



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

GABRIELA FERNANDES DA FONSECA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* DE
PCL/BIOVIDRO: estudo *in vitro* da biocompatibilidade e da
diferenciação celular**

2018

GABRIELA FERNANDES DA FONSECA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* DE PCL/BIOVIDRO:
estudo *in vitro* da biocompatibilidade e da diferenciação celular**

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

Área de Prótese Dentária. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de biomateriais e novas tecnologias em odontologia.

Orientador: Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges

Coorientador: Dr. Tiago Moreira Bastos Campos

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. 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).

Fonseca, Gabriela Fernandes

Síntese e caracterização de scaffolds de Pcl/Biovidro: estudo in vitro da biocompatibilidade e da diferenciação celular / Gabriela Fernandes Fonseca.
- São José dos Campos : [s.n.], 2018.
68 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, 2018.

Orientador: Alexandre Luiz Souto Borges

Coorientador: Tiago Moreira Bastos Campos

1. Biocompatibilidade. 2. Scaffold. 3. Tecido ósseo. 4. Osteogênese. I. Borges, Alexandre Luiz Souto , orient. II. Campos, Tiago Moreira Bastos , coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Fábio da Silva Matuda

Faculdade de ciência da saúde (Univap)

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 14 de Dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Primeiramente dedico este trabalho a Deus, pois sem acreditar que ele guiaria meus caminhos, eu não estaria aqui.

Além de ser meu guia, Deus me deu o meu maior presente que foi a minha mãe a qual dedico este trabalho de uma forma especial, pois foi por ela e por minha amada avó que tudo começou há seis anos. Sem dúvida alguma, valeu a pena cada lágrima pela distância, cada gota de suor da minha mãe pra me manter aqui e cada data perdida pra que minha missão fosse concluída com sucesso.

Quando concluí minha graduação, entreguei o diploma nas mãos da minha avó Sebastiana e disse que aquele título era dela, pra ela, e agora mãe eu digo o mesmo pra senhora, esse título de Mestre é inteiramente seu, pra você e por você. Com todo amor do mundo eu dedico exclusivamente a senhora, mãe!

AGRADECIMENTOS

Tenho tanto a agradecer, e gostaria de iniciar por aqueles que tornaram meus dias mais leves com boas risadas; Jéssica, Nathalia, Poly, Pedro Prado, Vander, Jaiane, Daphne, Amanda, João, Marcão, Fernandinho, Ju, Lilian, Alice, Gabriela Monteiro e tantos outros que peço desculpa por não cita-los.

Agradeço aos meus queridos amigos Jéssica, Nathalia, Poly e Pedro por todos os momentos descontraídos que passamos juntos, pelas “gordices,” conselhos. Lembrarei de vocês com muito carinho e saudade.

Ao Vander vulgo Valdemiro, eu tenho que te agradecer não só por me fazer sorrir, mas por estar SEMPRE ao meu lado, só nós sabemos o quanto nos apoiamos nessa árdua tarefa. Você me proporcionou uma amizade vander que eu sempre levarei comigo e é com os olhos marejados que digo isso, pois você é uma pessoa incrível que sempre me deu suporte e estímulo pra continuar. Serei eternamente grata por seu companheirismo!

A vocês; Amanda, João, Daphne e Jaiane eu agradeço por todos os ensinamentos profissionais que com tanta disposição me passaram. Vocês auxiliaram pra que eu crescesse e me tornasse uma pessoa e profissional melhor. Serei eternamente grata por cada lição que aprendi com vocês.

Ao quarteto fantástico; Fernandinho, Marcão, Lilian e Ju, vocês foram pessoas iluminadas na minha trajetória nessa instituição. Aprendi com vocês a sorrir mais e tentar reclamar menos da vida, aprendi a me silenciar quando a razão deixava de existir e que até as piadas do Fernandinho podem secar lágrimas que insistem em cair. Obrigada por tudo, quarteto!

As minhas companheiras de república Gabriela e Alice, sou grata pela forma extremamente gentil com que vocês me acolheram e transformaram o meu último ano aqui em dias melhores. Vocês me mostraram que nem tudo é o que parece e que respeito, carinho e amizades reais se conquistam no dia a dia. Muito obrigada por toda paciência e acolhimento!

Aos meus familiares; Thais, vó Maria, vó Sebastiana, Larissa, Ítala e meus pais

Geraldo e Valmir. Vocês iluminam minha vida como anjos, sempre orando e torcendo por minha felicidade e sucesso. Vocês são responsáveis por uma base sólida de confiança e esperança que me permite ir além cada vez mais. Obrigada por toda fé que sempre depositaram em mim!

Por último, mas não menos importante quero agradecer ao meu orientador, Alexandre, coorientador, Tiago e a professora Luana Marota por todo suporte pra que este trabalho fosse realizado. Vocês me instruíram e me ensinaram durante essa tarefa tão difícil, mas compensadora que é a pesquisa. Sou grata por terem “aberto as portas e me mostrado esse novo mundo”.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Métodos de produção de biomateriais.....	15
2.2 Eletrofiação.....	16
2.3 Policaprolactona (PCL).....	16
2.4 Tecido ósseo e doenças que o acometem.....	17
2.5 Biomaterias.....	18
2.6 Biovidros.....	19
2.7 Biovidro por Fusão.....	19
2.8 Biovidro por Sol-gel.....	20
3 PROPOSIÇÃO.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Síntese dos Biovidros.....	23
4.1.1 Método de fusão/resfriamento.....	23
4.1.2 Rota Sol-Gel.....	24
4.2 Preparo da solução de PCL com Biovidro.....	25
4.3 Soluções de PCL com adição de dois diferentes métodos de obtenção de Biovidro.....	26
4.4 Síntese das Nanofibras: técnica da eletrofiação.....	26
4.5 Síntese dos <i>scaffolds</i> de PCL e PCL/Biovidro	27
4.6 Testes para caracterização das NFs sintetizadas.....	28
4.6.1 Análise de superfície com Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo.....	29

4.6.2 Análise do diâmetro médio das fibras.....	30
4.6.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato.....	31
4.6.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	31
4.6.5 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	30
4.7 Cultura Celular.....	32
4.7.1 Determinação da viabilidade celular (MTT).....	34
4.7.2 Conteúdo de Proteína Total.....	34
4.7.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	35
4.7.4 Adesão celular.....	36
4.7.5 Formação dos nódulos de mineralização.....	36
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6 RESULTADOS.....	38
6.1 Microscopia Eletrônica por emissão de campo (FEG).....	38
6.1.1 Média da espessura das nanofibras.....	41
6.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier....	42
6.3 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	44
6.4 Determinação da viabilidade celular (MTT).....	46
6.5 Conteúdo de Proteína Total.....	47
6.6 Conteúdo de Fosfatase Alcalina.....	48
6.7 Adesão celular.....	49
6.8 Formação de nódulos de mineralização.....	51
6.9 Potencial Zeta.....	55
7 DISCUSSÃO.....	56
8 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Atividade de fosfatase alcalina
EDS	Spectroscopia de energia dispersiva
FEG	Microscopia Eletrônica por emissão de campo
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTS	Meio Total Suplementado
MTS-O	Meio Total Suplementado Osteogênico
MTT	Determinação da viabilidade celular
NFs	Nanofibras
PCL	Policaprolactona
<i>Scaffold</i>	Arcabouço de biomaterial

Fonseca GF. Síntese e caracterização de *scaffolds* de Pcl/Biovidro: estudo *in vitro* da biocompatibilidade e da diferenciação celular [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

As membranas reabsorvíveis tem sido utilizadas para promover o crescimento ósseo em defeitos causados por doenças periodontais, periapicais ou por exodontia. Essas membranas possuem diversas composições, podendo ter em sua estrutura polímeros como Policaprolactona (PCL) que combinado com o biovidro que facilita a neoformação óssea. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um *scaffold* de PCL com 10% de biovidro obtido por meio de duas rotas, Fusão e Sol-Gel. Foram preparadas soluções de 15% PCL dissolvidos em acetona pura e incorporados 10% de biovidro de acordo com meio de obtenção das partículas, resultando em 3 soluções: Controle: somente PCL, e dois grupos experimentais: PCL/Biovidro, divididas de acordo com o tipo de produção das partículas de biovidro: PCL/biov. fusão - solução de PCL com 10% de Biovidro por fusão e PCL/biov. Sol-Gel - solução de PCL com 10% de Biovidro Sol-Gel. A solução foi eletrofiada com os seguintes parâmetros: 12 kv, 12 cm de distância ponta/coletor e fluxo de 1ml/h. As mantas obtidas tiveram suas propriedades físico/químicas e biológicas analisadas por: Morfologia (MEV e FEG), propriedades físico-químicas; (Análise do diâmetro médio das fibras, Ângulo de contato, EDS, FTIR) e Celular: MTT, Fosfatase alcalina, Adesão celular, Proteína total e Formação de nódulos de mineralização. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelos testes ANOVA e Tukey (5%) e os resultados apresentados em gráficos e tabelas. Foi evidenciado a incorporação das partículas de biovidro nas fibras de PCL, tal incorporação proporcionou características como maior porcentagem de fosfatase alcalina (ALP) e formação de matriz óssea quando comparado a fibra de PCL sem a presença de biovidro. O *scaffold* de PCL proporcionou um meio favorável para adesão e proliferação celular, e a adição das partículas de biovidro intensificaram o processo de formação de matriz óssea, principalmente o biovidro obtido pelo método sol-gel, atuando de forma ativa no processo de regeneração e favorecendo uma reparação adequada no defeito ósseo.

Palavras-chave: Biocompatibilidade. *Scaffold*. Tecido ósseo. Osteogênese.

Fonseca GF. Characterization and synthesis of Pcl/Bioglass scaffolds: An in vitro study about biocompatibility and celular diferenciacion [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Resorbable membranes have been used to promote bone growth in defects caused by periodontal, periapical or exodontic diseases. These membranes have several compositions, and can have in their structure polymers such as polycaprolactone (PCL) that combined with the bioglass that facilitates the bone formation. The objective of this research was to develop a PCL scaffold with 10% bioglass obtained through two routes, Fusion and Sol-Gel. A solution of 15% PCL dissolved in pure acetone and incorporated in 10% of bioglass according to the medium of the particles was prepared, resulting in 3 solutions: Control: PCL only, and two experimental groups: PCL/Biovidro, divided according to type of production of the bioglass particles: PCL/biov. fusão - PCL solution with 10% of Bioglass by melting and PCL / biov.Sol-Gel - PCL solution with 10% of bio.sol-gel. The solution was electrophied with the following parameters: 12 kv, 12 cm tip / collector distance and 1ml / h flow. The obtained blankets had their physical / chemical and biological properties analyzed by: Morphology (SEM and FEG), physicochemical properties; (Analysis of mean fiber diameter, contact angle, EDS, FTIR) and Cellular: MTT, alkaline phosphatase, cell adhesion, total protein and formation of mineralization nodules. The data were analyzed statistically by ANOVA and Tukey tests (5%) and the results presented in graphs and tables. It was evidenced the incorporation of the bioglass particles in the PCL fibers, such incorporation provided characteristics as a higher percentage of alkaline phosphatase (ALP) and formation of bone matrix when compared to PCL fiber without the presence of bioglass. The PCL scaffold provided a favorable medium for adhesion and cell proliferation, and the addition of the bioglass particles intensified the process of bone matrix formation, mainly the bioglass obtained by the sol-gel method, acting actively in the regeneration process and favoring adequate repair of the bone defect.

Keywords: Biocompatibility. Scaffold. Bone Tissue. Osteogenesis.

1 INTRODUÇÃO

A ausência de elementos dentários por fatores como extração, doença periodontal crônica e infecções periapicais ocasionam um processo de cicatrização acelerado, tendo como consequência o colapso dos tecidos moles e ósseo (Lin et al., 2008; Marton et al., 2017; Vaca-Cornejo et al., 2017). Consequentemente, essas condições levam a perda óssea, tornando a instalação de próteses ou implantes um desafio para o profissional, visto que a ausência de suporte ósseo não permite uma adequada reabilitação tanto funcional quanto estética.

Para reestabelecer a porção óssea perdida e restaurar o equilíbrio no organismo, biomateriais são utilizados (Sinhoreti et al., 2013). Os biomateriais devem apresentar características que os tornem compatíveis com o corpo humano, permitindo sua utilização de forma confiável e eficaz, além disso, é importante que o biomaterial, de acordo com sua composição, apresente a capacidade de induzir o organismo a produzir um determinado tecido (Guastaldi, Aparecida, 2010). Dentre à classe dos biomateriais utilizados têm-se as membranas reabsorvíveis. Essas membranas atuam como uma barreira entre o tecido conjuntivo e o tecido ósseo, evitando a proliferação de tecido mole no interior do defeito ósseo e propiciando o crescimento de células osteogênicas (Gordh et al., 1998). Essas membranas podem ser compostas por polímeros como Poli-ácido láctico (PLA), Poli-ácido glicólico (PGA) e Policaprolactona (PCL) (Bottino et al., 2011).

Um estudo anterior utilizou PCL para reconstituição de tecidos, no qual foi observado o crescimento de cardiomiócitos sobre os *scaffolds* (Gishto et al., 2015). Além disso, fibras de PCL são confeccionadas com substâncias

adicionais como antimicrobianos, para atuarem como carreadoras de fármacos permitindo uma aplicação local do medicamento com potencial efeito satisfatório, inibindo de forma parcial ou total o crescimento bacteriano sobre a superfície de aplicação.

Para confecção e aplicação desses *scaffolds* de PCL é associado outro biomaterial que possa aumentar a resistência e eficácia dessa estrutura. Para tal feito, geralmente é realizado a incorporação de biovidros na fibra de PCL. Assim como o PCL, o biovidro apresenta uma ótima biocompatibilidade, biodegradabilidade, além de possuir a característica de bioatividade o que facilita a neoformação óssea (Shankhwar et al., 2016). Bem como a liberação de íons que provocam uma resposta intra e extra-celular de rápida reparação óssea (Sharifi et al., 2016).

A capacidade indutora e condutora de tecido ósseo produzida pelo biovidro ocorre devido a sua superfície de hidroxicarbonato apatita, auxiliando a adesão, proliferação e o metabolismo de osteoblastos. Além disso, o material pode ser utilizado para estabilizar a taxa de degradação e estabilidade de alguns polímeros, aumentando o tempo de vida útil dos *scaffolds* (Rizwan et al., 2017).

