

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA**

CONCEIÇÃO DE MARIA VAZ ELIAS

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS POSSÍVEIS EFEITOS GENOTÓXICOS E
ANTIMICROBIANO DE *SCAFFOLDS* A BASE DE POLI (BUTILENO ADIPATO-
CO-TEREFTALATO)/POLIPIRROL COM NANOHIĐROXIAPATITA PARA
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

**IN VIVO EVALUATION OF THE POSSIBLE GENOTOXIC AND ANTIMICROBIAL
EFFECTS OF SCAFFOLDS BASED ON POLY (BUTYLENE ADIPATE-CO-
TEREFTALATE) / POLYPIRROL WITH NANOHYĐROXIAPATITE FOR BONE
REGENERATION**

São Paulo – SP

2020

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

CONCEIÇÃO DE MARIA VAZ ELIAS

AVALIAÇÃO IN VIVO DOS POSSÍVEIS EFEITOS GENOTÓXICOS E ANTIMICROBIANO DE *SCAFFOLDS* A BASE DE POLI (BUTILENO ADIPATO-CO- TEREFTALATO)/POLIPIRROL COM NANOHIIDROXIAPATITA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo
Orientador

Profa. Dra. Fernanda Roberta Marciano
Co-orientadora

São Paulo - SP

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

E41a ELIAS, Conceição de Maria Vaz.

Avaliação in vivo dos possíveis efeitos genotóxicos e antimicrobiano de scaffolds a base de poli (butileno adipato-co-tereftalato) /polipirrol com nanohidroxiapatita para regeneração óssea / Conceição de Maria Vaz Elias -- São Paulo: Universidade Brasil, 2020.

92 p.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo.

Coorientação: Profa. Dra. Fernanda Roberta Marciano.

1. Genotoxicidade. 2. Materiais Biocompatíveis. 3. Regeneração Óssea. I. Lobo, Anderson de Oliveira. II. Marciano, Fernanda Roberta.

CDD 620.82

ATA DA APRESENTAÇÃO PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO

ATA PG Nº 650/2020

Aos 15 dias do mês de dezembro do ano de 2020, às 14:00 horas, reuniram-se os membros da Banca Examinadora composta pelos professores: Dr.(a) Anderson de Oliveira Lobo (presidente-orientador), Dr.(a) Rodrigo Sávio Pessoa, Dr.(a) Laurita dos Santos, Dr.(a) Antônio Luiz Martins Maia Filho e Dr.(a) Bartolomeu Cruz Viana Neto, banca aprovada pelo Coordenador(a) do Doutorado em Engenharia Biomédica, da Universidade Brasil, a fim de argüirem o(a) doutorando(a) **Conceição de Maria Vaz Elias (RA: 1710269-0)** sobre sua tese, com o título **“AVALIAÇÃO IN VIVO DOS POSSÍVEIS EFEITOS GENOTÓXICOS E ANTIMICROBIANO DE SCAFFOLDS A BASE DE POLI (BUTILENO ADIPATO-CO-TEREFTALATO)/POLIPIRROL COM NANOHIIDROXIAPATITA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA”**. Aberta a sessão pelo presidente da mesma, coube ao (à) candidato (a), na forma regimental, expor o tema de sua tese, dentro do tempo regulamentar, sendo em seguida questionado(a) pelos membros da Banca Examinadora, tendo dado as explicações que foram necessárias. Os conceitos atribuídos pelos membros da Banca Examinadora são os que se seguem: Dr.(a) Anderson de Oliveira Lobo (presidente/orientador) “APROVADA”, Dr.(a) Rodrigo Sávio Pessoa “APROVADA”, Dr.(a) Laurita dos Santos “APROVADA”, Dr.(a) Antônio Luiz Martins Maia Filho “APROVADA” e Dr.(a) Bartolomeu Cruz Viana Neto “APROVADA”, Conceito final “APROVADA”.

Com base no resultado do exame o(a) aluno(a) fará jus ao título de **Doutor em Engenharia Biomédica**, após efetuar as correções na tese, sugeridas pela Banca Examinadora e a correspondente homologação.

Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão às: 17:20 horas e foi lavrada a presente ata, sendo assinada pelos membros da Banca Examinadora e, por mim secretária, Sandra Claudina da Silva.

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Anderson de Oliveira Lobo (presidente-orientador)



Continuação da ATA PG Nº 650/2020 do aluno (a) **Conceição de Maria Vaz Elias (1710269-0)**.

Rodrigo S. Pessoa

Prof(a). Dr(a). Rodrigo Sávio Pessoa (UNIVERSIDADE BRASIL)

Laurita dos Santos

Prof(a). Dr(a). Laurita dos Santos (UNIVERSIDADE BRASIL)

Antônio Luiz Martins Maia Filho

Prof(a). Dr(a) Antônio Luiz Martins Maia Filho (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ)

Bartolomeu Cruz Viana Neto

Prof(a). Dr(a). Bartolomeu Cruz Viana Neto (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ)

SAD

Secretária do Doutorado em Engenharia Biomédica

Candidato (a) *Conceição de Maria Vaz Elias*

Aluno (a) **Conceição de Maria Vaz Elias**



Continuação da ATA PG Nº 650/2020 do aluno (a) **Conceição de Maria Vaz Elias (1710269-0)**

Observação:

Houve alteração do Título: sim () não (X)

São Paulo, SP 15 de dezembro de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho para minha família, em especial meus pais Sandra Conceição Vaz Elias e João Elias Neto, minhas irmãs Sâmmya e Elissandra, pelo exemplo de ser humano, pela força e superação e apoio em todos os momentos.

Meus amigos de percurso do Doutorado, inclusive aos meus colaboradores de pesquisa, Prof. Prof. Dr. Maia, Prof. Dr. Anderson Lobo, Profa. Dra. Fernanda Marciano e por todo aprendizado, exemplo e incentivo na elaboração da minha pesquisa.

A todos que confiaram no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Gratidão à Deus, por permitir chegar até aqui, e realizado meu sonho de ser Doutora, pelo dom dos conhecimentos e todas as oportunidades que tenho de crescer e transmitir conhecimentos.

Gratidão aos meus orientadores Prof. Dr. Anderson e Oliveira Lobo e Prof.Dra. Fernanda Roberta Marciano por toda condução nesses anos de Doutorado, pelo conhecimento compartilhado, pelo crescimento que obtive.

Grata aos meus colaboradores, Prof. Maia pelo suporte para realização dos testes *in vivo*. A Prof.^a Luciana pela colaboração dos testes com bactérias.

Prof.Webster, pela colaboração e transmissão de conhecimentos, e pela sua colaboração dos artigos publicados.

Minha colaboradora de IC Laryssa, colaborador veterinário Daniel.

Meus colegas de caminhada, Fran, Fabricia, Larisse, Alan, Juçara, Thiago, por serem suporte inúmeras vezes.

Aos todos os professores do programa do doutorado da Universidade Brasil, em especial professores da UFPI que me acolheram grandemente Prof. Edson, Josy, Bartolomeu, obrigada pelos ensinamentos compartilhados.

Ao Professor Airton pelo seu desempenho ao programa e coordenação o curso.

À UNIVERSIDADE BRASIL pelo financiamento desta pesquisa e oportunidade de concluir mais uma meta.

"Nada é igual ao Seu redor. Tudo se faz no seu
olhar. Oh, grande És, ninguém explica Deus... .
Dono de toda ciência, sabedoria e poder! "

Clovis Encarnacao De Pinho

RESUMO

Uma tendência cada vez mais frequente na pesquisa em engenharia de tecidos é o desenvolvimento de *scaffolds ultrafinos* em nanoescala. Propõe-se então, a fabricação de *scaffolds* poliméricos utilizando a eletrofição (PBAT 12 %, PBAT 12 %/PPy 1%), e a deposição homogênea de nanocompósitos de nHAp na superfície das fibras utilizando a eletrodeposição eletroquímica (PBAT 12 %/PPy 1%/nHAp), para regeneração óssea. O processo de eletrofição foi realizado com 12-13 kV, agulha de 1,2 mm, bomba de infusão de 0,3 ml / h e distância de 10-12 cm do contra eletrodo. Posteriormente, o nHAp foi diretamente eletrodepositada nos *scaffolds* de PBAT / PPy usando um aparelho clássico de três pontas. Os *scaffolds* foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura MEV/EDS, FTIR por ATR, DRX, testes para avaliar possíveis efeitos genotóxicidade *in vivo* (MN e Cometa), e atividade antibacteriana. No DRX o tamanho do cristalito do *scaffold* com nHAp depositada foi de 72.6 nm. No teste MN o experimento foi composto por 05 animais (n=5), sendo quatro grupos: GI - PBAT/PPy/nHAp, GII- PBAT/PPy, Controle positivo - Ciclofosfamida na dose de 50mg/Kg por via intraperitoneal e o Controle negativo - água destilada. O sangue foi coletado da cauda de ratos para o teste cometa. No teste micronúcleo foram coletadas células da medula óssea da fêmur de ratos, mostraram que a *scaffold* não induziu danos no DNA e genotoxicidade nas células. Nos testes antimicrobianos os *scaffolds* apresentam uma eficácia de 99,8% em atividade antibacteriana (bactéria *Pseudomonas aeruginosa*). Em conclusão, os *scaffolds* não tem efeito genotóxico, sendo esse novo biomaterial apresentado tendo grande potencial para possível utilização *in vivo* e no reparo ósseo.

Palavras-chaves: Genotoxicidade. Materiais Biocompatíveis. Regeneração Óssea

ABSTRACT

An increasingly frequent trend in tissue engineering research is the development of nanoscale nanofiber scaffolds. It is then proposed to manufacture polymeric scaffolds using electrospinning (PBAT 12%, PBAT 12% / PPy 1%), and homogeneous deposition of nHAp nanocomposites on the surface of the fibers using electrochemical electrodeposition (PBAT 12% / PPy 1 % / nHAp), for bone regeneration. The electrospinning process was carried out with 12-13 kV, 1.2 mm needle, 0.3 ml / h infusion pump and 10-12 cm distance from the counter electrode. Subsequently, nHAp was directly electrodeposited on PBAT / PPy scaffolds using a classic three-point device. The scaffolds were characterized by SEM / EDS scanning electron microscopy, FTIR by ATR, XRD, tests to evaluate possible in vivo genotoxicity effects (MN and Comet), and antibacterial activity. In XRD the size of the scaffold crystallite with deposited nHAp was 72.6 nm. In the MN test the experiment consisted of 05 animals (n = 5), with four groups: GI - PBAT / PPy / nHAp, GII-PBAT / PPy, Positive control - Cyclophosphamide at a dose of 50mg / kg intraperitoneally and the Control negative - distilled water. Blood was collected from the tail of rats for the comet test. In the micronucleus test, bone marrow cells were collected from the rat femur, showing that the scaffold did not induce DNA damage and genotoxicity in the cells. In antimicrobial tests, scaffolds are 99.8% effective in antibacterial activity (bacteria *Pseudomonas aeruginosa*). In conclusion, scaffolds have no genotoxic effect, and this new biomaterial presents great potential for possible use in vivo and in bone repair.

Keywords: Genotoxicity. Biocompatible materials. Bone Regeneration

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1- Número de trabalhos publicados na área de eletrofição por ano. | 20 |
| Figura 2- Zonas histológicas formadas durante a distração óssea..... | 25 |
| Figura 3- Estrutura química do PBAT | 30 |
| Figura 4: Equação de polimerização do PPy a partir de pirrol e cloreto férrico como agente oxidante. Para cada três unidade constituídas uma é protonada. | 33 |
| Figura 5: Classificação dos micronúcleos, (efeito mutagênico) detectados por meio do Teste de Micronúcleo. A) célula mononucleada; B) célula binucleada; C) célula binucleada com micronúcleo. | 41 |
| Figura 6 - Classificação de danos ao DNA (efeito genotóxico) detectados por meio do ensaio cometa. | 43 |
| Figura 7- Polímeros (a) PBAT - Ecoflex® e (b) Polipirrol (PPy)..... | 46 |
| Figura 8- Apresentação esquemática da montagem típica na técnica de eletrofição, com processo ocorrendo dentro da capela de exaustão..... | 47 |
| Figura 9: Processo de deposição eletroquímica | 48 |
| Figura 10- Procedimento cirúrgico em rato wistar, para inserção dos scaffolds, por via intraperitoneal. | 51 |
| Figura 11- Ilustração do procedimento experimental, teste cometa. | 53 |
| Figura 12: Ilustração do experimento, teste MN em ratos wistar, para exposição de <i>scaffolds</i> | 55 |
| Figura 13 - Imagens de MEV de <i>scaffolds</i> de PBAT (a) com respectivo diâmetro médio das fibras ultrafinas calculadas pelo programa ImageJ de $105 \pm 19,9$ (a.1) PBAT/PPy (b) com seu diâmetro médio de 140 ± 30 nm (b.1) PBAT/PPy após eletrodeposição de nHAp (c) EDS dos <i>scaffold</i> de PBAT/PPy/nHAp demonstrando O, P e Ca (c.1) apresentando uma relação Ca / P da HAp estequiométrica de 1,67..... | 56 |
| Fig. 14 - Demostra a difratograma de raio X dos <i>scaffolds</i> de PBAT/PPy(a) e PBAT PBAT/PPy /nHAp , com zoom na região de $12-30 \text{ cm}^{-1}$ (b), mostrando poliéster PBAT | 59 |
| Figura 15 - Espectros de ATR-FTIR dos <i>scaffold</i> de PBAT, PBAT / PPy e PBAT / PPy com nHAp. | 61 |
| Figura 16: Registra o comprimento da cauda após análise do open comet dos animais após exposição (A). Registro da porcentagem de DNA da cauda após análise do <i>open comet</i> dos animais após exposição (B). | 64 |
| Figura 17- Mostra a presença do micronúcleo (MN) na medula óssea de ratos Wista (<i>Rattus norvegicus</i>)..... | 67 |
| Figura 18: Média de micronúcleos encontrados em 2.000 eritrócitos policromáticos após exposição aguda (A) Média de micronúcleos encontrados em 2.000 eritrócitos policromáticos após exposição crônica (B) Tabela com frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCE MNs) em medula óssea de <i>Rattus wistar</i> expostos a <i>scaffold</i> , agudo (A.1) e crônico (B.1). | 68 |
| Figura 19: Teste antimicrobiano evidenciando o percentual em proliferação de (a) bactérias viáveis e (b) bactérias inviáveis..... | 69 |

LISTA DE TABELA

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1- Estrutura molecular de alguns polímeros condutores | 32 |
| Tabela 2- Dados das formulações e parâmetros utilizados para a preparação das matrizes dos <i>scaffolds</i> de fibras ultrafinas, PBAT, PPy, presença de nHAp, voltagem e taxa de fluxo e distância do contra eletrodo..... | 45 |
| Tabela 3: Dados das formulações utilizadas para teste <i>in vivo</i> | 50 |
| Tabela 4- Dados das formulações utilizadas para teste <i>in vivo</i> | 51 |
| Tabela 5- Dados das formulações utilizadas para teste <i>in vivo</i> | 53 |
| Tabela 6: Os danos no DNA encontrados por grupo após a exposição ao PBAT / PPy e PBAT / PPy com nHAp relatados como o desvio médio e padrão da % cauda de DNA e comprimento da cauda. . | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| PLGA | Ácido poli láctico-glicólico |
| PGA | Ácido poliglicólico |
| PHB | Ácido polihidroxitirato |
| PLGA | Ácido polilático glicólico |
| PLA | Ácido polilático |
| Al ₂ O ₃ | Alumina |
| MSCs | Células-tronco mesenquimais |
| CN | controle Negativo |
| COBEA | Colégio Brasileiro de Experimentação animal |
| CEUA | Comissão de Ética de Uso de Animais |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| PBAT | Co-tereftalato de adipato de polibutileno |
| CP | Controle positivo |
| XRD | Difração de raios X |
| EDS | espectroscopia de energia dispersiva |
| FTIR | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier |
| HAp | Hidroxiapatita |
| FIZ | Inter-zona fibrosa |
| MECs | Matrizes extracelulares |
| MN | Micronúcleos |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| FMP | Mineralização primária |
| nHAp | Nanohidroxiapatita |
| NMs | Nanomateriais |
| OECD | Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico |
| PBS | Poli (succinato de butileno) |
| PCL | Poli ε-caprolactona |
| PHV | Poli(hidroxicaprolactato) |
| PCL | Policaprolactona |
| PHB | Polihidroxitirato |
| PPy | Polipirrol |
| PMO | Proteínas morfogenéticas ósseas |
| ATR | Reflectância Total Atenuada |
| SFB | Soro fetal bovino |
| ZrO ₂ | Zircônia |

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 Relevância do tema e estado atual da arte | 17 |
| 1.2 Fundamentação | 22 |
| 1.2.1 Tecido ósseo: Estrutura, formação e Dinâmica..... | 22 |
| 1.2.2 Considerações sobre os Biomateriais..... | 26 |
| 1.2.3 Biomateriais Poliméricos Biorreabsorvíveis..... | 26 |
| 1.2.4 Biomateriais Cerâmicos | 32 |
| 1.2.5 Mutagenicidade | 37 |
| 1.2.6 Teste de Micronúcleo | 39 |
| 1.2.7 Ensaio cometa | 42 |
| 1.3 Objetivos | 44 |
| 2 METODOLOGIA..... | 45 |
| 2.1 Produção das soluções poliméricas para eletrofiação | 45 |
| 2.2. Eletrofiação de nanofibras de PBAT/PPy | 46 |
| 2.3. Eletrodeposição de nHAp sobre scaffold de PBAT (12%)/PPy (1%) | 47 |
| 2.4 Caracterização morfológica e estrutural dos scaffold | 48 |
| 2.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 48 |
| 2.4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR ATR) ... | 49 |
| 2.4.3 Difratometria De Raios-X (DRX)..... | 49 |
| 3 Testes <i>in vivo</i> para avaliação genotóxica | 50 |
| 3.1 Animais | 50 |
| 3.2 Aspectos Éticos | 50 |
| 3.3 Para o ensaio do cometa..... | 51 |
| 3.4 Testes micronúcleo..... | 51 |
| 3.5 Avaliação Atividade Antibacteriana | 55 |
| 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 55 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 56 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 71 |
| ANEXO | 73 |
| PRODUÇÃO DE ARTIGOS NO PERÍODO DE DOUTORADO..... | 74 |
| REFERÊNCIAS | 76 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Relevância do tema e estado atual da arte

O reparo da fratura óssea se trata de um processo complexo, isto é, reconstrução de defeitos ósseos e não apenas união. O osso tem capacidade para reparação e regeneração em resposta a uma lesão ou tratamento cirúrgico. Seja qual for desses processos, estes envolvem uma complexa integração de células, fatores de crescimento e matriz extracelular. O processo de reparação consiste em restaurar a continuidade dos tecidos lesados, sem necessariamente aumentar o volume ósseo. Já a regeneração é um processo que envolve a diferenciação de novas células e a formação de um novo tecido ósseo que resulta em um aumento do volume de novos tecidos esqueléticos (JACOBSEN; AL-AQL; WAN; FITCH *et al.*, 2008).

Além da fixação convencional, enxertos ósseos combinados com fisioterapia adequada, como estimulação elétrica, ultrassom e ambiente com gradiente de baixo oxigênio, são estudados para reparo ósseo. Os materiais utilizados para o reparo de fraturas ósseas incluem auto enxertos, aloenxertos, xenoenxertos e materiais ósseos sintéticos. Entre eles, os autoenxertos são considerados o "padrão ouro" dos materiais de reparo ósseo. No entanto, os autoenxertos são limitados por fontes ósseas e também podem introduzir novos traumas e / ou complicações. O implante de aloenxertos e xenoenxertos pode ser propenso a desencadear rejeição imune. Embora o reparo da fratura óssea possa não precisar de materiais que não sejam implantes, defeitos ósseos ou grandes vazios de tecido podem exigir materiais como suporte. Como resultado, uma variedade de materiais ósseos sintéticos foi desenvolvida, e mostrou grande promessa para o reparo de fraturas ósseas. (NAIR; SURESH BABU; VARMA; JOHN, 2008; TAUTZENBERGER; KOVTUN; IGNATIUS, 2012; ZHANG; LI; MAO; WANG, 2011)

Nanomateriais são definidos como tendo pelo menos uma dimensão entre 1 e 100 nm. Apresentam propriedades físicas e / ou químicas únicas que são diferentes dos materiais convencionais e surgiram nos últimos anos como avanços promissores no reparo de fraturas ósseas (ROCO, 2003). Por exemplo, nanopartículas fluorescentes, como pontos quânticos e nanopartículas de conversão positiva, mostraram-se promissoras para o rastreamento a longo prazo *in vitro* e *in vivo* de células-tronco mesenquimais (MSCs), e nanopartículas de ouro promoveram a diferenciação de MSCs em relação a osteoblastos células sobre células adipocitárias. (ROSEN; KELLY; SCHULDT; LU *et al.*, 2007; WANG; CHENG; XU; LIU, 2012; YI; LIU; FONG; ZHANG *et al.*, 2010)

As aplicações de nanomateriais na medicina regenerativa, incluindo reparo de fraturas ósseas são variadas incluindo isolamento de células-alvo com nanopartículas, instrução *in vitro* de células terapêuticas com nanomateriais como veículos de entrega, módulos funcionais e artificiais matrizes extracelulares (MECs) com sinais, fornecendo células nanoengenharia para tecidos alvo para terapia regenerativa, construindo modelos de doenças *in vitro* para entender a patologia da doença e a triagem de medicamentos e engenharia de células *in situ* usando nanomateriais diretamente dentro tecido nativo *in vivo*.(CHEN; ZENG; LIU; ZHAO *et al.*, 2013; PERÁN; GARCÍA; LÓPEZ-RUIZ; BUSTAMANTE *et al.*, 2012)

Os scaffolds podem ser chamados de “o coração pulsante” do campo da engenharia de tecidos. Sem o scaffold apropriado, o crescimento de células em um ambiente artificial não é possível. Dentre todas as várias células do corpo humano, as células ósseas são um dos tipos mais críticos que requerem um scaffold bem projetado para permitir crescimento *in vivo*. Existe uma necessidade crescente de reparar tecidos danificados, como ossos, ou substituí-los por novos saudáveis. Pesquisas sobre novas abordagens para criar esses scaffold foram intensificadas nos últimos anos, e a engenharia de tecidos combinada à nanotecnologia agora é encarada como uma alternativa promissora às estratégias de reparo convencionais existentes. (KHADEMHOSEINI; LANGER, 2016; VAN VLIERBERGHE; DUBRUEL; SCHACHT, 2011)

A engenharia tecidual e a medicina regenerativa avançam diariamente na busca de novas formas de solucionar problemáticas. Com o aumento dos acidentes automotivos e da expectativa de vida e conseqüentemente o aumento da população de idosos, as fraturas ósseas e a osteoporose são mais recorrentes (MENDES; SASKA; MARTINES; MARCHETTO, 2013). Assim, estes fatos incentivaram a comunidade científica em buscar novos biomateriais para substituição ou reparação óssea. Esta ciência multidisciplinar, é uma nova abordagem para a restauração e reconstrução de tecidos danificados. Ele tem como objetivo desenvolver tecidos específicos e funcionais que também podem se comportar como os tecidos naturais. A engenharia tecidual ainda, tem como intuito repor, reparar ou auxiliar na regenerar tecidos e órgãos prejudicados por motivos diversos, utilizando-se *scaffolds*, células e biomoléculas, que, em conjunto, mimetizam a matriz extracelular natural do corpo, fornecendo características químicas, físicas e mecânicas que promovem a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013; HINDERER; SCHESNY; BAYRAK; IBOLD *et al.*, 2012).

As propriedades exclusivas das fibras ultrafinas e suas aplicações em muitas áreas, como filtragem de alta eficiência, biomédica, engenharia de tecidos e separadores de bateria

foram amplamente demonstradas nos últimos 20 anos. O mercado global de produtos de nanofibra poderá aumentar de US\$ 927 milhões em 2018 para US\$ 4,3 bilhões até 2023, a uma taxa composta de crescimento anual de 36,2%. Portanto, métodos de fabricação de fibras ultrafinas ecologicamente corretos, com alta eficiência e alta estabilidade de processo, estão atraindo cada vez mais atenção (CHANG; WANG; CHEN, 2014; PERSANO; CAMPOSEO; TEKMEK; PISIGNANO, 2013).

Para atender ao requisito mencionado acima, os pesquisadores aprimoraram e inventaram muitos processos de fiação de fibras, como fusão por fusão, fiação de dois componentes e fiação de força. No entanto, o processo de fabricação de fibras ultrafinas amplamente utilizado é a eletrofiação por causa de sua operação simples para alterar o diâmetro e a porosidade da nanofibra, sua versatilidade em usar uma grande variedade de materiais de polímero a cerâmica e sua capacidade de produzir fibras contínuas. Portanto, a eletrofiação que inclui a eletrofiação de solução e a eletrofiação de fusão é considerada como o método mais promissor para a produção em massa de fibras ultrafinas comerciais.(HAVLÍČEK; SVOBODOVÁ; BAKALOVA; LEDERER, 2020)

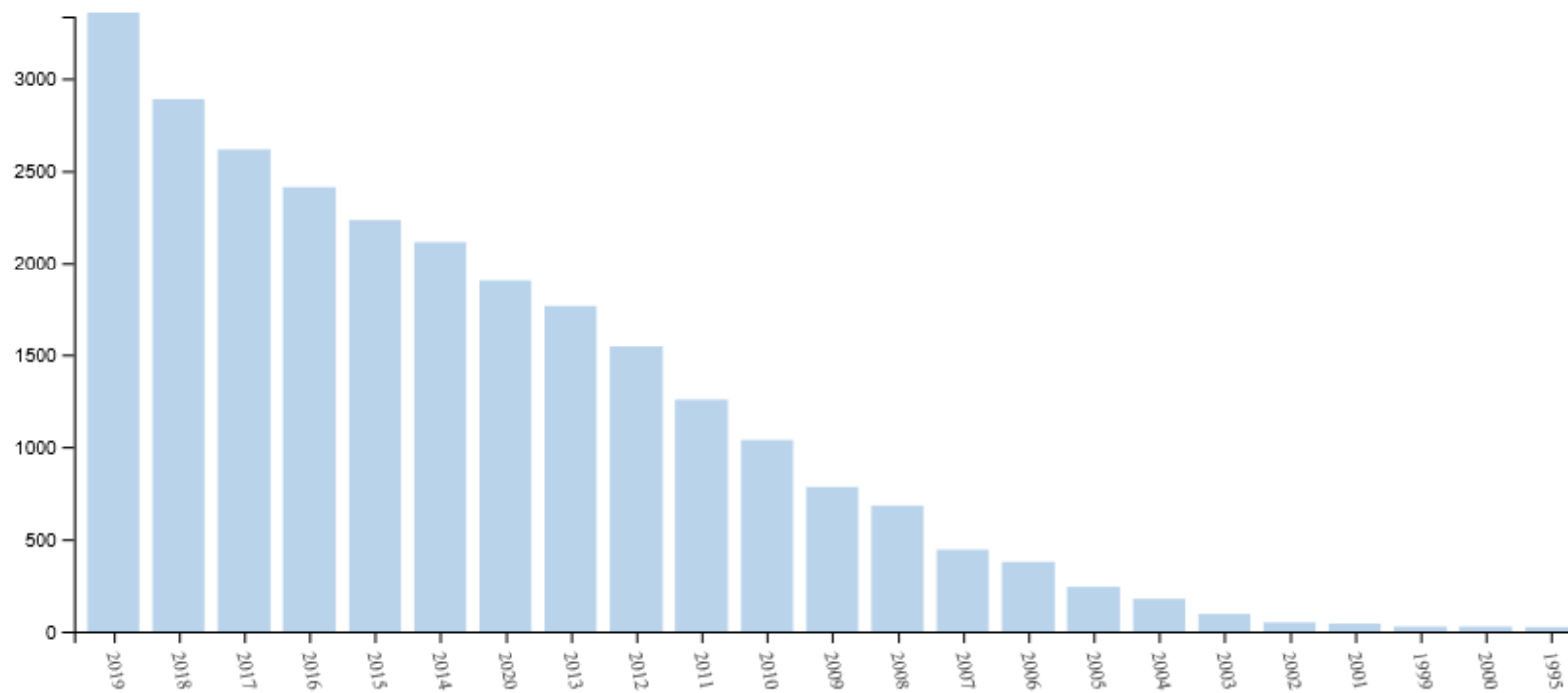
A arquitetura de *scaffold* de fibras ultrafinas, realizadas por eletrofiação assemelha-se bastante com o ambiente natural das células no corpo humano, a MEC. Dessa maneira, o implante de materiais eletrofiados tem maior chance de favorecer a adesão e proliferação celular, facilitando o processo de reparação ou regeneração de tecidos. Tais fibras ultrafinas podem ser obtidas utilizando como matrizes polímeros naturais ou sintéticos, a escolha varia de acordo com a necessidade da fabricação de novos biomateriais que possa fornecer soluções terapêuticas para o tratamento do tecido ósseo, que promova a reparação deste tecido, conferindo-lhe características físicas e biológicas essenciais ao seu correto funcionamento (INGAVLE; LEACH, 2014; KHORSHIDI; SOLOUK; MIRZADEH; MAZINANI *et al.*, 2016)

Eletrospinning, ou eletrofiação, utilizam de um campo elétrico para produzir micro e nano fibras a partir de uma solução polimérica. É um processo barato e simples e capaz de produzir fibras ultrafinas. Apesar de ter sido patenteada pela primeira vez em 1934 por Formhals, a eletrofiação se tornou popular, apenas nos anos 90 devido ao crescente interesse e nanotecnologia e a busca de novos materiais. Desde então, grandes pesquisas concentraram-se em quais polímeros podem ser eletrofiados e na otimização do processo de eletrofiação para aplicações específicas (VENTURELLI; GRIPA, 2017).

