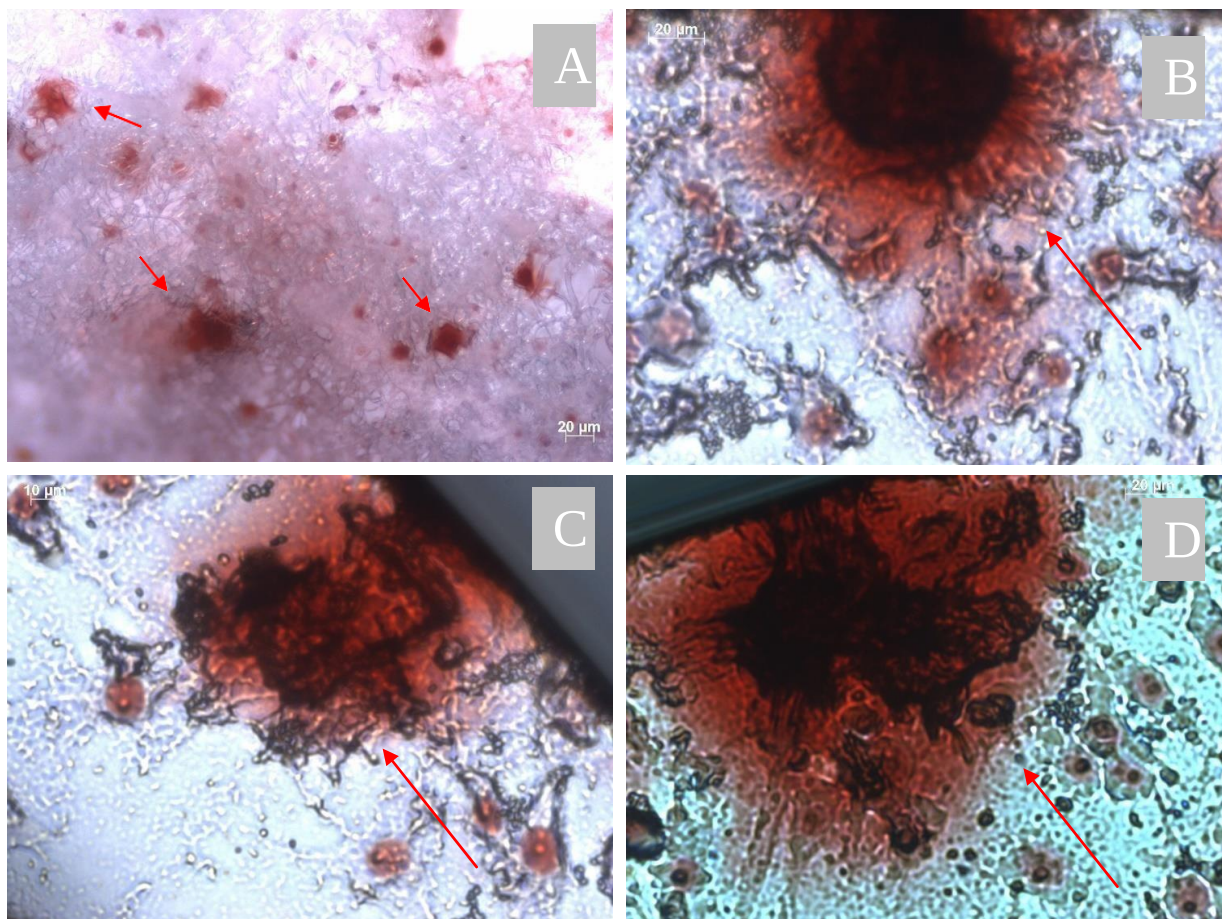
Legenda: PCL) *Scaffold* de PCL. PCL/SG) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel. PCL/P) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado. PCL/P+Mg) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Mg. PCL/P+Li) *Scaffold* de PCL com biovidro 58S produzido pela rota Sol-gel Precipitado dopado com Li.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.4 Nódulos de mineralização

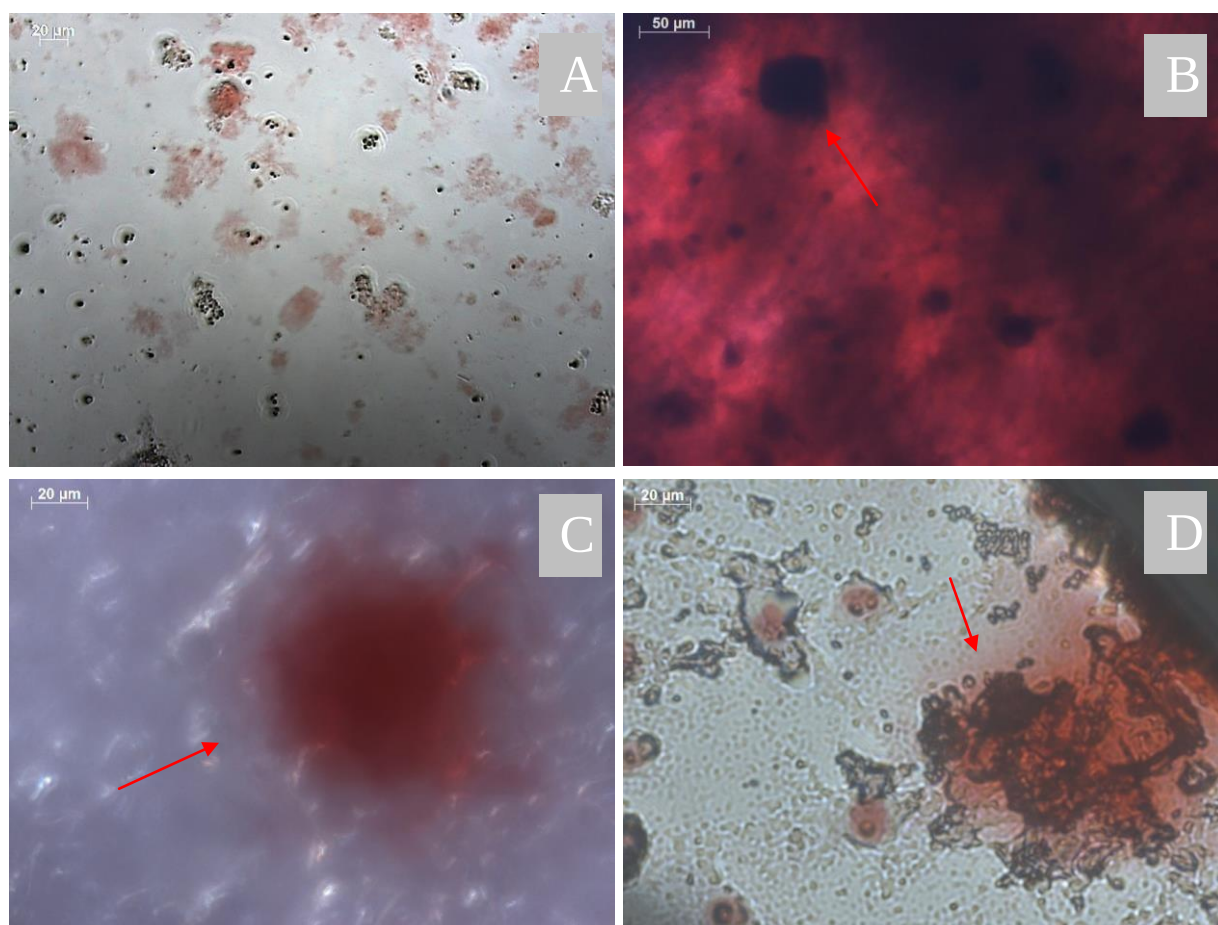
A partir dos resultados obtidos para o teste de nódulos de mineralização foi observado que todos os grupos apresentaram, qualitativamente, formação de nódulos de mineralização, sendo observados indicados pelas setas (Figura 29 a 33).