Para a realização deste trabalho o biovidro 45S5, foi o material de escolha para formar o composto com o PCL por apresentar aspectos positivos já bem descritos na literatura, como por exemplo, propriedades com potencial de diferenciação e adesão celular devido à formação de grupos de fosfato de cálcio em sua superfície quando em contato com meio aquoso, proporcionando a neoformação óssea (Silva et al., 2011). Além disso, essa propriedade proporciona ao material a capacidade de rápida ligação com o tecido ósseo, a qual não ocorre da mesma forma em outros tipos de biovidros (Jones, 2015).

Entre os diferentes métodos para a sintetização de *scaffolds* utilizando biomateriais, a eletrofiação aparece como um instrumento eficiente para produção dessas estruturas (Shao et al., 2017). Esta metodologia proporciona

vantagens como um baixo custo e fácil manipulação, aspectos que auxiliam na obtenção de fibras consistentes e homogêneas (Greiner, Wendorff, 2007). Por essas características, a eletrofiação foi escolhida para sintetizar os *Scaffolds* de PCL/biovidro idealizados neste estudo.

.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Métodos de produção de biomateriais

Para a produção de biomateriais diferentes técnicas podem ser utilizadas, dentre elas tem-se as técnicas de Síntese Template, Separação de Fase e Eletrofiação (Feng et al., 2002). Todos os métodos possuem vantagens e desvantagens, as quais cabem ao pesquisador selecionar a melhor técnica de acordo com os objetivos do trabalho. Na técnica de Síntese Template, a solução é injetada sob alta pressão em um molde previamente preparado, com características como a porosidade pré-definido, tendo como resultados fibras alinhadas e com diâmetros variados (Feng et al., 2002).

A técnica de produção do tipo Separação de Fases, consiste em 4 etapas, em um primeiro momento é sintetizado a solução a qual em seguida é levada a baixas temperaturas para congelar o solvente e por fim, é realizado a liofilização do material para a confecção da matriz porosa (Ma, Zhang, 1999; Hiraoka, 2015). Já o método de impressão 3D, permite a sintetização de *scaffolds* por técnicas como a baseada por extrusão (EB), utilizando-se de agulhas coaxiais permite a confecção de estruturas pré-definidas (Sarker et al., 2018). Apresentando resultados positivos na sintetização de biomaterias, a eletrofiação é um método eficiente para a confecção dessas estruturas (Shao et al., 2017). Permitindo a produção de *scaffolds* com baixo custo, fácil manipulação e com fibras consistentes (Greiner, Wendorff, 2007).

2.2 Eletrofiação

O método por eletrofiação foi o escolhido para a realização deste trabalho, sendo necessário uma solução polimérica com viscosidade suficiente para criar uma tensão superficial, a qual é injetada em um campo elétrico formado por aplicação de alta tensão (Costa et al., 2012) uma vez rompida a tensão superficial da solução, ocorre a formação de fibras em escala nanométrica, submicrométricas ou micrométrica as quais são depositadas em um anteparo metálico (Doshi, Reneker, 1995; Instrumentação, 2012).

O processo de eletrofiação permite a obtenção de fibras com porosidade (Thakkar, Misra, 2017) fazendo com que a fibra reproduza características do tecido procedente, visto que sua porosidade permitirá a formação de uma vascularização sobre o *scaffold* e consequentemente a adesão e proliferação celular (Loh, Choong, 2013; Thakkar, Misra, 2017). Segundo Engler et al. (2004) quanto mais semelhante a estrutura for da matriz extracelular melhor foi a resposta celular (Engler et al., 2004). Um estudo recente, demonstra que tanto o PCL como o biovidro atuam como biomateriais que possibilitam a formação de um fibra com características semelhantes a matriz-extracelular (Keothongkham et al., 2017).

2.3 Policaprolactona (PCL)

Dentre os polímeros utilizados para produção de biomateriais por sintetização por eletrofiação, a Policaprolactona (PCL), foi o polímero de

escolha deste trabalho por apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas que lhe caracterizam com uma boa resistência mecânica e baixa taxa de degradação (Thuaksuban et al., 2018). O PCL pode ser utilizado de forma individual ou em conjunto com outras substâncias para a produção de diversas estruturas, podendo ser empregado desde a regeneração de cartilagem a tecido nervoso (Groppo et al., 2017). Devido as suas características, estruturas que contem PCL são capazes de promover a mineralização e regeneração de tecidos como o tecido ósseo (Cheng et al., 2016).

2.4 Tecido ósseo e doenças que o acometem

O tecido ósseo desempenha um importante papel estrutural e funcional no corpo humano. Dentre suas funções, ele proporciona ancoragem aos elementos dentários, permitindo entre inúmeras características uma eficiência mastigatória (Ozcan, Sekerci, 2017). O tecido ósseo possui uma arquitetura complexa e dinâmica, que lhe confere uma capacidade regenerativa pelo processo de remodelação óssea frente a uma agressão tecidual (Judas et al., 2012). Para que esse processo de remodelação ocorra é de suma importância à atividade de duas células, os osteoclastos e os osteoblastos os quais irão reabsorver o tecido ósseo e promover a deposição de uma nova matriz óssea, respectivamente. Esse processo é constituído por três fases, sendo iniciada pela reabsorção do tecido ósseo danificado pelos osteoclastos e finalizada pela neoformação óssea pelos osteoblastos (Crane, Cao, 2014; Chen et al., 2015).

Doenças bucais inflamatórias como a gengivite e a periodontite afetam cerca de 90% da população mundial segundo (Pihlstrom et al., 2005) essas doenças são caracterizadas por uma inflamação neutrofílica que acomete os

tecidos de proteção e suporte dos elementos dentários, tecidos moles e tecido ósseo, podendo ocasionar a perda dos mesmos (Pihlstrom et al., 2005; Shi et al., 2018; Zhang et al., 2018). Além de tais doenças, a perda óssea e a atrofia da crista alveolar podem ser ocasionadas pela extração do elemento dentário, seja por trauma ou extraído clinicamente por motivos diversos (Kim et al., 2017). Estudos como o de (Schropp et al., 2003) demonstra que após a extração ocorre perda óssea tanto horizontal quanto vertical de até cinquenta por cento em um período de 12 meses.

2.5 Biomaterias

No intuito de minimizar a perda óssea, biomateriais de origem sintética (Aloplásticos) e de origem natural (Xenoenxertos, Enxertos Homólogos, Enxertos Autógenos) são empregados, proporcionando diferentes graus de sucesso no tratamento (Beck, Mealey, 2010). Os biomateriais de origem sintética possuem como objetivo, proporcionar um ambiente semelhante à matriz extracelular para que ocorra diferenciação, adesão e proliferação celular (Strub et al., 2018). O grande desafio dos biomateriais de origem sintética é a mimetização das características do tecido ósseo, requerendo desses *scaffolds* aspectos como resistência o suficiente para dar suporte às células, porosidade e fatores de diferenciação e proliferação celular (Orciani et al., 2017).

2.6 Biovidros

O biovidro possui uma capacidade de bioatividade, interagindo quimicamente com o tecido ósseo, formando resistentes ligações com o tecido, devido à presença de uma camada superficial do biovidro que se assemelha a apatita, sendo composta por estruturas químicas semelhantes à porção inorgânica do tecido ósseo, a qual corresponde a um total de 65% de todo o tecido (Farias, 2016; Aguiar et al., 2017). Essa bioatividade, torna o biovidro protagonista do processo de diferenciação celular e osteogênese, excluindo a presença de fatores indutores de crescimento ósseo, diferenciando de trabalhos como o de Heydari et al. (2017) em que se utiliza osteoindutores incorporados aos *scaffolds*, ao invés de explorar a capacidade osteoindutora e osteocondutora do biovidro (Heydari et al., 2017). Neste estudo o biovidro não é apenas um agregado na membrana reabsorvível, e sim o principal fator de desenvolvimento de tecido ósseo.

2.7 Biovidro por Fusão

Para a obtenção de biovidro, os métodos Sol-Gel e Fusão são os mais utilizados (Roy et al., 2017). A técnica por fusão possui como vantagens a simples reprodutibilidade, alto rendimento e baixo custo de produção, porém a área de superfície das partículas obtidas por fusão é inferior a das obtidas por Sol-Gel, além de possuir reduzidos grupos funcionais devido à alta temperatura necessária para calcinação do biovidro por fusão, acarretando em uma menor interação com o meio (Hench, Jones, 2005).

2.8 Biovidro por Sol-gel

O método de síntese por Sol-Gel proporciona a obtenção de partículas de biovidro com características únicas (Lefebvre et al., 2008) . O processo consiste de duas etapas principais: hidrólise e condensação, durante a síntese são usados sais de cátions como precursores de sílica e sais metálicos, que geralmente são nitratos (Cividanes et al., 2010). Esses cátions se ligam a sílica formando um vidro com baixa temperatura de fusão. Permitindo assim, a formação de biovidros em baixa temperatura com formas geométricas complexas e porosidades (Oliveira-Ogliari et al., 2015).

Os nitratos de sódio e cálcio, possuem vantagens como baixo custo, simples composição e alta solubilidade, características que os tornam elementos de escolha para síntese de biovidro por Sol-Gel. Entretanto, é necessário a realização de tratamentos térmicos acima de 600 ° C para remover subprodutos de nitrato, os quais são nocivos as células vivas (Woodhouse et al., 2005; Jones., 2009). A realização desses tratamentos térmicos que vão de 610°C a 800°C, resultam na formação de uma fase cristalina que reduz a bioatividade dos biovidros (Rezwan et al, 2006; Lefebvre et al., 2007) . Essa alteração na bioatividade das partículas, ocorre por reduzir a presença de grupos como a hidroxila na superfície do material (Jones., 2009; Arcos, Vallet-Regí., 2010).

Para evitar a perda de grupos com hidroxila como os grupos silanois (Si-OH) e consequentemente a redução da bioatividade das partículas de biovidro, foi idealizado um biovidro por sol-gel sem a presença de nitrato. Tendo como fonte de sílica, ácido silícico em meio aquoso e como fonte de sódio e cálcio, foram utilizados cloreto de sódio e cloreto de cálcio que são substâncias encontradas no corpo humano. Além disso, foi incorporado fósforo a partir do fosfato de amônio monobásico. Desta forma, esse biovidro com formulação

inovadora, teve como objetivo ser superior aos biovidros encontrados na literatura, uma vez que não é necessário o tratamento térmico em altas temperaturas para a remoção de subprodutos de nitrato, preservando assim sua bioatividade.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

- Produzir um *scaffold* de PCL+Biovidro por eletrofiação para diferenciação celular.

Objetivo específico:

- Analisar a influência de dois diferentes métodos de obtenção de biovidro, Método de fusão/resfriamento e o Método sol-gel, na diferenciação, adesão e proliferação de células mesenquimais obtidas a partir de fêmur de ratos.

As hipóteses testadas neste trabalho são:

H₁: Não existe diferença na influência das partículas de biovidro por fusão e Sol-Gel, sobre o processo de diferenciação e proliferação osteoblástica.

H₂: Todos os *scaffolds* (PCL, PCL/Biovidro por fusão e PCL/Biovidro Sol-Gel), são capazes de induzir a formação de matriz óssea.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados na pesquisa estão citados na tabela 1.

Tabela 1 - Materiais e fabricante

Material	Descrição	Fabricante
PCL	Polímero a base de policaprolactona (Éster)	Sigma-Aldrich
Acetona	Acetona pura	Sigma-Aldrich
Biovidro*	45% de SiO ₂ ; 24,5% de CaO; 24,5% de Na ₂ O e 6% de P ₂ O ₅	Produção própria

Legenda:* Lefebvre et al., 2007

Fonte: Elaborado pela própria autora

4.1 Síntese dos Biovidros

4.1.1 Método de fusão/resfriamento

Para obtenção do biovidro 45S5 foi utilizada a metodologia descrita por Lefebvre et al. (2007) que se baseia nos processos de preparação de vidros convencionais produzidos tradicionalmente, através do método de fusão/resfriamento. Esse método envolve a fusão de uma mistura dos materiais de partida, no caso do biovidro 45S5, correspondente a 45% SiO₂, 24,5% CaO,

24,5% Na_2O e 6,0% P_2O_5 em massa. Os óxidos Na_2O e CaO empregados na síntese foram obtidos a partir de seus respectivos carbonatos.

Em uma etapa prévia à fusão, os reagentes SiO_2 , CaCO_3 e Na_2CO_3 foram misturados em seguida, essa mistura foi levada ao forno para descarbonatação (separação do carbonato de cálcio em óxido de cálcio e dióxido de carbono). A mistura dos óxidos obtida foi armazenada em frascos plásticos em dessecador até o momento do preparo do biovidro. O P_2O_5 foi acrescentado à mistura somente momentos antes do processo de fundição do biovidro, devido sua higroscopicidade (Stachel, Barz, 2007). A fusão do biovidro 45S5 foi realizada em forno a $1350^\circ\text{C}/15$ min, em cadinho ZAS (zircônia-alumina-silício). Posteriormente, o vidro fundido foi vertido em água. O vidro, em forma de fritas, foi recolhido, seco e posteriormente moído em moinho de bolas por 72 h.

4.1.2 Rota Sol-Gel

Para a preparação do biovidro pela rota sol-gel, foi utilizado ácido silícico como precursor pelo processo sol-gel. Uma solução de 1mol/L de Metasilicato de Sódio (Na_2SiO_3) foi usado como precursor na obtenção do ácido silícico. Em seguida, a solução obtida foi misturada com uma resina de troca iônica (IR120 – Rohm and Haas) levando a uma troca entre os íons H^- e Na^- . Posteriormente, essa mistura foi filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo e sua concentração determinada por meio de titulação do ácido silícico com hidróxido de sódio padronizado.

Para titulação, foram formuladas três soluções de 1g de NaOH , 25 mL de água destilada e do 20 mL de SiO_2 em um béquer de 600 mL. Aproximadamente 3 mL de HF foram adicionadas na solução para a neutralização da soda,

formando SiF_6 , indicada por uma cor azulada na solução. Essa mistura foi titulada com NaOH padronizada até o fim da reação, com a formação de Si(OH)_4 , indicada pela cor azul-esverdeado, e o volume utilizado da soda foi anotado. Em seguida, 200 mL de água em ebulição foram adicionadas na solução e a titulação prosseguiu até que a solução apresentasse uma coloração de azul intenso. A partir do volume utilizado, calculou-se a concentração do ácido silícico.

