

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

JUÇARA GONÇALVES DE CASTRO

**FIBRAS CONDUTORAS ULTRAFINAS DE POLI (BUTILENO ADIPATO CO-
TEREFTALATO)/POLIPIRROL PRODUZIDAS POR ELETROFIAÇÃO E
NANOHIĐROXIAPATITA E SEU POTENCIAL COMO SUPORTE PARA
CRESCIMENTO ÓSSEO**

São José dos Campos, SP

2016

JUÇARA GONÇALVES DE CASTRO

FIBRAS CONDUTORAS ULTRAFINAS DE POLI (BUTILENO ADIPATO CO-TEREFTALATO)/POLIPIRROL PRODUZIDAS POR ELETROFIAÇÃO COM NANOHIĐROXIAPATITA E SEU POTENCIAL COMO SUPORTE PARA CRESCIMENTO ÓSSEO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Professor Dr. Anderson de Oliveira Lobo
Co-orientadora: Professora Dra. Fernanda Roberta Marciano

São José dos Campos, SP

2016

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

CASTRO, Juçara Gonçalves
FIBRAS CONDUTORAS ULTRAFINAS DE POLI (BUTILENO ADIPATO
CO-TEREFTALATO)/POLIPIRROL PRODUZIDAS POR ELETROFIAÇÃO COM
NANOHIIDROXIAPATITA E SEU POTENCIAL COMO SUPORTE PARA CRESCIMENTO
ÓSSEO / Juçara Gonçalves CASTRO; orientador, Anderson Lobo;
co-orientador Fernanda Marciano. - São José dos Campos, SP, 2016.
69 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica.

Inclui referências

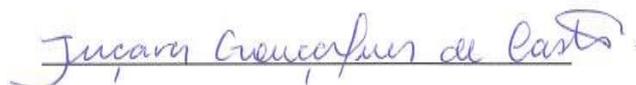
1. Engenharia Biomédica. 2. Nanobiotecnologia. 3.
Eletrofiação. I. Lobo, Anderson, orient. II. Marciano, Fernanda,
co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Juçara Gonçalves CASTRO, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 11 de Maio de 2016.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 07 / 03 / 2016

JUÇARA GONÇALVES DE CASTRO

**“NANOFIBRAS CONDUTORAS DE POLI (BUTILENO ADIPATO CO-
TEREFTALATO)/POLIPIRROL PRODUZIDAS POR ELETROFIAÇÃO COM
NANOHIDROXIAPATITA ELETRODEPOSITADA E SEU POTENCIAL COMO SUPORTE
PARA CRESCIMENTO ÓSSEO.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof^ª. Dra. **FERNANDA ROBERTA MARCIANO** (UNIVAP) Fernanda Marciano

Prof. Dr. **ANDERSON DE OLIVEIRA LOBO** (UNIVAP) Anderson de Oliveira Lobo

Prof^ª. Dra. **PRISCILA PEREIRA FÁVERO** (UNIVAP) Priscila Fávoro

Prof^ª. Dra. **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS** (UNESP) Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Prof^ª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 07 de março de 2016.

A persistência é o melhor caminho do êxito

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

À minha filha Maria Júlia de Castro, razão de todos os passos e de todas as buscas. Que lhe sirva de inspiração.

À minha mãe Edvaldina Castro pela grande lição que deu aos seus filhos; que sempre mostrou que o caminho da vitória é trilhado pelos livros. Obrigada minha Mãe, pelo incentivo, por acreditar e torcer por cada jornada da busca do conhecimento.

Às minhas irmãs Nailer Castro, Margarete Castro, Iêda Castro, Sádía Castro e Carmelita Castro, pela parceria, amizade, pelas oportunidades oferecidas. Por representarem o porto seguro da minha vida.

Ao meu irmão Raimundo Castro (*in memoriam*), que certamente iria sorrir muito dos meus momentos de “agonia” para finalizar esse trabalho. E eu iria sorrir com ele. Saudades, meu irmão!

Aos meus sobrinhos(as) pelos muitos sorrisos que me proporcionam.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pela fé, pela Sua misericórdia, pelos livramentos e por permitir mais uma conquista.

A meu orientador professor Dr. Anderson de Oliveira Lobo pela oportunidade de conhecer esse importante braço da ciência moderna que é a nanotecnologia. Pelos ensinamentos e orientações. Pela estrutura disponibilizada para realização deste estudo e pela forma sempre atenciosa como atendeu.

À minha co-orientadora professora Dra. Fernanda Roberta Marciano pela atenção com que me recebeu no Laboratório de Nanotecnologia Biomédica.

A Dra Ritchelli Ricci por todo conhecimento compartilhado sobre cultura de células; pela paciência e generosidade. Pela companhia leve e agradável. Muito Obrigada Rit!

A Dra Maíra Maftoum Costa pela atenção, disponibilidade e orientações sobre os ensaios biológicos e ajuda na produção do artigo.

Ao Dr. Bruno V. M. Rodrigues pela companhia no período que estive no Laboratório de Nanotecnologia Biomédica e pela grande ajuda na caracterização das amostras e produção do artigo.

Ao aluno de iniciação científica André Ribeiro pela ajuda na produção dos grupos deste trabalho e preparação das amostras.

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Nanotecnologia Biomédica da UNIVAP: Cíntia, Natália, Juliana, Maria Júlia, Mayara. Obrigada pela atenção e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Aos demais colegas do programa de Mestrado/Doutorado em especial Teresa Marsi pelo sorriso acolhedor e pela disponibilidade em ajudar e ao Vinícius por me hospedar em sua residência durante o período em que fiquei em São José dos Campos.

À amiga Ana Flávia Carvalho, parceira nesta jornada, por dividir as angústias desse percurso sempre sorrindo, mesmo diante de todas as adversidades que passamos.

Aos demais colegas da turma de Teresina, especialmente Andréa Conceição Lima, pela coragem de organizar o programa aqui em nossa cidade e, Maura Porto pela motivação e incentivo.

Aos meus amigos da FACID/Devry: Diretora, Coordenador, colegas professores, colaboradores e queridos alunos pela compreensão e torcida.

Às professoras Dra Veruska Cronemberger Nogueira e Dra Noélia Leal pela amizade e boa convivência e por terem assinado as cartas de recomendação na seleção do mestrado.

À Universidade Estadual do Piauí-UESPI pela estrutura disponibilizada para nossas aulas em Teresina.

Aos funcionários da UNIVAP pela atenção e pela forma sempre solícita em nos atender.

CASTRO, J. G. **Fibras condutoras ultrafinas de poli (butileno adipato co-tereftalato)/polipirrol produzidas por eletrofiação com nanohidroxiapatita e seu potencial como suporte para crescimento ósseo.** São José dos Campos – SP. 2016. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba-UNIVAP, 2016.

RESUMO

A substituição do tecido ósseo por enxerto de biomateriais depende das interações físicas, químicas e biológicas entre estes no sítio de implante, de forma a estimular a migração e diferenciação celular e favorecer a adequada formação óssea. O desenvolvimento de um material bioativo, biorreabsorvível e osteocondutivo, implica no ajuste de características e propriedades da superfície, a fim de obter uma interface biologicamente ativa. O objetivo desse estudo foi desenvolver e caracterizar *scaffolds* poliméricos tridimensionais de Poli (butileno adipato co-tereftalato)/Polipirrol (PBAT/PPy) produzidos por eletrofiação com nanohidroxiapatita (nHAp) eletrodepositada na superfície e avaliar sua biocompatibilidade e potencial de diferenciação celular em osteoblastos MG-63, visando aplicações na engenharia de tecidos. Utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura (MEV) para caracterização das amostras e análise da adesão celular e medida do ângulo de contato para identificar a molhabilidade. Os ensaios biológicos *in vitro* foram realizados em quadruplicata com osteoblastos humanos para avaliar biocompatibilidade, através do teste de citotoxicidade – MTT (1 e 7 dias) e potencial de diferenciação da matriz extracelular dos diferentes grupos estudados através da atividade da fosfatase alcalina (ALP, 14 e 21 dias). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) não paramétrico seguido de pós-teste de Múltipla Comparação Tukey's. O nível de significância fixado em 5% ($p < 0,05$). O diâmetro médio das fibras ultrafinas foi PBAT (111 ± 26 nm) e PBAT/PPy (132 ± 33 nm). As fibras ultrafinas PBAT e PBAT/PPy apresentaram ângulo de contato de 115° e 84° , respectivamente. As amostras PBAT, PBAT/PPy e PBAT/PPy/nHAp não induziram efeito citotóxico após o contato com as células MG-63, que foram capazes de interagir com o material evidenciando sua morfologia clássica. A presença do PPy nas fibras ultrafinas induziu um aumento na atividade de ALP aos 21 dias. Esses resultados mostram que esse novo nanobiomaterial apresenta um grande potencial para aplicação na medicina regenerativa como suporte para crescimento de osso.

Palavras-chave: Poli(butileno adipato co-tereftalato); Polipirrol; Nanohidroxiapatita; Eletrofiação; Fosfatase Alcalina; Citotoxicidade.

ABSTRACT

The replacement of the bone tissue using biomaterial graft depends on the physical, chemical and biological interactions among themselves in the implant spot, in order to stimulate the migration and cellular differentiation and favor the properly bone formation. The development of a bioactive, bioresorbable and osteoconductive material, implies in an adjustment of the characteristics and properties of the surface, in order to obtain a biologically active interface. The objective of this study was to developed and characterized a tridimensional polymeric *scaffolds* of Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/Polypyrrole (PBAT/PPy) produced by electrospinning with nanohydroxyapatite(nHAp) electrodeposited on their surface and evaluate its biocompatibility and potential cellular differentiation into Mg63 osteoblast aiming implementations in the tissue engineering. It was used Scanning Electron Microscope SEM to characterize the samples and analyzed the cell adhesion and measured the contact angle to identify the wettability. The biological *in vitro* tests were carried out in quadruplicates with human osteoblasts to evaluate their biocompatibility, using cytotoxicity test – MTT (1 and 7 days) and potential differentiation of the extracellular matrix in the different studied groups by alkaline phosphatase activity (14 and 21 days). The obtained results were submitted to the non-parametric variance analysis test (ANOVA) followed by the Turkey's multiple comparison test. The significance level was set in 5% ($p < 0,05$). The ultrathin distribution diameter were: PBAT (111 ± 26 nm) and PBAT/PPy (132 ± 33 nm), respectively. PBAT and PBAT/PPy ultrathin fibers showed contact angle around of 115° and 84° , respectively. The PBAT, PBAT/PPy and PBAT/PPy/nHAp samples did not present cytotoxicity effect after the contact with the Mg-63 cells, which were able to interact with the material showing its classical morphology. The presence of PPy into nanofibers induced an increase in ALP activity at 21 days. These results show that this new biomaterial presents a great potential to be applied in regenerative medicine as a support for bone growth.

Key-words: Poly (butylene adipate-co-terephthalate); Polypyrrole; Nano-hydroxyapatite; Electrospinning; Alkaline Phosphatase; Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Técnica da engenharia de tecidos	22
Figura 2 - Estrutura química do PBAT.	26
Figura 3 - Cadeia polimérica do polipirrol.....	27
Figura 4 - Esquema ilustrando a disposição dos componentes do processo de eletrofiação.	31
Figura 5 - Polímeros (a) PBAT - Ecoflex® e (b) polipirrol (PPy).	35
Figura 6 - Representação esquemática da montagem típica da técnica de eletrofiação, com processo ocorrendo dentro da capela de exaustão.....	36
Figura 7 - Esquema ilustrando a célula eletroquímica, demonstrando (A) contra eletrodo, (B) eletrodo de referência e (C) eletrodo de trabalho, ambos ligados a um potenciostato.	38
Figura 8 - Montagem do ânodo (porta-eletrodo) para eletrodeposição de nHAp.....	38
Figura 9 - Amostra PBAT/PPy com nHAp eletrodeposita na superfície.....	39
Figura 10 - Plaqueamento das células MG-63 como biomaterial e látex para realização do ensaio MTT.....	41
Figura 11 - Micrografias (a) PBAT e (b) PBAT/PPy.....	45
Figura 12 - Micrografias (a) e (b) PBAT/PPy/nHAp	47
Figura 13 - Fotografias tiradas em momentos diferentes para PBAT e PBAT/PPy durante medidas de ângulo de contato.	48
Figura 14 - Análise de viabilidade celular de osteoblastos MG-63 cultivadas sobre scaffolds poliméricos após 1 e 7 dias. * p <0,05 vs controle.	49
Figura 15 - Atividade ALP após 14 e 21 dias de cultura de osteoblastos nos scaffolds PBAT, PBAT/PPy e PBAT/PPy/nHAp. *p<0,05 vs controle. #p<0,05 vs 14 dias.	51
Figura 16 - Micrografias das células MG-63 cultivadas em 24 h sobre os scaffolds (a) PBAT, (b) PBAT/PPy e (c) PBAT/PPy/nHAp.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Reagentes do eletrólito da marca SIGMA-ALDRICH®	37
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ângulo de contato
ALP	Atividade da Fosfatase Alcalina
Ca/P	Cálcio/fósforo
DMF	Dimetilformanida
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
HMDS	Hexametildisiloxano
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Técnica de redução do sal de tetrazolium.
nHAp	Nanohidroxiapatita
PBAT	Poli(butileno adipato co-tereftalato)
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PGA	Poli(ácido glicólico)
PGLA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLA	Poli(ácido láctico)
PPy	Polipirrol
SBF	Soro Fetal Bovino
SLS	Lauril sulfato de sódio
UNIVAP	Universidade do Vale do Paraíba
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

_Toc452642626

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivo Geral.....	19
1.2 Objetivos Específicos	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Reparo do Tecido Ósseo e Enxerto Ósseo	20
2.2 Bioengenharia Tecidual Óssea e Biomateriais.....	22
2.2.1 <i>Biomateriais Poliméricos Biorreabsorvíveis</i>	24
2.2.2 <i>Biomateriais Cerâmicos</i>	28
2.2.3 <i>Compósitos</i>	30
2.3 Fibras Ultrafinas Poliméricas Produzidas por Eletrofiação.....	31
3 METODOLOGIA	34
3.1 Produção das Soluções Poliméricas para Eletrofiação.....	34
3.2 Fabricação das Fibras Poliméricas Ultrafinas	35
3.3. Eletrodeposição de nHAp sobre as Fibras Ultrafinas de PBAT/PPy	37
3.4 Caracterização das Fibras Ultrafinas PBAT, PBAT/PPy, PBAT/PPy/nHAp ..	39
3.4.1 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura – Emissão de Campo</i>	40
3.4.2 <i>Análise da Molhabilidade</i>	40
3.5 Ensaio Biológicos in vitro	40
3.5.1 Ensaio de Viabilidade Celular	41
3.5.2 Ensaio de Fosfatase Alcalina (ALP).....	42
3.5.3 Análise da Adesão Celular	43
3.6 Análise Estatística.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Caracterização Morfológica das Fibras Ultrafinas	45
4.2 Análise do Ângulo de Contato	48
4.3 Viabilidade Celular	49
4.4 Ensaio de Fosfatase Alcalina (ALP)	51
4.5 Análise da Adesão Celular	53
5 CONCLUSÃO	56

6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
PRODUÇÃO CIENTÍFICA DECORRENTE DA DISSERTAÇÃO	67

1 INTRODUÇÃO

A quantidade de doenças relacionadas à estrutura óssea (doenças degenerativas, fraturas, neoplasias) tem crescido na medida em que aumenta a expectativa de vida da população mundial, tornando-se um grande desafio para setores da área da saúde, especialmente da clínica ortopédica, em que muitas vezes há necessidade de realização de intervenção cirúrgica para substituição ou reconstrução óssea total ou parcial, além de fixação definitiva ou temporária de ossos. Quando a estrutura biológica não puder ser reparada, os enxertos ósseos tornam-se uma alternativa viável para o restabelecimento das funções normais do paciente e demandam a necessidade do estudo de materiais que possam ser utilizados como substitutos ósseos (GUASTALDI; APARECIDA, 20012; LANDIM et al., 2013), já que são reconhecidas as deficiências e limitações no uso de enxertos autógenos no tratamento dessas lesões.