Figura 29 – Micrografia dos nódulos de mineralização dos *scaffolds* de PCL



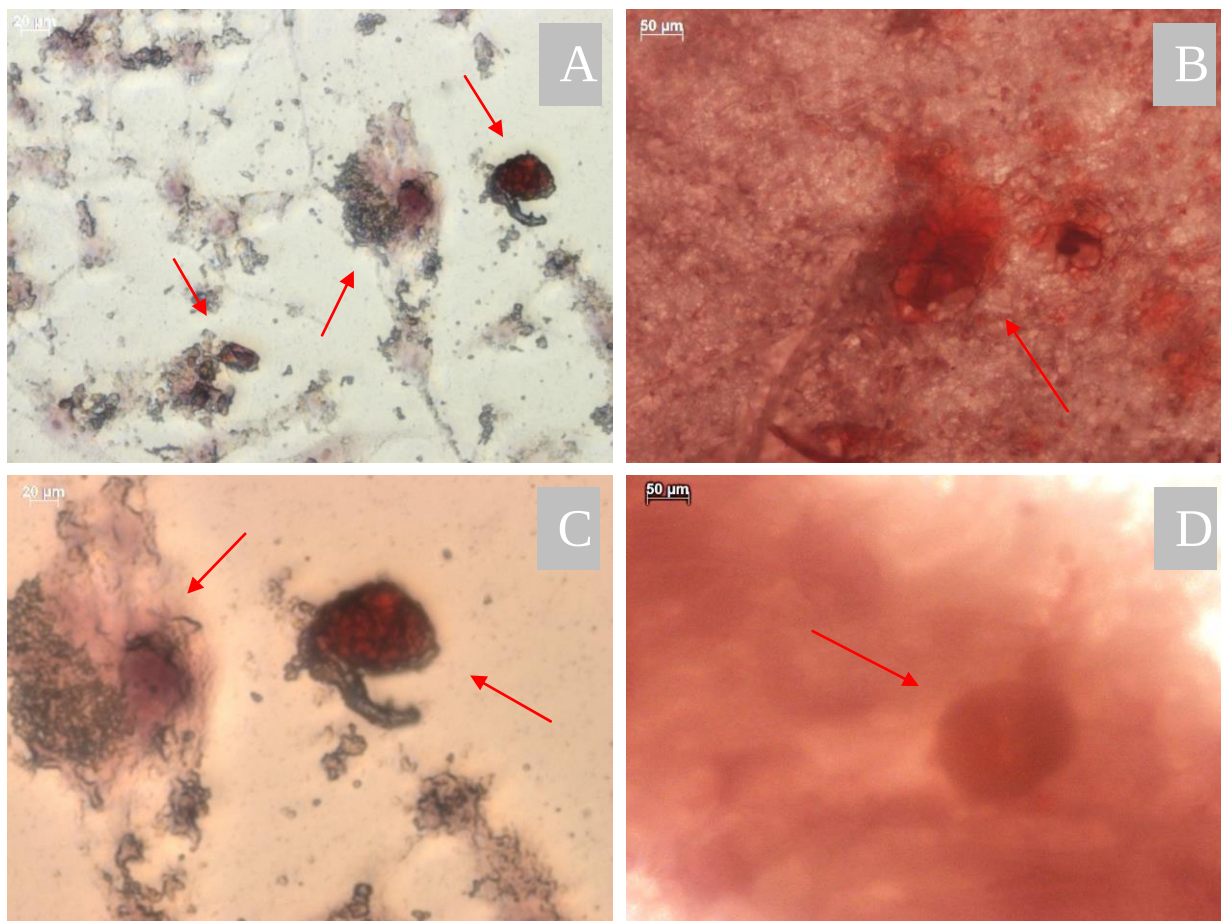
Legenda: A) Aumento de 10X. B) Aumento de 20X. C) Aumento de 20X. D) Aumento de 40X.
Os nódulos de mineralização estão indicados pelas setas.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 – Micrografia dos nódulos de mineralização dos *scaffolds* de PCL P



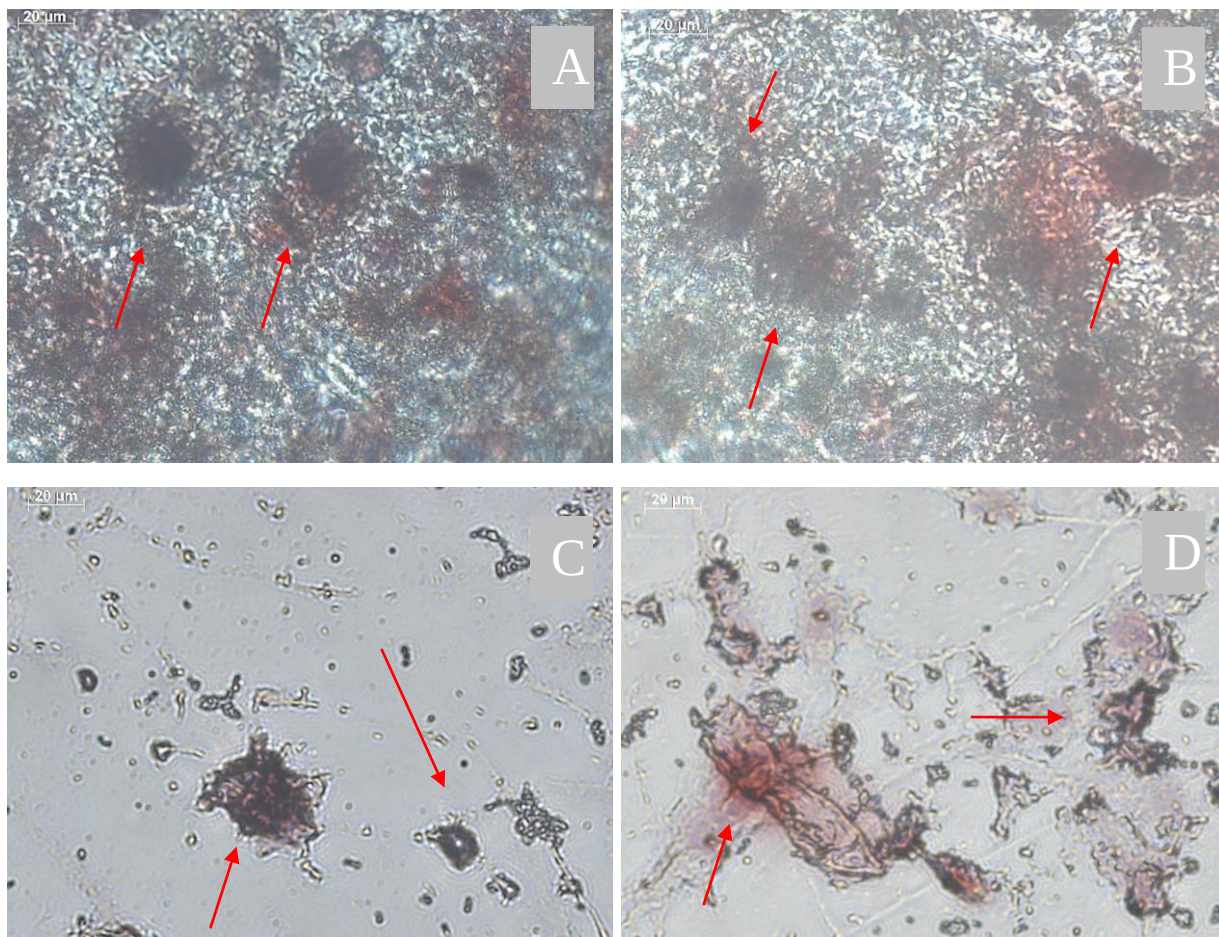
Legenda: A) Aumento de 10X. B) Aumento de 20X. C) Aumento de 40X. D) Aumento de 40X. Os nódulos de mineralização estão indicados pelas setas.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31 – Micrografia dos nódulos de mineralização dos *scaffolds* de PCL SG



