



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

JOYCE RODRIGUES DE SOUZA

**BIOMATERIAL POLIMÉRICO OBTIDO POR
ELETROFIAÇÃO: nanofibras de ácido polilático
incorporadas de biovidro dopado com estrôncio e cobalto**

JOYCE RODRIGUES DE SOUZA

**BIOMATERIAL POLIMÉRICO OBTIDO POR ELETROFIAÇÃO:
nanofibras de ácido polilático incorporadas de biovidro dopado com
estrôncio e cobalto**

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 dentária. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de biomateriais e novas tecnologias em odontologia.

Orientador: Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

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).

Souza, Joyce Rodrigues de
Biomaterial polimérico obtido por eletrofiação: nanofibras de ácido polilático incorporadas de biovidro dopado com estrôncio e cobalto / Joyce Rodrigues de Souza. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
87 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
Coorientadora: Renata Falchete Do Prado

1. Biomaterial. 2. Engenharia tecidual. 3. Nanofibras. 4. Regeneração óssea. I. Borges, Alexandre Luiz Souto, orient. II. Prado, Renata Falchete Do, 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. Alexandre Luiz Souto Borges (Orientador)

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

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Andréa Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 04 de março de 2021.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **José Machado** e **Ana Maria Brandão** pelo amor, exemplo e dedicação. Se eu cheguei até aqui, foi por ter vocês me apoiando em tudo, meu sucesso sempre será de vocês. Eu amo vocês.

As minhas irmãs **Jaqueline Rodrigues** e **Júlia Rodrigues**, obrigada pelo amor, carinho e torcida, eu as amo infinitamente.

Ao meu namorado **Lucas Barioni**, obrigada por todo incentivo e carinho, tudo ficou mais leve com você.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – ICT UNESP e ao programa de pós-graduação em odontologia restauradora.

Ao meu orientador **Prof Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges**, sou grata pela oportunidade e por todo incentivo e carinho que teve comigo ao longo da minha pós graduação e iniciação científica. Sempre foi um grande incentivador da pesquisa e exemplo de excelente profissional e ser humano.

À minha querida amiga e companheira de pós-graduação **Elisa Camargo Kukulka**, sou imensamente grata pela oportunidade de trabalhar com você e ter seu apoio em todas as etapas do trabalho, você foi essencial nessa trajetória, que sorte a minha em ter a sua amizade.

Ao **Prof. Tiago Campos**, muito obrigada por ser esse grande incentivador da pesquisa e por não medir esforços em ensinar. Sou muito grata pela oportunidade de trabalhar com você.

À minha coorientadora **Profa. Renata Falchete**, muito obrigada por toda ajuda e carinho que teve comigo ao longo da minha pós graduação.

À minha querida amiga **Juliani Ribeiro**, muito obrigada por aceitar o desafio de trabalhar comigo, você nunca mediu esforços para me ajudar e sempre preocupada em que eu compreendesse todos os testes, serei eternamente grata por tudo o que eu pude aprender com você.

À **Profa. Luana Marotta**, pelo apoio no desenvolvimento das atividades biológicas, sou imensamente grata pela oportunidade e por toda a ajuda.

À **Laís Morandini**, que sempre acreditou no meu potencial e ajudou de diversas formas, pelo incentivo e por todo o conhecimento que transmitiu para mim.

À minha querida amiga **Profa. Lilian de Siqueira**, serei eternamente grata por me ensinar tanto e por cada palavra motivadora ao longo desses dois anos, você é um exemplo de profissional e ser humano.

À minha aluna de iniciação científica **Sarah Andria**, por ter me proporcionado a oportunidade de aprender com você e pela confiança que teve em mim.

À minha banca do EGQ e defesa, **Profa. Dra. Tabata Sato, Prof. Assoc. Tarcísio Paes Júnior, Profa. Dra. Andréa de Marco e Prof. Dr. Fábio Matuda**, que aceitaram prontamente o meu convite para compor a banca e por serem para mim exemplos de excelentes profissionais.

À todos os meus colegas de pós-graduação pelo companheirismo e ajuda ao longo desses anos, vocês tornaram tudo mais fácil.

Aos colegas da Seção Técnica de Pós-Graduação, pela paciência e ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Prótese Dentária, **Fernando Carlos, Lilian Vilela e Marco Alfredo**, e à **Juliane Damasceno** do departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, pelo carinho e ajuda, vocês foram essenciais.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 01/03/19 a 28/02/21.

"O maior bem do homem é uma mente inquieta". Isaac Asimov

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 11 |
| RESUMO | 12 |
| ABSTRACT | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 Engenharia de tecidos | 19 |
| 2.2 Eletrofição | 20 |
| 2.3 Biopolímeros | 21 |
| 2.4 Biovidro | 22 |
| 2.5 Agentes terapêuticos | 22 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 24 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 4.1 Materiais utilizados | 25 |
| 4.2 Síntese de biovidros | 26 |
| 4.2.1 Síntese de biovidro rota Sol-Gel com Precipitação (P) | 26 |
| 4.2.2 Síntese de biovidro P dopado com cobalto | 28 |
| 4.2.3 Síntese de biovidro dopado com estrôncio | 29 |
| 4.3 Preparo das soluções | 30 |
| 4.3.1 Solução de PLA | 30 |
| 4.3.2 Solução de PLA/Biovidro (PLA-P) | 31 |
| 4.3.3 Solução de PLA/Biovidro P dopado com íons terapêuticos | 31 |
| 4.4 Síntese de nanofibras e obtenção <i>scaffolds</i> PLA/Biovidro | 33 |
| 4.5 Testes para caracterização das nanofibras | 35 |
| 4.5.1 Análise em microscópio eletrônico de varredura MEV-FEG | 35 |
| 4.5.2 Análise de diâmetro médio das fibras | 36 |
| 4.5.3 Análise de molhabilidade utilizando a técnica de ângulo de contato .. | 37 |

| | |
|---|----|
| 4.5.4 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) | 37 |
| 4.5.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) | 38 |
| 4.5.6 Difratomia de Raios X (DRX) | 38 |
| 4.5.7 Espectroscopia Raman | 38 |
| 4.5.8 Granulometria por difração a laser..... | 39 |
| 4.6 Ensaio biológico <i>in vitro</i> | 40 |
| 4.6.1 Isolamento celular | 40 |
| 4.6.2 Protocolo de lavagem e esterilização dos <i>scaffolds</i> | 42 |
| 4.6.3 Adesão Celular | 43 |
| 4.6.4 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade) | 43 |
| 4.6.5 Conteúdo de proteína total..... | 45 |
| 4.6.6 Atividade de fosfatase alcalina..... | 45 |
| 4.6.7 Formação de nódulos de mineralização | 46 |
| 5 ESTATÍSTICA | 47 |
| 6 RESULTADO | 48 |
| 6.1 Análises morfológicas e físico-químicas | 48 |
| 6.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) | 48 |
| 6.1.2 Análise do diâmetro médio de fibras | 53 |
| 6.1.3 Análise de ângulo de contato..... | 54 |
| 6.1.4 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) | 55 |
| 6.1.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) | 58 |
| 6.1.6 Difrátômetro de Raios X (DRX) | 59 |
| 6.1.7 Espectroscopia Raman | 60 |
| 6.1.8 Granulometria por difração a laser..... | 62 |
| 6.2 Ensaio biológico <i>in vitro</i> | 63 |
| 6.2.1 Adesão celular..... | 63 |

| | |
|---|-----------|
| 6.2.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade) | 65 |
| 6.2.3 Conteúdo de proteína total..... | 66 |
| 6.2.4 Atividade de fosfatase alcalina (ALP) | 67 |
| 6.2.5 Formação de nódulos de mineralização | 68 |
| 7 DISCUSSÃO..... | 71 |
| 8 CONCLUSÃO | 76 |
| REFERÊNCIAS..... | 77 |
| ANEXO..... | 87 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| ALP | Fosfatase Alcalina |
| DCC | Distância do capilar ao coletor |
| DMF | Dimetilformamida |
| DMSO | <i>Dimethyl sulfoxide</i> |
| DRX | Difratometria de Raios X |
| EDS | Espectroscopia de Energia Dispersiva |
| FTIR | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier |
| MEV-FEG | Microscópio Eletrônico de Varredura |
| MTT | Brometo de 3-4,5- dimetiltiazol |
| P | Biovidro Precipitado |
| P+Co | Biovidro Precipitado dopado com cobalto |
| P+Sr | Biovidro Precipitado dopado com estrôncio |
| PBS | Tampão fosfato |
| PLA | Ácido Polilático |
| PLA-P | Solução de PLA e biovidro precipitado |
| PLA-P+Co | Solução de PLA e biovidro precipitado dopado com cobalto |
| PLA-P+Sr | Solução de PLA e biovidro precipitado dopado com estrôncio |

De Souza JR. Biomaterial polimérico obtido por eletrofição: nanofibras de ácido polilático incorporadas de biovidro dopado com estrôncio e cobalto [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

O desenvolvimento de biomateriais em nanoescala associado a polímeros vem crescendo com o passar dos anos, devido a suas características estruturais importantes para aplicações em sistemas biológicos. O presente estudo teve como finalidade sintetizar um novo biovidro pela rota sol-gel dopado com Sr e Co, e desenvolver fibras de PLA associadas ao biovidro para regeneração tecidual óssea. O biovidro foi preparado pela rota sol-gel nas proporções: 60% de SiO₂; 36% de CaCl₂ e 4% de P₂O₅, e dopado com os íons cobalto e estrôncio. Após, foram preparadas soluções de PLA e acrescentado 4% de biovidro puro ou dopado com 5% de estrôncio ou cobalto, resultando assim em quatro grupos: controle (somente PLA); PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr. Os espécimes obtidos tiveram suas características morfológicas e físico-químicas analisadas por microscópio eletrônico de varredura, análise do diâmetro médio de fibras, análise do ângulo de contato, espectroscopia de energia dispersiva, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; difratometria de Raios X, espectroscopia de Raman e granulometria por difração a laser. Os testes *in vitro* para caracterização biológica foram feitos com culturas de células mesenquimais oriundas de fêmures de 9 ratos, cultivadas em meio de cultura total suplementado osteogênico, após indução de diferenciação osteoblástica foram realizadas a análise da viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina, quantificação de conteúdo de proteína total e visualização de nódulos de mineralização. Como resultados foi observado que houve a efetiva incorporação dos íons na estrutura do biovidro, sendo o vidro nitrato *free*, com partículas em dimensões nanométricas e clorado. Quanto às análises biológicas todos os grupos apresentaram viabilidade celular, não houve diferença estatística significativa em relação aos demais testes para todos os grupos analisados. Foi possível desenvolver *scaffolds* de PLA/Biovidro dopado com íons sem citotoxicidade, sendo um possível material para aplicação na engenharia tecidual.

Palavras-chave: Biomaterial. Engenharia tecidual. Nanofibras. Regeneração óssea.

De Souza JR. Polymeric biomaterial obtained by electrospinning: polylactic acid nanofibers incorporated with bioglass doped with strontium and cobalt [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

The development of nanoscale biomaterials associated with polymers has grown over the years, due to its important structural characteristics for applications in biological systems. The present study aimed to synthesize a new bioglass of composition 58s doped with Sr and Co, and to develop PLA fibers associated with the bioglass for bone tissue regeneration. The bioglass was prepared by the sol-gel route in the proportions: 60% SiO₂; 36% CaCl₂ and 4% P₂O₅, and doped with cobalt and strontium ions. Afterwards, PLA solutions were prepared and 4% pure or doped bioglass with 5% strontium or cobalt was added, thus resulting in four groups: control (PLA only); PLA-P, PLA-P + Co and PLA-P + Sr. The obtained specimens had their morphological and physicochemical characteristics analyzed by scanning electron microscope, analysis of the average fiber diameter, contact angle analysis, dispersive energy spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy; X-ray diffraction, Raman spectroscopy and laser diffraction granulometry. The in vitro tests for biological characterization were performed with cultures of mesenchymal cells from femurs of 9 rats, cultured in total supplemented osteogenic culture medium, after induction of osteoblastic differentiation, cell viability analysis, alkaline phosphatase activity, quantification of total protein content and visualization of mineralization nodules. As a result, it was observed that there was an effective incorporation of ions in the structure of the bioglass, the glass being nitrate free, with particles in nanometric dimensions and chlorinated. As for biological analyzes, all groups showed cell viability, there was no statistically significant difference in relation to the other tests for all groups analyzed. It was possible to develop PLA/Bioglass scaffolds doped with ions without cytotoxicity, being a possible material for application in tissue engineering.

Keywords: Biomaterial. Tissue engineering. Nanofibers. Bone regeneration.

1 INTRODUÇÃO

Na odontologia, doenças periodontais comprometem as estruturas de suporte e sustentação do dente resultando na perda de tecido mole e tecido ósseo, levando a uma possível extração do elemento dentário, que pode levar à um colapso dos tecidos no local da extração, inibindo a formação de tecido ósseo e sua regeneração. O comprometimento ósseo pode resultar em complicações biológicas em tratamentos com implantes dentários, ou até mesmo resultar na impossibilidade desse tratamento (Pihlstrom et al., 2005; Sarmast et al., 2017).

Neste sentido, a necessidade de novos materiais aptos a serem utilizados para regeneração óssea tem impulsionado novas pesquisas para elaboração de biomateriais na área de engenharia tecidual (Dawson et al., 2019; Vas et al., 2017). Dessa forma, o uso de membranas reabsorvíveis produzidas a partir de biomateriais, como o Ácido Polilático (PLA), surgem como uma opção ao processo de reparação de tecido ósseo formando um arcabouço de condução óssea (Xu et al., 2017).

Biomateriais devem apresentar características que os tornem compatíveis com o corpo humano, nesse contexto, estes são tidos como qualquer substância (que não seja um fármaco) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que podem ser utilizadas por um período de tempo, como um todo ou parte de um sistema que trata, regenera ou substitui qualquer tecido, órgão ou função corpórea (Chen et al., 2016; Williams, 2009).

A confecção de biomateriais poliméricos em nanoestrutura tem se mostrado promissora, devido a possibilidade de diversas aplicações como liberação controlada de fármaco, engenharia de tecidos, cicatrização, reparação e regeneração tecidual (Boudriot et al., 2006; Greiner, Wendorff, 2007). Com isso, nanofibras de materiais poliméricos vem ganhando notoriedade devido a possibilidade de confecção de arcabouços estimuladores de fixação e diferenciação celular.

As nanofibras são fibras em escala nanométrica que apresentam características estruturais importantes para aplicações em sistemas biológicos, uma vez que possuem alta área superficial, alta porosidade, excelentes propriedades mecânicas e podem participar na confecção de estruturas 3D (Greiner, Wendorff, 2007; Huang et al., 2003; Sedghi et al., 2020). Dentre os métodos utilizados para fabricação de fibras poliméricas, destaca-se o método da eletrofiação (Jun et al., 2003).

Essencialmente, o processo de eletrofiação é observado quando um campo elétrico age sobre uma solução polimérica ou polímero fundido (Greiner, Wendorff, 2007; Huang et al., 2003; Reneker, Chun, 1996). Para tanto, o método de eletrofiação é um sistema constituído por um anteparo coletor, uma seringa com um capilar metálico, uma bomba de infusão e uma fonte de alta tensão contínua (Huang et al., 2003).

A dimensão e a forma das fibras eletrofiadas dependem de algumas variáveis (Boudriot et al., 2006), tais como: parâmetros ambientais, como temperatura e umidade relativa do ar, parâmetros do processo de eletrofiação, como amplitude da tensão elétrica, distância do capilar ao coletor (DCC) e razão de fluxo, e parâmetros da solução, como a viscosidade, tensão superficial e o tipo de polímero utilizado (Deitzel et al., 2001; Doshi, Reneker, 1995; Greiner, Wendorff, 2007).

Um polímero utilizado para fabricação de nanofibras em engenharia tecidual é o PLA, biopolímero sintético derivado do monômero natural l-láctico, biodegradável e biocompatível, que apresenta como vantagem ser adequado para aplicações que necessitam suportar carga, como suturas e fixações ortopédicas (Dhar, Katiyar, 2017; Ruiz et al., 2009). Esse biopolímero é amplamente utilizado para fabricação de arcabouços ósseos biodegradáveis, visto que apresenta uma formação micro-porosa que permite um ambiente adequado para crescimento celular devido a suas propriedades físicas (Li et al., 2019; Lin et al., 2018; Xu et al., 2017).

Nesse sentido, as nanofibras de PLA podem ser associadas a outras substâncias, agregando novas características e propriedades de interesse para aplicação em engenharia tecidual e regeneração óssea, como uma superfície de maior capacidade de adesão e proliferação de células (Boudriot et al., 2006; Xu et al., 2017).

Os biovidros, grupo de biomateriais sintéticos de vitro cerâmica à base de sílica (Cao, Hench, 1996; Kaur et al., 2014), podem ser utilizados associados ao Ácido Poliláctico, visto que, tal material pode melhorar as propriedades mecânicas do polímero, uma vez que essa composição polímero/biovidro, teria maior estabilidade mecânica da fase cerâmica e boa tenacidade plástica devido ao polímero (Costa et al., 2007).

Ademais, o vidro bioativo apresenta alta biocompatibilidade e possui grande capacidade de ligação ao osso, o que se deve a sua reatividade química em fluidos fisiológicos, resultando na formação de uma camada de hidroxiapatita, à qual o osso é capaz de se ligar (Singh et al., 2019; Wu et al., 2013). Dessa forma, o biovidro pode ser utilizado para aumentar a taxa de cicatrização óssea em defeitos ósseos e fraturas, sendo um biomaterial amplamente estudado para aplicações médicas e odontológicas, devido sua biocompatibilidade e osteocondutividade (Moghanian et al., 2018; Wu et al.,

2008).

O biovidro obtido pela rota sol-gel tem potencial de estimular a expressão gênica e a resposta celular que é necessária para proliferação tecidual (Han et al., 2007), além de apresentar uma maior bioatividade e potencial osteogênico, devido suas características físico-químicas, em relação aos vidros obtidos por fusão (Sepulveda et al., 2002).

O biovidro pode ser dopado com íons terapêuticos, tais como os íons divalentes estrôncio e cobalto (Wu, Chang, 2014). O estrôncio (Sr^{2+}) possui uma excelente capacidade de se ligar a fase mineral da hidroxiapatita, possui um mecanismo de ação que aumenta a proliferação pré-osteoblástica tipo I e mineralização da matriz óssea, além de inibir a proliferação e ativação dos osteoclastos (Pilmane et al., 2017; Wu et al., 2015). No trabalho de Wu et al. (2008), o estrôncio promoveu proliferação celular e angiogênese de forma aumentada em relação ao grupo controle. Também foi capaz de diminuir a reabsorção óssea e melhorar a formação óssea (Buehler et al., 2001; Canalis et al., 1996).

O cobalto, é um elemento fundamental na fisiologia humana, uma vez que é integrante da vitamina B12 (Li et al., 2003). O íon cobalto (Co^{2+}) é um indutor químico de HIF-1 α que desencadeia uma resposta semelhante a hipóxia, dessa forma, o fator de crescimento endotelial vascular é ativado levando à um resposta neovascularização, e em nanoescala pode aumentar a angiogênese e osteogênese *in vivo* (Lin et al., 2018; Wu et al., 2012). Além disso, o íon cobalto apresenta propriedades antimicrobianas, uma vez que interage no mecanismo de difusão de ferro reduzindo a disponibilidade e absorção de íons férricos pelas células bacterianas (Wu et al., 2012). Zheng et al. (2019), em estudo de biocerâmica dopada com íon cobalto, comprovaram a viabilidade de neovascularização óssea (Zheng et al., 2019).

