

UNESP
Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá

Guaratinguetá
2015

MARISA APARECIDA DE SOUZA

**INCORPORAÇÃO DA APATITA NA SUPERFÍCIE DA LIGA TI30TA
EMPREGANDO TRATAMENTO ALCALINO ASSOCIADO À
ELETROFIAÇÃO DE FIBRAS DE PCL**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia do
Campus de Guaratinguetá, Universidade
Estadual Paulista, para a obtenção do título de
Doutor em Engenharia Mecânica na área de
Materiais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro
Co-orientadora: Dr^a. Patrícia Capellato

GUARATINGUETÁ
2015

S729i	Souza, Marisa Aparecida de Incorporação da apatita na superfície da liga Ti30ta empregando tratamento alcalino associado à eletrofiação de fibras de PCL / Marisa Aparecida de Souza - Guaratinguetá, 2015 120 f. : il. Bibliografia: f. 106-120 Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2015. Orientadora: Profª Drª Ana Paula Rosifini Alves Claro Coorientadora: Patrícia Capellato 1. Ligas de titânio 2. Ligas de titânio – superfícies 3. Apatita I. Título CDU 669.295(043)
-------	--

MARISA APARECIDA DE SOUZA

**ESTA TESE FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
“DOUTOR EM ENGENHARIA MECÂNICA”**

**PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
ÁREA: MATERIAIS**

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO


Prof. Dr. Edson Cocchieri Botelho
Coordenador

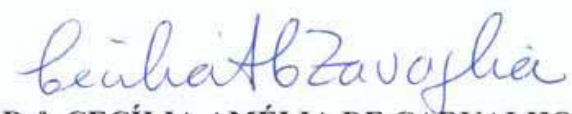
BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO
Orientador / UNESP/FEG


Prof. Dr. EDSON COCCHIERI BOTELHO
UNESP/FEG


Prof. Dr. CRISTIANE APARECIDA ASSIS CLARO
UNITAU


Prof. Dr. ESTEVÃO TOMOMITSU KIMPARA
UNESP/SÃO JOSÉ DOS CAMPOS


Prof. Dr. CECÍLIA AMÉLIA DE CARVALHO
UNICAMP

Janeiro de 2015

DADOS CURRICULARES

MARISA APARECIDA DE SOUZA

NASCIMENTO 24.08.1970 – APARECIDA /SP

FILIAÇÃO Benedito de Oliveira Souza
 Benedita Aparecida de Souza

1989/1992 Curso de Graduação em Odontologia
 Universidade de Uberaba –MG (UNIUBE)

1994/1995 Curso de Especialização em Endodontia
 Associação Brasileira de Ensino Odontológico/ABENO
 São Paulo- SP

2009/2011 Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica
 Mestrado
 Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá- FEG/ UNESP
 Área de Materiais

2012/2014 Curso de Especialização em Prótese Odontológica
 Associação Paulista de Odontologia- APCD
 São José dos Campos - SP

DEDICATÓRIA

Aos meus afilhados fofos Arthur e Lucas,
e aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, pelas oportunidades, pela inteligência,

aos meus pais, pela dedicação e esforço pelas minhas conquistas.

a minha orientadora, Prof. Dra. Ana Paula Rosifini Alves Claro, pela ajuda, pelo compartilhamento de seus conhecimentos e pela amizade.

ao Prof. Dr. Tomaz Manabu Hashimoto que me incentivou no início da minha vida acadêmica e no início do doutorado como co-orientador, muito obrigada.

ao Prof. Dr. Alfeu Saraiva Ramos pela ajuda no início do doutorado, como orientador, muito obrigada.

A Giselia Alves de Souza, que me auxiliou no início da minha jornada.

ao Prof. Dr. Ketul Popat (Colorado State University) pelo laboratório de cultura de células.

a Dra. Patrícia Capellato pela co-orientação.

ao Prof. Dr. Roberto Zenhei Nakazato a técnica em química Conceição Aparecida Matsumoto Dutra pelo laboratório de Química e pela atenção.

ao Prof. Dr. Marcos Akira D'Ávila pelo laboratório de Polímeros e Eletrofiação da UNICAMP.

a Dra. Rosemeire dos Santos Almeida (UNICAMP) pela ajuda no processo de eletrofiação na prática e teoria.

ao Prof. Dr. Ronaldo Spezia Nunes (UNESP/FEG) pela ajuda nas análises FTIR.

ao Prof. Dr. Edson Cocchieri Botelho (UNESP/FEG), a aluna Cirlene Fourquet e Elton Espíndola pelo laboratório de análises térmicas.

ao Prof. Dr. Paulo Suzuki do DEMAR/USP pelo laboratório de difração de Raios X.

aos alunos Reginaldo Konatu, André Rangel, Celso Bortolletto, Cristiane Mayum, Ana Lúcia Amaral, Gilda Maria Cortez Pereira, pela ajuda durante todo o processo laboratorial.

ao aluno João Pedro Aquires Carobolante, que me auxiliou sempre com disposição e eficiência.

ao aluno Javier Munoz Chaves pela realização das análises na Universidade de São Carlos (UfSCar).

a aluna Carolina Martinelli pela ajuda durante as realizações das análises de cultura de células.

aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FEG/UNESP, Regina Célia Galvão Faria Alves, Maria Cristina Silva de Oliva, Renata Pereira da Rocha Barbosa e Rodrigo José Nunes pela atenção e compreensão.

a todos os funcionários da FEG/UNESP que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Sem a convicção de uma harmonia íntima do Universo,
não poderia haver ciência”

Albert Einstein

SOUZA, M. A. **Incorporação da apatita na superfície da liga Ti30Ta empregando tratamento alcalino associado à eletrofiação de fibras de PCL**. 2015. 120f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica)-Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2015.