Para a síntese do biovidro pelo processo sol-gel, preparou-se uma solução de ácido silícico com cloreto de cálcio, cloreto de sódio e fosfato de amônio na proporção 45% de SiO_2 ; 24,5% de CaO ; 24,5% de Na_2O e 6% de P_2O_5 em massa, acrescidos de etilenglicol com 20% do volume total da solução.

A solução então foi secada em estufa por 24 h a uma temperatura de 80°C .

4.2 Preparo da solução de PCL com Biovidro

Para a síntese da nanofibra o PCL foi dissolvido em acetona pura, sendo em seguida adicionado o biovidro. Tanto o PCL quanto o Biovidro foram aferidos em uma balança de precisão. O conjunto, Acetona pura, PCL, Biovidro foram colocados em um agitador (IKARH Basic,Staufen, Alemanha) no qual permaneceram por um período de 24 h.

4.3 Soluções de PCL com adição de dois diferentes métodos de obtenção de Biovidro

Para a formulação das soluções de PCL com os diferentes biovidros (Fusão/Resfriamento e Sol-gel), foi estabelecida a concentração de 15% de PCL e 10% de biovidro no volume total da solução como preconizado na literatura (Gönen et al., 2016; Singh, Pramanik, 2017) (Equação 1).

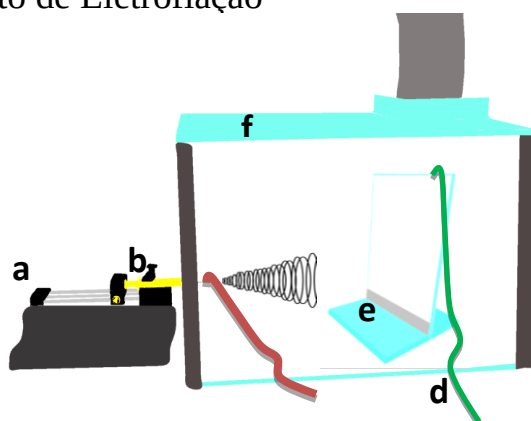
$$C = \frac{m}{V} \quad (1)$$

Onde C é a concentração em porcentagem do biovidro na solução (10%); m é a massa do biovidro (0,15 mg) dividido pelo V, que é o volume da acetona pura (1,5 ml),

4.4 Síntese das Nanofibras: técnica da eletrofiação

Para a confecção das nanofibras (NFs), foi utilizado o equipamento de eletrofiação, sendo sua estrutura composta por uma fonte de alta tensão, uma seringa plástica de 5 ml com agulha de ponta reta e diâmetro do orifício de 0,7 mm (Figura 1). O processo de eletrofiação possui algumas variáveis que visam otimizar o processo de sintetização das NFs, podendo ser modificada a tensão, fluxo da solução e a distância da ponta da seringa ao anteparo. O processo de sintetização foi realizado no laboratório de Bioengenharia e Biomateriais do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP.

Figura 1 – Equipamento de Eletrofiação



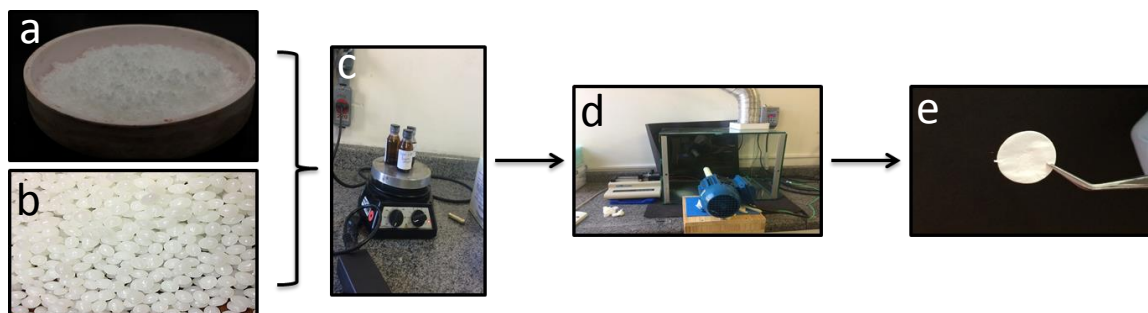
Legenda: a) fonte ejetora da solução, b) seringa com a solução pra eletrofiação, c) fio condutor para aplicação de alta tensão, d) fio terra, e) anteparo para coletar as fibras, f) capela de eletrofiação.

Fonte: Elaborado pela autora

4.5 Síntese dos *scaffolds* de PCL e PCL/Biovidro

Para a realização deste trabalho, foi sintetizado 194 *scaffolds* com diâmetro de 15 mm e espessura de 0,07 mm (Figura 2 e 4). Os *scaffolds* de PCL, PCL/Biovidro por fusão e PCL/Biovidro por sol-gel foram eletrofiados sob a tensão de 12 kv, distância da ponta da agulha ao anteparo de 12 cm e fluxo de 0,1 mL/h. Sendo tanto o grupo em meio osteogênico (MTS-O) como não osteogênico (MTS) em duplicata, e estruturado de acordo com a Tabela 2.

Figura 2 – Síntese dos *Scaffolds*



Floxograma de produção dos *scaffolds*. a) Biovidro, b) Policaprolactona (PCL), c) soluções de PCL/Biovidro sob agitação, d) Equipamento para Eletrofiação, e) *Scaffold* de PCL/Biovidro.

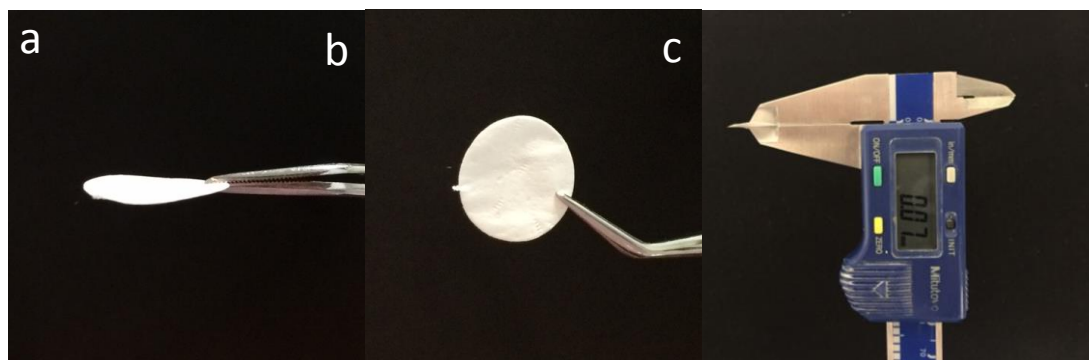
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 – Grupos e quantidade de amostras

Grupos	MTT	Fosf./Proteína	Nódulo	MEV	Total por grupo
PCL	4	4	4	3	15
PCL/biov. fusão	4	4	4	3	15
PCL/biov. sol-gel	4	4	4	3	15
Controle celular	4	4	4	3	15

Legenda: Tabela ilustrativa de quantidade de amostras por grupos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 3 - *Scaffold* PCL/Biovidro

Legenda: a) visão lateral do *Scaffold*, b) visão frontal do *scaffold* com 15 mm de diâmetro, c) evidência da espessura, 0,7 mm, do *scaffold* com paquímetro digital.

Fonte: Elaborado pela própria autora

4.6 Testes para caracterização das NFs sintetizadas

Foi realizada uma caracterização microestrutural, envolvendo a determinação da estrutura cristalina, quantidade, composição química, distribuição de fases, forma e tamanho das NFs.

4.6.1 Análise de superfície com Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV - FEG)

Para analisar a topografia superficial das NFs, foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JEOL/JSM-5310, Tóquio, Japão) com canhão de emissão de campo “*Field Emission Gun*” (FEG) (Tescan/Vega 3, Brno, República Tcheca) instalados no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE). Para isso, as amostras foram posicionadas em uma plataforma de alumínio (stub), auxiliado por uma fita dupla face de carbono (3M, Sumaré SP, Brasil) e metalizadas com uma camada fina de ouro (80 Å), que foi depositado através de vaporização iônica (sputtering) na máquina metalizadora (Emitech SC 7620, Sputter Coater, Quorum Technologies, Newhaven, Reino Unido) por 130 s com uma corrente de 10-15 mA em vácuo de 130 mTorr e à uma taxa de metalização de 3,5 nm/min. As imagens foram obtidas no MEV com detector de elétrons secundários (ES), projetados sobre a superfície da amostra; e também por meio do detector de elétron retro espalhado (BSE). As magnificações utilizadas foram de 2.000 X, 4.000 X, 6.000 X e 10.000X.

4.6.2 Análise do diâmetro médio das fibras

O diâmetro das NFs foi definido utilizando o software ImageJ (Versão 1.44, National Public of Health) por meio das micrografias obtidas em FEG. Foram analisadas 3 micrografias por grupo (PCL, PCL/biov. por fusão e PCL/biov. sol-gel) com 10 mensurações de diâmetro em 5 regiões distintas, sendo 50 análises para cada imagem. Os resultados do diâmetro médio das fibras para cada grupo foram apresentados em estatística descritiva (média e desvio-padrão) e inferencial com nível de significância de 5%.

4.6.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato

Para a análise de molhabilidade, foram preparadas 6 amostras das fibras: PCL, PCL/Biovidro por fusão e PCL/ Biovidro por sol-gel. As NFs foram eletrofiadas sobre lâminas de vidro com dimensões 26 x 76 mm, sendo o total de 2 lâminas para cada *scaffold*. A energia livre de superfície (ELS) foi realizada a partir do método automático de medição do ângulo de contato médio por meio de um goniômetro (Ramé Hart-Inc, 100-00-115, Montain Lakes, Nova Jersey, EUA) com a técnica de gota sésil com dois líquidos de diferentes tensões superficiais: água destilada e diodometano. Previamente à análise, cada amostra foi manuseada com luvas cuidadosamente para evitar contaminação. Uma seringa graduada para dispersão gradual (série 100-10-12-22, calibre 22) com agulha hidrofóbica deposita a gota e o ângulo de contato médio direito e esquerdo é calculado pelo programa computacional (DROPimage Advanced Software). A temperatura ambiente e a umidade do ar foram controladas. Os

ângulos de contato médios da água e do diodometano ($^{\circ}$), os componentes polar e dispersiva (em mN/n), bem como a ELS foram calculados pelo próprio programa.

4.6.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

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

4.6.5 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para realização de análise qualitativa da composição química dos elementos químicos das NFs, 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).

4.7 Cultura 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 (Protocolo 02/2018) (ANEXO A)

Inicialmente, foram coletadas células da medula óssea de fêmures de ratos machos, *Rattus norvegicus*, Wistar albinos com idade média de 90 dias, as quais foram isoladas e cultivadas com meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (500 µg/mL) (Gibco) em recipientes para cultura de 25 mL e 75 cm² (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil). Essas células foram mantidas em um meio de cultura para garantir sua viabilidade e mantidas em estufa à uma temperatura de 37°C com umidade atmosférica contendo 5% de CO₂. A seleção das células mesenquimais ocorreu pela sua capacidade de adesão ao poliestireno, sendo expandidas até atingirem mais de 80% da ocupação do recipiente. Previamente a cultura celular, todas as amostras foram submetidas à esterilização em raio ultravioleta (UV) por 30 min.

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 desprendessem do fundo do frasco. Em seguida, o conteúdo de tripsina foi neutralizado com 6 ml de meio alfa MEM, transferido para um tubo Falcon de 15 mL (TTP, Biosystems, Curitiba, Brasil) e centrifugado em 5000 rpm por 5 min a 25°C (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, USA) com consequente

formação do pellet (agregado de células). O sobrenadante do pellet foi descartado, as células ressuspensas em meio alfa MEM e distribuídas nos poços das placas de 24 poços contendo as amostras. O plaqueamento celular ocorreu com 20.000 células/poço, após a contagem celular realizada pelo contador automático Countess® (Invitrogen, EUA). O desenvolvimento das células foi avaliado por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss Microimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany).

Os meios de cultura utilizados para o plaqueamento celular foram diferentes quanto ao seu conteúdo, sendo que um deles foi o meio de cultura suplementado citado acima e o outro foi o meio de cultura osteogênico, o qual adicionalmente a suplementação, também continha 5 mg/mL de ácido ascórbico (Neon) e 2,16 g de beta glicerofosfato (Sigma-Aldrich ref 50020). Ambos os meios de cultura foram trocados dos poços a cada dois dias.

Os grupos estudados foram plaqueados com: a) grupo controle celular: células mesenquimais em meio osteogênico e não osteogênico; b) grupo PCL/ Biovidro por fusão : células mesenquimais plaqueadas com o compósito (PCL/ Biovidro por fusão) utilizando meio de cultura osteogênico e não osteogênico; c) grupo PCL/ Biovidro Sol-Gel: células mesenquimais plaqueadas com o compósito (PCL/ Biovidro Sol-Gel) utilizando meio de cultura osteogênico e não osteogênico; d) grupo PCL: células mesenquimais plaqueadas com PCL utilizando meio de cultura osteogênico e não osteogênico.

Na maioria dos testes, em todos os grupos foi utilizado n=5 para repetição técnica e foram realizadas duas repetições biológicas. Todos os testes *in vitro* foram realizados de acordo com a ISO-10993-5.

4.7.1 Determinação da viabilidade celular (MTT)

Após 7 dias, foi realizada a confecção da cultura celular para análise quantitativa de células viáveis. Esse teste foi realizado por meio da exposição das células ao agente tóxico pela incubação com MTT e avaliação espectrofotométrica do MTT incorporado. No grupo controle, foram utilizadas células mesenquimais em uma fração de MTT a 0,5 mg/ml em PBS preparada, procedendo-se em seguida à incubação das culturas primárias com esta solução por 4 h a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂. Após esse período, a solução de MTT foi removida e adicionada a 500 µl da solução de DMSO (*Dimethyl Sulfoxide* - Dimetilsulfóxido) que permaneceu nos poços por 10 min em estufa de CO₂ a 37°C. A seguir a placa foi colocada sob agitação por 10 min para solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 100µl foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços (Greiner) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU).

4.7.2 Conteúdo de Proteína Total

A proteína total foi quantificada após 10 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes, com PBS a 37°C, e preenchidos com 2 ml de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich), para extração das proteínas. Após 30 min, 1 ml da solução de cada poço foi misturada com 1 ml da solução de Lowry (SigmaAldrich) e deixado por 20 min à temperatura ambiente. A esta

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

4.7.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Foi determinada após 10 dias de cultura celular, nos mesmos lisados utilizados para quantificar a proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica). Inicialmente, 50 μl de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 ml de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1. À solução foi acrescentada alíquota de 50 μl dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 min a 37°C em banho-maria. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 ml de 32 Na_2CO_3 a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir de curva-padrão usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 μmol de timolftaleína/hora/ μg proteína.

