



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

CLARISSA CARVALHO MARTINS MACIEL

**FIBRA DE CARBONO: caracterização e avaliação da resposta
inflamatória e toxicidade em ratos**

2022

CLARISSA CARVALHO MARTINS MACIEL

FIBRA DE CARBONO: caracterização e avaliação da resposta inflamatória e toxicidade em ratos

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

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre Microbiologia, Imunologia e terapia em Periodontia e Implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Carvalho De Marco

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. 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).

Maciel, Clarissa Carvalho Martins

Fibra de carbono: caracterização e avaliação da resposta inflamatória e toxicidade em ratos / Clarissa Carvalho Martins Maciel. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
55 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientador: Andrea Carvalho De Marco.

1. Fibra de carbono . 2. Testes mecânicos. 3. Materiais biocompatíveis. 4. Engenharia tecidual . I. De Marco, Andrea Carvalho, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andréa Carvalho de Marco (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dra. Marianne Spalding

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Fábio da Silva Matuda

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Fundação Valeparaibana de Ensino - FVE

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 01 de agosto de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois Ele cuidou de todos os meus passos até aqui.

A minha família, namorado e amigos, por todo o apoio e amor.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia – Unesp, pela acolhida.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Prof. Assoc. Luciane Dias de Oliveira, atual Programa Ciências Aplicadas à Saúde Bucal – CASB, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Profa. Dra. Andréa Carvalho De Marco, Prof. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim, Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria e o Prof. Dr. Sérgio Lúcio P. de Castro Lopes.

As docentes do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Prof. Dra Ana Lia Anbinder e Prof. Dra Luana Marotta Reis de Vasconcellos.

Aos técnicos dos laboratórios por toda ajuda na realização de testes, Márcio Marques e Thais Paradella (Materiais Odontológicos e Prótese), Sérgio Alves (Patologia).

Aos meus amigos da Pós-graduação, pelo companheirismo e ajuda diária. Leticia Cavassini Torquato, Kauê Alberto Pereira, Eduardo Chelin e Nátaly Domingues.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 01/03/2020 – 30/09/2020 (88887.489676/2020-00), de 01/10/2020 a 31/08/2021 (88887.529146/2020-00) e de 01/03/2022 a 31/07/2022 (88887.668150/2022-00).

À minha orientadora Prof. Dra. Andréa Carvalho De Marco pela dedicação, companheirismo, respeito e carinho comigo e com nossa pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Preparação da fibra de carbono e ativação	14
3.2 Caracterização da Fibra de Carbono	17
3.2.1 Molhabilidade (ângulo de contato)	17
3.2.2 Avaliação das propriedades de tensão da fibra de carbono – Ensaio de tração	18
3.2.3 Ensaio de Intumescimento	19
3.3 Modelo Experimental <i>in vivo</i>	21
3.3.1. Procedimento cirúrgico para a implantação dos corpos de prova no tecido subcutâneo	21
3.3.2 Processamento histológico para avaliação do tecido subcutâneo	23
3.3.3 Análises histológica descritiva e histomorfométrica (avaliação da densidade de fibras colágenas)	24
3.3.4 Processamento histológico para avaliação da toxicidade nos órgãos .	26
3.4 Análise estatística	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Teste de molhabilidade	27
4.2 Ensaio de tração	28
4.3 Ensaio de intumescimento	29
4.4. Análise histológica do implante subcutâneo	31
4.5 Análise histomorfométrica (picrosirius)	34
4.6 Avaliação dos sinais clínicos e histológicos de toxicidade	38
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO .	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
BMP	Proteínas morfogênicas ósseas
BTE	Engenharia de Tecidos Ósseos
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação em Animais
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNT	Nanotubos de Carbono
cPAN	Fibra de Poliacrilonitrila Carbonizada
CPS	Fosfato de Cálcio
FCA	Fibra de Carbono Ativado
FFCA	Feltro de Fibra de Carbono Ativado
FFCAg	Feltro de Fibra de Carbono Ativado com Prata
FFCNA	Feltro Fibra de Carbono não ativado
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
HE	Hematoxilina e Eosina
IL-6	Interleucina 6
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PAN	Fibra de Poliacrilonitrila
PDGF	Fator de Crescimento derivado de plaquetas
TFCA	Tecido Fibra de Carbono Ativado
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante Beta
VEGF	Fator de Crescimento endotelial vascular

Maciel CCM. Fibra de carbono: caracterização e avaliação da resposta inflamatória e toxicidade em ratos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a Fibra de Carbono obtida a partir da fibra PAN têxtil e de fibra de algodão, nas suas diferentes formas de apresentação: Feltro Fibra de Carbono Não Ativado (FFCNA), Feltro Fibra de Carbono Ativado (FFCA), Feltro de Fibra de Carbono Ativado com Prata (FFCAAg) e Tecido Fibra de Carbono Ativado (TFCA), com vistas à obtenção de *scaffolds* como potencial material com propriedades relativas à enxerto ósseo sintético. Foram realizados testes de caracterização: molhabilidade de superfície, ensaio de tração, ensaio de intumescimento e testes *in vivo*: avaliação da resposta inflamatória pela implantação dos materiais no tecido subcutâneo de quatorze ratos Wistar, avaliação das fibras colágenas pela coloração *Picrosirius Red* e avaliação da toxicidade nos seguintes órgãos: coração, baço, fígado e rim. No teste de molhabilidade, FFCNA e TFCA se mostraram hidrofóbicos ($\theta 124^\circ$ e 114°), FFCA e FFCAAg hidrofílicos. Para tensão máxima FFCA se apresentou mais resistente (2.983 ± 1.059). No ensaio de intumescimento os grupos FFCAAg e FFCA se mostraram com maior porcentagem de absorção para a solução PBS e água destilada. Os animais não apresentaram sinais clínicos de intoxicação. Os órgãos não apresentaram sinais de toxicidade sistêmica aguda. As regiões dos implantes apresentaram infiltrado inflamatório de leve a moderado em 7 e 21 dias. Apenas o grupo TFCA não apresentou maturação de fibras colágenas tipo I em 21 dias. Por meio das análises realizadas constatou-se que o TFCA se apresentou hidrofóbico, pouco resistente a tração e baixo potencial para maturação de fibras colágenas. Portanto o TFCA mostra-se com pouco potencial para ser indicado como possível scaffold para engenharia tecidual óssea. Conclui-se que FFCNA, FFCA e FFCAAg, possuem potencial para serem consideradas *scaffolds*, devido as seguintes características que foram apresentadas: boa taxa de absorção, hidrofiliabilidade e atóxicas.

Palavras-chave: Fibra de carbono. Testes mecânicos. Materiais biocompatíveis. Engenharia tecidual.

Maciel CMM. Carbon Fiber from PAN textile fibers: characterization and evaluation of the inflammatory response and toxicity in rats [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the Carbon Fiber obtained from PAN textile fiber and cotton fiber, in its different forms of presentation: Non-Activated Carbon Fiber Felt (FFCNA), Activated Carbon Fiber Felt (FFCA), Activated Carbon Fiber with Silver (FFCAAg) and Activated Carbon Fiber Tissue (TFCA), with a view to obtaining scaffolds as a potential material with properties related to synthetic bone graft. Characterization tests were performed: surface wettability, traction test, swelling test and in vivo tests: evaluation of the inflammatory response by implanting the materials in the subcutaneous tissue of fourteen Wistar rats, evaluation of collagen fibers by Picrosirius Red staining and evaluation of toxicity in the following organs: heart, spleen, liver and kidney. In the wettability test, FFCNA and TFCA were hydrophobic ($\theta 124^\circ$ and 114°), FFCA and FFCAAg were hydrophilic. For maximum stress FFCA was more resistant (2.983 ± 1.059). In the swelling test, the FFCAAg and FFCA groups showed the highest percentage of absorption for the PBS solution and distilled water. The animals did not show clinical signs of intoxication. The organs showed no signs of acute systemic toxicity. The implant regions showed mild to moderate inflammatory infiltrate at 7 and 21 days. Only the TFCA group did not show maturation of type I collagen fibers in 21 days. Through the analyzes carried out, it was found that the TFCA was hydrophobic, with little resistance to traction and low potential for collagen fiber maturation. Therefore, TFCA shows little potential to be indicated as a possible scaffold for bone tissue engineering. It is concluded that FFCNA, FFCA and FFCAAg have the potential to be considered scaffolds, due to the following characteristics that were presented: good absorption rate, hydrophilicity and non-toxic.

Keywords: Carbon fiber. Mechanical tests. Biocompatible materials. Tissue engineering.

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, composto por diferentes componentes celulares, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células precursoras osteogênicas e elementos hematopoéticos da medula óssea, além da matriz óssea mineralizada. Os osteoblastos são as principais células do tecido ósseo, responsáveis pela formação óssea através da síntese dos componentes orgânicos da matriz extracelular e no controle da mineralização da mesma. Incorporados a esta matriz, os osteócitos participam da regulação da homeostase do cálcio no sangue, detectam sobrecarga mecânica e transmitem essa informação para outras células, regulando a função de osteoblastos e osteoclastos. Os osteoclastos, por sua vez, são células especializadas multinucleadas que se originam da linhagem hematopoética de monócitos/macrófagos. Responsáveis pela reabsorção óssea, realizam essa função através da secreção de enzimas ácidas e líticas que degradam minerais e componentes orgânicos da matriz. (Junqueira, Carneiro; 2017)

O processo de reparo ósseo quando se trata de um defeito ósseo crítico, se inicia da formação de um coágulo no local da fratura, ele é a principal fonte de mediadores inflamatórios que iniciará o processo de reparo. Osteoclastos removem o tecido necrótico nas extremidades do local agredido. Fatores de crescimento PDGF, TGF- β , FGF, VEGF e BMP estimulam a proliferação e diferenciação de células precursoras existentes no canal medular, no periosteio ou da circulação (células tronco e células endoteliais), que originam vasos sanguíneos, condroblastos e osteoblastos envolvidos no processo de reparador. Na região onde o coágulo se forma os fatores de crescimento induzem a diferenciação de células mesenquimais, dando origem a fibroblastos, vasos sanguíneos e condroblastos que formarão o calo mole, entre a 2^o e 3^o semana após a agressão. No período da 4^o a 17^o semana o calo duro se origina da ossificação do calo mole e da formação do osso membranoso iniciada pelo periosteio (Bogliolo Filho, 2021).

Na fase final de reparo, a matriz óssea e a cartilagem são remodeladas em osso maduro. A vitamina D e Cálcio são essenciais para essa fase. O período de remodelação depende de cada indivíduo, podendo demorar meses.

O processo de reparo é natural e eficaz, mas em alguns casos há necessidade da utilização de enxertos, quando se trata de um defeito de tamanho crítico, por exemplo (Lindhe, Lang; 2018; Amini et al., 2012). O enxerto ósseo autógeno, ainda é considerado o padrão ouro, pois fornece componentes osteocondutores, osteoindutores e osteogênicos (Rather et al., 2019). Porém, esse tipo de enxerto possui algumas desvantagens: a necessidade de dois sítios cirúrgicos, um doador e outro receptor, disponibilidade óssea do sítio doador, tendência à reabsorção parcial, desconforto pós-operatório, morbidade no local doador, risco de parestesia (Loyola et al., 2018; Zhao et al., 2011).

Tendo em vista essas limitações, o desenvolvimento de materiais para enxerto ósseo vem sendo abundantemente estudado. A busca para materiais com características osteo-condutivas, osteo-indutivas e de osteo-integração, são essenciais para promover o crescimento de um novo osso, além da interação com o tecido adjacente (Bow et al., 2019). A utilização de enxertos xenógenos, alógenos e sintéticos aparece como uma opção atraente para suprir as limitações do enxerto autógeno (Hasan et al., 2018).

A Engenharia de Tecido Ósseo (BTE), é uma área estudada por cientistas, engenheiros e cirurgiões, com objetivo de criar enxertos ósseos, através de estruturas nano, micro e macro para a reparação e regeneração óssea. Os pontos-chaves da BTE são: (1) Biocompatibilidade do material que será utilizado como “arcabouço”, deve ser semelhante ao tecido ósseo natural e do nicho da matriz extracelular (2) Necessidade de células osteogênicas para estabelecer a matriz de tecido ósseo. (3) Sinais morfogênicos que auxiliem no direcionamento das células para o fenótipo desejável e (4) vascularização suficiente para atender o tecido em crescimento, suprir necessidades e liberar nutrientes (Amini et al., 2012; Gao et al., 2017).

Esse ramo da engenharia de tecidos, tem voltado sua atenção para os tratamentos de defeitos ósseos considerados de tamanho crítico, aqueles que não apresentam cura espontânea. Materiais tradicionais como cerâmicas e polímeros, vem sendo aplicados como materiais de estruturação na engenharia de tecido ósseo. Entretanto, suas aplicações clínicas têm se mostrado limitadas. Recentemente materiais com estruturas nanométricas a base de carbono vem ganhando espaço por apresentar melhores propriedades como: ótima força

mecânica, grande área de superfície, alta biocompatibilidade, preço acessível e abundância de recursos. Além disso, em comparação aos enxertos ósseos tradicionais, os arcabouços produzidos possuem certas vantagens, como maior vida útil, facilidade de esterilização, baixa chance de infecção e menor custo (Peng et al., 2020; Ryu et al., 2014).

Entre os diferentes tipos de arcabouços temos os de origem metálica, como titânio, magnésio e aço inoxidável. Estes apresentam ótima propriedade mecânica e estabilidade. Porém não são reabsorvíveis e não interagem com as biomoléculas. Além disso ainda existe uma grande preocupação sobre a toxicidade dos íons metálicos, que podem levar a um dano tecidual (Rather et al., 2019; Peng et al., 2020).

As biocerâmicas bioativas, como a cerâmica de fosfato de cálcio, hidroxiapatita e bioglasses são materiais que interagem com os tecidos adjacentes e induzem fortemente a osteocondução promovendo a formação óssea. Os arcabouços de fosfato de cálcio (CPS), conseguem proporcionar uma substituição óssea transitória. O osso fica mais rígido e forte quando amadurece enquanto a CPS fica mais fraca e se biodegrada a ponto de ser totalmente substituída pelo osso recém-formado (Denry, Kuhn, 2016). Porém, sua baixa resistência e alta fragilidade, restringem os seus locais de aplicação (Zhang et al., 2011).

Materiais a base de carbono vem sendo amplamente estudados para cultura de células. As fibras de carbono ativado (FCA) possuem uma estrutura porosa bem definida em sua superfície, o que propicia uma rápida adsorção para componentes específicos. Porém a FCA possui a desvantagem de conter um custo relativamente alto. No intuito de deixar esse material economicamente mais atrativo ela foi incorporada a fibra de poliacrilonitrila (PAN) (Marcuzzo et al., 2016).

A fibra de poliacrilonitrila carbonizada (cPAN) é um isomorfo de carbono que pode ser facilmente processado para a utilização em arcabouços 3D. Suas propriedades biológicas para o uso na engenharia tecidual não estão totalmente elucidadas, mas há estudos otimistas sobre sua ação osteoindutora e sobre sua biocompatibilidade. Comparada a outros materiais, como estruturas nanométricas, a cPAN apresentou melhor biocompatibilidade e viabilidade celular (Ryu et al., 2014).