Como pode ser visto na Figura 1, a técnica de eletrofiação vem crescendo aritmeticamente nos últimos anos. Se observa que em 1996 o número de artigos publicados na

área era de apenas 150, já no último ano de 2019 se alcançou a marca de aproximadamente 3800 artigos. Esses números demonstram o crescimento de utilização da técnica e seu potencial no uso comercial.

Figura 1- Número de trabalhos publicados na área de eletrofição por ano.



Fonte: (WEB OF KNOWLEDGE, 2020)

O co-tereftalato de adipato de polibutileno (PBAT), um poliéster altamente flexível com baixa cristalinidade e boa resistência mecânica, tem sido uma boa opção para a engenharia de tecidos ortopédicos, no entanto, apresenta baixa bioatividade (KHORSHIDI; SOLOUK; MIRZADEH; MAZINANI *et al.*, 2016; RIBEIRO NETO; DE PAULA; MARTINS; GOES *et al.*, 2015). Além disso, a biocerâmica derivada de fosfatos de cálcio, especialmente a hidroxiapatita (HAp), possui uma forte semelhança química com ossos e dentes e é altamente bioativa (FIHRI; LEN; VARMA; SOLHY, 2017). O HAp tem a fórmula estequiométrica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com uma relação Ca/P de 1,67 e é o fosfato de cálcio menos solúvel de todos e o mais estável. A HAp tem sido usada como material de substituição óssea para aumento ósseo completo ou parcial, preenchimento de ossos e dentes ou revestimento de implantes ortopédicos e dentários convencionais (SZCZES; HOLYSZ; CHIBOWSKI, 2017).

A nanohidroxiapatita (nHAp) é uma nanopartícula que apresenta similaridade química e estrutural com a fase mineral óssea e possui excelentes propriedades como biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, propriedades ainda melhores que a HAp convencional ou estruturada em micron (SANTANA-MELO; RODRIGUES; DA SILVA; RICCI *et al.*, 2017). O polipirrol (PPy) é condutor, o que pode melhorar o crescimento ósseo devido às suas propriedades piezoelétricas. A estimulação elétrica pode promover significativamente a regeneração do tecido ósseo. Os biomateriais condutores podem responder a estímulos elétricos e, portanto, podem imitar a MEC do osso nativo (GAJENDIRAN; CHOI; KIM; KIM *et al.*, 2017; RIBEIRO NETO; DE PAULA; MARTINS; GOES *et al.*, 2015).

Assim, existe grande foco no uso de nHAp e materiais condutores na engenharia de tecidos ósseos. No entanto, uma grande preocupação sobre o uso de nHAp em ortopedia é que, em teoria, os nanomateriais (NMs) podem induzir efeitos genotóxicos, alterando o reparo dos sistemas de DNA nas células ou esgotando as defesas antioxidantes. Tais eventos podem resultar em lesões pré-mutagênicas que podem levar ao câncer, entre outras doenças (AZQUETA; DUSINSKA, 2015).

Na literatura, não existem estudos demonstrando a eletrodeposição de nHAp na superfície de poliésteres com PPy, a não ser, scaffolds produzidos por nosso grupo de pesquisa. A inovação deste material é que o nHAp é colocado fora do scaffold por eletrodeposição, proporcionando assim uma superfície bioativa em um material eletricamente ativo. No entanto, a incorporação de altas concentrações de nHAp em soluções poliméricas necessárias para a eletrodeposição ainda é um desafio. Altas concentrações de nHAp em um revestimento podem melhorar a biocompatibilidade do material (SZCZES; HOLYSZ; CHIBOWSKI, 2017) em como melhorar o processo de osteogênese. Nesse contexto, os *scaffolds* ultrafinos utilizados neste estudo podem ser relevantes para a medicina regenerativa ortopédica e a engenharia de tecidos.

Os *scaffolds* PBAT / PPy com nHAp ainda são pouco explorados na literatura, pela primeira vez, este grupo de pesquisa investigou os efeitos genotóxicos *in vivo* desses *scaffolds* de eletrofiação (DE CASTRO, J. G.; RODRIGUES, B. V. M.; RICCI, R.; COSTA, M. M. *et al.*, 2016; NETO; DE PAULA; MARTINS; GOES *et al.*, 2015; SANTANA-MELO; RODRIGUES; DA SILVA; RICCI *et al.*, 2017) estudando o efeito real das fibras ultrafinas na célula de seres vivos. Esses testes são de grande importância e são requisitos regulatórios para aplicações clínicas subsequentes em humanos, a fim de avaliar o potencial mutagênico desses materiais produzidos em laboratório para reparo tecidual (OECD, 2014a).

As diretrizes para avaliação da genotoxicidade são cruciais na avaliação da segurança de novos materiais. A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico(OECD, 2014a) publicou várias diretrizes com métodos validados e padronizados *in vitro* e *in vivo*, incluindo testes de genotoxicidade.

Em geral, os ensaios de micronúcleo (MN) e cometa *in vitro* ou *in vivo* são os testes mais frequentemente usados para investigar a genotoxicidade. Assim, é necessário realizar testes genotóxicos, como o teste do cometa e o teste MN, para esse fim (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012; LANDSIEDEL; KAPP; SCHULZ; WIENCH *et al.*, 2009; SINGH; MANSHIAN; JENKINS; GRIFFITHS *et al.*, 2009). No entanto, a maioria dos artigos encontrados na literatura que produzem *scaffolds* ultrafinos realiza apenas testes *in vitro* para avaliar a citotoxicidade, como o Teste de Citotoxicidade por Método Direto (MTT), artemia salina e atividade hemolítica, testes simplistas difíceis de traduzir *in vivo*.

Após a obtenção do biomaterial, é necessário realizar estudos genotóxicos dos mesmos para garantir seu uso e não trazer risco futuro de toxicidade; isso justificaria o uso de tais materiais, estabelecendo uma forte relação entre a exposição a agentes genotóxicos e o desenvolvimento de vários efeitos nocivos à saúde e, por definição, qualquer substância ou substância química que danifique o DNA. A capacidade de uma substância de danificar o DNA é preocupante, pois pode ser potencialmente mutagênica e / ou carcinogênica (MÁRQUEZ FERNÁNDEZ; LÓPEZ ORTIZ; CORREA LONDOÑO; PAREJA LÓPEZ *et al.*, 2003).

1.2 Fundamentação

1.2.1 Tecido ósseo: Estrutura, formação e Dinâmica

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo, o componente principal do esqueleto, serve de suporte para os tecidos moles e protege órgãos. É ainda constituído por células e por uma matriz extracelular, que possui a característica única de mineralizar. A mineralização da matriz confere a este tecido uma extrema dureza, permitindo-lhe desempenhar importantes funções de sustentação e proteção. Por sua vez, a matriz colagénica proporciona certa maleabilidade fornecendo algumas possibilidades de extensão e flexão (JUDAS; PALMA; FALACHO; FIGUEIRERO, 2012).

O osso é constituído aproximadamente por 70% de minerais, 20% de matriz orgânica e cerca de 10% de água, o que o diferencia de outros tecidos conjuntivos menos rígidos (RATH; HUFF; HUFF; BALOG, 2000). Da matriz orgânica, cerca de 90% a 95% são fibras

colágenas, constituída de colágeno tipo I, e o restante é substância fundamental composta principalmente de glicoproteínas, proteoglicanas, condroitina e ácido hialurônico. A matriz óssea possui depósitos de grandes quantidades de sais de cálcio. O cálcio e o fosfato dão origem aos cristais semelhantes à HAp cuja fórmula é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, predominantes na matriz óssea, porém há presença de outros íons como potássio, sódio, citrato, magnésio e potássio, em menor proporção conjugados aos cristais de HAp (SILVA, E. A. D., 2009) (ARBOLEDA; FRANCO; CAICEDO; TIRADO *et al.*, 2016).

O osso é constituído por células, e material extracelular calcificado, a matriz óssea. As células são: Osteoblastos; Osteoclastos; e o Osteócitos (KIERSZENBAUM, 2012):

Quadro 1 - Células tecido ósseo, sua morfologia, função e localização

| TIPO CELULAR | MORFOLOGIA | FUNÇÃO | LOCALIZAÇÃO |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| OSTEOBLASTO | Em atividade apresentam núcleos intensamente basofílicos, arredondados e tendência ao formato cúbico ou cilíndrico; em repouso assumem morfologia achatada. | Célula jovem, proveniente da linhagem osteoprogenitora, responsável pela síntese proteica que determina a estrutura da matriz, a ativação da captação iônica e a renovação tecidual via controle do osteoclasto. | Formam monocamada na superfície da matriz, onde podemos observar nas áreas de células ativas pequenas faixas de deposição de osteóide ligeiramente menos eosinofílica do que a matriz extracelular madura |
| OSTEOCITO | Núcleos basofílicos com formato oval e finíssimos prolongamentos celulares que tornam o aspecto da célula estrelada. | Célula madura, proveniente da linhagem osteoprogenitora, captação e manutenção iônica através de seus numerosos prolongamentos citoplásmicos. | Localizam-se dentro de lacunas no interior da matriz extracelular mineralizada, por onde seus prolongamentos percorrem inúmeros canaliculos que permitem a intercomunicação entre estas células, bem como com o sangue. |
| OSTEOCLASTO | Célula gigante multinucleada (sincício), com citoplasma volumoso intensamente osinofílico e formato irregular. | Realiza reabsorção da matriz orgânica via produção de colagenases e catepsinas e da porção mineral, via produção de ácidos (pH próximo a 3,5), com reaproveitamento das unidades "quebradas". Através do reaproveitamento iônico, controla a normocalcemia. | Localizam-se na superfície da matriz extracelular mineralizada, geralmente próximos às áreas de osteoblastos inativos, em depressões correspondentes à área de reabsorção, denominadas lacunas de Howship. |

Fonte: DE CASTRO JUNIOR; DE CASTRO; DA SILVEIRA NETO; MOTA *et al.* (2008)

Os osteoblastos são envoltos pela substância fundamental secretada, eles ficam confinados em espaços estreitos posicionados entre as lamelas do ósteon. Esses osteoblastos em confinamento, tecnicamente, passam a se chamar osteócitos (NEUMANN, 2011).

A capacidade de regeneração do osso, esta atribuída essencialmente, à atividade dessas células, que são fundamentais desde o processo de osteogênese até a remodelação (KIERSZENBAUM, 2012; SILVA; ANDRADE; AMARAL, 2015)

A ossificação pode dar-se através de dois mecanismos: ossificação endocondral e ossificação intramembranosa. Na ossificação endocondral, que ocorre nos ossos longos, o tecido ósseo forma-se a partir de tecido cartilaginoso. Na ossificação intramembranosa as células mesenquimais diferenciam-se em osteoblastos para formar osteoide que, posteriormente, sofre mineralização (ALAM; NATU; GOKKULAKRISHNAN; GIRI *et al.*, 2012).

A a sequência de eventos observada nos processos de osteogênese embrionária, é basicamente a mesma que vamos encontrar na consolidação de uma fratura, ou nos mecanismos de osteointegração de qualquer biomaterial. (JUDAS; PALMA; FALACHO; FIGUEIRERO, 2012)

Após a descontinuidade óssea provocada pela osteotomia, as células inflamatórias e osteoprogenitoras migram desde os tecidos moles adjacentes, medula, periósteo e endósteo para o local, verificando-se hemorragia e originando assim o calo ósseo imaturo (MAURETTE, 2009).

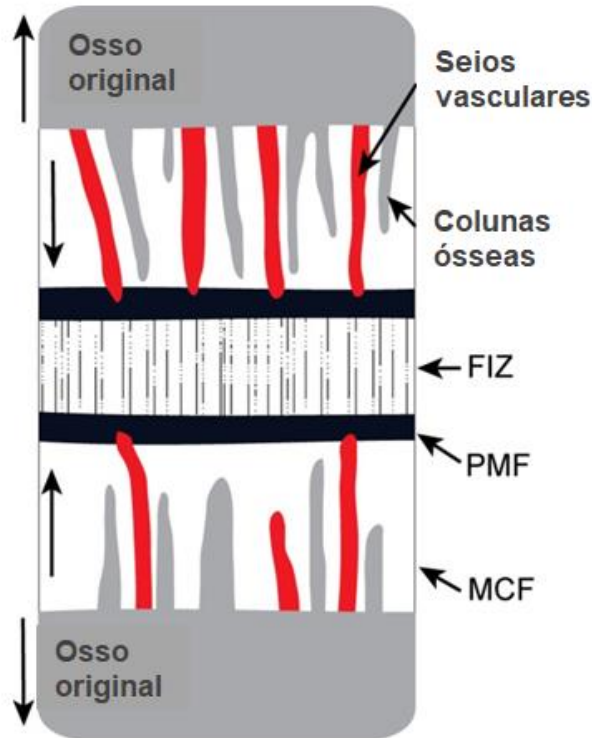
Com a ativação do aparelho distrator, as forças mecânicas por ele aplicadas são convertidas numa cascata de eventos bioquímicos, que por sua vez ativam inúmeros eventos celulares. Neste ponto, há uma marcada resposta vascular de modo a aumentar o aporte de fatores de crescimento, fator hipoxia-induzível, TGF- β e angiopoietina, com síntese de colagénio tipo I. Um trabeculado ósseo começa-se a formar 5 a 10 dias depois de iniciado o processo, e à medida que as forças são aplicadas, este trabeculado vai aumentando (RACHMIEL; LEISER, 2014).

A nível histológico, à medida que as forças são aplicadas, uma inter-zona fibrosa (FIZ) começa-se a formar centralmente. Esta zona contém fibras de colagénio orientadas segundo o vetor de distração e, ao longo destes feixes, os osteoblastos depositam osteoide. Mais tarde, através da mineralização do osteoide entre os feixes de colagénio, surge uma micro-coluna de formação (MCF). As duas extremidades do FIZ são denominadas por frente de mineralização primária (FMP), que é uma zona fina de alta proliferação celular. À medida que a distração continua, nas zonas mais centrais dá-se a formação de tecido fibroso, enquanto que nas áreas mais periféricas se observa mineralização ativa. A FIZ permanece sempre com a mesma largura, a MCF aumenta proporcionalmente ao afastamento dos segmentos ósseos (BEHNIA; TEHRANCHI; MORAD, 2013).

Na Figura 2, mostra as Zonas histológicas formadas durante a Distração Ossea (distração osteogênica). A inter-zona fibrosa (FIZ) é a primeira a formar-se e contém células como osteoblastos e fibras de colagénio. A micro-coluna de formação (MCF) forma-se de

cada lado da osteotomia e inclui vasos sanguíneos provenientes do osso. Estes vasos e as micro-colunas de mineralização óssea são paralelos à direção da força da distração. Entre a MCF e a FIZ encontra-se a frente de mineralização primária (FMP).

Figura 2- Zonas histológicas formadas durante a distração óssea



Fonte: PERCIVAL e RICHTSMEIER (2013)

Quando o alongamento desejado é obtido, as forças deixam de ser aplicadas, permitindo que ocorra a mineralização das zonas mais centrais e que o osso se remodele num osso lamelar mais consolidado, adquirindo resistência e funcionalidade (GOLDSTEIN; JORDAN; MCLAURIN; GRANT, 2013) .

De forma geral, a regeneração óssea possui uma sequência ordenada de eventos biológicos, sendo estas: inflamação, proliferação de células osteoprogenitoras, formação de tecido cartilaginoso, mineralização e remodelação (EINHORN; GERSTENFELD, 2015). Primeiramente à rompimento de vasos sanguíneos causado por trauma em conjunto com fratura, gera hipóxia local, que dá início a inflamação. Nessa fase, alguns sinalizadores biológicos são liberados, como: TNF- α , TFG- β , proteínas morfogenéticas ósseas (PMO) e interleucinas. Essa etapa inicial, é fundamental para o início do reparo tecidual, porque estimula a angiogênese, atrai e promove a diferenciação celular e aumenta a síntese de matriz extracelular (LIU; LI; ZHANG; LI, 2018) .

O mecanismo de reparação do tecido ósseo pela osteointegração é descrito por Davies em três fases: hemostasia, formação de tecido de granulação e formação óssea. A primeira fase, a hemostasia, tem por objetivo a formação de coágulo. Um aspecto importante nesta fase é a aderência da rede de fibrina na superfície do implante. A fase de formação do tecido de granulação é caracterizada pela fagocitose de restos teciduais necróticos, neoformação vascular intensa e deposição de matriz pelos fibroblastos formando um arcabouço para emergência do sistema vascular. A fase de formação óssea envolve os processos de osteocondução (migração de células com potencial osteogênico para a área do reparo peri-implantar), contração da ferida (responsável também pelo afastamento da ferida da superfície do implante), crescimento aposicional (diferenciação das células em osteoblastos, produção e secreção de matriz óssea) e formação óssea “de novo”. Por fim, a matriz passa a ser mineralizada (DAVIES, 1996)

Há a necessidade de mais estudos para compreensão do processo de osteointegração, pois se acredita que as propriedades de um biomaterial interfiram diretamente na qualidade do osso formado, ou seja, as características de superfície como hidrofiliabilidade, rugosidade, porosidade e bioatividade são fatores que determinam a formação óssea, assim como o metabolismo do paciente também interfiram neste processo (BAUER; SCHMUKI; MARK; PARK, 2013; MACHADO, 2002; THELEN; BARTHELAT; BRINSON, 2004) (WU; WENG; LIU; YEUNG *et al.*, 2014) (VANDROVCOVÁ; BACAKOVA, 2011).

1.2.2 Considerações sobre os Biomateriais

Os grandes defeitos e falhas ósseas ocorrem em situações em que a perda de osso é causada por doença, trauma ou ressecção de tumor e, dessa forma, representam um problema em cirurgias reconstrutivas, principalmente quando os processos de reparação e de remodelação estão prejudicados clinicamente nos pacientes. A necessidade de novos materiais mais acessíveis e novas técnicas para utilização na medicina humana e veterinária é evidente, sendo os modelos experimentais em animais, essenciais para uma aplicação segura e eficaz de tais técnicas. O intuito da medicina regenerativa é reparar e regenerar tecidos danificados e, através da elaboração de biomateriais realizada pela engenharia de tecidos, os utiliza, também forma de compósitos, como auxílio no tratamento desses tecidos (KIM; PARK; KANG; PARK, 2014).

Conceitua-se biomaterial, qualquer substância ou combinações de substâncias, sintética ou natural, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como

parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (AZEVEDO; CHAVES; BEZERRA; FOOK *et al.*, 2007). Os melhores materiais para aumentos ósseos não devem ser apenas substitutos ósseos, mas também materiais de regeneração óssea, que envolvem uma completa reabsorção com a formação de novo osso (ANTOUN; BOUK; AMEUR, 2008). Eles podem ser produzidos a partir de substratos metálicos; poliméricos, naturais ou sintéticos; cerâmicos; ou uma mistura de dois ou mais tipos, denominados compósitos (LAVIK; LANGER, 2004).

Além disso, a associação de materiais visando o agrupamento de características ideais complementares nos tratamentos para regeneração tecidual óssea está sendo pesquisada a cada dia mais se tornando uma alternativa promissora para a evolução da engenharia de tecidos. Polímeros e cerâmicas, especialmente, têm uma participação abrangente nesses estudos (WU; WENG; LIU; YEUNG *et al.*, 2014).

Biomateriais possuem uma variedade de aplicações e não há um biomaterial ideal para todas as indicações. As aplicações e os diferentes tipos de biomateriais podem ser visualizados no quadro 2:

Quadro 2- Diferentes biomateriais e aplicações biomédicas

| Biomaterial | Aplicações |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Polímeros sintéticos: poliuretano, nylon, polietileno, poliéster, PMMA (polimetil-metacrilato), silicone. Polímeros naturais: colágeno, gelatina, quitosa. | Suturas, artérias, veias, maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula), tendão artificial, oftalmologia. |
| Compósitos (cerâmica-metal, carbono-carbono, fosfato de cálcio-colágeno). | Válvula cardíaca artificial, juntas de joelho, etc. |
| Cerâmicas (óxidos de alumínio, zircônio, e titânio, porcelana, fosfato de cálcio, carbono e vidro bioativos). | Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, prótese de bacia, traqueias artificiais. |
| Metais e ligas (aço inoxidável, ligas de titânio e cobalto-cromo). | Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios) e implantes dentários. |

Fonte: MALAGUTTI-FERREIRA (2016)

Polímeros são materiais orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos, de alto peso molecular, são obtidos através de reações químicas de polimerização formando estruturas moleculares que consistem na repetição de pequenas unidades, chamadas meros (unidade básica de repetição da cadeia polimérica). Devido ao seu tamanho avantajado, a molécula de

um polímero é chamada macromolécula (KIEVIT; FLORCZYK; LEUNG, 2010) (DASH; CHIELLINI; OTTENBRITE, 2011).

Os biomateriais cerâmicos podem ser classificados de acordo com a sua interação com o tecido hospedeiro como bioinertes, bioativas e bioreabsorvíveis. As bioinertes, como a alumina e a zircônia, mantêm suas propriedades físicas 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 exemplos desta classe, destacam-se a hidroxiapatita, os biovidros e as vitrocerâmicas (RATNER, 2013).

É verídico, que existem diversas técnicas propostas visando à fabricação destes biomateriais, no entanto a técnica de eletrofiação tem sido motivo de escolha, pelo fato de conseguir produzir *scaffolds* fibrosos semelhantes a MEC. A técnica de eletrofiação é, ainda considerada uma abordagem simples de baixo custo e bastante versátil, podendo-se utilizar o mesmo sistema para processar materiais sintéticos ou naturais com fácil incorporação de componentes funcionais, tais como cerâmicas bioativas, entre outros, tornando-os ideais candidatos para aplicações em engenharia de tecidos (INGAVLE; LEACH, 2014; KHORSHIDI; SOLOUK; MIRZADEH; MAZINANI *et al.*, 2016; NETO; PAULA; MARTINS; GOES, 2015; RODRIGUES, 2013; ZHOU; LAWRENCE; BHADURI, 2012).

As fibras ultrafinas eletrofiadas possuem uma elevada área superficial, devido ao pequeno diâmetro de suas fibras e ao fato de elas formarem um não tecido. Além disso, possuem alta porosidade, devido à presença de poros tanto em suas fibras quanto entre o emaranhado de fibras, que forma uma estrutura tridimensional e totalmente interconectada por toda sua extensão (BURGER; HSIAO; CHU, 2006; PATEL; KURPINSKI; QUIGLEY; GAO *et al.*, 2007).

Os NMs, de uma forma geral, são plataformas emergentes que podem ser usadas como *scaffolds* para estudos de regeneração de tecidos *in vitro* ou *in vivo*. Tais fibras ultrafinas podem ser obtidas utilizando como matrizes polímeros naturais ou sintéticos. Para produção de novos *scaffolds*, os polímeros biodegradáveis têm sido amplamente investigados, e mais recentemente o PBAT, que também utilizaremos esta pesquisa (EVANS; GENTLEMAN; POLAK, 2006; FERREIRA; KARP; NOBRE; LANGER, 2008).

As fibras ultrafinas são um dos materiais que mais se assemelham às estruturas fibrosas da MEC nativa e podem ser sintetizadas a partir de vários tipos de polímeros naturais como proteínas de MEC (colágeno, elastina e fibronectina) e polímeros sintéticos tais como poli ϵ -

caprolactona (PCL) e ácido poli láctico-glicólico (PLGA) (AGARWAL; WENDORFF; GREINER, 2009).

Para solucionar as desvantagens dos polímeros, novos estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver biomateriais sintéticos híbridos ou compósitos, que possuam as vantagens dos polímeros, porém com melhores taxas de reabsorção após a implantação, melhor resistência mecânica e melhor bioatividade celular (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006) (LOBO; SIQUEIRA; NEVES; MARCIANO *et al.*, 2013).

Os principais polímeros utilizados com a finalidade de reparo do tecido ósseo são o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (NAVARRO; MICHIARDI; CASTAÑO; PLANELL) (NAVARRO; MICHIARDI; CASTAÑO; PLANELL) (NAVARRO; MICHIARDI; CASTAÑO; PLANELL), ácido polihidroxibutirato (PHB), policaprolactona (PCL), ácido polilático glicólico (PLGA) (ABEDALWAFI; WANG; WANG; LI, 2013) (OKAMOTO; JOHN, 2013) (MOHAMMADI; BUREAU; NAZHAT, 2014) e mais recentemente o poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT).

Em pesquisa de Silva et al. (2014) concluiu que fibras ultrafinas de PBAT incorporadas com nanopartículas por um processo de eletrofiação podem ser consideradas um biomaterial atrativo para aplicação biomédica (SILVA; SANTANA-MELO; FERREIRA; SILVA *et al.*, 2014). Desse modo o PBAT, um polímero bioreabsorvível, e o PPy, polímero condutor que apresenta facilidade de síntese, boa condutividade e biocompatibilidade (SILVA, E. A. D., 2009).

1.2.3 Biomateriais Poliméricos Biorreabsorvíveis

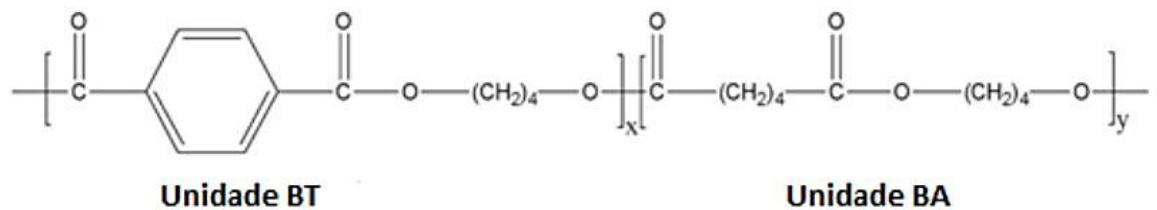
O poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) é um polímero alifático aromático com balanço ajustável entre a biodegradação e as propriedades físicas desejáveis, é um polímero considerado completamente biodegradável. Possui ainda características atrativas como baixa cristalinidade, flexibilidade e um elevado alongamento à ruptura (JIANG; WOLCOTT; ZHANG, 2006) (FUKUSHIMA; WU; BOCCHIN; RASYIDA *et al.*, 2012).

No entanto, assim como os demais polímeros têm algumas limitações, como baixa bioatividade. Para solucionar as desvantagens dos polímeros, novas estratégias buscam a incorporação de nanopartículas nas soluções poliméricas com a finalidade de associar melhores propriedades mecânicas com a biofuncionalidade da superfície do material, aumentando a bioatividade celular (FUKUSHIMA; WU; BOCCHIN; RASYIDA *et al.*, 2012;

RIBEIRO NETO; DE PAULA; MARTINS; GOES *et al.*, 2015) (SIQUEIRA; CORAT; CAVALCANTI; NETO *et al.*, 2015).