4.7.4 Adesão celular

Após 7 dias de cultura, a adesão celular (n=3 para cada grupo experimental) sobre todas as amostras foi observada ao MEV utilizando o equipamento MEV (Inspect S50, FEI Company, Brno, República Tcheca). Inicialmente, as amostras foram lavadas três vezes com PBS para remover as células não aderentes e, em seguida, fixadas quimicamente com paraformaldeído a 4% à temperatura ambiente durante 20 min. Em seguida as amostras foram desidratadas por meio de uma série ascendente de etanol e previamente a análise, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro usando um sistema *sputter*-revestimento.

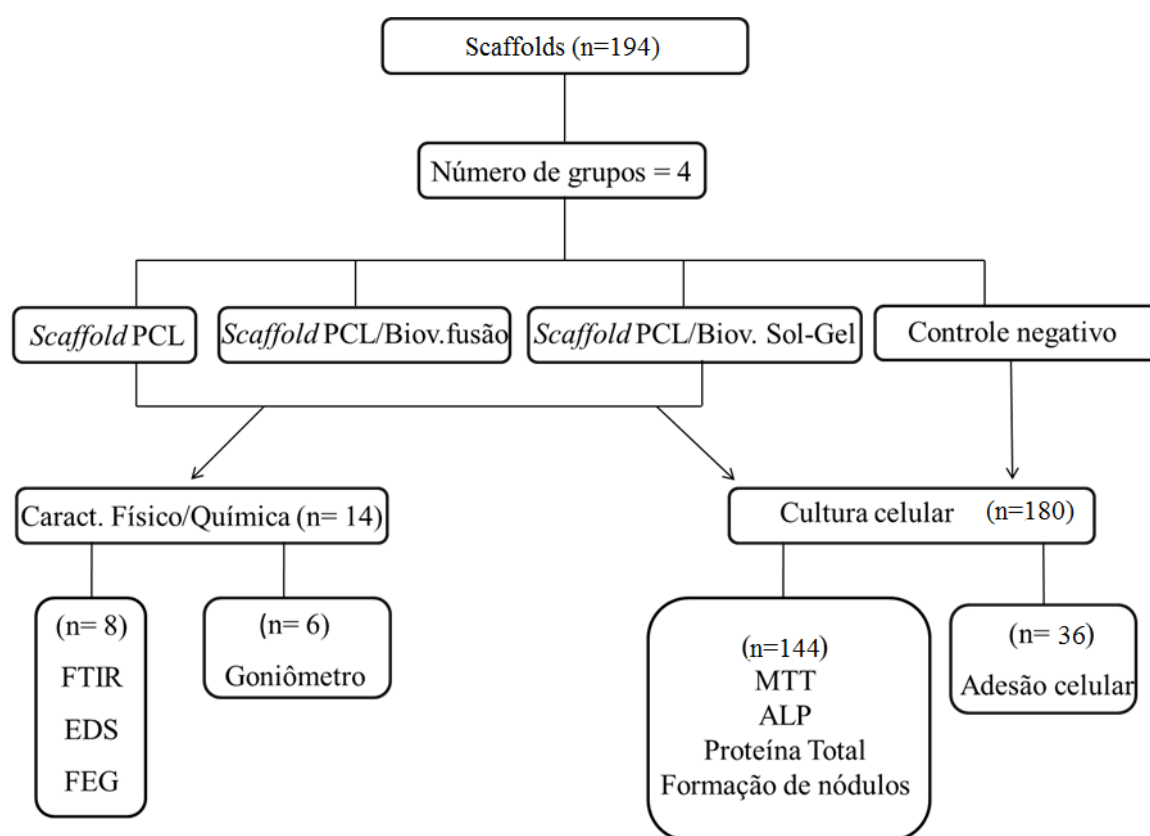
4.7.5 Formação dos nódulos de mineralização

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 14 dias de cultura (n=4 para cada grupo experimental). Para tanto, as células aderidas foram fixadas em solução de formol 10% por 2 h à temperatura ambiente. Após fixação, as amostras foram desidratadas com uma série gradual de álcool e coradas com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Brasil), pH 4,2 por 10 min. O corante vermelho de Alizarina S cora áreas que são ricas em cálcio.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados (MTT, Fosfatase Alcalina, Proteína Total) foram plotados e a estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão) foi realizada. As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas por análise de variância 1- fator (ANOVA) e pelo teste de Tukey para múltiplas comparações ($p = 0,05$). Para a análise do diâmetro médio das nanofibras foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p = 0,05$).

Figura 4 – Fluxograma do número de amostras e testes



Legenda: Fluxograma representativo do número total de amostras e suas distribuições de acordo com os testes realizados, tanto físico/químicos quanto biológicos.

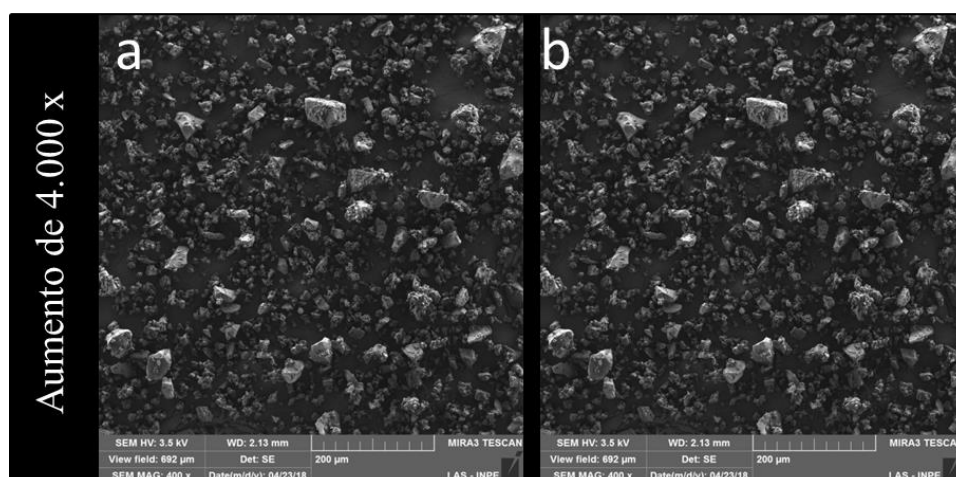
Fonte: Elaborado pela autora.

6 RESULTADOS

6.1 Microscopia Eletrônica por emissão de campo (FEG)

A partir das Figuras 5e 6, foi realizada a análise das partículas dos biovidros por Fusão e Sol-Gel. As partículas por fusão apresentaram ausência de porosidades, enquanto as partículas por Sol-Gel, demonstraram porosidades em sua superfície.

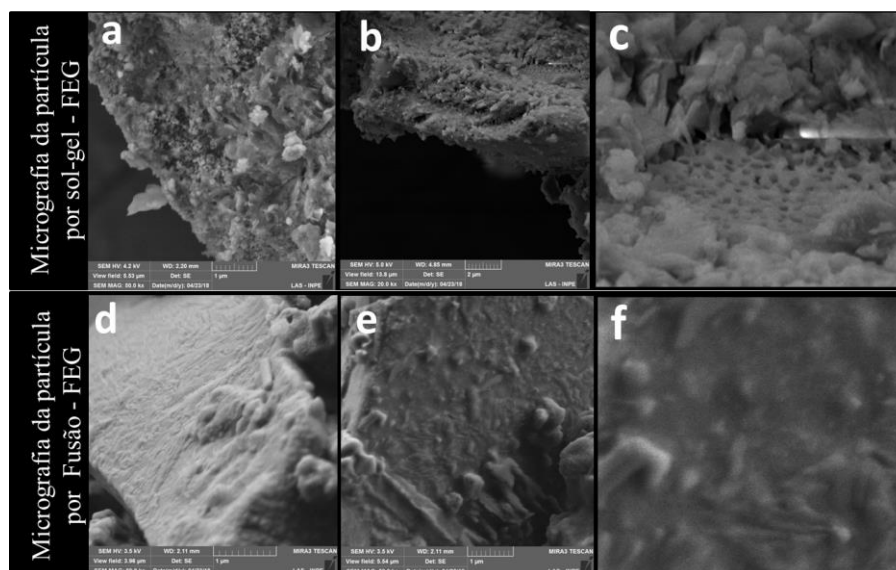
Figura 5- Micrografia das partículas de biovidro por Fusão e Sol-Gel



Legenda: a) partículas de biovidro por Fusão, b) partículas de biovidro por Sol-Gel, ambas com aumento de 4.000 vezes.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6 – Micrografia das partículas do biovidro por Fusão e biovidro Sol Gel.

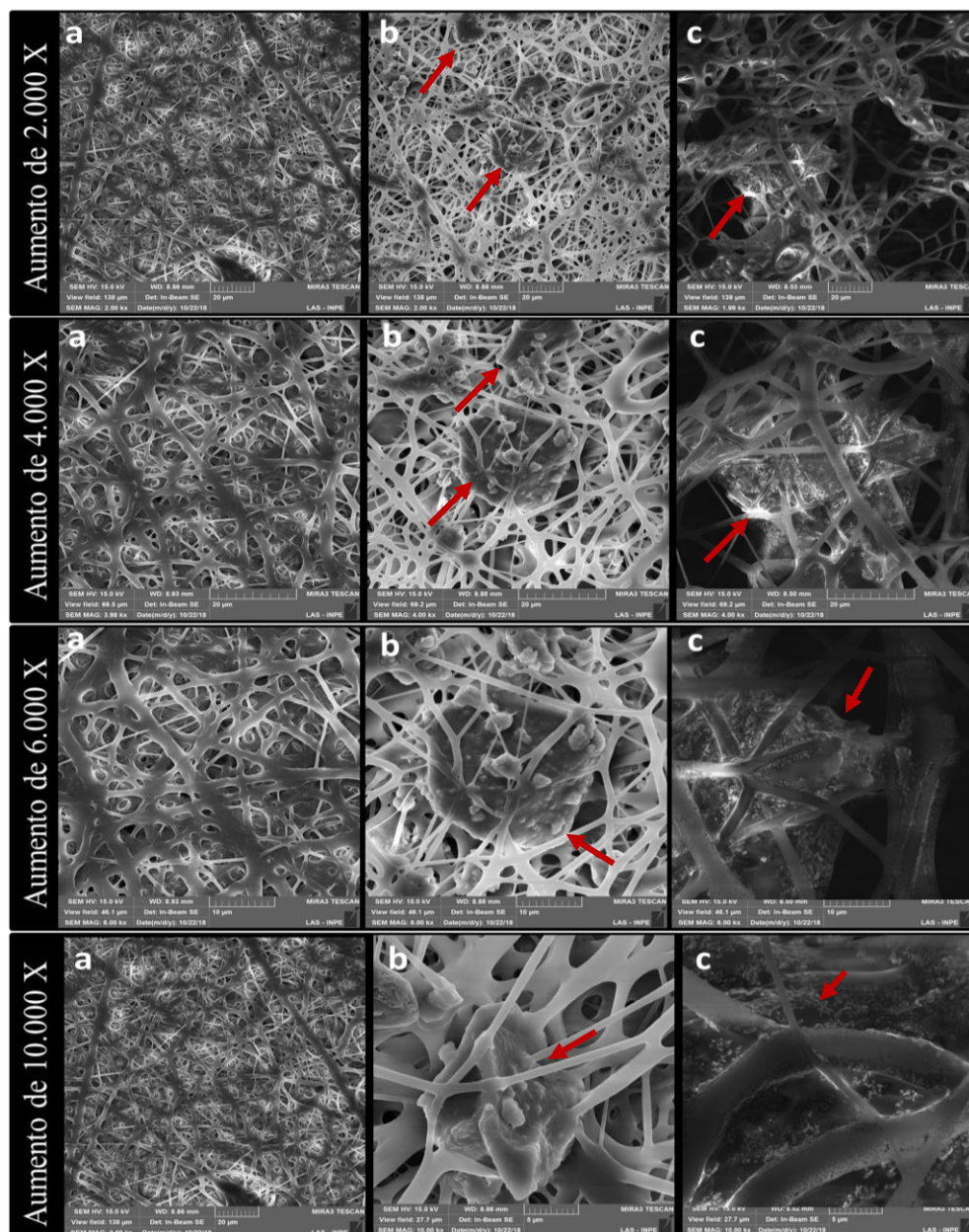


Legenda: a) partícula Sol-Gel com aumento de 70.000x, b) partículas Sol-Gel com aumento de 50.000x, c) partícula Sol-gel , Zoom na imagem, com aumento de 50.000x. d) partícula por Fusão com aumento de 50.000x, e) partícula por Fusão com aumento de 20.000x, f) partícula por Fusão, Zoom na imagem com aumento de 20.000x.