O feltro de fibra de carbono ativado (FFCA) é derivado da cPAN após o processo de ativação, que compreende sua exposição ao dióxido de carbono a

1000°C por 50 minutos (Marcuzzo et al., 2016). A partir da fibra de algodão, por meio do mesmo processo, é obtido o tecido fibra de carbono ativado (TFCA) (do Amaral Junior et al., 2017).

No estudo de Marcuzzo et al. (2016), foi realizada uma análise da estrutura dos poros pela adsorção de gás nitrogênio a 77K. Além disso, iodo e isotérmica de azul de metileno foram utilizados para determinar a capacidade de adsorção. Os resultados obtidos indicaram que esse material ativado é predominantemente preenchido com microporos com cerca de 3,2 nm de largura máxima. A maioria dos poros são dimensionados em torno de 1,2 nm.

Visando complementar os testes das formas de apresentação da cPAN, este estudo tem como objetivo realizar teste de molhabilidade, para a verificação do ângulo de contato; ensaio de tração para verificar a resistência da fibra; ensaio de intumescimento para verificação da capacidade de absorção e também teste *in vivo*, para avaliação da resposta inflamatória e toxicidade em ratos.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar a fibra de carbono ativado obtida a partir de fibra PAN têxtil e de fibra de algodão, nas suas diferentes formas de apresentação, com vistas à obtenção de *scaffolds* como potencial material de enxerto ósseo sintético.

2.2 Objetivos específicos

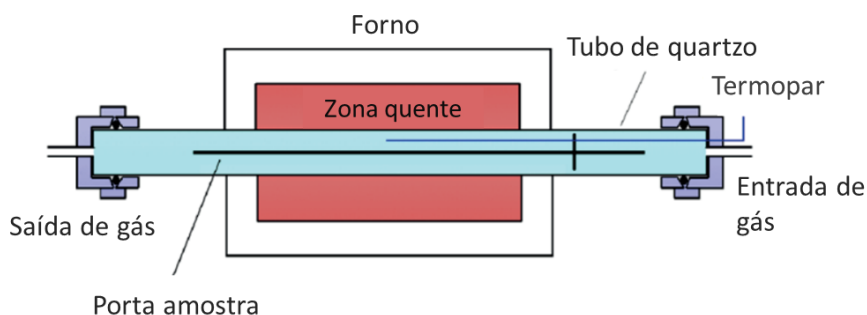
- a) avaliar a molhabilidade da superfície a partir do ângulo de contato;
- b) avaliar as propriedades de tensão da fibra de carbono ativado por meio do Ensaio de tração;
- c) avaliar as propriedades de absorção de água pelo ensaio de intumescimento;
- d) avaliar a resposta inflamatória por meio de implantes do material do tecido subcutâneo.
- e) avaliar a toxicidade nos órgãos: rim, fígado, coração e baço.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação da fibra de carbono e ativação

A obtenção do material se dá pela parceria com a empresa “JMHP Consultoria em Materiais e Informática LTDA” que vêm preparando e desenvolvendo o material até a etapa de testes biológicos. Para sua confecção as fibras PAN de 5.0 dtex em cabo de 200 mil filamentos foram oxidadas termicamente e utilizadas como matéria prima para a produção de feltro. A matéria prima (feltro de fibra PAN oxidada) foi colocada em um porta amostra, e inserido em um forno tubular elétrico para carbonização (900 °C) por 30 min, e em seguida foi ativada em atmosfera de CO₂ a 1000°C durante 50 min (Figura 1).

Figura 1 - Esquematização do forno tubular elétrico onde é inserido o porta amostra contendo a matéria prima que passará pelo processo de carbonização e ativação



Fonte: Imagem adaptada de Marcuzzo et al. (2016).

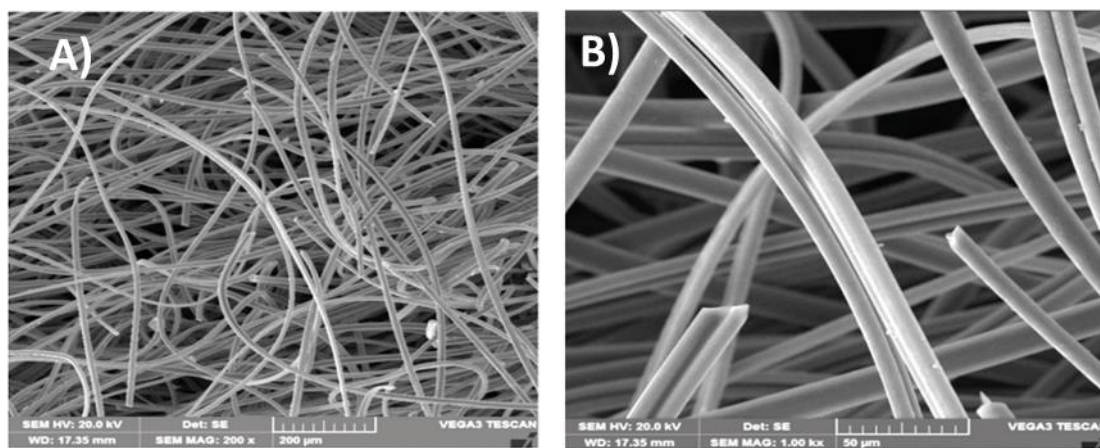
Os testes realizados por Marcuzzo et al. (2016) foram os seguintes:

- a) a verificação da morfologia estrutural do FFCA foi estudada por difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura;
- b) a análise da estrutura dos poros foi determinada através da adsorção de gás nitrogênio a 77K;

- c) determinação da capacidade de adsorção pela aplicação de iodo e isotérmica de azul de metileno;
- d) para química de superfície, foi aplicada a metodologia Boehm;
- e) análise de Raman que verifica a sensibilidade das estruturas de carbono.

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) inicial foi possível observar que o feltro fibra carbono ativada (FFCA) possui estrutura bidimensional desordenada, suas fibras têm cerca de 10-15 μ m de diâmetro (Figura 2A e B). Na adsorção de gás nitrogênio foi indicado que a superfície das fibras é populada por microporos, sendo sua grande maioria dimensionados em torno de 1,2 nm, o diâmetro máximo apresentado foi de aproximadamente de 3,2 nm. Com relação à sua capacidade de adsorção pelo iodo e pelo azul de metileno, FFCA apresentou níveis maiores do que os encontrados na literatura, sugerindo maior eficiência para pequenos compostos moleculares, deste modo, o material parece ter potencial de propiciar ambiente adequado para proliferação celular (Marcuzzo et al., 2016).

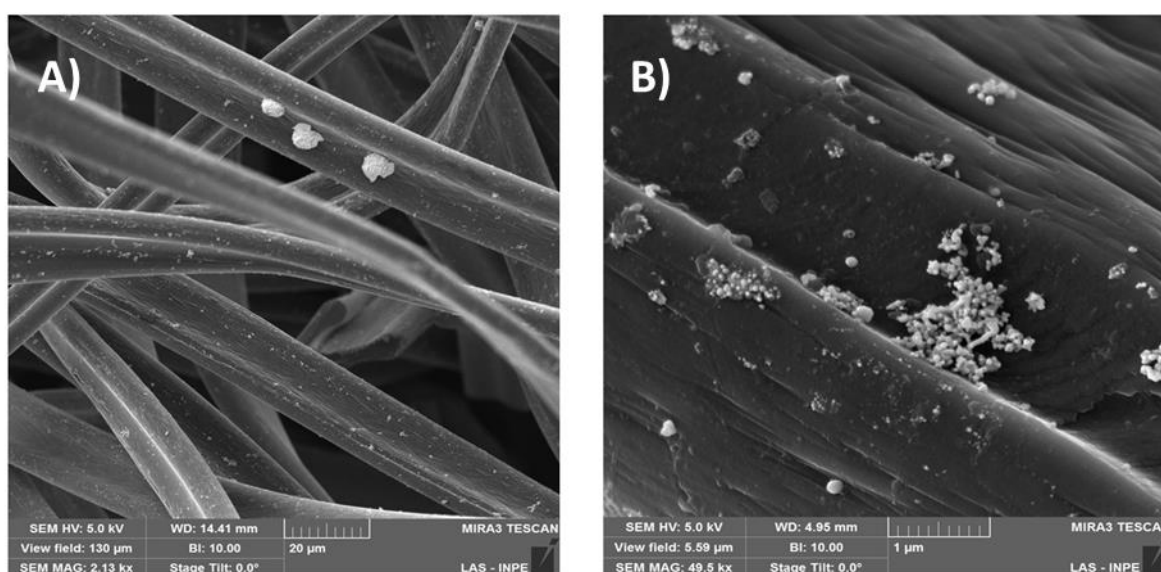
Figura 2 – Estrutura dos filamentos da fibra



Legenda: A) MEV da estrutura dos filamentos do FFCA; B) detalhe das fibras ativadas do FFCA
Fonte: Imagem adaptada de Marcuzzo et al., 2016.

Para a preparação do feltro fibra de carbono ativado com prata (FFCAA_g), o FFCA foi imerso em uma solução aquosa de nitrato de prata (2g L⁻¹ de AgNO₃) até saturar a adsorção, durante 24 horas. A amostra foi lavada com água deionizada e seca em estufa a vácuo a 50°C, formando um compósito de prata no feltro fibra de carbono ativado (Rodrigues et al., 2019). A adsorção de prata ocorreu em toda a superfície das fibras (Figura 3A), porém as partículas de prata não são uniformemente distribuídas, observa-se que em regiões específicas ocorre formação de aglomerados de prata na superfície do FFCA (Figura 3B), o tamanho estimado do grão de prata formado na superfície da fibra de carbono é de 200 nm de diâmetro (Rodrigues et al., 2019).

Figura 3 - Distribuição das partículas de prata na fibra



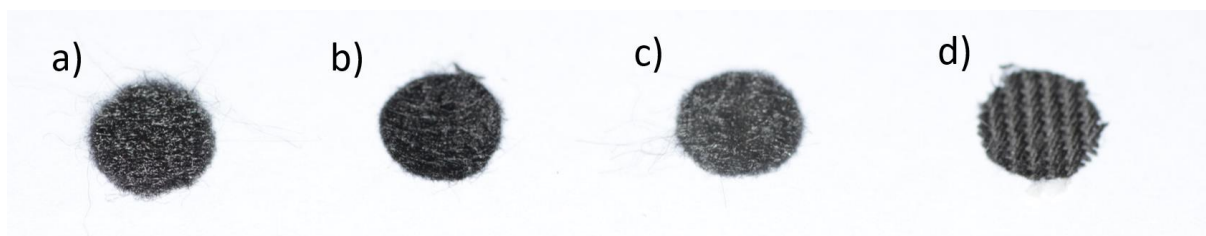
Legenda: A) MEV representando a distribuição das partículas de prata nas fibras do FFCAA_g; B) detalhe da superfície das fibras do FFCAA_g.

Fonte: Imagens não publicadas e cedidas pelo Prof. Dr. Jossano Saldanha Marcuzzo.

3.2 Caracterização da Fibra de Carbono

A Fibra de Carbono ativado foi analisada nas seguintes formas de apresentação: feltro fibra carbono ativado (FFCA), tecido fibra carbono ativado (TFCA), feltro fibra carbono ativado com prata (FFCAAg) e feltro fibra não ativado (FFCNA).

Figura 4 – Formas de apresentação dos feltros



Legenda: a) feltro fibra não ativado (FFCNA); b) feltro fibra carbono ativado (FFCA); c) feltro fibra carbono ativado com prata (FFCAAg); d) tecido fibra carbono ativado (TFCA). Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.1 Molhabilidade (ângulo de contato)

A superfície do biomaterial foi avaliada por meio das medidas do ângulo de contato (θ). Os corpos de prova foram pulverizados em 2 μ L de água destilada, utilizando um medidor de ângulo de contato (goniômetro: Krüss, modelo DAS 100) (Figura 5) do Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese – ICT UNESP, Campus São José dos Campos. O teste foi realizado em triplicata. O software Attension foi utilizado para a medição dos ângulos de contato das amostras.

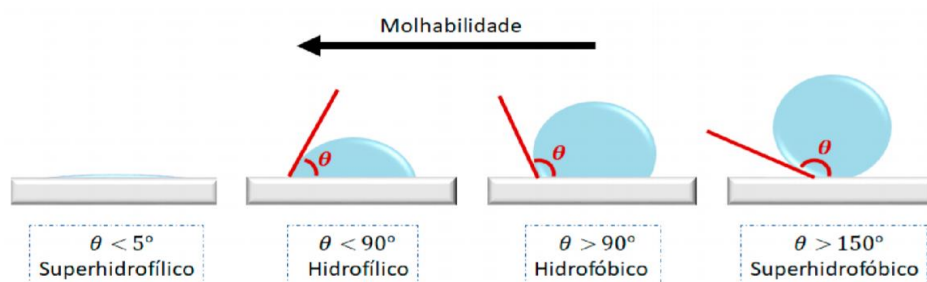
A partir do ângulo formado entre o líquido e a superfície teremos a caracterização do material em hidrofílico ou hidrofóbico (Figura 6).

Figura 5 – Medidor de ângulo de contato, goniômetro



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Representações de diferentes ângulos de contato em superfícies



Fonte: Neves et al., 2021.

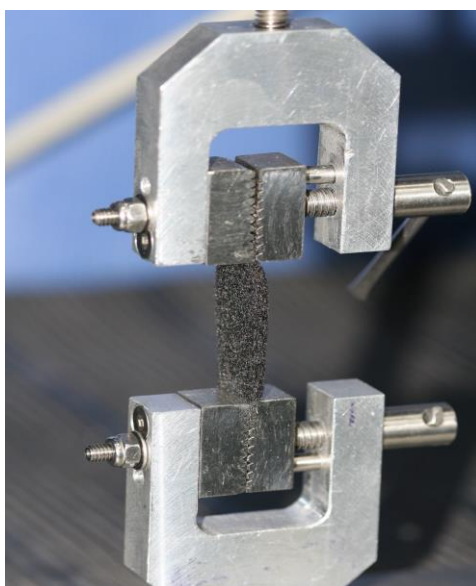
3.2.2 Avaliação das propriedades de tensão da fibra de carbono – Ensaio de tração

Os comportamentos de tração da fibra de carbono ativado foram avaliados de acordo com a norma ASTM E 466 (*American Standard of the Testing Materials*) em um equipamento EMIC modelo DL-1000, no Laboratório de Pesquisa de Materiais Dentários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese – ICT UNESP, Campus São José dos Campos.

As amostras foram testadas por uma máquina de teste EMIC DL 1000 com uma célula de carga de 10 Kg. Os experimentos foram realizados em temperatura

ambiente (25°C) e condições atmosféricas (umidade relativa de $20 \pm 5\%$), com velocidade de teste de 5 mm/min. As amostras foram preparadas cortando tiras do biomaterial (Figura 7) de 40 mm de comprimento por 15 mm de largura, a espessura foi medida individualmente por um paquímetro. Cinco amostras de cada grupo foram testadas e os valores médios e desvios-padrão foram relatados conforme Zhang et al. (2015).