Segundo dados do DATASUS (2015) no Brasil, o mercado de dispositivos médicos foi de R\$ 19,7 bilhões em 2014. Quando voltado especificamente para o subsetor dos dispositivos implantáveis, estima-se que este represente o equivalente a 20% desse total, ou seja, cerca de R\$ 4 bilhões. O Ministério da Saúde considera dispositivo médico implantável “órtese e prótese implantável por meio de procedimento médico ou odontológico invasivo, bem como os materiais utilizados como instrumental específico para sua implantação” (BRASIL, 2015). Esses valores refletem a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de materiais que apresentem melhor custo e maior efetividade.

O crescente desenvolvimento de pesquisas sobre as aplicações de biomateriais é responsável por impulsionar esse mercado no Brasil. De acordo com as pesquisas especializadas (GRAND VIEW RESEARCH, 2015), a previsão do mercado de biomateriais no Brasil é estimada em US\$ 2 bilhões até 2018. Os biomateriais ortopédicos (biomateriais reconstrutivos, cimento ósseo e medicina esportiva) ocuparam a maior quota, seguido de biomateriais cardiovasculares.

Por definição, biomateriais são: “dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos (incluindo fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de

origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados [...]” (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015, p. 967).

Os biomateriais mais utilizados como substitutos ósseos, sejam permanentes ou biodegradáveis, naturais ou sintéticos, necessitam ser biocompatíveis, osteoindutivos, osteocondutivos, porosos e mecanicamente compatíveis com o osso (BAUER et al., 2013), para assim servirem de *scaffolds*, capazes de proporcionar um ambiente adequado para as células se agregarem, proliferarem, diferenciarem e permitirem a deposição da nova matriz óssea (COSTA-PINTO; REIS; NEVES, 2011).

Os biomateriais poliméricos estão entre os mais empregados no contexto médico, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes às dos materiais biológicos (GRIFFITH, 2000). Especificamente na área de engenharia tecidual, vários biopolímeros têm se destacado, como o poli (ácido lático) (PLA) (LASPRILLA et al., 2012), o poli (ácido glicólico) (PGA) (OKAMOTO; JOHN, 2013) e o copolímero poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PGLA) (GENTILE et al., 2014). No campo da regeneração do tecido ósseo, é essencial atingir arquitetura e química semelhante à da matriz extracelular (MEC), que por sua vez irá desempenhar papel fundamental no controle da adesão celular e maior proliferação celular (CHEN et al., 2009).

Embora a literatura descreva vários métodos de processamento para a produção de *nanoscaffolds* visando aplicações na engenharia de tecidos (MI; JING; TURNG, 2015; HUTMACHER, 2001) como liofilização (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012), separação de fases, automontagem (GARG; BOWLIN, 2011), rotofiação (BRITO, 2013), nenhum corresponde à eletrofiação em termos da sua versatilidade, flexibilidade e facilidade de produção de fibras.

A eletrofiação compreende a aplicação de um campo elétrico para induzir a criação e o acondicionamento das fibras de vários materiais em um coletor metálico, estático ou rotativo, utilizando uma fonte de alta tensão, seringa com agulha e um coletor aterrado (KE et al., 2014). O campo elétrico é aplicado entre a ponta da agulha e uma base metálica que pode ser usada para coleta das fibras. Essa técnica ocupa um lugar de destaque devido à sua reconhecida capacidade de produzir nanofibras e fibras ultrafinas tridimensionais, indispensáveis para aplicações no campo da engenharia de tecidos ósseos (INGAVLE; LEACH, 2013; KHORSHIDI et al., 2015).

Fibras ultrafinas poliméricas produzidas por eletrofiação têm sido largamente utilizadas para desenvolvimento de novos materiais com potencial aplicação biomédica (LAO et al., 2011; INGAVLE; LEACH, 2013), já que apresentam estruturas e topologia semelhantes à das matrizes extracelulares naturais, sendo, por isso, candidatos interessantes como suportes para crescimento celular, sendo atribuído principalmente à elevada área superficial disponível (ZHANG; WEBSTER, 2009).

Dentre os polímeros, os poliésteres provenientes de fontes naturais ou sintéticas, têm sido amplamente estudados objetivando o seu potencial para aplicações biomédicas, mais especificamente em engenharia de tecidos (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011; OKAMOTO; JOHN, 2013). Destacamos aqui o poli (butileno adipato co-tereftalato) (PBAT), um polímero muito flexível que tem muitas propriedades interessantes, tais como um elevado alongamento na ruptura, biodegradabilidade (JIANG; WOLCOTT; ZHANG, 2006) e comprovada biocompatibilidade, seja puro ou com seus nanocompósitos (GOES et al., 2012; SILVA et al., 2014).

Algumas investigações vêm sendo realizadas sobre a síntese do PBAT, puro e associado com diferentes nanopartículas (GOES et al., 2012, FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013a; NETO et al., 2015). Em estudo recente, Rodrigues et al. (2016) concluíram que fibras ultrafinas de PBAT incorporadas com nanotubos de carbono de múltiplas paredes superhidrofílicos, obtidas pelo processo de eletrofiação, podem ser consideradas um biomaterial atrativo para aplicação biomédica. No entanto, até o momento, materiais produzidos pela técnica de eletrofiação utilizando PBAT e seus compósitos têm recebido pouca atenção quanto à sua preparação e aplicação.

Nesse estudo, o Polipirrol (PPy), um polímero condutor cuja propriedade mais importante é justamente sua elevada condutividade elétrica, além de apresentar facilidade de síntese, elevada flexibilidade, boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade será incorporado ao PBAT, (ANSARI, 2006; SILVA, 2009). Os polímeros condutores têm demonstrado grande potencial para utilização no campo biomédico, pois são capazes de auxiliarem o deslocamento de sinais elétricos para os locais de destino (tecido-alvo) e podem fornecer suporte físico para o crescimento celular (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007; LEE et al., 2012).

A presença do PPy no compósito produzido para esse estudo busca a produção de fibras ultrafinas condutoras de forma a permitir eletrodeposição de nanohidroxiapatita (nHAp) na sua superfície. A nHAp é um mineral que favorece o crescimento ósseo (LOBO, 2011) e têm sido largamente estudadas para a reparação e substituição de tecidos ósseos.

As nHAp podem ser obtidas por diversos métodos de síntese como processo sol-gel, síntese hidrotérmica, processo úmido, método biomimético, reações em estado sólido, precipitação, técnicas hidrotérmicas, hidrólise de fosfatos (LOBO, 2011) e outros métodos pelos quais nanocristais de várias formas e tamanhos podem ser obtidos. A eletrodeposição é o mais indicado por se tratar de um método eficaz e de baixo custo para a obtenção de filmes homogêneos sobre superfícies de biomateriais (KERN; SCHWALLER; MICHLER, 2005). Como ocorre de forma não espontânea, esse processo necessita de uma fonte de corrente contínua para direcionar o fluxo de íons.

Lobo et al. (2013) demonstraram que nHAp obtidas pelo método de eletrodeposição são biocompatíveis, bioativas e permitem a adesão e proliferação de osteoblastos e, por isso, tem aplicação na regeneração óssea por estabelecer ligações entre o material e o tecido ósseo. Nos últimos anos, o uso de polímeros aplicados juntamente às cerâmicas para reconstituição de tecidos, tais como osso, cartilagem, tendões e ligamentos, tem implicado na melhoria das propriedades mecânicas de *scaffolds* quando comparado a matriz do polímero (LEE et al., 2008).

As fibras ultrafinas condutoras biodegradáveis serão de grande importância para o desenvolvimento de implantes médicos não permanentes, que necessitam apresentar condutividade elétrica maior que a dos polímeros comumente utilizados, eliminando assim a necessidade de procedimentos de remoção dos mesmos (SILVA, 2009).

Os polímeros estruturados em forma de fibras estão se tornando cada vez mais atraentes, pois em geral, as fibras eletrofiadas apresentam estrutura semelhante à matriz extracelular dos tecidos biológicos (ALCOBIA, 2013), podendo vir mimetizar de forma bastante fidedigna as propriedades físico-químicas e estruturais do tecido ósseo humano.

A literatura não registra trabalhos que demonstram a eletrodeposição de nHAp na superfície de poliésteres devido à falta de condutividade desses polímeros. Portanto, esse estudo visa obter nanofibras ultrafinas tridimensionais de PBAT/PPy,

pela técnica de eletrofiação formando um suporte para deposição de nHAp e avaliar seu potencial para diferenciação osteoblástica, de forma a apresentar-se como uma alternativa para aplicação na regeneração do tecido ósseo e posterior produção de enxertos.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi produzir fibras ultrafinas de PBAT/PPy pelo processo de eletrofiação, utilizá-las como *scaffolds* para eletrodeposição de nHAp e avaliar seu potencial para uso na área de engenharia de tecido.

1.2 Objetivos Específicos

- Obter fibras condutoras ultrafinas com polímeros biorreabsorvíveis (PBAT e PPy) pelo processo de eletrofiação;
- Eletrodepositar nHAp na superfície das fibras condutoras ultrafinas tornando-as bioativas;
- Caracterizar as fibras ultrafinas utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Verificar a molhabilidade desses novos *scaffolds* através da análise de ângulo de contato;
- Analisar a biocompatibilidade das fibras ultrafinas através do teste de citotoxicidade utilizando a técnica de redução do sal de tetrazolium – MTT;
- Avaliar o potencial de diferenciação celular da matriz extracelular dos diferentes grupos analisados, através de ensaios de Fosfatase Alcalina;
- Analisar o potencial de adesão celular dos osteoblastos MG-63 no novo material utilizando MEV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os estudos que envolvem esta Dissertação encontram vasta explicitação teórica. A seguir, faz-se a exibição da revisão bibliográfica a respeito do tema do trabalho.

2.1 Reparo do Tecido Ósseo e Enxerto Ósseo

O tecido ósseo revela um potencial único para reparação, sendo capaz de reparar fraturas ou defeitos locais por meio do processo de regeneração, com formação de um novo tecido com a mesma organização estrutural do tecido anterior, sem a formação de cicatriz (AMADEI et al., 2006). O processo de regeneração óssea visa ao estabelecimento da organização anatômica e funcional do tecido lesado. Esse processo depende de diversos fatores, dentre eles a migração de células osteoprogenitoras, a liberação de fatores de crescimento que induzem o remodelamento ósseo, a angiogênese, fatores físicos e mecânicos (HERNÁNDEZ et al., 2012).

De acordo com Zakaria, Madi e Kasugai (2012), o principal obstáculo para uma reparação óssea satisfatória e a neoformação óssea é que, em contraste com a osteogênese, a formação de tecido conjuntivo ocorre rapidamente podendo prejudicar ou impedir totalmente a osteogênese.

Vários estudos têm sido realizados na busca de um método eficaz para acelerar a cicatrização do osso, buscando-se preencher as falhas ósseas segmentares quando existe perda considerável de tecido ósseo ou dificuldade em sua regeneração.

Enxertos têm sido muito usados para preencher os mais diferentes defeitos ósseos. As modalidades de intervenção existentes incluem enxertos autógenos, oriundos do próprio paciente e por isso são considerados “padrão ouro” para realização de enxertos ósseos, tem a vantagem de serem histocompatíveis, mas com a desvantagem da quantidade limitada; alógenos, resultantes de doadores

de mesma espécie, mas limitados pelos riscos de transmissão de doenças e por histoincompatibilidades; xenógenos, que são provenientes de doadores de espécies diferentes, como bovinos, apresentam resistência biomecânica similar à do osso humano e, com tratamentos adequados, podem evitar respostas imunológicas ou inflamatórias adversas (MEYER; FLOERKEMEIER; WINDHAGEN, 2008; DA VEIGA KALIL, 2013). Os substitutos ósseos aloplásticos surgem como alternativa promissora utilizando material natural ou sintético; são tipicamente osteocondutores, usados para reconstruções de defeitos ósseos e para servir de arcabouço para a reparação e crescimento do tecido ósseo (ANDRADE, 2007; KASAJ et al., 2008).

Assim, diversos materiais são utilizados como enxertos ósseos com o intuito de estimular a osteogênese (enxertos e implantes osteogênicos e osteoindutores) ou mesmo direcionar de forma mais rápida e apropriada a cicatrização do osso (enxertos e implantes osteocondutores) (PERKA et al., 2000; MORAES, 2006).

Para que possa ser utilizado em um sistema biológico como um enxerto, os biomateriais devem possuir as seguintes propriedades: não induzir à formação de trombos com o resultado do contato entre o sangue e o biomaterial; não induzir resposta imunológica adversa; não ser carcinogênico; não interferir no fluxo sanguíneo e não produzir resposta inflamatória aguda ou crônica que impeça a diferenciação tecidual característica do local da implantação (CARVALHO; BASSI; PEREIRA, 2004). Um substituto ósseo deve ser esterilizável, não tóxico, biocompatível, disponível em grandes quantidades, indutor de diferenciação celular para a formação de células ósseas e reabsorvível (RIVERA et al., 2004).

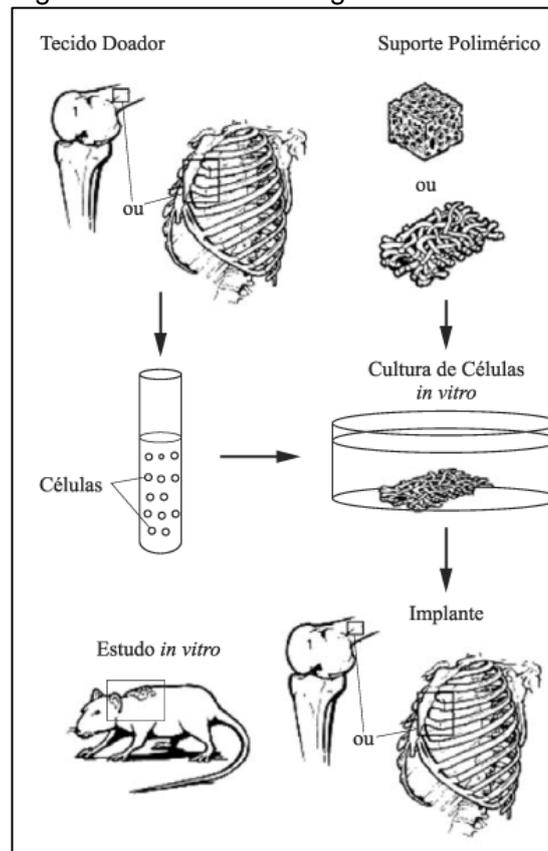
A alternativa mais promissora para enxerto ósseo é desenvolver materiais à base de polímeros que contenham reforços mais duros e mais fortes que o próprio polímero com constituintes tais como fibras, cristais ou partículas (EFTEKHARI et al., 2014).

A engenharia tecidual integra conhecimentos da ciência dos materiais, das engenharias e da biologia e tem emergido como uma abordagem promissora no desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de técnicas e de biomateriais que contribuam com a regeneração de tecidos danificados ou comprometidos em consequência de traumas, lesões ou doenças.

2.2 Bioengenharia Tecidual Óssea e Biomateriais

A Bioengenharia Tecidual compreende um campo emergente, multidisciplinar, que aplica os princípios das ciências biológicas e das engenharias para o desenvolvimento de biomateriais e/ou técnicas regenerativas que melhorem e/ou restaurem a função tecidual comprometida (ARMENTANO et al., 2010). Para Navarro et al. (2008), um dos grandes desafios se constitui no desenvolvimento de biomateriais com aplicação na reparação do tecido ósseo. Então, o foco dessa área tem sido a criação de tecido para enxerto, capaz de promover ou aumentar a osteogênese no sítio de defeito ósseo (FRÖHLICH et. al, 2008). A Figura 2.1 ilustra o desenvolvimento idealizado da técnica da engenharia de tecidos.