Fonte: Elaborado pela autora

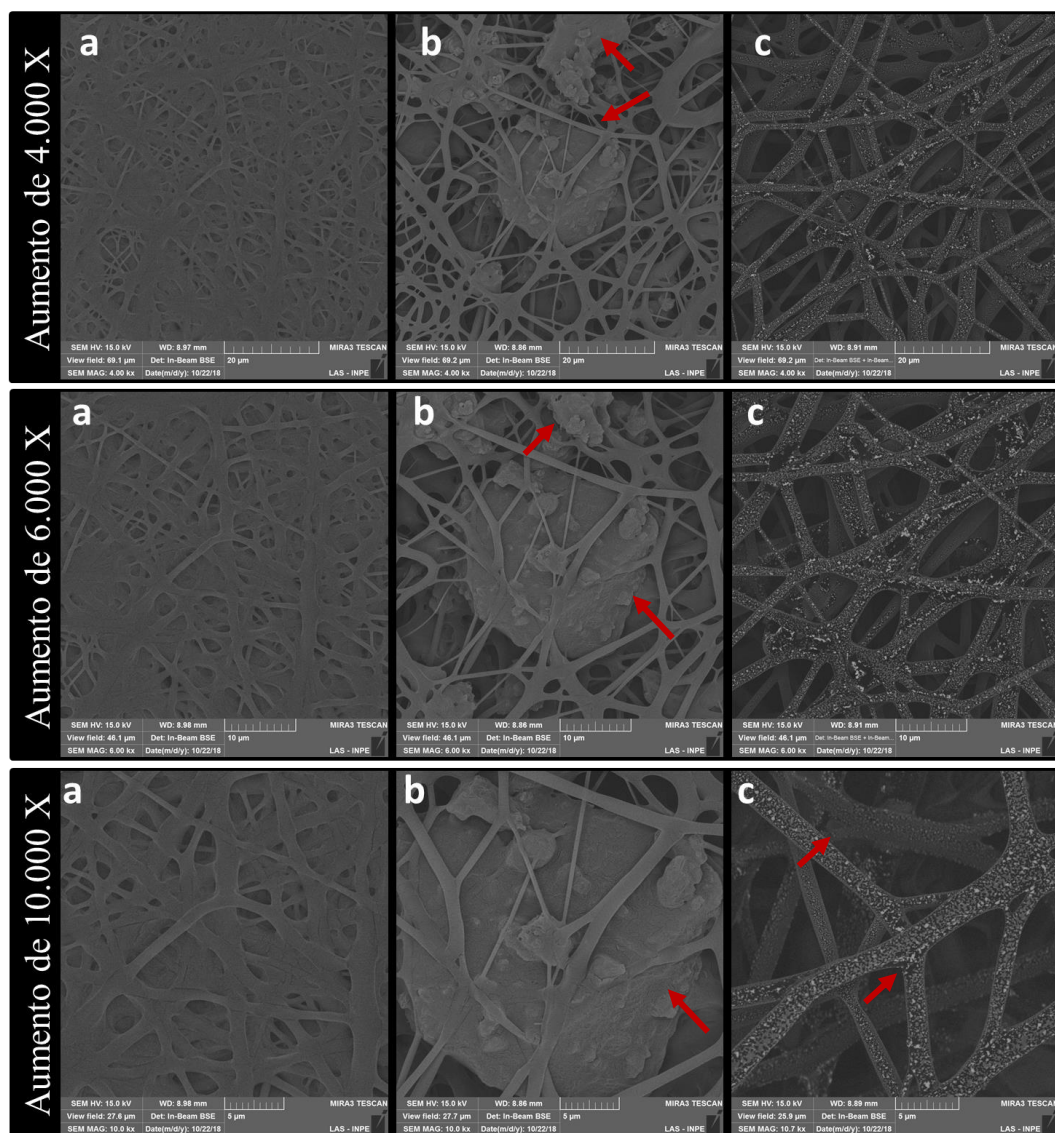
A Figura 7 apresenta micrografias obtidas por FEG, nas quais foi possível observar a presença de partículas de biovidro nos Scaffolds de PCL/biov. por fusão e PCL/biov. sol-gel, e a ausência das mesmas no Scaffold de PCL. Na Figura 8, as partículas de biovidro ficaram em evidência devido ao modo Retro Espalhado, o qual permitiu observar a presença das partículas de biovidro não só na superfície, mas como também no interior das fibras do Scaffold de PCL/biov. sol-gel. Demonstrando que as partículas obtidas por sol-gel possuem uma menor granulometria, ficando dispersas de forma mais homogênea nas fibras de PCL.

Figura 7 – Micrografias obtidas por FEG



Legenda: Micrografias com aumento de 2.000, 4.000, 6.000 e 10.000 vezes, respectivamente. a) *Scaffold* de PCL, b) *Scaffold* de PCL/bio. por fusão, c) *Scaffold* de PCL/bio. sol-gel. As setas vermelhas indicam partículas de biovidro nos scaffolds de PCL/bio. por fusão e PCL/bio. sol-gel.
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8- Micrografias obtidas por FEG em modo Retro Espalhado



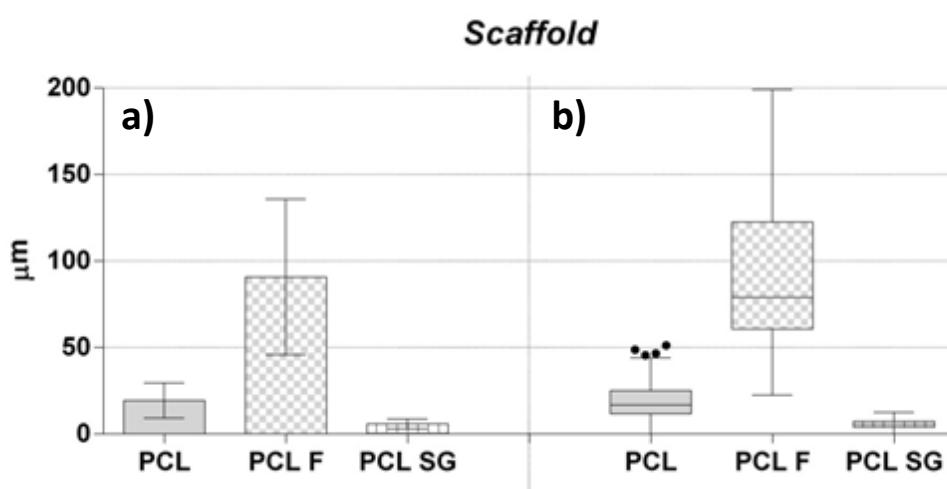
Legenda: Micrografias em modo Retro Espalhado com aumento de 4.000, 6.000 e 10.000 vezes, respectivamente. a) *Scaffold* de PCL, b) *Scaffold* de PCL/bio. por fusão, c) *Scaffold* de PCL/bio. sol-gel. As setas indicam partículas de biovidro nos scaffolds de PCL/bio. por fusão e PCL/bio. sol-gel. Fonte: Elaborado pela própria autora

6.1.1 Média da espessura das nanofibras

Para a aferição do diâmetro das fibras, foi utilizado o programa *Image J*. em seguida, foi realizada um estatística descritiva apresentando a média e desvio padrão do diâmetro das fibras (Figura 9). Foi também realizada uma

estatística inferencial, demonstrando que houve diferença significativa entre o diâmetro das nanofibras, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,0001 < 0,05$).

Figura 9- Gráfico de colunas (média $\pm$ dp) e diagrama de Caixa (*box-plot*), segundo o diâmetro dos três tipos de nanofibras



Legenda: a) Gráfico de colunas mostrando a média $\pm$ desvio padrão, b) Diagrama de caixa (*box-plot*) de comparação da mediana. PCL F corresponde ao Scaffold PCL/biov. por fusão e o PCL SG ao Scaffold PCL/biov. sol-gel.

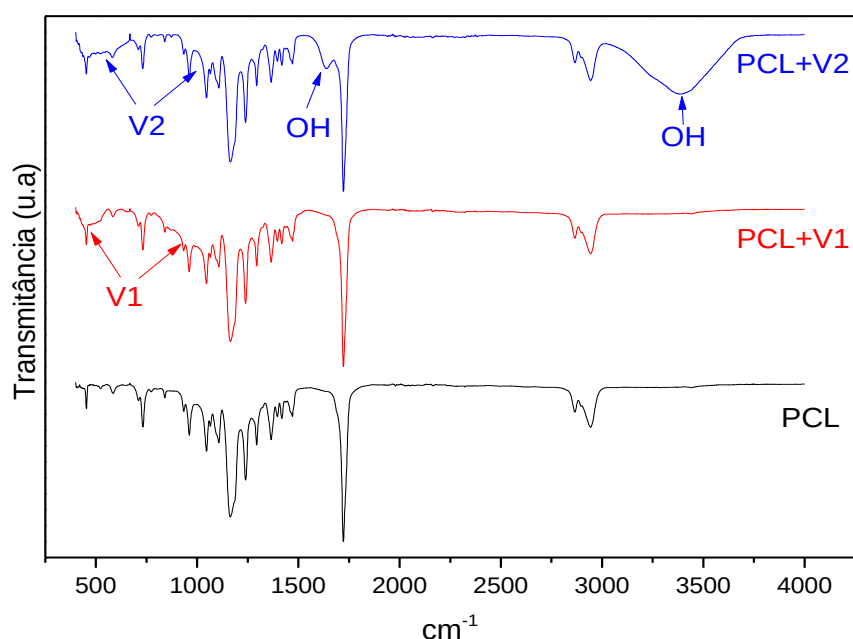
Fonte: Elaborado pela autora.

6.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Foi analisado e comparado o grupo controle com os compósitos (PCL/biov. por fusão e PCL/biov. sol-gel). Os grupos (PCL/biov. por fusão e PCL/biov. sol-gel) apresentaram em sua estrutura química; sílica (Si-O-Si) e fosfato (PO_4), porém somente o grupo PCL/biov. sol-gel, apresentou em sua estrutura o grupamento Silanol (SiOH), o qual proporciona uma intensa adesão celular (Souza, 2014) (Figura 10 e 11). O *scaffold* sintetizado apenas com PCL,

apresentou bandas características do PCL puro, demonstrando que não ocorreu alteração na composição química do material durante o processo de eletrofiação (Tabela 3).

Figura 10 – Espectro de infravermelho das amostras (PCL, PCL/biov. por fusão e PCL/biov. sol-gel)



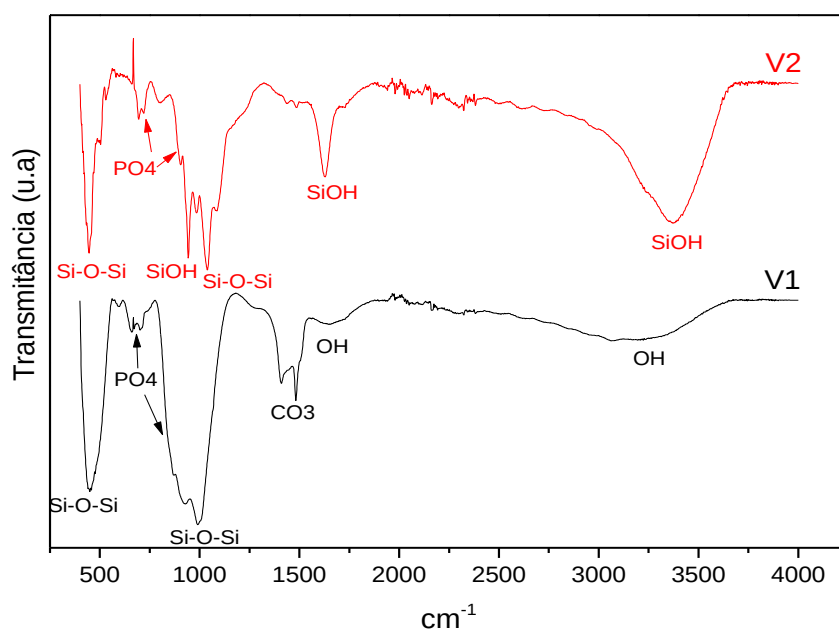
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3- Tabela representativa de ligações encontradas na análise FTIR

Atribuições	Frequência
Vibrações de estiramento de CO	1726 cm ⁻¹
Modos de curvatura CH ₂	1473, 1397 e 1361 cm ⁻¹
Alongamento CH ₂	2942 e 2862 cm ⁻¹
Vibrações de alongamento COC	1233, 1107 e 1042 cm ⁻¹
Estiramento de CO	1160 cm ⁻¹
Estiramento de CC	1290 cm ⁻¹

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 11 – Espectro de infravermelho das partículas de biov. por fusão (V1) e biov. sol-gel (V2)

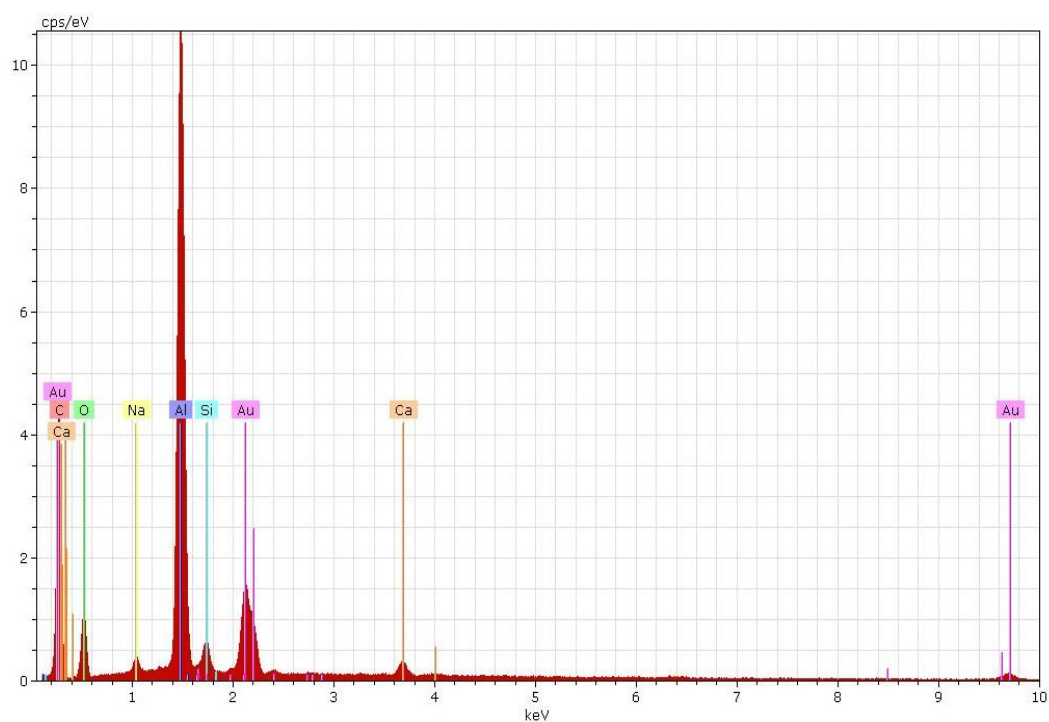


Fonte: Elaborado pela autora.