Com isso, o biovidro obtido pela rota sol-gel dopado com estrôncio e cobalto, tem como finalidade combinar a estabilidade mecânica favorável do vidro com os benefícios biológicos já documentados do estrôncio e cobalto (Bellucci et al., 2018; Shi et al., 2019). A partir da atual demanda por biomateriais em engenharia de tecidual, o presente estudo se faz importante devido sua investigação quanto a compósitos de nanofibras de PLA associadas ao biovidro dopado com estrôncio e cobalto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos visa integrar princípios médicos, biológicos e de engenharia para tratar tecidos danificados por meio de substitutos funcionais artificiais semelhantes ao tecido/órgão (Fathi-Achachelouei et al., 2019; Langer, Vacanti, 1993; Vieira et al., 2017). A engenharia tecidual combina três elementos essenciais – *Scaffolds* (estrutura que dá suporte para o crescimento celular); fonte de células e fatores de crescimento (para que haja diferenciação celular e crescimento das células formando o novo tecido/órgão) (Vieira et al., 2017).

Um dos maiores desafios para a engenharia de tecidos é a regeneração tecidual óssea, visto que o tecido ósseo apresenta alta complexidade anatômica e sofre alto estresse mecânico. Dessa forma, a nanotecnologia se faz importante para desenvolver estruturas de dimensões iguais aos encontrados no tecido ósseo e dessa forma aprimorar propriedades mecânicas (Kim et al., 2014), de osteoindução, osteocondução e osteointegração (Laschke et al., 2010; Qian et al., 2014).

Na odontologia, doenças periodontais, endodônticas e sequelas cirúrgicas (Daubert et al., 2020; Kim et al., 2018) são responsáveis por acometer tecidos de suporte e proteção dos elementos dentários, podendo resultar na perda desse elemento (Shi et al., 2018). Além das doenças periodontais, outros motivos podem levar a uma perda dentária, como a doença cárie e traumatismo dentário, e conseqüentemente pode ocorrer uma perda óssea e atrofia da crista óssea alveolar (Jordan, 2004; Pihlstrom et al., 2005).

2.2 Eletrofiação

Dentre os métodos utilizados para fabricação de fibras, destaca-se a técnica de eletrofiação que é um método versátil e viável. A eletrofiação é um método constituído de quatro elementos: Uma fonte de alta tensão; uma bomba de infusão, uma seringa com capilar metálico e um anteparo coletor (Greiner, Wendorff, 2007; de Souza et al., 2017).

Na seringa é colocada a solução polimérica ou polímero fundido, a fonte de alta tensão cria um campo elétrico que agirá sobre a solução polimérica/polímero fundido dentro da seringa (Ahmed et al., 2015), e com o aumento da tensão elétrica, a superfície da solução polimérica na ponta do capilar metálico se alonga adquirindo uma forma cônica, devido a repulsão eletrostática das cargas da superfície, conhecida como Cone de Taylor (Taylor, Dyke, 1969).

Pela ação da bomba infusora e do campo elétrico, a solução polimérica/polímero fundido percorre a seringa e inicialmente o jato se estende de forma linear e posteriormente sofre movimentos de chicoteamento, devido à instabilidade de flexão, e quando a tensão superficial é vencida, (Ahmed et al., 2015; Taylor, Dyke, 1969) jatos poliméricos são ejetados em direção ao coletor, e com a evaporação do solvente são coletadas nanofibras sólidas (Cloupeau, Prunet-Foch, 1990; Doshi, Reneker, 1995).

No entanto, os parâmetros relacionados ao processo, meio e solução polimérica, podem levar a modificações na conformação das fibras eletrofiadas, como diâmetro e formação de defeitos (de Souza et al., 2017).

2.3 Biopolímeros

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).

Os biopolímeros como suporte para crescimento celular vem ganhando destaque na engenharia de tecidos, devido aos benefícios que esses materiais apresentam, podendo desenvolver papel de arcabouço para suporte celular e levar a regeneração de tecidos e órgãos (Kellomäki, Törmälä, 2004). Dessa forma, o material polimérico é desenvolvido de forma a suportar mecanicamente as células, e o polímero é degradado e reabsorvido gradualmente, permitindo espaço para proliferação celular e formação de tecido (Sahana, Rekha, 2018).

O Ácido Polilático (PLA), é um biopolímero muito utilizado em engenharia tecidual, devido suas propriedades favoráveis de biodegradabilidade e biocompatibilidade, esse polímero vem sendo bastante explorado, não só na engenharia de tecidos como também nas áreas farmacêutica, alimentícia, agricultura, dentre outras (Mirzaei et al., 2017).

O PLA é uma escolha viável para fabricação de material para regeneração tecidual. Com o PLA é possível confeccionar nanofibras pelo método de eletrospinning e, a esse polímero podem ser associadas outras substâncias, agregando novas características e propriedades de interesse, como uma superfície de maior capacidade de adesão, proliferação e diferenciação celulares.

2.4 Biovidro

Os vidros bioativos são biomateriais que apresentam em sua composição, principalmente, óxidos de cálcio e de silício. Existem diferentes tipos de biovidros com variadas composições; como exemplo tem-se o biovidro 45S5 (45% SiO₂) e 58S (58% SiO₂) (Moghanian et al., 2018).

O biovidro 58S apresenta em sua composição SiO₂, CaO e P₂O₅, é obtido pelo método Sol-Gel, que proporciona a esse biovidro um maior teor de silício e cálcio o que favorece a formação de apatita na superfície desse vidro, fazendo com que esse biomaterial tenha melhores propriedades bioativas que o 45S5, obtido pelo método fusão (Balamurugan et al., 2006; Huang et al., 2014; Moghanian et al., 2018; Saravanakumar et al., 2011).

Além de biocompatíveis e bioabsorvíveis, os vidros bioativos apresentam uma excelente ligação com os tecidos devido a sua reatividade química em fluidos teciduais, visto que esse biomaterial possui a capacidade de formar uma camada de apatita quando em contato com fluidos biológicos (Catteaux et al., 2013).

Dessa forma, os vidros bioativos são utilizados em engenharia tecidual para regeneração óssea, uma vez que esse biomaterial apresenta semelhança ao tecido natural e induz a regeneração óssea (Balamurugan et al., 2006).

2.5 Agentes terapêuticos

Íons metálicos, como o cobalto, cobre, gálio, ferro, manganês, prata, estrôncio, vanádio e zinco, apresentam características interessantes para utilização como agentes terapêuticos em *scaffolds* com finalidade de regeneração tecidual, uma vez que possuem a vantagem de apresentar estabilidade e interação com outros íons que podem alterar as funções biológicas (como ativação de canais iônicos e ligação a macromoléculas), essas ações dos íons metálicos, podem fornecer efeitos distintos aos alcançados através de outras manipulações químicas, genéticas ou bioquímicas (Mouriño et al., 2012).

Os íons estrôncio e cobalto são íons divalentes com propriedades de regeneração tecidual óssea. Esses íons podem ser dopados ao biovidro para aumentar a capacidade de regeneração óssea desse biomaterial.

O estrôncio é um íon que tem a capacidade de aumentar a retenção de cálcio no organismo e impedir a reabsorção óssea, sendo, portanto, utilizado para prevenir e reduzir a perda óssea (Anupama et al., 2016). Estudos demonstraram que o estrôncio é capaz de aumentar a atividade dos osteoblastos, enquanto inibe a diferenciação de osteoclastos (Bonnelye et al., 2008; Marie, 2005).

O Cobalto é um elemento essencial para os humanos, uma vez que apresenta diversas funções biológicas. Esse íon apresenta a capacidade de estabilizar a HIF-1 α (Fator 1-alfa induzível por hipóxia) promovendo uma condição que se assemelha a hipóxia, levando a um acoplamento da angiogênese a osteogênese, dessa forma resultando em uma neovascularização (Kulanthaivel et al., 2016).

Dessa forma, os íons terapêuticos podem ser associados ao biovidro 58S para favorecer a resposta tecidual durante a regeneração óssea.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

- Produzir e testar *scaffolds* poliméricos compostos por fibras de PLA associados a um novo biovidro obtido pela rota sol-gel (clorado, nanoestruturado e nitrato *free*), dopado com íons terapêuticos estrôncio (Sr^{2+}) ou cobalto (Co^{2+}) para utilização em engenharia tecidual.

Objetivo específico:

- Realizar a caracterização físico/química e topográfica;
- Realizar a caracterização biológica quanto a citotoxicidade, adesão celular, viabilidade celular, proteína total, fosfatase alcalina e nódulo de mineralização óssea.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

Todos os materiais utilizados no presente estudo estão citados no quadro 1, assim como sua composição e o fabricante.

Quadro 1 - Materiais utilizados para obtenção dos espécimes

| Material | Fabricante | Composição |
|-------------------------------|--------------------|---------------------------|
| Acetato Cobalto II | Vetec Química | $C_4H_6CoO_4 \cdot 4H_2O$ |
| Ácido Polilático (PLA) | Nature Works | CH_3O_2 |
| Biovidro 58S | Fabricação Própria | $SiO_2, CaCl_2, P_2O_5$ |
| Cloreto de Estrôncio | Sigma - Aldrich | Co_3Sr |
| Clorofórmio | Synth | $CHCl_3$ |
| Dimetilformamida (DMF) | Sigma - Aldrich | $HCON(CH_3)_2$ |

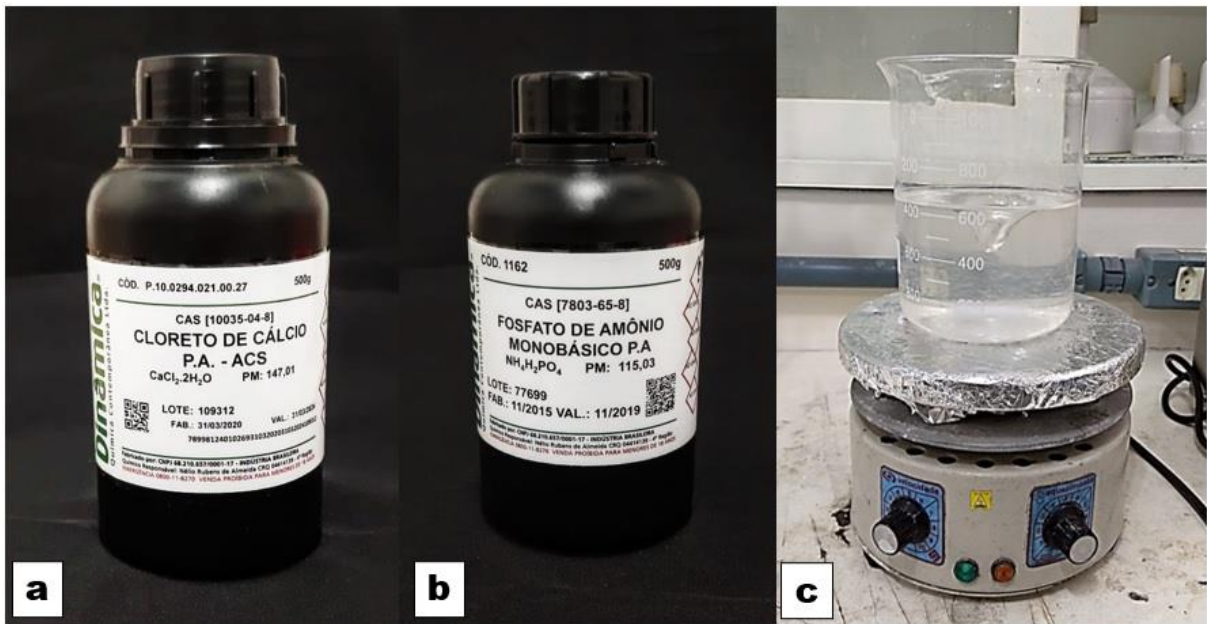
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Síntese dos biovidros

4.2.1 Síntese de biovidro obtido pela rota sol-gel com precipitação (P)

O biovidro foi preparado pela rota sol-gel nas proporções: 60% de SiO₂; 36% de CaCl₂, 4% de P₂O₅ (Silver et al., 2001). Inicialmente 6,16 g de cloreto de cálcio e 2,6 g de fosfato de amônio monobásico foi incorporado em 150 mL de ácido silícico e deixado sob agitação até total dissolução (Figura 1). Após, 150 mL de solução de bicarbonato de amônio em água (3 litros de água em 40 g de bicarbonato de amônio), foi adicionado à solução (para que ocorresse a precipitação do vidro) em temperatura ambiente, e agitado em ultrassom de ponteira para melhor homogeneização das partículas. A solução foi seca em estufa para geleificar por 12 horas a uma temperatura de 100°C e posteriormente sofreu processo de calcinação por 5 horas a uma temperatura de 500°C, após o biovidro foi triturado (Figura 2) e peneirado (peneira de 75 µm).

Figura 1 – Produção de biovidro com precipitação



Legenda: a) cloreto de cálcio; b) fosfato de amônio monobásico e c) cloreto de cálcio e fosfato de amônio monobásico + ácido silícico em agitador magnético.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 – Processo de trituração do biovidro

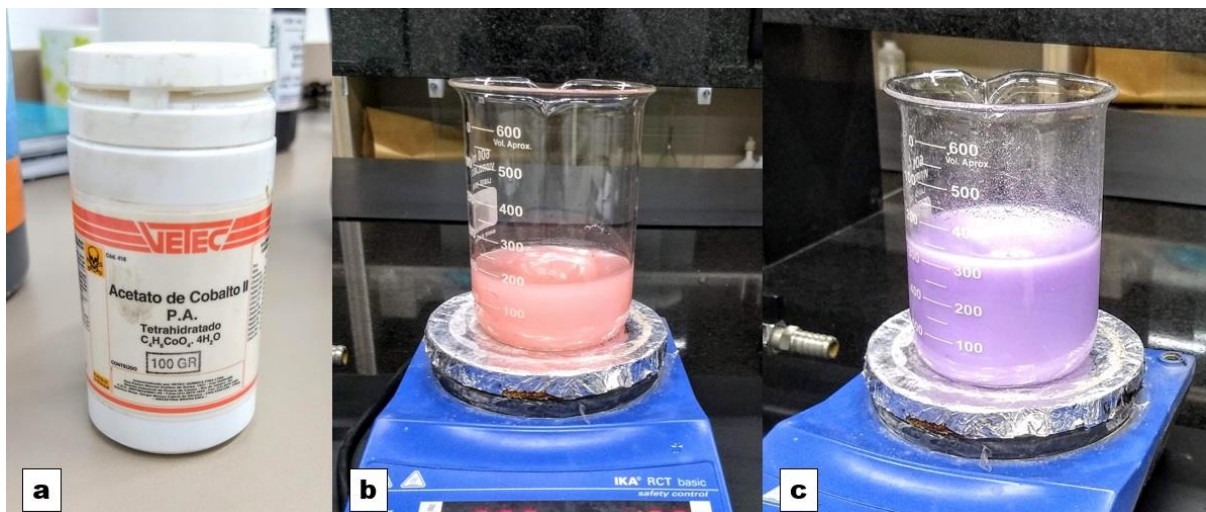


Legenda: a) biovidro geleificado e calcinado; b) maceração do biovidro; c) biovidro triturado peneirado em peneira de 75 μm .
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Síntese de biovidro P dopado com cobalto (P+Co)

Para o vidro P dopado com cobalto, a solução base de biovidro foi preparada e adicionado 5% (Wu et al., 2013) em massa de acetato de cobalto II e deixado sob agitação em temperatura ambiente até total dissolução. Após, 150 mL de solução de bicarbonato de amônio em água foi adicionado à solução para precipitação do vidro e deixado sob agitação em temperatura ambiente (Figura 3) e agitado em ultrassom de ponteira. A solução foi seca em estufa para geleificar por 12 horas a uma temperatura de 100°C e posteriormente sofreu processo de calcinação por 5 h a uma temperatura de 500°C, após, o biovidro foi triturado e peneirado (peneira de 75 μm).

Figura 3 – Biovidro dopado com cobalto



Legenda: a) acetato de cobalto II b) 5% de acetato de cobalto II + solução base de biovidro 58S, coloração rosa devido ao pH básico da solução; c) acetato de cobalto II + biovidro 58S + bicarbonato de amônio (acrescentado para precipitação do vidro, coloração roxa devido ao pH ácido da solução).




Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.3 Síntese de biovidro P dopado com estrôncio (P+Sr)

Já para o biovidro dopado com estrôncio, todo o processo de síntese de biovidro foi feito e após foi acrescentado 5% (Wu et al., 2015) em massa de cloreto de estrôncio e dissolvido em 150 mL de água destilada, deixado sob agitação em temperatura ambiente e agitado em ultrassom de ponteira para melhor homogeneização das partículas. A solução foi seca em estufa para geleificar por 12 horas a uma temperatura de 100°C e posteriormente sofreu processo de calcinação por 5 h a uma temperatura de 500°C, após, o biovidro foi triturado e peneirado (peneira de 75 µm).

Foram obtidos 3 diferentes biovidros, como ilustrado na figura 4.

Figura 4 – Biovidro e composição

| | Precipitado | Precipitado + Cobalto | Precipitado + estrôncio |
|-------------------|--|---|--|
| GRUPO |  |  |  |
| Composição | SiO ₂ , CaCl ₂ , P ₂ O ₅ , NH ₄ HCO ₃ | SiO ₂ , CaCl ₂ , P ₂ O ₅ , NH ₄ HCO ₃ +Acetato de cobalto II | SiO ₂ , CaCl ₂ , P ₂ O ₅ NH ₄ HCO ₃ +Cloreto de Estrôncio |

Legenda: Biovidros desenvolvidos no presente trabalho e sua composição

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Preparo das soluções

4.3.1 Solução de PLA

Uma solução a 7 % de PLA foi preparada dissolvendo-se 1,0 g de ácido polilático (PLA) em 7,5 mL de Clorofórmio, e deixado sob agitação constante (300 rpm) em temperatura ambiente até total dissolução do polímero. Após, foi incorporado 2,5 mL de dimetilformamida (DMF) a solução (para estabilidade da solução), e deixado sob agitação constante (300 rpm) em temperatura ambiente, durante 12 horas. Os materiais utilizados são ilustrados na figura 5.

Figura 5 – Preparo solução de PLA



Legenda: a) ácido polilático (PLA); b) clorofórmio; c) dimetilformamida (DMF).

Fonte: Elaborado pelo autor.

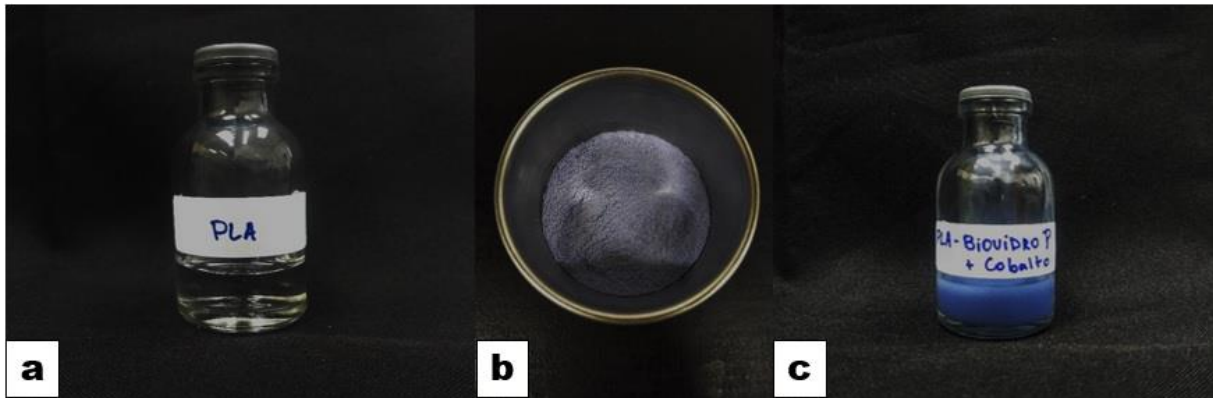
4.3.2 Solução de PLA/Biovidro (PLA-P)

Para solução de PLA/Biovidro, foi preparada uma solução de PLA pura, e após foi incorporado 4% em volume (30% em massa) de biovidro 58S precipitado (P) e então a solução foi deixado sob agitação constante em temperatura ambiente durante 24 horas, obtendo-se uma solução de PLA/Biovidro Precipitado (PLA-P)

4.3.3 Solução de PLA/Biovidro P e íons terapêuticos

Para solução de PLA/Biovidro dopado com cobalto e estrôncio, foi preparada uma solução de PLA pura, e após foi incorporado 4% em volume de biovidro 58S dopado com 5% de acetato de cobalto II (Vetec – Química) (Figura 6) ou 5% de cloreto de estrôncio (Sigma – Aldrich) e então a solução foi deixado sob agitação constante em temperatura ambiente durante 24 horas. As soluções obtidas são ilustradas na figura 7.