Legenda: A) Aumento de 5X. B) Aumento de 10X. C) Aumento de 20X. D) Aumento de 40X.
Os nódulos de mineralização estão indicados pelas setas.
Fonte: Elaborado pelo autor.

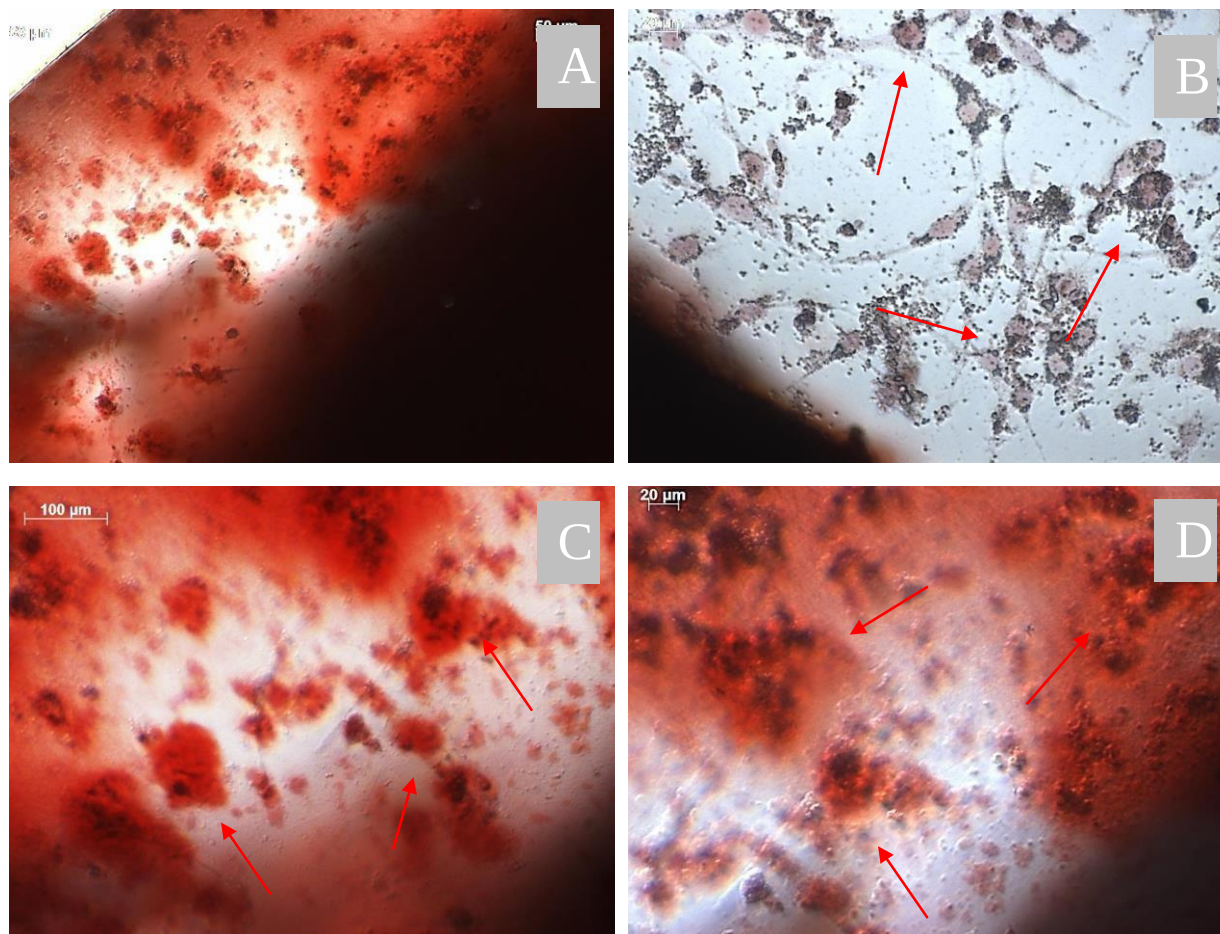
Figura 32 – Micrografia dos nódulos de mineralização dos *scaffolds* de PCL Mg



Legenda: A) Aumento de 10X. B) Aumento de 20X. C) Aumento de 20X. D) Aumento de 40X .
Os nódulos de mineralização estão indicados pelas setas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33 – Micrografia dos nódulos de mineralização dos *scaffolds* de PCL Li