RESUMO

O uso da liga Ti30Ta para aplicações biomédicas tem sido avaliado devido as suas propriedades, como, biocompatibilidade e baixo módulo de elasticidade (menor que o aço inoxidável e o titânio puro). Quando esses materiais são inseridos no corpo humano as propriedades de sua superfície induzirão uma resposta tecidual e osseointegração. As técnicas de modificação de superfície são utilizadas para modificar a superfície inerte para uma melhor interação osso/biomaterial. Ligas experimentais com 30% em peso de Ta foram produzidas de chapas de titânio comercialmente puro (99,9%) e tântalo (99,9%) e como grupo controle foram utilizadas ligas de Ti6Al4V, a mais utilizada nos dias atuais e a liga de titânio comercialmente puro (TiCP). Os lingotes das ligas foram obtidos a partir da fusão dos elementos puros em forno a arco voltaico, com atmosfera de argônio e cadinho de cobre refrigerado a água. O tratamento térmico de homogeneização foi realizado após essa etapa a 1000°C por 24h com resfriamento dentro do forno. Discos com 6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram cortados para o tratamento. As amostras de Ti30Ta foram imersas em solução de NaOH (1M) por 24h, as de Ti6Al4V e TiCP (5M) por 24h e secas a temperatura ambiente, imersas em HCl por uma hora e colocadas em estufa a 40°C por 24h. Em seguida, PCL foram depositados nas ligas de Ti30Ta, Ti6Al4V e no TiCP através da eletrofiação. Foi utilizado o PCL (MW 70000-90000), marca Sigma Aldrich, clorofórmio/acetona (Merck 99.0%) e (Synth 99.5%) na proporção 1:1. Para as soluções, uma concentração de 13.6% peso foi dissolvido para a eletrofiação de PCL, 24h antes da utilização da solução. Para o processo de eletrofiação, utilizou-se um equipamento composto por uma bomba de infusão e um anteparo coletor de alumínio para a acomodação das amostras. Após a eletrofiação das amostras, foi realizada a imersão das amostras em solução de 0,5M CaCl₂ e 0,3M Na₂HPO₄ para o crescimento de apatita. A morfologia das superfícies das amostras foi avaliada através do microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (FEG/MEV), para avaliação da composição foi realizada a espectroscopia de energia dispersiva (EDS), microscópio confocal para avaliação da rugosidade, difração de raios X para a caracterização microestrutural dos materiais e a molhabilidade do material através do ângulo de contato. Para a análise térmica da manta de fibras de PCL foram utilizadas as análises, espectroscopia de infra-vermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Para avaliação da adesão e proliferação celular foi utilizado o (MEV/FEG). Foi observada a deposição uniforme das fibras e boa adesão das fibras nas superfícies das ligas Ti30Ta, Ti6Al4V e TiCP. As nanofibras de PCL exibem comportamento hidrofóbico, porém após a imersão nas soluções tornou-se hidrofílico com formação de apatita. Nas amostras eletrofiadas e eletrofiadas com mineralização foram observadas proliferação celular e espalhamento. Estes resultados mostram a viabilidade com esta técnica, melhorando as propriedades da superfície das ligas de titânio.

PALAVRAS-CHAVES: Ligas de titânio. Tratamento de superfície. Tratamento Alcalino. Eletrofiação

SOUZA, M. A. Incorporate of apatite on the surface of Ti 30Ta employing alkaline treatment associated with electrospinning PCL fibers. 2015. 120f. Thesis (Doctorate in Mechanical Engineering) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2015.

ABSTRACT

The use of the Ti-30Ta alloy for biomedical applications has been evaluated due to their properties, such as, biocompatibility and lower elastic modulus than stainless steel and titanium CP. When these materials are inserted inside human body the surface properties will affect their response and osseointegration. Surface modifications techniques can be used for change the inert surface of titanium alloys for better interaction bone/biomaterial. Experimental alloy with Ta concentration of 30 wt% was produced from sheets of commercially pure titanium (99.9%) and tantalum (99.9%) and control groups Ti6Al4V and titanium commercially pure (TiCP). Ingots were melted in an arc furnace under an argon atmosphere and re-melted ten times at least. They were homogenized under vacuum at 1000 °C for 86.4 ks to eliminate chemical segregation and cold-worked by swaging. Discs with 6 mm diameter and 3 mm in height were cut for surface treatment. Samples were immersed in aqueous NaOH solution (1 M) for 24h, Ti6Al4V and TiCP (5M), dried at room temperature, immersed in HCl for one hour and dried at 40 °C in oven for 24 hours. Followed, PCL fibers were deposited on the Ti30Ta alloy discs surfaces by electrospinning. PCL (MW 70000-90000) was used supplied by Sigma Aldrich, a chloroform / acetone (Merck 99.0%) and (Synth 99.5%) in the proportion 1:1 by weight. For solutions, a concentration of 13.6 wt% was dissolved to PCL electrospinning, maintained under mechanical stirring for 24 hours preparing the solution. For the electrospinning process, it was used a device consisting of infusion pump and a collector screen an aluminum plate was used for samples with accommodation. After deposition samples were immersed in 0,3 M CaCl₂ solution and 0,5 M Na₂HPO₄ solution for apatite growth. Morphology of the alloy surface was evaluated by FEM, EDX, XRD, Confocal Microscope, Contact Angle, FTIR Spectroscopy, TGA and DSC. For cell adhesion and proliferation SEM/FE was used. Crystal structure was analyzed by wide-angle X-ray diffraction. Also the contact angle measurements were taken. It can be observed uniform deposition and good adhesion of the fibers on the Ti30Ta alloy surface. Electrospun PCL nanofibers exhibited hydrophobic behavior however the values were reduced and hydrophilic surfaces were obtained after solution immersion with apatite formation. Electrospinning samples and electrospinning samples with mineralization showed cells proliferation and spreading. These results show the viability this technique for improve surface properties of titanium alloys.