Figura 1 - Técnica da engenharia de tecidos



Fonte: BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK (2005).

Nesse sentido, a pesquisa em engenharia de tecidos tem buscado, de forma cada vez mais frequente, o desenvolvimento de *scaffolds* de tecido sintético, e

produzidos em nanoescala, usando materiais biocompatíveis para produzir um substituto funcional eficaz para o tecido ósseo danificado (POINERN; BRUNDAVANAM; FAWCETT, 2013).

A nanotecnologia refere-se à aplicação de conhecimento científico para manipular e controlar a matéria na escala atômica, molecular ou macromolecular e que, em ao menos uma dimensão, esteja na faixa entre 1 e 100 nm e resulte em estruturas, dispositivos ou sistemas que possuam novas propriedades e funções devido ao seu tamanho (ISO/TS80004 - 2010).

O uso de biomateriais em escala nanométrica ou ultrafinos vem despertando interesse dos pesquisadores a partir do ano de 2003, aproximadamente, com a realização de experimentações *in vivo* e ensaios clínicos. Esses novos materiais se caracterizam pela estrutura composta de partículas que se configuram em um arcabouço tridimensional (3D), com diâmetro médio entre 20-100 nm, sintetizados a partir de diferentes substratos, desde cerâmicos aos poliméricos. Esses nanobiomateriais se destacam, principalmente, pela sua composição físico-química, bastante semelhante à parte mineral do tecido ósseo (STRIETZEL; REICHART; GRAF, 2007; TELLEMAN et al., 2010).

O avanço da nanotecnologia no desenvolvimento de biomateriais é considerado promissor pelo fato desses nanobiomateriais apresentarem análogos aos componentes nanoestruturados da matriz extracelular (MEC) (SNIADOCKI et al., 2006). Os componentes da MEC possuem dimensões em escala nanométrica, de forma que muitas ferramentas da nanotecnologia são amplamente aplicáveis para mimetizar suas características (LOBO, 2011).

As características biomiméticas e excelentes propriedades físico-químicas dos nanobiomateriais desempenham um papel primordial na estimulação do crescimento celular, funcionando como guia (suporte) para regeneração tecidual. Vários nanomateriais têm sido estudados para aplicação na engenharia de diferentes tecidos, entre eles o tecido ósseo, cartilagem, pele, tecido neural, vascular, entre outros (ATALA, 2009).

Os materiais utilizados na área biomédica como substitutos do tecido ósseo devem possuir características biomecânicas, degradação controlada, propriedades elétricas e biológicas compatíveis com o tecido ou órgão lesado. Para escolha de um material para implantação no tecido vivo deve-se levar em conta vários fatores como: fadiga do material, bioatividade, adesão celular, degradação do

material e biocompatibilidade (VASQUEZ, 2007, CHEN et al., 2009), além disso, precisam proporcionar uma estrutura adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea (PRECHEUR, 2007).

No início da década de 50, quando os biomateriais passaram a ser usados de forma mais sistemática, o objetivo era a obtenção de materiais biocompatíveis, capazes de substituir um tecido danificado e prover suporte mecânico, com mínima resposta biológica do paciente. Posteriormente, buscou-se aumentar a vida do implante por sua interação com a interface do tecido hospedeiro. Em seguida, a meta era o desenvolvimento de materiais biodegradáveis, com capacidade de serem incorporados ou absorvidos (após dissolução) pelo tecido hospedeiro. Na atualidade, tem-se trabalhado com o conceito de biomimética, buscando-se materiais que participem de forma ativa no processo de recuperação, atuando no tecido de forma específica, com estimulação em nível celular (HOLZAPFEL et al., 2013).

2.2.1 Biomateriais Poliméricos Biorreabsorvíveis

Os polímeros são os materiais mais procurados na engenharia de tecidos, e também os mais empregados na prática médica, devido às semelhanças com características estruturais do tecido e também por apresentarem uma elevada versatilidade mecânica (CHEN; LIANG; THOUAS, 2013). Dentre as principais vantagens desses biomateriais destaca-se a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios e outros), o processamento secundário, custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas (WONG; BRONZINO, 2007).

Podem ser de origem natural ou sintética. Os polímeros naturais são derivados de plantas e animais e têm sido usados há muitos séculos. As modernas ferramentas da investigação científica tornaram possível a determinação das estruturas moleculares deste grupo de materiais e o desenvolvimento de inúmeros polímeros, que são sintetizados a partir de pequenas moléculas orgânicas. São chamados polímeros sintéticos. Os materiais sintéticos podem ser produzidos a

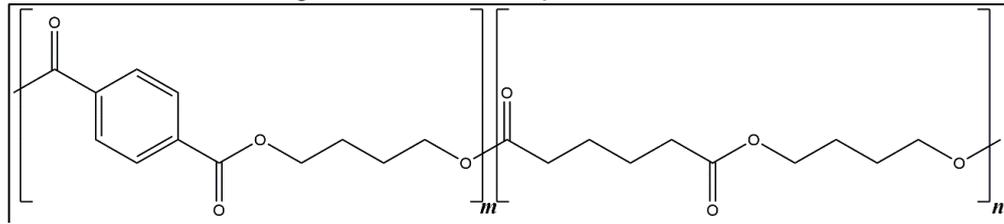
baixos custos, e suas propriedades podem ser modificadas a um nível em que muitos deles são superiores aos seus análogos naturais (CALLISTER; RETHWISCH, 2014).

Atualmente busca-se o desenvolvimento de polímeros que proporcionem efetiva interação com os tecidos, favorecendo respostas fisiológicas como crescimento e/ou diferenciação celular no local de implantação, mimetizando as características da matriz extracelular e exercendo um papel ativo na restauração tecidual. Uma classe de biomateriais poliméricos, os biorreabsorvíveis, são utilizados em tecidos que necessitam de um suporte temporário para sua recomposição tecidual ou para direcionar o processo regenerativo (SANTOS; WADA, 2007). Os polímeros biorreabsorvíveis são degradados *in vivo*, através da diminuição de tamanho, e os seus produtos são absorvidos pelo organismo, ou seja, ocorre a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Considerando a área de Engenharia de Tecidos, os polímeros sintéticos mais utilizados são os biodegradáveis, como os poliésteres alifáticos saturados: o poli(ácido láctico) (PLA) e o poli(ácido glicólico) (PGA) e o copolímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PGLA) (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003), ressaltando o uso na confecção de suportes tridimensionais para proliferação celular, como suturas biodegradáveis, dispositivos absorvíveis de fixação óssea e matrizes para a liberação de fármacos (TIAN et al., 2012).

O poli (butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) é um polímero biodegradável obtido por síntese química, produzido pela empresa BASF (Ecoflex® Mistura C1200 – BASF). Trata-se de um copoliéster alifático-aromático com base nos monômeros de 1,4-butanodiol, ácido adípico e ácido tereftálico na cadeia de polímeros (60% butileno adipato; 40% butileno tereftalato), como visto na sua estrutura química ilustrada na Figura 2.2.

Figura 2 - Estrutura química do PBAT.



Fonte: RODRIGUES et al., 2016.

O PBAT tem mostrado um elevado potencial para aplicações industriais ambientais, mas só recentemente tem-se estudado seus possíveis usos na engenharia de tecidos (FUKUSHIMA et al., 2012). Jao et al. (2010) estudaram o nível de biocompatibilidade *in vitro* de filmes PBAT, e concluíram que este poderia ser usado para aplicações biomédicas, especialmente depois de uma modificação da superfície de PBAT em amostras com heparina, ácido hialurônico e quitosana. Fukushima, Rasyida e Yang (2013a) concluíram que PBAT e nanocompósitos (sepiolite, montmorilonites, fluorohectorites) são biocompatíveis, hemocompatíveis e não citotóxicos, mostrando que esses podem ser muito atraentes para várias aplicações de engenharia de tecidos, especialmente para defeitos ósseos.

A principal limitação deste polímero para sua aplicação médica mais ampla (como ossos e substituição de articulação) reside em sua fraca resistência mecânica, no entanto verificou-se que a adição de nanopartículas poderia superar essa desvantagem, conferindo propriedades multifuncionais ao PBAT (DIMITRY et al., 2010; CHEN; CHEN; YANG, 2011; FUKUSHIMA et al., 2012).

A maioria dos polímeros não é bom condutor de eletricidade, devido à falta de disponibilidade de grande número de elétrons livres para participar do processo de condução, mas alguns materiais poliméricos com condutividade elétrica foram sintetizados e denominados polímeros condutores (CALLISTER; RETHWISCH, 2014).

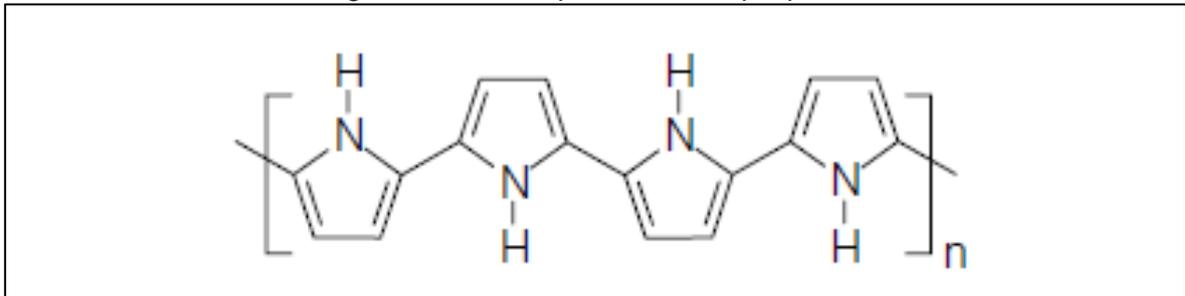
Os filmes de polímeros condutores têm sido explorados devido às suas características especiais, como baixa densidade, alta resistência, facilidade de fabricação, flexibilidade de design, estabilidade e baixo custo. A combinação dessas propriedades físicas com propriedades elétricas é que tem despertado interesse nesses polímeros ao longo das últimas décadas (WANG et al., 2009).

Nas áreas médicas, os polímeros condutores podem ser utilizados na manufatura de músculos artificiais, sensores de biomoléculas, eletrodos e agentes

para liberação controlada de fármacos (INNIS; MOULTON; WALACE, 2007) e no desenvolvimento de tecidos com interface eletrônica para monitoramento de sinais vitais (CARPI; ROSSI, 2005).

O Polipirrol (PPy) é um dos polímeros condutores com grande potencial para aplicações em implantes biomédicos uma vez que apresenta boa estabilidade e alta condutividade elétrica (WANG et al., 2009). A condutividade no PPy se dá em decorrência de sua estrutura que apresenta ligações simples e duplas alternadas entre os átomos de carbono ao longo da cadeia polimérica como mostra a Figura 2.3, originando um caminho para o fluxo de elétrons o que resulta na ocorrência de condução elétrica.

Figura 3 - Cadeia polimérica do polipirrol.



Fonte: Adaptado de (ROCHA FILHO, 2000).

O PPy pode ser sintetizado por dois métodos: (1) a polimerização química e a (2) eletroquímica, sendo que primeira permite a produção em larga escala por um baixo custo, facilidade na preparação de blendas com outros polímeros e melhor processabilidade (SANTIM, 2011). Esse método leva à formação de um pó preto quando uma solução de pirrol entra em contato com uma solução de um agente oxidante, por exemplo, o FeCl_3 .

Nos últimos anos várias pesquisas têm sido realizadas utilizando o PPy na tentativa de viabilizar aplicações desse polímero na área biomédica, principalmente considerando sua boa estabilidade química e alta condutividade.

Estudos *in vivo* comprovaram a viabilidade de utilização do PPy, na forma de compósitos, como material bioativo para melhorar a regeneração tecidual por ser não tóxico, biocompatível e capaz de promover estímulos elétricos em células nervosas e ósseas (COLLIER et al., 2000). Ramanaviciene et al. (2007) injetaram partículas de PPy em ratos e não detectaram respostas alérgicas ou alterações significativas em rins ou fígado desses animais. Cui et al. (2007)

estudaram sobre o uso de nanocompósitos de PPy, nanotubos de carbono e enzimas para a confecção de biossensores de lactase. Singh et al. (2006), em estudo com membranas de PPy e nitrato de sódio, comprovaram que essas membranas se apresentam como bons substratos para crescimento de células endoteliais. Lee et al. (2008) também obtiveram bons resultados com células endoteliais, observando uma boa adesão dessas células na superfície de filmes de PPy com oligopeptídeos. As propriedades de filamentos de PPy foram avaliadas por Llinás et al. (2005) e indicaram seu uso como eletrodos para estimulação do sistema nervoso.

No entanto, a associação de um polímero condutor com um poliéster como arcabouço para crescimento de cristais à base de fosfato de cálcio ainda não tinha sido reportado, o que motiva o desenvolvimento de biomaterias nessa área.

Um campo de interesse significativo tem sido gerado sobre compósitos PPy com hidroxiapatita (HAp) para a fabricação de materiais de substituição óssea com melhora da osseointegração. Ma et al. (2011) realizaram estudo sobre a eletrodeposição de compósitos contendo heparina e hidroxiapatita em uma matriz de PPy depositada como monocamadas ou bicamadas sobre substratos condutores de aço inoxidável. Os resultados sugerem que esses materiais podem ser usados para a fabricação de implantes biomédicos com a melhoria da hemocompatibilidade, osseointegração e proteção contra corrosão.

2.2.2 Biomateriais Cerâmicos

As cerâmicas podem ser tanto sintéticas quanto naturais e possuem diversas vantagens como biomateriais para utilização em substituição ao tecido ósseo, pelo fato de se apresentarem estruturalmente semelhantes ao componente inorgânico do osso. São biocompatíveis, osteocondutivas e, principalmente, não possuem proteínas em sua composição, o que proporciona ausência de resposta imunológica, além de possuírem um alto tempo de degradação *in vivo* (ABUKAWA et al., 2006). Suas limitações estão relacionadas à sua baixa rigidez estrutural, de forma que não podem ser utilizadas em regiões de grande esforço mecânico, e à

sua natureza porosa, o que aumenta o risco de fraturas (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006).

As biocerâmicas podem ser classificadas, de acordo com a sua interação com os tecidos, como bioinertes, bioativas e biorreabsorvíveis. Os materiais bioinertes, mantêm suas propriedades físicas, químicas e mecânicas enquanto implantadas, são bem toleradas pelo organismo e não provocam resposta dos tecidos. As cerâmicas bioativas interagem com o tecido circundante, estimulam a cura e o sistema tissular a responder ao material como se este fosse um tecido natural, como é o caso da HAp e dos biovidros (DELFINO et al., 2010; YELTEN; YILMAZ, OKTAR, 2012). Os materiais biorreabsorvíveis participam do processo metabólico do organismo e apresentam degradação por ações químicas ou biológicas, sendo lentamente substituídos por células em crescimento. O fosfato tricálcico e o gesso estão incluídos nesta classe de cerâmicas (RATNER et al., 2004).

Podemos destacar como materiais biocerâmicos: a HAp, alumina, zircônia e biovidros. A HAp é um fosfato de cálcio de fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com relação molar Ca/P 1,67. Este material possui grande importância na tecnologia de biocerâmicas, por ser o constituinte principal da fase mineral de ossos e dentes humanos (BONAN et al., 2014). A HAp promove a adesão e crescimento do tecido ósseo pela formação espontânea de apatitas biológicas (KALITA; BHARDWA; BHATT, 2007), especialmente quando na forma nanoestruturada (nHAp).