6.3 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

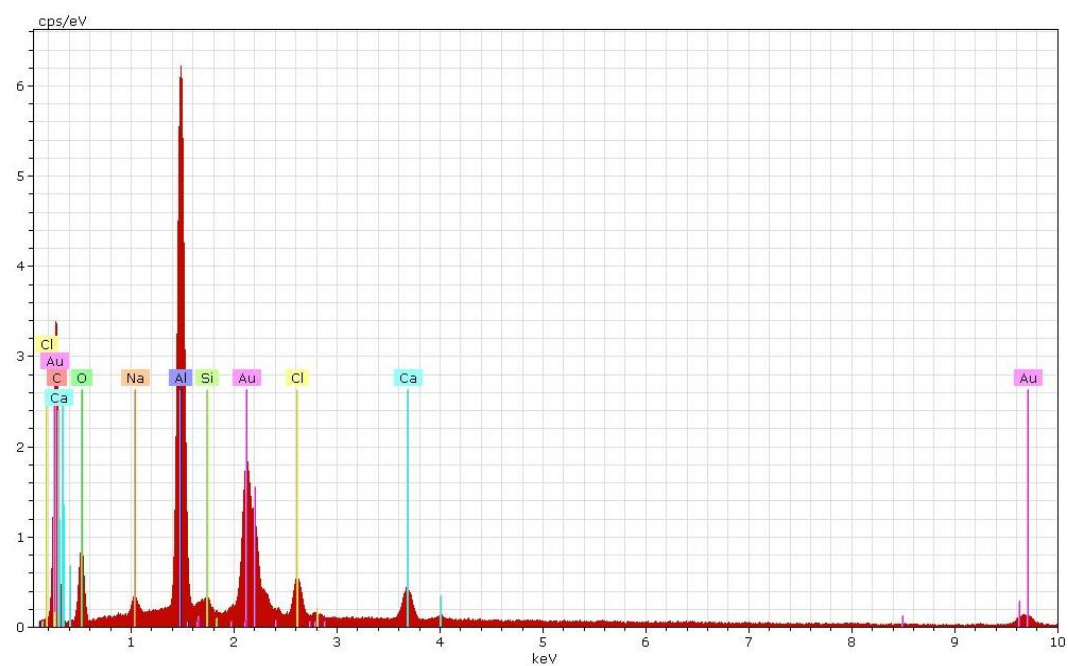
As imagens 12 e 13 evidenciam a presença de elementos químicos que compõem os Biovidros (Si, Na, Ca, C), utilizados neste trabalho. Demonstrando assim, a presença de biovidro nos *Scaffolds* de PCL/biov. por fusão e PCL/biov. sol-gel.

Figura 12 – EDS do compósito PCL/biov. por fusão



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 13- EDS do compósito PCL/biov. sol-gel



Fonte: Elaborado pela autora.

6.4 Determinação da viabilidade celular (MTT)

Os grupos PCL, PCL/Biovidro por fusão e PCL/Biovidro por sol-gel apresentaram maior viabilidade celular que o grupo controle celular em meio não osteogênico (MTS), sendo observada diferença estatística entre o grupo controle e os demais ($p < 0,05$). Entretanto não houve diferença estatística entre o grupo PCL e o PCL/biov, produzido por sol-gel ($p > 0,05$). O grupo PCL/biovidro por fusão apresentou maior número de células viáveis quando comparado aos outros grupos ($p < 0,005$) (Figura 14).

Figura 14- gráfico de viabilidade celular, análise MTT

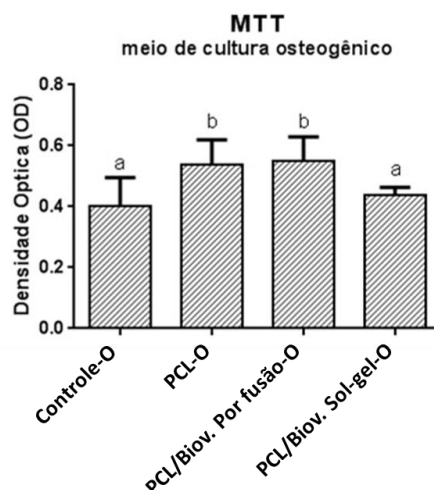


Fonte: Elaborado pela autora.

Na presença de meio osteogênico (MTS-O) não houve diferença estatística entre o grupo controle Celular e o PCL/biov. produzido por sol-gel ($p > 0,05$), os quais diferiram estatisticamente dos grupos PCL e PCL/biov

produzido por fusão ($p < 0,05$), que não diferiram entre si ($p > 0,05$) e apresentaram maior viabilidade celular que os dois primeiros grupos (Figura 15).

Figura 15- gráfico de viabilidade celular, análise MTT



Fonte: Elaborado pela autora.

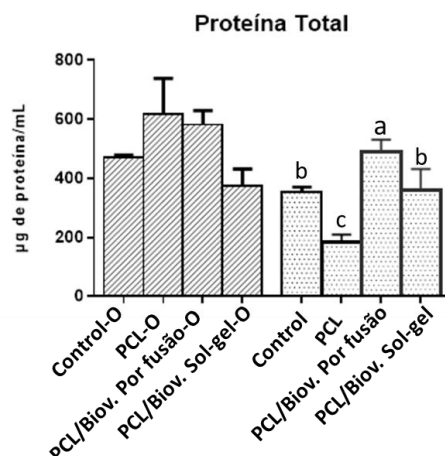
6.5 Conteúdo de Proteína Total

Na Figura 16 observamos um gráfico representativo da análise de quantificação de proteína total, sendo evidenciada a atividade metabólica celular em todos os grupos. O grupo de PCL/biov.por fusão apresentou maior atividade tanto no meio não osteogênico (MTS) quanto no meio osteogênico (MTS-O). Embora, no meio não osteogênico não tenha sido observada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Enquanto que no meio não osteogênico o grupo PCL exibiu os menores valores e diferiu de todos os grupos ($p < 0,05$). Por outro lado, o grupo PCL/biov. por fusão com os maiores valores também diferiu de todos os grupos ($p < 0,05$).

Já o grupo controle e o grupo PCL/biov. por sol-gel não diferiram entre si ($p>0,05$).

Figura 16- Gráfico do conteúdo de proteína total



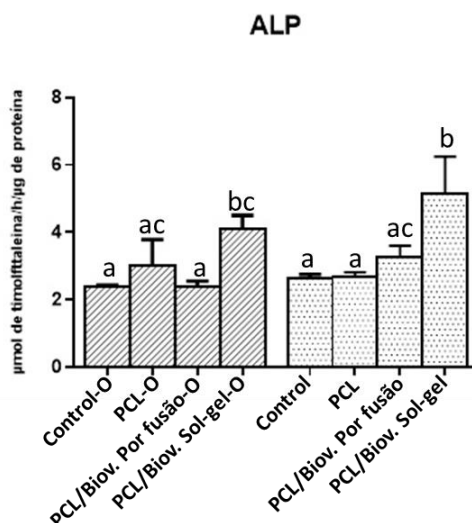
Fonte: Elaborado pela autora

6.6 Conteúdo de Fosfatase Alcalina

Na presença de meio osteogênico (MTS-O) os *scaffolds* de PCL e PCL/Biovidro por fusão não exibiram diferença estatística na expressão de ALP quando comparados ao grupo controle ($p>0,05$). Entretanto o grupo PCL/biov. por sol-gel, que exibiu a expressão mais alta de ALP, apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo Controle celular e PCL/biov. por fusão ($p<0,005$) (Figura 17).

Na cultura celular com meio não osteogênico, também os grupos PCL e PCL/biovidro por fusão não exibiram diferença estatística na expressão de ALP quando comparados ao grupo controle ($p>0,05$). Novamente, o grupo PCL/biov. por sol-gel, exibiu a expressão mais alta de ALP e apresentou diferença estatística com o grupo Controle celular e PCL ($p<0,005$) (Figura 17).

Figura 17- Gráfico representativo da atividade da fosfatase alcalina.

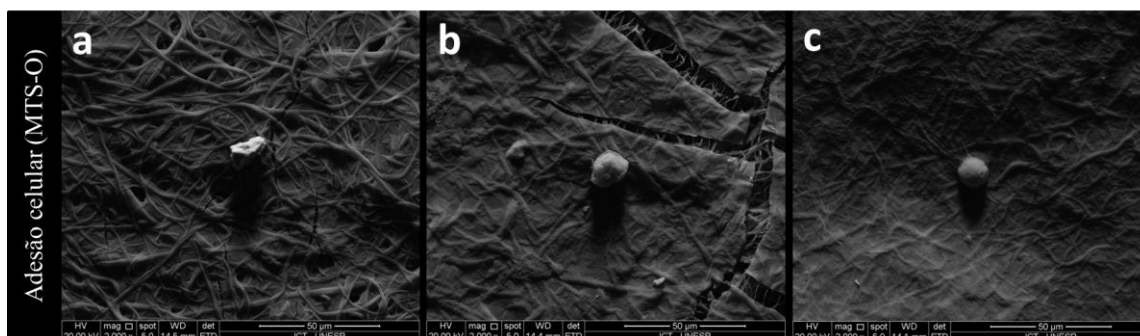


Fonte: Elaborado pela autora.

6.7 Adesão celular

Figuras de 18 a 21 apresentam amostras representativas da adesão celular sobre os scaffolds de PCL, PCL/biov. por fusão e PCL/biov. sol-gel. Após 7 dias de cultura, as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para evidenciação da interação celular sobre as amostras. Foi possível observar que todos os *scaffolds* proporcionaram um espraçamento celular de forma satisfatória.

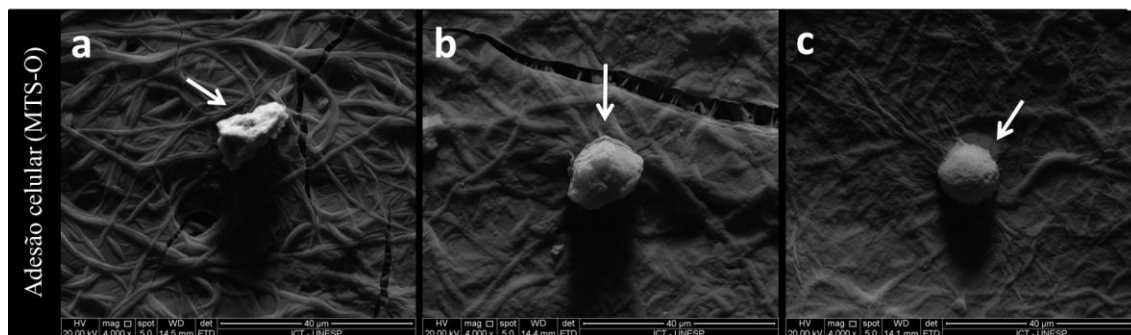
Figura 18- Fotomicrografia por MEV



Legenda: a) *Scaffold* PCL, b) *Scaffold* de PCL/Biovidro por fusão, c) *Scaffold* PCL/Biovidro sol-gel. Aumento de 2000x em todas as figuras.

Fonte: Elaborado pela autora.

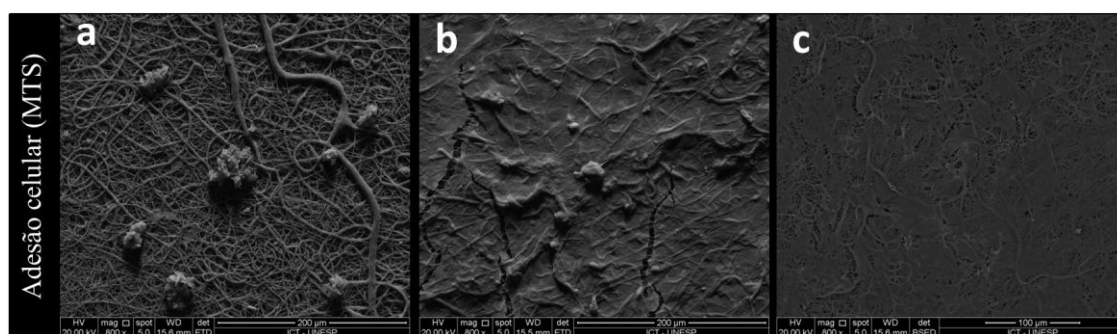
Figura 19- Fotomicrografia por MEV



Legenda: a) *Scaffold* PCL. Seta indicando partícula do corante vermelho de Alizarina, b) *Scaffold* de PCL/Biovidro por fusão. Seta indicando aparente nódulo ósseo, c) *Scaffold* PCL/Biovidro sol-gel. Seta indicando aparente nódulo ósseo. Aumento de 4000x em todas as figuras.

Fonte: Elaborado pela autora.

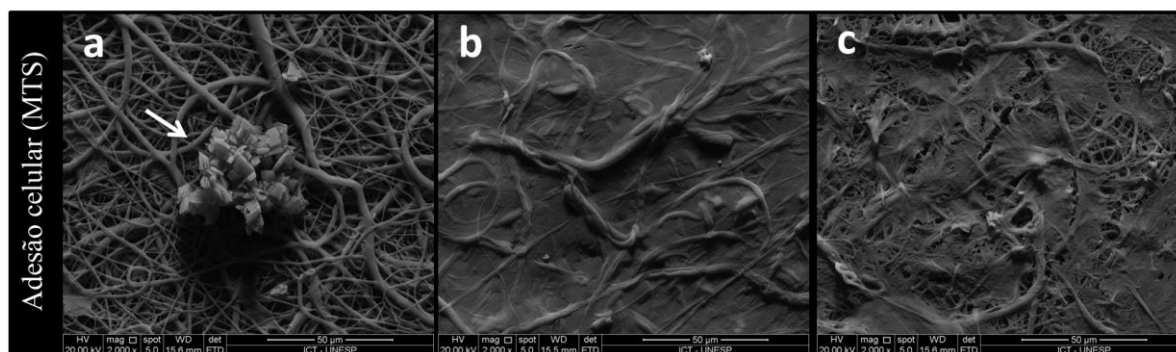
Figura 20- Fotomicrografia por MEV



Legenda: a) *Scaffold* PCL, b) *Scaffold* de PCL/Biovidro por fusão, c) *Scaffold* PCL/Biovidro sol-gel. Aumento de 800 em todas as Figuras.

Fonte: Elaborado pelo autora.

Figura 21- fotomicrografia por MEV



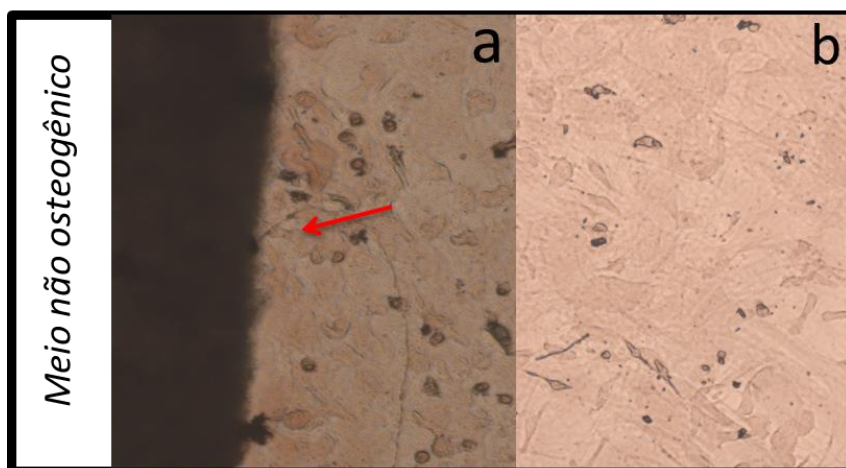
Legenda: a) *Scaffold* PCL, Seta indicando cristal do corante vermelho de Alizarina, b) *Scaffold* de PCL/Biovidro por fusão, c) *Scaffold* PCL/Biovidro sol-gel. Aumento de 2000x em todas as Figuras.