KEYWORDS: Titanium alloys. Surface treatment. Alkaline treatment. Electrospinning

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquematizado do implante	23
Figura 2 – Atividade celular	25
Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura de Ravichandran	31
Figura 4 – Imagem da matriz extra-celular original e da manta de PCL	32
Figura 5 – Aplicações de polímeros	36
Figura 6 – Fórmula estrutural do PCL poli (ϵ -caprolactona)	36
Figura 7 - Fluxograma da metodologia empregada	38
Figura 8 – Amostra de Ti30Ta	39
Figura 9 - Banho termostatzado marca Tecnal TE-184	40
Figura 10 – Amostras com tratamento alcalino/após eletrofiação	41
Figura 11 - Equipamento utilizado para a eletrofiação	42
Figura 12 - Amostras durante o processo de mineralização com Ca/P	42
Figura 13 - Amostras na placa de 24 poços com células (ADSC)	44
Figura 14 – Fluxo laminar	45
Figura 15 - Equipamento TG/DTA <i>SII Nanotechnology</i>	46
Figura 16 - Equipamento <i>SII Nanotechnology</i>	47
Figura 17 - Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Magellan 400L	48
Figura 18 - Equipamento <i>Supter Coater, Baltec</i>	48
Figura 19 - Difratorômetro marca Panalytical	49
Figura 20 - Goniômetro modelo DSA 100 marca Krüss	50
Figura 21 - FTIR da manta de PCL poli (ϵ -caprolactona)	51
Figura 22 - Análise Termogravimétrica (TGA) da manta de PCL	52

Figura 23 - Análise termogravimétrica (TGA) da manta de PCL com imobilização de Ca/P	53
Figura 24 - Curvas de DSC (1° aquecimento) da manta de PCL	54
Figura 25 – Curva de DSC (2° aquecimento) da manta de PCL	55
Figura 26 - Curvas de DSC da manta de PCL e manta PCL/Ca/P	56
Figura 27 - Curva DSC de resfriamento da manta de PCL	57
Figura 28 - Micrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura, Manta PCL, Manta PCL mineralizada	60
Figura 29 - Gráfico do diâmetro das fibras de PCL	61
Figura 30 - Gráfico do diâmetro das fibras de PCL/ mineralização com Ca/P	61
Figura 31 – Microscopia eletrônica de varredura da liga Ti30Ta	64
Figura 32 – Microscopia eletrônica de varredura da liga Ti30Ta/Ca/P	65
Figura 33a – Microscopia confocal da liga Ti30Ta lixada	67
Figura 33b – Microscopia confocal da liga Ti30Ta/alcalino	67
Figura 34a – Região observada para determinação da apatita	69
Figura 34b - EDS da liga Ti30Ta após eletrofiação com PCL e mineralização	69
Figura 35 – Difração de Raios X da liga Ti30Ta	70
Figura 36 – Microscopia eletrônica de varredura da liga Ti6Al4V	71
Figura 37 – Microscopia eletrônica de varredura da liga Ti6Al4V/Ca/P	72
Figura 38a – Microscopia confocal da liga Ti6Al4V lixada	73
Figura 38b – Microscopia confocal da liga Ti6Al4V/alcalino	73
Figura 39a – Região observada para determinação da apatita	75
Figura 39b – EDS da liga Ti6Al4V após eletrofiação com PCL e mineralização	75
Figura 40 – Difração de Raios X da liga Ti6Al4V	76
Figura 41 – Microscopia eletrônica de varredura do titânio CP	77
Figura 43 – Microscopia eletrônica de varredura do titânio CP/Ca/P	78
Figura 43a – Microscopia confocal do titânio CP lixada	79
Figura 43b – Microscopia confocal do titânio CP/alcalino	79
Figura 44a – Região observada para determinação da apatita	82
Figura 44b – EDS do titânio CP após eletrofiação com PCL e mineralização	82
Figura 45 – Difração de Raios X do titânio CP	83
Figura 46 – Imagens das células-tronco (ADSC) após 1 dia de	

cultura celular na liga Ti30Ta (500x) (a) e com aumento (1000x) (b)	87
Figura 47 – Imagens das células-tronco (ADSC) após 4 dias de	
cultura celular na liga Ti30Ta lixada (500x) (a) e aumento (1000x) (b)	88
Figura 48 – Imagens de células-tronco após 7 dias de	
cultura celular na liga Ti30Ta lixada (250x) (a) e aumento (500x) (b)	89
Figura 49 – Imagens das células-tronco (ADSC) após 1 dia de	
cultura celular na liga Ti30Ta eletrofiada com PCL (500x) (a)	
e aumento (1000x) (b)	90
Figura 50 – Imagens das células-tronco (ADSC) após 4 dias de	
cultura celular na liga Ti30Ta eletrofiada com PCL (500x) (a)	
e aumento (1000x) (b)	91
Figura 51 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 7 dias de	
cultura celular na liga Ti30Ta eletrofiada com PCL (500x) (a)	
e aumento (1000x) (b)	92
Figura 52 – Imagens das células-tronco após 1 dia de	
cultura celular na liga Ti30Ta eletrofiada com PCL e	
mineralização com Ca/P (500x) (a) e aumento (1000x) (b)	93
Figura 53 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 4 dias de	
cultura celular na liga Ti30Ta eletrofiação com PCL e	
mineralização com Ca/P (500x) e aumento (1000x) (b)	94
Figura 54 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 7 dias de	
cultura celular da liga Ti30Ta após eletrofiação com PCL e	
mineralização com Ca/P (500x) (a) e aumento (1000x) (b)	95
Figura 55 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 1 dia de	
cultura celular do TiCP lixado (250x) (a) e aumento (500x) (b)	96
Figura 56 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 4 dias de	
cultura celular no TiCP lixado (250x) (a) e aumento (500x) (b)	97