A vantagem de usar nanohidroxiapatita (nHAp) reside na sua capacidade de integração com o tecido, promovendo e apoiando o crescimento ósseo. Uma propriedade interessante da nHAp é que quando esta se une ao osso, forma uma união indistinguível com o tecido ósseo circundante. Infelizmente, existem algumas desvantagens na sua utilização, já que não pode ser utilizado em grandes quantidades de uma composição em implante ortopédico porque a HAp tem baixas propriedades mecânicas tais como a força e resistência à fratura (POINERN; BRUNDAVANAM; FAWCETT, 2013)

De acordo com Park (2008), dentre as propriedades da HAp destaca-se sua excelente biocompatibilidade e bioatividade. Essas características lhe conferem capacidade de ligar-se ao tecido ósseo, sem a presença de tecido conectivo intermediário. Esta biocerâmica possui ainda propriedade osteocondutiva, o que permite a migração de células osteogênicas pela superfície desse material.

Atualmente polímeros têm sido aplicados juntamente com partículas biocerâmicas com o intuito de solucionar desvantagens individuais, objetivando desenvolver biomateriais sintéticos híbridos ou compósitos para utilização na reconstituição de tecidos, tais como osso, cartilagem, tendões e ligamentos. Isso implica a melhoria das propriedades mecânicas do *scaffold* em comparação com a matriz de polímero puro (LEE et al., 2008).

2.2.3 Compósitos

Os compósitos correspondem a uma classe de materiais constituídos por uma fase contínua (matriz) e uma fase dispersa (componente de reforço ou modificador) separadas por interfaces, cujas características podem incorporar propriedades combinadas dos constituintes individuais. O material de reforço ou modificador pode ser utilizado na forma de fibras ou partículas e é adicionado com diversos objetivos, como, por exemplo, melhorar propriedades mecânicas, aumentar a taxa de degradação, melhorar a biocompatibilidade e bioatividade, dentre outros (HABRAKEN; WOLKE; JANSEN, 2007).

Considerando desvantagens individuais das cerâmicas e polímeros, estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver biomateriais sintéticos híbridos ou compósitos, que possuam as vantagens das cerâmicas e polímeros, mas com melhores taxas de reabsorção após a implantação e melhor resistência mecânica (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006)

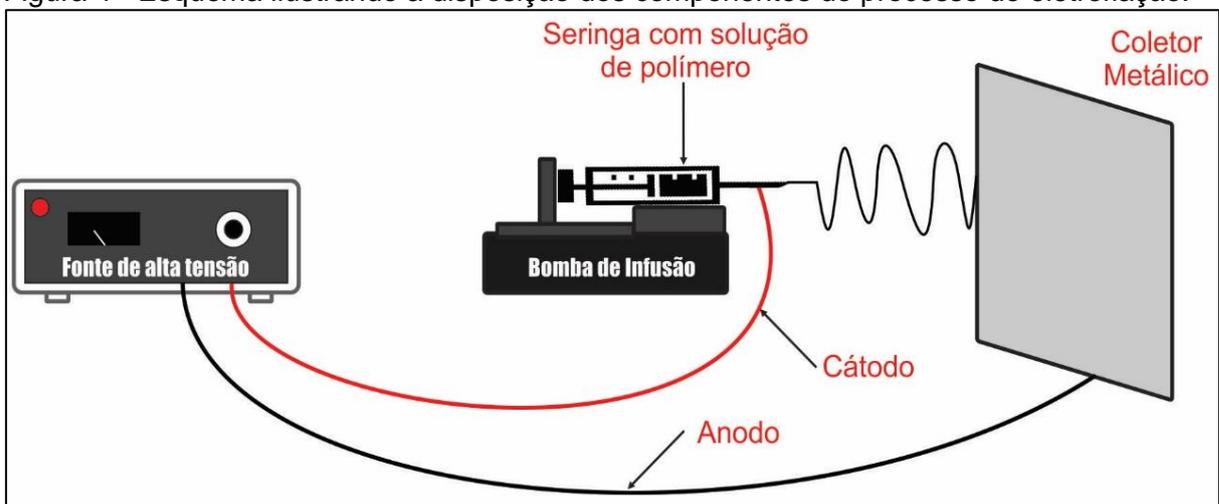
A formação dos biomateriais compósitos pode ocorrer de diversas formas, sendo que as principais associações são do tipo polímero-cerâmica e metal-cerâmica. Em nosso estudo, será mostrado um nanocompósito formado por biomaterial polimérico (PBAT/PPy) com a adição de nHAp na superfície pela técnica de eletrodeposição. Em biomateriais poliméricos para implante ósseo, a adição de partículas de HAp tem como objetivo aumentar a biocompatibilidade e o módulo elástico da matriz, levando as propriedades mecânicas do compósito a se tornarem mais próximas às do osso (KATTI, 2004).

2.3 Fibras Ultrafinas Poliméricas Produzidas por Eletrofiação

Eletrofiação é um processo através do qual se consegue produzir nanofibras, fibras ultrafinas e microfibras, contínuas com diâmetros que variam na faixa entre 3 nm e de 5 μm (SUBBIAH et al., 2005). Fibras poliméricas produzidas por eletrofiação têm atraído atenção significativa para a engenharia de tecidos (ZANG et al., 2008), pois permite a fiação de uma ampla gama de polímeros, tanto naturais como sintéticos, bem como na combinação desses polímeros (CHEW et al., 2006).

Em nível experimental um processo de eletrofiação requer apenas uma fonte de alimentação com tensão elevada (até 60 kV), num sistema de aterramento, solução polimérica, bomba de infusão, uma seringa, uma agulha de ponta faceada e um coletor (TEO; RAMAKRISHNA, 2006). A Figura 2.4 demonstra um esquema básico de montagem de um sistema de eletrofiação, que pode ser feito tanto na horizontal como na vertical.

Figura 4 - Esquema ilustrando a disposição dos componentes do processo de eletrofiação.



Fonte: Autora.

Para o processo de eletrofiação, os polímeros devem estar completamente dissolvidos em solvente para formar uma solução polimérica. Em seguida, o fluido polimérico é colocado na seringa e os terminais elétricos são ligados na ponta da agulha (cátodo) e no coletor (ânodo). Por fim, é aplicada a diferença de potencial pela fonte (kV).

A fabricação de *scaffolds* a partir de fibras ultrafinas permite o desenvolvimento de suportes que mimetizam a arquitetura do tecido humano natural na escala nanométrica (MENG et al., 2011). As micro e fibras ultrafinas obtidas por eletrofiação têm características notáveis tais como uma grande área de superfície, boa interconectividade dos poros e alta porosidade fazendo dessas as melhores candidatas para aplicação em engenharia de tecidos (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2006). Uma superfície porosa nas fibras ultrafinas não é importante somente por promover aumento na ligação de células e compatibilidade com os tecidos, mas também se torna essencial para permitir o transporte de oxigênio e nutrientes para as células, facilitando sua fixação e diferenciação, além de apoiar e controlar o crescimento celular (CUNHA; PANSERI; ANTONINI, 2011).

A estrutura criada por fibras ultrafinas eletrofiadas assemelham-se bastante com o ambiente natural das células da MEC do corpo humano. Assim, implantes de materiais eletrofiados têm maior possibilidade de favorecer a adesão e proliferação de células endógenas, conduzindo a um melhor processo de cura ou regeneração tecidual (ALCOBIA, 2013).

Em artigo de revisão, Costa et al. (2012) elencaram inúmeras possibilidades de aplicação dessas fibras ultrafinas produzidas por eletrofiação em engenharia tecidual médica, seja como parte de próteses, vasos sanguíneos, pele artificial, biossensores, liberação controlada de fármacos, *scaffolds* e curativos, como também relatos da incorporação de fatores de crescimento, fármacos, enzima ou até mesmo fragmentos de DNA nas fibras ultrafinas para controlar a forma como esses materiais interagem com as células e o organismo do indivíduo. Ainda segundo esses autores, uma das áreas com maior potencial de benefício com o uso da eletrofiação é a de biomateriais, onde a estrutura fibrilar na escala submicrométrica, a biocompatibilidade resultante do uso de polímeros de origem natural e a possibilidade de carregamento com substâncias bioativas implicam um conjunto de propriedades até então inédito em qualquer material de engenharia, abrindo um novo universo de possibilidades no campo da engenharia tecidual.

Dada a flexibilidade de ajustes dos parâmetros para eletrofiação, muitos estudos têm sido realizados. Uma dessas linhas de pesquisa associa polímeros biocompatíveis com nanopartículas bioativas, tais como a nHAp, buscando favorecer a integração das nonofibras produzidas com o tecido ósseo, e assim, favorecer o processo de reparação óssea.

Silva et al. (2014) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de fibras ultrafinas de PBAT com nanopartículas de nHAp incorporadas, produzidas por eletrospinning e concluíram que essas fibras ultrafinas não apresentaram toxicidade às células e ainda exibiram um ambiente mais favorável ao desenvolvimento de células da linhagem MG-63 quando comparadas à amostra controle de PBAT. Esse resultado torna promissora a pesquisa envolvendo o poliéster PBAT.

3 METODOLOGIA

A pesquisa corresponde a um estudo experimental do tipo caso controle, com abordagem quantitativa, com objetivo de produzir e caracterizar fibras poliméricas ultrafinas condutoras com recobrimento de nHAp, para aplicações em engenharia de tecidos.

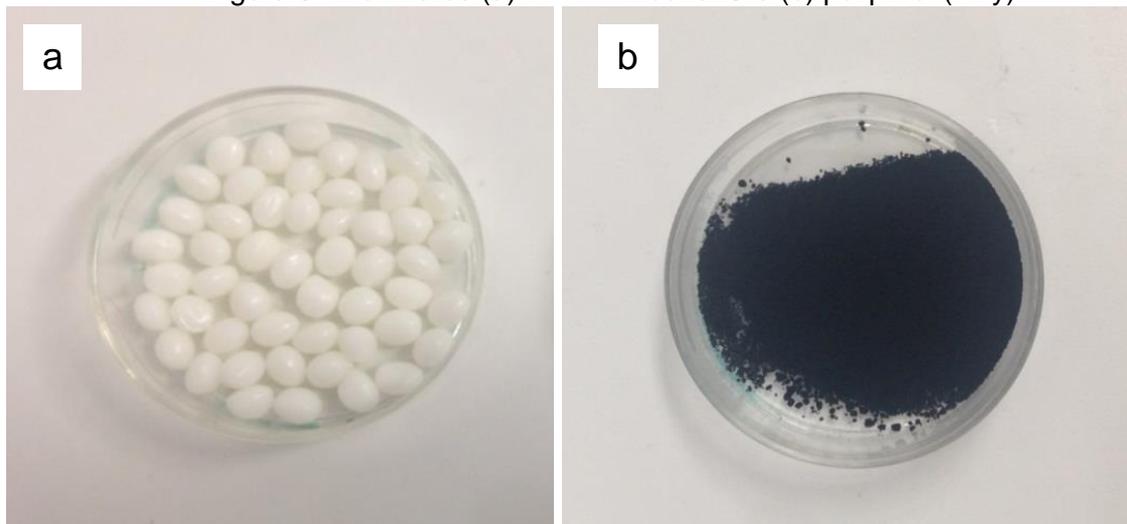
Até a presente data não havia registros da eletrofiação de fibras ultrafinas que associavam um poliéster e um polímero condutor como *scaffold* para eletrodeposição de nHAp e seu possível uso para aplicações biomédicas. A seguir será descrito o processo para obtenção dessas fibras.

3.1 Produção das Soluções Poliméricas para Eletrofiação

Para a produção das soluções poliméricas foi utilizado o polímero comercial PBAT - Ecoflex® F blend C1200 (Figura 3a), poliéster biodegradável compostável para filmes da BASF SE; o solvente clorofórmio (CHCl_3) da Dinâmica Química Contemporânea Ltda e o solvente secundário N,N-dimetilformanida ($\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$ (DMF) da Synth e, o polímero secundário e condutor PPy (Figura 3b) sintetizado na Universidade Federal do estado de São Paulo (Unifesp).

Os procedimentos para produção das soluções e posterior eletrofiação foram realizados no Laboratório de Nanotecnologia Biomédica do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), sob a responsabilidade e orientação do professor Dr. Anderson de Oliveira Lobo.

Figura 5 - Polímeros (a) PBAT - Ecoflex® e (b) polipirrol (PPy).



Fonte: Autora.

As soluções contendo PBAT e PPy em 12% (m/v) e 1% (m/v), respectivamente, foram preparadas utilizando-se clorofórmio e dimetilformamida (DMF) como sistema solvente (60/40). Numa preparação típica, o PBAT foi dissolvido em clorofórmio, durante 2 horas, sob vigorosa agitação por meio de um agitador magnético (Color Squid IKMAG®) e uma barra magnética, até total dispersão dos grânulos. O PPy foi disperso em DMF sob sonicação (VCX 500 - Sonics) durante 60 minutos. Depois que o PPy foi completamente disperso, as duas soluções foram misturadas, e a solução resultante foi agitada durante 20 h, até completa homogeneização. Mediu-se a condutividade das soluções contendo somente o PBAT (12% m/v) e PBAT/PPy (12% e 1% m/v) utilizando um condutímetro (mCA 150, TECNOPON).

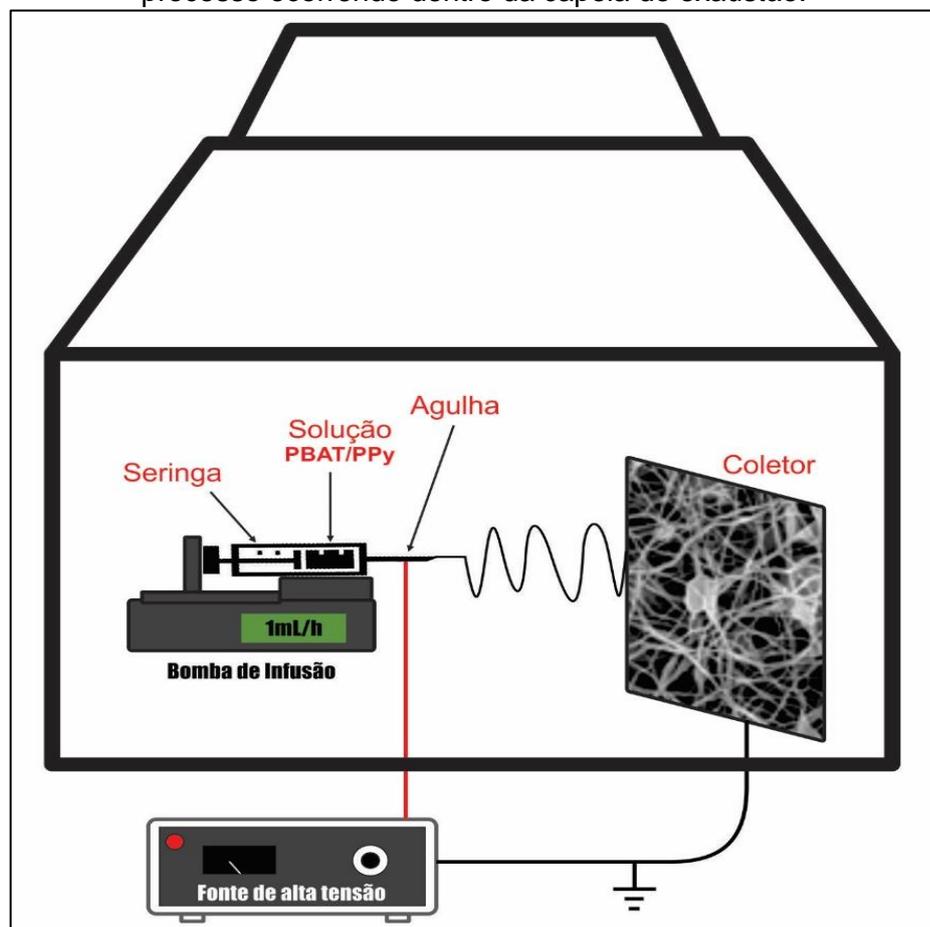
3.2 Fabricação das Fibras Poliméricas Ultrafinas

As soluções de PBAT e PBAT/PPy foram eletrofiadas utilizando uma fonte de alta tensão da marca BERTAN 230-30R. As soluções foram colocadas na bomba de infusão, em uma seringa de 3 mL (Becton DicKinson – BD), agulha de metal não descartável 1,2 mm, com fluxo regulado em 1mL/h. A tensão aplicada foi de 13 kV e o processo ocorreu a uma distância de 10 cm entre agulha e coletor. As amostras foram coletadas em um contra-eletródo plano de aço de dimensões 92 X 78 mm,

recoberto por papel alumínio, no intuito de facilitar a remoção das mesmas. O processo teve duração aproximada de 2 horas para cada amostra e foram controlados também os parâmetros de temperatura (21-23 °C) e umidade relativa do ar (45 a 50%).