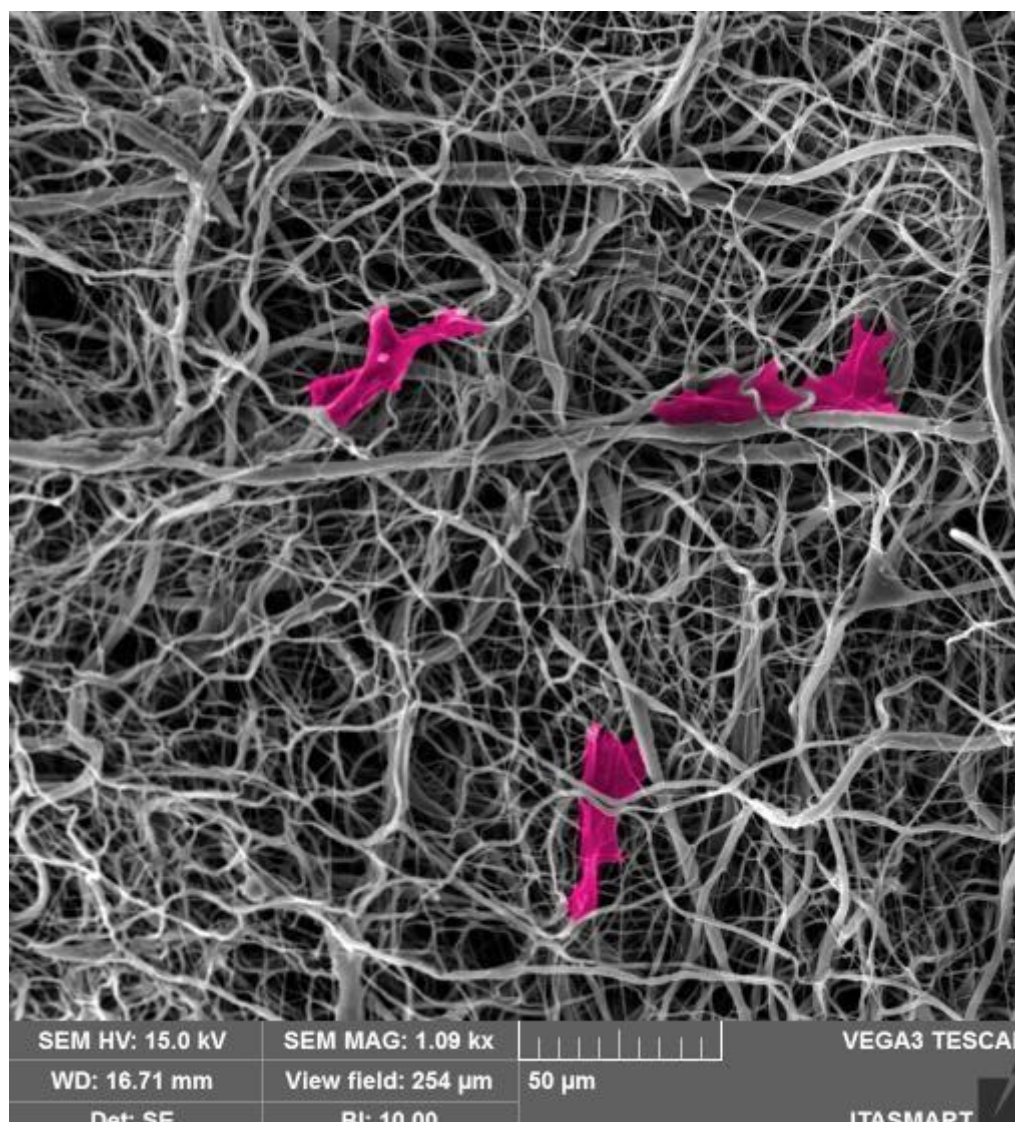
Legenda: A) Aumento de 10X. B) Aumento de 10X. C) Aumento de 20X. D) Aumento de 40X. Os nódulos de mineralização estão indicados pelas setas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Nas imagens obtidas por MEV foi possível observar a presença de células nos *scaffolds* produzidos, comprovando a viabilidade celular e a sua não citotoxicidade (Figura 34).

Figura 34 – Micrografia após fixação celular dos *scaffolds*



Legenda: Células, em rosa, presentes entre as fibras produzidas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A reabsorção óssea como consequência de doenças, como a doença periodontal, e que afeta os tecidos periodontais é uma das causas mais comuns de perda óssea em pacientes odontológicos (Kerbaudy et al., 1999), sendo necessário o desenvolvimento de alternativas para suprir a necessidade em tratamentos clínicos baseados em regeneração tecidual (Amaral, 2018).

A utilização de polímeros biodegradáveis, como o PCL, tem sido amplamente estudada para a utilização como estruturas tridimensionais que auxiliam no processo de regeneração óssea, sendo uma alternativa de fácil utilização, produção e de baixo custo (Dziadek et al., 2015).

No estudo realizado, a utilização de fibras ultrafinas de PCL associadas ao biovidro dopado foi diretamente atribuída às propriedades de osteoindução dos biovidros. Esses materiais recebem atenção por poderem ser desenvolvidos para aplicações específicas como para implantes dentais, cicatrização óssea e osseointegração (Ratner et al., 2004).

A utilização de biovidros 58S pela rota Sol-gel apresenta como vantagens sobre os métodos tradicionais uma maior pureza e homogeneidade, temperaturas de processamento mais baixas, melhor ligação ao tecido ósseo e melhor degradabilidade e reabsorção *in vivo* (Bejarano et al., 2015). A partir da caracterização dos biovidros podemos observar que os biovidros produzidos pelas duas diferentes rotas apresentam diferenças em relação ao tamanho das partículas, sendo o biovidro produzido pela rota Sol-gel Precipitado o que apresentou menores partículas e mais homogêneas, o que resultaria em taxas de mineralização mais elevadas quando comparado com partículas micrométricas (Frazão et al., 2015), e que a adição de íons terapêuticos na produção dos biovidros influenciou na morfologia e

quantidade das fibras produzidas, porém a influencia na molhabilidade do polímero não foi estatisticamente significante.

Nanofibras produzidas por eletrofiação possuem a mesma estrutura e topologia que as matrizes extracelulares naturais, assim são candidatas ideais para a produção destes suportes (Goes et al., 2012). Com base nos resultados obtidos podemos observar que apesar de apresentarem diferença morfológica entre os grupos, em ambos pode-se observar uma satisfatória produção de fibras com ausência de defeitos e com a possibilidade de observar a presença de partículas de biovidro no interior e na superfície das fibras produzidas.

Os dados obtidos por EDS apresentam os elementos químicos presentes nas fibras e comprovam a presença dos materiais utilizados para a produção. Para as fibras de PCL podemos observar os elementos carbono e oxigênio, característicos do polímero utilizado, concordado com estudos de (Liu et al., 2019).

Para as fibras de PCL com biovidro Sol-gel e Sol-gel Precipitado podemos observar os elementos carbono, oxigênio, cálcio, silício e cloro, característicos do biovidro produzido, concordando com estudos de (Cañaveral et al., 2019).

O resultado de difratometria de cada material apresentou padrões de difratometria característicos de cada material, como em trabalhos de (Pereira et al., 2013; Sánchez Cepeda, 2016). Nos padrões “PCL-SG” e “PCL-P” foi possível observar que a presença do biovidro causa uma exacerbação dos picos característicos do polímero. O padrão “Mg” apresenta picos de CaMgSiO_6 que mostram a característica de um material homogêneo com pouca cristalização e o padrão “Li” mostra uma maior formação de grupo silanol, característico de materiais de promovem intensa adesão celular (da Fonseca et al., 2020; Leonor et al., 2011).