Figura 57 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 7 dias de cultura celular do TiCP lixado (250x) (a) e aumento (500x) (b)	98
Figura 58 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 1 dia de cultura celular no TiCP eletrofiado com PCL (500x) (a) e aumento (1000x) (b)	99
Figura 59 – Imagens de células-tronco após 4 dias de cultura celular no TiCP eletrofiado com PCL (500x) (a) e aumento (1000x) (b)	100
Figura 60 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 7 dias de cultura celular do TiCP eletrofiadas com PCL (500x) (a) e aumento (1000x) (b)	101
Figura 61 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 1 dia de cultura celular no TiCP após eletrofiação e mineralização com Ca/P (500x) (a) e aumento (1000x) (b)	102
Figura 62 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 4 dias de cultura celular no TiCP após eletrofiação com PCL e mineralização com Ca/P (500x) (a) e aumento (1000x) (b)	103
Figura 63 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 7 dias de cultura celular no TiCP após eletrofiação com PCL e mineralização com Ca/P (500x) (a) e aumento (2000x) (b)	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Módulo de elasticidade do titânio comercialmente puro (TiCP) e algumas ligas	22
Quadro 2 – Concentração iônica (mM) do plasma sanguíneo, do SBF e os respectivos pH	27
Quadro 3 - Tipos de fosfatos de cálcio (Ca/P)	28
Quadro 4 - Índice de bioatividade (Ib) de algumas biocerâmicas	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de processamento CA/CC	41
Tabela 2 - Análise térmica da fibra de PCL eletrofiada	58
Tabela 3 - Valores da rugosidade da liga Ti30Ta lixada e após tratamento alcalino	66
Tabela 4 - Valores de rugosidade da liga Ti6Al4V lixada e após o tratamento alcalino/HCl	74
Tabela 5 - Valores de rugosidade do titânio comercialmente puro lixado e após tratamento alcalino/HCl	80
Tabela 6 - Valores da rugosidade da liga Ti30Ta, Ti6Al4V e do titânio comercialmente puro	(CP) 80
Tabela 7 - Tabela com as medidas do ângulo de contato	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
2.2 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE LIGAS DE TITÂNIO	26
2.3 ELETROFIAÇÃO	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Obtenção das amostras	39
3.2 Tratamento de superfície	40
3.2.1 Tratamento alcalino	40
3.2.2 Eletrofiação	41
3.2.3 Imobilização de apatita empregando solução Ca/P	42
3.3 Cultura celular	43
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA FIBRA DO POLÍMERO (ϵ -CAPROLACTONA) PCL APÓS ELETROFIAÇÃO	46
3.5 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS LIGAS APÓS ELETROFIAÇÃO	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA FIBRA DO POLÍMERO (ϵ -CAPROLACTONA) PCL APÓS ELETROFIAÇÃO	51
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS LIGAS APÓS ELETROFIAÇÃO	62
4.2.1 Molhabilidade	84
4.3 AVALIAÇÃO CELULAR	87
5 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	106
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	120

INTRODUÇÃO

Desde os tempos primórdios, o homem busca soluções para as perdas físicas do corpo humano, oriundas da busca inconsciente da evolução mental e consciente da tecnológica, com choques de ideais e ideias demonstradas através das guerras e revoluções, ou mesmo, pela busca apenas do instinto de sobrevivência. Durante as guerras foram descobertas várias formas e materiais para a reparação das perdas físicas e assim foi sendo possível identificar um material que melhor se integre ao corpo humano, minimizando os problemas, como rejeições, toxicidade e durabilidade e proporcionar às pessoas melhores condições de regeneração.

Os biomateriais são utilizados em aplicações ortopédicas, cardiovasculares bem como em outras áreas da Medicina, e também na Odontologia, na confecção de implantes dentários, dentre outras aplicações. O estudo de materiais para essas aplicações se intensificou nos últimos anos, com o desenvolvimento de ligas metálicas como aço inoxidável e ligas cobalto-cromo.

O início do emprego do titânio na Odontologia ocorreu na década de 1960 com o experimento de um pesquisador sueco, Bränemark, que verificou a capacidade deste material em se osseointegrar ao osso humano durante a realização de um experimento em tibia de coelho. Ao introduzir um cilindro de titânio no animal para inserir uma câmera fotográfica verificou que, ao tentar retirar o dispositivo, o material estava aderido ao osso (BRÄNEMARK, 1985). A partir deste resultado, ele aprofundou seus estudos definindo um dos principais conceitos empregados até hoje na área odontológica: a osseointegração. Esta descoberta teve o seu lado social, contribuindo para a melhoria da vida das pessoas com perdas dentárias extensas e perdas físicas, e também científico, resultando no crescimento dos estudos nesta área.