A Figura 3.2 ilustra basicamente como foi organizado o aparato experimental para a produção de fibras ultrafinas poliméricas desta pesquisa, que ocorreu no interior da capela de exaustão.

Figura 6 - Representação esquemática da montagem típica da técnica de eletrofiação, com processo ocorrendo dentro da capela de exaustão.



Fonte: Autora.

3.3. Eletrodeposição de nHAp sobre as Fibras Ultrafinas de PBAT/PPy

Para a produção do eletrólito, foram utilizados reagentes de alta qualidade (Sigma-Aldrich®), com máxima pureza, tais como descritos na Tabela 1. Salienta-se que para a preparação do eletrólito a solução manteve a razão Ca/P da nHAp estequiométrica (1,67).

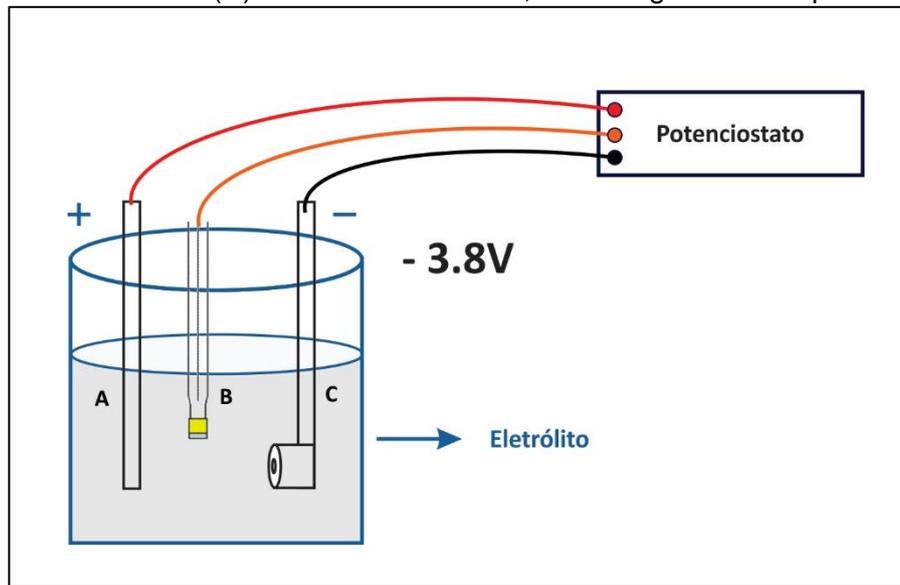
Tabela 1- Reagentes do eletrólito da marca SIGMA-ALDRICH®

Eletrólitos	Concentração (mM)	Volume (mL)
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	2,5	50
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,5	50

Fonte: Autora.

O processo de deposição eletroquímica de cristais de nHAp foi realizado em um Potenciostato/Galvanostato (AUTOLAB, PGSTAT 128N, METROHM), operando em modo Potenciostático com o módulo px1000 acoplado para medir constantemente a temperatura e pH durante o processo de eletrodeposição. A figura 3.3 esquematiza a célula eletroquímica onde ocorreu o processo de eletrodeposição dos cristais de nHAp na superfície das fibras PBAT/PPy.

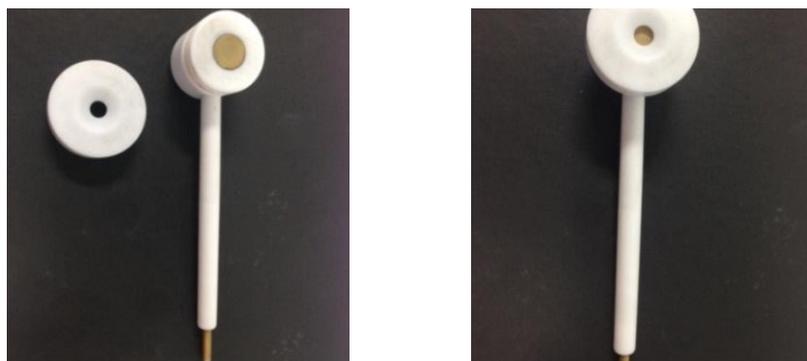
Figura 7 - Esquema ilustrando a célula eletroquímica, demonstrando (A) contra eletrodo, (B) eletrodo de referência e (C) eletrodo de trabalho, ambos ligados a um potenciostato.



Fonte: Autora

Na eletrodeposição de nHAp as amostras das fibras de PBAT/PPy (10mm x 10mm) foram utilizadas no ânodo acoplado à um porta-eletródo de teflon em formato de cachimbo, como mostra a Figura 3.4. Foi realizada a completa vedação do ânodo para não ocorrer influências nas medidas eletroquímicas.

Figura 8 - Montagem do ânodo (porta-eletródo) para eletrodeposição de nHAp



Fonte: Autora.

Utilizou-se como contra-eletródo um bastão de platina com 5×10^{-2} m de comprimento e 2×10^{-4} m de diâmetro. O pH foi ajustado para 4,7 e monitorado automaticamente ao longo do processo de eletrodeposição. O monitoramento da temperatura também foi realizado, e para mantê-la constante ($\sim 70^{\circ}\text{C}$) utilizou-se um

banho termostático (QUIMIS, Modelo Q-218-1). Todo o processo foi realizado sob agitação contínua de 450 rpm com o auxílio de agitador magnético (IKA®). Os cristais de nHAp foram depositados nas fibras ultrafinas PBAT/PPy pela aplicação de um potencial constante de -3.8 V durante 30 min. Essa configuração foi escolhida para promover nHAp estequiométrica.

Ao final do processo de eletrodeposição era possível visualizar uma fina camada de nHAp sobre a superfície das amostras das fibras ultrafinas PBAT/PPy, como é visto na Figura 3.5.

Figura 9 - Amostra PBAT/PPy com nHAp eletrodepositada na superfície



Fonte: Autora

3.4 Caracterização das Fibras Ultrafinas PBAT, PBAT/PPy, PBAT/PPy/nHAp

As considerações acerca das técnicas e procedimentos de caracterização das fibras ultrafinas estão baseadas na análise morfológica e estrutural por MEV e na molhabilidade pela análise do ângulo de contato, que serão descritos a seguir.

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura – Emissão de Campo

A análise morfológica das amostras para caracterização das fibras ultrafinas e da nHAp eletrodepositada foi realizada pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura – Emissão de campo usando um Microscópio Mira3 TESCAN do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, operando a 20,0 kV. Antes da análise, depositou-se uma fina camada de ouro (~10nm) na superfície das amostras, via técnica de Sputtering, sob plasma de Argônio, à pressão de 2×10^{-1} mBar, e corrente de 30 mA, durante 2 minutos, a fim de melhorar a condutividade e consequentemente a resolução das micrografias.

3.4.2 Análise da Molhabilidade

Para fazer as medidas do ângulo de contato (AC), utilizou-se o método de Gota séssil com água deionizada (2 μ L) em temperatura e pressão atmosférica controlada em ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e (~60%), respectivamente. Para aquisição das medidas foi utilizado um goniômetro Krüss, modelo EasyDrop Contact Angle Measuring Instrument (EasyDrop DSA 100). As medidas foram realizadas imediatamente após a deposição de uma única gota sobre a superfície dos nanocompósitos (fixado em substratos de Teflon) para evitar perturbações por evaporação ou adsorção e as medições entre o ângulo e a interface foram tiradas em diferentes tempos (0 – 2400s).

3.5 Ensaios Biológicos in vitro

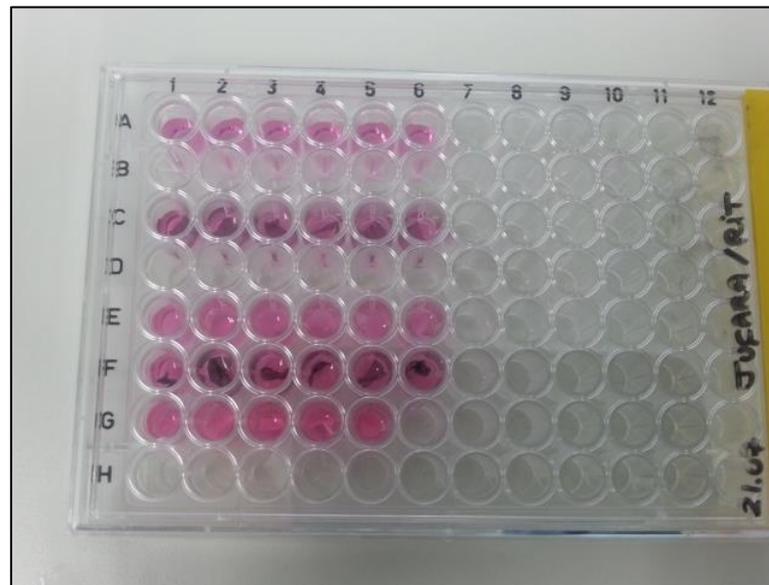
Os ensaios biológicos foram realizados na sala de Cultura de Células do Laboratório de Histologia e Terapia Regenerativa do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos/SP.

Para realização dos ensaios foram utilizados osteoblastos humanos MG-63 (ATCC® CRL-1427™), cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e incubados em estufa com atmosfera controlada de CO₂ a 5% e temperatura a 37°C.

3.5.1 Ensaio de Viabilidade Celular

A citotoxicidade das amostras PBAT, PBAT/PPy e PBAT/PPy/nHAp foi avaliada utilizando o ensaio de MTT. Esse ensaio é baseado na redução do sal de tetrazolium – MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliol - Sigma (Saint Louis, Missouri, EUA) em cristais de formazan pelo complexo enzimático succinato desidrogenase presente na matriz de mitocôndrias de células viáveis. Para realização deste ensaio, foram plaqueadas 2×10^4 células/poço em uma placa de 96 poços, como ilustrado na Figura 3.6.

Figura 10 - Plaqueamento das células MG-63 como biomaterial e látex para realização do ensaio MTT



Fonte: Autora.

Todas as amostras (10 x 10 x 1 mm) foram esterilizadas durante 24 horas, sob irradiação UV. As células foram submetidas a contato direto com as amostras e látex (controle positivo de morte) em dois experimentos independentes,

por 1 e 7 dias em condições de cultivo. Após os respectivos períodos de incubação, as amostras e o meio foram retirados e, então, adicionados 100 μL de MTT (1mg mL^{-1}) em cada poço. A placa foi revestida por papel alumínio e incubada por 2 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C . Transcorrido este período, a solução de MTT foi retirada e 100 μL de DMSO (Dimetilsulfóxido) - Sigma (Saint Louis, Missouri, EUA) adicionado em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância das placas foi feita em leitor de ELISA (Elisa Spectracount, Packard, EUA) utilizando-se filtro de 570nm. Os dados obtidos foram subtraídos do valor do branco, apenas DMSO, e apresentados em forma de porcentagem em relação ao controle. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

3.5.2 Ensaio de Fosfatase Alcalina (ALP)

A estimulação osteogênica pelos *scaffolds* está diretamente relacionada com um aumento da atividade da ALP. A enzima fosfatase alcalina está presente nas membranas plasmáticas dos osteoblastos e durante a formação ativa do tecido ósseo essas células secretam altos níveis dessa enzima (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Para avaliar a capacidade das fibras ultrafinas para estimular a diferenciação dos osteoblastos, 2×10^4 células/mL MG-63 foram mantidas em cultura em três grupos experimentais com as amostras do nanomaterial (PBAT, PBAT/PPy e PBAT/PPy/nHAp) e um grupo controle (sem fibras ultrafinas), em uma placa de 24 poços. Os ensaios foram realizados em quadruplicata, em dois experimentos de 14 e 21 dias.

A fosfatase alcalina hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada é diretamente proporcional à atividade enzimática. Para determinar a ALP através da liberação de timolftaleína monofosfato, usamos o Kit Fosfatase Alcalina nº 40 (Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte, BR), de acordo com as recomendações do fabricante. A absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro (UV 1203) no comprimento de onda 590 nm. A atividade da ALP foi correlacionada com o conteúdo de proteína e expressa como μmol de ALP timolftaleína/min/mL.

A fosfatase alcalina foi quantificada em relação à proteína. Para dosagem da proteína, após decorridos os respectivos períodos, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados três vezes com PBS a 37°C e incubados com 2 mL de 0,1% de lauril sulfato de sódio (LSS) durante 30 min. A solução LSS/células foi misturada com uma solução de Lowry (Sigma) e incubadas por 20 min em temperatura ambiente. O reagente de Folin-Ciocalteu fenol (Sigma) foi adicionado e deixado por 30 min em temperatura ambiente para permitir o desenvolvimento da cor. O conteúdo de proteína total foi calculado com base na curva padrão de albumina e expressos como $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.5.3 Análise da Adesão Celular

O teste de adesão foi realizado com o objetivo de mostrar a interação das células cultivadas sobre os biomateriais. Para avaliar a adesão dos osteoblastos MG-63 foram cultivadas 2×10^4 células em placas de 24 poços por 24 horas sobre as membranas poliméricas dos grupos: PBAT, PBAT/PPy e PBAT/PPy/nHAp. Posteriormente, as amostras (10 X 10 X 1mm) foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão salina fosfato (PBS-137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10nM Na_2HPO_4 , 1,8mM KH_2PO_4 , pH 7,4) por 10 min em temperatura ambiente. As amostras com células foram desidratadas em soluções com concentração crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%), pelo período de 10 min cada, hexametildisiloxano (HMDS) e acetona 1:1 por 30 min e HMDS 100% por 30 min. Ao final, as amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro (~10nm) via técnica de Sputtering, sob plasma de Argônio, à pressão de 2×10^{-1} mBar, e corrente de 30 mA, durante 2 minutos. A análise morfológica das células deu-se por meio de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) da marca Zeiss, modelo EVO MA10 do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

3.6 Análise Estatística

Para a interpretação dos resultados, utilizou-se o software Drop Shape Analysis 4 (KRÜSS) para o ajuste do método variável do ângulo de contato, utilizando como linha de base o método de Young-Laplace. Os dados foram apresentados na forma de média e desvio padrão e foram coletados com um intervalo de confiabilidade de 99,1% baseado no valor da medida de tensão superficial da água.

Os ensaios biológicos foram realizados em quadruplicata e todos os resultados obtidos estão expressos como média \pm desvio padrão da média e submetido a teste de análise de variância não paramétrico seguido de pós-teste de Múltipla Comparação Tukey's com o auxílio do *software* GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0,05$) e foi representado pelo símbolo (*) nos gráficos.