Através da análise de FTIR foi possível observar bandas referentes

às estruturas químicas sílica (Si-O-Si), fosfato (PO₄) e grupo silanol (SiOH), o qual é responsável pela intensa adesão celular ao material (Souza, 2014) e foi possível confirmar a incorporação dos biovidros nos polímeros. Durante a análise das fibras de PCL sem biovidro foi possível observar bandas características do polímero puro, evidenciando que não houve alteração da composição química do polímero durante o processo de eletrofiação das fibras produzidas (Catauro et al., 2014).

A partir dos testes *in vitro* realizados, os resultados mostraram que os biomateriais testados não são citotóxicos. Em relação à viabilidade celular, os estudos revelaram presença de células viáveis em todos os grupos, sugerindo que PCL e biovidro têm efeito sobre a proliferação celular, concordando com trabalhos já realizados (da Fonseca et al., 2020).

A atividade e diferenciação celular, bem como a formação óssea foram realizados por meio dos testes de proteína total, fosfatase alcalina e nódulo de mineralização, respectivamente. Analisando a proteína total, os grupos contendo biovidro obtiveram resultados superiores em relação ao grupo com o polímero puro, porém sem diferença estatística. Na mensuração da produção de enzima da fosfatase alcalina (importante na mineralização de matriz extracelular) os grupos não apresentaram diferença estatística. Estudos mostram que materiais poliméricos de PCL com biovidro podem liberar íons cálcio, silício e fosfato, responsáveis por intensificar a ALP (Dziadek et al., 2015).

Foi analisada também, de forma qualitativa, a formação de nódulos de mineralização, onde foi possível observar sua formação em todos os grupos testados, indicando que foi possível a adesão, proliferação e formação de nódulos de mineralização pelas células mesenquimais nos *scaffolds* produzidos. Estudos mostram que a presença dos componentes presentes nos biovidros também estão relacionados com o favorecimento do processo de mineralização (Farea et al., 2014).

CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, foi possível produzir e caracterizar os novos biomateriais produzidos, sendo considerados biomateriais promissores para a área de engenharia tecidual, uma vez que apresentam respostas físicas, químicas e biológicas favoráveis ao comportamento celular, porém são necessárias maiores investigações sobre sua influência *in vitro*, como a avaliação da taxa de degradação e métodos de esterilização dos *scaffolds*, e *in vivo*, com testes em animais experimentais e testes clínicos.

REFERÊNCIAS*

Abdali Z, Logsetty S, Liu S. Bacteria-responsive single and core-shell nanofibrous membranes based on polycaprolactone/poly(ethylene succinate) for on-demand release of biocides. *ACS Omega*. 2019;4(2):4063-70. doi:10.1021/acsomega.8b03137.

Amaral SS. Membranas porosas de polímeros de PLA e PCL: estudo in vitro microbiológico e da osteogênese [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

Anindyajati A, Boughton P, Ruys A. Fabrication and microstructure evaluation of fibrous composite for acetabular labrum implant. *Mater Sci Forum*. 2017;900:17-22. doi: 10.4028. /www.scientific.net/msf.900.17.

Baino F, Hamzehlou S, Kargozar S. Bioactive glasses: where are we and where are we going? *J Funct Biomater*. 2018 Mar 19;9(1):25. doi:10.3390/jfb9010025. PMID: 29562680; PMCID: PMC5872111.

Baker BM, Mauck RL. The effect of nanofiber alignment on the maturation of engineered meniscus constructs. *Biomaterials*. 2007 Apr;28(11):1967-77. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.01.004. Epub 2007 Jan 23. PMID: 17250888; PMCID: PMC1847368.

Bal BS, Rahaman MN, Jayabalan P, Kuroki K, Cockrell MK, Yao JQ, et al. In vivo outcomes of tissue-engineered osteochondral grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Apr;93(1):164-74. doi:10.1002/jbm.b.31571. PMID: 20091911.

Bejarano J, Caviedes P, Palza H. Sol-gel synthesis and in vitro bioactivity of copper and zinc-doped silicate bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomed Mater*. 2015 Mar 11;10(2):025001. doi:10.1088/1748-6041/10/2/025001. PMID: 25760730.

Bellucci D, Chiellini F, Ciardelli G, Gazzarri M, Gentile P, Sola A, et al. Processing and characterization of innovative scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Jun;23(6):1397-409. doi:10.1007/s10856-012-4622-6. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22441671.

Bellucci D, Sola A, Gazzarri M, Chiellini F, Cannillo V. A new hydroxyapatite-based biocomposite for bone replacement. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Apr 1;33(3):1091-101. doi:10.1016/j.msec.2012.11.038. Epub 2012 Dec 8. PMID: 23827547.

Borges ALS, Münchow EA, de Oliveira Souza AC, Yoshida T, Vallittu PK, Bottino MC. Effect of random/aligned nylon-6/MWCNT fibers on dental resin composite reinforcement. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015 Aug;48:134-44. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.03.019. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25933169.

Bugarin Júnior JG, Garrafa V. Bioética e biossegurança: uso de biomateriais na prática odontológica [Bioethics and biosafety: the use of biomaterials in dental practice]. *Rev Saude Publica*. 2007 Apr;41(2):223-8. doi:10.1590/s0034-89102007000200008. PMID: 17384797.

Cai Q, Bei J, Wang S. Synthesis and degradation of a tri-component copolymer derived from glycolide, L-lactide, and epsilon-caprolactone. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2000;11(3):273-88. doi:10.1163/156856200743698. PMID: 10841279.

Cai Y, Guo L, Shen H, An X, Jiang H, Ji F, et al. Degradability, bioactivity, and osteogenesis of biocomposite scaffolds of lithium-containing mesoporous bioglass and mPEG-PLGA-b-PLL copolymer. *Int J Nanomedicine*. 2015 Jun 24;10:4125-36. doi:10.2147/IJN.S82945. eCollection 2015. PMID: 26150718. PMCID: PMC4484672.

Canaveral S, Morales D, Vargas AF. Synthesis and characterization of a 58S bioglass modified with manganese by a sol-gel route. *Mater Lett*. 2019;255:126575. doi: 10.1016/j.matlet.2019.126575.

Cao L, Weng W, Chen X, Zhang J, Zhou Q, Cui J, et al. Promotion of in vivo degradability, vascularization and osteogenesis of calcium sulfate-based bone cements containing nanoporous lithium doping magnesium silicate. *Int J Nanomedicine*. 2017 Feb;12:1341-52. doi:10.2147/IJN.S124965. eCollection 2017. PMID: 28260883. PMCID: PMC5325137.

Catauro M, Bollino F, Veronesi P, Lamanna G. Influence of PCL on mechanical properties and bioactivity of ZrO₂-based hybrid coatings synthesized by sol-gel dip coating technique. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Jun 1;39:344-51. doi:10.1016/j.msec.2014.03.025. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24863235.

Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambrone FAD. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Rev Bras de Cienc Farm*. 2004;40(3):289-99. doi: 10.1590/s1516-93322004000300004.