Além da biocompatibilidade responsável pela osseointegração, o titânio apresenta excelentes propriedades mecânicas e resistência à corrosão devido à formação de uma camada passiva de dióxido de titânio. Uma das maiores limitações atribuídas ao seu uso está no módulo de elasticidade elevado, o que resultou na adição de elementos de ligas como nióbio, tântalo, molibdênio, que diminuem o módulo de elasticidade (LIU et al., 2004, GEETHA et al., 2009). A liga Ti-6Al-4V é bastante empregada, no entanto, pesquisas mostram que o alumínio e o vanádio podem ser tóxicos ao corpo humano. Já existem vários estudos relacionando o alumínio com doenças degenerativas como

Alzheimer e Mal de Parkinson, sendo encontrados níveis elevados de alumínio em pessoas que foram a óbito por essas doenças (SIMÕES et al., 1994, FERREIRA et al., 2008).

Dessa forma, ligas de titânio, livres de elementos tóxicos, são alvo de diversas pesquisas (KIM et al., 1997, NISHIGUCHI et al., 1999, BARRERE et al., 2002, LIU et al., 2004, RACK et al. 2006, NIEMEYER et al. 2006, OLIVEIRA et al. 2007, NIINOMI 1998, 2008, WANG et al., 2008, CHEN et al., 2009, GEETHA et al., 2009).

O titânio e suas ligas são considerados bioinertes, ou seja, não induzem resposta local do sistema imunológico, e para torná-lo bioativo, com uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo, sem camada de tecido fibroso, tratamentos de superfície podem ser empregados, como, método por deposição assistida de feixe de íons por *sputtering* (LACEFIELD, 1998, MATTOX, 2000), método plasma-spray (AMARANTE et al., 2001), método sol-gel (SANTOS et al., 2005), eletrólise (GUASTALDI et al., 2010), jateamento de partículas (GIL, 2006), ataque ácido (COOPER, 2006), anodização eletroquímica (KIM et al., 2011), implantação iônica (BYON, 2005) e biomimético (WEI et al., 2002, LI et al., 2002, BARRERE et al., 2002, 2004, JONASOVA et al., 2004, GUASTALDI et al., 2010). De um modo geral os tratamentos produzem superfícies rugosas, modificam a composição superficial, melhoram a resistência à abrasão, à corrosão, e aumentam a compatibilidade sanguínea (LIU et al., 2004) aumentando, com isso, a interação osso-material.

Em vários tratamentos ocorre a formação de hidroxiapatita, que é um material biocerâmico e é o constituinte principal da fase mineral dos ossos. A hidroxiapatita tem capacidade de adsorção, ou seja, de fixar em sua superfície moléculas de outra substância e esta propriedade faz com que ela possa ser utilizada como suporte para antibióticos sobre a superfície do metal (COSTA et al., 2009).

Outro material que vem sendo muito pesquisado como biomaterial, são os polímeros. Existem vários métodos de deposição desses materiais, dentre eles, a eletrofição que desde a década de 1990, vem sendo aplicada na Engenharia de Tecidos no processamento de polímeros para ancoragem celular (BARBANTI et al., 2004).

A partir do exposto, essa pesquisa tem como objetivo geral empregar a eletrofição para a deposição de fibras de PCL na superfície da liga Ti30Ta visando melhorar a adesão celular.

Para que fosse possível alcançar esse objetivo geral foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Estudo do tratamento de superfície NaOH prévio a eletrofiação;
- 2) Eletrofiação do polímero PCL na superfície da liga na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP);
- 3) Emprego de técnicas para mineralização do polímero com cálcio e fosfato;
- 4) Caracterização da fibra do polímero após a eletrofiação por meio das análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA);
- 5) Caracterização da superfície da liga após eletrofiação e mineralização por meio das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), difração de raios X, microscopia confocal e medidas do ângulo de contato;
- 6) Cultura celular com células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) realizada na Universidade do Colorado, com a supervisão do Prof. Dr. Ketul Popat para verificação da adesão e proliferação celular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A história dos materiais utilizados para reparação do corpo humano vem desde a.C.; existem relatos da utilização em suturas, e reparação de dentes com ouro e madeira pelos romanos, chineses e astecas. No século XVIII e XIX com a Revolução Industrial houve um avanço nos conhecimentos anatômicos e fisiológicos do corpo humano levando a um aprimoramento das técnicas e dos materiais. A Segunda Guerra Mundial também trouxe conhecimentos sobre materiais e os médicos observaram que alguns projéteis promoviam uma menor reação de corpo estranho ao organismo (RATNER et al., 1996).

Em 1982, na Conferência do Instituto de Desenvolvimento de Consenso em Saúde, definiu-se como biomaterial, “qualquer substância, ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, capaz de tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo por um período de tempo” (HELMUS E TWEDEN, 1995). Os biomateriais começaram a ser utilizados como dispositivos médicos, próteses ortopédicas, oculares, odontológicas e nos dias atuais existem mais de 40 tipos de biomateriais em mais de 50 implantes diversos (FRANÇA et al., 2005, RODRIGUES, 2013).

Os biomateriais são classificados de acordo com a interação com os tecidos adjacentes após a inserção no organismo. De acordo com Geetha et al. (2009) os biomateriais podem ser classificados como:

- Biotolerantes: ocorre a formação de tecido fibroso na interface material/osso, prejudicando a conexão direta, como titânio, a liga Co-Cr e Polimetilmetacrilato (PMMA);
- Bioativos: ocorre a formação de osso ao redor do implante e uma forte interação com a superfície do implante, como fosfato de cálcio sintético, incluindo hidroxiapatita;
- Bioreabsorvíveis: materiais que substituem o tecido autógeno, como alguns polímeros e osso processado.