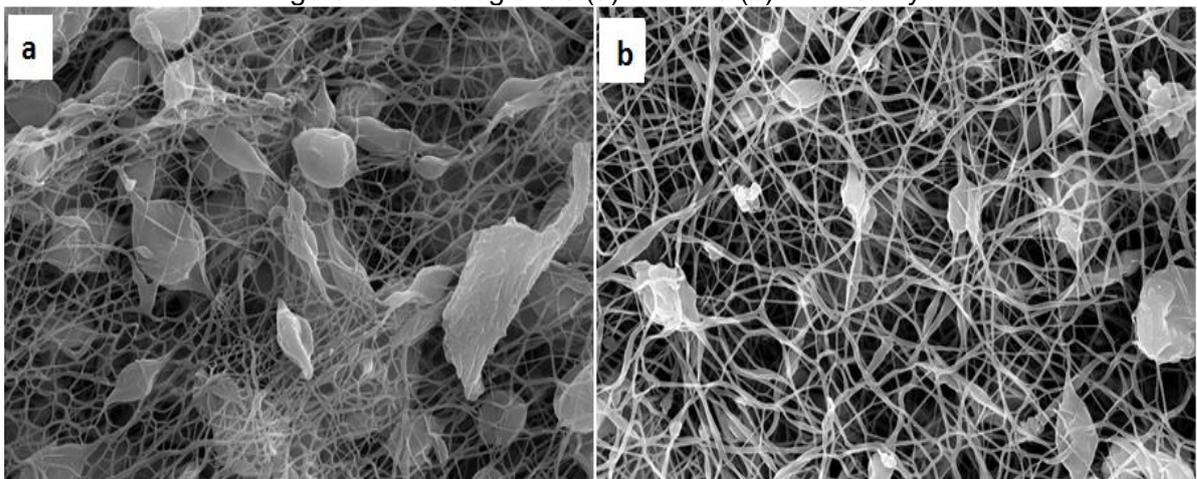
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta sessão, os dados obtidos no estudo são apresentados, conforme foram interpretados sob o enfoque desta pesquisa e serão discutidos em relação ao que se avançou no conhecimento do problema. Inicialmente serão apresentados e discutidos resultados referentes à caracterização das nanofibras envolvendo Microscopia Eletrônica de Varredura e Análise da molhabilidade através da medida do ângulo de contato, seguido dos resultados da análise biológica *in vitro* através dos ensaios de Viabilidade celular, Atividade da fosfatase alcalina e Ensaio de adesão celular.

4.1 Caracterização Morfológica das Fibras Ultrafinas

A morfologia (distribuição de diâmetros, orientação e alinhamento) das fibras eletrofiadas foi caracterizada utilizando-se a Microscopia Eletrônica de Varredura – emissão de campo (MEV-EC). A Figura 4.1 (a, b) apresenta as micrografias das fibras ultrafinas PBAT e PBAT/PPy.

Figura 11 - Micrografias (a) PBAT e (b) PBAT/PPy



Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

As amostras 4.1a e 4.1b apresentaram fibras com morfologia de aspecto fusiforme e contendo defeitos em forma de contas (*beads*), notadamente na amostra

PBAT. De acordo com Alcobia (2013), o tipo de fibra obtida é influenciado pela concentração da solução polimérica. Se a solução utilizada for muito diluta pode não haver material suficiente no jato para que forme uma fibra contínua favorecendo o surgimento de *beads*. Portanto, a baixa concentração da solução leva a redução no diâmetro médio das fibras, mas aumenta a possibilidade de *beads*. Percebe-se que as fibras ultrafinas PBAT/PPy apresentaram *beads* menores com regiões menos achatadas. Esta redução no tamanho dos *beads* e o aspecto mais fusiforme parece estar relacionado ao aumento da concentração da solução pela presença do PPy (1%).

A condutividade elétrica da solução também é um fator a ser considerado, pois interfere na morfologia das fibras produzidas. As medidas elétricas das soluções utilizadas mostraram que enquanto a solução PBAT apresentou uma condutividade elétrica de $0,2 \mu\text{S cm}^{-2}$, a introdução de PPy aumentou a condutividade elétrica para $36,2 \mu\text{S cm}^{-2}$. Picciani et al. (2010) observaram que a adição de um polímero condutor altera de forma significativa as propriedades da solução e, conseqüentemente, das fibras formadas, diminuindo drasticamente formação de *beads*, deixando as fibras mais uniformes. Esse achado também foi encontrado em nosso estudo, em que se observa que a nanofibra condutora PABT/PPy apresenta menor quantidade de *beads*, como evidencia a Figura 4.2 b.

A caracterização do diâmetro das fibras é de grande importância pois este irá influenciar significativamente o tipo de interação das células com o *scaffold*. A análise do diâmetro das fibras obtidas nesse estudo demonstrou que as fibras PBAT apresentaram diâmetro médio de 111 ± 26 nm enquanto que PBAT/PPy mostrou um pequeno aumento, com diâmetro médio de 132 ± 33 nm. Esperava-se que a presença do PPy promovesse uma redução no diâmetro médio das fibras já que as soluções de maior condutividade elétrica geralmente produzem fibras de menor diâmetro (TAN et al., 2005; BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Ainda assim, as fibras produzidas por eletrofiação em nosso estudo se apresentaram ultrafinas.

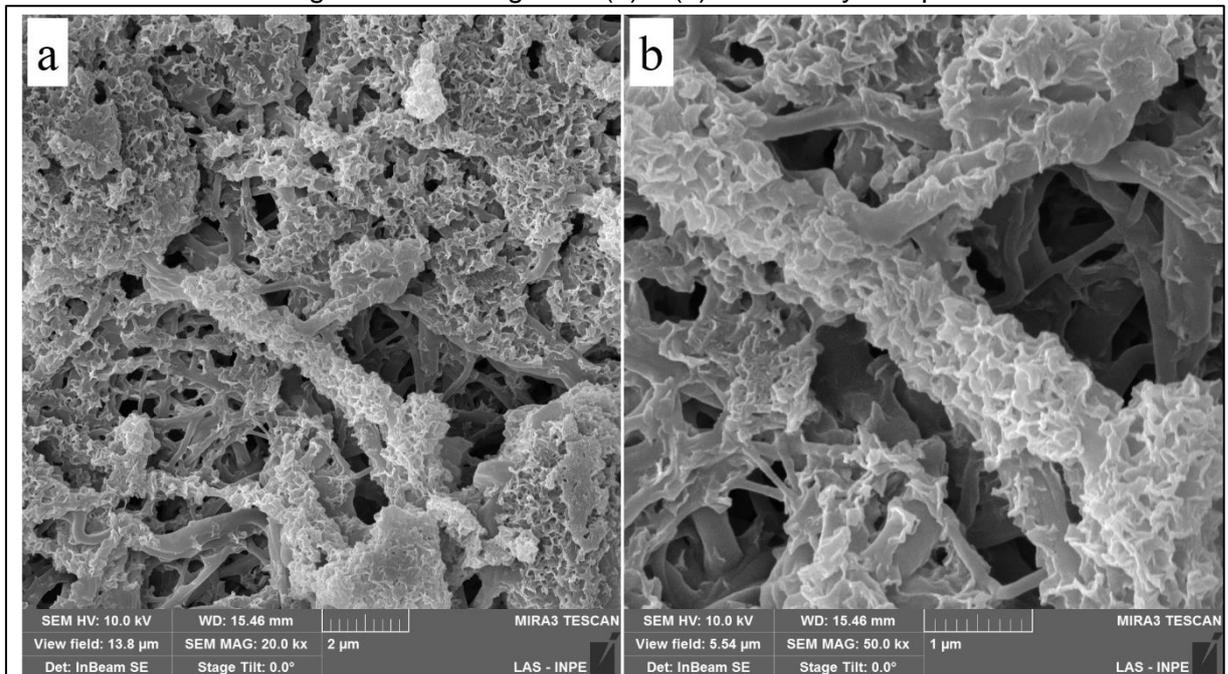
De acordo com Yoo, Kim e Park (2008) e Leung e Ko (2011), as fibras ultrafinas são as estruturas mais desejáveis para aplicações biomédicas por apresentarem a estrutura mais próxima à nativa de uma matriz extracelular (MEC), que é composta principalmente de fibras ultrafinas de colágeno.

O diâmetro médio das fibras ultrafinas PBAT e PBAT/PPy apresentam importante semelhança com as proteínas estruturais da MEC dos tecidos biológicos

naturais que possuem diâmetro médio de 50-500 nm (BARNES et al., 2007) podendo então, gerar suportes importantes para crescimento ósseo e favorecer maior aceitação do material pelo organismo.

Na Figura 4.2 (a) e (b), observa-se a nHAp eletrodepositada (razão Ca/P= 1,69) na superfície das amostras PBAT/PPy, evidenciando uma deposição homogênea dos cristais a base de fosfato de cálcio, que se apresentam dispostos ao longo das fibras ultrafinas tridimensionais. Até então, a literatura não registrava trabalhos demonstrando a eletrodeposição de nHAp na superfície de poliésteres. A incorporação do polímero condutor PPy favoreceu esse processo.

Figura 12 - Micrografias (a) e (b) PBAT/PPy/nHAp



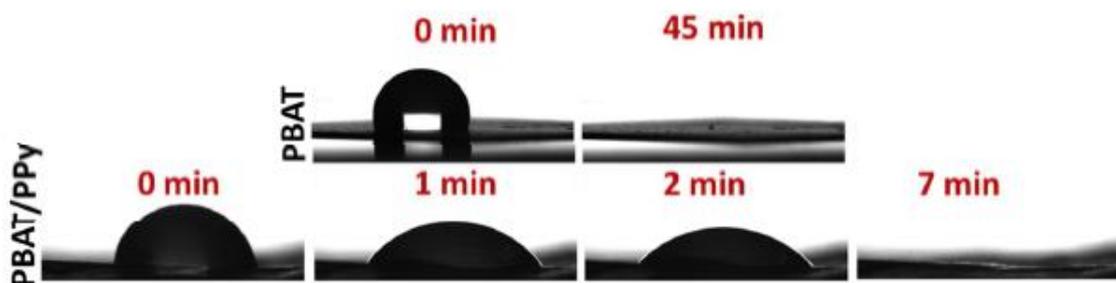
Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

Dadas as características da nHAp já citadas neste trabalho, a sua presença na superfície das fibras ultrafinas eletrofiadas deverá aumentar a biocompatibilidade e bioatividade desse novo biomaterial, levando a uma maior capacidade de integração das fibras ultrafinas com o tecido do hospedeiro, promovendo e apoiando o crescimento ósseo.

4.2 Análise do Ângulo de Contato

A Figura 4.3 mostram fotografias feitas em diferentes tempos para *scaffolds* PBAT e PBAT/PPy. Observou-se um ângulo de contato (AC) de 84° para as fibras PBAT/PPy, enquanto que para PBAT o AC foi bem maior (115°). Além disso, a gota de água foi totalmente absorvida pelo *scaffold* PBAT/PPy após 7 min, enquanto PBAT levou 45 minutos. Esse resultado para a amostra PBAT está de acordo com estudos recentes (RODRIGUES et al., 2016).

Figura 13 - Fotografias tiradas em momentos diferentes para PBAT e PBAT/PPy durante medidas de ângulo de contato.



Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

As superfícies das fibras estudadas apresentaram interação diferentes com a gota d'água. A amostra PBAT/PPy demonstra maior molhabilidade, ou seja, maior espalhamento da gota d'água em sua superfície por apresentar $AC < 90^\circ$, caracterizando esse material como hidrofílico. O resultado obtido no *scaffold* PBAT comprova que este é hidrofóbico conforme já citado anteriormente como uma característica dos polímeros.

Segundo Lobo (2011), a hidrofiliicidade é um fator que favorece diretamente os eventos celulares intrínsecos e a melhor molhabilidade aumenta a superfície de contato entre os nanobiomateriais e as proteínas de adesão celular. Esses fenômenos são importantes para que ocorra a migração, proliferação e diferenciação celular. Superfícies hidrofílicas são favoráveis às células que dependem de ancoragem, como osteoblastos, e resultam em maior taxa de proliferação celular e reduz os eventos de apoptose celular.

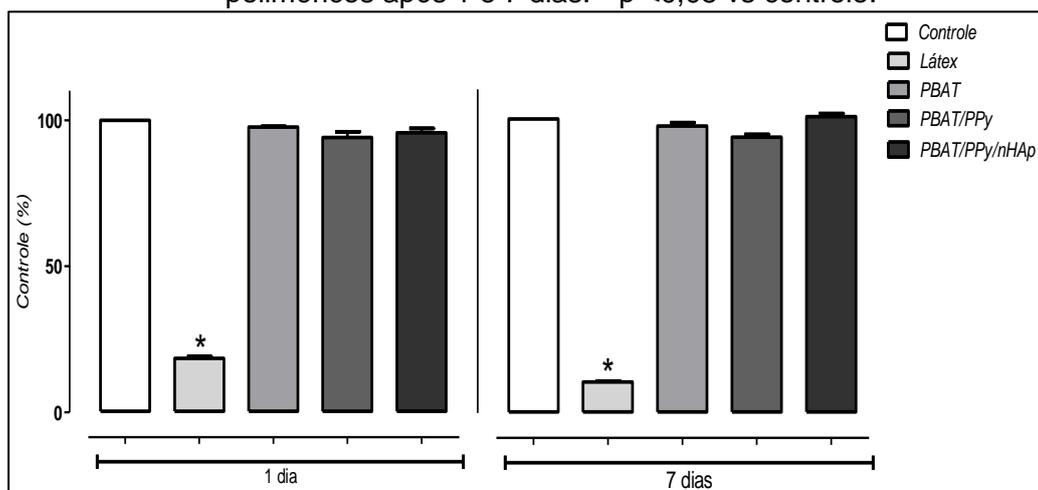
Até aqui, a presença do polímero condutor (PPy) demonstra estar relacionada com os fenômenos de maior molhabilidade, hidrofiliicidade e condutividade elétrica encontrados nas fibras ultrafinas obtidas e isso certamente irá favorecer os eventos biológicos.

4.3 Viabilidade Celular

A análise da viabilidade celular é um dos parâmetros fundamentais na avaliação da biocompatibilidade de novos materiais, e, como dito anteriormente, foi feita através do ensaio de MTT. Esse ensaio é usado especificamente para a funcionalidade mitocondrial e avalia a toxicidade do material através da viabilidade celular.

A Figura 4.4, apresenta a viabilidade dos osteoblastos MG-63 após contato direto com as amostras dos grupos experimentais PBAT, PBAT/PPy e PBAT/PPy com nHAp eletrodepositada, comparada com grupo controle, sem os nanomateriais e controle positivo para citotoxicidade (látex) em experimentos com 1 e 7 dias.

Figura 14 - Análise de viabilidade celular de osteoblastos MG-63 cultivadas sobre scaffolds poliméricos após 1 e 7 dias. * $p < 0,05$ vs controle.



Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

Os dados ilustrados na Figura 4.4 demonstram que, após incubação, as fibras ultrafinas PBAT, PBAT/PPy e PBAT/PPy/nHAp, nos percentuais e períodos

analisados neste estudo, não induziram efeitos citotóxicos nessa linhagem celular indicando que esse novo material é biocompatível. As células MG-63, quando em contato com as amostras, apresentaram índice de toxicidade baixo já que não apresentaram diferença percentual de viabilidade quando comparadas com o grupo controle no ensaio de MTT. Observamos diferença estatística somente no grupo látex, controle positivo para citotoxicidade, que apresentou $p < 0.05$ (*) em relação aos demais grupos. Entre os grupos experimentais avaliados não houve diferença estatística significativa com $p > 0.05$.

Estudos da citotoxicidade do PBAT puro e seus nanocompósitos (FUKUSHIMA et al., 2012; GOES et al., 2012; FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013b), PBAT com nanopartículas de nHAp e nanotubos de carbono (SILVA et al., 2014), concluíram que estas não apresentaram toxicidade quando submetidas ao teste de viabilidade celular por MTT, podendo ser consideradas como um biomaterial atrativo para aplicação biomédica. Bem mais recente, Rodrigues et al. (2016), em estudo *in vitro* utilizando PBAT e nanotubos de carbono de paredes múltiplas superhidrofílicos, verificou que todas as amostras eram viáveis pois não induziram efeitos citotóxicos em osteoblastos MG-63.