O PBAT é um copoliéster alifático aromático, derivado principalmente de 1,4-butanodiol, ácido adípico e ácido tereftálico. A fórmula estrutural do PBAT é representada pela Figura 3:

Figura 3- Estrutura química do PBAT



Fonte: XIAO; LU e YEH (2009)

A unidade repetitiva mais rígida da cadeia (unidade BT) é formada por unidades repetitivas de éster 1,4 butanodiol e monômeros de ácido tereftálico, enquanto a parte mais flexível da cadeia (unidade BA) consiste em 1,4 butanodiol e monômeros de ácido adípico (KIJCHAVENGKUL; AURAS; RUBINO; SELKE *et al.*, 2010). O ácido aromático possui papel duplo, reforçando mecanicamente a estrutura do copoliéster, sem alterar a biodegradabilidade global das cadeias do copoliéster (RAQUEZ; NABAR; NARAYAN; DUBOIS, 2008).

Ele é totalmente biodegradável em solo e em meio aquoso, degradando-se em apenas algumas semanas por enzimas que ocorrem naturalmente e é certificado como compostável de acordo com as especificações da norma ASTM D6400-04, sendo que seu tempo de degradação depende do comprimento médio da cadeia dos blocos aromáticos (GU; ZHANG; REN; ZHAN, 2008) (AL-ITRY; LAMNAWAR; MAAZOUZ, 2012) (JAMSHIDIAN; TEHRANY; IMRAN; JACQUOT *et al.*, 2010). A degradação pode ocorrer no solo, em meio aquoso, e sob condição de compostagem, para variados períodos de tempo dependendo do comprimento médio de cadeia dos blocos aromáticos (JIANG; ZHANG, 2017).

Devido às suas boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade, o PBAT tem despertado interesse para aplicações médicas e industriais (FUKUSHIMA; WU; BOCCHIN; RASYIDA *et al.*, 2012). O potencial uso comercial do PBAT ainda, deve-se a alta massa molar, estrutura com longas cadeias ramificadas, fácil processamento e propriedades mecânicas similares a do polietileno de baixa densidade (PEBD) (KIJCHAVENGKUL; AURAS; RUBINO; SELKE *et al.*, 2010) (MECKING, 2004).

A temperatura de processamento do PBAT deve ser observada, pois o polímero apresenta termoestabilidade reduzida. Mudanças significativas na viscosidade não ocorrem até 200°C, no entanto, significativas mudanças na viscosidade são observadas em temperatura superiores a 230°C (SIEGENTHALER; KÜNKEL; SKUPIN; YAMAMOTO, 2011) .

Segundo Bordes et al. (2009), o PBAT é mais flexível e apresenta maior alongamento na ruptura quando comparado a outros poliésteres biodegradáveis como o PLA e poli(succinato de butileno) (PBS)(BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009). Outra vantagem do PBAT é causar menos danos ecológicos no descarte (LIU; LIN; YANG; CHEN, 2005) pois degrada-se dentro de algumas semanas, com o auxílio de enzimas (GU; ZHANG; REN; ZHAN, 2008).

As maiores limitações para a ampla aplicação do PBAT na área industrial e médica são ocasionadas por sua baixa resistência mecânica e térmica, impedindo algumas aplicações em implantes ósseos e embalagens. Estas limitações podem ser superadas com adição de cargas nanométricas para obtenção de nanocompósitos, que conferem melhorias em propriedades térmicas e mecânicas (FUKUSHIMA; WU; BOCCHIN; RASYIDA *et al.*, 2012).

Poucos trabalhos reportam a utilização do PBAT como biomaterial, os principais referem-se ao uso deste polímero na preparação de blendas como as desenvolvidas por (PELLICANO; PACHEKOSKI; AGNELLI, 2009) , que avaliaram blendas de poli(hidroxicvalerato) (PHV)/ PBAT, (GUERRA, 2010) que avaliou blendas de amido de mandioca / PBAT e (CASARIN, 2004) que estudou blendas de PHB (polihidroxibutirato) / PBAT para fabricação de sacolas plásticas biodegradáveis, esses estudos objetivaram acelerar o processo de degradação das mesmas. Ainda há poucos estudos na literatura sobre o uso de PBAT e seus nanocompósitos para aplicações médicas. FUKUSHIMA; WU; BOCCHIN; RASYIDA *et al.* (2012) avaliaram a citotoxicidade de nanocompósitos de PBAT com diferentes concentrações de argilas para aplicações biomédicas, concluíram que os nanocompósitos não mostraram efeitos significativos de citotoxicidade de acordo com os testes preliminares de biocompatibilidade, sugerindo que o material é atraente para engenharia de tecidos.

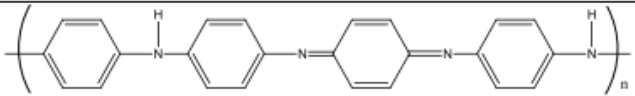
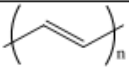
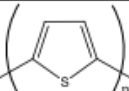
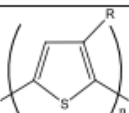
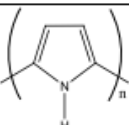
As fibras ultrafinas de PBAT puro e seu nanocompósito propiciaram ainda um ambiente mais favorável ao desenvolvimento celular de fibroblastos e cardiomiócitos do que as condições oferecidas pelos controles, provavelmente por apresentarem menores diâmetros e baixa cristalinidade em relação às demais fibras ultrafinas. Estes resultados mostram o potencial de uso destas mantas nanofibrilicas como suportes de crescimento celular. A principal limitação deste e de outros polímeros para aplicação médica é a fraca resistência

mecânica, no entanto, verificou-se que a adição de partículas de tamanho nanométrico pode minimizar esta desvantagem, melhorando propriedades mecânicas, térmicas, além de induzir a osteogênese e acelerar o processo de osseointegração (CHEN; CHEN; YANG, 2011; CHIVRAC; KADLECOVÁ; POLLET; AVÉROUS, 2006) (FUKUSHIMA; WU; BOCCHIN; RASYIDA *et al.*, 2012).

A maioria dos materiais poliméricos não é um bom condutor de eletricidade. Alguns materiais poliméricos com condutividade elétrica foram sintetizados e denominados polímeros condutores (RETHWISCH; JR, 2014). Polímeros condutores constituem uma classe de materiais poliméricos de larga aplicação prática, e por esta razão tem sido objeto de inúmeros estudos. A propriedade mais importante destes polímeros é justamente sua condutividade elétrica que os diferencia dos demais polímeros convencionais (SILVA, 2009)

A estrutura eletrônica nos polímeros condutores é determinada pela simetria da cadeia polimérica, sendo necessário que o polímero tenha uma cadeia linear. Pode ser visualizada na tabela 1 a estrutura molecular de alguns polímeros condutores (HEEGER, 2001):

Tabela 1- Estrutura molecular de alguns polímeros condutores

| Estrutura molecular | Nome e símbolo |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
|  | Polianilina (PANI) |
|  | Poliacetileno (PA) |
|  | Politiofeno (PT) |
|  | Poli (3-alkil) tiofeno (P3AT) |
|  | Polipirrol (PPy) |

Fonte: HEEGER (2001)

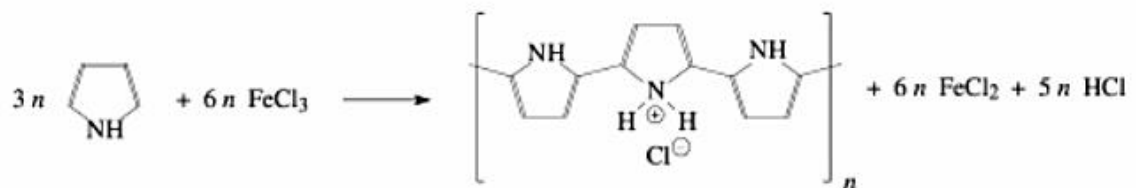
O PPy pode ser obtido por dois métodos principais de síntese: polimerização química e a eletroquímica. Na síntese química, forma-se um pó preto quando uma solução de pirrol entra em contato com uma solução de um agente oxidante (FeCl_3). A vantagem desse método, é a obtenção em grande quantidade do PPy com baixo custo, comparado com método

eletroquímico que é de alto custo. Os filmes de PPy produzidos por síntese química geralmente apresentam uma estrutura fibrilar com baixa rugosidade e flexibilidade e propriedades mecânicas boas (CHANDRASEKHAR, 1999; MEDEIROS; OLIVEIRA; CONSOLIN-FILHO; PATERNO *et al.*, 2012) (CHANDRASEKHAR, 1999).

Em síntese, a oxidação química usualmente produz PPy em forma de pó, enquanto a síntese eletroquímica forma filmes depositados no eletrodo de trabalho (LIU; OLIVEIRA, 2007; WALLACE; TEASDALE; SPINKS; KANE-MAGUIRE, 2002).

Ainda sobre a síntese química do PPy, esta ocorre segundo a reação proposta por (OMASTOVÁ; TRCHOVÁ; PIONTECK; PROKEŠ *et al.*, 2004) como mostrado no Esquema 1, no qual, o FeCl_3 é o agente oxidante geralmente utilizado. Segundo o mesmo autor a razão ótima de FeCl_3 /Pirrol é de 2,3.

Figura 4: Equação de polimerização do PPy a partir de pirrol e cloreto férrico como agente oxidante. Para cada três unidades constituídas uma é protonada.



Fonte: OMASTOVÁ; TRCHOVÁ; PIONTECK; PROKEŠ *et al.* (2004)

Segundo Giglio *et al.*, (2001) polímeros eletricamente condutores apresentam um grande diferencial para aplicações biomédicas, uma vez que estimulam e, portanto, favorecem o crescimento celular. (GIGLIO; GUASCITO; SABBATINI; ZAMBONIN, 2001). Na família dos polímeros condutores o PPy é um dos mais importantes por ser facilmente dopado sem a utilização de compostos altamente tóxicos e por ser termodinamicamente estável (EOFINGER; OOIJ; RIDGWAY, 1996) (DIAS; FIANCHINI; RAJAPAKSE, 2006).

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 capaz de promover estímulos elétricos em células nervosas e ósseas (COLLIER; CAMP; HUDSON; SCHMIDT, 2000).

O PPy foi relatado possuir boa em biocompatibilidade *in vivo* com os tecidos moles (WANG; ROBERGE; DAO; WAN *et al.*, 2004) (WANG; GU; YUAN; CHEN *et al.*, 2004)

(RAMANAVICIENE; KAUSAITE; TAUTKUS; RAMANAVICIUS, 2007) (GEORGE; LYCKMAN; LAVAN; HEGDE *et al.*, 2005) (WANG; GU; YUAN; CHEN *et al.*, 2004) (JIANG; MAROIS; TRAORÉ; TESSIER *et al.*, 2002) mas os seus efeitos sobre o tecido ósseo ainda é desconhecido. No entanto, possui excelente fixação, reforçada proliferação e diferenciação osteogênicos de células-tronco mesenquimais (MSCs)(MORENO; PANERO, 2012; MORENO; PANERO; MATERAZZI; MARTINELLI *et al.*, 2009) e osteoblastos (HU; HSU; CHENG; LI *et al.*, 2014). Isto sugere que o material de PPy tem potencial no tecido ósseo para regeneração *in vivo*.

Sendo o PPy relatado compatível as diversas células, entre elas a MSC (MORENO; PANERO, 2012) (HU; HSU; CHENG; LI *et al.*, 2014), as células ósseas musculares (GILMORE; KITA; HAN; GELMI *et al.*, 2009), neurônios (THOMPSON; MOULTON; RICHARDSON; WALLACE, 2011), os cardiomiócitos (KAI; PRABHAKARAN; JIN; RAMAKRISHNA, 2011), células endoteliais (GARNER; GEORGEVICH; HODGSON; LIU *et al.*, 1999), e osteoblastos (MENG; ZHANG; ROUABHIA, 2011).

Além disso, é PPy relatado para ser biocompatível *in vivo* em vários tecidos, tal como no tecido subcutâneo em ratos (JIANG; MAROIS; TRAORÉ; TESSIER *et al.*, 2002), a intraperitoneal em ratinhos (RAMANAVICIENE; KAUSAITE; TAUTKUS; RAMANAVICIUS, 2007), tecido neural em ratazanas (WANG; ROBERGE; DAO; WAN *et al.*, 2004), o tecido cerebral em ratos (GEORGE; LYCKMAN; LAVAN; HEGDE *et al.*, 2005) e do miocárdio em ratos (MIHARDJA; SIEVERS; LEE, 2008).

Outro campo de interesse significativo tem sido gerado nos compósitos PPy com hidroxiapatita para a fabricação de materiais de substituição óssea com melhora da osseointegração. (MA; SASK; SHI; BRASH *et al.*, 2011) em estudo que utilizou também a eletrodeposição de compósitos contendo heparina e hidroxiapatita em uma matriz de PPy depositada como monocamadas ou bicamadas sobre substratos condutores de aço inoxidável, sugeriram que esses materiais poderiam ser usados para a fabricação de implantes biomédicos com a melhoria da hemocompatibilidade, osseointegração e proteção contra corrosão.

Uma das desvantagens principais é que PPy não é inerentemente biodegradável. No entanto, os produtos de erosão de PPy tem demonstrado ser menos citotóxicos do que os de prata ou partículas de TiO₂, que são comuns produtos de desgaste de implantes ortopédicos (KIM; OH; JEONG; HONG *et al.*, 2011) (PALOMÄKI; KARISOLA; PYLKKÄNEN; SAVOLAINEN *et al.*, 2010).

1.2.4 Biomateriais Cerâmicos

Existem muitas vantagens no uso de biomateriais cerâmicos, dentre elas o fato de serem constituídas de elementos naturais ao sistema biológico; permitir condutividade elétrica e térmica controladas; possuírem um módulo de elasticidade semelhante ao osso humano e poderem ser utilizadas como interfaces inertes ou barreiras (LEMONS, 1996).

As cerâmicas constituem uma grande classe de materiais quimicamente compostos pela ligação iônica de um ou mais íons metálicos com um íon não metálico. São compostos inorgânicos, duros, frágeis, com altos pontos de fusão e baixa condutividade térmica e elétrica (WILLIAM JR, 2012).

Na saúde, as biocerâmicas são mais utilizadas em implantes cirúrgicos, próteses e órgãos artificiais e para cumprir certas funções fisiológicas no organismo humano. Suas aplicações biomédicas vão desde lentes de contato, até regeneração de tecidos. São os materiais mais parecidos com o osso humano, possuem uma boa biocompatibilidade, favorecem a osseointegração, que consiste na integração do osso com o implante, e não possuem proteínas em sua composição, diminuindo o risco de rejeição por parte do organismo (OLIVEIRA; OLIVEIRA; MACHADO; ROSA, 2010). Os principais biomateriais dessa classe são a alumina (Al_2O_3), zircônia (ZrO_2) e a hidroxiapatita (HAp).

Sendo os biomateriais cerâmicos classificados de acordo com a sua interação com o tecido hospedeiro como bioinertes, bioativas e bioreabsorvíveis. Dando ênfase as bioativas, pois será a utilizado neste trabalho, e que é compostas principalmente pela hidroxiapatita (HAp) e fosfatos de cálcio, vem sendo altamente utilizadas nos procedimentos para reparação óssea. Elas apresentam osteocondutividade e biocompatibilidade apropriadas, devido à fase química e estrutural similar com a fase mineral óssea. A HAp é um biomaterial osteocondutor, uma vez que a superfície de sua estrutura é irregular e complexa, facilitando a adesão e a proliferação celular. Adicionalmente, possui características que podem ser amplamente exploradas pois é um material extremamente biocompatível já que cerca de 65% em peso de osso é feito de HAp (OKAMOTO; JOHN, 2013).

A HAp é um material de grande versatilidade, devido à sua semelhança com o osso humano e sua habilidade de adesão. Ela pode ser de origem natural ou sintética, possui solubilidade que lhe permite circundar um osso ou tecido rapidamente, estimulando-o a crescer por entre seus poros. Por essa característica, tem sido utilizada no preenchimento de cavidades pós exéres de tumores, na reparação óssea, em osteotomias e no revestimento de próteses dentárias e ortopédicas (RODRIGUES, 2013).

A HAp pertence ao grupo das cerâmicas de fosfato de cálcio. Sua estrutura química é representada pela fórmula $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, com razão Ca/P de 1,67, podendo ter origem nos corais e algas, ser derivado de mineral ósseo natural ou ainda desenvolvido sinteticamente (SCHMITZ; HOLLINGER; MILAM, 1999).

Quando sintetizada em laboratório fica livre de impurezas que retardam a osteogênese. Além disso, o tamanho, a forma e a porosidade do produto podem ser controlados e pré-determinados (BORGES, 1998). É uma das cerâmicas mais biocompatíveis devido à semelhança com os constituintes minerais dos ossos e dentes humanos (FOOK; APARECIDA; FOOK, 2010). É um biomaterial, bioativo e osteocondutor, ou seja, tem a capacidade de servir como suporte para o crescimento de novo osso assim como novos vasos sanguíneos (BORGES; REZENDE; RIBEIRO; MELO *et al.*, 2000) (DUARTE; BORGES; LAVOR; FILGUEIRAS *et al.*, 2006). Pode ser reabsorvível quando fabricada pela sinterização (FUJITA; YOKOYAMA; KAWASAKI; KOHGO, 2003) ou pela calcinação (BORGES; REZENDE; RIBEIRO; MELO *et al.*, 2000).

Além da osteocondução, o processo de reabsorção da HAp contribui para que ela seja um excelente substituto para o tecido ósseo, uma vez que é realizada por osteoclastos, com as mesmas características que ocorre no processo natural de remodelação óssea (BORGES; REZENDE; RIBEIRO; MELO *et al.*, 2000) (RUMPEL; WOLF; KAUSCHKE; BIENENGRÄBER *et al.*, 2006). Quando implantada em tecidos moles, como subcutâneo, ela é encapsulada por tecido conjuntivo fibroso apresentando lenta reabsorção (CARLO; BORGES; REZENDE; MOREIRA *et al.*, 2007) o que pode torná-la útil em cirurgias reconstrutivas para promover correção de depressões congênitas ou traumáticas.

Contudo, a HAp não possui coesão nem resistência mecânica e tenacidades suficientes para ser usada na fabricação de implantes ou na utilização em locais que requeiram sustentação de peso, pois é um material duro, com baixa capacidade de deformação, o que a torna frágil, especialmente em ambientes úmidos sob condições fisiológicas (CARLO; BORGES; VARGAS; MARTINEZ *et al.*, 2009) (LI; WANG; FAN; FENG *et al.*, 2013). Além disso, a migração de partículas para fora do defeito ósseo é um problema comum (BORGES; REZENDE; RIBEIRO; MELO *et al.*, 2000) (RUPPRECHT; MERTEN; KESSLER; WILTFANG, 2003). Apesar disso, as cerâmicas possuem caráter rígido e quebradiço, o que limita seu uso a aplicações que não suportam cargas muito altas (MARTÍN, 2004).

Estudos têm centrado em replicar as propriedades mecânicas da hidroxiapatita que são anisotrópicas ao osso, por meio do uso do biomaterial em forma de placas ou de partículas de

HAp (CONVERSE; YUE; ROEDER, 2007) e também, são feitos estudos com a utilização de nanopartículas para melhorar o reforço mecânico, a distribuição e aumentar a atividade biológica (SHI; HUANG; CAI; TANG *et al.*, 2009) .

A nHAp pode ter outras propriedades especiais devido ao seu pequeno tamanho e grande área superficial específica. Um aumento significativo de adsorção de proteínas e adesão de osteoblastos sobre os materiais cerâmicos nanométricos (WEBSTER; ERGUN; DOREMUS; SIEGEL *et al.*, 2000) .

Os nanocompósitos baseados em partículas e biopolímeros com HAp têm atraído a atenção por sua boa osteocondutividade, osteoindutividade, biodegradabilidade e elevada resistência mecânica (OKAMOTO; JOHN, 2013). EL-GHANNAM; NING e MEHTA (2004) reproduziram uma escala do tamanho de HAp encontrada nos tecidos ósseos e mostrou que a incorporação de nHAp melhorou as características mecânicas e de adsorção de proteína dos compósitos suportes, mantendo simultaneamente uma elevada porosidade e microarquitetura adequadas.

Assim, para minimizar ou até eliminar esses problemas, ou seja, reduzir sua dureza e promover a coesão entre as partículas, a principal abordagem estudada é a formação de compósitos de HAP com a associação de outros polímeros (CARLO; BORGES; VARGAS; MARTINEZ *et al.*, 2009) (LI; WANG; FAN; FENG *et al.*, 2013) .

1.2.5 Mutagenicidade

Mutação é uma alteração permanente do material genético, que pode ocorrer tanto em células somáticas quanto em células germinativas, sendo estas alterações chamadas de mutações somáticas e germinativas, respectivamente; mutações somáticas não podem ser transmitidas à prole, mas as mutações germinativas podem ser transmitidas a parte da prole ou a toda ela . Estas podem ser classificadas como gênicas ou cromossômicas. Na mutação gênica, ocorre alteração de um alelo de um gene, tornando-se um alelo diferente e, como tal alteração ocorre dentro de um único gene e está em um locus cromossômico (“ponto”), a mutação gênica também é chamada de mutação de ponto ou pontual. (BATISTETI; ARAUJO; CALUZI, 2010)

Em outro nível de alteração hereditária, a mutação cromossômica, segmentos de cromossomos, cromossomos inteiros, ou mesmo grupos inteiros de cromossomos se alteram. Os efeitos de uma mutação cromossômica se devem a novos arranjos de cromossomos e dos genes que eles contêm. Muitas destas alterações levam a

anomalias de funcionamento da célula e do organismo (BATISTETI; ARAUJO; CALUZI, 2010).

A investigação do potencial mutagênico de compostos é de fundamental importância para evitar possíveis efeitos adversos para a saúde humana, desse modo, há uma gama de metodologias adequadas e padronizadas, utilizadas com objetivo de classificar as substâncias quanto ao seu grau de toxicidade, que se refere à capacidade de determinada substância, produto ou conjunto de substâncias de provocar efeitos danosos aos organismos com os quais entram em contato (ARENZON; NETO; GERBER, 2011) .

Nesta busca à proteção à saúde do usuário, antes de um composto entrar no mercado, é necessário que seja determinado o potencial mutagênico deste. As agências regulatórias também estão exigindo a realização de testes de mutagenicidade, seguindo protocolos com metodologias bem definidas e reconhecidas. De acordo com a ANVISA, testes de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo*, específicos para detectar o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações genéticas e cromossômicas (ANVISA).

Uma mutação é definida como uma mudança na sequência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica (SAKAMOTO-HOJO, 2003). Os testes regulatórios de Genética Toxicológica constituem uma série de testes selecionados para detectar agentes químicos e físicos capazes de interagir com o DNA, por meio de diferentes bioensaios, tem validade que existe alta ligação entre agentes genotóxicos e o desenvolvimento de processos carcinogênicos (VALADARES; ALVES; SANTOS; CARDOSO, 2015).

Estudos que avaliam a genotoxicidade dos produtos empregados, reveste-se de considerável importância, dada a relação íntima entre mutagenicidade e carcinogenicidade. É fato reconhecido que o câncer é doença genética, resultante de alterações (mutações gênicas e/ou aberrações cromossômicas) que ocorrem em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA e/ou genes que informam proteínas associadas aos processos de proliferação e diferenciação celulares (protooncogenes e genes supressores de tumor) ou, ainda, em genes relacionados à apoptose (BREIVIK, 2005; COLOMBO; RAHAL, 2009; LOU; HE; ZHENG; JIN *et al.*, 2007; MARCU; YEOH, 2009). A relação entre danos genéticos e carcinogênese é fato estabelecido (SANTOS, 2015). Os agentes genotóxicos são avaliados por meio de parâmetros estabelecidos, como o dano de DNA primário, determinado pelo ensaio cometa (EC), ou a frequência de micronúcleos (MN), de acordo com o teste MN e realizam também o teste de aberrações cromossômicas.

Nas últimas décadas, ensaios de genotoxicidade e citotoxicidade ganharam aceitação como indicadores importantes e úteis na avaliação da biocompatibilidade de determinados

materiais. Testes *in vitro* e *in vivo* são destinados a detectar compostos que induzem à citotoxicidade e danos ao DNA e aos cromossomos. Entretanto, ainda são restritos os estudos *in vivo* sobre nanocompósitos a base de Pbat/PPy com nHAp, deixando diversas perguntas sem respostas quanto à toxicidade deste material (GARCIA, 2015),

1.2.6 Teste de Micronúcleo

O teste de micronúcleo foi desenvolvido por (BOLLER; SCHMID, 1970), em 1970, e possibilita a realização de análises de danos causados por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam introduzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos), determinando alterações mutagênicas nos cromossomos e danos ao fuso mitótico, induzindo a formação de micronúcleos (DA SILVA; DE BRITO BARROS; VIANA; ROMÃO *et al.*, 2011).

O micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (HAYASHI; SOFUNI; MORITA, 1991).

Neste teste, a substância a ser avaliada é administrada em roedores e o efeito pode ser observado em esfregaços de células da medula óssea ou de sangue periférico. Na medula óssea, durante o processo de divisão celular, os eritroblastos sofrem duplicação final dos cromossomos, diferenciando-se em eritrócitos policromáticos. Estes são eritrócitos jovens, ricos em ribossomos e, por isso, são facilmente corados, diferenciando-se dos eritrócitos maduros ou normocromáticos que não contêm ribossomos. Na presença de agentes clastogênicos e/ou de agentes aneugênicos, os fragmentos cromossômicos resultantes de quebras do material genético ou de cromossomos inteiros que não se prenderam às fibras do fuso, podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose, originando o micronúcleo. Este, por sua vez, permanece no citoplasma e pode ser facilmente visualizado em eritrócitos policromáticos. Considerando que o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, qualquer micronúcleo que ele contenha tem grande probabilidade de ter sido gerado como danos cromossômicos induzidos recentemente, na presença de uma substância que causou este dano (SCHMID, 1976).

O teste de micronúcleos é amplamente utilizado para detecção de danos cromossômicos. Comparando-se a outros ensaios citogenéticos é considerado mais simples tanto na execução quanto na análise microscópica e, ainda, mostra claramente o aumento nos danos ao DNA.

Entretanto, quando se trata de exposição à níveis baixos de citotóxicos/mutagênicos, raramente serão encontrados resultados positivos, devendo sempre ser confirmado com outros ensaios citogenéticos como aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs (AZEVEDO; CHAVES; BEZERRA; FOOK *et al.*, 2007).

Segundo o protocolo descrito por (HAYASHI; KODAMA; AWOGI; SUZUKI *et al.*, 1992), o teste do micronúcleo também pode ser realizado em células sanguíneas de roedores tratados com agentes mutagênicos com resultados confiáveis.

O teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos apresenta muitas vantagens, mas também algumas limitações (SANTOS, 2015). Tais sejam:

a) Vantagens

- Micronúcleos são observados em células de interfase, dispensando procedimentos de cultura;
- O teste é realizado a baixo custo;
- A análise é simples e as estruturas são facilmente identificadas;
- O teste detecta a ação de agentes aneugênicos e clastogênicos.
- Adicionalmente à genotoxicidade, o teste de micronúcleo propicia também a avaliação da citotoxicidade de uma dada substância através (BORGES; MACHADO; CUNHA; PEREIRA *et al.*, 2013).