Com o titânio, depois de meses, ocorre a osseointegração, mas o processo é muito lento e quando colocado sobre função, ou seja, com carga, ocorre o insucesso da implantação (ALBREKTSSON et al., 1987).

O estudo do emprego de implantes dentários teve início na década de 1960 com pesquisas sobre a reação da medula óssea frente a vários traumas e procedimentos clínicos. O conceito de osseointegração definido como sendo a “conexão estrutural direta e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante suportando carga”, que alavancou os estudos na área Odontológica, surgiu nessa ocasião a partir de resultados de Bränemark na condução de experiências com animais (BRÄNEMARK, 1985). Durante a retirada de uma câmera instalada em tíbia de coelho e envolvida por um cilindro de titânio, o metal que a envolvia e o osso, estavam completamente unidos (integrados) sem qualquer rejeição. Com esta informação, foram desenvolvidos cilindros personalizados para serem implantados em osso maxilar ou mandibular, e em longo prazo, foram colocadas e confeccionadas próteses parciais fixas, que permitissem a função por dez anos (BRÄNEMARK, 1983). Esta técnica foi sendo aperfeiçoada pelos pesquisadores, criando o sistema mais evoluído de prótese fixa mundial daquela época. Com esse sistema, cerca de três mil desdentados da Suécia, quase todos idosos, foram reabilitados com os implantes osseointegrados (BRÄNEMARK, 1985).

O titânio comercialmente puro (TiCP) foi amplamente empregado na fabricação de implantes dentários por causa da sua excelente resistência à corrosão, devido à camada passiva de dióxido de titânio e biocompatibilidade. As pesquisas com ligas alternativas a base de titânio com a adição de elementos de liga cresceram, com a finalidade de melhorar as suas propriedades mecânicas, tendo como principal objetivo a redução do módulo de elasticidade conforme pode ser verificado no Quadro 1. O titânio CP apresenta módulo de elasticidade correspondente a aproximadamente 110 GPa. Com a adição de elementos como nióbio (Nb), zircônio (Zr), molibdênio (Mo) e tântalo (Ta) é possível a obtenção de valores mais reduzidos, no entanto, ainda superiores ao osso (10-40 GPa) (KIM et al., 1997, NIINOMI et al., 1998, 2008, NISHIGUCHI et al., 1999, BARRERE et al., 2002, LIU et al., 2004, RACK et al., 2006, WANG et al., 2008, CHEN et al., 2009, GEETHA et al., 2009).

O módulo de elasticidade é uma propriedade mecânica dos materiais demonstrada através da razão entre a tensão aplicada e a deformação resultante de um material. Quando os módulos de elasticidade entre dois materiais são muito diferentes,

muito distantes os valores, ocorre um processo chamado *stress shielding* ou tensão de blindagem, ocorrendo reabsorção óssea (GOMES et al., 2010, BRAGA et al., 2007).

Como foi dito anteriormente a diminuição do módulo de elasticidade é requerida para uma melhor resposta óssea e cabe ressaltar que esta diminuição não interfere na resistência do material, e assim, o baixo módulo de elasticidade pode coexistir com uma elevada tensão de ruptura (GOMES et al., 2010).

Com a evolução do conceito de biomaterial, as ligas de titânio foram classificadas como bioinertes, ou seja, quando introduzidas no corpo humano, formam uma fina camada de tecido fibroso entre o material e o osso, que não impede a osseointegração, porém o processo é muito lento (em torno de 24 meses), e quando o implante entra em função com carga, pode ocorrer o insucesso da implantação, o que levou aos tratamentos de superfícies com deposição de materiais bioativos, como as cerâmicas, na superfície desses materiais, tornando-os bioativos, fazendo com que diminua o tempo de osseointegração para até oito semanas, como mostra o trabalho de Nishiguchi et al. (1999).

Quadro 1 – Módulo de elasticidade do titânio comercialmente puro (TiCP) e algumas ligas.

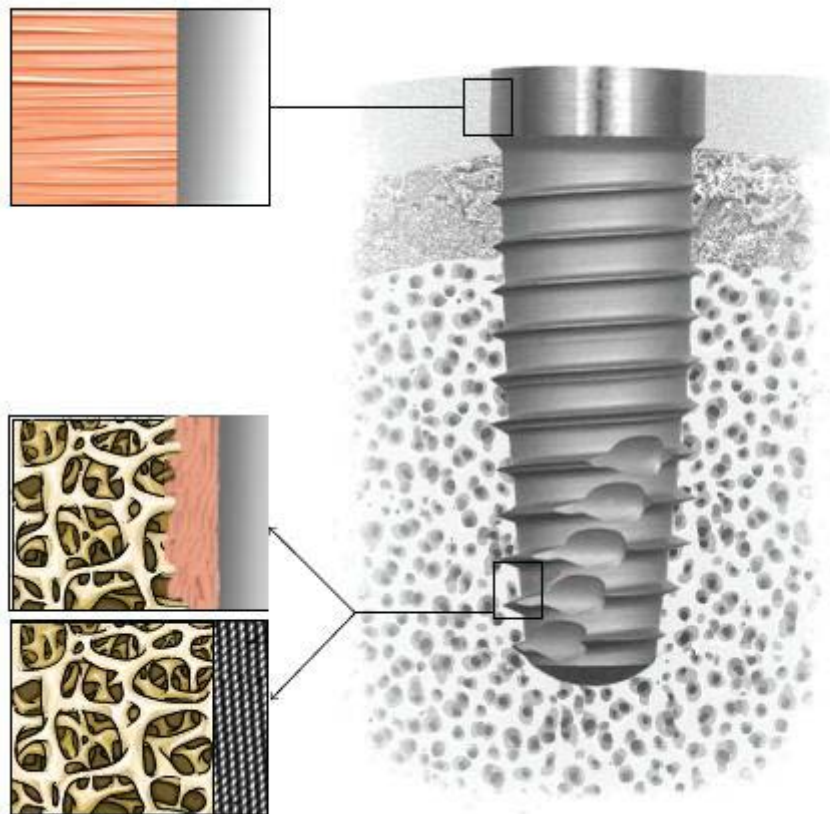
Liga/Material	Módulo de elasticidade (GPa)
Osso	10-40
TiCP	105
Ti6Al4V	110
Ti30Ta	69
Ti7,5Mo	55
Ti13Nb13Zr	80
Ti6Al7Nb	105
Ti12Mo6Zr2Fe	74-85