Chakraborty Banerjee P, Al-Saadi S, Choudhary L, Harandi SE, Singh R. Magnesium implants: prospects and challenges. *Materials (Basel)*. 2019 Jan

3;12(1):136. doi:10.3390/ma12010136. PMID: 30609830. PMCID: PMC6337251.

Chen M, Patra PK, Warner SB, Bhowmick S. Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds. *Tissue Eng.* 2007 Mar;13(3):579-87. doi:10.1089/ten.2006.0205. PMID: 17518604.

Costa RG, Oliveira J E D, Paula GFD, Picciani PHDS, Medeiros ESD, Ribeiro C, Mattoso LH. Eletrofiação de polímeros em solução: parte I: fundamentação teórica. *Polímeros.* 2012;22(2):170-7. doi:10.1590/SD104-14282012005000026.

Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *J Clin Invest.* 2014 Feb;124(2):466-72. doi:10.1172/JCI70050. Epub 2014 Feb 3. PMID: 24487640; PMCID: PMC3904610.

Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, et al. Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.* 2004 Dec;25(27):5857-66. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.043. PMID: 15172498.

Dziadek M, Pawlik J, Menaszek E, Stodolak-Zych E, Cholewa-Kowalska K. Effect of the preparation methods on architecture, crystallinity, hydrolytic degradation, bioactivity, and biocompatibility of PCL/bioglass composite scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015Nov;103(8):1580-93. doi:10.1002/jbm.b.33350. Epub 2014 Dec 23. PMID: 25533304.

Farea M, Husein A, Halim AS, Abdullah NA, Mokhtar KI, Lim CK, et al. Synergistic effects of chitosan scaffold and TGF β 1 on the proliferation and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth. *Arch Oral Biol.* 2014 Dec;59(12):1400-11. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.08.015. Epub 2014 Sep 6. PMID: 25222336.

da Fonseca GF, Avelino SOM, Mello DCR, do Prado RF, Campos TMB, de Vasconcellos LMR, et al. Scaffolds of PCL combined to bioglass: synthesis, characterization and biological performance. *J Mater Sci Mater Med.* 2020 Apr 29;31(5):41. doi:10.1007/s10856-020-06382-w. PMID: 32350625.

Frazão MCA, da Silva GV, Linhares TS, Lago A DN, Lima DM. Biovidro 45S5: um avanço biotecnológico nos materiais restauradores da odontologia. *Rev Fac Odontol Lins.* 2015;25(2):47-55. doi: 10.15600/2238-1236/fo1.v25n2p47-55.

Gao F, Hu Y, Li G, Liu S, Quan L, Yang Z, et al. Layer-by-layer deposition of bioactive layers on magnesium alloy stent materials to improve corrosion resistance and biocompatibility. *Bioact Mater*. 2020 May 7;5(3):611-23. eCollection 2020 Sep. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.04.016. PMID: 32405576. PMCID: PMC7212186.

Gao S, Wang Y, Wang X, Lin P, Hu M. Effect of lithium ions on cementoblasts in the presence of lipopolysaccharide *in vitro*. *Exp Ther Med*. 2015 Apr;9(4):1277-82. doi:10.3892/etm.2015.2276. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25780422. PMCID: PMC4353773.

Goes AM, Carvalho S, Oréface RL, Avérous L, Custódio TA, Pimenta JG, et al. Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorilonita. *Polimeros*. 2012;22(1):34–40. doi: 10.1590/S0104-14282012005000012.

Gomes P. Scaffolds derivados do biovidro 58s contendo íons Na: síntese por sol-gel e modificação de superfície para liberação de óxido nítrico [dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química; 2017.

Haro Durand LA, Vargas GE, Vera-Mesones R, Baldi A, Zago MP, FanovichMA, et al. In vitro human umbilical vein endothelial cells response to ionic dissolution products from lithium-containing 45S5 bioactive glass. *Materials (Basel)*. 2017 Jul 3;10(7):740. doi: 10.3390/ma10070740. PMID: 28773103. PMCID: PMC5551783.

Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Nov;17(11):967-78. doi:10.1007/s10856-006-0432-z. Epub 2006 Nov 22. PMID: 17122907.

Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S11-S26. doi:10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x. PMID: 19737262.

Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(11):2757-74. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.004. Epub 2011 Feb 2. PMID: 21292319.

Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *ComposSci Technol*. 2003;63(15):2223–53. doi: 10.1016/S0266-3538(03)00178-7. PMID: 16771634.

Judas F, Palma P, Falacho RI, Figueiredo H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo [dissertação]. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2012.

Karakuzu-Ikizler B, Terzioğlu P, Basaran-Elalmis Y, Tekerek BS, Yücel S. Role of magnesium and aluminum substitution on the structural properties and bioactivity of bioglasses synthesized from biogenic silica. *Bioact Mater*. 2020 Jan 13;5(1):66–73. doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.12.007. eCollection 2020 Mar. PMID: 31989060. PMCID: PMC6965208.

Kerbaudy WD. Avaliação da perda óssea alveolar em pacientes encaminhados a especialista em periodontia: estudo radiográfico [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 1999.

Khan PK, Mahato A, Kundu B, Nandi SK, Mukherjee P, Datta S, et al. Influence of single and binary doping of strontium and lithium on in vivo biological properties of bioactive glass scaffolds. *Sci Rep*. 2016 Sep 8;6:32964. doi: 10.1038/srep32964. PMID: 27604654. PMCID: PMC5015095.

Khodaei M, Nejatidanesh F, Shirani MJ, Valanezhad A, Watanabe I, Savabi O. The effect of the nano- bioglass reinforcement on magnesium based composite. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2019 Dec;100:103396. doi:10.1016/j.jmbbm.2019.103396. Epub 2019 Aug 12. PMID: 31442943.

Kim DA, Lee JH, Jun SK, Kim HW, Eltohamy M, Lee HH. Sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle-incorporated glass ionomer cement with or without chitosan for enhanced mechanical and biomineralization properties. *Dent Mater*. 2017 Jul;33(7):805-17. doi:10.1016/j.dental.2017.04.017. Epub 2017 May 20. PMID: 28535954.

Kim SY, Kim YK, Kim HS, Yun PY, Kim SG, Choi YH. Extraction socket sealing using palatal gingival grafts and resorbable collagen membranes. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2017 Dec 25;39(1):39. doi:10.1186/s40902-017-0137-x. eCollection 2017 Dec. PMID: 29302588. PMCID: PMC5742316.

Koepsell L, Remund T, Bao J, Neufeld D, Fong H, Deng Y. Tissue engineering of annulus fibrosus using electrospun fibrous scaffolds with aligned polycaprolactone fibers. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Dec 15;99(4):564-75. doi:10.1002/jbm.a.33216. Epub 2011 Sep 20. PMID: 21936046.

Leonor IB, Rodrigues MT, Gomes ME, Reis RL. In situ functionalization of

wet-spun fibre meshes for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Feb;5(2):104-11. doi:10.1002/term.294. PMID: 20653041.