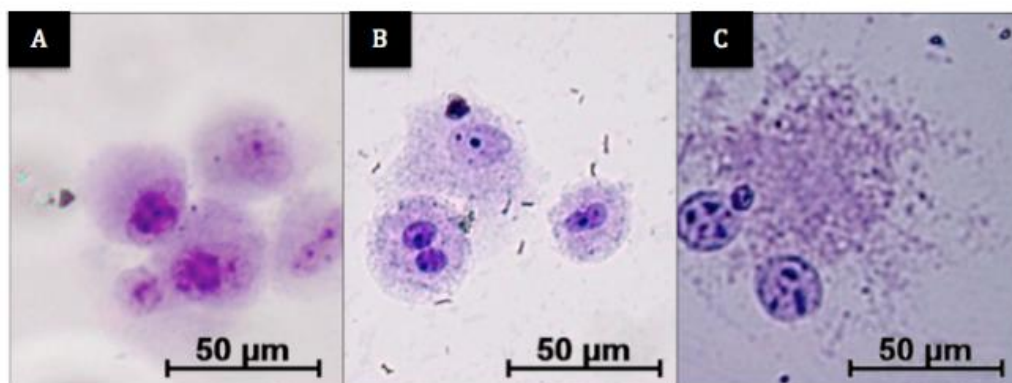
b) Limitações

- Micronúcleos são observados apenas em células que passaram anteriormente por uma divisão;
- Eventos de não-disjunção mitótica não são detectados
- Quebras que promovem rearranjos cromossômicos sem a ocorrência de fragmentos não são expressas.

Com relação à formação do micronúcleo, (FLORES; YAMAGUCHI, 2008) afirmam que esta ocorre durante a divisão celular e é resultante da expulsão de cromossomos fragmentados ou inteiros. O micronúcleo (MN) é uma estrutura que não apresenta núcleo e localizada próxima ao núcleo. As principais funções do micronúcleo são sinalizar a mutagenicidade e mostrar a ocorrência de danos genéticos. O micronúcleo é conhecido na hematologia como Corpúsculo de Howel-Jolly, e quando tem a sua frequência aumentada significa que as células foram expostas a agentes mutagênicos.

Os MN constituem pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Formados na telófase da mitose ou meiose quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas (Figura 5). Resultantes essas de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal (RIBEIRO; SALVADORI, 2003).

Figura 5: Classificação dos micronúcleos, (efeito mutagênico) detectados por meio do Teste de Micronúcleo. A) célula mononucleada; B) célula binucleada; C) célula binucleada com micronúcleo.



Fonte: (MALAGUTTI-FERREIRA, 2016)

As frequências de MN sofrem aumento em tecidos expostos aos carcinogêneos, antes que qualquer sintoma clínico se manifeste. Assim, o teste de MN é um biomarcador ocupacional em células expostas a agentes químicos genotóxicos, além de possível indicador de sinais carcinogênicos precoces (SINGARAJU; SINGARAJU; PARWANI; WANJARI, 2012).

Em síntese micronúcleo são pequenas estruturas que possuem cromatina justaposta ao núcleo principal ou filhas binucleadas após a conclusão da mitose. Estes podem surgir em respostas a resultados de processos clastogênicos, aneuploídicos ou segregações cromossômicas anormais (ALBAS; SOUZA; NAI; PARIZI, 2014).

O teste de micronúcleo realizados em medula óssea de camundongos é considerado valiosa ferramenta na avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade de um dado agente. Este teste é recomendado como parte do arsenal de testes regulares adotados na prática da Genética Toxicológica, aceito pelas instituições governamentais e pelas agências internacionais de registros de novas drogas, drogas estas que são lançadas no mercado mundial (BONASSI; BIASOTTI; KIRSCH-VOLDERS; KNASMUELLER *et al.*, 2009; MARZIN, 1997; ZEIGER, 1998).

1.2.7 Ensaio cometa

Denominado “single cell gel electrophoresis test” (SCGE), a metodologia do ensaio do cometa foi descrita por (SINGH; MCCOY; TICE; SCHNEIDER, 1988) Singh et al. (1988) e modificada por (SPEIT; HARTMANN, 1999) Speit e Hartman (1999). No protocolo descrito por Speit; Hartman (1999), para a realização deste ensaio, retira-se células sanguíneas de um animal tratado com a substância em análise e este sangue é misturado com agarose de baixo ponto de fusão.

Quando a agarose é solidificada, as células são lisadas em uma solução detergente, por pelo menos uma hora, e então as lâminas são colocadas em câmara de eletroforese com solução alcalina, permitindo o desenrolar do DNA. Quando o composto em análise provoca alguma modificação no material genético, este procedimento resulta na migração de pequenos fragmentos do DNA através do gel de agarose na eletroforese. Assim, caracterizam-se imagens de nucleóides como cometas, com cabeça e cauda, que, quando corados com solução de brometo de etídio, podem ser observados em microscópio de fluorescência. Os danos ao DNA podem ser verificados pelo escore visual ou por análise automatizada, através da análise de sistemas diretos de fotomicrografias por software específico. No escore visual, são classificados em quatro categorias, distribuídos desde a classe zero, em que as células não apresentam cauda (dano mínimo), até a classe quatro, em que as células apresentam o tamanho da cauda superior a duas vezes ou mais o tamanho da cabeça (dano máximo) (COLLINS; AI-GUO; DUTHIE, 1995) .

O Ensaio Cometa é utilizado amplamente na genética médica, genética toxicológica ecotoxicológica, em diagnósticos e tratamentos médicos, medicina ambiental, ocupacional, biomonitoramento ambiental, além de outras aplicações biomedicas (TICE; AGURELL; ANDERSON; BURLINSON *et al.*, 2000).

A mesma técnica pode ser usada substituindo o sangue por outros tecidos, a partir da obtenção de uma suspensão celular do órgão em análise (UENO; KASHIMOTO; SUSA; NATSUME *et al.*, 2007). As principais vantagens do ensaio cometa, segundo (TICE; AGURELL; ANDERSON; BURLINSON *et al.*, 2000) Tice et al. (2000), são:

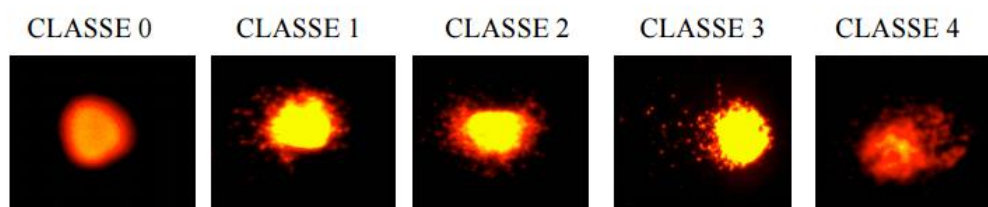
- Apresenta grande sensibilidade e flexibilidade;
- O número de células para análise é pequeno;
- É realizado a baixos custos e em curto espaço de tempo;

- É de fácil aplicação.

A técnica “Ensaio do Cometa” (EC) ou “eletroforese em gel de célula única”, (Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE), proposta por (OSTLING; JOHANSON, 1984) Östling e Johanson, em 1984, permite detectar quebras na dupla fita de DNA, produzidas por alterações genéticas nas células, por meio de uma técnica de eletroforese em gel sob condições neutras. Posteriormente, a técnica foi modificada por (SINGH; MCCOY; TICE; SCHNEIDER, 1988) SINGH et al., (1988), para uma técnica sob condições alcalinas e mais eficiente. Tem se destacado como uma técnica padrão para avaliar os danos e a reparação no DNA, devido a sua sensibilidade para a detecção de níveis baixos desses danos, a sua aplicabilidade em vários tecidos e/ou tipos de células e a exigência de apenas um pequeno número de células por amostra, torna seu desempenho fácil e rápido (FAUST; KASSIE; KNASMÜLLER; BOEDECKER *et al.*, 2004; TICE; AGURELL; ANDERSON; BURLINSON *et al.*, 2000).

O EC consiste basicamente em fazer passar uma corrente elétrica pelas células, proporcionando a migração dos fragmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. A extensão da migração dos fragmentos de DNA depende diretamente de danos presentes nas células, desta forma, após a eletroforese, as células que apresentarem núcleo intacto com membrana bem delimitada, são consideradas sem danos, já as células identificadas visualmente com “cauda”, formadas pelos fragmentos de DNA, são consideradas células com danos detectáveis e serão classificadas quanto ao tamanho da cauda, conforme Figura 6 (BETTI; DAVINI; GIANNESSI; LOPRIENO *et al.*, 1994).

Figura 6 - Classificação de danos ao DNA (efeito genotóxico) detectados por meio do ensaio cometa.



Fonte: (MALAGUTTI-FERREIRA, M. J., 2016)

O ensaio do cometa é uma ferramenta confiável, que tem sido utilizada com sucesso para a investigação de compostos com atividade antioxidante. É uma técnica muito válida para verificar se as interações entre compostos antioxidantes e micronutrientes são capazes de

proteger a integridade do material genético (CEMELI; BAUMGARTNER; ANDERSON, 2009).

É uma técnica utilizada para detectar danos ao DNA em células individuais, podendo ser aplicado em sistemas *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* (CEMELI; BAUMGARTNER; ANDERSON, 2009). O ensaio do cometa permite a detecção de lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção pelo sistema de reparo (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

Novos softwares são utilizados como técnica, para detecção de danos no DNA, como por exemplo, o OpenComet, como utilizado esta trabalho, no qual utiliza fórmulas geométricas para encontrar cometas através de uma análise automatizada de imagens, que possibilita resultados precisos e com menos erros humanos, sendo também uma análise mais rápida (GYORI; VENKATACHALAM; THIAGARAJAN; HSU *et al.*, 2014).

No software OpenComet, versão 1.3 as análises do ensaio cometa, utilizam o comprimento da cauda de DNA e a porcentagem de DNA na cauda (COLLINS, 2014), 2014). É uma ferramenta desenvolvida para lidar com dificuldade que exigem seleção manual dos cometas, trazendo assim, uma análise automática de imagens de ensaios de cometas, melhorando os resultados analisados e diminuindo erros que possam existir, bem como reduzindo o tempo total das análises (GYORI *et al.*, 2014).

1.3 Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é produzir um nanocompósito que seja biocompatível e reduza o crescimento bacteriano, a base de PBAT, PPy e nHAp, com potencial ósseo regenerativo e avaliar os possíveis efeitos genotóxicos dos mesmos em ratos wistar.

Objetivos Específicos

- Produzir nanocompósitos a base de PBAT/PPy/nHAp pelo processo de eletrofição;

- Caracterizar através da microscopia eletrônica de varredura-espectroscopia de dispersão de energia (MEV-EDS), a capacidade de aceleração do processo de reparação óssea das fibras ultrafinas de PBAT, PBAT/PPy, PBAT/PPy/nHAp
- Analisar e adquirir uma amostragem controlada através Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR), Difratometria de Raios-X (DRX) e análise do tamanho do cristalito.
 - Determinar a frequência de micronúcleos em células da medula óssea de ratos wistar tratados e não tratados com PBAT/PPy, PBAT/PPy/nHAp
 - Identificar o índice de danos e a frequência de danos ao DNA em ratos wistar tratados e não tratados com PBAT(12%)/PPy(1%), PBAT(12%)/PPy(1%)/nHAp com a aplicação do teste cometa
 - Verificar a ação carcinogênica PBAT(12%)/PPy(1%), PBAT(12%)/PPy(1%)/nHAp através do teste de micronúcleo.
 - Realizar avaliação da atividade antibacteriana.

2 METODOLOGIA

2.1 Produção das soluções poliméricas para eletrofiliação

Salienta-se que as proporções e concentrações definidas nessa tese seguiram metodologias de trabalhos realizados pelo grupo, podendo ser melhores especificadas nas referencias (RODRIGUES; SILVA; MELO; VASCONCELLOS *et al.*, 2016) (DE CASTRO, J. G.; RODRIGUES, B. V. M.; RICCI, R.; COSTA, M. M. *et al.*, 2016) Para a produção das soluções poliméricas, foi utilizado polímero comercial PBAT - (Ecoflex® F Blend C1200), o solvente Clorofórmio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) e o solvente secundário Dimetilformanida (DMF, Synth) e, o polímero secundário e condutor PPy sintetizado na Universidade Federal do estado de São Paulo (Unifesp). Foram preparadas três diferentes formulações como segue na Tabela 2:

Tabela 2- Dados das formulações e parâmetros utilizados para a preparação das matrizes dos *scaffolds* de fibras ultrafinas, PBAT, PPy, presença de nHAp, voltagem e taxa de fluxo e distância do contra eletrodo.

| Nº | Grupos | PBAT (m/v) | PPy (m/v) | nHAp | Voltage (kV) | Fluxo (mL/h) | Distancia cm |
|----|--------|---------------|--------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|
|----|--------|---------------|--------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|

| | | | | | | | |
|---|---------------------------|------|----|-----|-----------|-----|-------|
| 1 | PBAT (12%) | 12% | 0 | Não | 12- 13 kV | 0.3 | 10-12 |
| 2 | PBAT (12%)/ PPy (1%) | 12 % | 1% | Não | 12- 13 kV | 0.3 | 10-12 |
| 3 | PBAT (12%) PPy (1%)/ nHAp | 12% | 1% | Sim | 12- 13 kV | 0.3 | 10-12 |

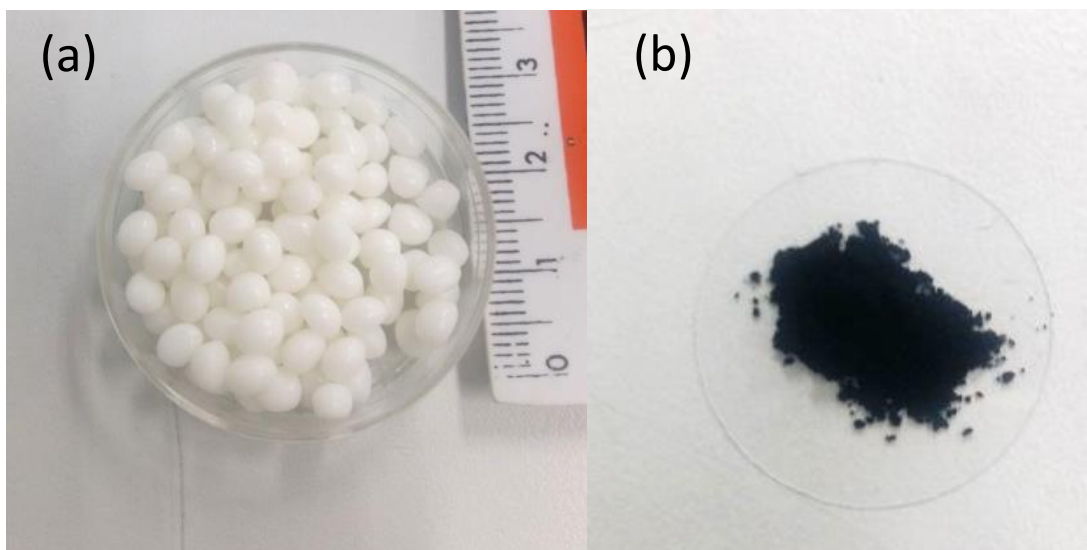
Fonte: Proprio autor

2.2. Eletrofiação de nanofibras de PBAT/PPy

Os *scaffold* ultrafinoscontendo PBAT (12% m/v) e PPy (1% m/v), respectivamente (**Fig. 7**), foram preparadas utilizando-se clorofórmio e dimetilformamida como sistema solvente (60/40). Numa preparação típica, os pellets de PBAT foi dissolvido em clorofórmio, durante 120 minutos, sob agitação de 250 rpm 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 10 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.

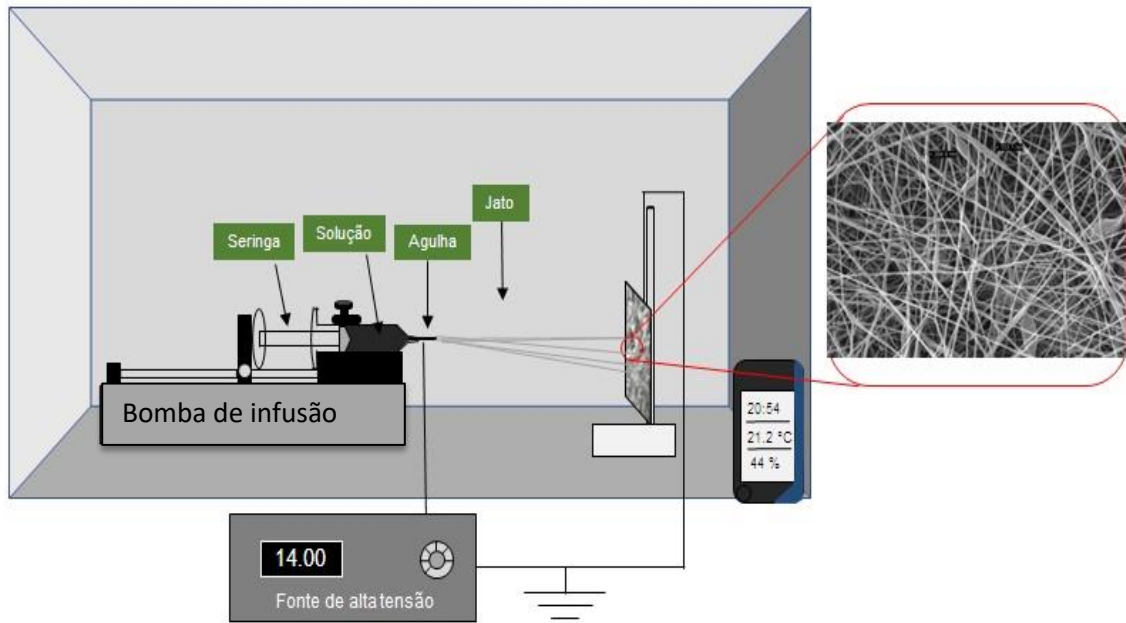
As soluções poliméricas foram eletrofiadas em um sistema adaptado (**Fig. 8**), de baixo custo relativo, utilizando uma fonte de alta tensão da marca BERTAN 230-30R. A solução foi colocada na bomba de infusão (KDS 100, KD Scientific), em uma seringa de 3 mL (BectonDicKinson – BD), agulha de metal não descartável 1,2 mm, com fluxo regulado em 0,3mL/h. O processo ocorreu a uma distância de 10 - 12 cm e tensão aplicada de 12- 13 kV (PBAT/PPy). Foram controlados os parâmetros de umidade relativa do ar , mantendo em torno de 45 a 50%. As amostras foram coletadas em um contra eletrodo plano de aço de dimensões 92X78 mm, recoberto por papel alumínio. O processo de cada *scaffold* teve duração aproximada 50 minutos para cada amostra.

Figura 7- Polímeros (a) PBAT - Ecoflex® e (b) Polipirrol (PPy).



Fonte: Autora

Figura 8- Apresentação esquemática da montagem típica na técnica de eletrofição, com processo ocorrendo dentro da capela de exaustão



Fonte: Autora

2.3. Eletrodeposição de nHAp sobre *scaffold* de PBAT(12%)/PPy(1%)

A eletrodeposição dos cristais de nHAp nas amostras PBAT/PPy foram realizadas utilizando eletrólitos da marca SIGMA-ALDRICH®, sendo 2.5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 1.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH = 4.8) em 50 ml.

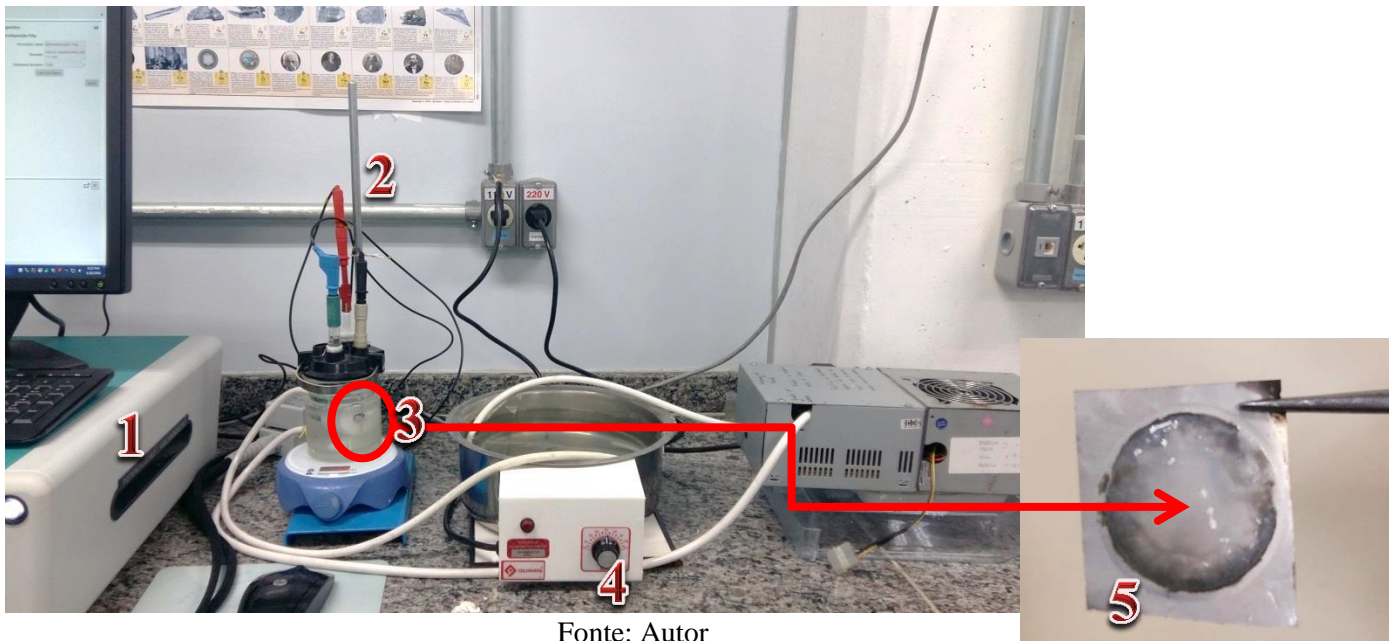
Estas concentrações foram escolhidas de acordo com o $\text{Ca/P} = 1,67$ (DE CASTRO, J. G.; RODRIGUES, B. V. M.; RICCI, R.; COSTA, M. M. *et al.*, 2016). Os *scaffolds* ultrafinos de PBAT/PPy foram utilizadas como anodo acoplado à um porta-eletrodo com área circular exposta de $2,8 \times 10^{-5} \text{ m}^2$. Foi utilizado como contra-eletrodo um bastão de platina com $5 \times 10^{-2} \text{ m}$ de comprimento e $2 \times 10^{-4} \text{ m}$ de diâmetro.

O processo de deposição eletroquímica foi realizado em um Potenciostato/Galvanostato (AUTOLAB, PGSTAT 128N, HOLANDA), operando em modo Potenciostato, fornecendo energia de corrente contínua no potencial de -3,8 V, durante 1800 segundos. Para manter a solução em temperatura constante ($\sim 70^\circ$), foi utilizado um banho termostático (QUIMIS,

Modelo Q-218-1). Todo o processo foi realizado com o auxílio de agitador magnético (IKA®), sob agitação contínua de 450 rpm.

Figura 9 - Processo de deposição eletroquímica, mostrando o Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB, PGSTAT 128N, HOLANDA com os eletrodos clássicos de três pontas PGSTAT 128N (2); célula com eletrólitos e cachimbo acoplado com a amostra de PBAT/PPy (3); banho termostático QUIMIS, Modelo Q-218-1. À 70°C(4), material produzido *scaffold* de PBAT/PPy após eletrodeposição de nHAp (OSTLING; JOHANSON).

Figura 9: Processo de deposição eletroquímica



Fonte: Autor

2.4 Caracterização morfológica e estrutural dos *scaffold*

As técnicas utilizadas para caracterizar os biomateriais foram Microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR ATR).

2.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das amostras, bem como a disposição, formato e a determinação dos seus diâmetros foram obtidos por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) da marca Zeiss, modelo EVO MA10 que se encontra acoplado ao sistema de Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDS), e as imagens das fibras aumentadas de 1000 e 6000 vezes. Foi

depositada sobre cada amostra 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. Realizou-se a mensuração do diâmetro médio dos *scaffolds* utilizando o programa Image J.

As quantidades de Ca^+ e P^+ foram determinadas em três pontos distintos por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) (MAIA FILHO et al 2014).

2.4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR ATR)

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para caracterização das amostras obtidas, com auxílio de acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR), usando um sistema de imagem Perkin-Elmer Spotlight 400 FTIR Imaging System. Os dados foram coletados no intervalo de $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$ no modo de absorbância.

2.4.3 Difractometria De Raios-X (DRX)

A Difração de raios X (XRD, X-Pert Philips) com radiação Cu K- α gerada a 40kV e 50 mA para caracterizar a microestrutura e o conteúdo de fase do cristais de nHAp. Os resultados foram comparados com o pó HAp (JCPDS pattern 01-072-1243).

Para o cálculo de tamanho de cristalito foi utilizada a equação de Scherrer, é expressa pela Equação 1 (OLIVEIRA, 2005).

$$\tau = k \lambda \beta / \cos \Theta \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

τ é o tamanho do cristalito em nanômetro, k é a constante de proporcionalidade que depende da forma das partículas. Assumindo como esférica $k = 0,91$, λ é o comprimento de onda da radiação CuK α (1.5406 Å), β é a largura total pico à meia altura do máximo (FWHM) de intensidade conforme a reflexão dos planos (hkl) em radianos, e θ é o ângulo de difração [°] satisfazendo a lei de Bragg para o plano escolhido como principal da estrutura cristalina formada.

A determinação dos índices de cristalinidade foi realizada utilizando o perfil da banda de maior intensidade característicos da fase cristalina dos respectivo polímero, sendo analisado plano (002), com pico 2θ de 26,5 graus da amostra PBAT/PPy depositada nHAp. Os valores (FWHM) foram coletados após a deconvolução do pico analisado, usando padrão e perfis do tipo, Lorentz (BARBOSA; MESSMER; BRAZIL; MARCIANO *et al.*, 2013).

3 Testes *in vivo* para avaliação genotóxica

Os ensaios *in vivo* vem fornecem informações detalhadas de significância biológica e fisiológica, e nos ensaios *in vitro*, têm sido considerados como um teste de genotoxicidade para o rastreio de substâncias (por exemplo: candidatas drogas, extrato de plantas medicinais, substâncias químicas, etc.) e avaliar a sua segurança inicial (BENIGNI; BOSSA; TCHEREMENSKAIA; BATTISTELLI *et al.*, 2012).

Os testes de genotoxicidade aprovado oficialmente pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) incluem o teste de mutação reversa bacteriana, teste de aberração cromossômica, teste de micronúcleos, e ensaio de cometa (KANG; KWON; LEE; SEO, 2013).

3.1 Animais

A amostra foi do tipo probabilística e aleatória, utilizando ratos machos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), com peso corpóreo de 200-250g, acima de 30 dias; foram mantidos no biotério. Foram utilizados 5(cinco) animais para cada grupo, com alimentação e água à vontade, ciclo claro-escuro (12h).

3.2 Aspectos Éticos

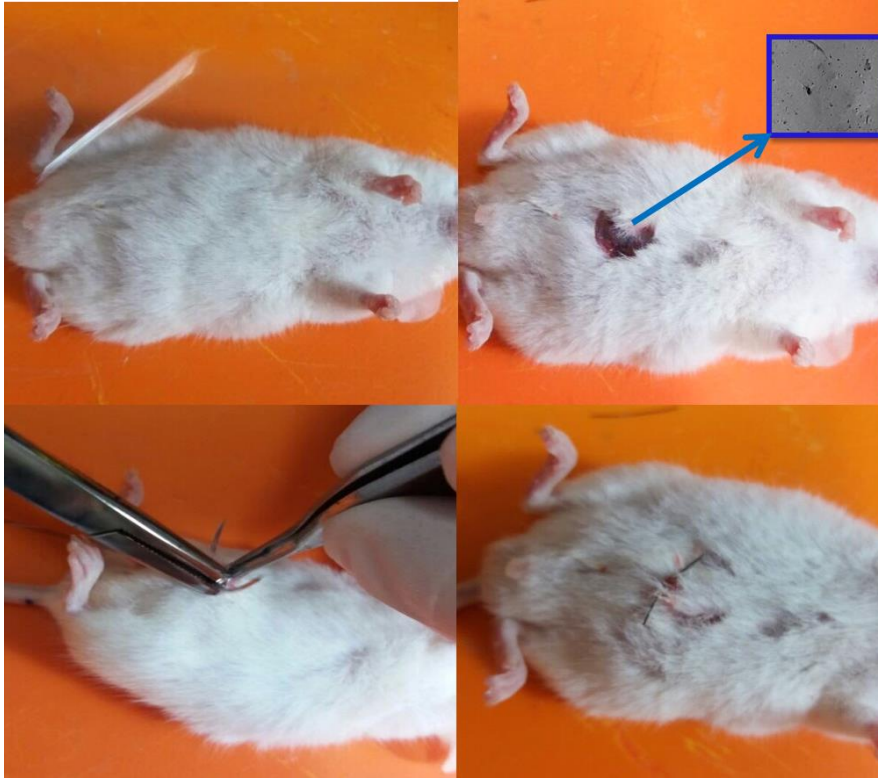
Princípios éticos da experimentação animal foram de acordo com a Lei Federal nº 11.794/2008. O procedimento experimental atenderam à todas as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA). Foi aprovado pelo do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) – (Protocolo – N°0029/2017) no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP / FACIME) conforme Anexo A. Os 4 grupos testados, estão descritos na tabela 3 :

Tabela 3: Dados das formulações utilizadas para teste *in vivo*

| Grupos | Grupos |
|-------------------|---------------------------|
| Controle Positivo | Ciclofosfamida |
| Controle Negativo | Água destilada |
| GI | PBAT (12%) PPy (1%)/ nHAp |
| GII | PBAT (12%)/ PPy (1%) |

Fonte: Autoria própria

Figura 10- Procedimento cirúrgico em rato wistar, para inserção dos scaffolds, por via intraperitoneal.