Fonte: Adaptado de Zhou et al., 2004, Ho et al., 1999, Liu et al., 2004.

Quando o implante é inserido no corpo humano, ocorre uma sequência de atividades celulares, migração de proteínas, plaquetas, que irão propiciar a deposição de um novo osso (JOKSTAD, 2011), (FIGURA 1). Estes primordiais acontecimentos têm grande importância sobre a migração, adesão e diferenciação das células (LAVENUS et al., 2010), e estão intimamente relacionados com a topografia do implante (rugosa ou lisa), composição química da superfície, bioatividade, molhabilidade da superfície (hidrofóbica ou hidrofílica).

Figura 1 - Desenho esquematizado do implante com as atividades celulares, migração de proteínas, plaquetas, leucócitos (LAVENUS et al., 2010)

Implante/tecido gengival



Conexão direta
implante/osso

Fonte: Adaptado de Lavenus et al. 2010

Primeiramente em um processo de formação óssea ocorre a migração, que é a osteocondução das células em direção ao material implantado.

O contato inicial do sangue com a superfície do implante cria um estado dinâmico de atividade celular, iniciado pela ativação das plaquetas e leucócitos no hematoma periimplantar e adesão de proteínas, como a fibrina, à superfície do implante.

Estas características celulares em relação à topografia do material implantado reforça a importância do tratamento de superfície tornando-o hidrofílico. Em um estudo de Bacakova et al. (2011), foi concluído que superfícies hidrofílicas melhoram a adesão celular, este estudo foi realizado com células mesenquimais.

As proteínas são aderidas na superfície do implante devido à topografia superficial, e é através da estrutura biológica tridimensional que as células osteogênicas putativas migram para o implante.

Nos implantes com superfícies lisas essa aderência celular era muito pobre, porém com as superfícies rugosas teve um grande progresso (JOKSTAD, 2011).

Em relação às superfícies dos implantes, muitas pesquisas mostram respostas diversificadas em relação à natureza celular, como fibroblastos gengivais e células epiteliais com mais afinidade por superfícies lisas e proliferação de osteoblastos com mais afinidade nas superfícies rugosas (COCHRAN et al., 1994, PONSONNET et al., 2002, BATZER et al., 1998, BOYAN et al., 1998, LOHMANN et al., 1997).

Os efeitos da rugosidade superficial da liga Ti6Al4V na resposta de células da medula óssea humana foi avaliada por Deligianni et al., em 2001, e verificou que houve aumento na adesão e proliferação celular.

A rugosidade superficial altera a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos e a produção de matriz in vitro (KIESWETTER et al., 1996, SCHWARTS et al., 1997).

Porém, existe uma diversidade entre alguns artigos que mostram a resposta inicial das células nas superfícies lisas sendo melhor, e que com o decorrer das atividades celulares, há uma diminuição da proliferação celular, ocorrendo um aumento na atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP). Estas diferenças são em relação ao tipo de células utilizadas, fibroblastos, osteoblastos, entre outras.

Ku et al. (2002) supõem que o aumento da ALP pode ser devido à diminuição da proliferação de osteoblastos.

Lincks et al. (1998), mostraram que a rugosidade aumenta a diferenciação celular, o que parece ser devido ao aumento da ALP, da produção de osteocalcina (proteína produzida pelos osteoblastos durante a fase da mineralização óssea) e da produção de colágeno nas superfícies rugosas.

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima relacionada ao processo de osteogênese e a fosfatase ácida está envolvida com a absorção do tecido ósseo (CHRISTENSON, 1997, VIEIRA, 1999).

A fosfatase alcalina está diretamente relacionada ao início do processo de mineralização do tecido ósseo (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1995, KATCHBURIAN E ARANHA, 2004).

Após a osteocondução celular, os osteoblastos aderem às superfícies do implante e, geralmente, ocupam toda a superfície através da proliferação celular.

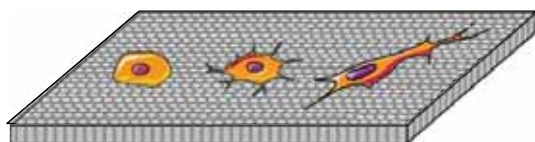
Após a proliferação celular ocorre a síntese de proteínas e diferenciação.

Estudos mostram que nas superfícies lisas as células aderem e se proliferam, mas tem uma pequena expressão dos marcadores de diferenciação.

A Figura 2 ilustra uma sequência da atividade celular durante o processo de formação óssea.