Figura 7 – Fibra posicionada na presilha para realização do teste de tração

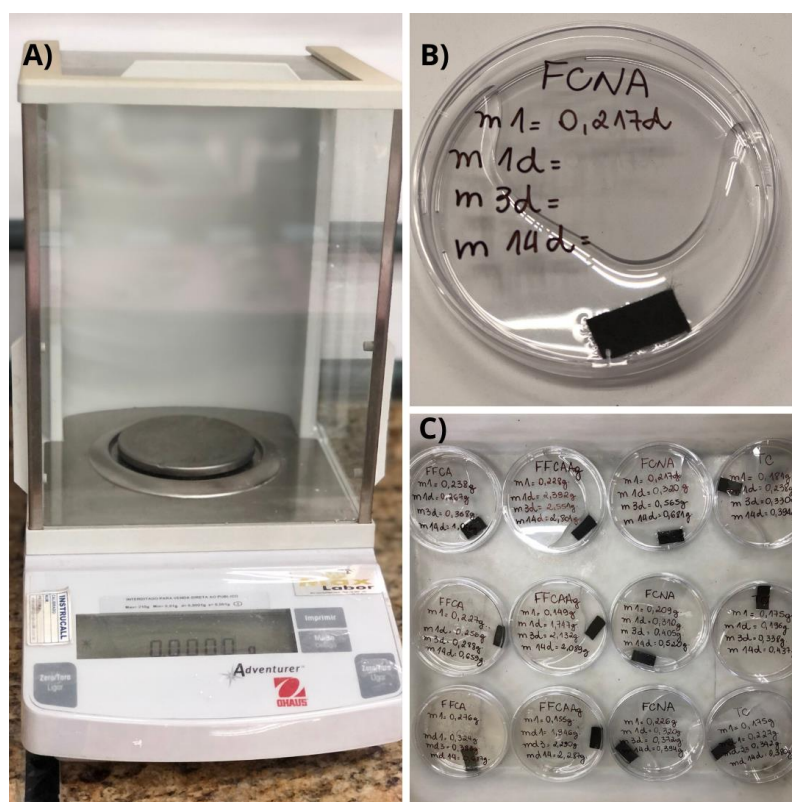


Legenda: Amostra da fibra com tamanho de 40 mm X15 mm presa à presilha da EMIC.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.3 Ensaio de Intumescimento

Os espécimes de fibra de carbono ativado com dimensões de 20 mm x 10 mm tiveram suas massas pré-determinadas (M1) em uma balança de precisão (Figura 8A) e foram colocados e mantidos em placas de Petri. O teste foi realizado em duas soluções, 10ml de água destilada (Rosina et al., 2004; Silva 2018; Liu et al., 2016) e 10ml de tampão fosfato-salino (PBS) (Amaral, 2005), sendo três amostras de cada grupo, totalizando doze amostras para cada solução. (Figuras 8B e C).

Figura 8 – Materiais utilizados para o ensaio de intumescimento



Legenda: A) Balança de precisão utilizada para pesar as amostras; B) Amostra imersa em água destilada, simulando o fluido corpóreo; C) O ensaio realizado em triplicata para cada fibra.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Decorridos 1, 3 e 14 dias, as amostras foram retiradas das placas com pinça e com um papel de filtro o excesso de água foi removido gentilmente. O ensaio foi feito em triplicata (Figura 7C) e as fibras foram pesadas em seguida (M2) com o intuito de verificar a % de intumescimento, calculada conforme a fórmula a seguir Liu et al. (2016):

$$\% \text{ Intumescimento} = \frac{(M2 - M1)}{M1} \times 100$$

3.3 Modelo Experimental *in vivo*

Todos os procedimentos *in vivo* foram realizados de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA. Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP, nº do protocolo 14/2020. A descrição deste trabalho seguiu as diretrizes do *Animal research: Reporting in vivo experiments - ARRIVE* (Percie du Sert et al., 2020) (ANEXO A).

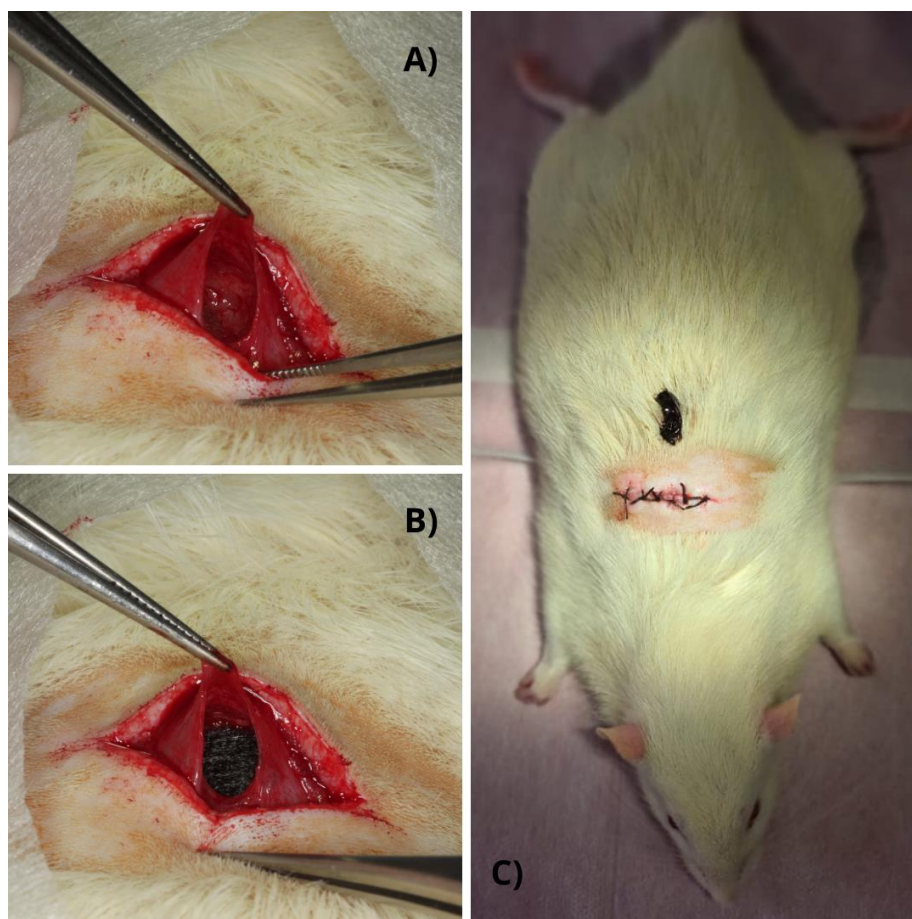
3.3.1. Procedimento cirúrgico para a implantação dos corpos de prova no tecido subcutâneo

Foram utilizados quatorze ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com idade de 90 dias e peso entre 350 e 400 g, fornecidos pelo Biotério Central da Unesp – Campus de Botucatu - SP. Os ratos foram alocados em gaiolas apropriadas e receberam dieta e água *ad libitum*.

Para a realização das cirurgias e eutanásia, os animais foram anestesiados com uma solução de 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan – Ceva Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular e 100 mg/Kg de cetamina base (Dopalen – Ceva Brasil), anestésico geral, via intramuscular (Santiago et al., 2020).

Amostras de FFCNA, FFCA, TFCA e FFCAAg (6 mm de diâmetro) foram implantadas individualmente e aleatoriamente no tecido subcutâneo dorsal do rato (n = 2) (Marsi et al., 2019) como mostra a Figura 9.

Figura 9 – Procedimento cirúrgico para avaliação da resposta inflamatória



Legenda: A) Confeção da bolsa no tecido subcutâneo para a colocação do material; B) Implantação da fibra na região subcutânea; C) leito cirúrgico suturado e com marcação de *henna* para a localização do implante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os animais foram distribuídos da seguinte forma: dois animais recebem o FFCNA (feltro fibra de carbono não ativado), outros dois a FFCA (feltro de fibra de carbono ativado), outros dois o FFCAA_g (feltro de fibra de carbono ativado com prata), e um animal recebeu o TFCA (tecido fibra de carbono ativado), esses foram eutanasiados em 7 dias. Para o segundo momento de eutanásia, aos 21 dias, seguiu-se o mesmo padrão: dupla que recebeu o FCNA, outra a FFCA, outra FFCAA_g e um animal recebeu TFCA. Para o procedimento cirúrgico o material foi limpo com etanol a 70% e esterilizado em calor seco à temperatura de 170°C por 1 hora para serem inseridos cirurgicamente (Camargo et al., 2010). Depois de

anestesiado, foi realizada a desinfecção do dorso do animal com clorexidina a 2% (Figura 8A) em seguida a incisão foi feita e uma bolsa subcutânea foi aberta para a colocação da amostra de 6mm de diâmetro da fibra (Figura 9B), em sequência a ferida foi fechada e a sutura realizada com fio de seda (Figura 9C), utilizando os procedimentos descritos por Camargo et al. (2010). A única medicação pós-operatória foi o analgésico Tramal, por via oral, dosagem de 5-7mg/Kg a cada 24h por 3 dias (Santiago et al., 2020). O acompanhamento do pós-operatório foi feito por observação de sinais de dor e verificação da alimentação. Os ratos foram eutanasiados em 7 dias (Marques et al., 2013) e 21 dias após a cirurgia (Broon et al., 2016). Os animais foram eutanasiados por sobredose em dose triplicada, da associação de Cetamina 10% (Dopalen), e Xylazina 2% (Anasedan) e depois decapitados. Em seguida, região do tecido conjuntivo dorsal de cada animal, foi removida junto ao implante que seguiu para análise. Os seguintes órgãos também foram removidos: coração, fígado, baço e rins, para análise morfológica e histológica, pois segundo Li et al. (2019), a fibra de carbono depois de implantada pode liberar resíduos no sangue resultando em danos às células e seus principais órgãos.

3.3.2 Processamento histológico para avaliação do tecido subcutâneo

Para análise histológica, os espécimes do implante foram fixados em formalina tamponada neutra a 10%. Após 48h, os espécimes foram processados com inclusão de parafina.

O bloco de parafina foi orientado paralelamente ao eixo longo do material, e foram realizados cortes seriados de 5 µm de espessura. Foram obtidas 6 lâminas de cada animal. Para a coloração foi feita a seguinte divisão: 2 lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e 3 lâminas com *Picrosirius red*, para a realização da análise histológica e histoquímica, respectivamente.

Para a verificação dos parâmetros de inflamação foi utilizado microscopia de luz pelo Axiophot2 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera

digital AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que transmitiu para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2.

3.3.3 Análises histológica descritiva e histomorfométrica (avaliação da densidade de fibras colágenas)

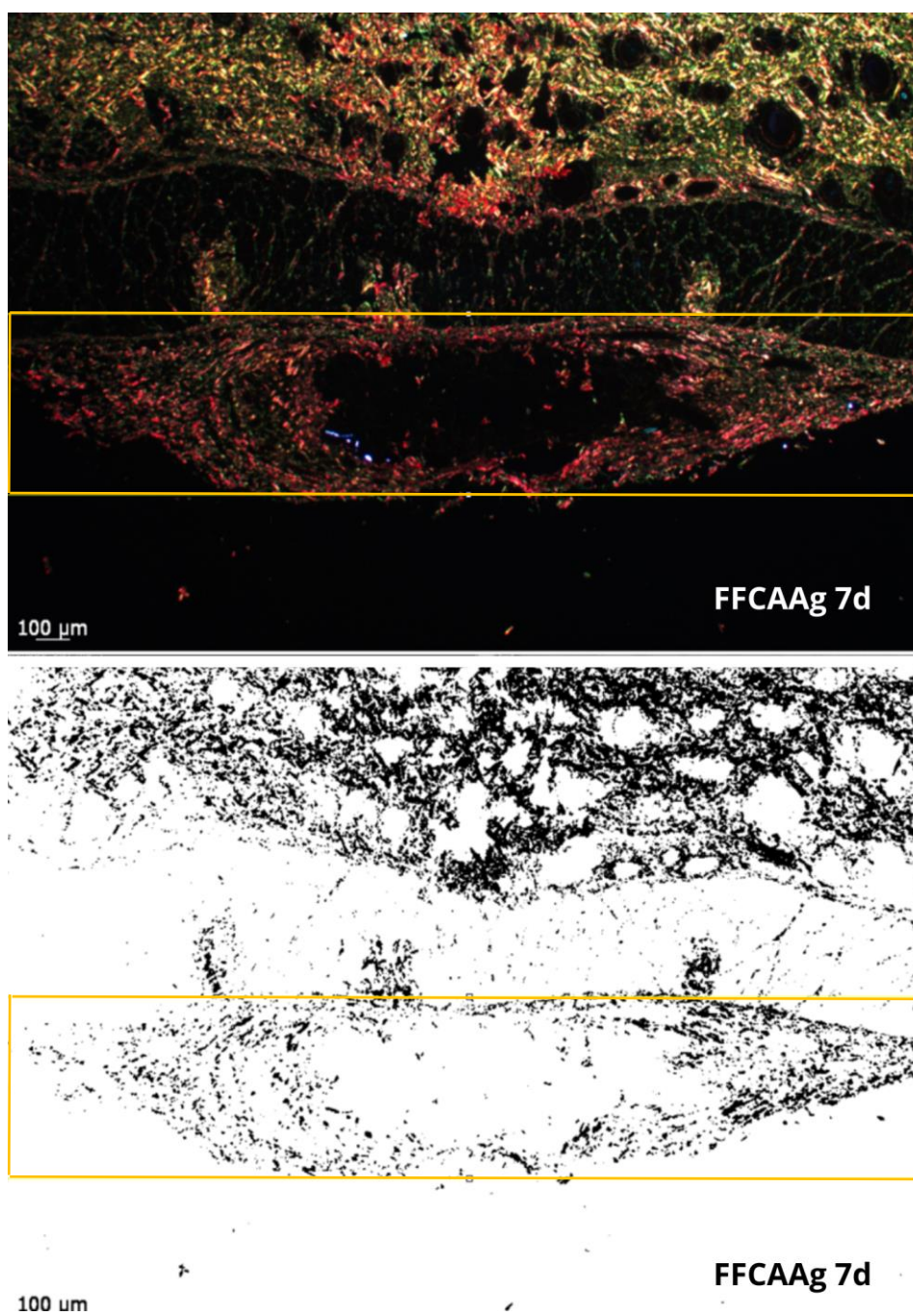
As imagens em *Picrosirius red* foram obtidas em microscópio de luz com a utilização da luz e filtros de polarização Axiophot2 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que transmitiu para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2.

A análise de *Picrosirius red* permite a visualização das fibras colágenas. Isso ocorre devido à afinidade das proteínas pelo corante Sirius red F3BA, sob luz polarizada, o colágeno exibe birrefringência devido a seu arranjo molecular. As moléculas do corante se dispõem paralelamente as fibras colágenas e podem apresentar cores que variam do verde até o vermelho, conforme o grau de maturação das fibras. As fibras de colágeno tipo I se apresentam espessas e avermelhadas, já o colágeno tipo III é fino e se apresenta esverdeado (Borges et al., 2007; Lemos, 2010).