Fonte: Autoria própria

3.3 Para o ensaio do cometa

O ensaio do cometa teve 5 (cinco) animais ($n= 5$), para cada grupo (4 grupos conforme tabela 4 abaixo, com suas respectivas exposições, que foi implantada através de uma Laparotomia. Para a Laparotomia os animais foram previamente anestesiados através de anestesia dissociativa a base de ketamina (1,0ml/kg) e xilazina (1,1ml/kg) intramuscular.

Tabela 4- Dados das formulações utilizadas para teste *in vivo*

| Grupos | Exposição | N ratos |
|--------|-----------------------------------|---------|
| CP | Ciclofosfamida(Controle Positivo) | 5 |
| CN | Água destilada(Controle Negativo) | 5 |
| GI | PBAT (12%) PPy (1%)/ nHAp | 5 |
| GII | PBAT (12%)/ PPy (1%) | 5 |

Fonte: Autor

O teste foi realizado com 20 animais, quatro grupos, sendo: o suporte nanofibroso PBAT (12%) / PPy (1%) e PBAT (12%) PPy (1%) / nHAp, com tamanho de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ introduzido no peritônio por laparotomia; O grupo CP (Controle positivo), que recebeu ciclofosfamida sabidamente genotóxica (BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012) (KOUR; ALI; GANAIE; TABASSUM, 2017), ciclofosfamida numa concentração de 50 mg/Kg por animal; e CN (controle Negativo), com água destilada por via intraperitoneal, na mesma proporção.

Processamento das amostras:

As amostras foram processadas 4 horas após a exposição (para observar o dano) e 24 horas após o tratamento (para observar o reparo). Ao final de cada exposição (4 h e 24 h), amostras de sangue foram coletadas da cauda animal e 40 μL dessa amostra foram transferidos para microtubos contendo 120 mL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C . A mistura foi homogeneizada e transferida para lâminas pré-revestidas com 5% de agarose. As lâminas foram então cobertas com lamínulas e colocadas a 3°C por 20 min (DA SILVA; DOS SANTOS; SATIE TAKAHASHI, 2010). As lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise, [com 89 mL de uma solução concentrada (2,5 M de Na CL, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, pH =10,0), 89 mL de água destilada e 1% de laurilsarcosinato], 1 mL de Triton X-100 e 10 mL de DMSO durante 1h a 3°C no escuro.

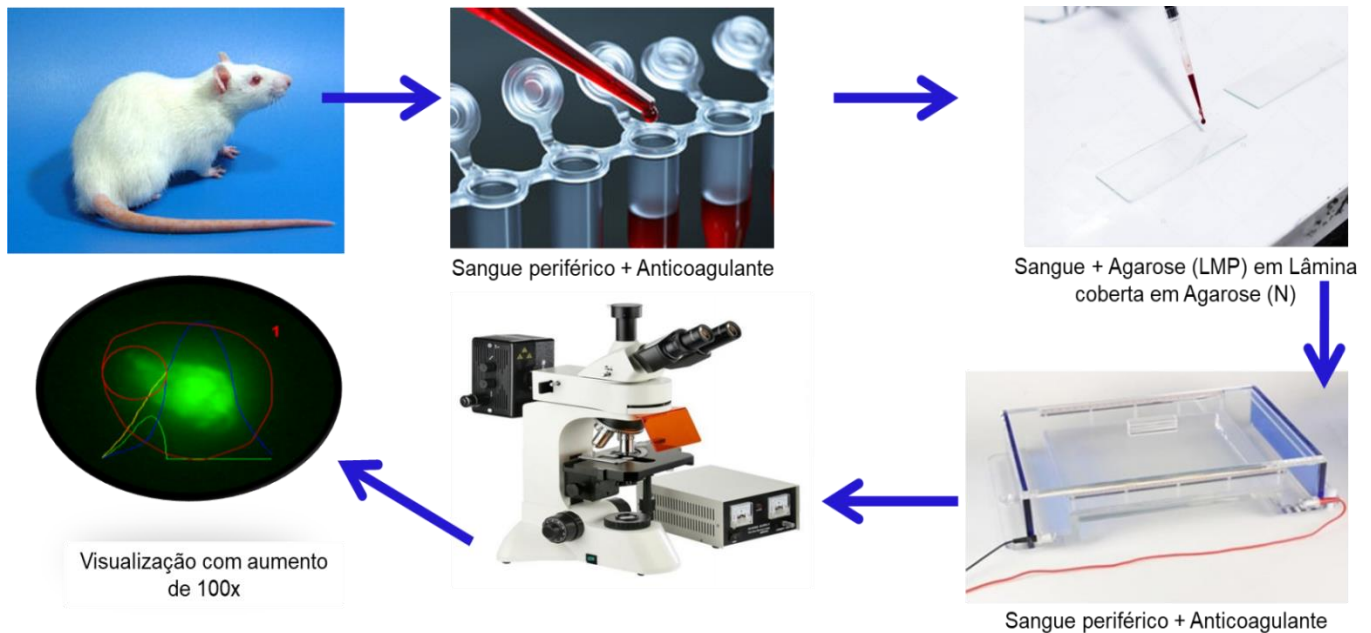
Para desnaturação do DNA, foram colocadas numa cuba de eletroforese, contendo uma solução tampão (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, preparada a partir de uma solução estoque de NaOH 10 N e EDTA 200 pH = 10,0) pH > 13 a 3°C por 20 min no escuro. A eletroforese foi realizada a 25 V e 300 mA. As lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris-HCL, pH = 7,5, durante 3 ciclos de 5 min cada.

Após todo esse processo, as lâminas foram então lavadas com água destilada e secas ao ar, lavando-as com Gel Red (Diluição 2,0: 10.000 μL por 10 min). Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por luxação cervical. Todas as lâminas foram analisadas por microscopia de imunofluorescência (aumento de $40 \times$) Utilizar-se-á um filtro de 420- 490 nm e um filtro de barreira de 520 nm.

Foram obtidas, imagens pelo Opton Sistema (câmera digital CCD 5.0 mega pixel para imunofluorescência). Assim, foi avaliado o dano ao DNA pelo percentual de mensuração do DNA na cauda (% DNA-medida da proporção do DNA total presente na cauda) e o tempo da cauda (Comprimento da cauda-TM vezes a porcentagem de DNA na cauda) (KUMARAVEL; VILHAR; FAUX; JHA, 2009). Esses parâmetros foram calculados em 100 nucleotídeos /

amostra (duas lâminas por indivíduo). Para isso, utilizamos o software OpenComet (GYORI; VENKATACHALAM; THIAGARAJAN; HSU *et al.*, 2014)

Figura 11- Ilustração do procedimento experimental, teste cometa.



Fonte: Autoria própria

3.4 Testes Micronúcleo

O teste foi realizado com 40 animais, sendo 20 ratos Wistar para exposição aguda e 20 para exposição crônica teste foi realizado com quatro grupos com cinco animais ($n = 5$) em cada grupo.

Tabela 5- Dados das formulações utilizadas para teste *in vivo*

| Nomeclatura | Grupos | N ratos | | Exposição aguda | Exposição crônica | Total animais |
|---------------------------|-------------------|-----------|--|---------------------------|---------------------------|---------------|
| | | por grupo | | | | |
| CP | Controle Positivo | 5 | | Ciclofosfamida | Ciclofosfamida | 10 |
| CN | Controle Negativo | 5 | | Água destilada | Água destilada | 10 |
| PBAT (12%)/ PPy (1%) | GII | 5 | | PBAT (12%)/ PPy (1%) | PBAT (12%)/ PPy (1%) | 10 |
| PBAT (12%) PPy (1%)/ nHAp | GI | 5 | | PBAT (12%) PPy (1%)/ nHAp | PBAT (12%) PPy (1%)/ nHAp | 10 |

Fonte: Autoria própria

Os *scaffolds* foram implantados intraperitonealmente do animal por laparotomia, onde o tamanho da amostra foi de $1 \times 1 \text{ cm}^2$. O teste experimental conteve quatro (4) grupos conforme tabela 5; que receberam esses scaffolds introduzidos no peritônio através de uma laparotomia e foram totalmente anestesiados, com ketamina (1,0ml/kg) e xilazina (1,1ml/kg) intramuscular.

O grupo controle positivo, que recebeu ciclofosfamida (conhecida por ser genotóxico (Casorelli, 2012 #792) e induzir danos no DNA das células da medula óssea) na dose de 50mg/Kg por via intraperitoneal. O controle negativo, nos qual foi utilizado água destilada. Estes foram eutanasiados em 48(exposição aguda) e 72 horas (exposição crônica) após o início do tratamento.

O trabalho seguiu padrões da OECD-474, 2013, onde as amostras para análise inicial não podem ser antes de tratamento, e não se estendem além de 48 h após o tratamento com intervalo (s) entre as amostras, caso utilizado o tempo de amostragem anterior 24 h após o tratamento deve ser justificado e deve haver intervalo adequados após a primeira amostra, mas não se estendendo além de 72 h (OECD, 2014b).

Para o preparo da lâminas:

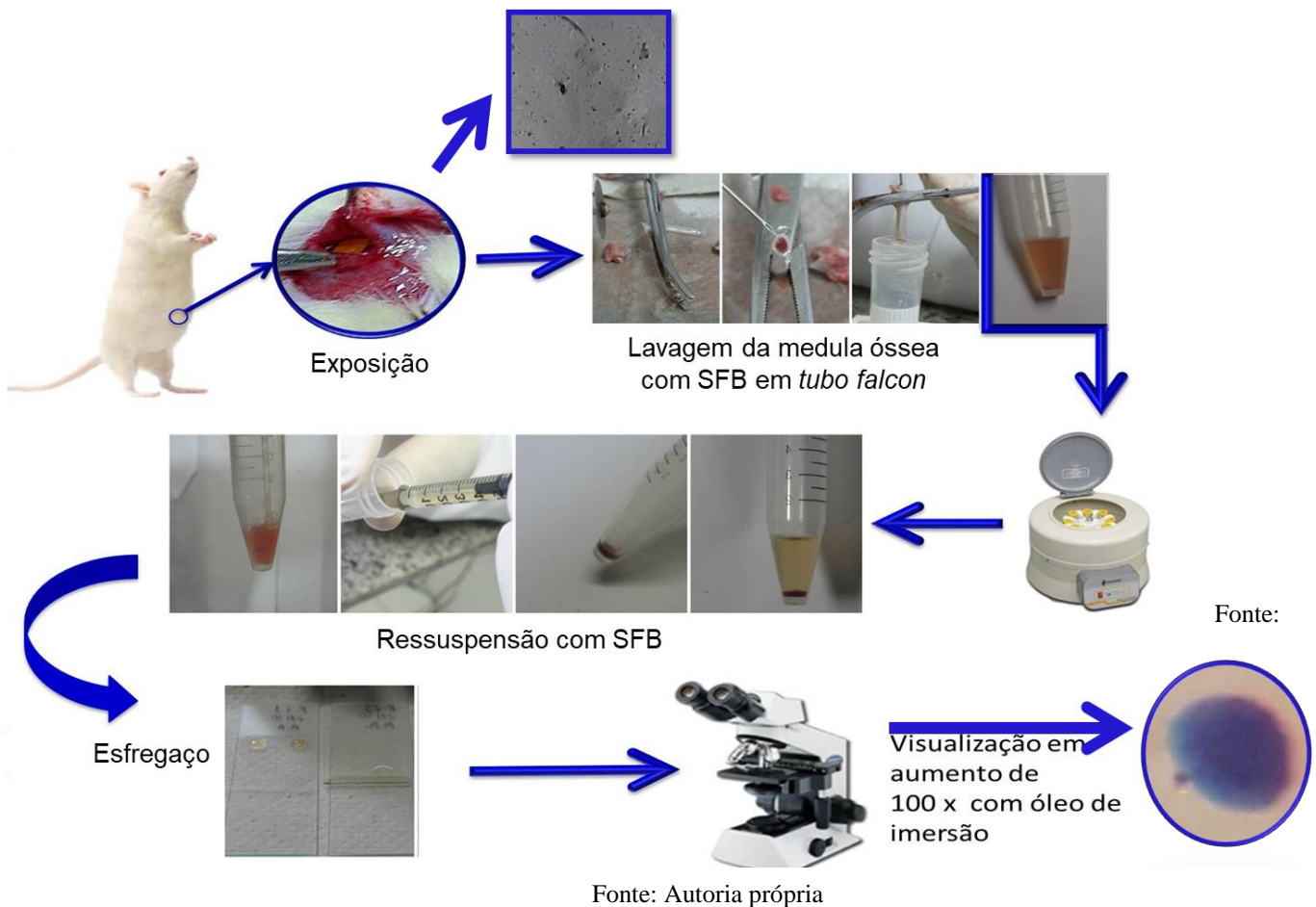
As células da medula óssea foram coletadas imediatamente após a eutanásia, realizado por deslocamento cervical dos animais. Uma seringa de 1 mL foi usada para a coleta. Esta seringa foi preenchida com soro fetal bovino (SFB).

Introduziu-se a agulha na abertura de uma extremidade do fêmur e derramar-se-á o soro fetal pelo canal, empurrando o componente medular em direção à outra extremidade, onde estará um tubo Falcon, previamente marcado com o código do animal. Ressuspendeu-se o material da medula em soro fetal bovino, até atingir uma homogeneidade.

A suspensão foi centrifugada por 5 min a 1000 rpm, descartando o sobrenadante ao final do procedimento pipeta Pasteur. A amostra foi preenchida com 0,5 mL de soro fetal bovino e suspensa até a homogeneização. Os esfregaços foram preparados pingando 2 gotas da suspensão na extremidade fosca de uma lâmina (previamente marcada com o código do animal) e, com o auxílio de outra lâmina inclinada em um ângulo de 45 graus, foi realizado o esfregaço Após a confecção do esfregaço secou-se as lâminas ao ar livre. Foram confeccionadas 2 lâminas por animal. A coloração foi realizada 24h após a confecção das lâminas em Giemsa por 3 minutos.. A análise da lâmina foi realizada em campo cego com aumento de $100 \times$ (objetivo de imersão) em um curto espaço de tempo pelo mesmo

observador. Determinou-se a frequência de micronúcleos em 2.000 células PCEs por animal e 10.000 PCE / grupo . Todo o protocolo é baseado em publicações (HAYASHI; MORITA; KODAMA; SOFUNI *et al.*, 1990) (HAYASHI; TICE; MACGREGOR; ANDERSON *et al.*, 1994) (HAMADA; OHYAMA; TAKASHIMA; SHIMADA *et al.*, 2015) (BENIGNI; BOSSA; TCHEREMENSKAIA; BATTISTELLI *et al.*, 2012) (KANG; KWON; LEE; SEO, 2013).

Figura 12: Ilustração do experimento, teste MN em ratos wistar, para exposição de *scaffolds*



3.5 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada de acordo com (DE PAULA; BASSOUS; AFEWERKI; HARB *et al.*, 2018) e ISO 20776-1: 2019. As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram inoculadas em em Ágar de Soja Tríptico - TSA por meio de isolamento e incubadas a 37°C por 24 horas. As bactérias foram ressuspensas em PBS 1x até $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ (Tubo 0,5 de MacFarland Stands) e diluídas em TSA até $1,5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹. Em seguida, os *scaffolds* (10 mm x 10 mm x 0,5 mm) em triplicata previamente

esterilizadas foram colocadas em placas de cultura de 24 poços e inoculadas individualmente com 1000 μL de solução bacteriana, e incubadas por 24 h, a 37°C. Após esse processo, as amostras foram enxaguadas lentamente com PBS duas vezes, para remover quaisquer bactérias não aderentes. Logo em seguida os suportes foram colocados em frascos individuais com PBS (1000 μL) e em seguida colocados em vórtex para remover as bactérias fortemente aderentes durante 15 seg. Essas suspensões de solução bacteriana foram diluídas em série (10X; 100X; 1000X) e plaqueadas em placas de TSA como alíquotas de 10 μL , em triplicata e incubadas durante a noite (~ 24 h) a 37 °C. Para finalizar o teste, as colônias foram contadas para calcular as unidades formadoras de colônia (CFUs). Os dados foram normalizados por dados brutos de PBAT para destacar a atividade bactericida dos arcabouços produzidos sem o uso de antibióticos.

4 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando *One-Way* ANOVA o teste de Tukey. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos como médias, ou seja, desvio padrão das duas experiências independentes. O resultado foi considerado positivo quando houver um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

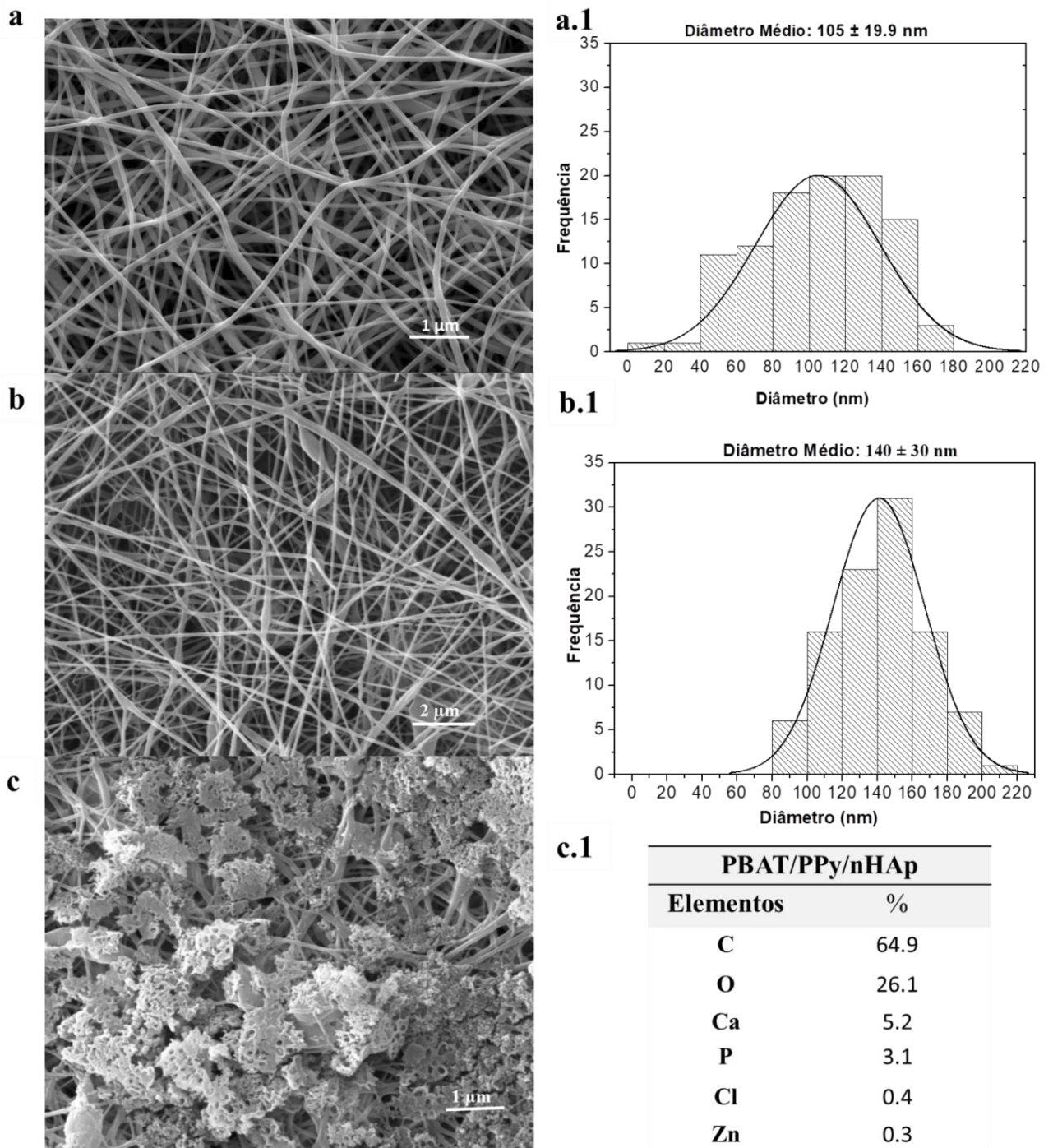
5 Resultados e Discussões

As fibras ultrafinas produzidas a base PBAT/PPy/nHAp, foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios-X (EDS), Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) e Difractometria de Raios-X (DRX), e testes *in vivo* para análise de possíveis efeitos genotoxicidade (cometa e micronúcleo), bem como avaliamos atividade antibacteriana do nanomaterial.

A **Fig. 13a e 13b** mostram as micrografias de estruturas fibrosas ultrafinas do PBAT, PBAT/PPy interconectadas. Considerando-se o diâmetro médio dos *scaffolds*, o PBAT/PPy (140 ± 30 nm), obtiveram diâmetros maiores que os *scaffold* de PBAT ($105 \pm 19,9$), e ambos apresentaram-se como fibras ultrafinas. Torna-se importante mensurá-los, pois poderá influenciar na interação do biomaterial com as células que serão expostas (WANG; ZHONG; LIM; NIE, 2015).

Figura 13 - Imagens de MEV de *scaffolds* de PBAT (a) com respectivo diâmetro médio das fibras ultrafinas calculadas pelo programa ImageJ de $105 \pm 19,9$ (a.1) PBAT/PPy (b) com seu diâmetro médio de 140 ± 30 nm (b.1) PBAT/PPy após eletrodeposição de nHAp (c) EDS dos

scaffold de PBAT/PPy/nHAp demonstrando O, P e Ca (c.1) apresentando uma relação Ca / P da HAp estequiométrica de 1,67.



Fonte: Autoria própria

Um dos aspectos fundamentais no desenvolvimento de um *scaffold* é que a estrutura 3D desenvolvida mimetize a MEC presente no tecido ósseo. A MEC é composta por uma estrutura proteica conhecida por colágeno, que se organiza em fibras ultrafinas com diâmetro de 50 a 500 nm e controla o comportamento celular com sua arquitetura. No osso, o bloco de

construção básico da MEC é o colágeno mineralizado/fibrilas. E dessa forma, compreendese a importância das estruturas fibrilares para a produção de *scaffolds* utilizados na engenharia de tecidos ósseos (QUE; CHAN; JABAIAH; LATHROP *et al.*, 2015).

Dadas as características da nHAp citadas neste trabalho, a sua presença no nanocompósito desenvolvido, deverá aumentar a biocompatibilidade e bioatividade desse novo biomaterial, levando a uma maior capacidade de integração os *scaffold* com os tecidos, promovendo e apoiando o crescimento ósseo (RODRIGUES; DE MV ELIAS; VIANA; DE HOLLANDA *et al.*, 2020; SZCZES; HOLYSZ; CHIBOWSKI, 2017).

Segundo Picciani (PICCIANI; MEDEIROS; PAN; WOOD *et al.*, 2010) ao adicionar um polímero condutor, altera as propriedades da solução, e por conseguinte as fibras formadas, diminuindo a formação de beads, e deixando as fibras mais uniformes. Observa-se que os *scaffold* de PBAT e PBAT/PPy apresentam poucas quantidade de beads, como mostra a **Fig. 13 (a)** e **(b)**. Na **Fig. 13 (c)** mostra nHAp envolvidas de forma homogênea ao longo dos *scaffolds* de PBAT/PPy; constatando assim, que as condições de eletrofiação utilizadas neste trabalho foram ideias para formação deste biomaterial.

Ainda na Figura 13 (c) demonstra a os *scaffolds* de PBAT/PPY após eletrodeposição de nHAp, analisadas pelo acessório de energia dispersiva de raios-X acoplada (EDS). Após a coleta dos espectros de EDS foi calculada a razão atômica de Ca/P, onde identificou valores de $\pm 1,67$. Estes valores encontrados são idênticos à relação Ca/P da HAp estequiométrica de 1,67 presente no osso (GRINET; ZANIN; CAMPOS GRANATO; PORCIONATTO *et al.*, 2014).

O EDS na **Figura 13 (c.1)**, comprovou a eficiência da eletrodeposição, pode-se observar a presença dos elementos Ca(cálcio), P(fosforo), O(oxigênio). Desse modo, observa-se que as nanopartículas de nHAp foram uniformemente distribuídas na matriz polimérica, como mostrado nas micrografias.

No quadro 3, mostra o peso das amostras analisadas em gramas, PBAT/PPy e PBAT/PPy/nHap. A amostra sem nHap, variou de 0,0028 à 0,0035g, enquanto a amostra com nHap variou de 0,0038 à 0,0048g.

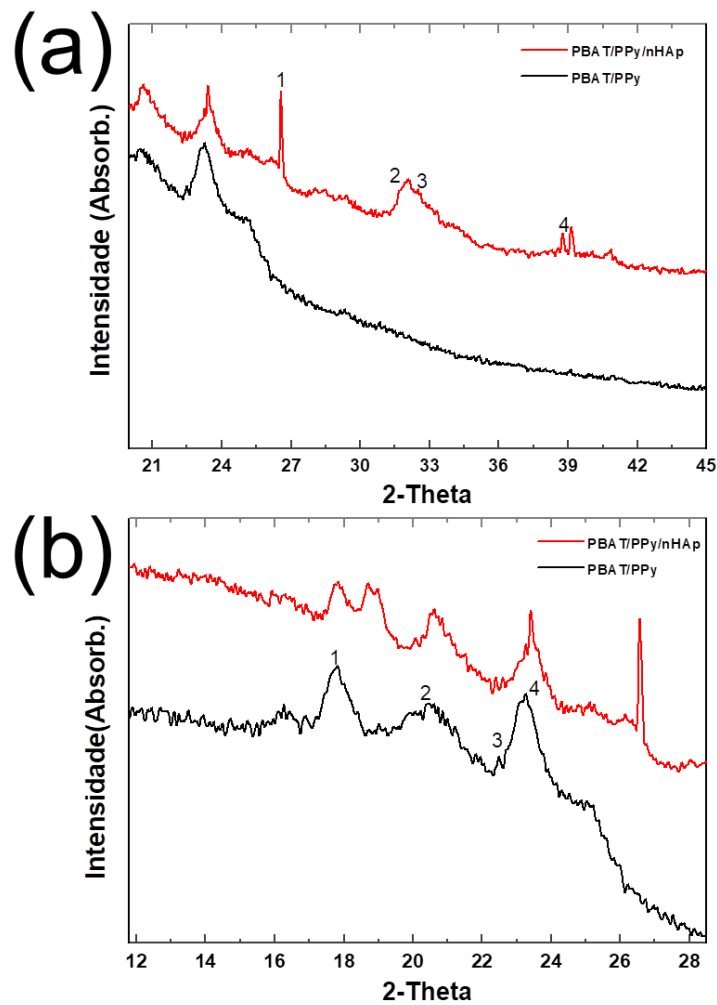
Quadro 3 – Peso das amostras

| | PBAT/PPy | PBAT/PPy/nHAp |
|---------|---------------------|---------------------|
| Amostra | 0,0028 g - 0,0035 g | 0,0038 g - 0,0048 g |

Fonte: Autor

Fig. 14 mostra XRD dos *scaffolds* XRD dos *scaffolds* fibrosos ultrafinos de PBAT / PPy e PBAT / PPy / nHAp nanofibrosos. A nHAp nos *scaffolds* ultrafinos de PBAT/PPy é próxima com o aparecimento dos picos de 1 a 4 característicos da nHAp da literatura, com os ângulos $2\theta = 26,5^\circ$, $31,9^\circ$, $32,4^\circ$, $38,7^\circ$ com planos (002), (211), (300), (220) respectivamente, que estão de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS 01-072-1243. Os pequenos deslocamentos são, devido a utilização da nHAp neste trabalho, ser cristalizada. Assim, que houve deposição de nHAp eficaz, e que o PPy não prejudicou na formação das mesmas. Desse modo, os picos característicos do PBAT e do PPy concordam com os resultados relatados. O pico de maior intensidade encontram-se entre 26 e 38 graus, que são também os da HAp padrão, sendo representado pelo plano de difração (002). Sendo estes utilizados para a análise de largura a meia altura (FWHM) e conseqüentemente, tamanho de cristalito.