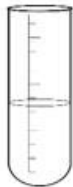
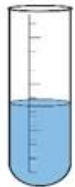
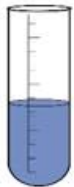

Figura 6 – Preparo solução de PLA/Biovidro P e Cobalto



Legenda: a) solução de PLA puro; b) biovidro P dopado com cobalto c) solução final de PLA/Biovidro P dopado com cobalto (PLA-P+Co).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Soluções obtidas no trabalho

| | PLA | PLA-P | PLA-P+Co | PLA-P+Sr |
|-------------------|---|---|---|---|
| GRUPO |  |  |  |  |
| Composição | 1 g PLA, 7,5 g CHCl ₃ e 2,5 g DMF | 1 g PLA, 7,5 g CHCl ₃ , 2,5 g DMF e 4% P | 1 g PLA, 7,5 g CHCl ₃ , 2,5 g DMF e 4% P-Co | 1 g PLA, 7,5 g CHCl ₃ , 2,5 g DMF e 4% P-Sr |

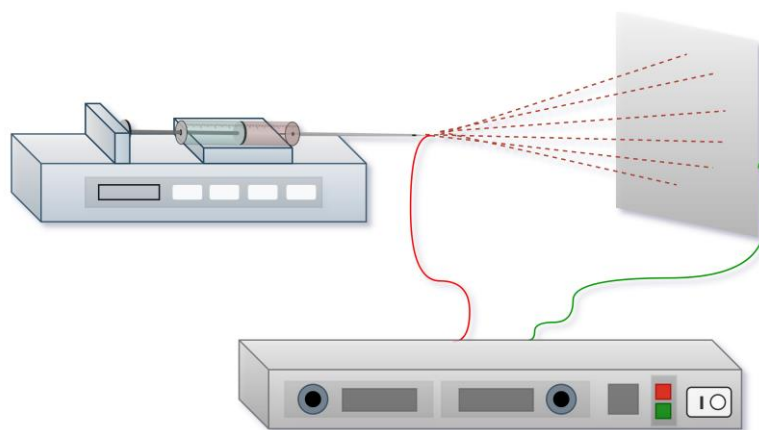
Legenda: Foram obtidas quatro soluções poliméricas no presente estudo, PLA (controle), PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Síntese de nanofibras e obtenção de *scaffolds* PLA/Biovidro

Para síntese das nanofibras foi utilizado o equipamento de eletrofiação (laboratório de Bioengenharia e Biomateriais do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos –UNESP), sendo sua estrutura composta por uma bomba de infusão, uma fonte de alta tensão, uma seringa plástica de 5 mL com capilar metálico e um anteparo coletor, como pode ser observado na figura 8. As soluções de PLA, PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr, foram colocadas, separadamente, em uma seringa de plástico com um capilar metálico (0,7 mm Ø) e submetidas ao processo de eletrofiação, sob os parâmetros: razão de fluxo de 0,7 mL h⁻¹, distância do capilar ao coletor de 10 cm e tensão elétrica de 15 kV.

Figura 8 - Sistema para processo de eletrofiação

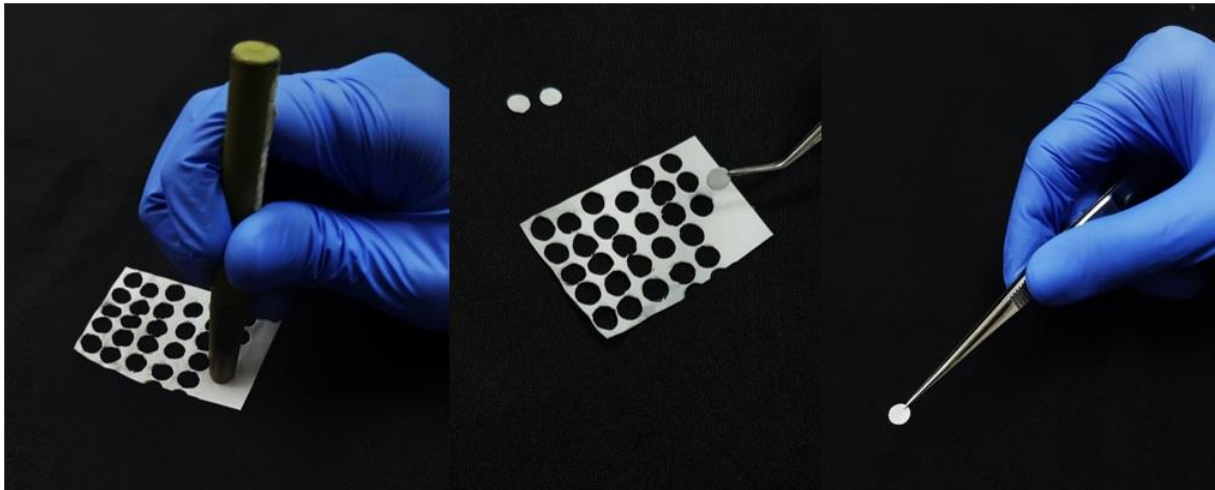


Legenda: Equipamento para eletrofiação, que consiste em uma bomba de infusão, uma seringa com capilar metálico, uma fonte de alta tensão e um anteparo coletor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

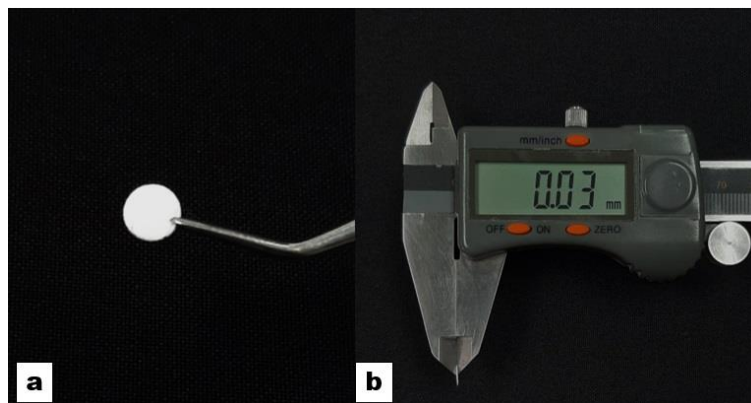
Os espécimes foram cortados com o auxílio de instrumento com bordas cortantes (*punch*) no diâmetro de 6 mm e espessura de 0,03 mm, figuras 9 e 10.

Figura 9 – Obtenção de *scaffolds*



Legenda: Obtenção de *Scaffold* com diâmetro de 6 mm.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – *Scaffold* PLA/Biovidro



Legenda: a) vista frontal do *scaffold*, b) evidenciação da espessura de 0,03 mm do *scaffold* com paquímetro digital.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Testes para caracterização das nanofibras

Os testes para caracterização das nanofibras foram realizados no laboratório de Bioengenharia e Biomateriais do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, laboratório de Materiais Dentários do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, laboratório Labmat do Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA, São José dos Campos, laboratório Lass do Instituto Nacional de Pesquisas Especiais – INPE, São José dos Campos e Laboratório NAPCEM – Núcleo de Apoio à Pesquisa e Ciência e Engenharia de Materiais, do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNIFESP.

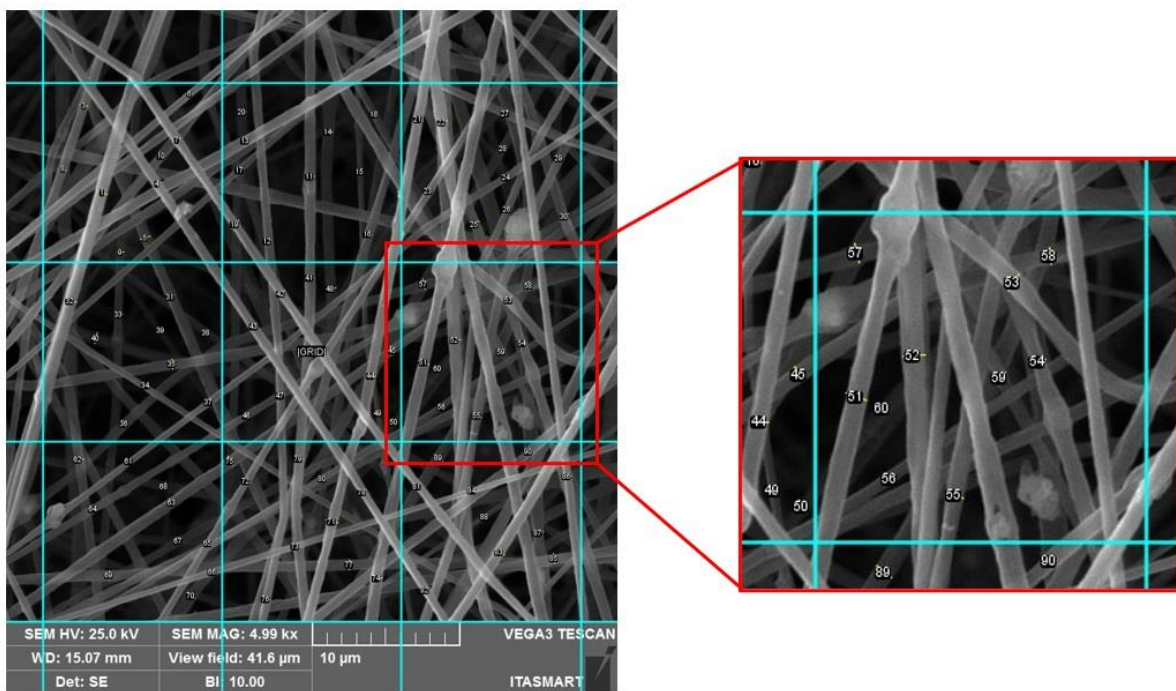
4.5.1 Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG)

A partir das amostras eletrofiadas foram obtidas imagens através do Microscópio Eletrônico de Varredura para análise da topografia superficial. Para isso, três amostras de cada grupo (PLA, PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr) foram posicionadas em uma plataforma de alumínio (stub), auxiliado por uma fita dupla face e metalizadas com uma fina camada de ouro, que foi depositado através de vaporização iônica (sputtering) na máquina metalizadora por 130s 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 secundário, projetados sobre a superfície da amostra; e também por meio do detector de elétron retro espalhado.

4.5.2 Análise de diâmetro médio das fibras

A morfologia estrutural e o diâmetro médio das nanofibras foram analisados por meio do software de análise de imagem ImageJ (Versão 1.44o, National Public of Health) por meio das micrografias obtidas a partir do MEV. Foram analisadas 3 micrografias por grupo (PLA, PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr) com 10 mensurações de diâmetro em 9 regiões distintas, sendo 90 análises para cada imagem (Figura 11).

Figura 11 – Análise do diâmetro das fibras em software de análise de imagem



Legenda: Micrografia obtida em MEV dividida em 9 quadrantes para mensuração do diâmetro das fibras, destaque para análise do diâmetro das fibras com numeração em cada mensuração.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.3 Análise de molhabilidade utilizando a técnica de ângulo de contato

Para a análise de molhabilidade, foram preparadas 3 amostras de cada grupo (PLA, PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr) e então o ângulo de contato das superfícies foi analisado por meio de um tensiômetro óptico (TL 1000 – Invoiced freight, Theta Lioe, Attension, Lichfield, Staffordshire, RU - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos –UNESP), onde uma seringa de vidro do sistema (Gastight Syringes #1001 – 1 mL, Hamilton, Reno, Nevada, EUA) deposita uma gota de água destilada sobre a superfície da amostra.

4.5.4 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para realização de análise qualitativa da composição química dos elementos químicos das nanofibras, 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). Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE, São José dos Campos.

4.5.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise da estrutura química da superfície das nanofibras foi realizada utilizando o espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Parkin-Elmer, modelo Spectrum GX - Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA, São José dos Campos) no modo UATR. Para tanto, foram preparadas duas amostras de cada grupo (PLA, PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr).

4.5.6 Difratometria de Raios X (DRX)

Para análise da fase cristalina dos compósitos duas amostras de cada grupo (PLA, PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr) foram preparadas no formato 3x3 cm e posicionadas no aparelho de DRX, (Shimadzu XRD 7000, radiação $\text{CuK}\alpha$, $2\theta = 20-80^\circ$, 30 mA, 40 kV). Instituto Tecnológico de Aeronáutica – ITA.

4.5.7 Espectroscopia Raman

Uma amostra de cada grupo de biovidro (P, P+Co e P+Sr) foi submetida à espectroscopia de Raman para análise da composição estrutural do vidro. As medições da espectroscopia Raman foram realizadas usando um modelo do sistema Renishaw 2000 (Horiba Scientific, Palaiseau France - Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA, São José dos Campos), equipado com um laser de íons de ar (514,5 nm).

4.5.8 Granulometria por difração a laser

Para determinar a distribuição e o tamanho médio das partículas de biovidro foi utilizado um analisador de tamanho de partículas de difração a laser (Delsa™ Nano, Beckman Coulter) Laboratório NAPCEM – Núcleo de Apoio à Pesquisa e Ciência e Engenharia de Materiais, do Instituto de Ciência e Tecnologia da Unifesp de São José dos Campos. As amostras foram preparadas na forma de suspensão (amostra + álcool isopropílico), e submetidas à agitação ultrassônica (Ultrassom de ponta, modelo VCX 500, Sonics) por 15 minutos para completa desaglomeração das partículas. A suspensão foi então inserida no equipamento e realizada a leitura.

4.6 Ensaio biológicos *in vitro*

4.6.1 Isolamento celular

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 14/2020, a fim de contemplar as diretrizes do CONCEA dos 3Rs (Cazarin et al., 2004).

A eutanásia de 9 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, Jacareí - Brasil), substância sedativa e relaxante muscular; e Cloridrato de Ketamina 100 mg/kg (Dopalen® – Vetbrands, Jacareí - Brasil) e administrada via intramuscular. Após confirmação da instalação da anestesia, os animais foram submetidos ao procedimento de decapitação por guilhotina.

Em seguida, foi realizada a técnica de isolamento de células da medula óssea de fêmures conforme descrita previamente por 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 fluxo laminar tendo as epífises removidas e a diáfise lavada com 20 mL de meio de cultura suplementado composto por meio 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, o conteúdo das lavagens contendo as células foi inserido em frascos para cultura de 25 mL e 75 cm² (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil) para o cultivo. Essas células foram mantidas em estufa a uma temperatura de 37°C com umidade atmosférica contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi renovado a cada 48 horas e foi realizada a seleção das células mesenquimais pela sua capacidade de adesão ao poliestireno, sendo expandidas até atingirem mais de 80% de confluência.

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 ressuspendidas em meio alfa MEM e distribuídas nos poços das placas de 96 poços contendo as amostras. Foi realizado o plaqueamento celular com 10.000 células/poço, após a contagem celular realizada utilizando a câmara de Neubauer. Previamente as amostras foram colocadas nos poços e acrescentado meio de cultura, até a obtenção do volume final de 200 µl. O meio de cultura utilizado para o plaqueamento celular foi o meio de cultura osteogênico, o qual adicionalmente a suplementação, tem 5 mg/mL de ácido ascórbico (Neon) e 2,16 g de beta glicerofosfato (Sigma-

Aldrich ref 50020). 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 Microimaging 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 triplicata, sendo que cada triplicata teve um *pool* de células provenientes dos fêmures 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).

4.6.2 Protocolo de lavagem e esterilização dos *scaffolds* para ensaio biológico

Para evitar que as amostras flutuassem no meio de cultura (devido à alta hidrofobicidade dos *scaffolds*) e que houvesse contaminação, previamente a cultura celular, todas as amostras foram cortadas com auxílio de um *punch* e submetidas à um protocolo de lavagem e esterilização.

Após cortadas, as amostras foram lavadas com uma solução de gelatina (LabSynth, Diadema, Brasil) por 12 horas. A gelatina foi removida e as amostras foram lavadas com álcool 70% por 30 min, depois de removido o álcool as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS por 30 min; e então foram esterilizadas em raio ultravioleta (UV) por 30 min (15 min cada lado). E por fim, foi acrescentado 200 µl de meio de cultura MTS-O contendo as células. Sendo os grupos avaliados: a) grupo PLA: células mesenquimais plaqueadas com PLA, b) grupo PLA-P: células mesenquimais plaqueadas com o compósito de

PLA/Biovidro precipitado, c) grupo PLA-P+Co: células mesenquimais plaqueadas com o compósito de PLA/Biovidro precipitado dopado com cobalto e d) grupo PLA-P+Sr: células mesenquimais plaqueadas com o compósito de PLA/Biovidro precipitado dopado com estrôncio.

4.6.3 Adesão celular

Para o teste de adesão celular (n=3), após 5 dias de cultura celular, o meio de cultura contendo as células foi removido de todas as amostras e cada poço foi lavado 3 vezes de com PBS e após foi adicionado formaldeído em todos os poços e deixado durante 1 hora em temperatura ambiente. Após, o formaldeído foi removido e realizada nova lavagem com PBS (3x). Em seguida, cada poço foi lavado com uma série de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, e 100%) durante 10 minutos. Por fim, o etanol foi removido de cada poço e a placa foi deixada para secar em temperatura ambiente para posterior análise através do microscópio eletrônico de varredura.

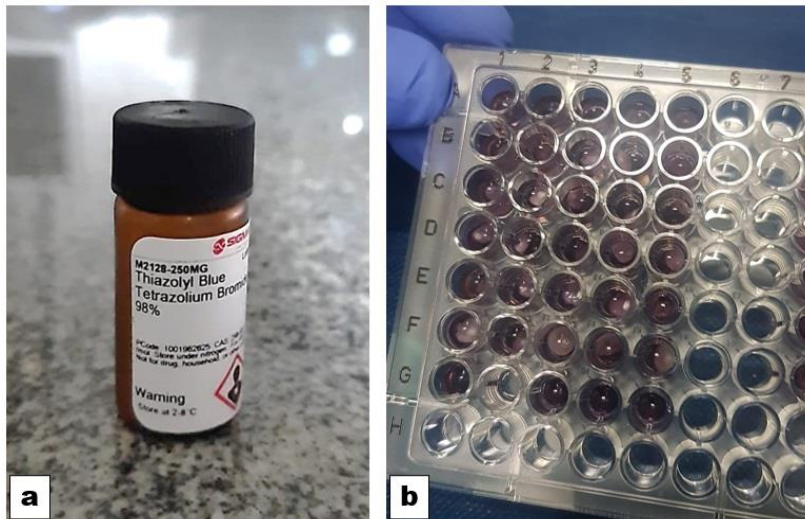
4.6.4 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

A avaliação quantitativa de células viáveis, por meio da exposição ao corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)] (Sigma Aldrich) (Figura 12a) e

análise espectrofotométrica do corante incorporado, foi realizada após 7 dias de cultura celular (n=5 para cada grupo experimental). Alíquotas de MTT a 0,5 mg/mL em PBS foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas primárias com esta solução por 4 horas a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂ (Figura 12b).

Após, a solução de MTT foi removida e foi adicionado 500 µl da solução de DMSO (Dimethyl Sulfoxide) que permaneceu nos poços por 10 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. A seguir a placa foi colocada sob agitação por dez minutos. Alíquotas de 100 µl foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços (Greiner) para medição colorimétrica em espectrofotômetro (intervalo de 570 nm a 650 nm) (EL 808 BioTek Instruments, Winooski, EUA) (do Prado et al., 2015).