A análise quantitativa das fibras foi feita pelo *software* Image J, como pode ser visto na Figura 10. Um retângulo com tamanho padronizado foi confeccionado para a medição da quantidade em porcentagem de fibras na área de interesse, ao redor do implante.

Já a análise qualitativa foi feita visualmente, distinguindo as fibras esverdeadas das avermelhadas (Pinho et al., 2015).

Figura 10 – Confeção do retângulo para determinação da área de interesse no *Software Image J*



Legenda: Análise no *Software Image J*, com a confecção do retângulo padronizado em amarelo na área de interesse.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.4 Processamento histológico para avaliação da toxicidade nos órgãos

Para análise histológica, os espécimes foram fixados em formalina tamponada neutra a 10%. Após 48h, os espécimes foram processados com inclusão de parafina.

O bloco de parafina foi orientado paralelamente ao eixo longo do material, e foram realizados cortes seriados de 5 μm de espessura. Foram obtidas 5 lâminas, com 3 cortes de cada órgão, corados em seguida com Hematoxilina e Eosina (HE).

Para a análise da morfologia celular foi utilizada microscopia de luz pelo Axiophot2 (Carl Zeiss Oberköchen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Oberköchen, Alemanha) que transmitiu para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2

3.4 Análise estatística

Inicialmente os dados passaram pelos testes de normalidade. Para análise dos dados obtidos no ensaio de tração e módulo elástico foi aplicada a análise de variância (ANOVA) *one way*, por meio do programa computacional GraphPAD PRISM (versão 6, 2013).

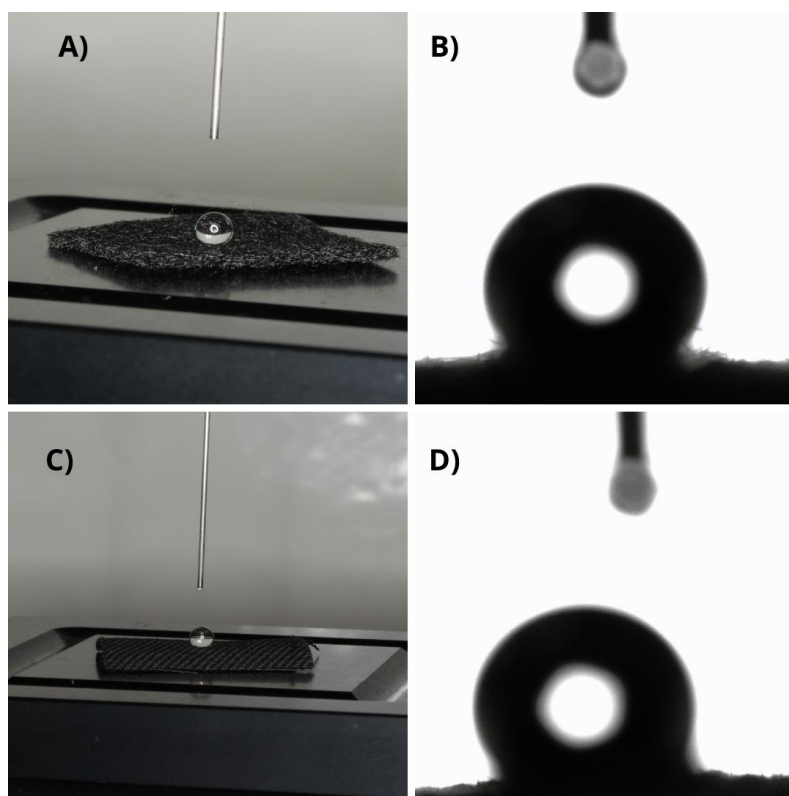
Para o ensaio e intumescimento e análise quantitativa de fibras colágenas foi aplicado o ANOVA *two way* seguido pelo Teste de Tukey. O nível de significância escolhido foi o valor convencional de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Teste de molhabilidade

As amostras de FFCAAg e FFCA se mostraram superhidrofílicas, a ponto de não formarem ângulo de contato já que o líquido foi imediatamente absorvido. Já as amostras de FFCNA (Figura 9A e B) e TFCA (Figura 9C e D) se mostraram hidrofóbicas, com ângulos de contato de 124° e 114° respectivamente, como é possível ver nas figuras abaixo:

Figura 11 – Ângulo de contato das amostras FFCNA e TFCA



Legenda: A) amostra de FFCNA pulverizada; B) amostra FFCNA no software Attention; C) amostra de TFCA pulverizada; D) amostra TFCA no software Attention.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Ensaio de tração

Os dados de tensão máxima e o módulo elástico de cada grupo, se encontram na Tabela 1. No teste de tração o grupo FFCA apresentou diferença estatística significativa com o grupo FFCAAg (FFCA vs FFCAAg, $p < 0.003$), e com o grupo TFCA (FFCA vs TFCA, $p < 0.003$), sendo FFCA (superior ou inferior) em ambas as comparações. Na avaliação do módulo elástico TFCA apresentou diferenças estatísticas significativas com o grupo FFCAAg (TFCA vs FFCAAg, $p < 0.002$) e com o grupo FFCNA (TFCA vs FFCNA, $p < 0.002$), sendo o grupo TFCA (inferior ou superior) na comparação de ambos os grupos. Na Figura 12 podemos verificar os gráficos representativos do ensaio de tração de cada grupo.

Tabela 1 – Propriedades de tração dos grupos FFCA, FFCNA, FFCAAg e TFCA

Amostras	Tração Máxima (Mpa)	Módulo Elástico (Mpa)
FFCA	2.983 ± 1.059 ^a	0.7923 ± 0.04811
FFCNA	2.020 ± 0.2089	0.9027 ± 0.02737 ^b
FFCAAg	1.350 ± 0.6294 ^b	0.9492 ± 0.05700 ^b
TFCA	1.527 ± 0.1718 ^b	0.0650 ± 0.1475 ^a

Legenda: Dados representados estão em média e desvio padrão.

FFCA – Feltro de Fibra de Carbono Ativado

FFCNA – Feltro Fibra de Carbono Não Ativada

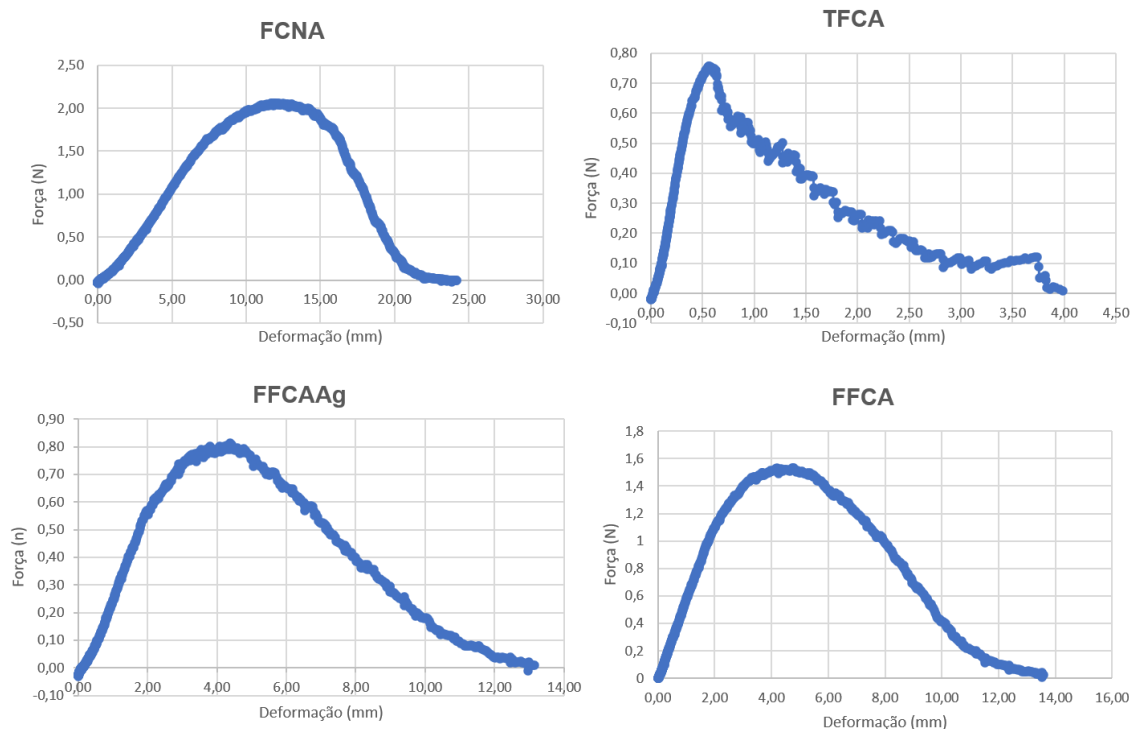
FCAAg – Feltro de Fibra de Carbono Ativada com prata

TFCA – Tecido Feltro de Carbono Ativado

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa na análise intergrupo para cada parâmetro – $p < 0,05$ - *One Way Analysis of Variance*.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12 – Gráficos representativos individuais dos grupos FFCNA, TFCA, FFCAAg e FFCA



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Ensaio de intumescimento

Os dados de média e desvio padrão, podem ser observados nas tabelas 2 e 3. Na comparação entre grupos para a solução de PBS, o grupo FFCAAg obteve diferença estatística significativa nos períodos de 24h, 3 dias e 14 dias, com os grupos FFCA (FFCAAg vs FFCA, $p < 0.001$), com o grupo TFCA (FFCAAg vs TFCA, $p < 0.001$) e com o grupo FCNA (FFCAAg vs FCNA, $p < 0.001$). Com a mesma solução o grupo FFCA também apresentou diferença estatística significativa, nos períodos 24h, 3 dias e 14 dias, com o grupo TFCA (FFCA vs TFCA, $p < 0.001$).

Comparando os períodos para a solução de BPS, a massa inicial (M1) obteve diferença significativa com todos os períodos (M1 vs 24h, $p < 0.001$; M1 vs 3 dias,

$p < 0.001$; M1 vs 14 dias, $p < 0.001$). Com a mesma solução o período de 24 horas apresentou diferença estatística significativa com o período de 14 dias (M24h vs M14d, $p < 0.001$).

Tabela 2 – Dados do intumescimento com PBS

	M1	M24h	M3d	M14d
FFCA	0.269 ± 0.007^A	0.730 ± 0.498^{Bc}	0.738 ± 0.432^{Bc}	1.077 ± 0.260^B
FFCAA _g	0.271 ± 0.013^A	1.595 ± 0.108^{Bb}	1.763 ± 0.107^{Cb}	2.036 ± 0.054^{Db}
FFCNA	0.206 ± 0.056^A	0.396 ± 0.056^{Bc}	0.437 ± 0.082^{Cc}	0.566 ± 0.090^{Dc}
TFCA	0.183 ± 0.010^A	0.209 ± 0.013^{Bd}	0.228 ± 0.005^{Cd}	0.272 ± 0.028^{Dd}

Legenda: Dados representados estão em média e desvio padrão.

Letras maiúsculas diferentes - diferença significativa na análise intragrupo para cada parâmetro – $p < 0,05$ - *Two Way Analysis of Variance*.

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa na análise intergrupo para cada parâmetro – $p < 0,05$ - *Two Way Analysis of Variance*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a solução de água destilada, na comparação entre grupos, o grupo FFCAA_g apresentou diferença estatística significativa, nos períodos de 24 horas, 3 dias e 14 dias, com os grupos FFCA (FFCAA_g vs FFCA, $p < 0.001$), grupo FCNA (FFCAA_g vs FCNA, $p < 0.001$) e com o grupo TFCA (FFCAA_g vs TFCA, $p < 0.001$).

Na comparação entre períodos para a solução de água destilada, a massa inicial (M1), assim como na solução de PBS, também obteve diferença significativa com todos os períodos (M1 vs 24h, $p < 0.001$; M1 vs 3 dias, $p < 0.001$; M1 vs 14 dias, $p < 0.001$). Com a mesma solução o período de 24 horas apresentou diferença estatística significativa com o período de 14 dias (M24h vs M14d, $p < 0.001$) e o período de 3 dias apresentou diferença estatística significativa com o período de 14 dias (M3d vs M14d, $p < 0.001$).

Tabela 3 – Dados do intumescimento com água destilada

	M1	M24h	M3d	M14d
FFCA	0.247 ± 0.026 ^A	0.282 ± 0.037 ^{Bc}	0.346 ± 0.051 ^{Bc}	0.804 ± 0.227 ^{Bc}
FFCAA _g	0.177 ± 0.044 ^A	2.028 ± 0.330 ^{Bb}	2.324 ± 0.212 ^{Cb}	2.392 ± 0.368 ^{Db}
FFCNA	0.217 ± 0.009 ^A	0.317 ± 0.006 ^{Bc}	0.447 ± 0.103 ^{Cc}	0.532 ± 0.144 ^{Dc}
TFCA	0.177 ± 0.003 ^A	0.220 ± 0.022 ^{Bd}	0.337 ± 0.006 ^{Cd}	0.404 ± 0.030 ^{Dd}

Legenda: Dados representados estão em média e desvio padrão.

Letras maiúsculas diferentes - diferença significativa na análise intragrupo para cada parâmetro – $p < 0,05$ - *Two Way Analysis of Variance*.

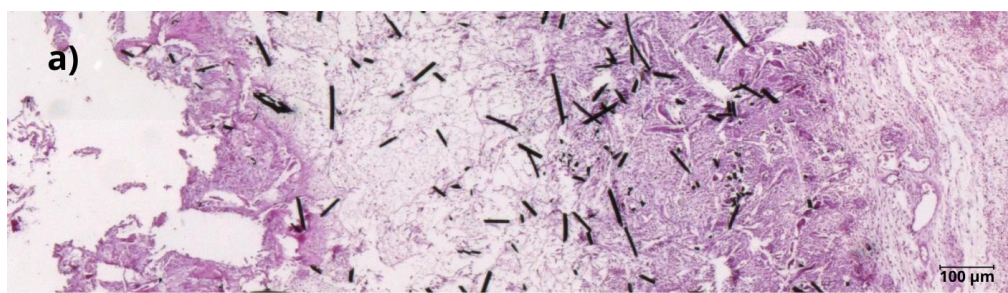
Letras minúsculas diferentes - diferença significativa na análise intergrupo para cada parâmetro – $p < 0,05$ - *Two Way Analysis of Variance*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

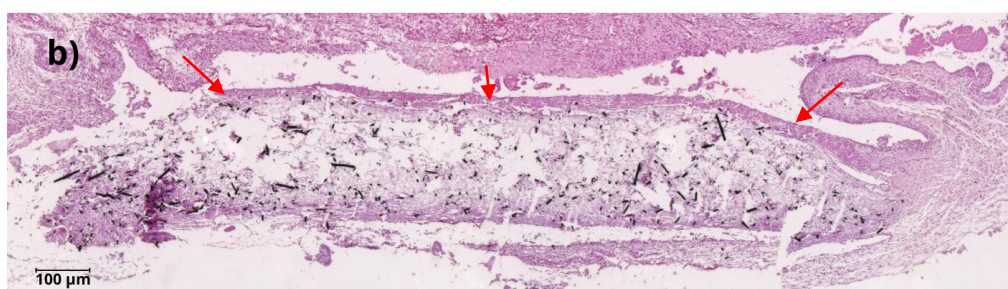
4.4. Análise histológica do implante subcutâneo

As peças obtidas no período de 7 dias, apresentaram um processo inflamatório agudo de leve a moderado. Foi possível observar a presença de cápsula ao redor de todo material, como pode ser visto na Figura 13, vasos neoformados e vasos com seu calibre aumentado, indicando o aumento da permeabilidade vascular. Infiltrado inflamatório com presença de neutrófilos e plasmócitos. Presença de polimorfonucleares (PMNs) circundando fragmentos do material.