Fig. 14 - Demonstra a difratograma de raio X dos *scaffolds* de PBAT/PPy(a) e PBAT/PBAT/PPy/nHAp, com zoom na região de $12-30\text{ cm}^{-1}$ (b), mostrando poliéster PBAT



Fonte: Autoria própria

As intensidades dos picos de XRD de PBAT/PPy aumentaram com a adição de nHAp, como mostrado na Fig. 14.

De acordo com a literatura o PPy é amorfo (CAMPOS; FAEZ; REZENDE, 2014), portanto imperceptível na **Fig. 14**. A presença do poliéster PBAT é confirmada pela presença dos picos $17,7^\circ$, 20° , $22,5^\circ$ e $23,3^\circ$. Todos os picos encontrados foram característicos da fase cristalina dos respectivos polímeros, conforme reportado na literatura (SANTOS; MULLER; GROSSMANN; MALI *et al.*, 2014).

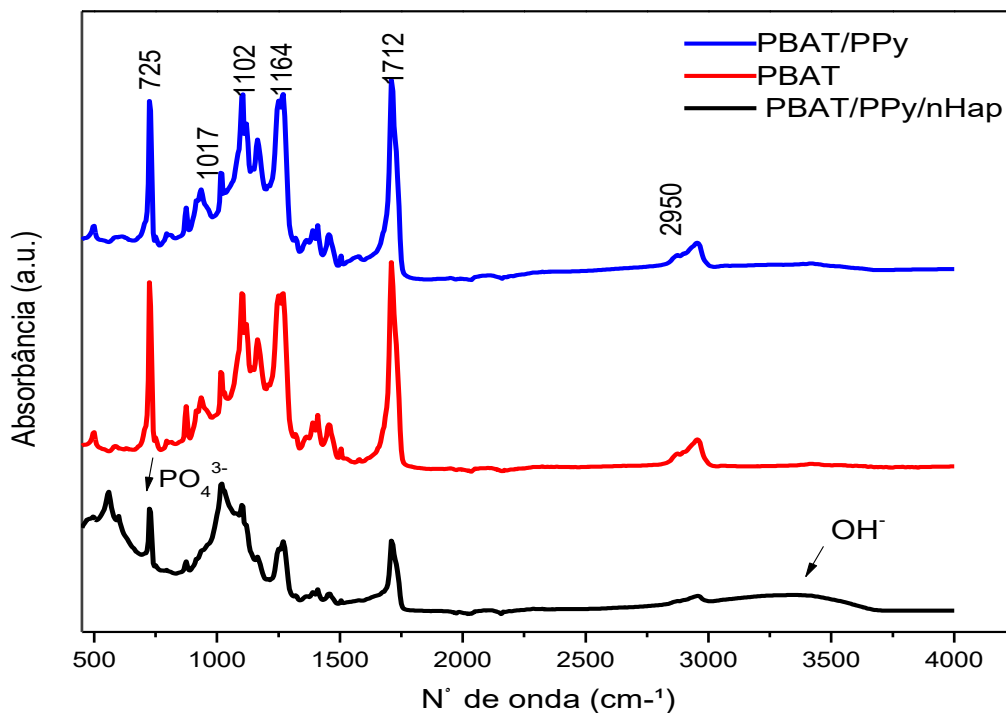
O tamanho de cristalito, que foi calculado pela equação de Scherrer, evidenciaram uma estrutura nanométrica no scaffold com nHAp aqui analisada (PBAT/PPy/nHAp). No quadro 3 ilustra o tamanho do cristalito de acordo com plano (002) referente ao pico 2θ de $26,5$ graus da amostra PBAT/PPy depositada nHAp que foi de $72,67$ nm. Na tabela observam-se um aumento do cristalito da nHAp depositada, em relação a nHAp padrão que é 67 nm.

Quadro 3: Tamanho do cristalito usando a difração plana (002) para a característica da estrutura de nHAp depositada (PBAT/PPy/nHAp) e nHAp padronizada 01-072-1243.

| AMOSTRA | 2 θ PICO | (2 θ) FWHM | Tamanho do Cristalito XRD (nm) |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------------------------------|
| PBAT/PPy/nHAp | 26,57 | 0,11098594 | 72,6773 |
| nHAp | 25,86 | 0,204 | 67 |

Na **Figura 15** os espectros de FTIR de PBAT e PBAT/PPy são mostrados, pode-se visualizar a vibração de alongamento assimétrica de grupos CH₂ em 2950 cm⁻¹. Outro estiramento de vibração de carbonila (C = O) esta presente, característico do poliéster de PBAT, a 1712 cm⁻¹; vibração de alongamento simétrico de C-O a 1264 cm⁻¹ e 1102 cm⁻¹; flexão de Plano CH do anel de fenileno à 1017 cm⁻¹, e um pico acentuado de deformação de (-CH₂-) em 725 cm⁻¹, do composto aromático (BHEEMANENI; SARAVANA; KANDASWAMY, 2018; CAI; LV; FENG, 2013).

Figura 15 - Espectros de ATR-FTIR dos scaffold de PBAT, PBAT / PPy e PBAT / PPy com nHAp.



Fonte: Autoria própria

A eletrodeposição de nHAp nos *scaffold* de PBAT / PPy pode ser confirmado pelo ATR-FTIR. A banda vibracional na região de 3000 a 3750 pode ser atribuída a OH- pico de absorção, enquanto pico característico a absorbância do PO_4^{3-} pôde ser observado na banda de 600-450 cm^{-1} (WANG; SONG; LOU, 2010).

Observa-se que a maioria das bandas vibracionais dos *scaffolds* do PBAT/PPy/nHAp estão menos intensas, do que as de PBAT/PPy. Demonstrando assim, a interação que ocorreu com a eletrodeposição de nHAp sobre a superfície dos *scaffolds*, refletindo no comportamento das bandas, fazendo com que diminua a intensidade e a vibração (CHAUDHURI; MONDAL; RAY; SARKAR, 2016).

Testes in vivo

A aplicação de *scaffolds* de materiais poliméricos biocompatíveis visando a substituição de tecidos ou órgãos humanos está aumentando nos campos médico, odontológico e de engenharia de tecidos. Desse modo, torna necessário entender as interações entre biomateriais e tecidos biológicos para posterior avaliação de seu uso clínico (PAGANO; CHIERUZZI; BALLONI; LOMBARDO *et al.*, 2019). Os *scaffolds* deste estudo foram desenvolvidos com o objetivo de estimular a regeneração do tecido ósseo. Assim, foi avaliado potencial genotóxico através do teste MN e cometa.

Como os nanomateriais se tornam bastante reativos, conforme foi visto no decorrer deste trabalho, devido ao aumento relativo na área superficial, isso deixa números maiores de moléculas para reagir em proteínas e/ou subseqüentemente células. A produção desses materiais aumentou consideravelmente nas últimas décadas e hoje as pessoas estão expostas a uma quantidade desconhecida de uma ampla variedade de exposições. As mesmas características que os tornam interessantes para aplicações em vários setores também podem levar à toxicidade.

Existe a preocupação dos NMs acarretarem possíveis efeitos genotóxicos, que venha prejudicar a saúde humana. Ainda como foi visto, os NMs interagem com as células e com seus componentes celulares, e alguns ainda persistem nas células se não forem bioabsorvíveis. É importante notar que esses NMs podem atingir o núcleo durante a mitose e interferir nos microtúbulos, causando genotoxicidade, como efeitos clastogênicos. Eles ainda podem alterar a função mitocondrial, causando a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e induzindo a oxidação do DNA. A inflamação produzida pelos NMs nos tecidos também pode

afetar o DNA (AZQUETA; DUSINSKA, 2015). Desta forma, este estudo mais aprofundado sobre genotoxicidade é relevante e deve ser concluído após a produção de qualquer NMs.

Dadas as características mencionadas, a presença de nHAp tem como característica aumentar a biocompatibilidade e bioatividade de novos biomateriais, levando a uma maior capacidade de integração dos NMs nos tecidos, viabilizando o crescimento ósseo. A utilização de diversos tipos de biomateriais torna-se importante para manter características essenciais promovendo assim a regeneração óssea, como melhoria da biocompatibilidade, caráter mecânico, estimulação elétrica com células ósseas e outros benefícios que podem ser obtidos quando utilizados na prática clínica.

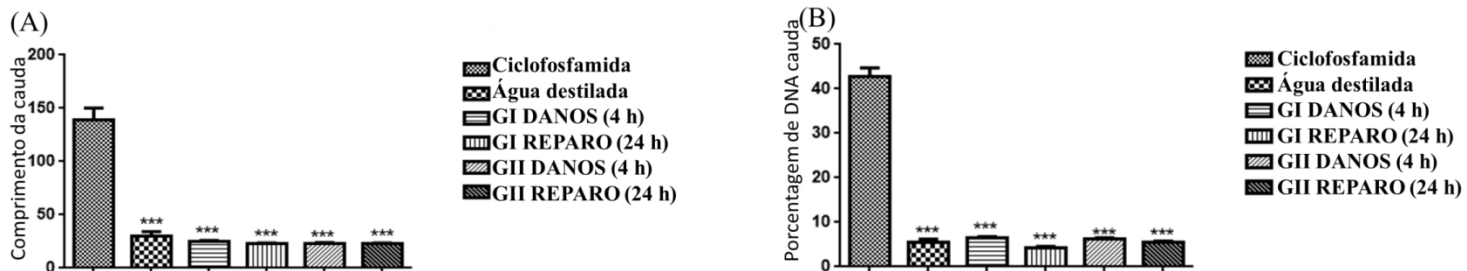
A análise estatística dos dados para avaliação dos efeitos genotóxicos foi realizada por meio do programa Gra Prism 6.0; para todos os testes foi considerado nível de significância $\alpha = 0,05$. Os resultados foram expressos com média e desvio padrão para os testes do cometa e do micronúcleo.

4.2 Teste Cometa

O ensaio do cometa é muito útil e largamente empregado para avaliação de danos e reparos de DNA em células individuais. Seu princípio básico é o da lise de membranas celulares, seguida pela indução da migração eletroforética do DNA liberado em matriz de agarose. Quando vista ao microscópio, a célula migrada adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça, a região nuclear, e cauda, que contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo. A análise dos cometas baseia-se no grau de fragmentação do DNA e sua migração pela microeletroforese (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009).

Para a análise do teste do cometa, foram lidos 100 nucleotídeos por animal, perfazendo um total de 500 nucleotídeos por grupo. Tabela 6 ilustra o potencial tóxico dos *scaffolds* PBAT (12%) PPy (1%) / nHAp e PBAT (1 PPy (1%) (GI e GII Danos). Observe que houve uma diferença significativa a % de DNA na cauda dos *scaffolds* fibras ultrafinas produzidos ($6,481 \pm 2,178$ e $6,278 \pm 1,795$), em comparação com o CP ($42,80 \pm 13,91$) e não houve aumento significativo em relação ao CN ($5,519 \pm 2,178$) nas primeiras 4 h e nas 24 h os grupos se comportaram de forma semelhante. Este fato também foi observado quando analisamos o comprimento da cauda, sugerindo não houve efeito genotóxico

Figura 16: Registra o comprimento da cauda após análise do open comet dos animais após exposição (A). Registro da porcentagem de DNA da cauda após análise do *open comet* dos animais após exposição (B).



Legenda: CN= controle negativo; CP = controle positivo (ciclofosfamida 50 mg / kg). Grupo de exposição: GI = PBAT / PPy / nHAp GII = PBAT / PPy. Resultados expressos em significância e desvio padrão; "****" indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao CP. Assim, os resultados apresentados em Figura 15 mostraram que a membrana não induziu danos no DNA e genotoxicidade das células.

Tabela 6: Os danos no DNA encontrados por grupo após a exposição ao PBAT / PPy e PBAT / PPy com nHAp relatados como o desvio médio e padrão da % cauda de DNA e comprimento da cauda.

| Parâmetros | CP | CN | DANOS GI 4h | REPARO GI 24h | DANO GII 4h | REPARO GII 24h |
|------------------------------|---------------|---------------|----------------|------------------|----------------|-------------------|
| Média ± desvio padrão | | | | | | |
| % DNA cauda | 42 ± 13.91 | 5.519 ± 5.230 | 6.481 ± 2.178 | 4.296 ± 2.186 | 6.278 ± 1.795 | 5.481 ± 2.081 |
| Comprimento da cauda | 139.1 ± 79.21 | 30.49 ± 28.11 | 24.88 ± 6.339 | 22.9 ± 4.801 | 22.92 ± 6.356 | 22.75 ± 6.486 |

Fonte: Autoria própria

O DNA é uma molécula orgânica responsável pela informação genética das células. Para que essas informações sejam transmitidas com sucesso em cada geração, a integridade do DNA deve ser mantida. No entanto, apesar de sua considerável estabilidade química, estudos sobre seu metabolismo mostraram que as propriedades dinâmicas dessa molécula (FRIEDBERG, 2003) e exposições constantes a vários agentes podem produzir uma variedade de lesões em sua estrutura. Essas lesões podem afetar mecanismos celulares essenciais, como a replicação do DNA e sua transcrição para o RNA, gerando danos ao DNA que podem produzir efeitos genotóxicos (mutagênese) ou citotóxicos (morte celular) nas

células, dependendo da natureza dessas lesões e, portanto, da instabilidade genômica e até o início do câncer (DE BOER; HOEIJMAKERS, 2000).

É importante mencionar que, durante o metabolismo normal do DNA, também pode haver alterações espontâneas em sua estrutura que comprometem seu funcionamento ideal, como incompatibilidade de bases, perda de grupos amino presentes nas bases (citosina, adenina e guanina), e assim por diante. Essa perda ocorre espontaneamente em reações dependentes do pH e da temperatura e, se forem alteradas durante a replicação, podem gerar mutações definitivas (HOEIJMAKERS, 2001). Embora as mutações sejam essenciais quando se pensa em processos evolutivos, elas são antes de tudo prejudiciais aos sistemas biológicos (FRIEDBERG, 2003).

Ainda o reparo do DNA é necessário para manter a integridade e a estabilidade do DNA genômico para a sobrevivência celular normal, caso contrário, a frequência de morte celular, mutações genéticas ou evolução para células tumorais aumentaria. Assim, avaliar a situação do DNA e sua resposta a danos e reparos é uma estratégia promissora para prevenir / prever o tratamento para a regeneração óssea e garantir que ela não represente um risco para a prática clínica (PORTICH; DOS SANTOS; KERSTING; JORGE *et al.*, 2017).

Em estudos realizados, com ensaio cometa para avaliar a genotoxicidade de suas cerâmicas auto-renovadas em linfócitos periféricos humanos primários, também não encontraram danos no DNA induzidos por essas cerâmicas, indicando que o biomaterial é seguro para o ensaio clínico (CHEN; BAI; HUANG; SUO *et al.*, 2012; HUA, N.; ZHU, H.; ZHUANG, J.; CHEN, L., 2014).

O ensaio Cometa é um método rápido e barato para medir quebras de fita simples de DNA. Também tem uma vantagem sobre os outros métodos de detecção de danos no DNA, como troca de cromátides irmãs, eluição alcalina e teste de micronúcleos, devido à sua alta sensibilidade (LEE; STEINERT, 2003) Portanto, os resultados apresentados na Figura 14 mostraram que a membrana não induziu danos no DNA e genotoxicidade de células animais.

Outro estudo que foi conduzido por ensaio de cometa para avaliar a genotoxicidade de cerâmicas auto-renováveis em linfócitos humanos cultivados em três grupos de diferentes proporções de $\text{LaPO}_4 / \text{Y}_2\text{O}_3$ difásica por seis dias, os pesquisadores não mostraram nenhuma diferença entre as cerâmicas testadas e um controle negativo ($p > 0,05$), indicando que o biomaterial era seguro para ensaios clínicos (HUA, NAN; ZHU, HUIFANG; ZHUANG, JING; CHEN, LIPING, 2014; SHU-JIAN; YAO; XUN-BIN; JIN-PING *et al.*, 2012).

Em estudo de avaliação comparada entre as duas técnicas de MN e Ensaio do Cometa para detectar efeitos genotóxicos da radiação de Raios-X, (HE; CHEN; JIN; JIN, 2000)

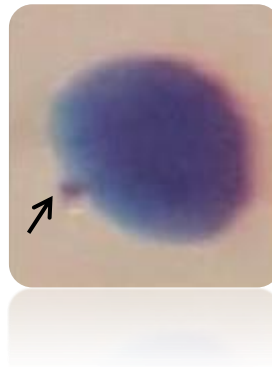
encontraram também maior sensibilidade para avaliação de dano no DNA para o Ensaio do Cometa que para o Teste MN. Isto ressalta a importância de manter uma combinação de testes para melhor discernimento da mutagenicidade dos agentes e avaliação de baixas doses de efeitos.

4.1 Ensaio Micronúcleo

Em síntese, micronúcleo são pequenas estruturas que possuem cromatina justaposta ao núcleo principal ou filhas binucleadas após a conclusão da mitose. Estes podem surgir em respostas a resultados de processos clastogênicos, aneuplodicos ou segregações cromossômicas anormais (ALBAS; SOUZA; NAI; PARIZI, 2014).

A avaliação da frequência de micronúcleos *in vivo* é recomendada pelas agências internacionais e instituições governamentais para ser conduzida como parte da bateria de testes para avaliação da segurança de um produto, é considerada valiosa ferramenta na avaliação da genotoxicidade. A análise dos micronúcleos é realizada em eritrócitos policromáticos (PCE, eritrócitos jovens, que ainda contêm ribossomos) de medula óssea de camundongos ou ratos. O Micronúcleo é uma massa de cromatina originada de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, que se perderam durante a divisão celular, devido aos eventos clastogênicos (quebra de cromossomos) ou aneugênicos (que induzem a aneuploidia ou a segregação cromossômica anormal). Este método assim, detectar a quebra de cromossomos e também a segregação cromossômica anormal (IARMARCOVAI; BONASSI; BOTTA; BAAN *et al.*, 2008; KRISHNA; HAYASHI, 2000; SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001; SPEIT; SCHMID; FROHLER-KELLER; LANG *et al.*, 2007).

Figura 17- Mostra a presença do micronúcleo (MN) na medula óssea de ratos Wista (*Rattus norvegicus*)



(Fonte: Autoria própria)

Figura 17: Ilustração da presença de micronúcleo Imagem obtida por microscopia óptica na objetiva de 100x mostrando a presença de micronúcleo na seta.

Quando um tecido é exposto aos carcinogêneos, antes que qualquer sintoma clínico se manifeste, há um aumento da frequência de MN. Desse modo, o teste de MN é um biomarcador ocupacional em células expostas a agentes químicos genotóxicos, além de possível indicador de sinais carcinogênicos precoces (SINGARAJU; SINGARAJU; PARWANI; WANJARI, 2012)

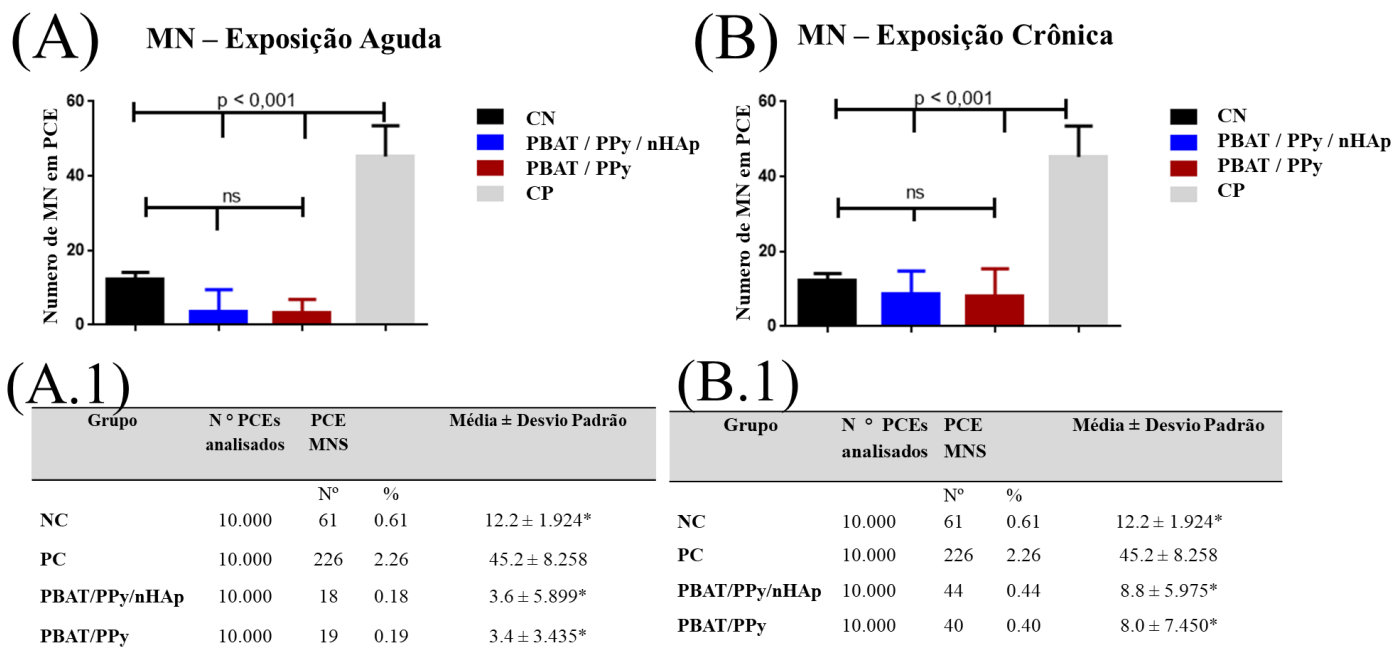
Nota-se que muitos trabalhos (KOUR; ALI; GANAIE; TABASSUM, 2017) (LIN; HAO; LONG; LAI *et al.*, 2017) utilizam-se da ciclofosfamida como CP, pois este é um medicamento quimioterápico pertencem a um grupo de agentes alquilantes e seu principal modo de ação é baseado em sua interação com o DNA, resultando em divisão celular reprimida ou seja, é genotóxico (BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012)

Observa-se que muitos trabalhos (KOUR; ALI; GANAIE; TABASSUM, 2017) utilizam a ciclofosfamida como controle positivo (PC), uma vez que é uma droga quimioterápica pertencente a um grupo de agentes alquilantes e seu principal modo de ação é baseado na interação com o DNA, resultando em células reprimidas divisão, isto é, é genotóxico (BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012).

O teste MN foi avaliado comparando a frequência dos grupos encontrados para os diferentes tempos de exposição aguda e é relatado em Figura 18A, e exposição crônica em Figura 18B. Os grupos comparados foram: PBAT / PPy e PBAT / PPy / nHAp, controle negativo (CN) e controle positivo (CP), com suas respectivas médias e os desvios padrão das frequências MNs para os diferentes tempos de exposição(Fig. 18 A.1 e B.1). Como

observado, na Figura 18, os *scaffolds* com e sem nHAp não mostraram danos genotóxicos agudos ou crônicos quando analisadas *in vivo*.

Figura 18: Média de micronúcleos encontrados em 2.000 eritrócitos policromáticos após exposição aguda (A) Média de micronúcleos encontrados em 2.000 eritrócitos policromáticos após exposição crônica (B) Tabela com frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCE MNs) em medula óssea de *Rattus wistar* expostos a *scaffold*, agudo (A.1) e crônico (B.1).



Legenda: CN = controle negativo; CP = controle positivo (ciclofosfamida 50 mg/kg); PCE = eritrócitos policromáticos e "*" indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao PC

A Figura 5 A.1 mostra que os *scaffolds* PBAT (12%) PPy (1%) / nHAp (laparotomia + *scaffold*) foi $3,6 \pm 5,899$, o PBA (12%) / PPy (1%) foi $3,4 \pm 3,435$, o grupo CP (ciclofosfamida) foi de $45,2 \pm 8,258$, e o grupo CN (laparotomia) foi $12,2 \pm 1,924$ para avaliação de micronúcleo agudo (48 h).

As médias e desvio padrão de MN foram calculadas a partir das células da medula óssea do ratos (n=5), para cada grupo. As taxas em diferentes tempos 48h (para agudo) e 72h (para crônico) dos 4 grupos.

Na Figura 18, mostra que não houveram aumento significativo da genotoxicidade por meio do teste de MN, quando comparado ao CN (negativo ($p > 0,05$), pois não houve alteração da incidência de PCEs em ratos, ou seja não ultrapassou a taxas de MN do controle positivo (CP), não havendo diferença estatística significativa para o mesmo ($p < 0,001$).

Os resultados achados não indicaram danos significativo após a exposição às membranas de PBAT12% /PPy1% e PBAT12% /PPy1% + nHAp, pelo teste de MN sugerindo que os compósitos a base de poli (butileno adipato-co-tereftalato)/polipirrol com nanohidroxiapatita (PBAT/PPy/nHAp) não são genotóxico, e não induzem efeitos aneugênicos ou clastogênicos no teste do micronúcleo *in vivo*, portanto, promissora e segura para aplicações *in vivo*.

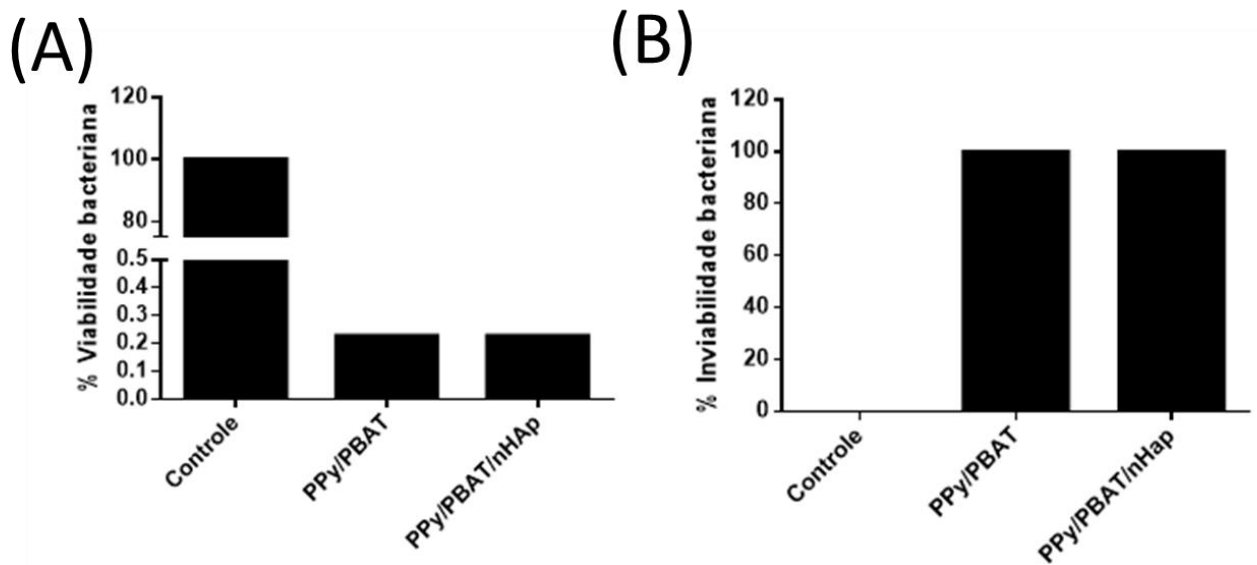
Resultados semelhantes foram encontrados na literatura corroborando com trabalho. Em estudo que fez uso de uma membrana de poliestireno / colágeno / norbixina, também não apresentou efeito genotóxico ao usar os testes cometa e MN na medula óssea de *rattus novergicus* após 72 h (MIRANDA MONTE; FILHO; AMARAL; CABRAL LEÃO FERREIRA *et al.*, 2016).