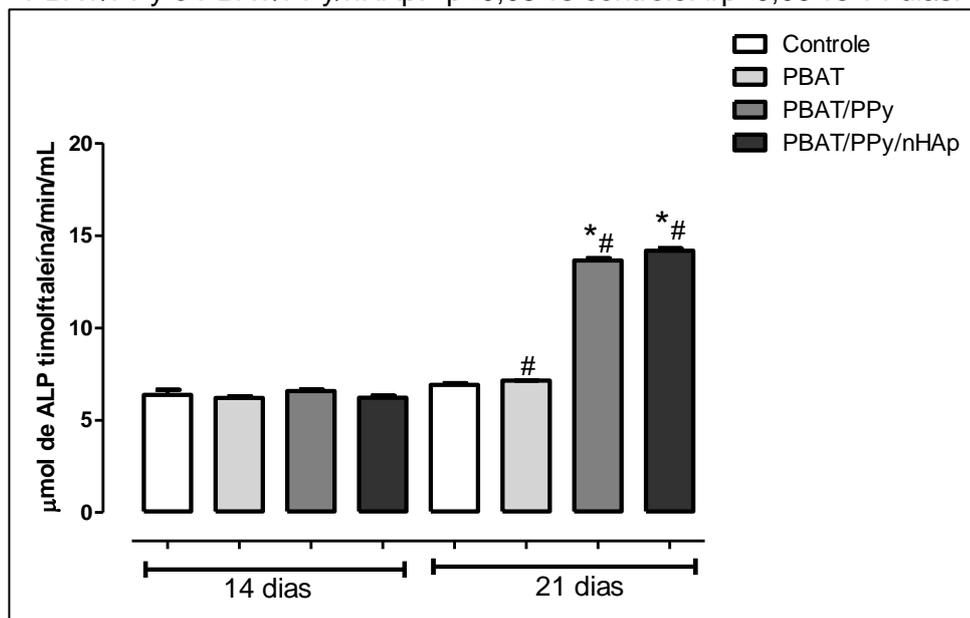
Na última década, estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando o PPy também têm demonstrado a sua biocompatibilidade (ATEH; NAVSARIA; VADGAMA, 2006; RAMANAVICIENE et al., 2007; FAHLGREN et al., 2015), concluindo que polímeros condutores podem proporcionar um novo e promissor biomaterial, inclusive para a concepção de implantes ortopédicos.

Em nosso estudo os polímeros PBAT e PPy foram utilizados para a produção de fibras ultrafinas pela técnica de eletrofiação, seguido da eletrodeposição de nHAp, afim de melhorar o biomimetismo dos materiais sintetizados. A avaliação positiva obtida no ensaio de viabilidade celular confirma o potencial dessas fibras ultrafinas para o uso biomédico.

4.4 Ensaio de Fosfatase Alcalina (ALP)

A atividade da ALP é frequentemente utilizada como marcador precoce de osteogênese. A Figura 4.5 apresenta os dados da indução de diferenciação de osteoblastos humanos MG-63 quando cultivados em *scaffolds* poliméricos.

Figura 15 - Atividade ALP após 14 e 21 dias de cultura de osteoblastos nos *scaffolds* PBAT, PBAT/PPy e PBAT/PPy/nHAp. * $p < 0,05$ vs controle. # $p < 0,05$ vs 14 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

A atividade de ALP analisada no período de 14 dias de incubação não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle. A expressão de ALP foi mais evidente e crescente aos 21 dias, destacadamente nas amostras que apresentam PPy, indicando que a presença do polímero condutor induziu aumento da atividade ALP no decorrer desse período. A adição de nHAp na fibra PBAT/PPy mostrou-se indiferente já que não existe diferença estatística entre as duas amostras com maior expressão de ALP. Esses dados indicam que os *scaffolds* que contêm o polímero condutor sustentaram as células osteoblásticas enzimaticamente ativas.

O aumento da atividade de ALP ocorre durante a diferenciação dos osteoblastos e é comumente relacionada com a calcificação da matriz óssea

(ORIMO, 2010). Alguns estudos destacaram a ação do PPy como um potencializador da atividade de ALP.

Fahlgren (2015) em estudo que avaliou a biocompatibilidade do PPy em cultura de osteoblastos humanos primários para liberação controlada de drogas, verificou aumento da atividade da enzima ALP dos osteoblastos cultivados sobre implantes revestidos em PPy e dodecilbenzenosulfonato (PPy-DBS) pelo processo de polimerização eletroquímica. Os dados obtidos sugerem que o PPy tem um grande potencial para a regeneração de tecido ósseo, proporcionando estimulação elétrica local e, concluiu que polímeros condutores podem favorecer o desenvolvimento de um novo e promissor material para a concepção de implantes ortopédicos ou dentários, pois pode aumentar a formação de osso de uma forma rigorosamente controlada.

Em outra pesquisa, Hardy (2015) preparou fibras eletrofiadas de polímero biodegradável policaprolactona (PCL), polímero condutor (PPy) e sulfonato de poliestireno e avaliou o potencial dos *scaffolds* eletroativos para regeneração de tecido ósseo, utilizando células estaminais mesenquimais humanas e observou aumento da atividade de ALP nas amostras, notadamente no grupo submetido a uma estimulação elétrica. Esses resultados demonstram a importância do desenvolvimento de *scaffolds* utilizando um polímero condutor.

Em nosso estudo, o grande aumento da atividade de ALP nas amostras que apresentam PPy, em comparação àquelas que continham apenas células (grupo controle) e PBAT puro, pode estar relacionado à interferência do PPy nas características da superfície dos *scaffolds*, no diâmetro e distribuição das fibras (tridimensionais), hidrofiliabilidade e molhabilidade das fibras ultrafinas produzidas.

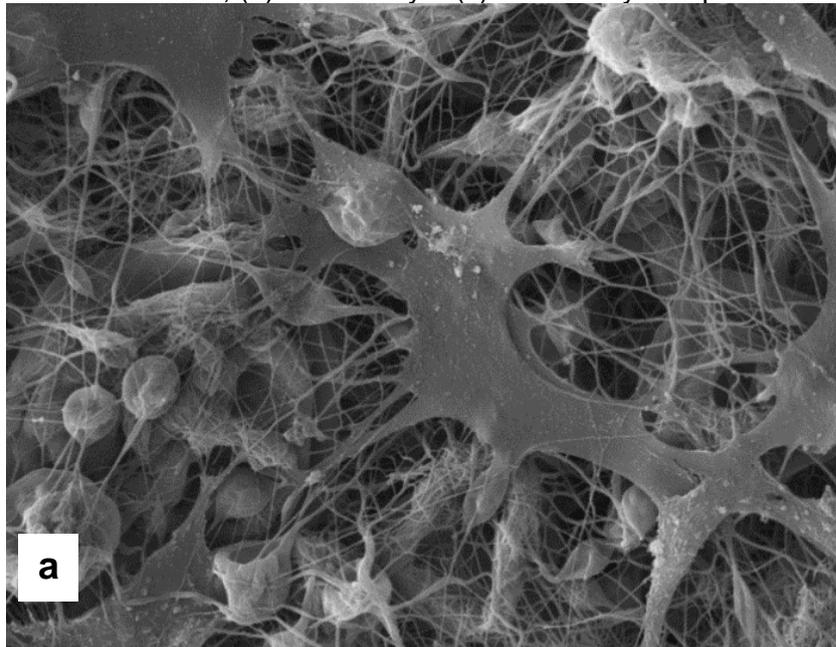
Esse achado configura uma importante contribuição desse estudo, demonstrado o potencial do PPy para acelerar a diferenciação osteogênica, com capacidade para conduzir sinais elétricos na região a ser reparada, auxiliando o crescimento ósseo.

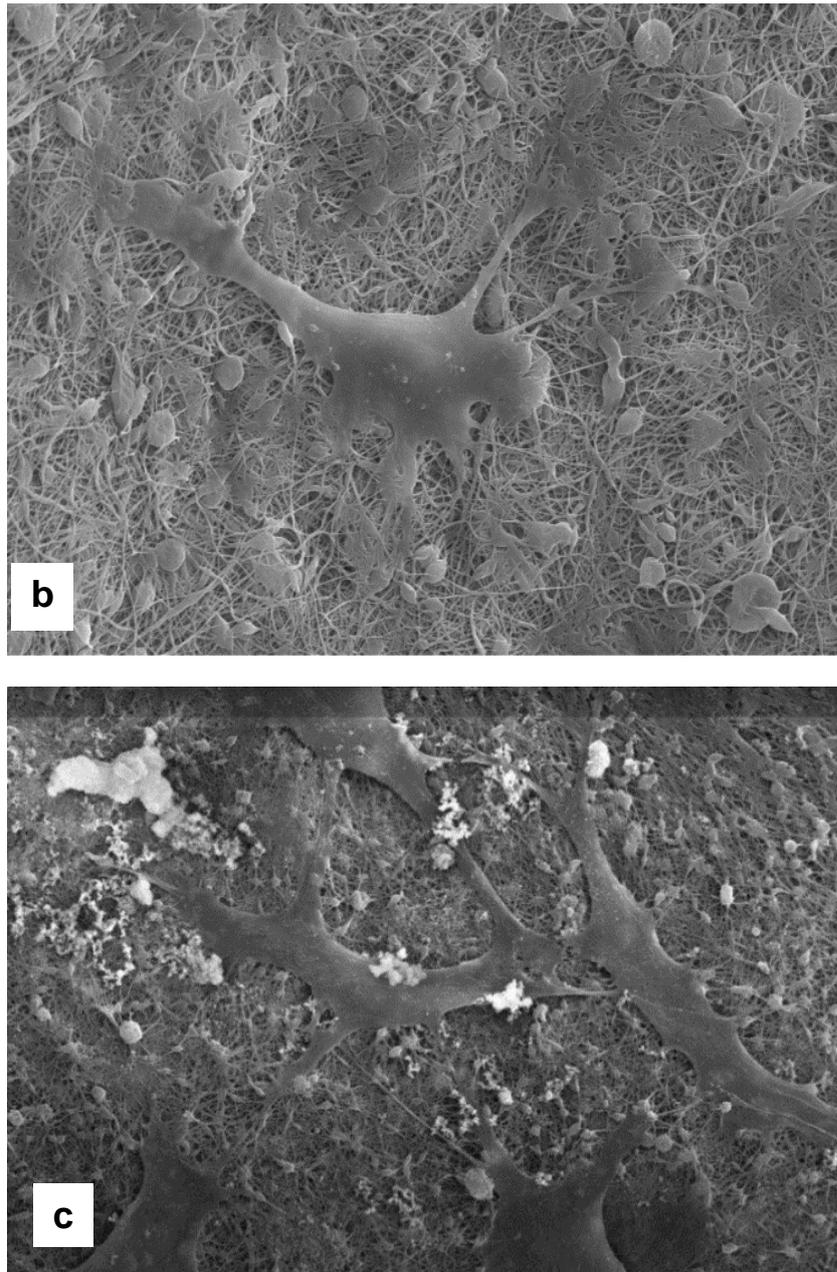
4.5 Análise da Adesão Celular

O teste de adesão foi realizado com o objetivo de mostrar a interação das células MG-63 cultivadas sobre as nanofibras. Uma excelente fixação das células ósseas é essencial para proporcionar um ambiente favorável para melhorar a proliferação celular. A estrutura tridimensional das fibras ultrafinas pode melhorar a adesão e desenvolvimento celular porque seu arranjo é semelhante ao das fibras colágenas da matriz extracelular (VASITA; KATTI, 2006).

A Figura 4.6 mostra a interação dos osteoblastos humanos com as fibras ultrafinas poliméricas (a) PBAT, (b) PBAT/PPy e (c) PBAT/PPy/nHAp evidenciando que as células preservaram suas projeções citoplasmáticas características e sinaliza para um bom processo de adesão.

Figura 16 - Micrografias das células MG-63 cultivadas em 24 h sobre os scaffolds (a) PBAT, (b) PBAT/PPy e (c) PBAT/PPy/nHAp.





Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

Na micrografia 4.6 (c) é evidente a interação das células com os cristais de nHAp, onde é possível observar as projeções citoplasmáticas entre os cristais de nHAp e o *scaffold*.

As características da superfície dos biomateriais revelam-se importantes uma vez que é nesse local que ocorre interações que irão conduzir às respostas biológicas. As micrografias mostram que fibras ultrafinas tridimensionais, com grande área de superfície, forneceram um bom suporte para as células MG-63, que foram capazes de interagir com o material sem alterar sua morfologia clássica.

Então, *scaffolds* fibrosos produzidos em nanoescala podem proporcionar um suporte ideal para as células migrarem e crescerem sobre eles.

Rodrigues et al (2016), em estudo com fibras ultrafinas de PBAT/nanotubos de carbono de paredes duplas verticalmente alinhadas identificaram interação entre a superfície das amostras que continham PBAT e as células MG-63. Para esses autores a presença de projeções citoplasmáticas e morfologia celular normal são fatores que confirmaram a citocompatibilidade das fibras ultrafinas poliméricas com as células MG-63.

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho conseguiu-se obter fibras condutoras ultrafinas utilizando os polímeros biorreabsorvíveis - PBAT e PPy - pelo processo de eletrofiação e eletrodepositar um filme homogêneo de nHAp na superfície tornando-as bioativas.

A solução PBAT/PPy apresentou maior condutividade elétrica e produziu fibras ultrafinas com menor quantidade de *beads* que as fibras PBAT. A análise realizada pelo MEV revelou ainda que as fibras produzidas apresentaram morfologia fusiforme e diâmetro médio dentro da escala das estruturas nanométricas fibrosas da matriz óssea extracelular.

Deve-se destacar que a presença do Polipirrol proporcionou a formação de fibras ultrafinas hidrofílicas e com maior capacidade de molhabilidade, fato esse indispensável para permitir a ocorrência dos fenômenos biológicos locais.

A interação entre as amostras do material e os osteoblastos humanos demonstrou, no ensaio de MTT, que as fibras ultrafinas estudadas não induziram efeitos citotóxicos nas células MG-63. No ensaio de ALP verificou-se o potencial do PPy para diferenciação osteogênica e formação de matriz óssea, constatando-se sua capacidade de estimulação das células ósseas. Nesse ensaio a presença de nHAp na superfície das fibras mostrou-se indiferente no processo de diferenciação osteoblástica.

O MEV do estudo da adesão celular evidenciou que todas as fibras ultrafinas produzidas forneceram suporte para adesão das células MG-63 preservado sua morfologia citoplasmática clássica. Destaca-se as fibras PBAT/PPy/nHAp que parecem demonstrar melhores condições de superfície para adesão celular.

Todos esses achados indicam que as fibras ultrafinas condutoras estudadas apresentam grande potencial para funcionar como suporte para acelerar a formação óssea.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em continuidade a este trabalho e buscando a obtenção de fibras mais bioativas para aplicações como enxertos ósseos, sugere-se:

- Estudar aspectos metodológicos que visem ajustar parâmetros da solução e do processo de eletrofiiação para a obtenção de fibras ultrafinas livres da presença de *beads*.
- Estimular com corrente elétrica osteoblastos humanos em cultura com fibras PBAT/PPy e analisar a diferenciação osteogênica através de ensaio de ALP.
- Verificar a interação das fibras condutoras ultrafinas *in vivo*.
- Estimular, *in vivo*, utilizando correntes elétricas de baixa frequência que simulem o fluxo endógeno da corrente biológica, a área com defeito ósseo e implante de fibras condutoras ultrafinas PBAT/PPy e PBAT/PPy/nHAp.

REFERÊNCIAS

- ABUKAWA, H. et al. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. **Dental Clinics of North America**, v. 50, n. 2, p. 205-216, 2006.
- ALCOBIA, D. de S. **Produção de Fibras ultrafinas alinhadas de polímeros biodegradáveis para crescimento e regeneração de células neurais**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de pós graduação em química. Universidade de São Paulo, 2013.
- AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol méd lab**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 40, n. 5, 2012.
- ANDRADE, A. D. de. **Raspadores ósseos: avaliação estrutural e sua relação com a eficácia in vitro**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Grande Rio. Duque de Caxias, 2007.
- ANSARI, R. Polypyrrole conducting electroactive polymers: synthesis and stability studies. **Journal of Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 186-201, 2006.
- ARMENTANO, I. et al., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. **Polym Degrad Stabil**, v. 95, p. 2126-2146, 2010.
- ATALA, A. Engineering organs. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 575-592, 2009.
- ATEH, D. D.; NAVSARIA, H. A.; VADGAMA, P. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. **Journal of the royal society interface**, v. 3, n. 11, p. 741-752, 2006.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A.C; DUEK, E. A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.
- BARNES, C. P. et al. Cross-linking electrospun type II collagen tissue engineering scaffolds with carbodiimide in ethanol. **Tissue engineering**, v. 13, n. 7, p. 1593-1605, 2007.
- BAUER, S. et al. Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. **Progress in Materials Science**, v. 58, p. 261–326, 2013.
- BHARDWAJ, N; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 3, p. 325-347, 2010.