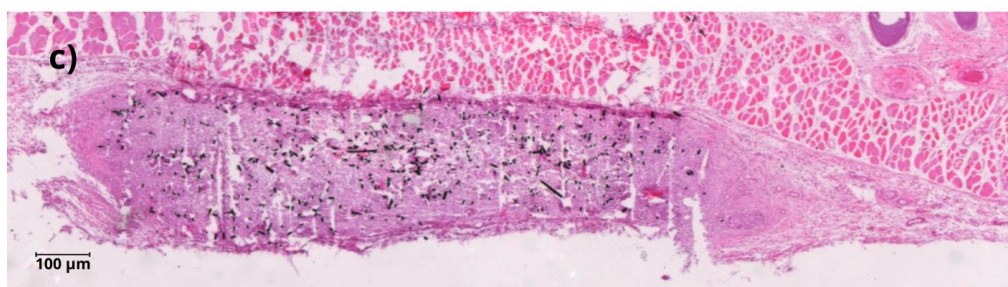
Figura 13 – Região subcutânea com implantes período de 7 dias



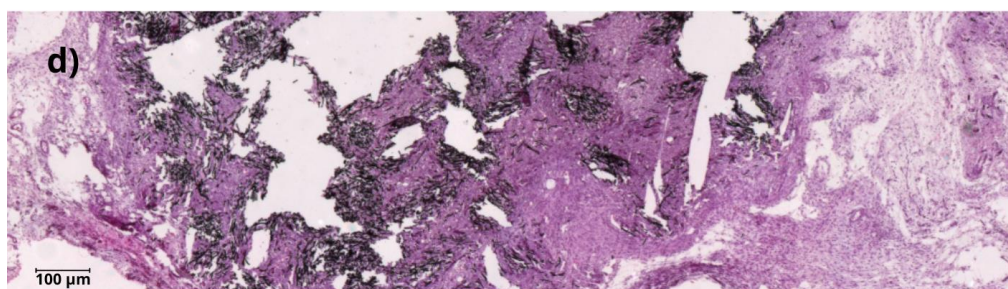
FFCNA 7d



FFCA 7d



FFCAAg 7d



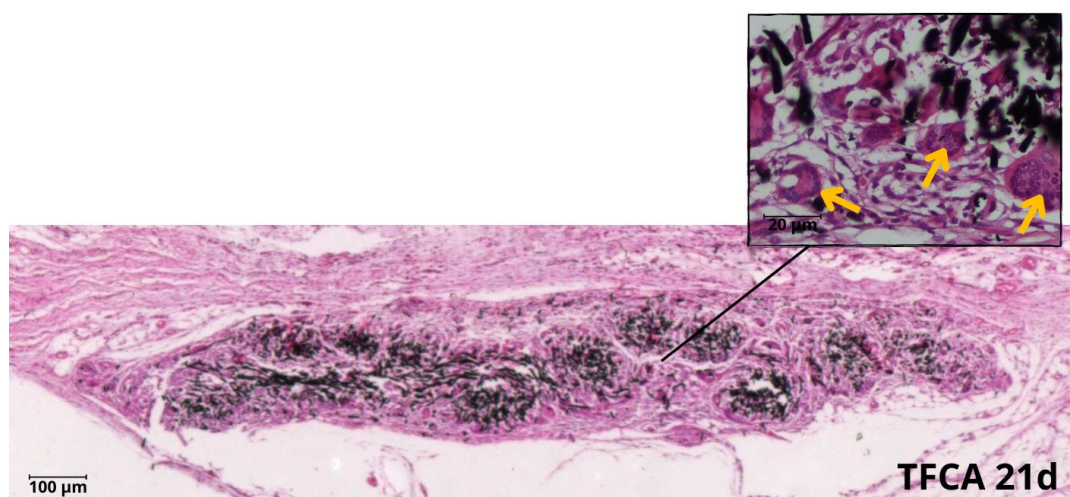
TFCA 7d

Legenda: a) Implante grupo FFCNA 7 dias (2,5X); b) Implante subcutâneo grupo FFCA 7 dias (2,5X) cápsula indicada pelas setas vermelhas; c) Implante grupo FFCAAg 7 dias (2,5X); d) Implante grupo TFCA 7 dias (2,5X).

Fonte: Elaborado pelo autor.

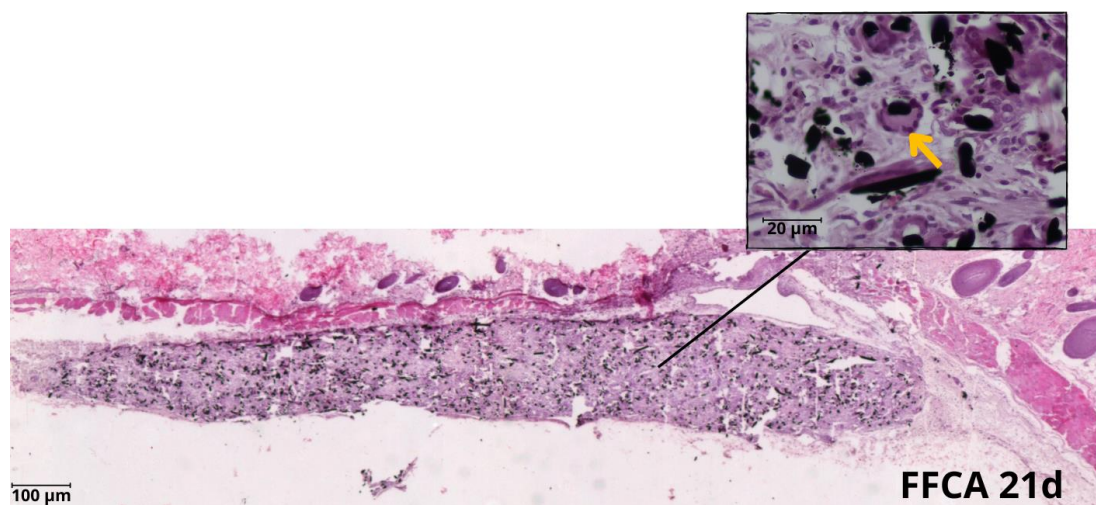
Aos 21 dias predominância de PMNs e células gigantes de corpo estranho, como pode ser observada na Figura 14 e 16. Foi notado um aumento de fagocitoses nesse período (Figura 15). Ainda se tem a presença da cápsula ao redor do implante, assim como a presença de vasos neoformados e células do plasma.

Figura 14 – Implante subcutâneo TFCA 21d



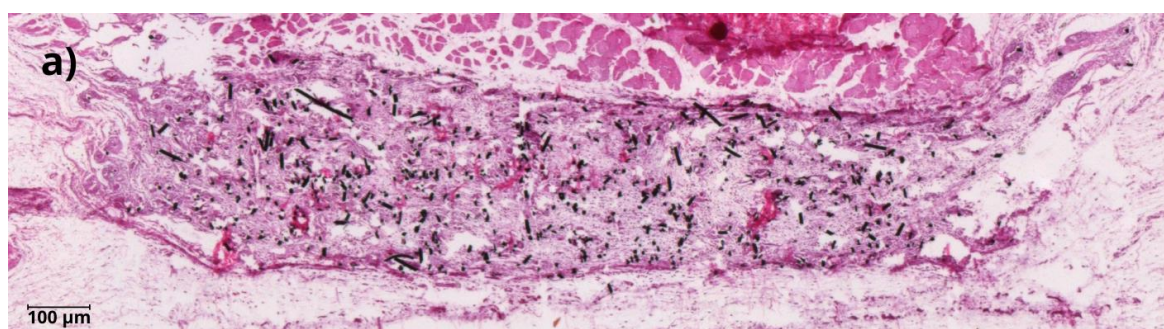
Legenda – Implante subcutâneo do grupo TFCA no período de 21 dias (2,5X). Maior aumento (40X) mostrando a presença de células gigantes de corpo estranho.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Implante subcutâneo FFCA 21d

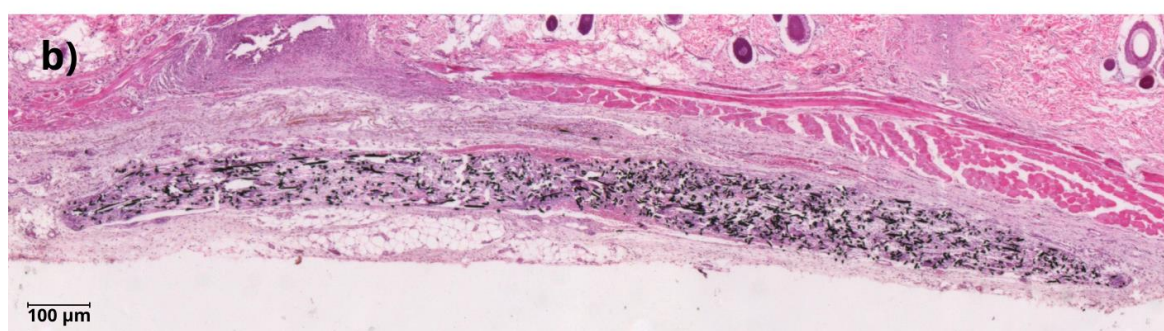


Legenda – Implante subcutâneo do grupo FFCA no período de 21 dias (2,5X). Maior aumento (40X) mostrando a presença de fagocitose.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Região subcutânea com implantes no período de 21 dias



FFCNA 21d



FFCAAg 21d

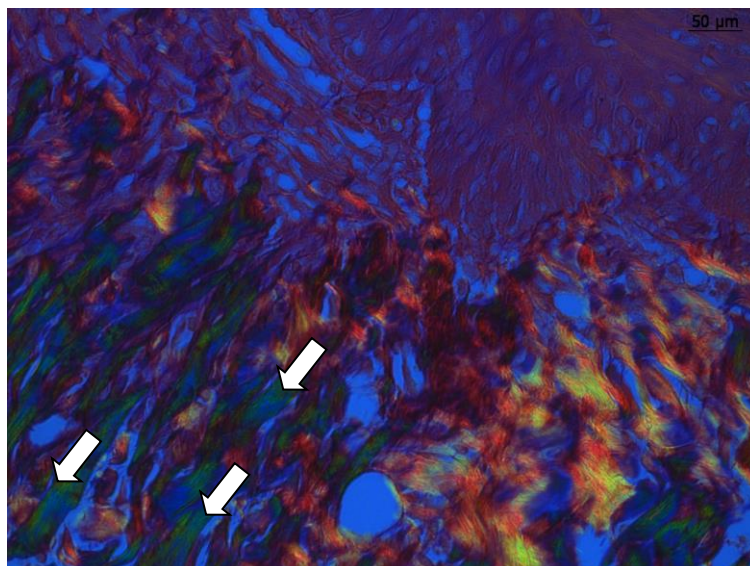
Legenda: a) Implante grupo FFCNA 21 dias (2,5X); b) Implante grupo FFCAAg 21 dias (2,5X).
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Análise histomorfométrica (picrosirius)

Pela análise visual, as lâminas do primeiro período de eutanásia aos 7 dias, apresentaram maior presença de fibras colágenas do tipo III. Em 21 dias, apenas o grupo TFCA não demonstrou mudança visual para fibras colágenas tipo I.

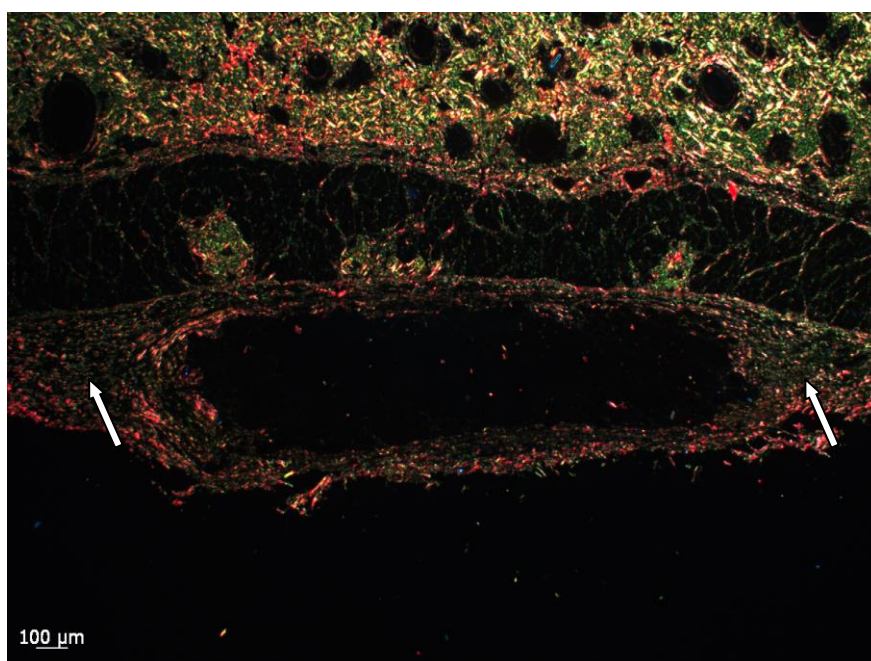
Podemos observar na Figura 17, um corte histológico corado em *Picrosirius red* do grupo FFCA 7 dias, mostrando grande presença de fibras verdes (colágeno tipo III). Maior presença de fibras colágenas tipo III também podem ser observadas no grupo FFCAAg 7 dias, como mostra a Figura 18.

Figura 17 - Análise *Picrosírius red*, grupo FFCA mostrando fibras de colágeno tipo III em maior aumento



Legenda: Análise *Picrosírius red*, espécime do grupo FFCA 7d (40X). Predominância de fibras da cor verde indicada pelas setas brancas.
Fonte: elaborado pelo autor.