Testes antibacterianos

O estudo do efeito bactericida foi avaliado utilizando a *P. aeruginosa*, que é proeminente no ambiente hospitalar (DE PAULA; BASSOUS; AFEWERKI; HARB *et al.*, 2018). As bactéria *Pseudomonas aeruginosa* são patógeno oportunista comuns em forma de bastonetes que pode causar infecções nosocomiais, especialmente em pacientes com sistema imunológico debilitado, podendo ser fatais (AKERLEY; RUBIN; NOVICK; AMAYA *et al.*, 2002). Pant e colaboradores (2019) afirma que *Pseudomonas aeruginosa* do tipo gram-negativo, também contribui significativamente para a infecção óssea que segue após implantes (PANT; SUNDARAM; GOUDIE; NGUYEN *et al.*, 2019).

Na Figura 18, mostra que 0,22% das bactérias sobreviveram (Fig 19a) e 99,88% morreram na presença dos nanobiomateriais (Fig 19b). A presença de nHAp não aumentou significativamente as atividades antimicrobianas das fibras em comparação com o grupo sem nHAp. Resultados semelhantes foram encontrados para todos os materiais testados sem diferença estatística ($p > 0,05$) (RODRIGUES; DE MV ELIAS; VIANA; DE HOLLANDA *et al.*, 2020). A concentração de bactérias viáveis foi reduzida em 99,8% (Fig. 19b) para todos os *scaffolds* ultrafinos. Os *scaffolds* tiveram uma conservação aproximada com 100% de bactérias inviáveis.

Figura 19: Teste antimicrobiano evidenciando o percentual em proliferação de (a) bactérias viáveis e (b) bactérias inviáveis.



Fonte: Autoria própria

Desse modo, com os resultados mostrados na Figura 18a, b, as fibras ultrafinas não parecem ser passíveis a colonização. O que poderia ser explicado pelo fato, do Pbat ser um polímero sabidamente hidrofóbico (BRANDELERO; GROSSMANN; YAMASHITA, 2013). Em estudos que utilizaram três técnicas para verificar a hidrofobicidade dos materiais, os resultados mostraram que as tensões superficiais sobre a superfície de LIO de PMMA com suspensões de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* tiveram um comportamento com tendência à hidrofobicidade, quando comparadas ao comportamento dos mesmos microrganismos em relação à superfície de LIO de silicone, as quais tiveram uma propriedade ligeiramente hidrofóbica (VAN LOOSDRECHT; LYKLEMA; NORDE; SCHRAA *et al.*, 1987).

Estudos ainda, têm demonstrado que a hidrofobicidade da superfície bacteriana pode desempenhar um papel muito importante nos fenômenos de adesão celular (ABSOLOM; LAMBERTI; POLICOVA; ZINGG *et al.*, 1983; DEXTER; SULLIVAN; WILLIAMS; WATSON, 1975; FLETCHER; LOEB, 1979; NEU, 1996). Outro trabalho realizado recentemente foi demonstrado que a aderência bacteriana envolve interações complexas entre a cepa bacteriana e a superfície do biomaterial. Bactérias com superfície hidrofóbica teriam menor tendência a colonizarem as superfícies hidrofílicas. No entanto, quando se utilizaram bactérias com superfícies hidrofílicas, os resultados inverteram-se (SCHMIDT; SCHLÖRICKE; FISLAGE; SCHULZE *et al.*, 1998).

Como ficou demonstrado no nosso trabalho, ao depositarmos nHAp na superfície das fibras, não alterou sua propriedade antibacteriana. Desse modo, a presença de nHAp não parece incrementar significativamente atividades antimicrobiana das fibras em comparação com o material não eletrodepositado.

Outro teste realizado pelo grupo, utilizando PBAT, PPy e nHAp que também corroborando para este trabalho e realizado pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram interação entre as amostras e os osteoblastos humanos, 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. A presença do PPy nas fibras ultrafinas induziu um aumento na atividade de ALP aos 21 dias. 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. Esses resultados mostram que esse novo nanobiomaterial apresenta grandes potencialidades.(DE CASTRO, J. G.; RODRIGUES, B. V.; RICCI, R.; COSTA, M. M. *et al.*, 2016).

6 Conclusão

Foi possível produzir *scaffolds* de ultrafinosde PBAT / PPy eletrodepositadas com nHAp, que permitiu a formação de filme homogêneo de nHAp na superfície de suas fibras, demonstrada pelo MEV, identificar ainda a eficácia da produção utliando os dois métodos eltrofiação e eletrodeposição de nHAp. O diâmetro médio no scaffolds de PBAT foi de $105 \pm 19,9$ nm e do PBAT/PPy 140 ± 30 nm. A formação de nHAp nas fibras ultrafinas de PBAT/PPy foi confirmada com o aparecimento de picos característicos do JCPDS 01-072-1243, de acordo com os padrões do DRX. Por FTIR verificou a interação das fibras ultrafinas de PBAT/PPy com nHAp, demonstrando espectros vibracionais característicos de cada material.


Pelo teste cometa, foi avaliado danos (4h) e reparos (24h) de DNA em celulas do sangue de ratos, os resultados não indicaram um aumento de danos nas primeiras 4h de exposição avaliado pela % de DNA na cauda e comprimento da cauda . Este achado permaneceu reduzido mesmo após 24h.

No teste micronucleo pela análise das células medula óssea do fêmur dos ratos, por meio das médias e desvios em diferentes tempos 48h (agudo) e 72h (crônico) mostraram que os scaffolds produzidos não mostraram danos genotóxicos agudos ou crônicos quando analisadas, não induziu danos no DNA. Assim, através do teste de MN e Cometa, constatou-se que os *scaffolds* não são genotóxicos.

Nos testes antimicrobianos os scaffolds apresentaram a eficácia de 99,8% em atividade antibacteriana bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, e apenas 0,22% das bactérias sobreviveram, o scaffold PBAT/PPy/nHAp não aumentou a atividade antimicrobiana em relação ao scaffold PBAT/PPy.

Em conclusão, os scaffolds não tem efeito genotóxico, sendo esse novo biomaterial apresentado, com grande potencial para aplicações em medicina regenerativa e reparação óssea.

**ANEXO A - Termo de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em
Pesquisa**

 GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA 

DECLARAÇÃO CEUA-UESPI

Declaro que, o pesquisador, ANTONIO LUIZ MARTINS MAIA FILHO, deu entrada sob no protocolo o N°0029/2017 do Projeto intitulado AVALIAÇÃO IN VIVO DOS POSSÍVEIS EFEITOS GENOTÓXICOS DE COMPOSITOS A BASE NANOFIBRAS COM NANOHIDROXIAPATITA PARA UTILIZAÇÃO NO REPARO ÓSSEO.

O mesmo após a análise da Comissão teve o seguinte parecer:

APROVADO

Data do relatório final: 30/042019

Teresina, 20 DE MARÇO DE 2017


Comissão - CEUA

Dr. Francisco Araújo
Sub-Coordenador CEUA/UESPI
Portaria Nº 1347 - 20/11/14
CRMV - 0415/17

Rua João Cabral, s/n - Bairro Pirajá - Cep: 64.002-150 - Teresina - Piauí - Brasil
Fones : (0xx86) 3213-7887 CENTRAL DA UESPI
e-mail: ceuauespi@gmail.com

PRODUÇÃO DE ARTIGOS DECORRENTES DO PERÍODO DE DOUTORADO

Andrade TM, Mello DCR, Elias CMV, Abdala JMA, Silva E, Vasconcellos LMR, Tim CR, Marciano FR, Lobo AO. *In vitro* and in vivo evaluation of rotary-jet-spun poly(ϵ -caprolactone) with high loading of nano-hydroxyapatite. **J Mater Sci Mater Med**. 2019 Jan 28;30(2):19. doi: 10.1007/s10856-019-6222-1. PMID: 30689050.

ELIAS, C. M. V.; MAIA FILHO, A. L. M. ; SILVA, L. R. ; AMARAL, F. P. M. ; WEBSTER, T. J. ; MARCIANO, F. R. ; LOBO, A. O. . In Vivo Evaluation of the Genotoxic Effects of Poly (Butylene adipate-co-terephthalate)/Polypyrrole with Nanohydroxyapatite *Scaffolds* for Bone Regeneration. **Materials**, v. 12, p. 1330, 2019. (ARTIGO TESE)

Magalhães, L.S.S.M.; Santos, F.E.P.; Elias, C.M.V.; Afewerki, S.; Sousa, G.F.; Furtado, A.S.A.; Marciano, F.R.; Lobo, A.O. Printing 3D Hydrogel Structures Employing Low-Cost Stereolithography Technology. *J. Funct. Biomater*. 2020, 11, 12. <https://doi.org/10.3390/jfb11010012>

Marsi TCO, Ricci R, Toniato TV, Vasconcellos LMR, Elias CMV, Silva ADR, Furtado ASA, Magalhães LSSM, Silva-Filho EC, Marciano FR, Zille A, Webster TJ, Lobo AO. Electrospun Nanofibrous Poly (Lactic Acid)/Titanium Dioxide Nanocomposite Membranes for Cutaneous Scar Minimization. **Front Bioeng Biotechnol**. 2019 Dec 20;7:421. doi: 10.3389/fbioe.2019.00421. PMID: 31921824; PMCID: PMC6932955.

Rodrigues, P., Elias, C., Viana, B., De Hollanda, L., Stocco, T., De Vasconcellos, L., . . . Lobo, A. (2020). Electrodeposition of bactericidal and bioactive nano-hydroxyapatite onto electrospun piezoelectric polyvinylidene fluoride *scaffolds*. **Journal of Materials Research**, 1-11. doi: 10.1557 / jmr.2020.302

Stocco, Thiago Domingues et al. "Cell Viability of Porous Poly(d,l-lactic acid)/Vertically Aligned Carbon Nanotubes/Nanohydroxyapatite *Scaffolds* for Osteochondral Tissue Engineering." **Materials (Basel, Switzerland)** vol. 12,6 849. 13 Mar. 2019, doi:10.3390/ma12060849

Vasconcellos, L.M.R., Elias, C.d.M.V., Minhoto, G.B. et al. Rotary-jet spun polycaprolactone/nano-hydroxyapatite *scaffolds* modified by simulated body fluid influenced the flexural mode of the neofomed bone. **J Mater Sci: Mater Med** 31, 72 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06403-8>



Article

In Vivo Evaluation of the Genotoxic Effects of Poly (Butylene adipate-co-terephthalate)/Polypyrrole with Nanohydroxyapatite Scaffolds for Bone Regeneration

Conceição de Maria Vaz Elias¹, Antônio Luiz Martins Maia Filho², Laryssa Roque da Silva², Fabricio Pires do Amaral³, Thomas J. Webster⁴, Fernanda Roberta Marciano^{5,*} and Anderson Oliveira Lobo^{6,*}

¹ Biomedical Engineering graduate program, Scientific and Technological Institute, Brasil University, São Paulo, SP 08230-030, Brazil; conceicao vazenf@hotmail.com

² Laboratory of Experimental Surgery and Mutagenicity, State University of Piauí, Teresina, PI 64001-280, Brazil; almuaiaf@gmail.com (A.L.M.M.F.); laryssaroqueds@gmail.com (L.R.d.S.)

³ Laboratory of Molecular Biology and Biological Injury Study, State University of Piauí, Teresina, PI 64001-280, Brazil; fabricio34amaral@gmail.com

⁴ Department of Chemical Engineering, Northeastern University, Boston, MA 02115, USA; th.webster@neu.edu

⁵ Department of Physics, UFPI-Federal University of Piauí, Teresina, PI 64049-550, Brazil

⁶ LIMAV-Interdisciplinary Laboratory for Advanced Materials, UFPI-Federal University of Piauí, Teresina, PI 64049-550, Brazil

* Correspondence: femarciano@gmail.com (F.R.M.); lobo@ufpi.edu.br (A.O.L.)

Received: 6 March 2019; Accepted: 13 April 2019; Published: 24 April 2019



Abstract: Here, butylene adipate-co-terephthalate/polypyrrole with nanohydroxyapatite (PBAT/PPy/nHAp) scaffolds were fabricated and characterized. The electrospinning process was carried out using 12 kV, a needle of 23 G, an infusion pump set at 0.3 mL/h, and 10 cm of distance. Afterwards, nHAp was directly electrodeposited onto PBAT/PPy scaffolds using a classical three-electrode apparatus. For in vivo assays (comet assay, acute and chronic micronucleus), 60 male albino Wistar rats with 4 groups were used in each test (n = 5): PBAT/PPy; PBAT/PPy/nHAp; positive control (cyclophosphamide); and the negative control (distilled water). Peripheral blood samples were collected from the animals to perform the comet test after 4 h (for damage) and 24 h (for repair). In the comet test, it was shown that the scaffolds did not induce damage to the % DNA tail and neither for tail length. After the end of 48 h (for acute micronucleus) and 72 h (for chronic micronucleus), bone marrow was collected from each rat to perform the micronucleus test. All of the produced scaffolds did not present genotoxic effects, providing strong evidence for the biological application of PBAT/PPy/nHAp scaffolds.

Keywords: Poly (butylene adipate-co-terephthalate); polypyrrole; nanohydroxyapatite; micronucleus; nanotechnology; and comet assays

1. Introduction

Currently, around the world, nearly 2.2 million patients are hospitalized for a bone graft procedure to repair bone defects, alleviate suffering, or combat bone diseases every year [1]. Diseases related to bone structures have become a public health problem, posing the greatest challenges for surgical orthopedic reconstruction.

From this, tissue engineering and regenerative medicine have advanced the search for new ways to solve such problems. With an increase in automobile accidents and life expectancy, and consequently

REFERÊNCIAS

ABEDALWAFI; WANG; WANG; LI. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review. **Rev. Adv. Mater. Sci**, 34, n. 2, p. 123-140, 2013.

ABSOLOM, D. R.; LAMBERTI, F. V.; POLICOVA, Z.; ZINGG, W. *et al.* Surface thermodynamics of bacterial adhesion. **Applied and environmental microbiology**, 46, n. 1, p. 90-97, 1983.

AGARWAL, S.; WENDORFF, J. H.; GREINER, A. Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. **Adv Mater**, 21, n. 32-33, p. 3343-3351, Sep 4 2009.

AKERLEY, B. J.; RUBIN, E. J.; NOVICK, V. L.; AMAYA, K. *et al.* A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of Haemophilus influenzae. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 2, p. 966-971, Jan 22 2002.

AL-ITRY; LAMNAWAR; MAAZOUZ. Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy. **Polymer Degradation and Stability**, 97, n. 10, p. 1898-1914, 2012.

ALAM; NATU; GOKKULAKRISHNAN; GIRI *et al.* Distraction Osteogenesis as a Solution for Facial Deformity: A Review. **Journal of Dental Sciences & Oral Rehabilitation**, p. 17-22, 2012.

ALBAS, C. S.; SOUZA, J. P.; NAI, G. A.; PARIZI, J. L. S. Avaliação da genotoxicidade da Ilex paraguariensis (erva mate) pelo teste do micronúcleo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 16, p. 345-349, 2014.

ANTOUN; BOUK; AMEUR. Bilateral sinus graft with either bovine hydroxyapatite or β tricalcium phosphate, in combination with platelet-rich plasma: A Case Report. **Implant dentistry**, 17, n. 3, p. 350-359, 2008.

ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos: Gerência de avaliação de segurança e eficácia – GESEF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 01 mar. 2010.

ARBOLEDA; FRANCO; CAICEDO; TIRADO *et al.* Synthesis and chemical and structural characterization of hydroxyapatite obtained from eggshell and tricalcium phosphate. **Ingeniería y competitividad**, 18, n. 1, p. 71-78, 2016.

ARENZON, A.; NETO, T. J. P.; GERBER, W. Manual sobre toxicidade em efluentes industriais. **Porto Alegre: Cespe/Senai de Artes Gráficas Henrique D'ávila Bertaso**, 2011.

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. **Toxicol Appl Pharmacol**, 258, n. 2, p. 151-165, Jan 15 2012.

AZEVEDO; CHAVES; BEZERRA; FOOK, L. *et al.* Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

AZQUETA, A.; DUSINSKA, M. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. **Frontiers in Genetics**, 6, n. 239, 2015-July-10 2015. Opinion.

BARBOSA; MESSMER; BRAZIL; MARCIANO *et al.* The effect of ultrasonic irradiation on the crystallinity of nano-hydroxyapatite produced via the wet chemical method. **Materials Science and Engineering: C**, 33, n. 5, p. 2620-2625, 2013.

BATISTETI, C. B.; ARAUJO, E. S. N. N. d.; CALUZI, J. J. Os experimentos de Griffith no ensino de biologia: a transposição didática do conceito de transformação nos livros didáticos. **Ensaio Pesquisa em Educação em Ciências (Belo Horizonte)**, 12, n. 1, p. 83-100, 2010.

BAUER; SCHMUKI; MARK, V. D.; PARK. Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. **Progress in Materials Science**, 58, n. 3, p. 261-326, 2013.

BEHNIA; TEHRANCHI; MORAD. Distraction Osteogenesis. *In: A Textbook of Advanced Oral and Maxillofacial Surgery*: IntechOpen, 2013.

BENIGNI, R.; BOSSA, C.; TCHEREMENSKAIA, O.; BATTISTELLI, C. L. *et al.* The new ISSMIC database on in vivo micronucleus and its role in assessing genotoxicity testing strategies. **Mutagenesis**, 27, n. 1, p. 87-92, Jan 2012.

BESSE, J. P.; LATOUR, J. F.; GARRIC, J. Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? **Environ Int**, 39, n. 1, p. 73-86, Feb 2012.

BETTI, C.; DAVINI, T.; GIANNESI, L.; LOPRIENO, N. *et al.* Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 307, n. 1, p. 323-333, 1994/05/01/ 1994.

BHEEMANENI, G.; SARAVANA, S.; KANDASWAMY, R. Processing and Characterization of Poly (butylene adipate-co-terephthalate) / Wollastonite Biocomposites for Medical Applications. **Materials Today: Proceedings**, 5, n. 1, Part 1, p. 1807-1816, 2018/01/01/ 2018.

BOLLER, K.; SCHMID, W. Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon. **Humangenetik**, 11, n. 1, p. 35-54, 1970.

BONASSI, S.; BIASOTTI, B.; KIRSCH-VOLDERS, M.; KNASMUELLER, S. *et al.* State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMNXL project initiative. **Mutagenesis**, 24, n. 4, p. 295-302, 2009.

BORDES; POLLET; AVÉROUS. Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, 34, n. 2, p. 125-155, 2009.

BORGES. O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia, de cães (Canis familiares) estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodispersão. 1998.

BORGES; REZENDE; RIBEIRO; MELO *et al.* Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 52, n. 6, p. 616-620, 2000.

BORGES, F. F.; MACHADO, T. C.; CUNHA, K. S.; PEREIRA, K. C. *et al.* Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 85, n. 3, p. 955-964, 2013.

BRANDELERO, R. P. H.; GROSSMANN, M. V.; YAMASHITA, F. Hidrofilicidade de filmes de amido/poli (butileno adipato co-tereftalato)(Pbat) adicionados de tween 80 e óleo de soja. **Polímeros**, 23, n. 2, p. 270-275, 2013.

BREIVIK, J., 2005, **The evolutionary origin of genetic instability in cancer development**. Elsevier. 51-60. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1044579X04000859?via%3Dihub>.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J. L. V. d.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 45, p. 325-334, 2009.

BURGER; HSIAO; CHU. Nanofibrous materials and their applications. **Annu. Rev. Mater. Res.**, 36, p. 333-368, 2006.

CAI, Y.; LV, J.; FENG, J. Spectral Characterization of Four Kinds of Biodegradable Plastics: Poly (Lactic Acid), Poly (Butylenes Adipate-Co-Terephthalate), Poly (Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) and Poly (Butylenes Succinate) with FTIR and Raman Spectroscopy. **Journal of Polymers and the Environment**, 21, n. 1, p. 108-114, March 01 2013. journal article.

CAMPOS, R. A. M.; FAEZ, R.; REZENDE, M. C. Síntese do polipirrol com surfactantes aniônicos visando aplicações como absorvedores de micro-ondas. **Polímeros**, 24, p. 351-359, 2014.

CARLO, E.; BORGES, A.; VARGAS, M.; MARTINEZ, M. *et al.* Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% poli-hidroxibutirato para substituição óssea em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61, n. 4, p. 844-852, 2009.

CARLO, E. C.; BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. M. d. F.; MOREIRA, J. d. C. L. *et al.* Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. 2007.

CASARIN. Desenvolvimento e caracterização de blendas e de compostos empregando polímeros biodegradáveis. 2004.

CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D. Antioxidants and the Comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 681, n. 1, p. 51-67, 2009/01/01/ 2009.

CHANDRASEKHAR. Conducting polymers, fundamentals and applications. 1999.

CHANG, W.-M.; WANG, C.-C.; CHEN, C.-Y. The combination of electrospinning and forspinning: Effects on a viscoelastic jet and a single nanofiber. **Chemical Engineering Journal**, 244, p. 540-551, 2014/05/15/ 2014.

CHAUDHURI, B.; MONDAL, B.; RAY, S. K.; SARKAR, S. C. A novel biocompatible conducting polyvinyl alcohol (PVA)-polyvinylpyrrolidone (PVP)-hydroxyapatite (HAP) composite scaffolds for probable biological application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 143, p. 71-80, 2016/07/01/ 2016.

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

CHEN, H.; ZENG, Y.; LIU, W.; ZHAO, S. *et al.* Multifaceted applications of nanomaterials in cell engineering and therapy. **Biotechnology Advances**, 31, n. 5, p. 638-653, 2013/09/01/ 2013.

CHEN, S.-J.; BAI, Y.; HUANG, X.-B.; SUO, J.-P. *et al.* Genotoxic and Biological Evaluation of a Nano Silica Cross Linked Composite Specifically Used for Intra-Vas Device. **Soft Nanoscience Letters**, Vol.02No.03, p. 6, 2012.

CHIVRAC; KADLECOVÁ; POLLET; AVÉROUS. Aromatic copolyester-based nano-biocomposites: elaboration, structural characterization and properties. **Journal of Polymers and the Environment**, 14, n. 4, p. 393-401, 2006.

COLLIER; CAMP; HUDSON; SCHMIDT. Synthesis and characterization of polypyrrole–hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications. **Journal of biomedical materials research**, 50, n. 4, p. 574-584, 2000.

COLLINS. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1840, n. 2, p. 794-800, 2014.

- COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research/DNA Repair**, 336, n. 1, p. 69-77, 1995.
- COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. **Rev bras cancerol**, 55, n. 2, p. 165-174, 2009.
- CONVERSE, G. L.; YUE, W.; ROEDER, R. K. Processing and tensile properties of hydroxyapatite-whisker-reinforced polyetheretherketone. **Biomaterials**, 28, n. 6, p. 927-935, 2007.
- DA SILVA, C. J.; DOS SANTOS, J. E.; SATIE TAKAHASHI, C. An evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of the anti-obesity drugs sibutramine and fenproporex. **Hum Exp Toxicol**, 29, n. 3, p. 187-197, Mar 2010.
- DA SILVA, F. C.; DE BRITO BARROS, M. Â.; VIANA, R. R.; ROMÃO, N. F. *et al.* Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, 2, n. 1, p. 13-21, 2011.
- DASH; CHIELLINI; OTTENBRITE. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in polymer science**, 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.
- DAVIES, J. In vitro modeling of the bone/implant interface. **The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, 245, n. 2, p. 426-445, 1996.
- DE BOER, J.; HOEIJMAKERS, J. H. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, 21, n. 3, p. 453-460, Mar 2000.
- DE CASTRO, J. G.; RODRIGUES, B. V.; RICCI, R.; COSTA, M. M. *et al.* Designing a novel nanocomposite for bone tissue engineering using electrospun conductive PBAT/polypyrrole as a scaffold to direct nanohydroxyapatite electrodeposition. **RSC Advances**, 6, n. 39, p. 32615-32623, 2016.
- DE CASTRO, J. G.; RODRIGUES, B. V. M.; RICCI, R.; COSTA, M. M. *et al.* Designing a novel nanocomposite for bone tissue engineering using electrospun conductive PBAT/polypyrrole as a scaffold to direct nanohydroxyapatite electrodeposition. **RSC Advances**, 6, n. 39, p. 32615-32623, 2016. 10.1039/C6RA00889E.
- DE CASTRO JUNIOR, A. F.; DE CASTRO, B. K.; DA SILVEIRA NETO, L. L.; MOTA, N. L. *et al.* Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, 27, n. 1/2, 2008.

DE PAULA, M. M. M.; BASSOUS, N. J.; AFEWERKI, S.; HARB, S. V. *et al.* Understanding the impact of crosslinked PCL/PEG/GelMA electrospun nanofibers on bactericidal activity. **PLOS ONE**, 13, n. 12, p. e0209386, 2018.

DEXTER, S.; SULLIVAN, J.; WILLIAMS, J.; WATSON, S. Influence of substrate wettability on the attachment of marine bacteria to various surfaces. **Applied microbiology**, 30, n. 2, p. 298-308, 1975.

DIAS; FIANCHINI; RAJAPAKSE. Greener method for high-quality polypyrrole. **Polymer**, 47, n. 21, p. 7349-7354, 2006.

DUARTE; BORGES; LAVOR; FILGUEIRAS *et al.* Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58, n. 5, p. 849-853, 2006.

EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, 11, n. 1, p. 45, 2015.

EL-GHANNAM, A.; NING, C.; MEHTA, J. Cyclosilicate nanocomposite: A novel resorbable bioactive tissue engineering scaffold for BMP and bone-marrow cell delivery. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, 71, n. 3, p. 377-390, 2004.

EOFINGER; OOIJ, V.; RIDGWAY. DC plasma-polymerization of pyrrole: Comparison of films formed on anode and cathode. **Journal of applied polymer science**, 61, n. 9, p. 1503-1514, 1996.

EVANS; GENTLEMAN; POLAK. Scaffolds for stem cells. **Materials Today**, 9, n. 12, p. 26-33, 2006.

FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; BOEDECKER, R. H. *et al.* The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 566, n. 3, p. 209-229, 2004/05/01/ 2004.

FERREIRA; KARP; NOBRE; LANGER. New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells. **Cell stem cell**, 3, n. 2, p. 136-146, 2008.

FIHRI, A.; LEN, C.; VARMA, R. S.; SOLHY, A. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, 347, p. 48-76, 2017/09/15/ 2017.

FLETCHER, M.; LOEB, G. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. **Applied and environmental microbiology**, 37, n. 1, p. 67-72, 1979.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. < b> Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FOOK; APARECIDA; FOOK. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. **Matéria (Rio de Janeiro)**, p. 392-399, 2010.

FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, 421, p. 436, 01/23/online 2003.

FUJITA, R.; YOKOYAMA, A.; KAWASAKI, T.; KOHGO, T. Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate blocks. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 61, n. 9, p. 1045-1053, 2003.

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

GAJENDIRAN, M.; CHOI, J.; KIM, S.-J.; KIM, K. *et al.* Conductive biomaterials for tissue engineering applications. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 51, p. 12-26, 2017/07/25/ 2017.

GARCIA, R. D. P. Efeitos citotóxicos e genotóxicos das ligas de solda de prata em ortodontia: revisão sistemática. 2015.

GARNER; GEORGEVICH; HODGSON; LIU *et al.* Polypyrrole–heparin composites as stimulus-responsive substrates for endothelial cell growth. **Journal of biomedical materials research**, 44, n. 2, p. 121-129, 1999.