Li H, Chen S, Wu Y, Jiang J, Ge Y, Gao K, et al. Enhancement of the osseointegration of a polyethylene terephthalate artificial ligament graft in a bone tunnel using 58S bioglass. *Int Orthop*. 2012 Jan;36(1):191-7. doi:10.1007/s00264-011-1275-x. Epub 2011 May 17. PMID: 21584642.PMCID: PMC3251679.

Li M, Mondrinos MJ, Gandhi MR, Ko FK, Weiss AS, Lelkes PI. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*. 2005 Oct;26(30):5999-6008. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.030. PMID: 15894371.

Li WJ, Mauck RL, Cooper JA, Yuan X, Tuan RS. Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomech*. 2007;40(8):1686-93. doi:10.1016/j.jbiomech.2006.09.004. Epub 2006 Oct 23. PMID: 17056048. PMCID: PMC2656562.

Lima LL. Contribuição à fabricação e caracterização de hidrogéis de pHEMA com objetivo de produção de cartilagem artificial [tese]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica; 2013.

Liu Q, Wang H, Chen L, Li W, Zong Y, Sun Y, L, Z. Enzymatic degradation of fluorinated Poly (ϵ -caprolactone)(PCL) block copolymer films with improved hydrophobicity. *Polymer degradation and stability*. 2019;165:27-34. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2019.04.018.

Liu YJ, Yang ZY, Tan LL, Li H, Zhang YZ. An animal experimental study of porous magnesium scaffold degradation and osteogenesis. *Braz J Med Biol Res*. 2014 Aug;47(8):715-20. doi:10.1590/1414-431x20144009. Epub 2014 Aug 1. PMID: 25098717. PMCID: PMC4165299.

Maçon ALB, Jacquemin M, Page SJ, Li S, Bertazzo S, Stevens MM, et al. Lithium-silicate sol-gel bioactive glass and the effect of lithium precursor on structure-property relationships. *J Solgel Sci Technol*. 2017;81(1):84-94. doi:10.1007/s10971-016-4097-x. Epub 2016 Jun 23. PMID: 32009741. PMCID: PMC6961499.

Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*. 1988 Nov;254(2):317-30. doi:10.1007/BF0022580. PMID: 3197089.

Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*. Mar-Apr 2002;3(2):232-8. doi:10.1021/bm015533u. PMID: 11888306.

Messner K. Meniscal substitution with a Teflon-periosteal composite graft: a rabbit experiment. *Biomaterials*. 1994 Feb;15(3):223-30. doi:10.1016/0142-9612(94)90071-x. PMID: 8199295.

Moghanian A, Firoozi S, Tahriri M, Sedghi A. A comparative study on the in vitro formation of hydroxyapatite, cytotoxicity and antibacterial activity of 58S bioactive glass substituted by Li and Sr. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018 Oct 1;91:349-60. doi:10.1016/j.msec.2018.05.058. Epub 2018 May 18. PMID: 30033264.

Mouriño V, Cattalini JP, Boccaccini AR. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments. *J R Soc Interface*. 2012 Mar 7;9(68):401-19. doi:10.1098/rsif.2011.0611. Epub 2011 Dec 7. PMID: 22158843. PMCID: PMC3262432.

Orshesh Z, Borhan S, Kafashan H. Physical, mechanical and *in vitro* biological evaluation of synthesized biosurfactant-modified silanated-gelatin/sodium alginate/45S5 bioglass bone tissue engineering scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2020 Jan;31(1):93-109. doi:10.1080/09205063.2019.1675226. Epub 2019 Oct 11. PMID: 31566481.

Ozcan G, Sekerci AE. Classification of alveolar bone destruction patterns on maxillary molars by using cone-beam computed tomography. *Niger J Clin Pract*. 2017 Aug;20(8):1010-19. doi:10.4103/1119-3077.180074. PMID: 28891547.

Pereira RDV. Desenvolvimento de scaffolds biodegradáveis de PLDLA/biovidro 58S produzidos por sinterização seletiva a laser [dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico; 2013.

Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng*. 2006 May;12(5):1197-211. doi:10.1089/ten.2006.12.1197. PMID: 16771634.

Pires ALR, Bierhalz AC, Moraes ÂM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quím Nova*. 2015 Aug;38(7):957-71. doi: 10.5935/0100-4042.20150094.

do Prado RF, Rabêlo SB, de Andrade DP, Nascimento RD, Henriques VAR,

Carvalho YR, et al. Porous titanium and Ti-35Nb alloy: effects on gene expression of osteoblastic cells derived from human alveolar bone. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Nov;26(11):259. doi:10.1007/s10856-015-5594-0. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26449449.

Ranga N, Gahlyan S, Duhan S. Antibacterial efficiency of Zn, Mg and Sr doped bioactive glass for bone tissue engineering. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020 Apr 1;20(4):2465-72. doi:10.1166/jnn.2020.17336. PMID: 31492263.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Elsevier; 2004. ISBN N° 0-12-582463-7.

Reneker DH, Yarin AL. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*. 2008 May;49(10):2387–425. doi: 10.1016/j.polymer.2008.02.002.

Rizwan M, Hamdi M, Basirun WJ. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. *J Biomed Mater Res A*. 2017 Nov;105(11):3197-223. doi:10.1002/jbm.a.36156. Epub 2017 Aug 9. PMID: 28686004.

Sánchez Cepeda ÁP, Vera-Graziano R, Muñoz-Prieto EDJ, Gómez-Pachón EY, Bernad-Bernad MJ, Maciel-Cerda A. [Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina]. *Cienc Desarro*. 2016 Dec;7(2):133-51. doi: 10.19053/01217488.v7.n2.2016.4818. Espanhol.

Santos JD. Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de nanofibras de polietilmetacrilato/nistatina produzidas por eletrofiação [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

Saravanakumar K, Ali DM, Kathiresan K, Wang MH. Antimicrobial, anticancer drug carrying properties of biopolymers-based nanocomposites- a mini review. *Curr Pharm Des*. 2018;24(32):3859-66. doi:10.2174/1381612825666181120161300. PMID: 30465496.

Shikinami Y, Kotani Y, Cunningham BW, Abumi K, Kaneda K. A biomimetic artificial disc with improved mechanical properties compared to biological intervertebral discs. *Adv Funct Mater*. 2004 Nov 15;14(11):1039-46. doi: 10.1002/adfm.200305038.

da Silva JG, Babb R, Salzlechner C, Sharpe PT, Brauer DS, Gentleman E. Optimisation of lithium-substituted bioactive glasses to tailor cell response for hard tissue repair. *J Mater Sci*. 2017;52(15):8832-44.

doi:10.1007/s10853-017-0838-7. PMID: 29056759. PMCID: PMC5644509.

Soares MSDM. Marcadores da diferenciação osteoblástica em culturas de células crescidas sobre titânio e expostas a coquetel de fatores de crescimento e proteínas [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2014.

de Souza JR, Sato TP, Borges ALS. Arquitetura de arcabouços para biomateriais: Influência dos parâmetros do processo na morfologia estrutural de fibras de quitosana eletrofiadas. *Braz Dent Sci*. 2017;24(4):100-5. doi: 10.14295/bds.2017.v20i4.1495.