Figura 12 – Análise de viabilidade celular (MTT)



Legenda: a) MTT [brometo de 3-4,5- dimetiltiazol] e b) amostras imersas em corante MTT.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6.5 Conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi calculado após 7 dias de cultura (n=5 para cada grupo experimental). Desse modo, para extração proteica, os poços foram lavados três vezes com PBS, após a remoção do meio de cultura, e logo preenchidos com 200 µL de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich), para lise celular e consequente liberação de todas as proteínas no sobrenadante. 30 minutos após, foi realizado agitação do conjunto nos poços para promover otimização dessa lise celular, sucedido pela mistura de 100 µL da solução de Lowry (SigmaAldrich) a 1 mL da solução de cada poço (20 minutos, temperatura ambiente). Logo após, 100 µL de reagente de Folin e Ciocalteau (Sigma-Aldrich) foi acrescentado (30 minutos, temperatura ambiente). E então, a absorbância foi aferida a 680 nm em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900).

4.6.6 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada após 7 dias de cultura celular (n=5 para cada grupo experimental), 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).

4.6.7 Formação de nódulos de mineralização

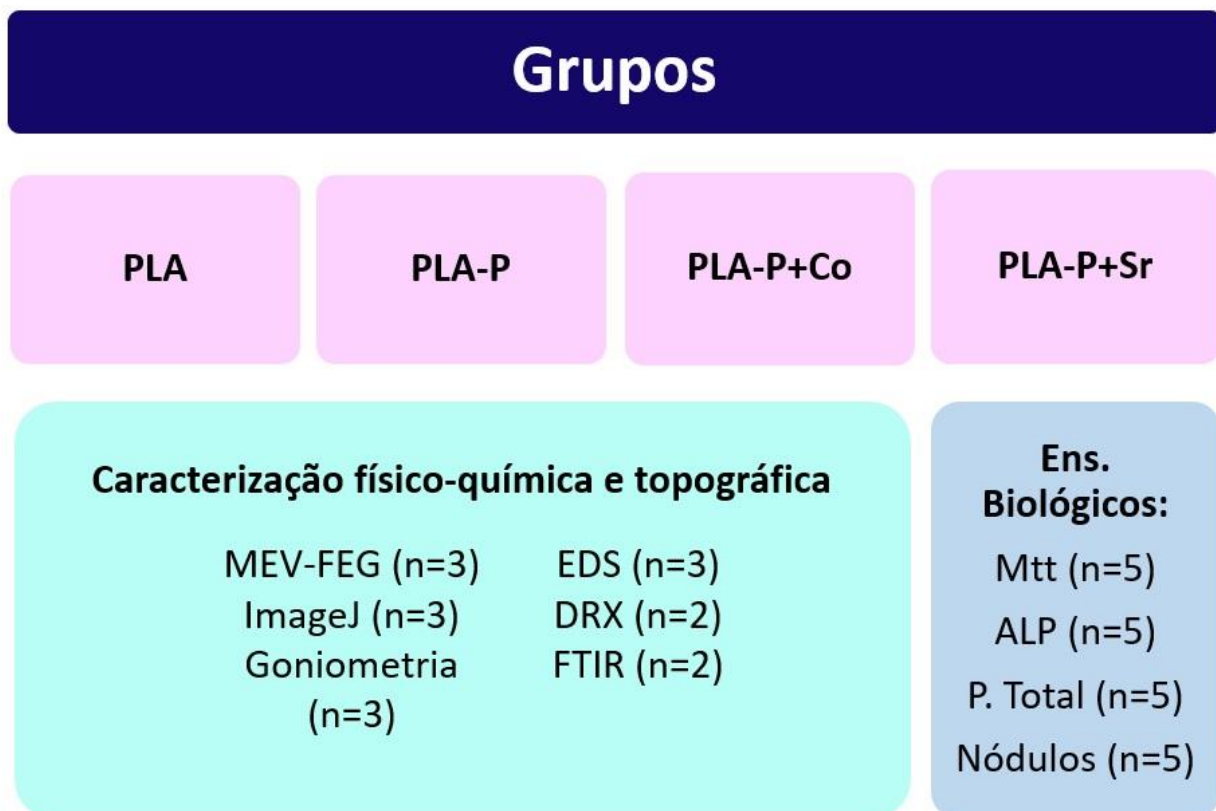
A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 14 dias de cultura (n=5 para cada grupo experimental). Para tanto, o meio de cultura foi removido de todas as mostras e adicionado solução de Hank 's (previamente aquecido em Banho-Maria). A solução de Hank 's foi removida e adicionado álcool 70% em cada poço contendo amostra e deixado na geladeira durante 1 hora. Após a incubação, o álcool foi removido e os poços foram lavados com PBS gelado. Após, foi adicionado água destilada em cada poço, a água foi removida e acrescentado corante Vermelho de Alizarina S a 4,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Brasil), por 15 minutos. O corante vermelho de Alizarina S cora áreas que são ricas em cálcio. Após a remoção do corante os poços foram lavados delicadamente com água destilada. Todos os poços foram mantidos com PBS durante 15 minutos e lavados duas vezes com água destilada. Por fim a água foi removida e as amostras foram deixadas para secar durante 24 horas em temperatura ambiente.

As amostras foram analisadas por meio de fotografia em microscópio de fluorescência.

5 ESTATÍSTICA

Todos os dados foram plotados e realizada a estatística descritiva (média e desvio padrão). Para análise de diâmetro médio das nanofibras e goniometria foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p=0,05$). Quanto aos dados obtidos no ensaio biológico (mtt, proteína total e fosfatase alcalina) dependendo do comportamento da amostra foi utilizado teste paramétrico ANOVA one-way ou não paramétrico Kruskal-Wallis ($p=0,05$). A seguir está descrita a quantidade de amostras utilizadas para cada grupo e teste realizado (Figura 13).

Figura 13 – Quantidade de amostras e testes realizados



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 RESULTADO

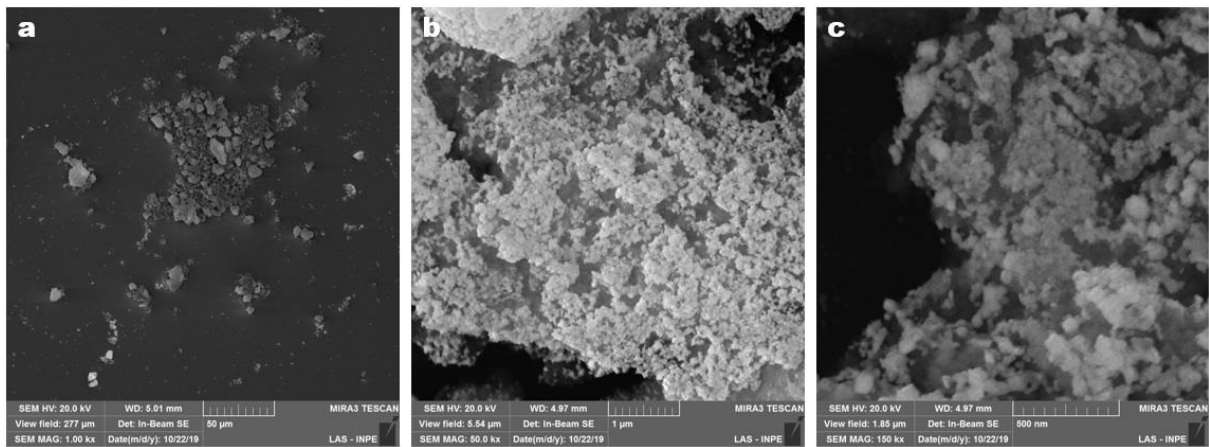
6.1 Análises morfológicas e físico-químicas

Foram obtidas no coletor estruturas 3D em formato de manta, constituída por nanofibras. Visualmente não foi possível observar diferença na textura das mantas eletrofiadas quando da inclusão de biovidro (P, P+Co e P+Sr), sendo as mantas com biovidro mais maleáveis que a do grupo PLA.

6.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)

De acordo com as análises realizadas em MEV-FEG, foi possível verificar o tamanho das partículas de biovidro obtidas pela rota sol-gel com precipitação, sendo demonstrado que esse vidro apresentou partículas em dimensões nanométricas (Figura 14). Além disso, foi possível constatar a formação efetiva de nanofibras em todos os grupos avaliados no presente estudo (PLA, PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr), figuras 15 e 16.

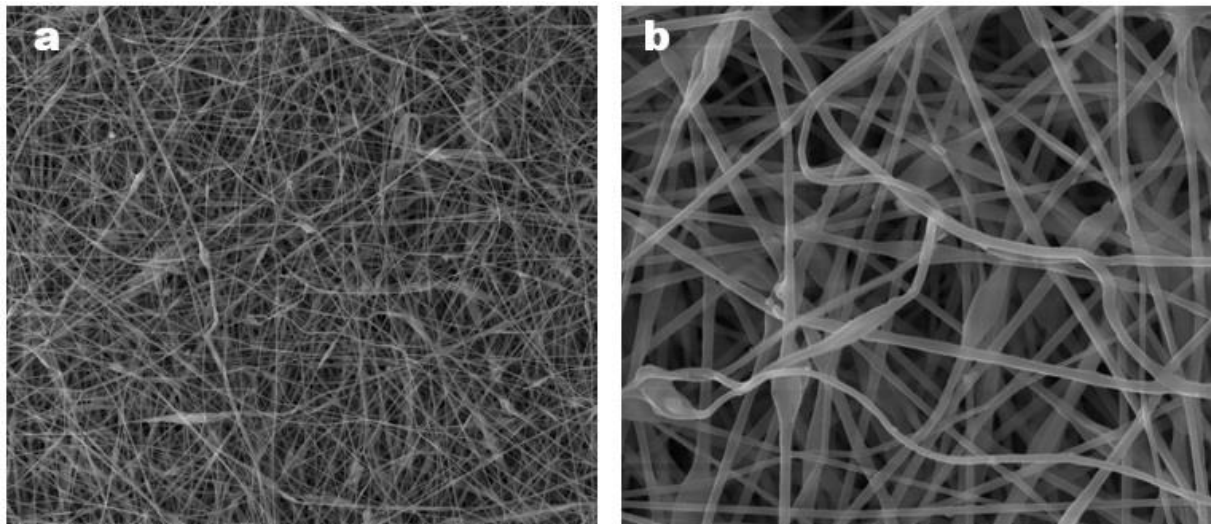
Figura 14 – Partículas de biovidro P



Legenda: Partículas de biovidro P a) aumento de 1.000 x, b) aumento de 50.000 x e c) aumento de 150.000 x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

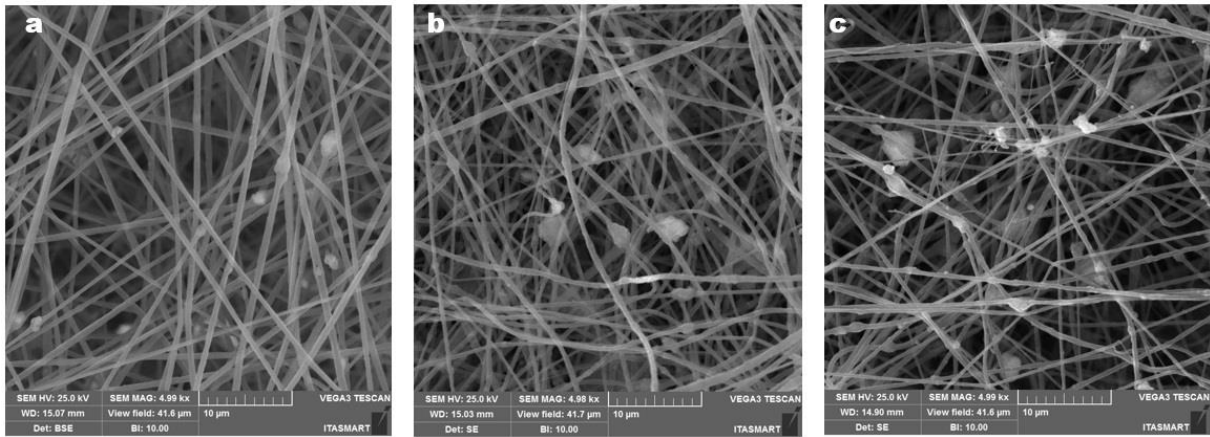
Figura 15 – Nanofibras de PLA



Legenda: Nanofibras de PLA P a) aumento de 1.000 x e b) aumento de 5.000 x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Nanofibras PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr



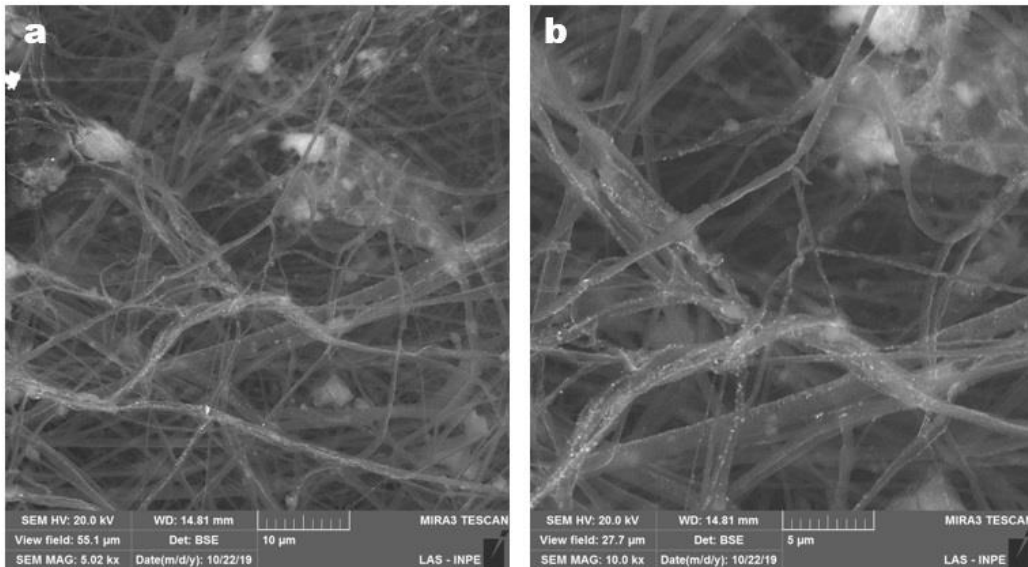
Legenda: Formação de nanofibras a) PLA-P aumento de 5.000 x, b) PLA-P+Co aumento de 5.000 x e c) PLA-P+Sr aumento de 5.000 x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As figura 17 e 18 apresentam micrografias obtidas por FEG, nas quais é possível observar partículas de vidro nas mantas de nanofibras de PLA-P, as partículas de biovidro ficaram em evidência devido ao modo Retro Espalhado, o qual permitiu observar a presença das partículas de biovidro não só na superfície das nanofibras como em seu interior. Nas fibras de PLA-P as partículas são encontradas também no interior da fibra de forma homogênea e desaglomerada, demonstrando que as partículas obtidas de P são nanométricas.

Também foi possível constatar a presença de partículas de biovidro nos *scaffolds* de PLA/Biovidro dopado com íons terapêuticos. Na figura 19, devido a utilização do modo retro espalhado, as partículas de biovidro ficaram em evidência, não só na superfície dos *scaffolds* como também em seu interior.

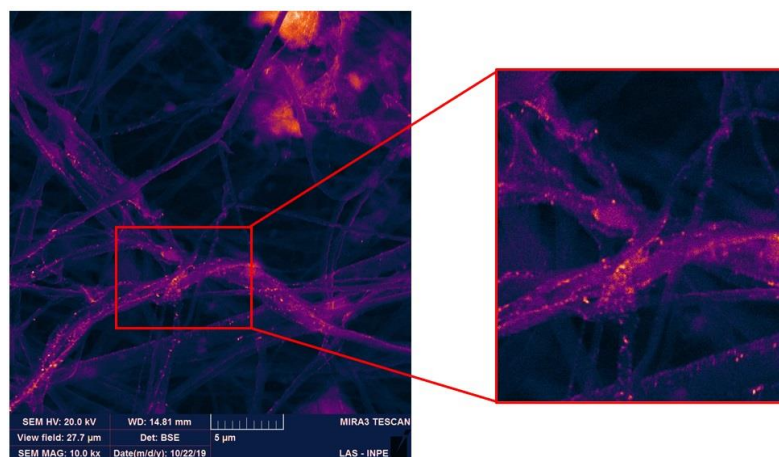
Figura 17 – Microscopias obtidas por MEV-FEG



Legenda: Nanofibras de PLA-P, é possível constatar a presença de partículas de biovidro não só na superfície das fibras como também em seu interior a) aumento de 5 000 x e b) aumento de 10 000 x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

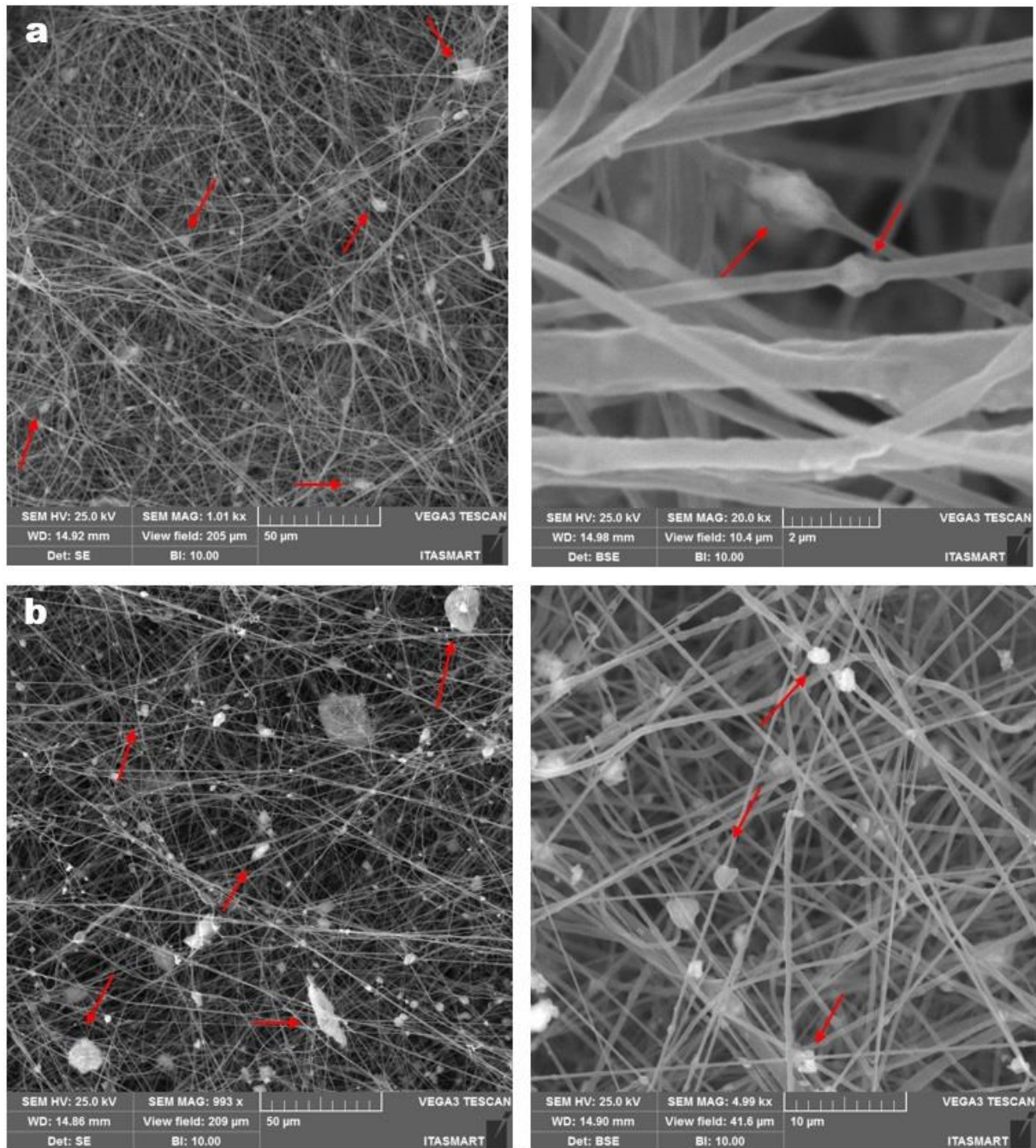
Figura 18 – Microscopia obtida por MEV-FEG