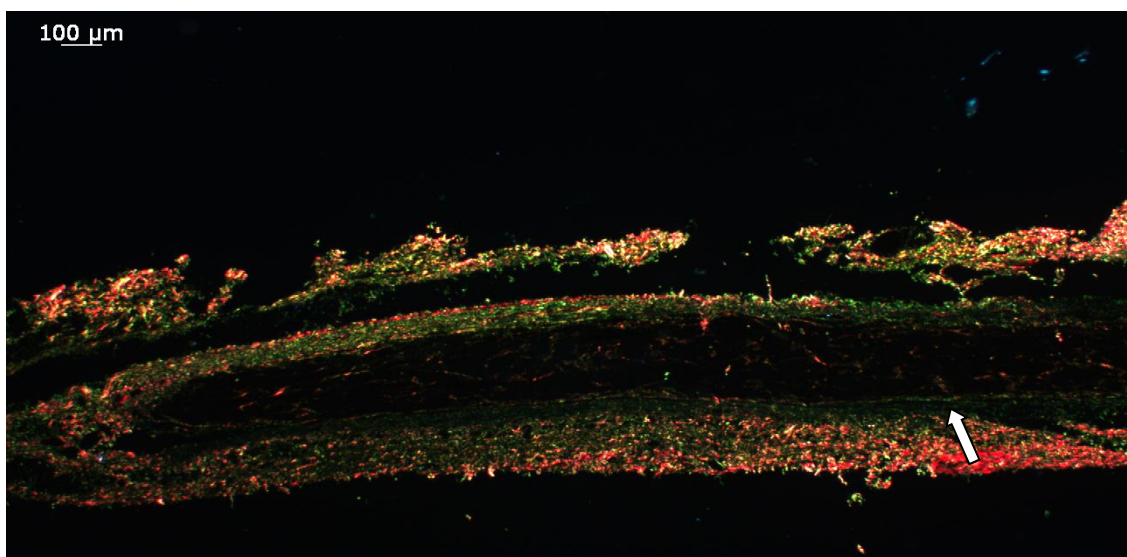
Figura 18– Análise *Picrosírius red*, mostrando fibras de colágeno tipo III



Legenda: Análise *Picrosírius red*, grupo FFCAAg 7d 2,5X. As setas brancas indicam a localização das fibras colágenas esverdeadas, localizadas na borda da capsula que circunda o implante.
Fonte: Elaborado pelo autor.

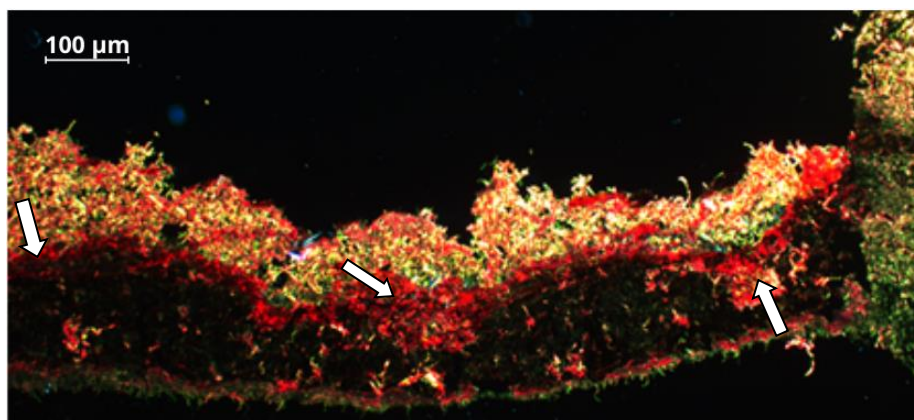
Com o decorrer dos dias há o processo de maturação das fibras colágenas, ocorre a troca das fibras de colágeno tipo III para tipo I, fibras maduras e espessas de coloração amarelo avermelhada. Nas Figuras 19 e 20 temos cortes histológicos dos grupos FFCAA_g e FFCNA respectivamente, no período de 21 dias, mostrando a troca da cor das fibras colágenas ao redor do implante. E na Figura 21 em maior aumento, é possível observar fibras de colágeno tipo I próximas ao material.

Figura 19 – Análise *Picrosírius red*



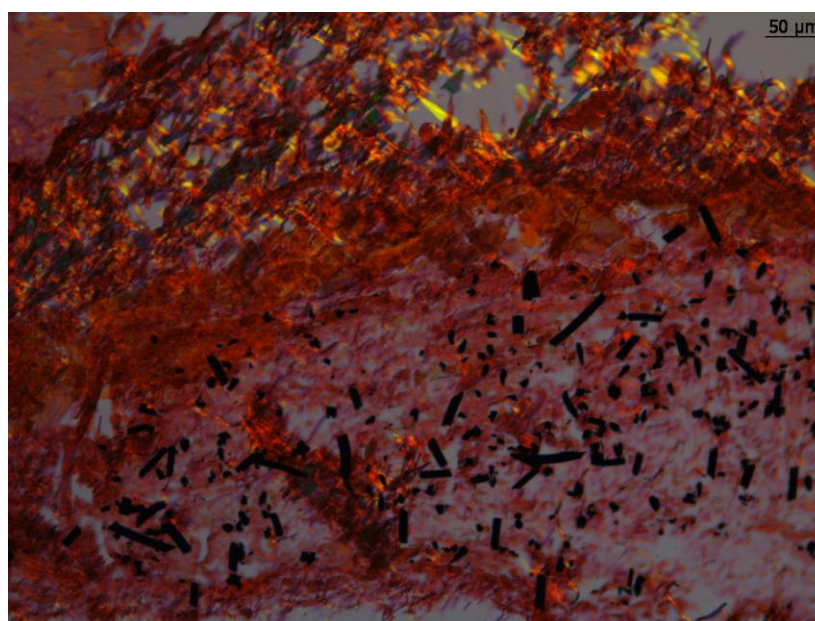
Legenda: Análise *Picrosírius red*, espécime do grupo FFCAA_g 21 dias (2,5X). Seta branca indicando grupo de fibras de colágeno tipo I.
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 20 – Análise *Picrosirius red*, grupo FFCNA 21 dias mostrando maior predominância de fibras colágenas tipo I



Legenda: Análise *Picrosirius red*, espécime do grupo FFCNA 21d (2,5X). Fibras de colágeno tipo I sinalizadas com setas brancas.
Fonte: Elaborado pelo autor.

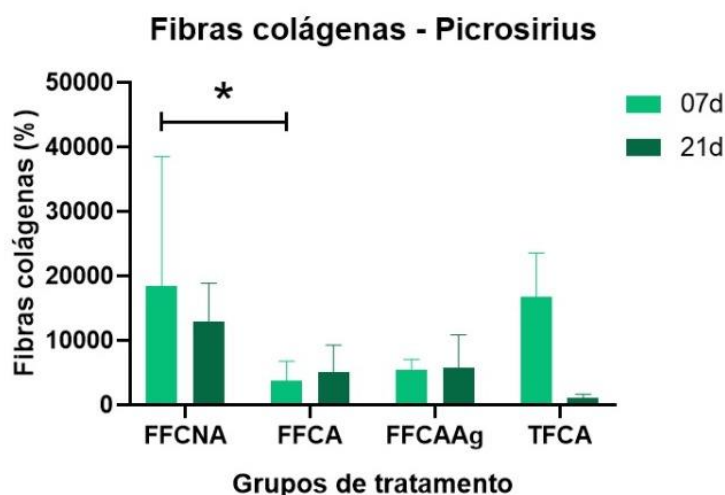
Figura 21 - Análise *Picrosirius red*, grupo FFCNA mostrando predominância de colágeno tipo I



Legenda: Análise *Picrosirius red*, espécime do grupo FFCNA 21d (10X). Fibras de colágeno tipo I sinalizadas com setas amarelas e partículas do material indicadas pelas setas azuis.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na análise quantitativa das fibras colágenas, apenas os grupos FFCNA e FFCA apresentaram diferença estatística significativa para a presença de fibras colágenas no período de 7 dias, como podemos ver na Figura 22.

Figura 22 – Análise quantitativa das fibras colágenas pela coloração *Picrosirius Red*



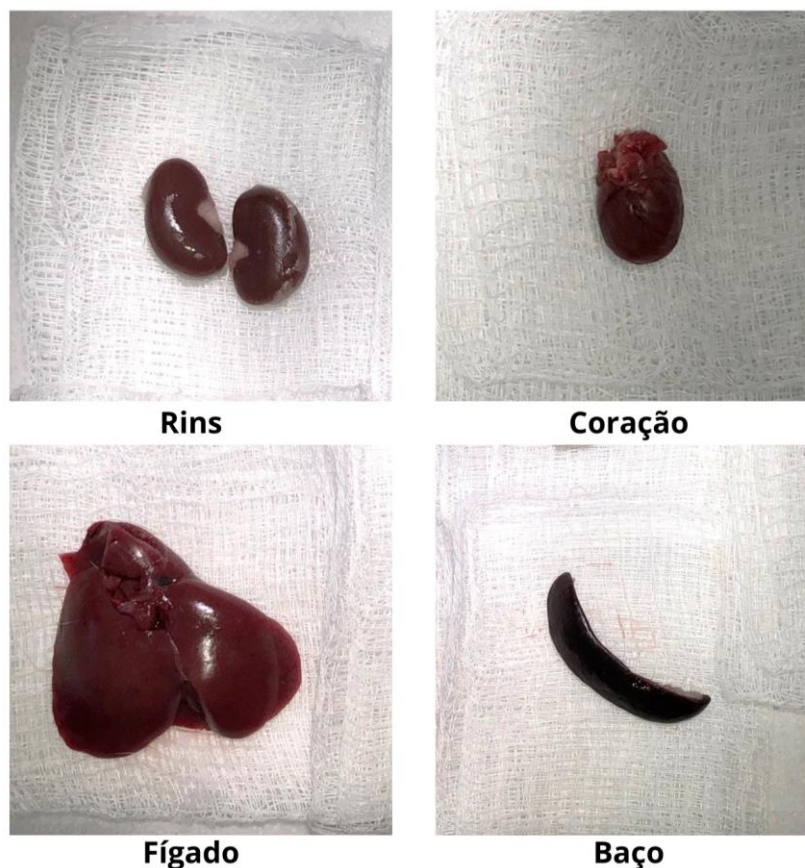
Legenda: Gráfico de porcentagem de fibras colágenas ao redor dos implantes de cada grupo no período de 7 e 21 dias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Avaliação dos sinais clínicos e histológicos de toxicidade

Após o procedimento cirúrgico os animais foram acompanhados diariamente e se apresentaram bem, depois que voltaram da anestesia se mostraram ativos na gaiola e se alimentando normalmente. Visualmente nenhum sinal de dor foi detectável. O mesmo foi feito para o acompanhamento da ferida cirúrgica, que não apresentou nenhum sinal anormalidade. Nenhum animal apresentou disfunção motora, tremor, diarreia ou outros sintomas de toxicidade. Não houve óbito de animais. Decorridos os períodos de eutanásia, a região dos implantes foi removida assim como os órgãos de interesse (Figura 23). Estes permaneceram fixados em formalina tamponada neutra até a fase de inclusão em parafina e corte histológico.

Figura 23 – Visualização macroscópica dos órgãos removidos



Legenda: Órgãos removidos: rins, coração, fígado e baço.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Macroscopicamente os órgãos não apresentaram alteração em tamanho e contorno. Não houve alterações dos aspectos de normalidade como: sangramento e edema.

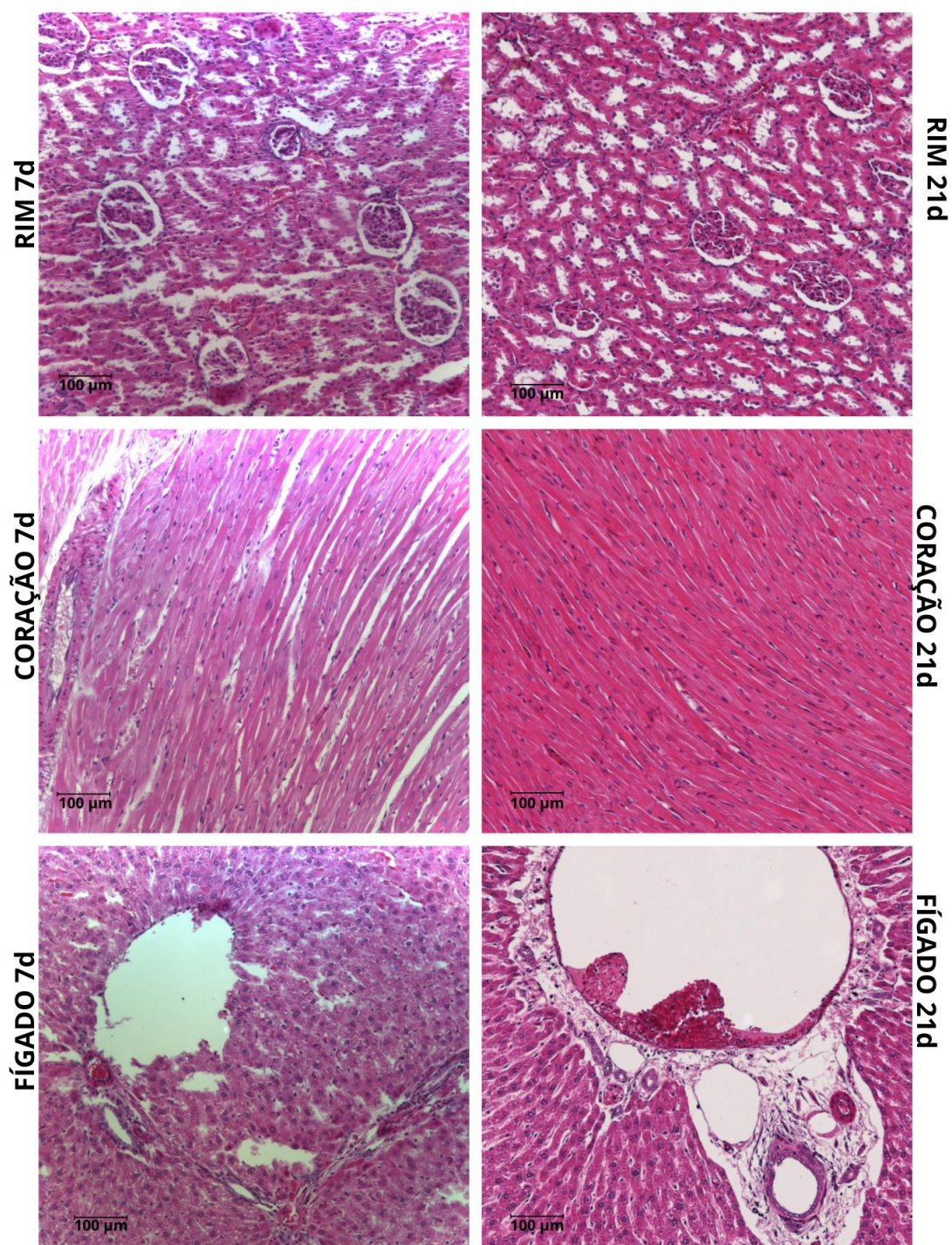
No fígado foi possível observar normalidade nos hepatócitos, quanto a sua morfologia e disposição, uma vez que se encontravam dispostos radialmente nos lóbulos hepáticos poligonais (Figuras 24, 25 e 26). Foram observados também ductos revestidos por epitélio cúbico, vasos sanguíneos, além da veia central. Observou-se ainda o espaço porta, composto pelo ramo da veia porta, ducto biliar e ramo da artéria hepática, todos exibindo aspectos compatíveis com a normalidade. Os capilares sinusoides presentes entre os hepatócitos também se apresentaram preservados.

Aspectos histológicos de normalidade também foram encontrados nas estruturas do rim, tanto na zona cortical quanto na zona medular (Figuras 24, 25 e 26). É possível observar glomérulos renais no espaço capsular, e seus ductos envoltos pela cápsula de Bowman.