Souza LPLD. Bioatividade de vidros contendo nióbio: estudo experimental in vivo [dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia; 2014.

Stamboulis A, Hench LL, Boccaccini AR. Mechanical properties of biodegradable polymer sutures coated with bioactive glass. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Sep;13(9):843-8. doi:10.1023/a:1016544211478. PMID: 15348548.

Suominen E, Aho AJ, Vedel E, Kangasniemi I, Uusipaikka E, Yli-Urpo A. Subchondral bone and cartilage repair with bioactive glasses, hydroxyapatite, and hydroxyapatite-glass composite. *J Biomed Mater Res*. 1996 Dec;32(4):543-51. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199612)32:4<543::AID-JBM7>3.0.CO;2-R. PMID: 8953144.

Tellisi N, Ashammakhi N. Comparison of meshes, gels and ceramic for cartilage tissue engineering in vitro. *Eur J Plast Surg*. 2008 Feb;35(2):159-70. doi: 10.1007/s00238-007-0189-8.

Thakkar S, Misra M. Electrospun polymeric nanofibers: new horizons in drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Sep 30;107:148-67. doi:10.1016/j.ejps.2017.07.001. Epub 2017 Jul 8. PMID: 28690099.

Tian P, Liu X. Surface modification of biodegradable magnesium and its alloys for biomedical applications. *Regen Biomater*. 2015 Jun;2(2):135-51. doi:10.1093/rb/rbu013. Epub 2014 Nov 28. PMID: 26816637. PMCID: PMC4669019.

Verrier S, Blaker JJ, Maquet V, Hench LL, Boccaccini AR. PDLA/Bioglass composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment. *Biomaterials*. 2004 Jul;25(15):3013-21. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.081. PMID: 14967534.

Vitale-Brovarone C, Vernè E, Bosetti M, Appendino P, Cannas M.

Microstructural and in vitro characterization of SiO₂-Na₂O-CaO-MgO glass-ceramic bioactive scaffolds for bone substitutes. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 Oct;16(10):909-17. doi:10.1007/s10856-005-4425-0. PMID: 16167099.

Wang B, Zheng H, Chang MW, Ahmad Z, Li JS. Hollow polycaprolactone composite fibers for controlled magnetic responsive antifungal drug release. *Colloids Surf B*. 2016 Sep 1;145:757-67. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.05.092. Epub 2016 Jun 1. PMID: 27295492.

Wang L, Zhang K, Hao Y, Liu M, Wu W. Osteoblast/bone-tissue responses to porous surface of polyetheretherketone-nanoporous lithium-doped magnesium silicate blends' integration with polyetheretherketone. *Int J Nanomedicine*. 2019 Jul 8;14:4975- 89. doi:10.2147/IJN.S197179. eCollection 2019. PMID: 31371942. PMCID: PMC6626899.

Williams DF. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. Amsterdam; New York: Elsevier; 1986. 72. ISBN n° 9780444428585.

Wu J, Xue K, Li H, Sun J, Liu K. Improvement of PHBV scaffolds with bioglass for cartilage tissue engineering. *PLoS One*. 2013 Aug 9;8(8):e71563. doi:10.1371/journal.pone.0071563. eCollection 2013. PMID: 23951190. PMCID: PMC3739736.

Xie J, Zhong S, Ma B, Shuler FD, Lim CT. Controlled biomineralization of electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibers to enhance their mechanical properties. *Acta Biomater*. 2013Mar;9(3):5698-707. doi:10.1016/j.actbio.2012.10.042. Epub 2012 Nov 3. PMID: 23131385.

Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2003 May;24(12):2077-82. doi:10.1016/s0142-9612(02)00635-x. PMID: 12628828.

Yu HS, Jang JH, Kim TI, Lee HH, Kim HW. Apatite-mineralized polycaprolactone nanofibrous web as a bone tissue regeneration substrate. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Mar 1;88(3):747-54. doi:10.1002/jbm.a.31709. PMID: 18357562.

Yuan B, Zhou SY, Chen XS. Rapid prototyping technology and its application in bone tissue engineering. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017 Apr;18(4):303-15. doi:10.1631/jzus.B1600118. PMID: 28378568. PMCID: PMC5394095.

Zhang K, Alaohali A, Sawangboon N, Sharpe PT, Brauer DS, Gentleman E. A comparison of lithium-substituted phosphate and borate bioactive glasses for mineralised tissue repair. *Dent Mater*. 2019 Jun;35(6):919-27. doi:10.1016/j.dental.2019.03.008. Epub 2019 Apr 8. PMID: 30975482. PMCID: PMC6559152.

Zheng K, Boccaccini AR. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: a review. *Adv Colloid Interface Sci*. 2017 Nov;249:363-73. doi:10.1016/j.cis.2017.03.008. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28364954.

Zhu DY, Lu B, Yin JH, Ke QF, Xu H, Zhang CQ, et al. Gadolinium-doped bioglass scaffolds promote osteogenic differentiation of hBMSC via the Akt/GSK3 β pathway and facilitate bone repair in vivo. *Int J Nanomed*. 2019 Feb 11;14:1085-100. doi:10.2147/IJN.S193576. eCollection 2019. PMID: 30804672. PMCID: PMC6375113.

Zur G, Linder-Ganz E, Elsner JJ, Shani J, Brenner O, Agar G, et al. Chondroprotective effects of a polycarbonate-urethane meniscal implant: histopathological results in a sheep model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011 Feb;19(2):255-63. doi:10.1007/s00167-010-1210-5. Epub 2010 Jul 16. PMID: 20635076.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos



Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP



CERTIFICADO CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 01/2021, intitulado:- **BIOMATERIAL POLIMÉRICO OBTIDO POR ELETROFIAÇÃO: NANOFIBRAS ASSOCIADAS A BIOVIDRO 58S DOPADO COM ÍONS TERAPÊUTICOS** sob a responsabilidade de **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS**, tendo como colaboradora aluna de Mestrado **JULIANI CAROLINE RIBEIRO DE ARAÚJO SOUTO**; e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 22/02/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/04/2021 a 30/06/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato/heterogênico Wistar
Nº de Animais	09 (reaproveitamento de animais do Protocolo 14/2020, aprovado pela CEUA)
Peso/Idade	350 gr – 90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP
Compromisso/Relatório(s)	Final:- Envio para a CEUA:- 31/07/2021
Alteração	No dia 22/03/2021, foi aprovado pela Plenária da CEUA, a alteração do título original, excluindo a palavra (ácido polilático)

São José dos Campos, 22 de março de 2021

Andrea Carvalho de Marco

Profa.Dra ANDREA CARVALHO DE MARCO
COORDENADORA/CEUA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076

Fax (12) 3947-9028 / carlos.guedes@unesp.br/ andrea.marco@unesp.br