Legenda: Nanofibras de PLA-P, coradas para melhor visualização de nanopartículas no interior da fibra.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 – *Scaffolds* de PLA-P+Co e PLA-P+Sr



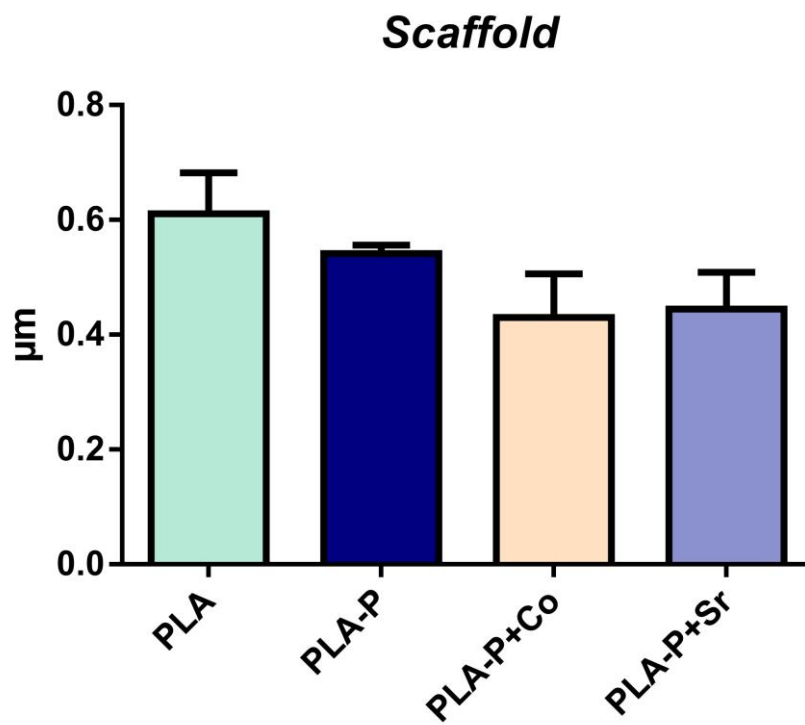
Legenda: Nanofibras de PLA-P+Co e PLA-P+Sr, é possível constatar a presença de nanopartículas de biovidro não só na superfície das fibras como também em seu interior a) nanofibras de PLA-P+Co aumento de 1 000 x e 20 000 respectivamente e b) nanofibras de PLA-P+Sr aumento de 1 000 x e 5 000 x respectivamente. As setas indicam as partículas de biovidro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.2 Análise do diâmetro médio de fibras

Foi realizada estatística descritiva apresentando a média e desvio padrão do diâmetro das nanofibras (Figura 20). Além disso, a estatística inferencial (teste de Kruskal-Wallis), demonstrou que não houve diferença significativa entre o diâmetro médio das nanofibras.

Figura 20 – Gráfico representativo do diâmetro das fibras







Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.3 Análise de ângulo de contato

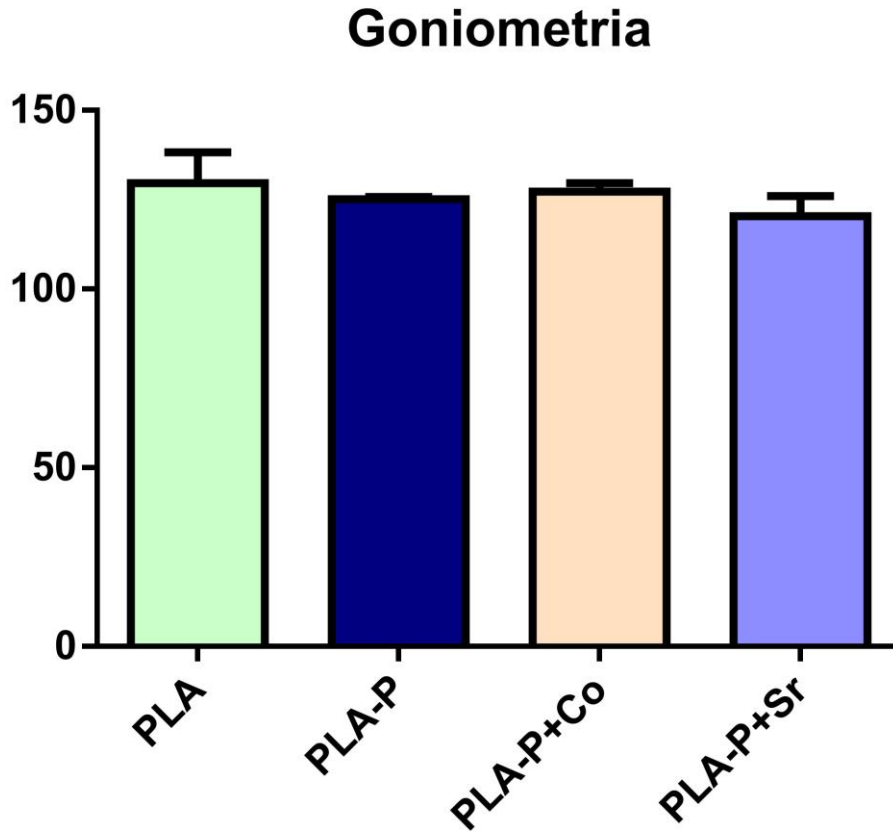
Na tabela 1 é possível observar a média \pm desvio padrão do ângulo de contato das amostras: PLA, PLA-P, PLA-P+Sr e PLA-P+Co. As médias não apresentaram diferença significativa (Figura 21), no entanto todas as amostras apresentaram um elevado ângulo de contato ($>90^\circ$) demonstrando a alta hidrofobicidade das amostras.

Tabela 1 – Análise de ângulo de contato

| Amostra | PLA | PLA-P | PLA-P+Co | PLA-P+Sr |
|---------------------------|---|---|--|---|
| Imagem |  |  |  |  |
| média \pm desvio padrão | 129,7 \pm 8,589 | 125,1 \pm 0,650 | 127,3 \pm 2,351 | 120,5 \pm 5,663 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Gráfico representativo da média de ângulo de contato

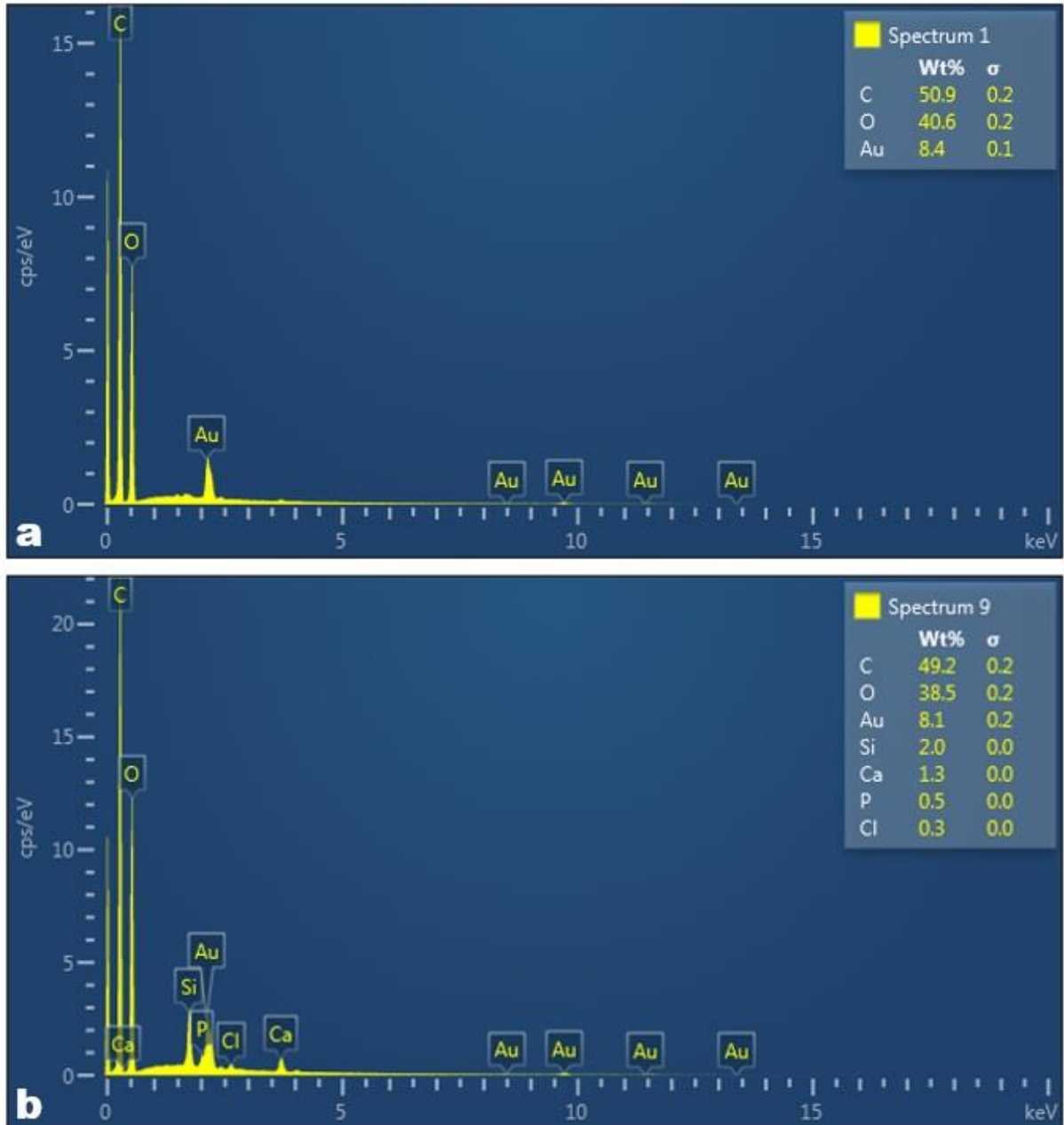


Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.4 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

As figuras de 22 e 23 evidenciam a presença dos elementos químicos O, Si, Ca, P e Cl que compõem o biovidro utilizado neste trabalho, demonstrando assim, a presença de biovidro nos *scaffolds* de PLA/Biovidro. Além disso, na figura 23 é possível constatar que houve efetiva incorporação dos íons cobalto (Figura 23a) e estrôncio (Figura 23b) ao biovidro.

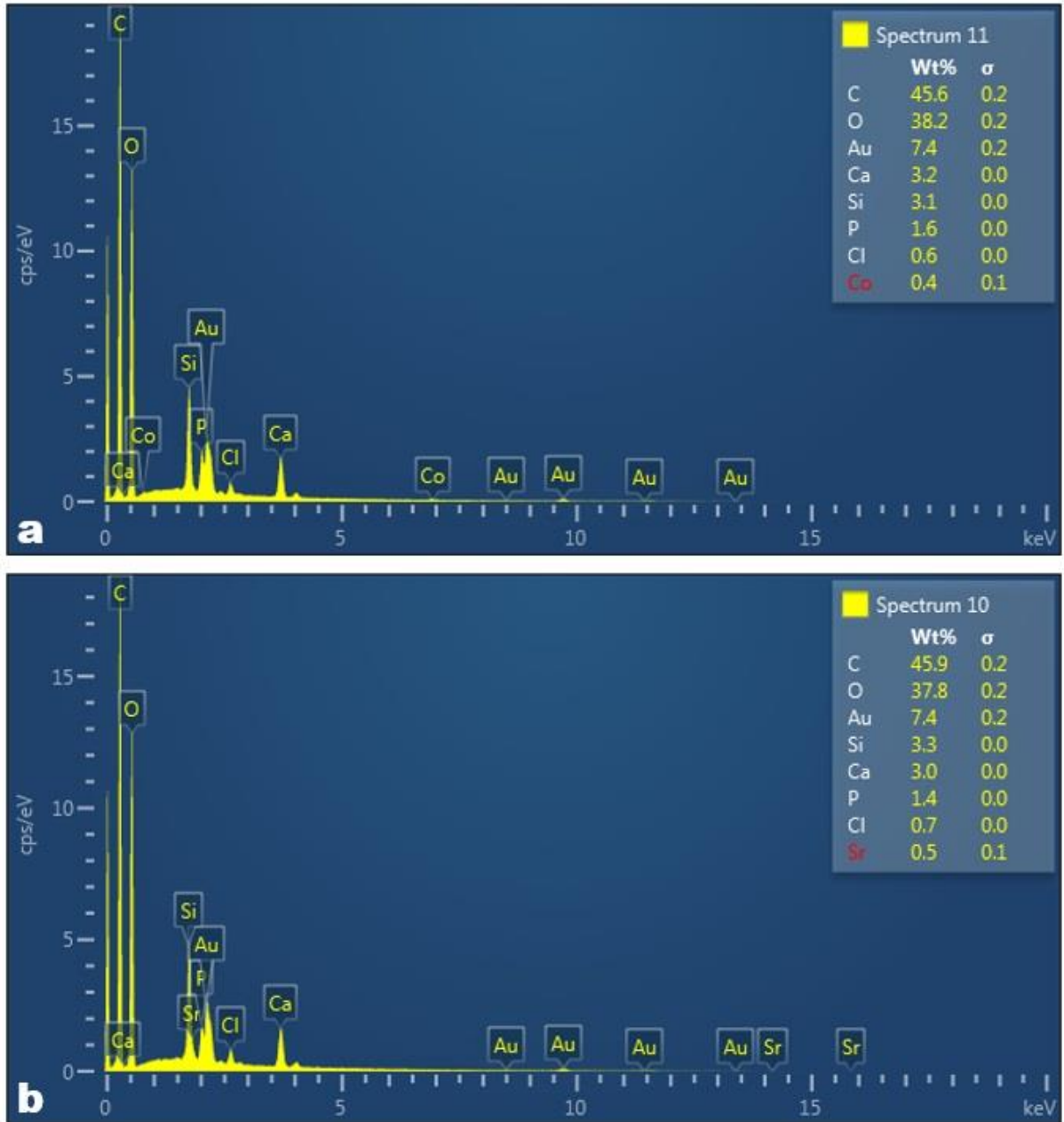
Figura 22 – EDS das amostras PLA (a) e PLA-P (b)



Legenda: a) EDS PLA e b) EDS do compósito PLA-P.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23: EDS dos Compósitos PLA-P+Co (a) e PLA-P+Sr (b)



Legenda: a) EDS do compósito PLA-P+Co e b) EDS do compósito PLA-P+Sr.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

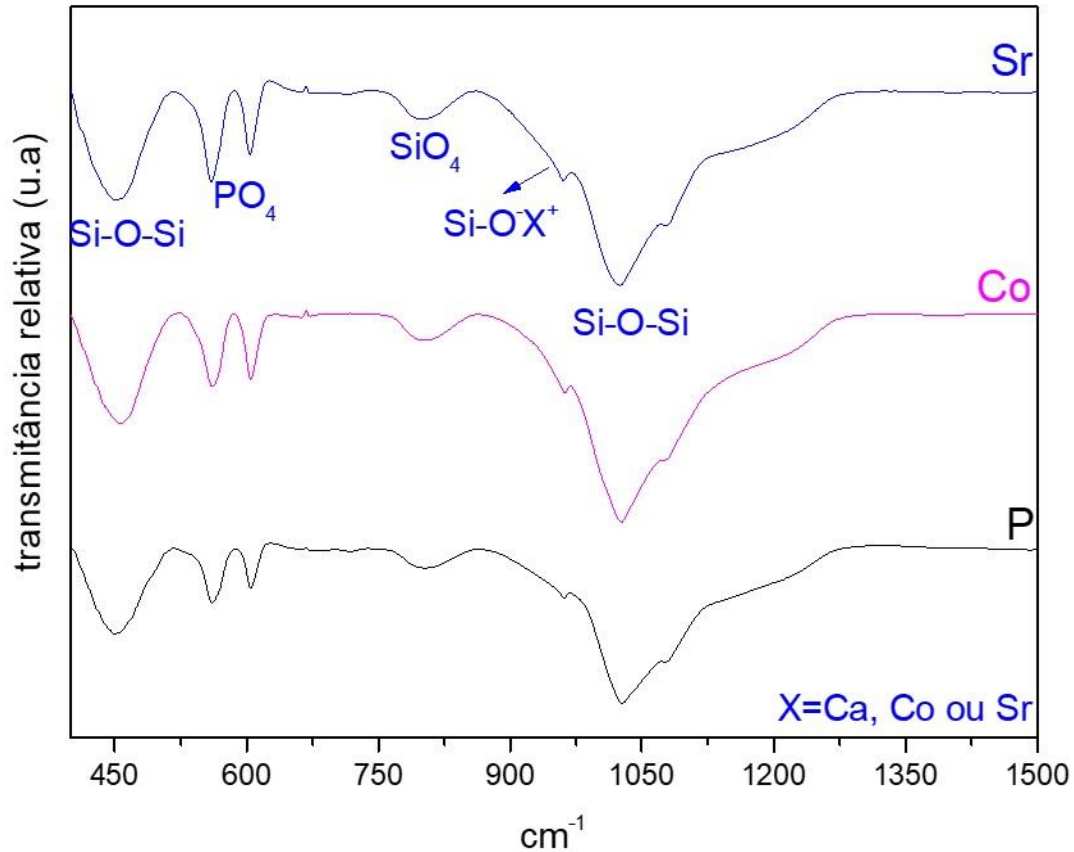
Os espectros de FTIR dos grupos PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr, são apresentados na figura 24. É possível observar as bandas de sílica, fosfato e as bandas tipo não ponte que representam a ligação do silício com um heteroátomo. Na tabela 1 são representadas as ligações encontradas na análise FTIR. Sendo a ligação NBO uma ligação entre o silício e um heteroátomo através do oxigênio e a ligação NO uma ligação entre silício e oxigênio. Devido a limitação da técnica não foi possível constatar diferença intensa entre os espectros. Dessa forma se fez necessário a análise em espectroscopia Raman.