BONAN, R. F. et al. Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita. **Cerâmica**, v. 60, p. 402-410, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Grupo de Trabalho Interinstitucional sobre órteses, próteses e materiais especiais (GTI-OPME)**. 2015. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/07/Relatorio-Final-versao-final-6-7-2015.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2016.

BRITO, T A. V. **Preparação e Caracterização de Fibras ultrafinas da Blenda PLL/PCL obtidas pelos Processos de Eletrofição e Rotofiação**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2013.

CALLISTER, W. D; RETHWISCH, D. G. **Fundamentos da Ciência e Engenharia de Materiais: Uma abordagem integrada**. 4.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2014.

CARPI, F; DE ROSSI, D. Electroactive polymer-based devices for e-textiles in biomedicine. **Information Technology in Biomedicine, IEEE Transactions on**, v. 9, n. 3, p. 295-318, 2005.

CARVALHO, P. S. P; BASSI, A. P. Farnezi; PEREIRA, L. A. V. D. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomater. **ImplantNews**, v. 1, n. 3, p. 255-260, 2004.

CHEN J.H; CHEN C.C; YANG M.C. Characterization of nanocomposites of poly(butylene adipate-co-terephthalate) blending with organoclay. **Journal Polymer Research**. v. 18, n. 6, p. 2151–2159, 2011.

CHEN, K.Y et al. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. **Biomaterials**, v. 30, n. 9, p. 1682-1688, 2009.

CHEN, Q; LIANG, S; THOUAS, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in polymer science**, v. 38, n. 3, p. 584-671, 2013.

CHEW, S. Y. et al. The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. **Current pharmaceutical design**, v. 12, n. 36, p. 4751-4770, 2006.

COLLIER, J. H. et al. Synthesis and characterization of polypyrrole–hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications. **Journal of biomedical materials research**, v. 50, n. 4, p. 574-584, 2000.

COSTA, R. G. F. et al., Eletrofição de polímeros em solução. Parte I: fundamentação teórica. **Polimeros**, v. 22, n. 2, p. 170-177, 2012.

COSTA-PINTO, A. R; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 17, n. 5, p. 331-347, 2011.

CUI, X. et al. Biocatalytic generation of ppy-enzyme-CNT nanocomposite: From network assembly to film growth. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 5, p. 2025-2031, 2007.

CUNHA, C.; PANSERI, S.; ANTONINI, S. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 1, p. 50-59, 2011.

DA VEIGA KALIL, M. Enxerto ósseo particulado aplicado à implantodontia. **International Journal of Science Dentistry**, v. 1, n. 38, 2013.

DELFINO, C. S. et al. Uso de novos materiais para o capeamento pulpar (hidroxiapatita-HAp e fosfato tricálcico- β -TCP)(The use of new materials for pulp capping (hydroxyapatite-HAp and tricalcium phosphate- β -TCP). **Cerâmica**, v. 56, p. 381-388, 2010.

DIMITRY, O. I. H et al. Preparation and properties of elastomeric polyurethane/organically modified montmorillonite nanocomposites. **Journal of polymer research**, v. 17, n. 6, p. 801-813, 2010.

EFTEKHARI, S. et al. Fabrication and characterization of novel biomimetic PLLA/cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone repair applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 39, p. 120-125, 2014.

FAHLGREN, A. et al. Biocompatibility of Polypyrrole with Human Primary Osteoblasts and the Effect of Dopants. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0134023, 2015.

FRÖHLICH, M. et al. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. **Current stem cell research & therapy**, v. 3, n. 4, p. 254-264, 2008.

FUKUSHIMA, K. et al. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 6, p. 1331-1351, 2012.

FUKUSHIMA, K.; RASYIDA, A.; YANG, M C. Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 80, p. 291-298, 2013a

FUKUSHIMA, K.; RASYIDA, A.; YANG, M C. Biocompatibility of organically modified nanocomposites based on PBAT. **Journal of Polymer Research**, v. 20, n. 11, p. 1-12, 2013b

GARG, K., BOWLIN, G. L. Electrospinning jets and nanofibrous structures. **Biomicrofluidics**, v. 5, n. 1, p. 013403, 2011.

GENTILE, P. et al. An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 3640-3659, 2014.

GOES, A. M. et al., Viabilidade celular de fibras ultrafinas de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorilonita. **Polímeros**, vol. 22, n. 1, p. 34-40, 2012.

GRAND VIEW RESEARCH, **Brazil Biomaterials Market Forecast** – Estimated To Achieve Two Billion By 2018.

Disponível em < <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biomaterials-industry>> Acesso em: 04-09-2015

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta Materialia.**, v. 48, n. 1, p.263-277, 2000.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfato de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, p. 1352-1358, 2012.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8, p. 876-921, 2007.

GUNATILLAKE, P. A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **Eur Cell Mater**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2003

HABRAKEN, W. J. E. M.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 4, p. 234-248, 2007.

HARDY, J. G. et al. Electrical stimulation of human mesenchymal stem cells on conductive nanofibers enhances their differentiation toward osteogenic outcomes. **Macromolecular rapid communications**, v. 36, n. 21, p. 1884-1890, 2015.

HERNÁNDEZ, A. et al., In vivo osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.100, n.9, p.2382-91, 2012.

HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 4, p. 581-603, 2013.

HUTMACHER, D. W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 12, n. 1, p. 107-124, 2001.

INGAVLE, G. C., LEACH, J. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 20, n. 4, p. 277-293, 2013.

INNIS, P.C, MOULTON S. O., WALLACE G.G, Biomedical Aplicacions of Inherently Conducting Polymers (ICPs). In: SKOTHEIM, T.A; REYROLDS, J.R. **Handbook of**

Conducting Polymers. Conjugated Polymers: processing and applications. 3ed. CRC Press, 2007. Cap. 11, p.1-33.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/TS80004-1: Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1: Core terms. Geneva, 2010.

JAO, W-C et al. Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly (butylene adipate-co-terephthalate) films. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, n. 8, p. 543-553, 2010.

JIANG, L.; WOLCOTT, M. P.; ZHANG, J. Study of biodegradable polylactide/poly (butylene adipate-co-terephthalate) blends. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 1, p. 199-207, 2006.

JUNQUEIRA, L C, CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KALITA, S. J, BHARDWAJ, A.; BHATT, H A. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 27, n. 3, p. 441-449, 2007.

KASAJ, A. et al. Clinical evaluation of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of human periodontal bony defects-A randomized controlled clinical trial: 6-month results. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 3, p. 394-400, 2008.

KATTI, K. S. Biomaterials in total joint replacement. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 39, n. 3, p. 133-142, 2004.

KE, P. et al. From macro to micro: structural biomimetic materials by electrospinning. **RSC Advances**, v. 4, n. 75, p. 39704-39724, 2014.

KERN, P.; SCHWALLER, P.; MICHLER, J. Electrolytic deposition of valve metal oxide thin films as interference coatings on biomedical implants. **Euro. Cells. Mat.**, v.10, Suppl.1, 25, 2005.

KHORSHIDI, S. et al. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, 2015.

LANDIM, A. et al. Equipamentos e tecnologias para saúde: oportunidades para uma inserção competitiva da indústria brasileira. **BNDES Setorial**, n. 37, mar. 2013, p. 173-226, 2013.

LAO, L. et al. Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 8, p. 1873-1884, 2011.

LASPRILLA, A. J.R et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices-A review. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 1, p. 321-328, 2012.

LEE, J. B. et al. PLGA scaffold incorporated with hydroxyapatite for cartilage regeneration. **Surface and Coatings Technology**, v. 202, n. 22, p. 5757-5761, 2008.

LEE, J. Y. et al. Nerve growth factor-immobilized electrically conducting fibrous scaffolds for potential use in neural engineering applications. **NanoBioscience, IEEE Transactions on**, v. 11, n. 1, p. 15-21, 2012.

LEUNG, V.; KO, F. Biomedical applications of nanofibers. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 22, n. 3, p. 350-365, 2011.

LLINAS, R. R. et al. Neuro-vascular central nervous recording/stimulating system: Using nanotechnology probes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 7, n. 2-3, p. 111-127, 2005.

LOBO, A. O. **Obtenção de super-hidrofilicidade em nanotubos de carbono alinhados e sua aplicação como nanobiomaterial**. 2011. 208f. Tese de Doutorado. Engenharia Aeronáutica e Mecânica – Área de Física e Química dos Materiais Aeroespaciais – Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos/SP, 2011.

LOBO, A. O. et al. In vitro and in vivo studies of a novel nanohydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned carbon nanotube nanocomposites. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 7, p. 1723-1732, 2013.

MA, R. et al. Electrodeposition of polypyrrole-heparin and polypyrrole-hydroxyapatite films. **Materials Letters**, v. 65, n. 4, p. 681-684, 2011.

MENG, Z. X. et al. Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 97-102, 2011.

MEYER, S.; FLOERKEMEIER, T.; WINDHAGEN, H. Histological osseointegration of Tutobone®: first results in human. **Archives of orthopaedic and trauma surgery**, v. 128, n. 6, p. 539-544, 2008.

MI, H-Y; JING, X; TURNG, L-S. Fabrication of porous synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. **Journal of Cellular Plastics**, v. 51, n. 2, p. 165-196, 2015.

MORAES, P. C. **O uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em rádio de coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de cálcio**. 2006. 44f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. **Tissue engineering**, v. 12, n. 3, p. 435-447, 2006.

NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, n. 27, p. 1137-1158, 2008.

NETO, W. A. R. et al. Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. **Polymer Degradation and Stability**, v. 120, p. 61-69, 2015.

OKAMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10, p. 1487-1503, 2013.

ORIMO, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. **Journal of Nippon Medical School**, v. 77, n. 1, p. 4-12, 2010.

PARK, J. B.; **Bioceramics: Properties, Characterizations, and Applications**. 1 ed., Springer, Iowa City, 2008. 376p.

PERKA, C. et al., Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. **Biomaterials**, v.21, n.11, p.1145-1153, 2000.

PICCIANI, P. H.S et al. Structural, electrical, mechanical, and thermal properties of electrospun poly (lactic acid)/polyaniline blend fibers. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 295, n. 7, p. 618-627, 2010.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.K; MORAES, A. M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

POINERN, G. E. J.; BRUNDAVANAM, R. K.; FAWCETT, D. Nanometre scale hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. **American Journal of Biomedical Engineering**, v. 3, n. 6, p. 148-168, 2013.

PRECHEUR, H.V. Bone Graft Materials. **Dental Clinics of North America**. v.51, p.729-746, 2007.

RAMANAVICIENE, A. et al. Biocompatibility of polypyrrole particles: an in-vivo study in mice. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 311, 2007.

RATNER, Buddy D. et al. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Academic press, 2004.

RIVERA, J.A et al., Injertosóseos – Nueva alternativa. Fase III. Obtención, caracterización y evaluación de hidroxiapatita sintética y el compuesto de hidroxiapatita sintética porosa – Proteínas morfogenéticas ósease nun modelo experimental Lapino. **Rev. Col. Cienc. Pec.**, v.17, n.1, 20-28, 2004.

ROCHA-FILHO, R. C. Nobel 2000 Polímeros Condutores: Descoberta e aplicações. **Química Nova na Escola**, n.12, p.11-14, 2000.

RODRIGUES, B. V. M et al. Influence of low contents of superhydrophilic MWCNT on the properties and cell viability of electrospun poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 782-791, 2016.

SANTIM, R. H. **Síntese e Caracterização de Polipirrol (PPy) obtido pelo processo químico convencional e microemulsão**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais) Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2011.

SANTOS, A. R.; WADA, M L F. **Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual**. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, v. 17, n. 4, p. 308, 2007.

SILVA, E. et al., **Avaliação da citotoxicidade de fibras ultrafinas de poli(butileno adipato-co-tereftalato) com nanohidroxiapatita e nanotubos de carbono superhidrofílicos incorporados**. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB 2014.

SILVA, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de blendas de polímeros biodegradáveis e polipirrol**. 2009. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SINGH, R. et al. Mechanism of dc electrical conduction and human endothelial cell proliferation in polypyrrole/sodium nitrate membrane. **Polymer**, v. 47, n. 17, p. 6042-6047, 2006.

SNIADECKI, N. J. et al. Nanotechnology for cell–substrate interactions. **Annals of biomedical engineering**, v. 34, n. 1, p. 59-74, 2006.

STRIETZEL, F. P.; REICHART, P. A.; GRAF, H-L. Lateral alveolar ridge augmentation using a synthetic nano-crystalline hydroxyapatite bone substitution material (Ostim®). Preliminary clinical and histological results. **Clinical oral implants research**, v. 18, n. 6, p. 743-751, 2007.

SUBBIAH, T. et al. Electrospinning of nanofibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 96, n. 2, p. 557-569, 2005.

TAN, S. H. et al. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. **Polymer**, v. 46, n. 16, p. 6128-6134, 2005.

TELLEMAN, G. et al. Peri-Implant Endosseous Healing Properties of Dual Acid-Etched Mini-Implants with a Nanometer-Sized Deposition of CaP: A Histological and Histomorphometric Human Study. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 12, n. 2, p. 153-160, 2010.

TEO, W. E.; RAMAKRISHNA, S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. **Nanotechnology**, v. 17, n. 14, p. R89, 2006.

TIAN, H. et al. Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 2, p. 237-280, 2012.

ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of polymer science Part B: polymer physics**, v. 49, n. 12, p. 832-864, 2011.

VASITA, R.; KATTI, D. S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. **International Journal of nanomedicine**, v. 1, n. 1, p. 15, 2006.

VASQUEZ, C. T. **Preparação e caracterização de filmes poliméricos a base de amido de milho e polipirrol para aplicação como biomaterial**. Tese. (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de pós graduação em Química, Florianópolis, 2007.

WAN, D. C.; NACAMULI, R. P.; LONGAKER, M. T. Craniofacial bone tissue engineering. **Dental Clinics of North American**, Philadelphia, v.50, n.2, p.175-190, 2006.

WANG, X-S. et al. Investigations on the mechanical properties of conducting polymer coating-substrate structures and their influencing factors. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 12, p. 5257-5284, 2009.

WONG, J. Y.; BRONZINO, J. D.; **Biomaterials**. New York: Taylor & Francis Group, 2007.

YELTEN, A.; YILMAZ, S.; OKTAR, F. N. Sol-gel derived alumina-hydroxyapatite-tricalcium phosphate porous composite powders. **Ceramics International**, v. 38, n. 4, p. 2659-2665, 2012.

YOO, H. S.; KIM, T. G.; PARK, T. G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 12, p. 1033-1042, 2009.

ZAKARIA, O.; MADI, M.; KASUGAI, S. A novel osteogenesis technique: The expansible guided bone regeneration. **Journal of tissue engineering**, v. 3, n. 1, p. 2041731412441194, 2012.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. **Nano Today**, v. 4, n. 1, p. 66-80, 2009.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DECORRENTE DA DISSERTAÇÃO

Artigo publicado

1- CASTRO, J. G et al, Designing a novel nanocomposite for bone tissue engineering using electrospun conductive PBAT/polypyrrole as a scaffold to direct nanohydroxyapatite electrodeposition. **RSC Advances**, v. 6, p. 32615-32623, 2016.