No coração, observou-se aspectos de normalidade nas diferentes regiões, endocárdio, miocárdio e epicárdio (Figuras 24, 25 e 26). As fibras cardíacas estriadas, apresentaram-se organizadas e exibiam núcleo claro, indicando atividade normal. A presença dos discos intercalares também foi notada nas regiões de união de fibras musculares.

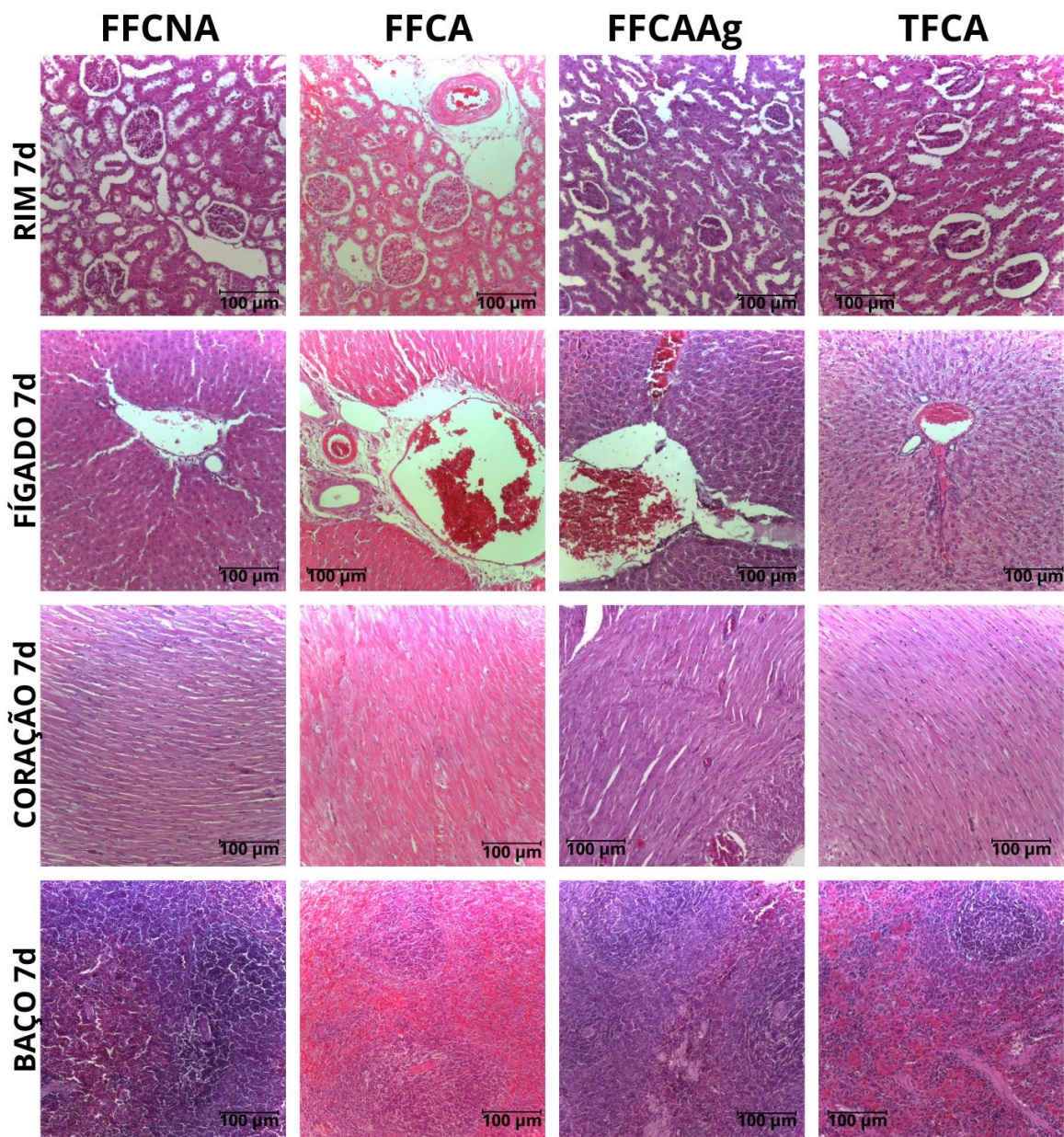
Por fim, observamos ao microscópio o baço, que exhibe em seu parênquima os folículos linfáticos, formados por uma bainha de linfócitos, localizados na região da polpa branca e apresentando uma artéria central (Figuras 24, 25 e 26). Também notou-se a presença das trabéculas de tecido conjuntivo permeando o parênquima, dividindo-o em compartimentos. Entre os folículos linfáticos, verificou-se a presença de células sanguíneas formando a polpa vermelha.

Figura 24 – Análise histológica grupo controle 7 e 21 dias



Legenda: Órgãos grupo controle 7 e 21 dias. (10X).
Fonte: Elaborado pelo autor.

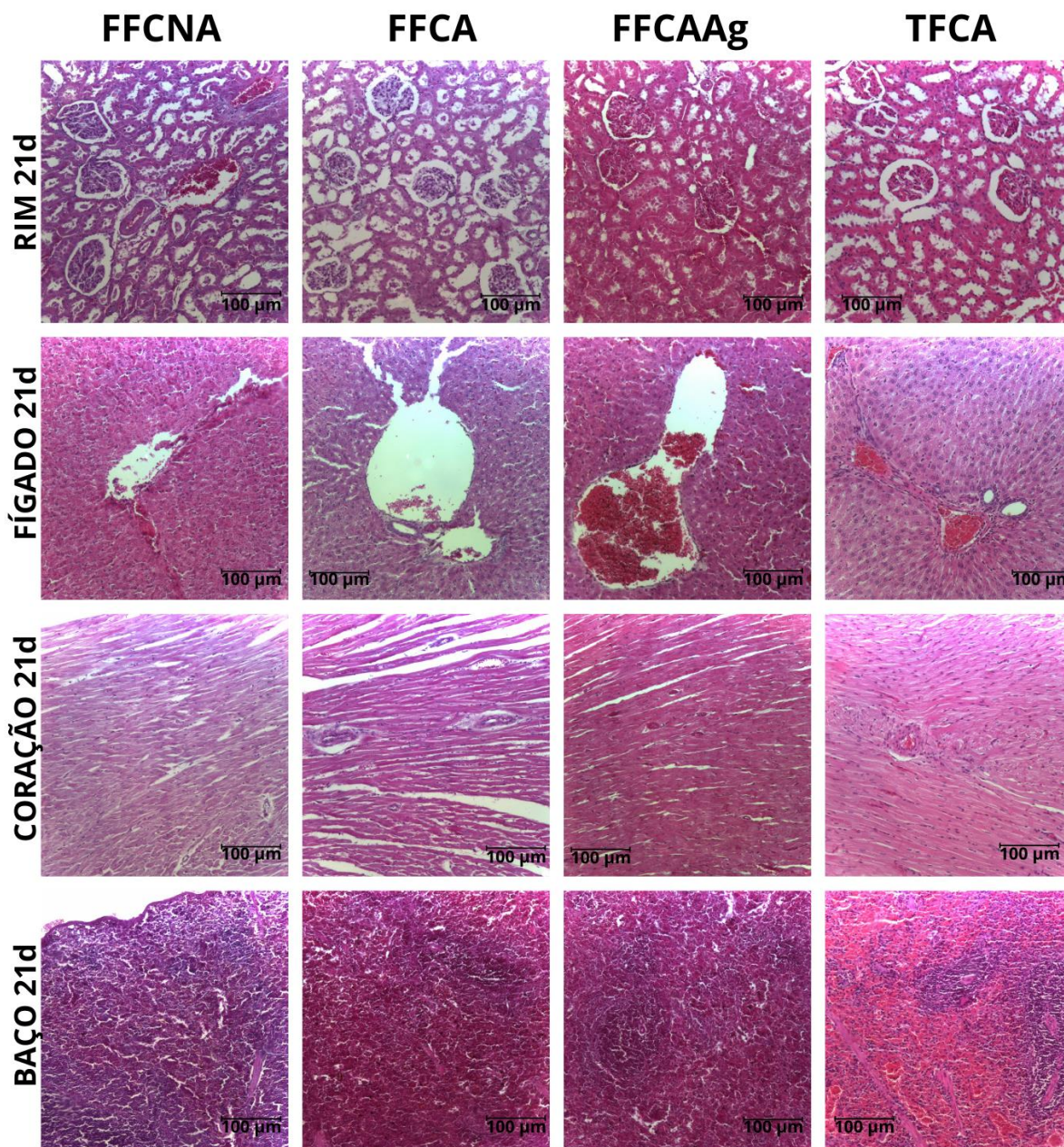
Figura 25 – Análise histológica dos órgãos dos grupos FFCNA, FFCA, FFCAA_g e TFCA no período de 7 dias



Legenda: Análise histológica dos órgãos no período de 7 dias em seus respectivos grupos. Aumento de 10X.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26 – Análise histológica dos órgãos dos grupos FFCNA, FFCA, FFCAA_g e TFCA no período de 21 dias



Legenda: Cortes histológicos dos órgãos e seus respectivos grupos. Aumento 10X.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Defeitos ósseos de tamanho crítico não possuem uma regeneração espontânea, necessitam de um material que facilite a migração celular, permitindo um reparo efetivo (Noori et al., 2017). As fibras de carbono ativada (FCA) possuem uma estrutura porosa bem definida em sua superfície, o que propicia uma rápida adsorção para componentes específicos (Marcuzzo et al., 2016). Suas propriedades biológicas para o uso na engenharia tecidual não estão totalmente elucidadas, mas há estudos otimistas sobre sua ação osteoindutora e sobre sua biocompatibilidade. (Ryu et al., 2014; Peng et al., 2020). Portanto, este estudo teve como objetivo realizar a caracterização de quatro formas de apresentação da FCA, por meio de ensaios de caracterização e testes *in vivo*, para verificação da resposta inflamatória e possível toxicidade sistêmica pelo material.

Sabe-se que um material que tem pretensões de ser usado no ramo da engenharia de tecidos necessita de certas características, dentre elas uma superfície hidrofílica, para que se tenha boa interação com o meio e ajude na proliferação celular (Oh et al., 2003). No teste de molhabilidade, a propriedade de absorção foi testada instantaneamente. Os grupos FFCAA_g e FFCA se mostraram superhidrofílicos, seus ângulos não puderam ser medidos devido a rápida absorção do líquido. Já os grupos FCNA e TFCA, com ângulos 124° e 114° respectivamente, se mostraram hidrofóbicos. Porém quando se trata de contato íntimo com o sangue estudos sugerem que há necessidade de um equilíbrio entre superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas (Tzoneva et al., 2007; Deppisch et al., 1998). No estudo de Bagheri et al. (2015), foram testadas fibras de carbono com diferentes compósitos incorporados (*Flax/Epoxy*), o grupo da fibra de carbono que foi considerada hidrofóbica no teste de molhabilidade, apresentou melhor compatibilidade no ensaio de citotoxicidade, do que a fibra mais hidrofílica que tinha maior taxa de absorção apenas. Os autores justificaram que a fibra hidrofílica pode ser melhor na absorção, porém libera mais particulados de carbono em comparação a outras, e é possível que isso tenha um efeito maior nas células.

No entanto, no presente estudo sugere-se que os espécimes necessitam de maior tempo em contato com a substância líquida para que ocorra maior absorção.

Um outro fator que deve ser lembrado e que retarda o processo de absorção é a presença de microporos nos feltros de fibra de carbono, os quais podem aprisionar ar, o que resulta em uma lentidão no processo de absorção (Rodrigues et al., 2019; do Amaral et al., 2017).

Todos os grupos apresentaram aumento da porcentagem de absorção com o decorrer dos dias no ensaio de intumescimento, dados que corroboram com os achados de Ryu et al. (2014), onde a fibra cPAN mostrou taxas maiores de absorção comparada à estruturas de nanotubos de carbono (CNT). Isso pode ser explicado pelo tamanho dos poros presentes na fibra que contribuem na absorção (Rodrigues et al., 2019). No presente estudo, os grupos FFCAA_g, FCNA, FFCA mostraram diferenças estatísticas significativas para absorção de ambas as soluções, água destilada e PBS. No entanto, é notável que o grupo FFCAA_g obteve maior porcentagem de intumescimento, isso pode ser explicado pela presença das partículas de prata incorporadas nesta fibra, elas aumentam a área de superfície exposta disponível como descrito por Rodrigues et al. (2019), fazendo com que o material absorva líquido de forma mais rápida, levando ao seu ganho de peso.

O comportamento mecânico dos feltros também foi avaliado, pelo teste de tração e módulo elástico. O ensaio de tração verifica a resistência do espécime a uma força aplicada, no presente estudo uma força de 10kg. O módulo elástico, verifica as deformações: plástica (P) e elástica (E), a primeira sendo aquela que pode ser reversível e a segunda onde o material fica permanentemente comprometido, isso pode ser observado no gráfico de tração do presente estudo. Com os resultados obtidos foi possível verificar que o processo de ativação não interfere nas propriedades mecânicas dos feltros, já que dentre os grupos que são ativados, o grupo FFCA foi o que se mostrou mais resistente e este passa pelo processo de ativação, que consiste na criação de poros e remoção da parte amorfa do material (do Amaral et al., 2017). No trabalho de Liu et al. (2016), foi verificada a relação da incorporação de óxido de grafeno com o aumento da resistência da fibra. Os autores verificaram que a incorporação de 2% de óxido de grafeno deixou a fibra reforçada. O grafeno é conhecido por ter uma resistência e módulo elástico excepcionalmente altos, no entanto quando temos a presença do processo de oxidação na produção da fibra, ocorre a redução dessas propriedades. No caso das fibras deste estudo, todas que passam pelo processo de ativação também passam

pelo processo de oxidação, o que pode justificar uma resistência a tração relativamente baixa em comparação a outras fibras.

A implantação de novos materiais na região subcutânea de ratos é um dos métodos mais convenientes para verificação dos efeitos locais de inflamação e também biocompatibilidade *in vivo* (Marques et al., 2013). O material que está sendo testado não pode ser danoso ao hospedeiro. Neste estudo, a resposta inflamatória local foi avaliada em dois períodos: 7 e 21 dias. Em 7 dias, obteve-se o esperado a um infiltrado inflamatório de leve a moderado em todos os grupos. Presença de cápsula de tecido conjuntivo envolvendo o implante, vasos neoformados mostrando alta atividade metabólica e predominância de leucócitos. Já aos 21 dias, características de infiltrado inflamatório leve foi observado, maior presença de células gigantes multinucleadas, plasmócitos e aumento nos processos de fagocitose. Ambos os períodos corroboram com os resultados obtidos por Camargo et al. (2010), Marsi et al. (2019) e Aoki et al. (2009).

A preocupação sobre a possibilidade de materiais a base de carbono estar relacionada a uma toxicidade aguda sistêmica no hospedeiro após sua implantação, vem sendo abordada na literatura recentemente (Ying et al., 2019). Por isso, neste estudo, foram removidos os rins, coração, fígado e baço para análise. Assim que foram removidos, os órgãos não apresentaram edema ou sangramento em excesso. Não foram observadas anormalidade nos órgãos dos grupos experimentais, todas as estruturas corresponderam ao grupo controle, tanto na parte estrutural quanto celular. Esses achados sugerem que os quatro tipos de materiais testados não causaram uma toxicidade aguda sistêmica nos animais.