Tabela 1 – Tabela representativa das ligações encontradas na análise FTIR

| Atribuições | Frequência |
|---|---------------------------------------|
| Ligação NO (Si-O-Si) | 400-500, 800 cm^{-1} |
| Fosfato (PO₄) | 500-600, 1100 cm^{-1} |
| Ligação NBO (Si-O-X⁺) | 900-1000 cm^{-1} |
| Grupo hidroxila | 1500-1750, 3000-3500 cm^{-1} |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Espectro de infravermelho dos vidros: P, P+Co e P+Sr

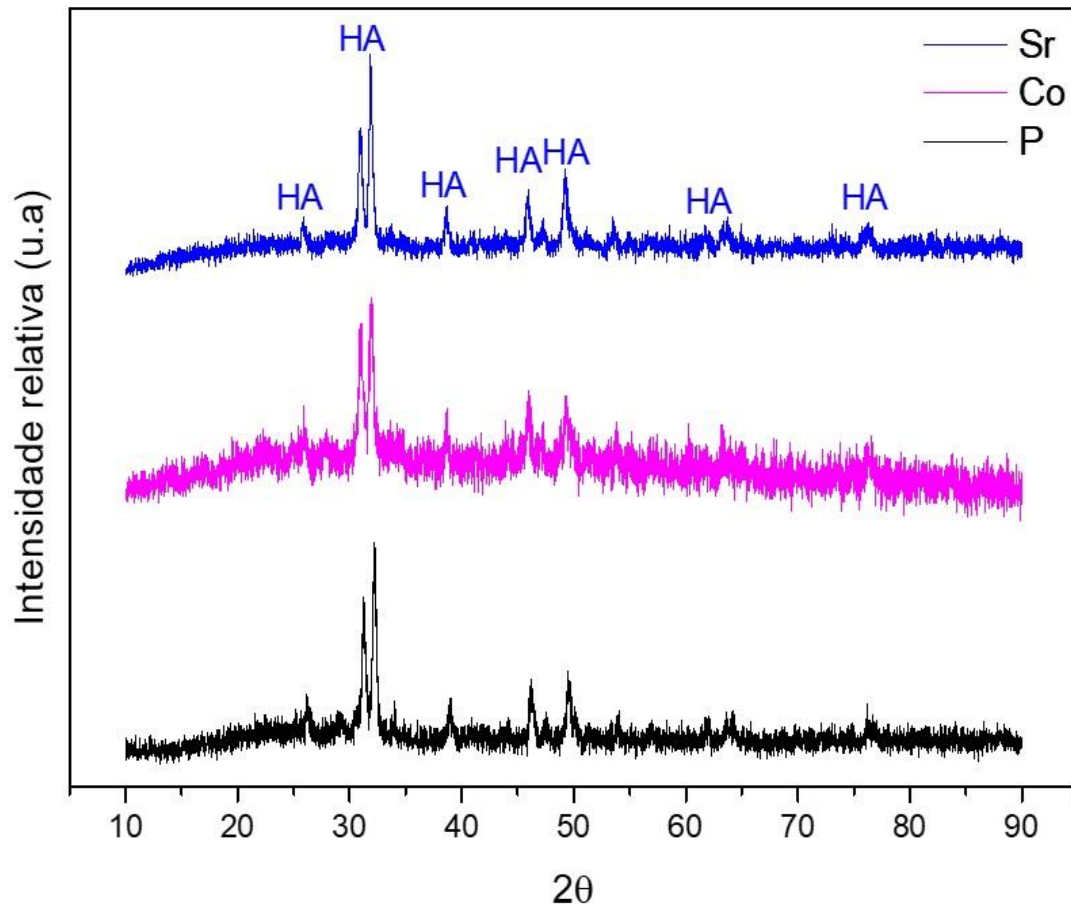


Legenda: Na ligação Si-OX⁺, em X pode ser encontrado Ca, Co ou Sr.
Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.6 Difratorômetro de Raios X (DRX)

Na análise de DRX, todos os materiais apresentaram uma pequena fração de hidroxiapatita (HA), o que se deve ao P₂O₅ presente na composição do biovidro, portanto é uma fase minoritária, a maior fase do material é vítrea figura 25.

Figura 25 – Difratorômetro de Raios X (DRX)



Legenda: DRX dos compósitos: PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr

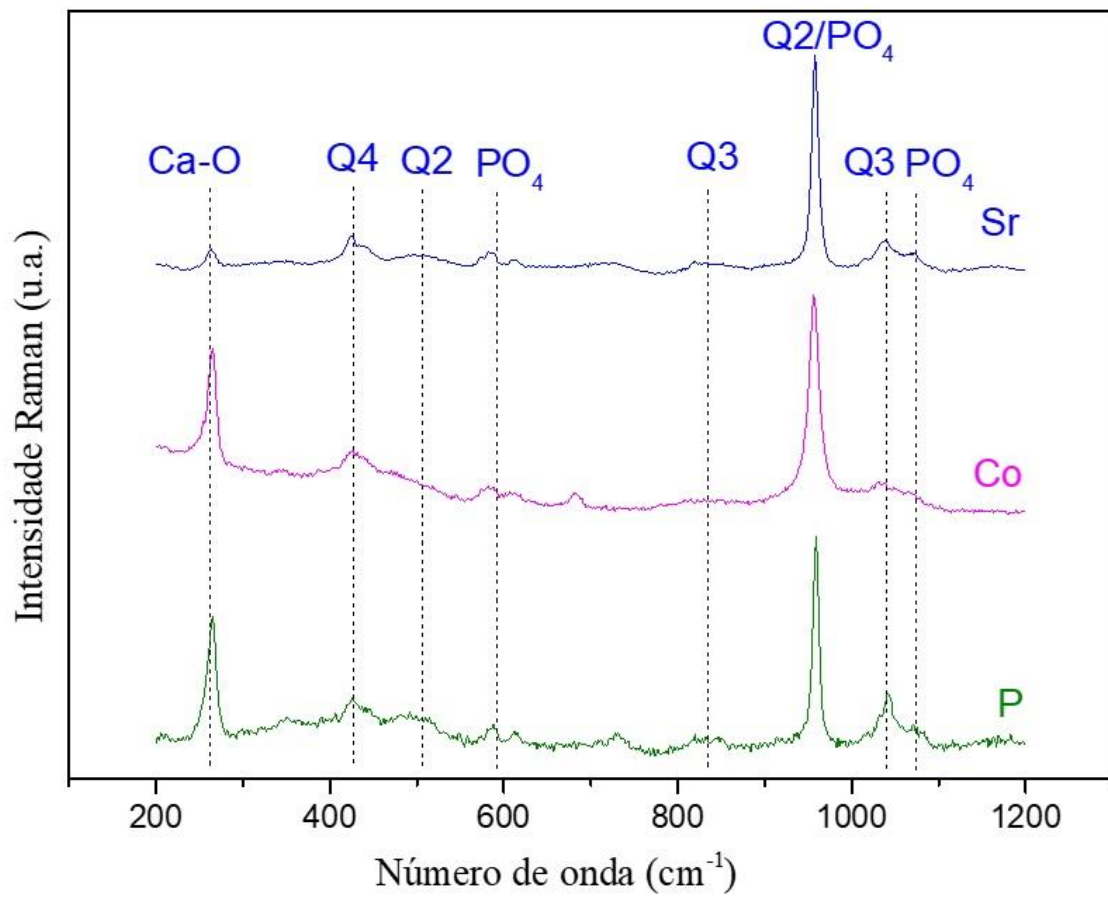
Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.7 Espectroscopia Raman

A figura 26 a seguir, evidencia que houve diminuição da intensidade de Q3 em relação a Q2 nos vidros P+Co e P+Sr em relação ao vidro P, sendo um

indicativo da incorporação heteroátomo na estrutura do vidro, demonstrando a efetividade de incorporação dos íons terapêuticos.

Figura 26 – Espectroscopia Raman

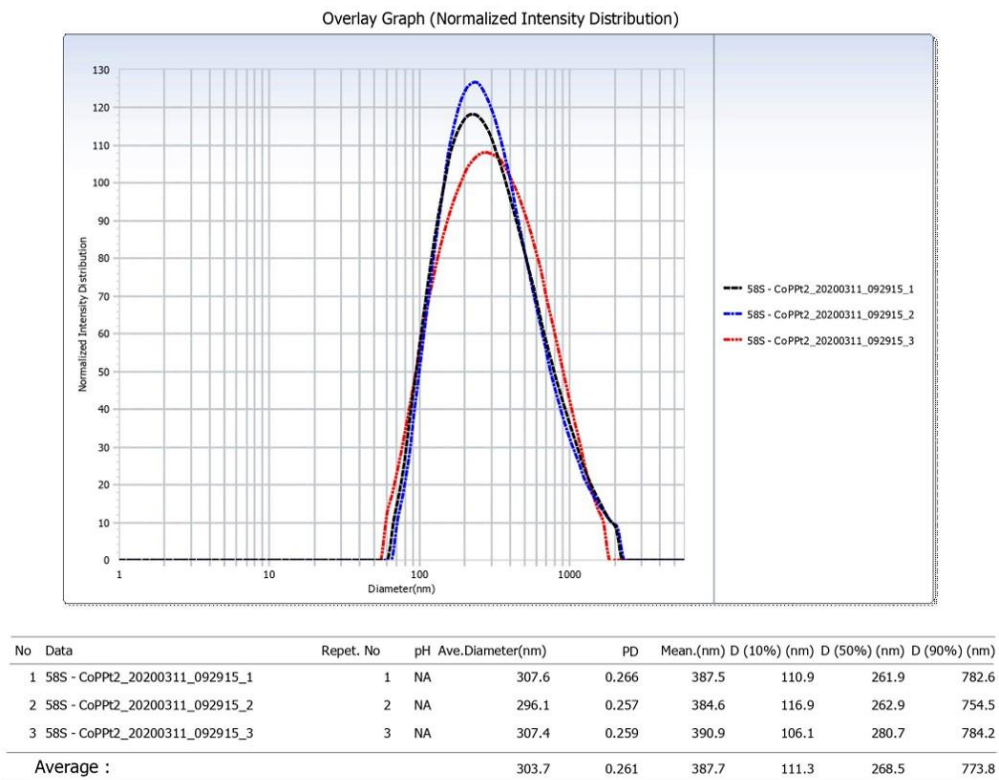


Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.8 Granulometria por difração a laser

A curva granulométrica do biovidro desenvolvido é mostrada na figura 27. A análise da curva granulométrica revela que o pó de biovidro obtido apresenta uma distribuição granulométrica de característica monomodal com valores de tamanho de partículas médio de 268,5 nm (D_{50}) com range de distribuição de 111,3 nm (D_{10}) e 773,8 nm (D_{90}) respectivamente.

Figura 27 – Gráfico representativo da granulometria por difração a laser



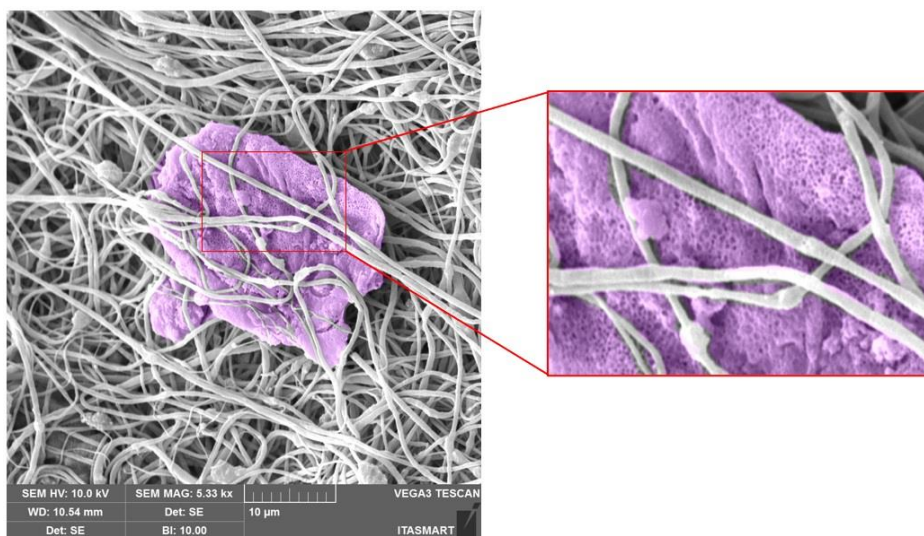
Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2 Ensaio biológicos *in vitro*

6.2.1 Adesão celular

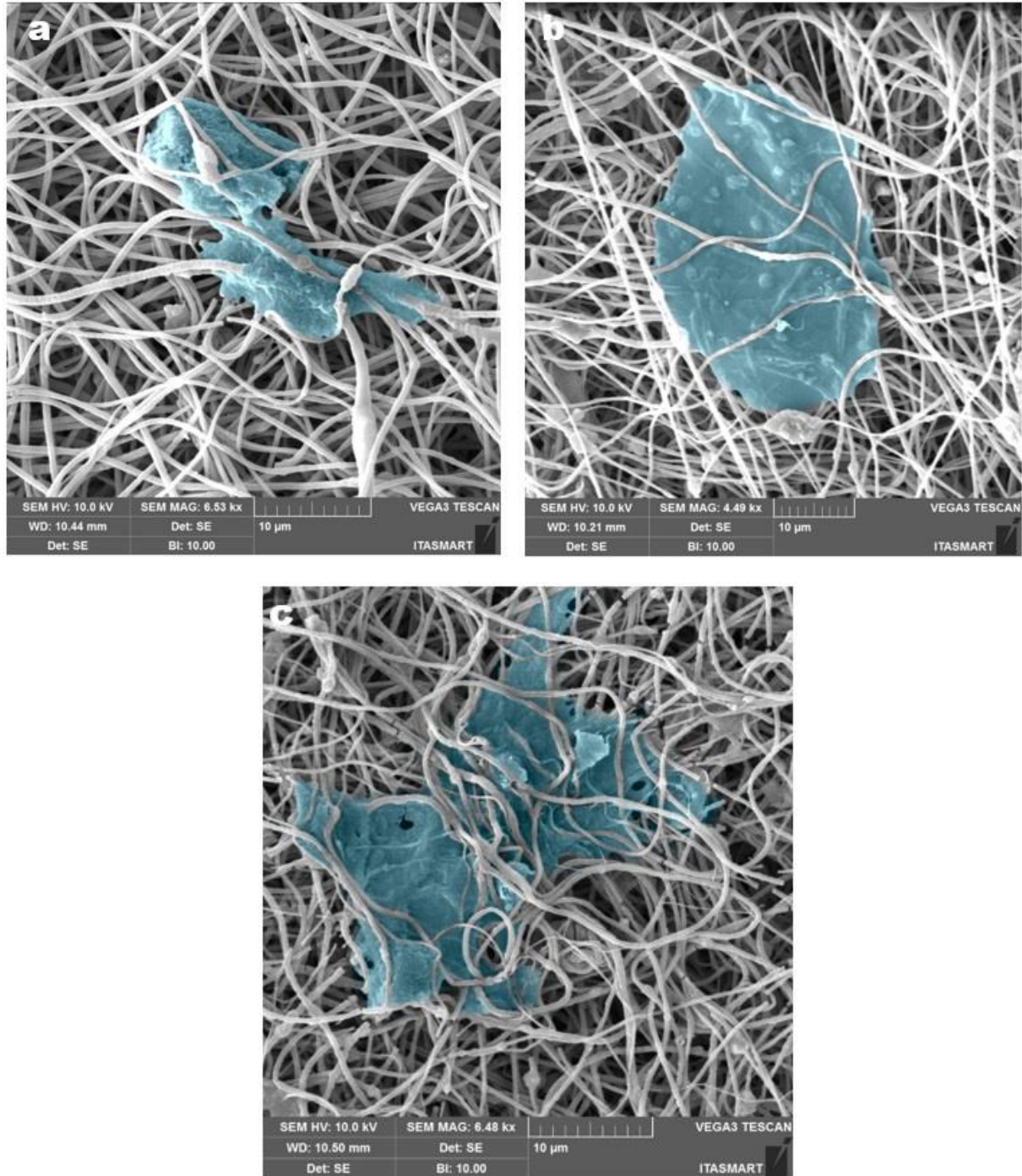
Após 5 dias de cultura, a interação celular sobre as amostras foi observada. As micrografias obtidas em MEV demonstram que todas as amostras permitiram o espraio celular (Figura 29). Além disso, foi possível constatar partículas de biovidro com aspecto poroso, demonstrando que houve liberação de vidro para o meio de cultura celular (Figura 28).

Figura 28 – Partícula de biovidro em meio celular



Legenda: Na micrografia é possível observar que houve liberação de biovidro para o meio celular.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 – Micrografias adesão celular



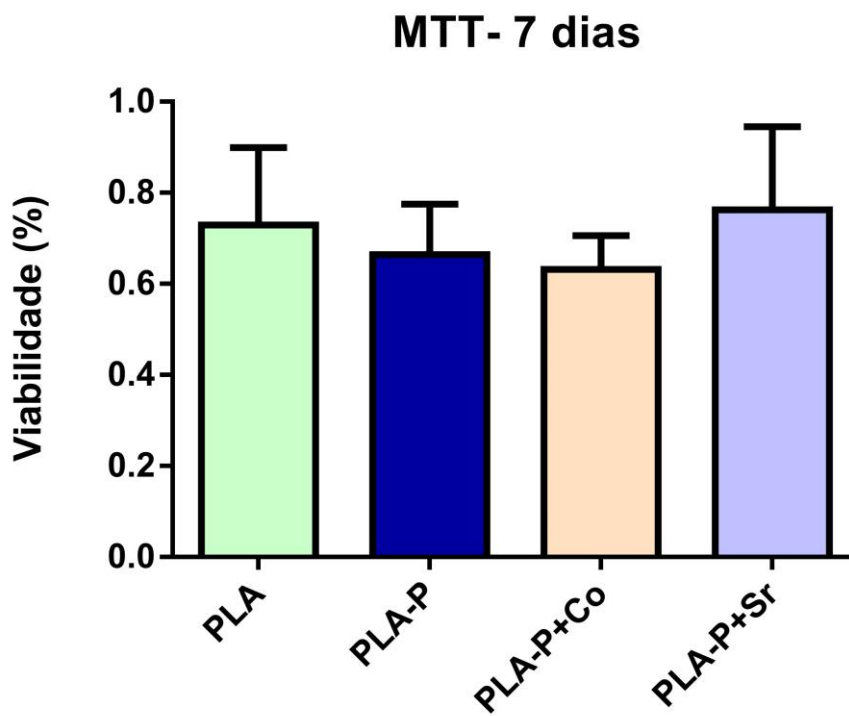
Legenda: Após 5 dias de cultura celular, foi possível constatar o espraiamento celular sobre os *scaffolds*. a) PLA-P aumento de 6 000 x, b) PLA-P+Co aumento de 4 000 x e c) PLA-P+Sr aumento de 6 000 x. As células estão destacadas na cor azul.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Todas as amostras apresentaram viabilidade celular, sem diferença estatística significativa (Figura 30).

Figura 30 – Gráfico de viabilidade celular

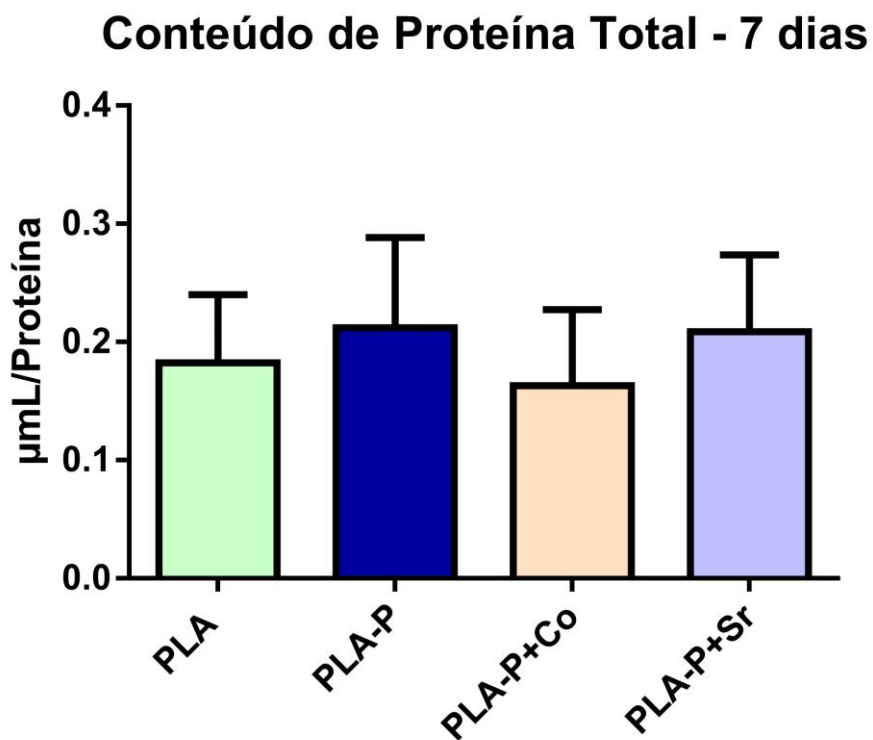


Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.3 Conteúdo de proteína total

Na figura 31 é possível observar um gráfico representativo de quantificação de proteína total em todos os grupos, sem diferença estatística significativa.