GAUTAM, S.; DINDA, A. K.; MISHRA, N. C. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, 33, n. 3, p. 1228-1235, Apr 1 2013.

GEORGE; LYCKMAN; LAVAN; HEGDE *et al.* Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics. **Biomaterials**, 26, n. 17, p. 3511-3519, 2005.

GIGLIO, D.; GUASCITO; SABBATINI; ZAMBONIN. Electropolymerization of pyrrole on titanium substrates for the future development of new biocompatible surfaces. **Biomaterials**, 22, n. 19, p. 2609-2616, 2001.

GILMORE; KITA; HAN; GELMI *et al.* Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components. **Biomaterials**, 30, n. 29, p. 5292-5304, 2009.

GOLDSTEIN; JORDAN; MCLAURIN; GRANT. The evolution of the Ilizarov technique: part 2: the principles of distraction osteosynthesis. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, 71, n. 1, p. 96, 2013.

GRINET, M. A. V. M.; ZANIN, H.; CAMPOS GRANATO, A. E.; PORCIONATTO, M. *et al.* Fast preparation of free-standing nanohydroxyapatite–vertically aligned carbon nanotube scaffolds. **Journal of Materials Chemistry B**, 2, n. 9, p. 1196-1204, 2014. 10.1039/C3TB21525C.

GU; ZHANG; REN; ZHAN. Melt rheology of polylactide/poly (butylene adipate-co-terephthalate) blends. **Carbohydrate polymers**, 74, n. 1, p. 79-85, 2008.

GUERRA. Modificação química do amido de mandioca e blendagem com poliéster biodegradável. 2010.

GYORI, B. M.; VENKATACHALAM, G.; THIAGARAJAN, P. S.; HSU, D. *et al.* OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. **Redox Biol**, 2, p. 457-465, 2014.

HAMADA, S.; OHYAMA, W.; TAKASHIMA, R.; SHIMADA, K. *et al.* Evaluation of the repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with 22 chemicals using young adult rats: summary of the collaborative study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/The Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, 780-781, p. 2-17, Mar 2015.

HAVLÍČEK, K.; SVOBODOVÁ, L.; BAKALOVA, T.; LEDERER, T. Influence of electrospinning methods on characteristics of polyvinyl butyral and polyurethane nanofibres essential for biological applications. **Materials & Design**, 194, p. 108898, 2020/09/01/ 2020.

HAYASHI, M.; KODAMA, Y.; AWOGI, T.; SUZUKI, T. *et al.* The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. **Mutation Research**, 278, n. 2, p. 209-213, 1992.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T. *et al.* The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutat Res**, 245, n. 4, p. 245-249, Dec 1990.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; MORITA, T. Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, 252, n. 3, p. 281-287, 1991.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T.; ANDERSON, D. *et al.* In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutat Res**, 312, n. 3, p. 293-304, Jun 1994.

HE, J. L.; CHEN, W. L.; JIN, L. F.; JIN, H. Y. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. **Mutation research**, 469, n. 2, p. 223-231, 2000/09// 2000.

HEEGER. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials (Nobel lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, 40, n. 14, p. 2591-2611, 2001.

HINDERER, S.; SCHESNY, M.; BAYRAK, A.; IBOLD, B. *et al.* Engineering of fibrillar decorin matrices for a tissue-engineered trachea. **Biomaterials**, 33, n. 21, p. 5259-5266, Jul 2012.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, 411, n. 6835, p. 366-374, May 17 2001.

HU; HSU; CHENG; LI *et al.* Electrical stimulation to promote osteogenesis using conductive polypyrrole films. **Materials Science and Engineering: C**, 37, p. 28-36, 2014.

HUA, N.; ZHU, H.; ZHUANG, J.; CHEN, L. Genotoxicity test of self-renovated ceramics in primary human peripheral lymphocytes. **Cell Biochem Biophys**, 70, n. 3, p. 1773-1777, Dec 2014.

HUA, N.; ZHU, H.; ZHUANG, J.; CHEN, L. Genotoxicity test of self-renovated ceramics in primary human peripheral lymphocytes. **Cell biochemistry and biophysics**, 70, n. 3, p. 1773-1777, 2014.

IARMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R. A. *et al.* Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. **Mutat Res**, 658, n. 3, p. 215-233, Mar-Apr 2008.

INGAVLE, G. C.; LEACH, J. K. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering. **Tissue Eng Part B Rev**, 20, n. 4, p. 277-293, Aug 2014.

JACOBSEN, K. A.; AL-AQL, Z. S.; WAN, C.; FITCH, J. L. *et al.* Bone Formation During Distraction Osteogenesis Is Dependent on Both VEGFR1 and VEGFR2 Signaling. **Journal of Bone and Mineral Research**, 23, n. 5, p. 596-609, 2008.

JAMSHIDIAN; TEHRANY; IMRAN; JACQUOT *et al.* Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, 9, n. 5, p. 552-571, 2010.

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

JIANG; ZHANG. Biodegradable and biobased polymers. *In: Applied plastics engineering handbook*: Elsevier, 2017. p. 127-143.

JIANG, X.; MAROIS, Y.; TRAORÉ, A.; TESSIER, D. *et al.* Tissue reaction to polypyrrole-coated polyester fabrics: an in vivo study in rats. **Tissue engineering**, 8, n. 4, p. 635-647, 2002.

JUDAS, F.; PALMA, P.; FALACHO, R.; FIGUEIRERO, H. Estrutura dinâmica do tecido ósseo. 2012. 20, 2012.

KAI; PRABHAKARAN; JIN; RAMAKRISHNA. Polypyrrole-contained electrospun conductive nanofibrous membranes for cardiac tissue engineering. **Journal of biomedical materials research Part A**, 99, n. 3, p. 376-385, 2011.

KANG, S. H.; KWON, J. Y.; LEE, J. K.; SEO, Y. R. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **J Cancer Prev**, 18, n. 4, p. 277-288, Dec 2013.

KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. A decade of progress in tissue engineering. **Nature Protocols**, 11, n. 10, p. 1775-1781, 2016/10/01 2016.

KHORSHIDI, S.; SOLOUK, A.; MIRZADEH, H.; MAZINANI, S. *et al.* A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. **J Tissue Eng Regen Med**, 10, n. 9, p. 715-738, Sep 2016.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KIEVIT; FLORCZYK; LEUNG. Chitosan–alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment. **Biomaterials**, 31, n. 22, p. 5903-5910, 2010.

KIJCHAVENGKUL; AURAS; RUBINO; SELKE *et al.* Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. **Polymer Degradation and Stability**, 95, n. 12, p. 2641-2647, 2010/12/01/ 2010.

KIM; OH; JEONG; HONG *et al.* Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells. **Biomaterials**, 32, n. 9, p. 2342-2350, 2011.

KIM; PARK; KANG; PARK. Surface-modified silk hydrogel containing hydroxyapatite nanoparticle with hyaluronic acid–dopamine conjugate. **International journal of biological macromolecules**, 70, p. 516-522, 2014.

KOUR, J.; ALI, M. N.; GANAIE, H. A.; TABASSUM, N. Amelioration of the cyclophosphamide induced genotoxic damage in mice by the ethanolic extract of *Equisetum arvense*. **Toxicology Reports**, 4, p. 226-233, 2017/01/01/ 2017.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat Res**, 455, n. 1-2, p. 155-166, Nov 20 2000.

KUMARAVEL, T. S.; VILHAR, B.; FAUX, S. P.; JHA, A. N. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biol Toxicol**, 25, n. 1, p. 53-64, Feb 2009.

LANDSIEDEL, R.; KAPP, M. D.; SCHULZ, M.; WIENCH, K. *et al.* Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--many questions, some answers. **Mutat Res**, 681, n. 2-3, p. 241-258, Mar-Jun 2009.

LAVIK; LANGER. Tissue engineering: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, 65, n. 1, p. 1-8, 2004.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat Res**, 544, n. 1, p. 43-64, Sep 2003.

LEMONS. Ceramics: past, present, and future. **Bone**, 19, n. 1, p. S121-S128, 1996.

LI, X.; WANG, L.; FAN, Y.; FENG, Q. *et al.* Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 101, n. 8, p. 2424-2435, 2013.

LIN, S.; HAO, G.; LONG, M.; LAI, F. *et al.* Oyster (*Ostrea plicatula* Gmelin) polysaccharides intervention ameliorates cyclophosphamide—Induced genotoxicity and hepatotoxicity in mice via the Nrf2—ARE pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 95, p. 1067-1071, 2017/11/01/ 2017.

LIU; LIN; YANG; CHEN. Miscibility, thermal characterization and crystallization of poly (l-lactide) and poly (tetramethylene adipate-co-terephthalate) blend membranes. **Polymer**, 46, n. 26, p. 12586-12594, 2005.

LIU; OLIVEIRA. Electrodeposition of polypyrrole films on aluminum from tartrate aqueous solution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18, n. 1, p. 143-152, 2007.

LIU, H.; LI, D.; ZHANG, Y.; LI, M. Inflammation, mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Histochemistry and cell biology**, 149, n. 4, p. 393-404, 2018.

LOBO; SIQUEIRA; NEVES, D.; MARCIANO *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**, 24, n. 7, p. 1723-1732, 2013.

LOU, J.; HE, J.; ZHENG, W.; JIN, L. *et al.* Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 617, n. 1-2, p. 104-110, 2007.

MA; SASK; SHI; BRASH *et al.* Electrodeposition of polypyrrole-heparin and polypyrrole-hydroxyapatite films. **Materials Letters**, 65, n. 4, p. 681-684, 2011.

MACHADO. Biocompatibilidade in vivo de implantes de titânio submetidos ao processo biomimético. 2002.

MALAGUTTI-FERREIRA. Análise da integridade genômica por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. 2016.

MALAGUTTI-FERREIRA, M. J. Análise da integridade genômica por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. 2016.

MARCU, L. G.; YEOH, E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. **Journal of cancer research and clinical oncology**, 135, n. 10, p. 1303-1314, 2009.

MÁRQUEZ FERNÁNDEZ, M. E.; LÓPEZ ORTIZ, J. B.; CORREA LONDOÑO, G.; PAREJA LÓPEZ, A. *et al.* Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos. **Iatreia; Vol 16, No 4**, 2003.

MARZIN, D. The position of the in vitro micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 392, n. 1-2, p. 175-181, 1997.

MAURETTE, M. Distração osteogênica alveolar. **Resconstruções em Implantodontia-Protocolos clínicos para o sucesso e previsibilidade**, p. 268-287, 2009.

MECKING. Nature or petrochemistry?—biologically degradable materials. **Angewandte Chemie International Edition**, 43, n. 9, p. 1078-1085, 2004.

MEDEIROS; OLIVEIRA; CONSOLIN-FILHO; PATERNO *et al.* Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: Introdução aos polímeros condutores. **Embrapa Instrumentação-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2012.

MENDES, L. S.; SASKA, S.; MARTINES, M. A. U.; MARCHETTO, R. Nanostructured materials based on mesoporous silica and mesoporous silica/apatite as osteogenic growth peptide carriers. **Materials Science and Engineering: C**, 33, n. 7, p. 4427-4434, 2013/10/01/ 2013.

MENG; ZHANG; ROUABHIA. Accelerated osteoblast mineralization on a conductive substrate by multiple electrical stimulation. **Journal of bone and mineral metabolism**, 29, n. 5, p. 535-544, 2011.

MIHARDJA; SIEVERS; LEE. The effect of polypyrrole on arteriogenesis in an acute rat infarct model. **Biomaterials**, 29, n. 31, p. 4205-4210, 2008.

MIRANDA MONTE, S.; FILHO, A.; AMARAL, F.; CABRAL LEÃO FERREIRA, D. *et al.* **Genotoxicity Evaluation of Polystyrene Membrane with Collagen and Norbixin by Micronucleus Test and Comet Assay.** 2016. 07 p.

MOHAMMADI; BUREAU; NAZHAT. Polylactic acid (PLA) biomedical foams for tissue engineering. *In: Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*: Elsevier, 2014. p. 313-334.

MORENO; PANERO. Evaluation of the interface aging process of polypyrrole–polysaccharide electrodes in a simulated physiological fluid. **Electrochimica acta**, 68, p. 1-8, 2012.

MORENO, S.; PANERO; MATERAZZI; MARTINELLI *et al.* Polypyrrole-polysaccharide thin films characteristics: Electrosynthesis and biological properties. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, 88, n. 3, p. 832-840, 2009.

NAIR, M. B.; SURESH BABU, S.; VARMA, H. K.; JOHN, A. A triphasic ceramic-coated porous hydroxyapatite for tissue engineering application. **Acta Biomaterialia**, 4, n. 1, p. 173-181, 2008/01/01/ 2008.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society, Interface**, 5, n. 27, p. 1137-1158, 2008.

NETO; PAULA, D.; MARTINS; GOES. Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. **Polymer Degradation and Stability**, 120, p. 61-69, 2015.

NETO, W. A. R.; DE PAULA, A. C. C.; MARTINS, T. M.; GOES, A. M. *et al.* Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. **Polymer Degradation and Stability**, 120, p. 61-69, 2015.

NEU, T. R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. **Microbiological reviews**, 60, n. 1, p. 151, 1996.

NEUMANN, D. A. **Cinesiologia do aparelho musculoesquelético: fundamentos para reabilitação.** Elsevier Health Sciences, 2011. 8535239669.

OECD. (Organisation for Economic Cooperation and Development) Guideline 474 2014a.

OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 2014b.

OKAMOTO; JOHN. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, 38, n. 10-11, p. 1487-1503, 2013.

OLIVEIRA; OLIVEIRA; MACHADO; ROSA. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras. **Revista de ciências médicas e biológicas**, 9, n. 1, p. 37-44, 2010.

OMASTOVÁ; TRCHOVÁ; PIONTECK; PROKEŠ *et al.* Effect of polymerization conditions on the properties of polypyrrole prepared in the presence of sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate. **Synthetic Metals**, 143, n. 2, p. 153-161, 2004.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PAGANO, S.; CHIERUZZI, M.; BALLONI, S.; LOMBARDO, G. *et al.* Biological, thermal and mechanical characterization of modified glass ionomer cements: The role of nano-hydroxyapatite, ciprofloxacin and zinc l-carnosine. **Materials Science and Engineering: C**, 94, p. 76-85, 2019.

PALOMÄKI; KARISOLA; PYLKKÄNEN; SAVOLAINEN *et al.* Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. **Toxicology**, 267, n. 1-3, p. 125-131, 2010.

PANT, J.; SUNDARAM, J.; GOUDIE, M. J.; NGUYEN, D. T. *et al.* Antibacterial 3D bone scaffolds for tissue engineering application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 107, n. 4, p. 1068-1078, 2019.

PATEL; KURPINSKI; QUIGLEY; GAO *et al.* Bioactive nanofibers: synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance. **Nano letters**, 7, n. 7, p. 2122-2128, 2007.

PELLICANO; PACHEKOSKI; AGNELLI. Influência da adição de amido de mandioca na biodegradação da blenda polimérica PHBV/Ecoflex®. **Polímeros**, 19, n. 3, p. 212-217, 2009.

PERÁN, M.; GARCÍA, M. A.; LÓPEZ-RUIZ, E.; BUSTAMANTE, M. *et al.* Functionalized Nanostructures with Application in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, 13, n. 3, p. 3847-3886, 2012.

PERCIVAL; RICHTSMIEIER. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. **Developmental Dynamics**, 242, n. 8, p. 909-922, 2013.

PERSANO, L.; CAMPOSEO, A.; TEKMEK, C.; PISIGNANO, D. Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review. **Macromolecular Materials and Engineering**, 298, n. 5, p. 504-520, 2013.

PICCIANI, P. H. S.; MEDEIROS, E. S.; PAN, Z.; WOOD, D. F. *et al.* Structural, Electrical, Mechanical, and Thermal Properties of Electrospun Poly(lactic acid)/Polyaniline Blend Fibers. **Macromolecular Materials and Engineering**, 295, n. 7, p. 618-627, 2010.

PORTICH, J. P.; DOS SANTOS, R. P.; KERSTING, N.; JORGE, K. B. *et al.* DNA damage response in patients with pediatric Acute Lymphoid Leukemia during induction therapy. **Leukemia Research**, 54, p. 59-65, 2017/03/01/ 2017.

QUE, R. A.; CHAN, S. W. P.; JABAIAH, A. M.; LATHROP, R. H. *et al.* Tuning cellular response by modular design of bioactive domains in collagen. **Biomaterials**, 53, p. 309-317, 2015/06/01/ 2015.

RACHMIEL; LEISER. The molecular and cellular events that take place during craniofacial distraction osteogenesis. **Plastic and reconstructive surgery Global open**, 2, n. 1, 2014.

RAMANAVICIENE; KAUSAITE; TAUTKUS; RAMANAVICIUS. Biocompatibility of polypyrrole particles: an in-vivo study in mice. **Journal of pharmacy and pharmacology**, 59, n. 2, p. 311-315, 2007.

RAQUEZ; NABAR; NARAYAN; DUBOIS. Novel high-performance talc/poly [(butylene adipate)-co-terephthalate] hybrid materials. **Macromolecular materials and engineering**, 293, n. 4, p. 310-320, 2008.

RATH, N.; HUFF, G.; HUFF, W.; BALOG, J. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry science**, 79, n. 7, p. 1024-1032, 2000.

RATNER. Introduction: Biology and medicine—key concepts in the use of biomaterials in surgery and medical devices. *In*: **Biomaterials Science**: Elsevier, 2013. p. 393-394.

RETHWISCH; JR, C. Fundamentos da ciência e engenharia de materiais: uma abordagem integrada. : Rio de Janeiro: LTC—Livros Técnicos e Científicos Editora SA 2014.

RIBEIRO, L.; SALVADORI, D. M. EK Mutagênese Ambiental. **Canoas: Editora da ULBRA, 356p**, 2003.

RIBEIRO NETO, W. A.; DE PAULA, A. C. C.; MARTINS, T. M. M.; GOES, A. M. *et al.* Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. **Polymer Degradation and Stability**, 120, p. 61-69, 2015/10/01/ 2015.

ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, 14, n. 3, p. 337-346, 2003/06/01/ 2003.

RODRIGUES. Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estudos tecnológicos em Engenharia**, 9, n. 2, p. 63-76, 2013.

RODRIGUES, B. V. M.; SILVA, A. S.; MELO, G. F. S.; VASCONCELLOS, L. M. R. *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**, 59, p. 782-791, 2016/02/01/ 2016.

RODRIGUES, P. J.; DE MV ELIAS, C.; VIANA, B. C.; DE HOLLANDA, L. M. *et al.* Electrodeposition of bactericidal and bioactive nano-hydroxyapatite onto electrospun piezoelectric polyvinylidene fluoride scaffolds. **Journal of Materials Research**, p. 1-11, 2020.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 722, n. 1, p. 225-254, 1999/02/05/ 1999.

ROSEN, A. B.; KELLY, D. J.; SCHULDT, A. J. T.; LU, J. *et al.* Finding Fluorescent Needles in the Cardiac Haystack: Tracking Human Mesenchymal Stem Cells Labeled with Quantum Dots for Quantitative In Vivo Three-Dimensional Fluorescence Analysis. **STEM CELLS**, 25, n. 8, p. 2128-2138, 2007.

RUMPEL, E.; WOLF, E.; KAUSCHKE, E.; BIENENGRÄBER, V. *et al.* The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. **Folia morphologica**, 65, n. 1, p. 43-48, 2006.

RUPPRECHT, S.; MERTEN, H.-A.; KESSLER, P.; WILTFANG, J. Hydroxyapatite cement (BoneSource™) for repair of critical sized calvarian defects—an experimental study. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, 31, n. 3, p. 149-153, 2003.

SAKAMOTO-HOJO, E. Hibridação in situ fluorescente (FISH): aplicação à mutagênese ambiental. **Mutagênese Ambiental. Canoas: ULBRA**, p. 225-246, 2003.

SANTANA-MELO, G. F.; RODRIGUES, B. V. M.; DA SILVA, E.; RICCI, R. *et al.* Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 155, p. 544-552, 2017/07/01/ 2017.

SANTOS, N. C. N. d. Avaliação da genotoxicidade e da citotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos e do ensaio cometa em linfócitos humanos. 2015.

SANTOS, R. A. L.; MULLER, C. M. O.; GROSSMANN, M. V. E.; MALI, S. *et al.* Starch/poly (butylene adipate-co-terephthalate)/montmorillonite films produced by blow extrusion. **Química Nova**, 37, p. 937-942, 2014.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. *In: Chemical mutagens*: Springer, 1976. p. 31-53.

SCHMIDT, H.; SCHLÖRICKE, E.; FISLAGE, R.; SCHULZE, H.-A. *et al.* Effect of Surface Modifications of Intraocular Lenses on the Adherence of *Staphylococcus epidermidis*. **Zentralblatt für Bakteriologie**, 287, n. 1, p. 135-145, 1998/01/01/ 1998.

SCHMITZ; HOLLINGER; MILAM. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 57, n. 9, p. 1122-1126, 1999.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environ Mol Mutagen**, 38, n. 1, p. 38-45, 2001.

SHI, Z.; HUANG, X.; CAI, Y.; TANG, R. *et al.* Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. **Acta biomaterialia**, 5, n. 1, p. 338-345, 2009.

SHU-JIAN, C.; YAO, B.; XUN-BIN, H.; JIN-PING, S. *et al.* Genotoxic and Biological Evaluation of a Nano Silica Cross Linked Composite Specifically Used for Intra-Vas Device. **Soft Nanoscience Letters**, 2012, 2012.

SIEGENTHALER; KÜNKEL; SKUPIN; YAMAMOTO. Ecoflex® and Ecovio®: biodegradable, performance-enabling plastics. *In: Synthetic biodegradable polymers*: Springer, 2011. p. 91-136.

SILVA. **Desenvolvimento e caracterização de blendas de polímeros biodegradáveis e polipirrol**. 2009. -, Universidade de São Paulo.

SILVA; SANTANA-MELO; FERREIRA; SILVA *et al.*, 2014, **Avaliação da citotoxicidade de nanofibras de poli (butileno adipato-co-tereftalato) com nanohidroxiapatita e nanotubos de carbono superhidrofílicos incorporados**.

SILVA, E. A. d. **Desenvolvimento e caracterização de blendas de polímeros biodegradáveis e polipirrol**. 2009. -, Universidade de São Paulo.

SILVA, M. R. d. S.; ANDRADE, S. R. d. S.; AMARAL, W. N. d. Fisiopatologia da osteoporose: uma revisão bibliográfica. **Femina**, p. 241-244, 2015.

SINGARAJU, M.; SINGARAJU, S.; PARWANI, R.; WANJARI, S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: A micronucleus study. **J Cytol**, 29, n. 1, p. 1-5, Jan 2012.

SINGH, N.; MANSHIAN, B.; JENKINS, G. J.; GRIFFITHS, S. M. *et al.* NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, 30, n. 23-24, p. 3891-3914, Aug 2009.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SIQUEIRA, I. A. W. B.; CORAT, M. A. F.; CAVALCANTI, B. d. N.; NETO, W. A. R. *et al.* In Vitro and in Vivo Studies of Novel Poly(d,l-lactic acid), Superhydrophilic Carbon Nanotubes, and Nanohydroxyapatite Scaffolds for Bone Regeneration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 7, n. 18, p. 9385-9398, 2015/05/13 2015.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). *In: DNA repair protocols*: Springer, 1999. p. 203-212.

SPEIT, G.; SCHMID, O.; FROHLER-KELLER, M.; LANG, I. *et al.* Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. **Mutat Res**, 627, n. 2, p. 129-135, Mar 5 2007.

SZCZES, A.; HOLYSZ, L.; CHIBOWSKI, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. **Adv Colloid Interface Sci**, 249, p. 321-330, Nov 2017.

TAUTZENBERGER, A.; KOVTUN, A.; IGNATIUS, A. Nanoparticles and their potential for application in bone. **International journal of nanomedicine**, 7, p. 4545-4557, 2012.

THELEN; BARTHELAT; BRINSON. Mechanics considerations for microporous titanium as an orthopedic implant material. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, 69, n. 4, p. 601-610, 2004.

THOMPSON; MOULTON; RICHARDSON; WALLACE. Effect of the dopant anion in polypyrrole on nerve growth and release of a neurotrophic protein. **Biomaterials**, 32, n. 15, p. 3822-3831, 2011.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

UENO, S.; KASHIMOTO, T.; SUSA, N.; NATSUME, H. *et al.* Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body X-irradiation using the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 634, n. 1-2, p. 135-145, 2007.

VALADARES, B. L. B.; ALVES, M. V.; SANTOS, A. L. P.; CARDOSO, M. N. Avaliação de atividade mutagênica de amostras de própolis vermelha do Estado de Sergipe (Brasil) pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster*. **Scientia Plena**, 11, n. 1, 2015.

VAN LOOSDRECHT, M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G. *et al.* Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, 53, n. 8, p. 1898-1901, 1987.

VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL, P.; SCHACHT, E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. **Biomacromolecules**, 12, n. 5, p. 1387-1408, 2011/05/09 2011.

VANDROVCOVÁ; BACAKOVA. Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. **Physiological Research**, 60, n. 3, p. 403, 2011.

VENTURELLI, R. B.; GRIPA, S., 2017, **ELETROFIAÇÃO: UMA ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE NÃOTECIDOS**.

WALLACE; TEASDALE; SPINKS; KANE-MAGUIRE. **Conductive electroactive polymers: intelligent materials systems**. CRC press, 2002. 1420031899.

WAN; NACAMULI; LONGAKER. Craniofacial bone tissue engineering. **Dental Clinics**, 50, n. 2, p. 175-190, 2006.

WANG; GU; YUAN; CHEN *et al.* Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, 68, n. 3, p. 411-422, 2004.

WANG; ROBERGE; DAO; WAN *et al.* In vivo evaluation of a novel electrically conductive polypyrrole/poly (d, l-lactide) composite and polypyrrole-coated poly (d, l-lactide-co-glycolide) membranes. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, 70, n. 1, p. 28-38, 2004.

WANG, C.; CHENG, L.; XU, H.; LIU, Z. Towards whole-body imaging at the single cell level using ultra-sensitive stem cell labeling with oligo-arginine modified upconversion nanoparticles. **Biomaterials**, 33, n. 19, p. 4872-4881, 2012/06/01/ 2012.

WANG, S.; ZHONG, S.; LIM, C. T.; NIE, H. Effects of fiber alignment on stem cells–fibrous scaffold interactions. **Journal of Materials Chemistry B**, 3, n. 16, p. 3358-3366, 2015. 10.1039/C5TB00026B.

WANG, X.; SONG, G.; LOU, T. Fabrication and characterization of nano-composite scaffold of PLLA/silane modified hydroxyapatite. **Medical Engineering & Physics**, 32, n. 4, p. 391-397, 2010/05/01/ 2010.

WEBSTER, T. J.; ERGUN, C.; DOREMUS, R. H.; SIEGEL, R. W. *et al.* Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. **Biomaterials**, 21, n. 17, p. 1803-1810, 2000.

WILLIAM JR, D. C. *Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução*. Ed. LTC, Rio de Janeiro, 2012.

WU, S.; WENG, Z.; LIU, X.; YEUNG, K. W. K. *et al.* Functionalized TiO₂ Based Nanomaterials for Biomedical Applications. **Advanced Functional Materials**, 24, n. 35, p. 5464-5481, 2014.

XIAO; LU; YEH. Crystallization behavior of fully biodegradable poly (lactic acid)/poly (butylene adipate-co-terephthalate) blends. **Journal of applied polymer science**, 112, n. 6, p. 3754-3763, 2009.

YI, C.; LIU, D.; FONG, C.-C.; ZHANG, J. *et al.* Gold Nanoparticles Promote Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells through p38 MAPK Pathway. **ACS Nano**, 4, n. 11, p. 6439-6448, 2010/11/23 2010.

ZEIGER, E. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 28, n. 2, p. 85-95, 1998.

ZHANG, Z.-G.; LI, Z.-H.; MAO, X.-Z.; WANG, W.-C. Advances in bone repair with nanobiomaterials: mini-review. **Cytotechnology**, 63, n. 5, p. 437, 2011/07/12 2011.

ZHOU; LAWRENCE; BHADURI. Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review. **Acta Biomaterialia**, 8, n. 6, p. 1999-2016, 2012.