A coloração *Picrosirius* verifica a presença dos subtipos de colágeno e também a organização de suas fibras. Esta tem sido utilizada para avaliação do processo de cicatrização, relacionando a quantidade e qualidade do colágeno formado como resultado da cicatrização final (Cuttle et al., 2005). Após uma agressão o primeiro colágeno a se formar é o do tipo III, o que foi possível observar nos cortes de 7 dias. Com o passar do tempo, ocorre o amadurecimento das fibras colágenas, aos 21 dias foi observado maior presença de fibras da cor amarelo avermelhado, caracterizando fibras colágenas tipo I. O grupo FFCA apresentou maior densidade de fibras colágenas no período de 7 dias e isso pode estar relacionado com o fato da predominância de fibras colágenas do tipo I a longo prazo.

Já o grupo TFCA não apresentou mudanças de amadurecimento da fibra colágena tipo III para a fibra tipo I, o que não é favorável a um material com vistas a obtenção de *scaffolds* para engenharia tecidual óssea.

Portanto, este estudo mostrou que as fibras apresentaram propriedades distintas, sendo FFCNA e TFCA hidrofóbicas e FFCA e FFCAAg hidrofílicas. Na avaliação da resistência a tração, FFCA se apresentou mais resistente e FFCAAg com maior resistência a deformação. Quanto ao intumescimento, FFCAAg e FFCA apresentaram maiores índices de absorção para as soluções de PBS e água destilada. No teste *in vivo*, os materiais implantados não causaram toxicidade sistêmica e a resposta inflamatória correspondeu dentro dos parâmetros de normalidade nos períodos de 7 e 21 dias. Já na avaliação da maturação das fibras colágenas, apenas o grupo TFCA não apresentou mudanças para a fibra colágena tipo I.

Como limitações do estudo pode-se destacar a ausência de outros líquidos para o teste de molhabilidade, bem como análise por cromatografia líquida que poderia colaborar para compreensão da taxa de carbono circulante no organismo dos animais. De todo modo, o presente estudo contribui com informações relevantes para a literatura, posto que há uma escassez sobre o tema abordado. Sugere-se que testes mais aprofundados sejam realizados, ainda em estudos futuros de fase pré-clínica.

6 CONCLUSÃO

Por meio das análises realizadas constatou-se que o TFCA se apresentou hidrofóbico, pouco resistente a tração e baixo potencial para maturação de fibras colágenas. Portanto o TFCA mostrou-se com pouco potencial para ser indicado como possível scaffold para engenharia tecidual óssea.

Conclui-se que FFCNA, FFCA e FFCAAg, possuem potencial para serem consideradas *scaffolds*, devido às seguintes características apresentadas: boa taxa de absorção, hidrofiliabilidade e atóxicas.

REFERÊNCIAS*

- Amaral RH, Rogero SO, Curz AS, Sacramento RS, Lima Filho AAS, Schor P, et al. Estudo de hidrogéis de poli(vinil pirrolidona) (pvp) para utilização na área oftalmológica. International Nuclear Atlantic Conference; 2005; Santos, Brasil. Available from: repositorio.ipen.br/bitstream/handle/123456789/18275/10574.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408. doi: 10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10. PMID: 23339648; PMCID:PMC3766369.
- Aoki K, Usui Y, Narita N, Ogiwara N, Iashigaki N, Nakamura K, et al. A thin carbon-fiber web as a scaffold for bone-tissue regeneration. *Small.* 2009 Jul;5(13):1540-6. doi: 10.1002/sml.200801610. PMID: 19334009.
- Bagheri ZS, Giles E, El Sawi I, Amleh A, Schemitsch EH, Zdero R, et al. Osteogenesis and cytotoxicity of a new Carbon Fiber/Flax/Epoxy composite material for bone fracture plate applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015 Jan;46:435-42. doi: 10.1016/j.msec.2014.10.042. Epub 2014 Oct 22. PMID: 25492008.
- Bogliolo Filho G - Patologia. 10.ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan; 2021.
- Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR. Picrosirius-polarization staining method as an eficiente histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron.* 2007;38(6):580-3. doi: 10.1016/j.micron.2006.10.005. Epub 2006 Nov 13. PMID: 17126553.
- Bow A, Anderson DE, Dhar M. Commercially available bone graft substitutes: the impact of origin and processing on graft functionality. *Drug Metab Rev.* 2019 Nov;51(4):533-44. doi: 10.1080/03602532.2019.1671860. Epub 2019 Oct 2. PMID: 31577468.
- Bron NJ, Martínez MPA, Ramírez MGL, Tinajero MC, Lagunas ALH, Bramante CM. Inflammatory response of Bioceramic material to dentin tube implantation in rats' subcutaneous tissue. *Rev Odont Mex.* 2016;20(3):174-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rodex.2016.08.004>..
- Camargo SE, Rode Sde M, do Prado RF, Carvalho YR, Camargo CH. Subcutaneous tissue reaction to castor oil bean and calcium hydroxide in rats. *J Appl Oral Sci.* 2010 May-Jun;18(3):273-8. doi: 10.1590/s1678-77572010000300014. PMID: 20857007; PMCID: PMC5349050.
- Chen CC, Hijaz A, Drazba JA, Damaser MS, Daneshgari F. Collagen remodeling and suburethral inflammation might account for preserved anti-incontinence effects of cut polypropylene sling in rat model. *Urology.* 2009 Feb;73 (2):415-20. doi:

10.1016/j.urology.2008.07.033. Epub 2008 Oct 1. PMID: 18829083; PMCID: PMC4160051.

Cuttle L, Nataatmadja M, Fraser JF, Kempf M, Kimble RM, Hayes MT. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picosirius-polarization. *Wound Repair Regen.* 2005 Mar-Apr;13(2):198-204. doi: 10.1111/j.1067-1927.2005.130211.x. PMID: 15828945.

Denry I, Kuhn LT. Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Dent Mater.* 2016 Jan;32(1):43-53. doi: 10.1016/j.dental.2015.09.008. Epub 2015 Sep 28. PMID:26423007; PMCID: PMC4696887.

Deppisch R, Storr M, Buck R, Göhl H. Blood material interactions at the surfaces of membranes in medical applications. *Sep Purif Technol.* 1998;14(1-3):241–54.

do Amaral Junior MA, Matsushima JT, Rezende MC, Gonçalves ES, Marcuzzo JS, Baldan MR. Production and characterization of activated carbon fiber from textile PAN Fiber. *J Aerosp Technol Manag.*2017;9(4):423-30. doi: 10.5028/jatm.v9i4.831.

Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int.* 2011 Jun;22(6):2003-6. doi: 10.1007/s00198-011-1611-4. PMID: 21523400.

Gao C, Peng S, Feng P, Shuai C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res.* 2017 Dec 21;5:17059. doi: 10.1038/boneres.2017.59. PMID: 29285402; PMCID: PMC5738879

Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Dec;1092:385-96. doi: 10.1196/annals.1365.035. PMID: 17308163.

Hasan A, Byambaa B, Morshed M, Cheikh MI, Shakoor RA, Mustafy T, et al. Advances in osteobiologic materials for bone substitutes. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Jun;12(6):1448-68. doi: 10.1002/term.2677. Epub 2018 May 21. PMID: 29701908.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica: texto e atlas.* 13.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010 Jun 29;8(6):e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412. PMID: 20613859; PMCID: PMC2893951.

Lang NP, Lindhe J. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral.* 6.ed. Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan; 2018.

Lemos MC. *Comparação entre histologia e espectroscopia de fluorescência para avaliação de atrofia cutânea induzida por glicocorticoide em ratos [dissertação].* São

Carlos. Universidade Federal de São Carlos; 2010 [2022/01/18]. Available from: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6970>.

Li Y, Wang D, Qin W, Jia H, Wu Y, Ma J, et al. Mechanical properties, hemocompatibility, cytotoxicity and systemic toxicity of carbon fibers/poly(ether-ether-ketone) composites with different fiber lengths as orthopedic implants. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2019 Dec;30(18):1709-24. doi: 10.1080/09205063.2019.1659711. Epub 2019 Aug 29. PMID: 31464157.

Liu C, Wong HM, Yeung KWK, Tjong SC. Novel electrospun polylactic acid nanocomposite fiber mats with hybrid graphene oxide and nanohydroxyapatite reinforcements having enhanced biocompatibility. *Polymers (Basel).* 2016 Aug 8;8(8):287. doi: 10.3390/polym8080287. PMID: 30974562; PMCID: PMC6432366.

Loyola M, Ancoski T, Ramires MA, Mello F, Mello AMD. Enxertos ósseos autógenos e xenógenos como alternativa de manutenção do espaço alveolar. *RGS.* 2018;19(2):8-18.

Marcuzzo JS, Cuña A, Tancredi N, Mendez E, Bernardi HH, Baldan MR. Microporus activated carbon fiber felt from Brazilian textile PAN fiber: preparation, characterization and application as super capacitor electrode. *Rev Bras Apl Vac.* 2016;35(2):58-63. doi: <https://doi.org/10.17563/rbav.v35i2.1022>.

Marques NC, Lourenço Neto N, Fernandes AP, Rodini Cde O, Duarte MA, Oliveira TM. Rat subcutaneoustissue response to MTA Fillapex® and Portland cement. *Braz Dent J.* 2013;24(1):10-4. doi: 10.1590/0103-6440201302120. PMID: 23657406.

Marsi TCO, Ricci R, Toniato TV, Vasconcellos LMR, Elias CMV, Silva ADR, et al. Electrospun nanofibrous poly (lactic acid)/titanium dioxide nanocomposite membranes for cutaneous scar minimization. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 Dec 20;7:421. doi: 10.3389/fbioe.2019.00421. PMID: 31921824; PMCID: PMC6932955.

Neves JC, Mohallem NDS, Viana MM. Materiais autolimpantes: conceitos, propriedades e aplicações. *Rev Virtual Quim.* 2021;13(2):540-50. doi: 10.21577/1984-6835.20210003.

Oh SH, Kang SG, Kim ES, Cho SH, Lee JH. Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method. *Biomaterials.* 2003 Oct;24(22):4011-21. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00284-9. PMID: 12834596.

Peng Z, Zhao T, Zhou Y, Li S, Li J, Leblanc RM. Bone tissue engineering via carbon-based nanomaterials. *Adv Healthc Mater.* 2020 Mar;9(5):e1901495. doi: 10.1002/adhm.201901495. Epub 2020 Jan 24. PMID: 31976623.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020 Jul 14;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410. PMID: 32663219; PMCID: PMC7360023.

Pinho MAS, Pereira ISSO, Odo MEY, Eça LPM. Estudo histológico comparativo e controlado de fibras colágenas da pele humana após terapia celular com fibroblastos. *Surg Cosmet Dermatol* 2015;7(3):206-10. doi: <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.20157302>.

Rather HA, Jhala D, Vasita R. Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Oct;103:109761. doi: 10.1016/j.msec.2019.109761. Epub 2019 May 17. PMID: 31349418.

Rodrigues AC, da Silva EL, Quirino SF, Cuña A, Marcuzzo JS, Matsushima JT, et al. Ag activated carbon felt composite as electrode for supercapacitors and a study of three different aqueous electrolytes. *Mat Res* 2019;22(1):e20180530. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2018-0530>.

Rosina RC, Baroni S, Cavalcanti OA. Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade de filmes isolados de polimetacrilato contendo polissacarídeo da raiz de Lótus (*Nelumbo nucifera*). *Rev Bras Ciênc Farm.*2004;40(3). doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000300020>.

Ryu S, Lee C, Park J, Lee JS, Kang S, Seo YD, et al. Three-dimensional scaffolds of carbonized polyacrylonitrile for bone tissue regeneration. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014 Aug 25;53(35):9213-7. doi: 10.1002/anie.201403794. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25044682.

Santiago GS, Vasconcellos LMR. Guia de procedimentos gerais de experimentação – Biotério ICT [Internet]. São Jose dos Campos: SJC/UNESP [cited 2020 abr 16]. Available from: <https://www.ict.unesp.br/Home/sobreoict/departamentosedensino/biocienciasediagnosticobucal/laboratorios/bioterio-guia-procedimentos.pdf>

Silva EA. Avaliação do processo de intumescimento da montmorilonita na intercalação e liberação do fármaco olanzapina ratos [dissertação]. Recife:Universidade Federal de Pernambuco; 2018 [2020 mar 23]. Available from: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/32965/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20Edson%20Alves%20da%20Silva.pdf>

Tzoneva R, Faucheux N, Groth T. Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-cell adhesions. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Nov;1770(11):1538-47. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.07.008. Epub 2007 Jul 24. PMID: 17804166

Zhang J, Tancret F, Bouler JM. Fabrication and mechanical properties of calcium phosphate cements (cpc) for bone substitution *Mater Sci Eng C.* 2011;31(4):740-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.10.014>.

Zhang C, Salick MR, Cordie TM, Ellingham T, Dan Y, Turng LS. Incorporation of poly(ethylene glycol) grafted cellulose nanocrystals in poly(lactic acid) electrospun nanocomposite fibers as potential scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci*

Eng C Mater Biol Appl. 2015 Apr;49:463-71. doi: 10.1016/j.msec.2015.01.024. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25686973.

Zhao M, Zhou J, Li X, Fang T, Dai W, Yin W, et al. Repair of bone defect with vascularized tissue engineered bone graft seeded with mesenchymal stem cells in rabbits. *Microsurgery*. 2011 Feb;31(2):130-7. doi: 10.1002/micr.20854. Epub 2011 Jan 25. PMID: 21268110.

ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 14/2020, intitulado:- **Fibra de carbono ativado:- Caracterização e avaliação da resposta inflamatória em ratos**, sob a responsabilidade de **ANDREA CARVALHO DE MARCO**, tendo como colaboradores:- Clarissa Carvalho Martins Maciel, Kauê Alberto Pereira, Leticia Cavassini Torquato e Eduardo Antonio Chelin Suárez, 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 19/11/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	11/12/2020 a 10/12/2021
Espécie/linhagem/raça	Ratos Heterogênico Wistar
Nº de Animais	12 ratos
Peso/Idade	90 dias / 300 grs.
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

COMPROMISSOS:-

Relatório científico	PERÍODO	ENVIO PARA A CEUA
PARCIAL	11/12/2020 a 11/06/2021	28/06/2021
FINAL	12/06/2021 a 10/12/2021	10/01/2022

Obs:- 01) O não cumprimento dos prazos já está implicando na impossibilidade de análise de novos protocolos pela CEUA/ICT_CSJC, caso não haja solicitação de prorrogação do prazo para entrega do relatório, com justificativa.

02) Será enviado via Secretaria da CEUA-ICT-CSJC-UNESP, aviso de alerta para envio do RC

São José dos Campos, 19 de novembro de 2020


Prof. Dra. CRISTIANE YUMI KOGA ITO
 Vice-Coordenadora em exercício