Figura 31 – Gráfico representativo do conteúdo de proteína total

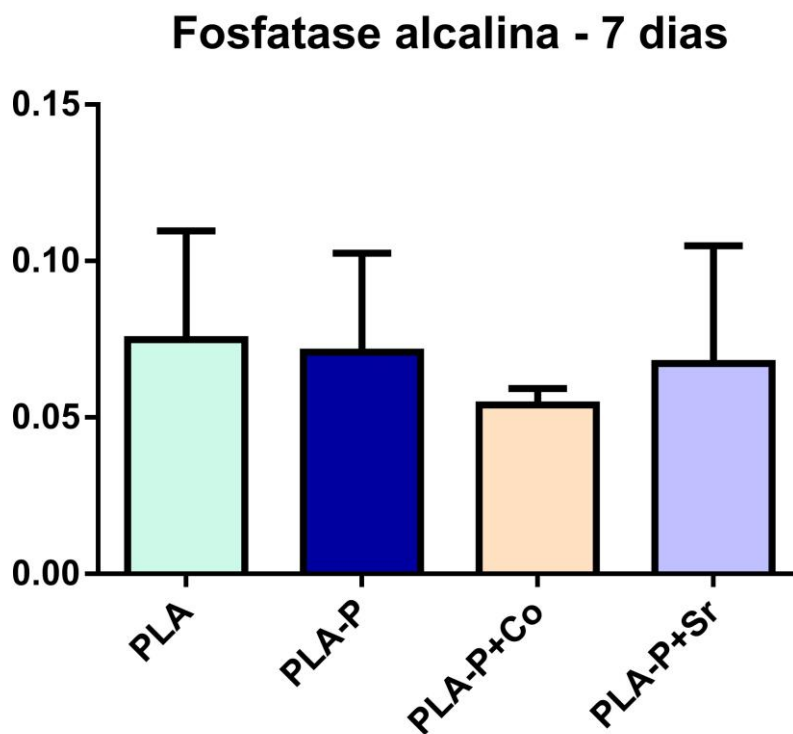


Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.4 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Na figura 32 é possível observar um gráfico representativo da expressão de fosfatase alcalina, sendo evidenciado que não houve diferença estatística entre os grupos analisados.

Figura 32 – Gráfico representativo de fosfatase alcalina

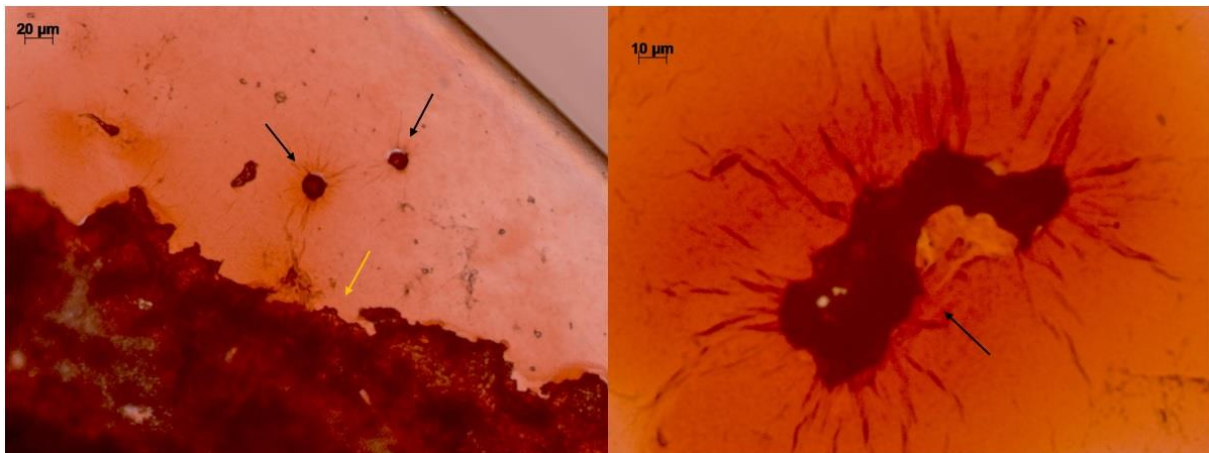


Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.5 Formação de nódulos de mineralização

Após 14 dias de cultura celular a formação de nódulos de mineralização foi verificada em todas as amostras como demonstrado nas figuras de 33 à 36. Sendo a amostra de PLA-P+Sr a que visualmente sugere-se maior quantidade de nódulos (Figura 36).

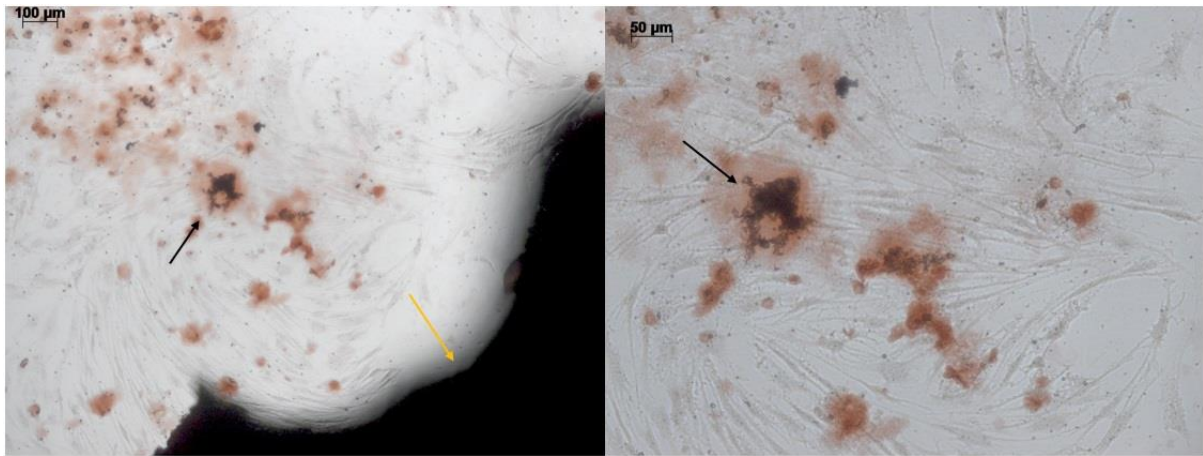
Figura 33 – Nódulo de mineralização no *scaffold* de PLA



Legenda: As setas pretas indicam os nódulos de mineralização e a seta amarela aponta para o *scaffold* de PLA.

Fonte: Elaborado pelo autor.

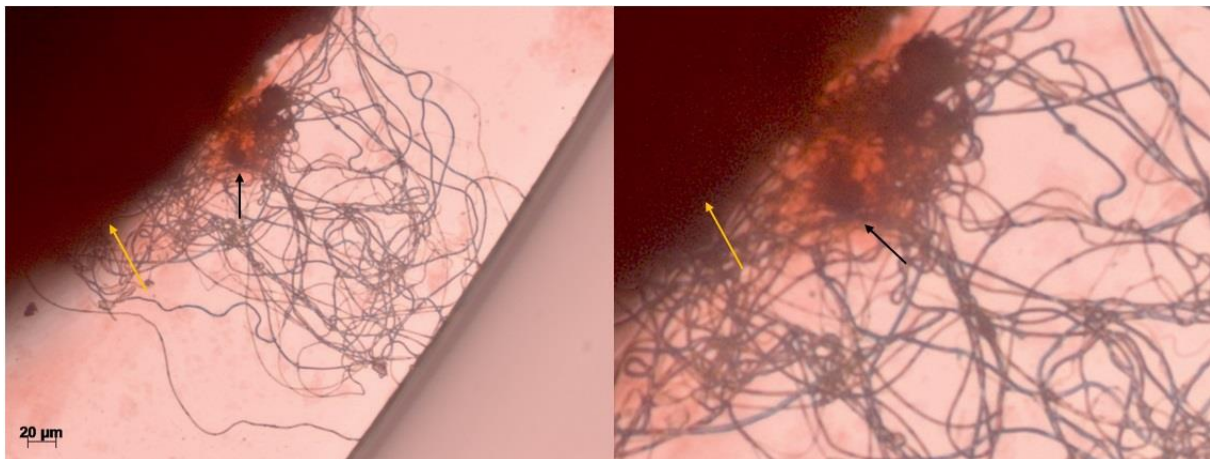
Figura 34 – Nódulo de mineralização no *scaffold* de PLA-P



Legenda: As setas pretas indicam os nódulos de mineralização e a seta amarela aponta para o *scaffold* de PLA-P.

Fonte: Elaborado pelo autor.

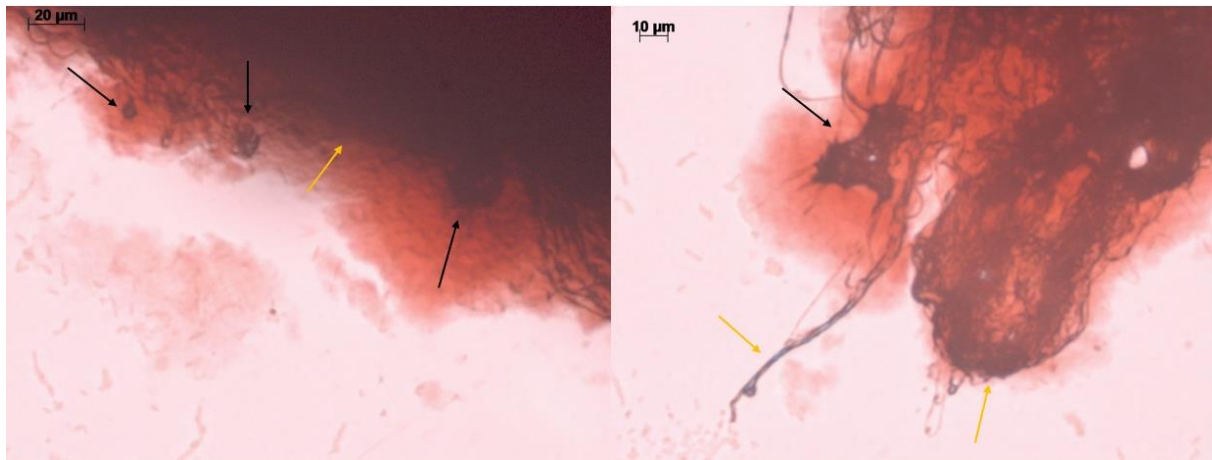
Figura 35 – Nódulo de mineralização no *scaffold* de PLA-P+Co



Legenda: As setas pretas indicam os nódulos de mineralização e as setas amarelas apontam para o *scaffold* de PLA-P+Co.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36 – Nódulo de mineralização no *scaffold* de PLA-P+Sr



Legenda: As setas pretas indicam os nódulos de mineralização e as setas amarelas apontam para o *scaffold* de PLA-P+Sr.

Fonte: Elaborado pelo autor.

7 DISCUSSÃO

A regeneração de defeitos ósseos é um desafio na odontologia, uma vez que há grande incidência de doenças periodontais, má formação, trauma, tumor e outras doenças que podem resultar na formação de defeitos intraósseos (Kao et al., 2015). Como tratamento podem ser utilizados osso autógeno, heterógeno, artificial ou membranas de engenharia tecidual (Li et al., 2017). O uso de osso autógeno continua sendo o padrão ouro, no entanto essa técnica leva a morbidade no local cirúrgico da área doadora que pode levar a complicações pós-cirúrgicas (Falisi et al., 2013).

Como alternativa menos traumática, o estudo e o uso de biomateriais têm sido amplamente abordados para utilização em regeneração óssea (Singla et al., 2019; Vieira et al., 2017). Como exemplo de biomaterial, as membranas reabsorvíveis, que induzem a diferenciação e proliferação de células osteogênicas, são utilizadas com o intuito de promover a ósseo-indução e ósseo-condução sem necessidade de nova cirurgia para remoção da membrana (Naung et al., 2019).

Esse estudo teve como objetivo desenvolver um *scaffold* de PLA incorporado de partículas de um novo biovidro 58S clorado, nanoparticulado e *nitrate free*, dopado com os íons terapêuticos estrôncio (Sr^{2+}) e cobalto (Co^{2+}). Esse biomaterial possibilitaria a reparação óssea através da ósseo indução e condução sem necessidade de adição de agentes indutores.

Com as análises realizadas em MEV-FEG e granulometria por difração a laser (Figuras 14 e 27 respectivamente), foi possível constatar que o biovidro desenvolvido nesse trabalho obteve partículas em escala nanométrica, sendo essa uma importante caracterização a ser feita nos biovidros, uma vez que, alguns estudos sugerem que o tamanho da partícula influencia na adesão celular

e no tempo de dissolução iônica (Chen et al., 2018; Leclerc et al., 2012).

De acordo com o estudo de Lopresti et al. (2020), partículas micrométricas incorporadas ao PLA, atuaram como um defeito local fazendo com que a fibra se tornasse mais frágil que as incorporadas com partículas nanométricas, que seriam fibras mais homogêneas e uniformes, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que é possível identificar nanopartículas de forma desaglomerada e uniforme no interior das fibras de PLA-P (figuras 17 e 18). Além disso, no mesmo estudo, é demonstrado que as nanopartículas induziram uma colonização celular mais homogênea ao *scaffold* (Lopresti et al., 2020).

A análise de granulometria por difração de laser mostra a média de tamanho das partículas de biovidro, desenvolvido no presente estudo (268 nm), porém é possível encontrar partículas inferiores a 100 nm e partículas de valores mais elevados, não ultrapassando 75 μm que foi a peneira utilizada), isso justifica as partículas de biovidro encontradas na superfície das mantas de nanofibras (figuras 19 e 28), o que seria uma vantagem, uma que vez que teria liberação de vidro de forma imediata para o meio celular, partículas maiores, e liberação de biovidro de forma mais lenta, quando no interior das fibras.

Quanto ao tamanho das fibras eletrofiadas, estudos mostram que a dimensão da fibra influencia na adesão e mobilidade celular. Segundo Pelipenko et al. (2015) a mobilidade celular diminui com o aumento da espessura das fibras (300 a 700 nm) ao passo que a adesão celular aumenta. Dessa forma, as fibras encontradas no presente estudo seriam mais favoráveis à adesão celular uma vez que todos os grupos estudados se enquadram nas dimensões 400 à 600 nm (Figura 20).

Em relação ao ângulo de contato das nanofibras, todos os grupos apresentaram elevada média ($>90^\circ$), demonstrando o caráter hidrofóbico dos *scaffolds* (figura 21), dessa forma foi desenvolvido um protocolo de lavagem

para contornar a hidrofobicidade dos *scaffolds* e possibilitar a realização do ensaio biológico.

Os resultados da análise em EDS mostraram a presença dos elementos químicos utilizados para o desenvolvimento do biovidro pela rota Sol-Gel (O, Si, Ca, P e Cl) figuras 22 e 23. Os pequenos valores de desvio padrão indicam que o material é homogêneo (Rezabeigi et al., 2014). Foi possível detectar também a presença dos elementos Co e Sr nos *scaffolds* de PLA-P+Co e PLA-P+Sr, respectivamente (Figura 23), demonstrando que houve incorporação dos íons ao vidro e às fibras.

A detecção do elemento cloro na análise de EDS demonstra a efetiva incorporação desse elemento no vidro desenvolvido, como já observado em outros estudos (Chen et al., 2017, 2015; Wang, Morita, 2016), isso se deve a temperatura de calcinação do biovidro ser inferior a de saída do cloro. O cloro pode ser eficiente na formação de cloroapatita e assim levar a uma remineralização superior. Além disso, a ausência de nitrato torna o vidro mais bioativo e não tóxico (Rezabeigi et al., 2014).

A figura 24 mostra a análise de FTIR, os espectros de FTIR exibiram principalmente vibrações de alongamento e flexão de Si-O-Si (Wu et al., 2015). Em análise de DRX foi detectado picos característicos de hidroxiapatita em todos os compósitos (PLA-P, PLA-P+Co e PLA-P+Sr) figura 25, demonstrando que o material não é totalmente amorfo (Rezabeigi et al., 2014). No entanto, trata-se de uma fase cristalina pequena, sendo o material em sua maior parte vítreo.

A Espectroscopia de Raman (Figura 26), demonstrou que houve uma diminuição de Q3 em relação a Q2 nos vidros dopados com íons terapêuticos, o que deixa claro a efetiva incorporação dos íons terapêuticos na estrutura do vidro (Lee et al., 2019; Lin et al., 2012).

De acordo com o MEV realizado após 5 dias de cultura celular, foi possível observar que houve adesão celular em todos os materiais testados demonstrando a não citotoxicidade dos *scaffolds* (Figura 29). No entanto, as células não penetram de forma eficiente nos *scaffolds*, isso pode ser explicado pela topografia irregular e microporosa das membranas de nanofibras (Sachot et al., 2016).

Após 7 dias de cultura celular, foi realizada análise de viabilidade celular e foi demonstrado a não citotoxicidade dos *scaffolds*, corroborando com os resultados obtidos na adesão celular, visto que houve viabilidade celular em todos os grupos, no entanto não teve diferença estatística entre os grupos (figura 30).

A não diferença estatística entre os grupos controle com os demais grupos pode ser justificada pelo tempo em que foi realizada a análise, alguns estudos já demonstraram que a proliferação celular ocorre de forma mais exacerbada nos três primeiros dias havendo um decréscimo na proliferação celular entre o terceiro e sétimo dia (Shen et al., 2018; Solanki et al., 2021).

No presente estudo, o período de 7 dias para realização da análise de viabilidade celular foi escolhido para esperar um maior tempo de degradação do material e assim melhores resultados.

No trabalho de Lee et al. (2019), os resultados de citotoxicidade mostram que o biovidro dopado com Sr teve diferença estatística significativa em relação aos *scaffolds* sem íon terapêutico, foi demonstrado que o Sr teve uma capacidade de viabilidade celular superior ao PLA puro. Isso pode ser justificado pela morfologia das membranas de nanofibras (alinhadas), diferença entre as células utilizadas e diferença entre os vidros.

De acordo com o teste de proteína total após 7 dias de cultura celular (Figura 31), foi possível constatar que não houve diferença estatística entre os grupos analisados.

Em relação a fosfatase alcalina após 7 dias de cultura celular (Figura 32), também não foi observado diferença estatística entre os grupos, demonstrando a capacidade semelhante entre todos os grupos quanto à atividade de fosfatase alcalina.

A formação de nódulos de mineralização foi observada após 14 dias de cultura celular, para comprovar que as células se diferenciaram em osteoblastos funcionais produzindo nódulos. Foi possível constatar a presença de nódulos em todos os grupos analisados (Figuras de 33 à 36), visualmente sugere-se que o grupo que teve maior quantidade foi o PLA-P+Sr (Figura 36).

A não diferença estatística significativa dos vidros dopados pode estar relacionada a falta de receptor para esses íons nos ensaios biológicos realizados no presente trabalho. O íon cobalto induz uma neoformação vascular o que não é possível de se detectar em estudo *in vitro* (Kulanthaivel et al., 2016; Lin et al., 2018; Wu et al., 2012).

Ademais, estudos *in vitro* apresentam algumas limitações, uma vez que não refletem as interações celulares e propriedades estruturais do tecido (Veigalopez et al., 2019), sendo preditivo para o presente trabalho a realização de um estudo *in vivo*.

8 CONCLUSÃO

Concluimos que foi possível produzir *scaffolds* poliméricos compostos por nanofibras de PLA associados a um biovidro obtido pela rota sol-gel (nanoestruturado, nitrato *free* e clorado) dopado com íons terapêuticos. Não apresentando citotoxicidade no estudo *in vitro*.

Sendo um possível biomaterial para aplicação em engenharia tecidual para regeneração óssea.