Fonte: Elaborado pela autora.

6.8 Formação de nódulos de mineralização

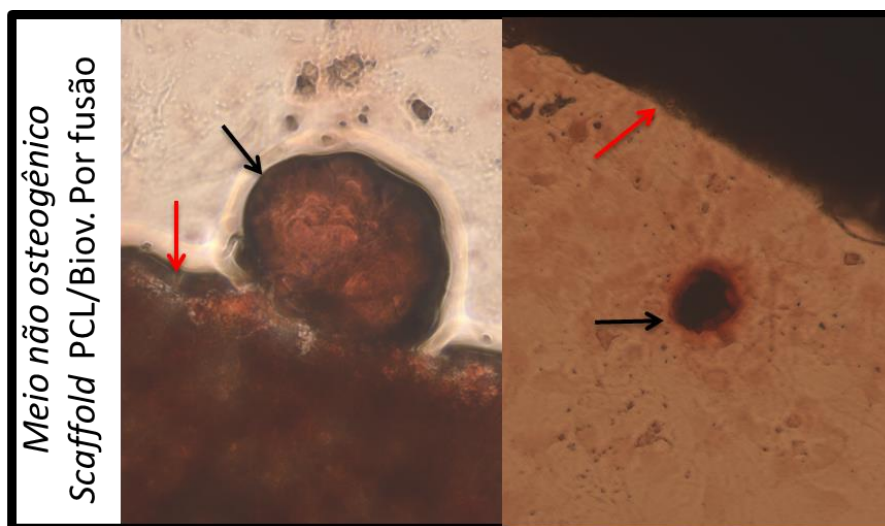
A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 14 dias de cultura celular. Em meio de cultura não osteogênico (MTS), apenas os grupos PCL/biov. por fusão e PCL/biov. sol-gel, apresentaram formação de nódulos de mineralização (Figuras 22, 23 e 24). Em meio de cultura osteogênico (MTS-O), todos os grupos PCL, PCL/biov. por fusão, PCL/biov. sol-gel e grupo controle celular apresentaram formação de nódulos de mineralização como evidenciado na Figura abaixo (Figura 25).

Figura 22- Ausência de nódulo de mineralização evidenciado no grupo *Scaffold* PCL (a) e Controle celular (b) em meio não osteogênico (MTS)



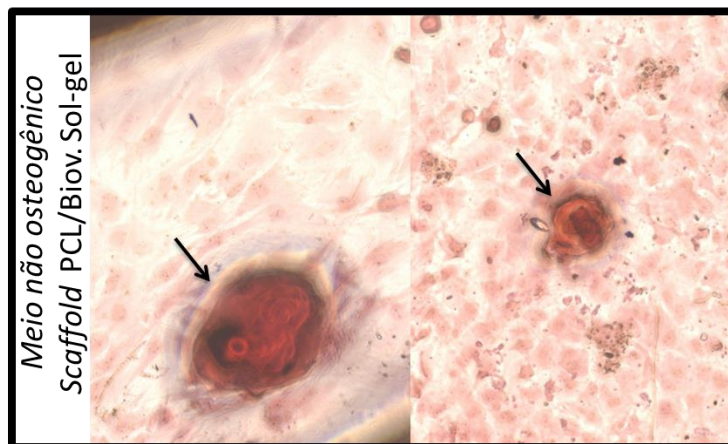
Legenda: (a) scaffold PCL, indicado pela seta, (b) controle celular. Ambos em meio não osteogênico.
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 23- Nódulo de mineralização evidenciado próximo ao *scaffold* do grupo PCL/biov. por fusão em meio não osteogênico (MTS)



Legenda: As setas em vermelho indicam o *scaffold* PCL, enquanto as setas pretas indicam os nódulos de mineralização.
Fonte: Elaborado pela autora.

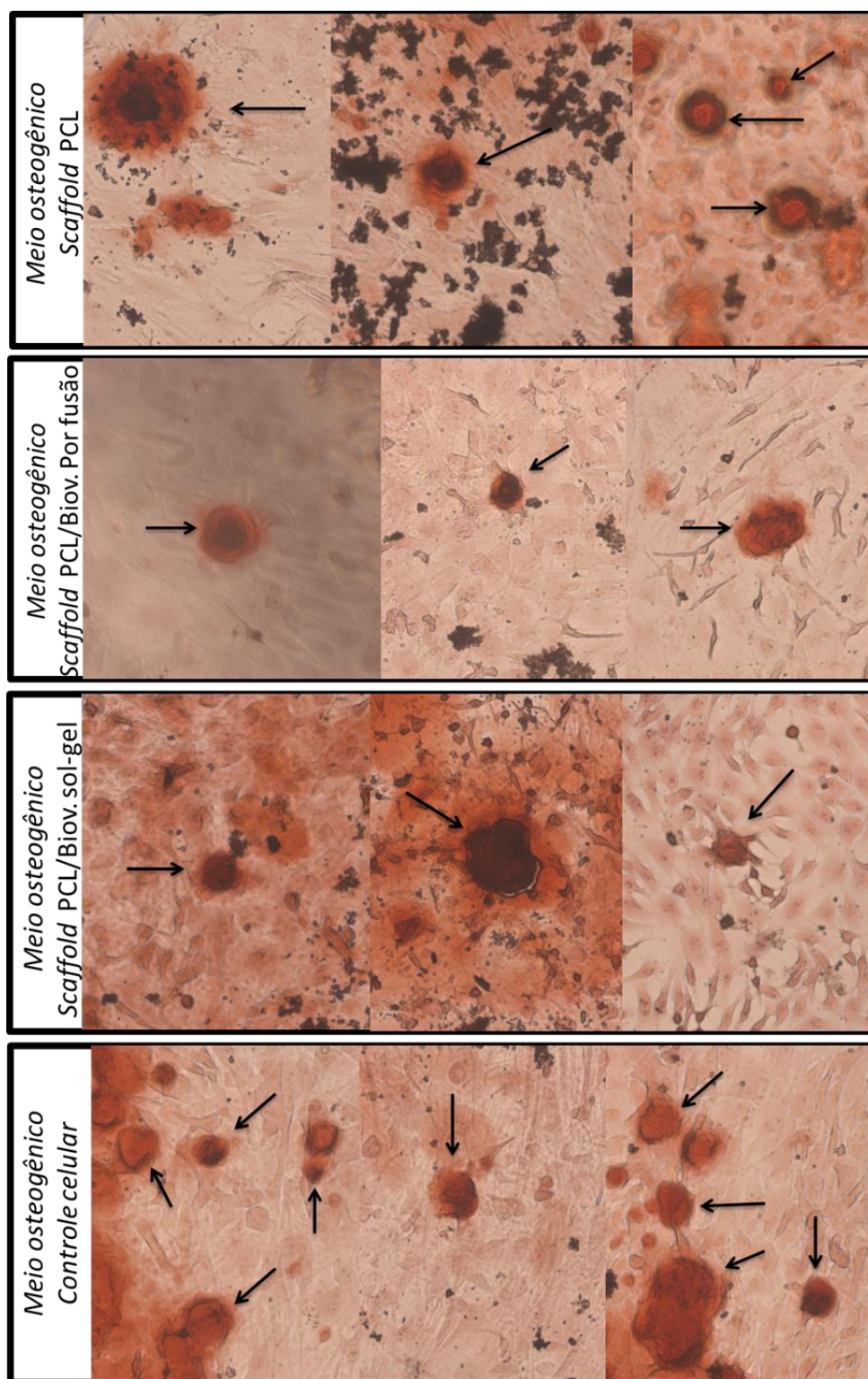
Figura 24- Nódulo de mineralização evidenciado próximo ao *scaffold* do grupo PCL/biov. sol-gel em meio não osteogênico (MTS)



Legenda: As setas indicam os nódulos de mineralização.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 25- Nódulos de mineralização nos grupos PCL, PCL/biov. por fusão, PCL/biov. sol-gel, controle celular



Legenda: Nódulos de mineralização foram observados em diferentes regiões e poços de cultura, estando próximos aos *scaffold* amostra. As setas indicam os nódulos de mineralização em todas as amostras, em meio osteogênico (MTS-O)

Fonte: Elaborado pela autora.

6.9 Potencial Zeta

A análise por potencial Zeta mostrou a reatividade da superfície das partículas de biovidro por fusão e por sol-gel. Sendo o potencial Zeta, influenciado de acordo com o meio o qual as partículas interagem. Quanto maior o valor do potencial Zeta em módulo maior é a estabilidade das partículas no meio. Os valores obtidos evidenciaram um maior valor em módulo, nas partículas de biovidro por sol-gel (Tabela 4).

Tabela 4 – Potencial Zeta dos biovidros por fusão e sol-gel

Potencial Zeta (mV) (biov. por fusão)	Potencial Zeta (mV) (biov. sol-gel)
0,69	-22,70
0,37	-23,54
0,62	-18,61
0,56	-21,62

Fonte: Elaborado pela autora.

7 DISCUSSÃO

Defeitos ósseos gerados por doenças como a periodontite ou extração do elemento dental, por vezes impossibilitam a reabilitação por meio de implantes (Marton et al., 2017). Visando restabelecer esses sítios afetados, membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis foram desenvolvidas, atuando como osteoindutora/condutora ou apenas como uma barreira entre o tecido conjuntivo e ósseo, respectivamente (Gordh et al., 1998).

Membranas não reabsorvíveis como as de Politetrafluoretileno - densa (PTFE), atuam como um arcabouço, mantendo o coágulo ou material de preenchimento em posição impedindo que o tecido conjuntivo prolifere no interior do defeito ósseo, proporcionando um ambiente favorável para reparação óssea (Barber et al., 2007). Já as membranas reabsorvíveis, possuem em sua composição partículas como hidroxiapatita que induz a diferenciação e proliferação de células osteogênicas, proporcionando assim uma ósseo-indução e ósseo-condução (Shebi, Lisa, 2018).

Apesar das membranas reabsorvíveis disponíveis no mercado proporcionarem uma ação ósseo-indutora e condutora eficiente, possuem um alto custo tanto para o odontólogo quanto para o paciente, por vezes impossibilitando o seu uso. Esse estudo teve como objetivo sintetizar um *scaffold* de PCL com partículas de biovidro por dois diferentes métodos de obtenção (Fusão e sol-gel), os quais possuem uma bioatividade capaz de induzir a diferenciação e proliferação de células osteogênicas. Esse material possibilitaria a reparação dos defeitos ósseos por ósseo-indução e condução, porém com um baixo custo de produção ao contrário das membranas já existentes.

Testes com cultura celular proporcionam uma análise minuciosa da interação entre as células e o material analisado. O método de cultura celular viabiliza um meio com condições controladas para o estudo (Bächle, Ralf,

2004). Neste trabalho a biocompatibilidade dos *scaffolds* de PCL/Biovidro por fusão ou sol-gel, foi analisada por testes *in vitro*, seguindo os parâmetros de adesão, proliferação, viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e formações nodulares de matriz mineralizada. Essa metodologia foi utilizada em estudos *in vitro* com objetivos semelhantes (Silva et al., 2018)

A biocompatibilidade do material está relacionada à forma com que as células interagem com a superfície do mesmo, demonstrando aspectos como uma boa adesão e espalhamento, isso influenciará diretamente na proliferação e diferenciação celular (Bowers et al., 1992). Neste estudo, podemos observar que à adesão celular, em todos os grupos (PCL, PCL/Biovidro por fusão e PCL/Biovidro por sol-gel) apresentaram células aderidas ao *scaffold* como pode ser observado nas micrografias realizadas por MEV após 14 dias (Figura 18 a 21).

O teste realizado para avaliar a viabilidade celular foi o MTT, sendo uma análise colorimétrica realizada neste estudo num período de 7 dias, fornecendo evidências da predileção e biocompatibilidade do material estudado (Pino-Mínguez et al., 2015). Os grupos PCL, PCL/Biovidro por fusão e PCL/Biovidro por sol-gel apresentaram maior viabilidade celular que o grupo controle celular em meio não osteogênico, corroborando com Rodrigues et al. (2015) o qual mostrou que o PCL auxilia numa maior viabilidade celular (Rodrigues et al., 2015) (Figura 14).

O grupo PCL/Biovidro por sol-gel apresentou uma menor taxa de viabilidade celular que o grupo PCL/Biovidro por fusão, corroborando com os resultados da análise de Potencial Zeta (Tabela 4), no qual mostrou uma maior carga em módulo nas partículas de biovidro por sol-gel (21.62), evidenciando a presença de grupos funcionais silanol (Si-OH) na superfície das partículas permitindo uma maior reatividade entre o silício (Si) e o meio celular o que de

acordo com Mestres et al. 2012 reduz a proliferação em detrimento a uma melhora na diferenciação celular (Mestres et al., 2012; Arcos, Greenspan, 2002).

O processo de diferenciação osteoblástica possui marcadores que indicam a osteogenicidade. De acordo com o estudo realizado por Farley e Baylink (1986), o marcador de maior relevância de diferenciação osteoblástica é a fosfatase alcalina (ALP) (Farley, Baylink., 1986). Para a avaliação do processo de diferenciação celular, foi realizado o cultivo celular em dois diferentes meios, sendo um o meio que possui ácido ascórbico e β -glicerolfosfato que contribuem com a diferenciação celular, meio osteogênico (MTS-O), e o outro com ausência desses aditivos, meio não osteogênico (MTS). Neste trabalho, o meio osteogênico proporcionou condições em que o biovidro não atuou como único agente na diferenciação celular, assim os *scaffolds* de PCL e PCL/Biovidro sol-gel não exibiram diferença estatística na expressão de ALP, ocorrendo formação de nódulo de mineralização em todos os grupos (Figura 25).

Quando foi utilizado o meio não osteogênico o biovidro tornou-se o único agente indutor de diferenciação, sendo o *scaffold* composto de PCL/Biovidro sol-gel o maior promovedor de diferenciação, exibindo diferença estatística com relação à expressão de ALP quando comparado aos outros grupos, corroborando com Leonor et al. (2011), o qual demonstrou a influência direta do grupamento silanol (Si-OH) no processo de diferenciação celular (Leonor et al., 2011) (Figura 17).

Além disso, trabalhos como o de Xiaoxia Yan et al. (2004) e Bowers et al. (1992) correlacionam a elevada taxa de diferenciação celular com a topologia do material, demonstrando que uma superfície mais irregular ou com presença de porosidade proporciona uma melhor interação entre célula e material, o que pode ser observado na micrografias obtidas por FEG, nas quais observamos uma superfície sólida e com ausência de porosidades no biovidro por fusão enquanto as partículas de biovidro por sol-gel apresentam presença de porosidades em sua

superfície, auxiliando na indução de diferenciação (Yan et al., 2004; Bowers et al., 1992) (Figura 6).

O *scaffold* de PCL/Biovidro por fusão embora tenha exibido valores acima do grupo PCL e controle celular no meio não osteogênico, não foi capaz de induzir com eficácia a expressão de ALP, indo ao encontro com os resultados de potencial zeta no qual os valores demonstram uma carga reduzida e positiva na superfície das partículas de biovidro por fusão, sugerindo a presença reduzida de grupos funcionais, ao contrário das partículas por sol-gel. Outro fator influenciador neste resultado é ausência do grupamento funcional silanol (Si-OH) nas partículas por fusão, como pode ser observado no gráfico obtido por FTIR (Figura 11), grupamento esse que segundo Zhong e Greenspan (2000) quando em contato com um meio aquoso, proporciona a formação de Hidroxiapatita Carbonatada (HCA) na superfície da partícula de biovidro em poucos minutos, favorecendo a interação com o tecido ósseo (Zhong, Greenspan, 2000).

Apesar da baixa expressão de ALP, o grupo PCL/Biovidro por fusão foi capaz de induzir a formação de nódulos de mineralização em meio não osteogênico, assim como o grupo PCL/Biovidro por sol-gel, corroborando com estudos na literatura que relataram que os valores de ALP podem não ser proporcionais a indução de formação de nódulos (Hoemann et al., 2009) (Figuras 23 e 24). Ao contrário dos grupos que possuem biovidro, os grupos PCL e controle celular não foram capazes de induzir a formação dos nódulos de mineralização em meio não osteogênico, demonstrando a importância do silício presente em ambos os biovidros na formação da matriz óssea imatura (osteóide) como observado no trabalho de (John et al., 1970) (Figura 22).

8 CONCLUSÃO

Concluimos que o *scaffold* de PCL proporciona um meio favorável para adesão e proliferação celular, porém a adição das partículas de biovidro intensificam o processo de diferenciação celular e formação de matriz óssea, principalmente o biovidro obtido pelo método sol-gel por apresentar uma maior reatividade. Assim, o biovidro poderá atuar de forma ativa no processo de regeneração, favorecendo uma reparação adequada no defeito ósseo.

REFERÊNCIAS*

- Arcos, D, Vallet-Regí, M. Sol–gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(8): 2874-88.
doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.012
- Arcos D, Greenspan DC. A new quantitative method to evaluate the in vitro bioactivity of melt and sol-gel-derived silicate glasses. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Jun 1;65(3):344-51. doi: 10.1002/jbm.a.10503.
Arcos
- Barber HD, Lignelli J, Smith BM, Bartee BK. Using a Dense PTFE Membrane Without Primary Closure to Achieve Bone and Tissue Regeneration. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:748–52. doi: doi.org/10.1016/j.joms.2006.10.042
- Beck TM, Mealey BL. Histologic analysis of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized human bone allograft. *J Periodontol*. 2010 Dec;81(12):1765-72. doi: 10.1902/jop.2010.100286.
- Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Implant Maxillofac*. 1992;7:302-10. PubMed PMID:1289255.
- Bottino MC, Thomas V, Janowski GM. A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration. *Acta Biomater*. 2011 Jan;7(1):216-24. doi: 10.1016/j.actbio.2010.08.019.
- Cheng Y-L, Chen Y-W, Wangde K, Shie M-Y. Enhanced adhesion and differentiation of human mesenchymal stem cell inside apatite-mineralized/poly(dopamine)-coated poly(ε-caprolactone) scaffolds by stereolithography. *J Mater Chem B*. 2016;4:6307-15. doi: 10.1039/C6TB01377E.
- Chen H, Senda T, Kubo KY. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol*. 2015 Jun; 48(2):61-8. doi: 10.1007/s00795-015-0099-y.
- Cividanes L S, Campos TMB, Rodrigues LA, Brunelli DD, Thim GP. "Review of mullite synthesis routes by sol–gel method." *J Solgel Sci Technol*. 55.1 (2010): 111-125.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Costa RGF, Oliveira JE, de Paula GF, Picciani PHS, Medeiros ES, Ribeiro C, et al. Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. *Polímeros* 2012; 22(2):170-7. doi: 10.1590/S0104-14282012005000026.

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

Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostat*. 1995 Aug;35(2-3):151-60. doi: 10.1016/0304-3886(95)00041-8.

Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bönnemann CG, Sweeney HL, Discher DE. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol*. 2004 Sep;166(6):877-87. doi: 10.1083/jcb.200405004.

Farley JR, Baylink DJ. Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. *Metabolism*. 1986;35:563-71. doi: 10.1016/0026-0495(86)90016-8.

Gishto A, Farrell K, Kothapalli CR. Tuning composition and architecture of biomimetic scaffolds for enhanced matrix synthesis by murine cardiomyocytes. *J Biomed Mater Res A*. 2015 Feb;103(2):693-708. doi: 10.1002/jbm.a.35217.

Gönen SÖ, Taygun ME, Aktürk A. Fabrication of nanocomposite mat through incorporating bioactive glass particles into gelatin/poly(ϵ -caprolactone) nanofibers by using Box–Behnken design. *Mater Sci Eng: C*. 2016 Oct;67(1):684-93. doi: 10.1016/j.msec.2016.05.065.

Gordh M, Alberius P, Johnell O, Lindberg L, Linde A. Osteopromotive membranes enhance onlay integration and maintenance in the adult rat skull. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Feb;27(1):67-73. Pubmed PMID: 9506306.

Groppa MF, Caria PH, Freire AR, Figueroba SR, Ribeiro-Neto WA, Bretas RES, et al. The effect of a hydroxyapatite impregnated PCL membrane in rat subcritical calvarial bone defects. *Arch Oral Biol*. 2017 Oct;82:209-15. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.018.

Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim Nova*. 2010:1352-8.

Hench L, Jones J, eds. Biomaterials, artificial organs and tissue engineering. Cambridge: Elsevier, 2005.

Jones JR. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. *J Eur Ceram Soc.* 2009;1275-81. doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.003

Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 2015 Sep;23 Suppl:S53-82. doi: 10.1016/j.actbio.2015.07.019.

Judas F, Palma P, Falacho RI, Figueiredo H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Clínica Universitária de Ortopedia, HUC. Coimbra, 2011.

Keothongkham K, Charoenphandhu N, Thongbunchoo J, Suntornsaratoon P, Krishnamra N, Tang IM, et al. Evaluation of bioactive glass incorporated poly(caprolactone)-poly(vinyl alcohol) matrix and the effect of BMP-2 modification. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 May 1;74:47-54. doi: 10.1016/j.msec.2016.12.128.

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

Lefebvre L, Chevalier J, Gremillard L, Zenati R, Thollet G, Bernache-Assolant D, Govin A. Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments. *Acta Materialia* 55.10 (2007): 3305-3313. doi.org/10.1016/j.actamat.2007.01.029

Lefebvre L, Gremillard L, Chevalier J, Zenati R, Bernache-Assolant D. Sintering behaviour of 45S5 bioactive glass. *Acta Biomater.* 2008 Nov; 4(6):1894-903. doi: 10.1016/j.actbio.2008.05.019.

Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013 Dec;19(6):485-502. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0437.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.

Lin S, Cohenca N, Muska EA, Front E. Ridge preservation in cases requiring tooth extraction during endodontic surgery: A case report. *Int Endod J*. 2008 May;41(5):448-55. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01400.x.

Leonor IB, Rodrigues MT, Gomes ME, Reis RL. In situ functionalization of wet-spun fibre meshes for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5(2):104-11. doi: 10.1002/term.294.

Marton R, Martin A, Lemperger S, Windisch P. Treating tissue defects following tooth removal. Three case reports. *Orv Hetil*. 2017 Aug;158(31):1228-34. doi: 10.1556/650.2017.30800. Hungarian.

Mestres G, Le Van C, Ginebra MP. Silicon-stabilized α -tricalcium phosphate and its use in a calcium phosphate cement: Characterization and cell response. *Acta Biomater*. 2012;8:1169-79. doi: 10.1016/j.actbio.2011.11.021.

Ogliari AO, Collares FM, Feitosa VP, Sauro S, Ogliari FA, Moraes RR. "Methacrylate bonding to zirconia by in situ silica nanoparticle surface deposition." *Dental Materials* 2015; 68-76. doi.org/10.1016/j.dental.2014.11.011

Orciani M, Fini M, Di Primio R, Mattioli-Belmonte M. Biofabrication and bone tissue regeneration: Cell source, approaches, and challenges. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017 Mar, 23;5:17. doi: 10.3389/fbioe.2017.00017.

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

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005 Nov 19;366(9499):1809-20. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67728-8.

Pino-Mínguez J, Jorge-Mora A, Couceiro-Otero R, García-Santiago C. Estudio de viabilidad y adhesividad celular de osteoblastos a cementos óseos utilizados en técnicas de refuerzo vertebral, mezclados con hidroxiapatita a distintas concentraciones. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2015;59:122-8. doi: 10.1016/j.recot.2014.06.007.

Roy MA Bandyopadhyay, S. Bose. "Ceramics in Bone Grafts and Coated Implants". *Materials for Bone Disorders*. 2017;265-314. doi: doi.org/10.1016/B978-0-12-802792-9.00006-9

Shankhwar N, Kumar M, Mandal BB, Srinivasan A. Novel polyvinyl alcohol-bioglass 45S5 based composite nanofibrous membranes as bone scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Dec 1;69:1167-74. doi: 10.1016/j.msec.2016.08.018.

Shao Z, Yu L, Xu L, Wang M. High-throughput fabrication of quality nanofibers using a modified free surface electrospinning. *Nanoscale Res Lett*. 2017 Dec;12(1):470. doi: 10.1186/s11671-017-2240-4.

Sharifi E, Ebrahimi-Barough S, Panahi M, Azami M, Ai A, Barabadi Z, et al. In vitro evaluation of human endometrial stem cell-derived osteoblast-like cells' behavior on gelatin/collagen/bioglass nanofibers' scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Sep;104(9):2210-9. doi: 10.1002/jbm.a.35748.

Stachel D, Barz A. Structure investigations of ultraphosphate glasses with some water content. *J Phys Chem Solids*, 2007; 68(5-6): 1021-23.

Rodrigues AI, Oliveira MB, Mano JF, Gomes ME, Reis RL, Leonor IB. Combinatorial effect of silicon and calcium release from starch-based scaffolds on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *ACS Biomater Sci Eng*. 2015;1:760-70. doi: 10.1021/acsbiomaterials.5b00113.

Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:3413-31. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039

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

Silva AC, Aparecida AH, Braga JFC. Biovidro 45S5: Modificações no arranjo estrutural visando atender à necessidades específicas na regeneração óssea. 55º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 29 de maio a 1 de junho de 2011, Porto de Galinhas, PE, Brasil;2011.

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.

Sinhoreti MAC, Vitti RP, Correr-Sobrinho L. Biomateriais na Odontologia: Panorama atual e perspectivas futuras. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2013; 67(4):256-61.

Singh BN, Pramanik K. Development of novel silk fibroin/polyvinyl alcohol/sol-gel bioactive glass composite matrix by modified layer by layer electrospinning method for bone tissue construct generation. *Biofabrication*. 2017 Mar;9(1):015028. doi: 10.1088/1758-5090/aa644f.

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003 Aug; 23(4):313-23. Pubmed PMID: 12956475.

Souza LPLD. Bioatividade de vidros contendo nióbio: Estudo experimental in vivo [tese]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2014.

Strub M, Bellinghen XV, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, et al. Maxillary bone regeneration based on nanoreservoirs functionalized ϵ -polycaprolactone biomembranes in a mouse model of jaw bone lesion. *BioMed Res Int*. 2018. doi: 10.1155/2018/7380389.

Thakkar S, Misra M. Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Sep;30(107):148-67. doi: 10.1016/j.ejps.2017.07.001.

Vaca-Cornejo F, Reyes HM, Jiménez SHD, Velázquez RAL, Jiménez JMD. Pilot study using a chitosan-hydroxyapatite implant for guided alveolar bone growth in patients with chronic periodontitis. *J Funct Biomater*. 2017 Jul 19;8(3). pii: E29. doi: 10.3390/jfb8030029.

Woodhouse M, Herman GS, Parkinson BA. Combinatorial approach to identification of catalysts for the photoelectrolysis of water. *J Mater Chem A Mater*. 2005;4318-24. doi: 10.1021/cm050546q

Yan X, Yu C, Zhou X, Tang J, Zhao D. Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities. *Angew Chemie - Int Ed*. 2004;43:5980-4. doi: 10.1002/anie.200460598.

Zhang T, Wu J, Ungvijanpunya N, Jackson-Weaver O, Gou Y, Feng J, et al. Smad6 methylation represses NF κ B activation and periodontal inflammation. *J Dent Res*. 2018. doi: 10.1177/0022034518755688.

Zhong J, Greenspan DC. Processing and properties of sol-gel bioactive glasses. J Biomed Mater Res. 2000;53(6):694-701. doi: 0.1002/1097-4636(2000)53:6<694::AID-JBM12>3.0.CO;2-6.

ANEXO A - Comitê de Ética



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



Instituto de Ciência e Tecnologia
São José dos Campos
UNESP

CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 02/2018, intitulado:- **"Síntese e caracterização de Scaffolds de PCL/Biovidro: Estudo in vitro da biocompatibilidade e da diferenciação celular"** sob a responsabilidade de **ALEXANDRE LUIZ SOUTO BORGES**, tendo como colaboradoras **LUANA MAROTA REIS DE VASCONCELLOS** e **GABRIELA FERNANDES DA FONSECA**, 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 06/04/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	06/04/2018 a 13/01/2019
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus, Wistar albinos
Nº de Animais	12
Peso/Idade	400 g/ 90 dias
Sexo	MACHO
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 06 de abril de 2018

Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
Coordenadora