REFERÊNCIAS*

Ahmed FE, Lalia BS, Hashaikeh R. A review on electrospinning for membrane fabrication: challenges and applications. *Desalination*. 2015 jan;356:15-30. doi: 10.1016/j.desal.2014.09.033.

Anupama M, Ashok Kumar K, Naveena Lavanya Latha J. Role of strontium in biological systems. *Eur J Pharm Med Res*. 2016;3(12):177–84.

Balamurugan A, Sockalingum G, Michel J, Fauré J, Banchet V, Wortham L, et al. Synthesis and characterisation of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications. *Mater Lett*. 2006;60(29–30):3752–7. doi: 10.1016/j.matlet.2006.03.102.

Bellucci D, Cannillo V, Anesi A, Salvatori R, Chiarini L, Manfredini T, et al. Bone regeneration by novel bioactive glasses containing strontium and/or magnesium: a preliminary in-vivo study. *Materials (Basel)*. 2018;11(11):1–13. doi: 10.3390/ma11112223.

Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*. 2008;42(1):129–38. doi: 10.1016/j.bone.2007.08.043. PMID: 17945546.

Boudriot U, Dersch R, Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning approaches toward scaffold engineering - a brief overview. *Artif Organs*. 2006;30(10):785–92. doi: 10.1111/j.1525-1594.2006.00301.x. PMID: 17026578.

Buehler J, Chappuis P, Saffar JL, Tsouderos Y, Vignery A. Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone*. 2001;29(2):176–9. doi: 10.1016/S8756-3282(01)00484-7. PMID: 11502480.

Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone*. 1996;18(6):517–23. doi: 10.1016/8756-3282(96)00080-4. PMID: 8805991.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cao W, Hench LL. Bioactive materials. *Ceram Int.* 1996;22(6):493–507. doi: 10.1016/0272-8842(95)00126-3.

Catteaux R, Grattepanche-Lebecq I, Désanglois F, Chai F, Hornez JC, Hampshire S, et al. Synthesis, characterization and bioactivity of bioglasses in the Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂ system prepared via sol gel processing. *Chem Eng Res Des.* 2013;91(12):2420–6. doi: 10.1016/j.cherd.2013.05.017.

Chen FM, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci.* 2016 Feb;53:86–168. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004. PMID: 270222-2; PMCID: PMC4808059.

Chen P, Aso T, Sasaki R, Ashida M, Tsutsumi Y, Doi H, et al. Adhesion and differentiation behaviors of mesenchymal stem cells on titanium with micrometer and nanometer-scale grid patterns produced by femtosecond laser irradiation. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2018;106(10):2735–43. doi: 10.1002/jbm.a.36503. PMID: 30055042.

Chen X, Karpukhina N, Brauer DS, Hill RG. High chloride content calcium silicate glasses. *Phys Chem Chem Phys.* 2017;19(10):7078–85. doi: 10.1039/c6cp07905a. PMID: 28225127.

Chen X, Karpukhina N, Brauer DS, Hill RG. Novel highly degradable chloride containing bioactive glasses. *Biomed Glas.* 2015;1(1):108–18. doi: 10.1515/bglass-2015-0010.

Cloupeau M, Prunet-Foch B. Electrostatic spraying of liquids: Main functioning modes. *J Electrostat.* 1990;25(2):165–84. doi: 10.1016/0304-3886(90)90025-Q.

Costa VC, Costa HS, Vasconcelos WL, Pereira M de M, Oréface RL, Mansur HS. Preparation of hybrid biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Res.* 2007;10(1):21–6. doi: 10.1590/S1516-14392007000100006.

Daubert D, Black RM, Chrepa V, Kotsakis GA. Endodontic peri-implant defects: a new disease entity. *J Endod.* 2020;46(3):444–8. doi: 10.1016/j.joen.2019.12.002. PMID: 31959483.

Dawson DR, El-Ghannam A, Van Sickels JE, Naung NY. Tissue engineering: what is new? *Dent Clin North Am.* 2019;63(3):433–45. doi: 10.1016/j.cden.2019.02.009. PMID: 31097136.

de Souza JR, Sato TP, Borges ALS. Scaffold architecture for dental biomaterials: influence of process parameters on the structural morphology of chitosan electrospun fibers. *Braz Dent Sci.* 2017 Dec;20(4):100-5. doi: 10.14295/bds.2017.v20i4.1495.

Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer (Guildf).* 2001 Jan;42(1):261-72. doi: 10.1016/S0032-3861(00)00250-0.

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.

Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostat.* 1995 Aug;35:151-60. doi: 10.1016/0304-3886(95)00041-8.

Dhar P, Katiyar V. Thermal degradation kinetics of polylactic acid / acid fabricated cellulose nanocrystal based bionanocomposites. *Int J Biol Macromol.* 2017 Nov;104(Pt A):827–36. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.039. Epub 2017 jun 23. PMID: 28648639.

Falisi G, Galli M, Vittorini-Velasquez P, Gallegos-Rivera JC, Minasi R, De Biase A, et al. Use of 3D cartilage scaffolds for the stabilization of implants and bone regeneration with the fit-lock technique. *Acta Odontol Latinoam.* 2013;26(3):167–72. PMID: 25335370.

Fathi-Achachelouei M, Knopf-Marques H, Ribeiro da Silva CE, Barthès J, Bat E, Tezcaner A, et al. Use of nanoparticles in tissue engineering and regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7(May):1–22. doi: 10.3389/fbioe.2019.00113.

Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chemie Int Ed.* 2007 July;46(30):5670-703. doi: 10.1002/anie.200604646.

Han YJ, Loo SCJ, Lee J, Ma J. Investigation of the bioactivity and biocompatibility of different glass interfaces with hydroxyapatite, fluorohydroxyapatite and 58S bioactive glass. *BioFactors.* 2007;30(4):205–16. doi: 10.1002/biof.5520300402. PMID: 18607070.

Huang K, Cai S, Xu G, Ren M, Wang X, Zhang R, et al. Sol-gel derived mesoporous 58S bioactive glass coatings on AZ31 magnesium alloy and in vitro degradation behavior. *Surf Coatings Technol.* 2014;240:137–44. doi: 10.1016/j.surfcoat.2013.12.026.

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

Jordan RCK. Diagnosis of periodontal manifestations of systemic diseases. *Periodontol 2000.* 2004;34:217–29. doi: 10.1046/j.0906-6713.2002.003433.x. PMID: 14717864.

Jun Z, Hou H, Schaper A, Wendorff JH, Greiner A. Poly-L-lactide nanofibers by electrospinning - influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology. *E-Polymers.* 2003;3(1):1–9. doi: 10.1515/epoly.2003.3.1.102.

Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal Regeneration – intrabony defects: a systematic review from the aap regeneration workshop. *J Periodontol.* 2015;86(2-s):S77–104. doi: 10.1902/jop.2015.130685. PMID: 25216204.

Kaur G, Pandey OP, Singh K, Homa D, Scott B, Pickrell G. A review of bioactive glasses: their structure, properties, fabrication and apatite formation. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(1):254–74. doi: 10.1002/jbm.a.34690. PMID: 23468256.

Kellomäki M, Törmälä P. Processing of resorbable poly-alpha-hydroxy acids for use as tissue-engineering scaffolds. *Methods Mol Biol.* 2004;238(7):1–10. doi: 10.1385/1-59259-428-x:1. PMID: 14970434.

Kim H, Che L, Ha Y, Ryu W. Mechanically-reinforced electrospun composite silk fibroin nanofibers containing hydroxyapatite nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol appl.* 2014 Jul 1;40:324–35. doi: 10.1016/j.msec.2014.04.012. Epub 2014 Apr 12. PMID: 24857500.

Kim JW, Lee H, Lim HK, Kim JW, Byun SH, Choi YJ, Lee UL. Orthognathic surgery deteriorates the osseointegration of dental implants: a propensity-matched multicentre cohort study. *J Oral Rehabil.* 2018;45(12):967–73. doi: 10.1111/joor.12705. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30125391.

Kulanthaivel S, Roy B, Agarwal T, Giri S, Pramanik K, Pal K, et al. Cobalt doped proangiogenic hydroxyapatite for bone tissue engineering application. *Mater Sci Eng C*. 2016;58:648–58. doi: 10.1016/j.msec.2015.08.052. PMID: 26478356.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 may 14;260(5110):920–6. doi: 10.1126/science.8493529. PMID: 8493529.

Laschke MW, Strohe A, Menger MD, Alini M, Eglin D. In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2010;6(6):2020–7. doi: 10.1016/j.actbio.2009.12.004. PMID: 20004748.

Leclerc L, Rima W, Boudard D, Pourchez J, Forest V, Bin V, et al. Size of submicrometric and nanometric particles affect cellular uptake and biological activity of macrophages in vitro. *Inhal Toxicol*. 2012;24(9):580–8. doi: 10.3109/08958378.2012.699984. PMID: 22861001.

Lee S, Matsugaki A, Kasuga T, Nakano T. Development of bifunctional oriented bioactive glass/poly(lactic acid) composite scaffolds to control osteoblast alignment and proliferation. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2019;107(5):1031–41. doi: 10.1002/jbm.a.36619. PMID: 30675975.

Li G, Zhou T, Lin S, Shi S, Lin Y. Nanomaterials for craniofacial and dental tissue engineering. *J Dent Res*. 2017;96(7):725–32. doi: 10.1177/0022034517706678. PMID: 28463533.

Li TS, Hamano K, Suzuki K, Ito H, Zempo N, Matsuzaki M. Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Aug;283(2):H468–73. doi: 10.1152/ajpheart.00261.2002. PMID: 12124190.

Li TT, Ling L, Lin MC, Jiang Q, Lin Q, Lin JH, Lou CW. Properties and mechanism of hydroxyapatite coating prepared by electrodeposition on a braid for biodegradable bone scaffolds. *Nanomaterials (Basel)*. 2019 May 2;9(5):679. doi: 10.3390/nano9050679. PMID: 31052501;PMCID: PMC6567105.

Lin CC, Chen SF, Leung KS, Shen P. Effects of CaO/P₂O₅ ratio on the structure and elastic properties of SiO₂–CaO–Na₂O–P₂O₅ bioglasses. *J Mater sci Mater Med*. 2012 Feb;23(2):245–58. doi: 10.1007/s10856-011-4504-3. Epub 2011 Nov 23. PMID: 22109904.

Lin M, Lou C, Lin J, An T, Chen Y. Biodegradable polyvinyl alcohol vascular stents : structural model and mechanical and biological property evaluation. *Mater Sci Eng C*. 2018;91(May):404–13. doi: 10.1016/j.msec.2018.05.030.

Lin WC, Chuang CC, Wang PT, Tang CM. A comparative study on the direct and pulsed current electrodeposition of cobalt-substituted hydroxyapatite for magnetic resonance imaging application. *Materials (Basel)*. 2018 Dec 31;12(1):116. doi: 10.3390/ma12010116. PMID: 30602692; PMCID: PMC6337257.

Lopresti F, Carfi Pavia F, Vitrano I, Kersaudy-Kerhoas M, Brucato V, La Carrubba V. Effect of hydroxyapatite concentration and size on morpho-mechanical properties of PLA-based randomly oriented and aligned electrospun nanofibrous mats. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020;101(September 2019):103449. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.103449. PMID: 31563845.

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;254(2):317–30.

Marie PJ. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. *Osteoporos Int*. 2005;16(SUPPL. 1):7–10. doi: 10.1007/s00198-004-1753-8. PMID: 15578159.

Mirzaei S, Karkhaneh A, Soleimani M, Ardeshirylajimi A, Seyyed Zonouzi H, Hanaee-Ahvaz H. Enhanced chondrogenic differentiation of stem cells using an optimized electrospun nanofibrous PLLA/PEG scaffolds loaded with glucosamine. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2017;105(9):2461–74. doi: 10.1002/jbm.a.36104. PMID: 28481047.

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*. 2018;91(November 2017):349–60. doi: 10.1016/j.msec.2018.05.058. 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;9(68):401–19. doi: 10.1098/rsif.2011.0611.

Naung NY, Shehata E, Van Sickels JE. Resorbable versus nonresorbable

membranes: when and why? *Dent Clin North Am.* 2019;63(3):419–31. doi: 10.1016/j.cden.2019.02.008. PMID: 31097135.

Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Nanofiber diameter as a critical parameter affecting skin cell response. *Eur J Pharm Sci.* 2015;66:29–35. doi: 10.1016/j.ejps.2014.09.022. PMID: 25301202.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005;366(9499):1809–20. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67728-8. PMID: 16298220.

Pilmane M, Salma-Ancane K, Loca D, Locs J, Berzina-Cimdina L. Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. *Mater Sci Eng C.* 2017;78:1222–30. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.042. PMID: 28575961.

Qian J, Xu W, Yong X, Jin X, Zhang W. Fabrication and in vitro biocompatibility of biomorphic PLGA/nHA composite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 2014;36(1):95–101. doi: 10.1016/j.msec.2013.11.047. PMID: 24433891.

Reneker DH, Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology.* 1996;7:216–23.

Rezabeigi E, Wood-adams PM, Drew RAL. Synthesis of 45S5 Bioglass ® via a straightforward organic , nitrate-free sol – gel process. *Mater Sci Eng C.* 2014;40:248–52. doi: 10.1016/j.msec.2014.03.042.

Ruiz M, Marín san H, Arenas B, Gómez M, Martínez-González. Injertos sustitutos no óseos . Aportaciones del ácido poliláctico y poliglicólico. *Av Periodon Implant.* 2009;21:45–52.

Sachot N, Castaño O, Oliveira H, Martí-Muñoz J, Roguska A, Amedee J, et al. A novel hybrid nanofibrous strategy to target progenitor cells for cost-effective: In situ angiogenesis. *J Mater Chem B.* 2016;4(43):6967–78. doi: 10.1039/c6tb02162j.

Sahana TG, Rekha PD. Biopolymers: applications in wound healing and skin tissue engineering. *Mol Biol Rep.* 2018;45(6):2857–67. doi: 10.1007/s11033-018-4296-3. PMID: 30094529.

Saravanakumar B, Rajkumar M, Rajendran V. Synthesis and characterisation of

nanobioactive glass for biomedical applications. *Mater Lett.* 2011;65(1):31–4. doi: 10.1016/j.matlet.2010.09.053.

Saravanakumar K, Ali DM, Kathiresan K, Wang M-H. 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.

Sarmast ND, Wang HH, Sajadi AS, Angelov N, Dorn SO. Classification and clinical management of retrograde peri-implantitis associated with apical periodontitis: a proposed classification system and case report. *J Endod.* 2017;43(11):1921–4. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.034. PMID: 28822567.

Sedghi R, Shaabani A, Sayyari N. Electrospun triazole-based chitosan nanofibers as a novel scaffolds for bone tissue repair and regeneration. *Carbohydr Polym.* 2020;230(December 2019):115707. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115707. PMID: 31887957.

Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *J Biomed Mater Res.* 2002;61(2):301–11. doi: 10.1002/jbm.10207. PMID: 12007211.

Shen R, Xu W, Xue Y, Chen L, Ye H, Zhong E, et al. The use of chitosan/PLA nano-fibers by emulsion eletrospinning for periodontal tissue engineering. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2018;46(sup2):419–30. doi: 10.1080/21691401.2018.1458233. PMID: 29661034.

Shi Q, Luo X, Huang Z, Midgley AC, Wang B, Liu R, et al. Cobalt-mediated multi-functional dressings promote bacteria-infected wound healing. *Acta Biomater.* 2019 Mar 1;86:465–79. doi: 10.1016/j.actbio.2018.12.048. PMID: 30599244.

Shi Q, Zhang B, Xing H, Yang S, Xu J, Liu H. Patients with chronic obstructive pulmonary disease suffer from worse periodontal health-evidence from a meta-analysis. *Front Physiol.* 2018 jan;25;9:33. doi: 10.3389/fphys.2018.00033. PMID: 29422870; PMCID: PMC5788941.

Silver IA, Deas J, Erecińska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: Effects of 45S5 Bioglass(®), and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials.* 2001;22(2):175–85. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00173-3. PMID: 11101161.

Singh BN, Veeresh V, Mallick SP, Jain Y, Sinha S, Rastogi A, et al. Design and evaluation of chitosan/chondroitin sulfate/nano-bioglass based composite scaffold for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2019;133:817–30. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.107. PMID: 31002908.

Singla R, Abidi SMS, Dar AI, Acharya A. Nanomaterials as potential and versatile platform for next generation tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2019;107(7):2433–49. doi: 10.1002/jbm.b.34327. PMID: 30690870.

Solanki AK, Lali FV, Autefage H, Agarwal S, Nommeots-Nomm A, Metcalfe AD, et al. Bioactive glasses and electrospun composites that release cobalt to stimulate the HIF pathway for wound healing applications. *Biomater Res*. 2021;25(1):1–16. doi: 10.1186/s40824-020-00202-6.

Taylor G, Dyke MD Van. Electrically driven jets. *Proc Roy Soc Lond A*. 1969;313:453–75.

Vas WJ, Shah M, Al Hosni R, Owen HC, Roberts SJ. Biomimetic strategies for fracture repair: engineering the cell microenvironment for directed tissue formation. *J Tissue Eng*. 2017;8:14. doi: 10.1177/2041731417704791. PMID: 28491274.

Veiga-lopez A, Pu Y, Gingrich J, Padmanabhan V. Obesogenic endocrine disrupting chemicals: identifying knowledge gaps. *Trends Endocrinol Metab*. 2018 Sep;29(9):607–25. doi: 10.1016/j.tem.2018.06.003.

Vieira S, Vial S, Reis RL, Oliveira JM. Nanoparticles for bone tissue engineering. *Biotechnol Prog*. 2017 May;33(3):590–611. doi: 10.1002/btpr.2469. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28371447.

Wang Y, Morita K. Measurement of the phase diagram of the SiO₂-CaCl₂ system and liquid area study of the SiO₂-CaO-CaCl₂ system. *Metall Mater Trans B Process Metall Mater Process Sci*. 2016;47(3):1542–7. doi: 10.1007/s11663-016-0641-x.

Williamms DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(30):5897-909. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027. PMID: 19651435.

Wu C, Chang J. Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective

delivery of therapeutic ions and drug/growth factors. *J Control Release*. 2014;193:282–95. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.026. PMID: 24780264.

Wu C, Ramaswamy Y, Soeparto A, Zreiqat H. Incorporation of titanium into calcium silicate improved their chemical stability and biological properties. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2008;86(2):402–10. doi: 10.1002/jbm.a.31623. PMID: 17969034.

Wu C, Zhou Y, Fan W, Han P, Chang J, Yuen J, et al. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33(7):2076–85. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.042. PMID: 22177618.

Wu C, Zhou Y, Xu M, Han P, Chen L, Chang J, et al. Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. *Biomaterials*. 2013;34(2):422–33. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.066. PMID: 23083929.

Wu X, Meng G, Wang S, Wu F, Huang W, Gu Z. Zn and Sr incorporated 64S bioglasses: Material characterization, in-vitro bioactivity and mesenchymal stem cell responses. *Mater Sci Eng C*. 2015;52:242–50. doi: 10.1016/j.msec.2015.03.057. PMID: 25953564.

Xu W, Shen R, Yan Y, Gao J. Preparation and characterization of electrospun alginate/PLA nanofibers as tissue engineering material by emulsion eletrospinning. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017;65:428–38. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.09.012. PMID: 27657813.

Zheng Y, Yang Y, Deng Y. Dual therapeutic cobalt-incorporated bioceramics accelerate bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Jun;99:770–82. doi: 10.1016/j.msec.2019.02.020. PMID: 30889752.

ANEXO A —Certificado do Comitê de ética



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 01/2021, intitulado:- **BIOMATERIAL POLIMÉRICO OBTIDO POR ELETROFIAÇÃO: NANOFIBRAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO 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 |

São José dos Campos, 22 de fevereiro de 2021

Prof. Dra **ANDREA CARVALHO DE MARCO**
COORDENADORA/CEUA

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 19/2020, intitulado:-