Figura 2 – Sequência da atividade celular: adesão, proliferação e diferenciação

Adesão - Proliferação - Diferenciação



Fonte: Adaptado de Lavenus et al., 2010

2.2. TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE LIGAS DE TITÂNIO

Os tratamentos de superfície podem ser empregados para tornar a superfície dos metais em materiais bioativos, ou seja, para uma conexão direta do material com o tecido vivo. Dentre as técnicas mais empregadas se destacam:

- Método por deposição assistida de feixe de íons por Sputtering (LACEFIELD, 1998);
- Método Plasma Spray (AMARANTE et al., 2001);
- Método Sol-Gel (SANTOS et al., 2005);
- Método deposição eletrolítica (GUASTALDI et al., 2010);
- Método Biomimético (GUASTALDI et al., 2010, WEI et al., 2002, BARRERE et al., 2002, 2004, JONASOVA et al., 2004, LI et al., 2002)

O método por deposição consiste em uma deposição de partículas vaporizadas de uma superfície sólida a partir de um processo físico.

No plasma-spray o material para recobrir o substrato é ionizado por meio de um arco elétrico com alta temperatura entre dois eletrodos. A desvantagem desse método é que só pode ser usado em substrato metálico e para o recobrimento, somente hidroxiapatita, pois os outros tipos de fosfato de cálcio sofreriam decomposição térmica e a adesão substrato - recobrimento é mecânico.

O método sol-gel é um método de via úmida que utiliza sais inorgânicos como fonte de cátions e ânions, água como agente de hidrólise e álcool como solvente.

A deposição eletrolítica consiste em uma reação da água, o substrato a ser recoberto atua como cátodo e um eletrodo de platina como ânodo, sendo imersos em uma solução de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} .

Em 1996, Kokubo deu início as pesquisas sobre o tratamento das superfícies metálicas das ligas de titânio, tornando-as bioativas a partir da realização de tratamento alcalino com imersão das amostras em solução alcalina de NaOH. Esse tratamento ficou conhecido como biomimético sendo a sua funcionalidade avaliada a partir da imersão das amostras em solução SBF (Simulated Body Fluid) (Quadro 2) que mimetiza os fluidos corpóreos que o implante entra em contato quando inserido no corpo humano (GUASTALDI et al., 2010, WEI et al., 2002, BARRERE et al., 2002, 2004, JONASOVA et al., 2004, LI et al., 2002).

Quadro 2 – Concentração iônica (mM) do plasma sanguíneo, do SBF e os respectivos pH.

	Plasma sanguíneo	SBF
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	103,8	147,8
HCO ₃ ⁻	27,0	4,2
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5
pH	7,2-7,4	7,4

Fonte: Adaptada de Kim et al, 1997

O tratamento biomimético foi empregado por Habibovic et al. (2002), sendo que nesse caso a imersão em SBF era parte do tratamento realizado com a formação de fosfato de cálcio nas amostras. O metal é imerso em uma solução alcalina de hidróxido de sódio (NaOH), em várias molaridades, de acordo com a composição do material (KIM et al, 2000, LEE et al., 2003, WANG et al., 2008).

O emprego desse tratamento na superfície do tântalo foi avaliado por Miyazaki et al. (2000). Quando o tântalo é imerso em solução alcalina (NaOH) com baixa molaridade, ocorre a formação de tantalato de sódio amorfo e em alta molaridade ocorre a formação de fase cristalina.

O sódio (Na) é substituído por íons H₃O⁺ formando grupos de Ti-OH que está carregado negativamente atraindo os íons cálcio (Ca²⁺) do fluido. O acúmulo de íons positivos de cálcio atrai os íons de fosfato (PO₄²⁻) negativos, para a formação de fosfato de cálcio.

Existem vários tipos de fosfatos, e suas características dependem da fração Ca/P (Quadro 3). De acordo com Best et al. (2008), Jong na década de 20 foi o primeiro a observar através da difração de raios X a similaridade entre o osso mineral e o composto

de fosfato de cálcio, hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sendo este o mais utilizado em biomateriais devido à similaridade química com os componentes inorgânicos do tecido duro e sua alta estabilidade em meio aquoso, mais que outros fosfatos em pH 4.2-8.0. O fosfato de cálcio é utilizado em diversas aplicações biomédicas, em reconstruções crânio maxilo facial, tratamento de defeitos ósseos, fraturas, cirurgias de articulações (BEST et al., 2008).

Quadro 3: Tipos de fosfatos de cálcio (Ca/P)

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Razão Ca/P
Hidroxiapatita, Fluorapatita, Cloroapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$	1,67
Fosfato octacálcico, OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Brushitas, a) fosfato dicálcio di-hidratado, DCPD, b) fosfato dicálcio anidro, DCPA (monetita)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ CaHPO_4	1,00
Whitlockita, a) fosfato tricálcio, β -TCP, b) fosfato tricálcio modificado Mg, Mg-TCP	$(\text{Ca}, \text{Mg})_9(\text{PO}_4)_6$	1,50
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0

Fonte: Adaptado de Legeros, 1991

As principais características do fosfato de cálcio são:

- Semelhança com a fase mineral dos ossos, dentes e tecidos calcificados;
- Biocompatibilidade;
- Material bioativo;
- Ausência de toxicidade;
- Taxas de degradação variáveis e
- Osteocondutividade (GUASTALDI et al., 2010)

Como já foi dito anteriormente, a hidroxiapatita (HA) é o fosfato de cálcio mais utilizado na área biomédica, porém, este possui baixo índice de bioatividade (Ib) e lenta taxa de degradação (4 a 5 anos), o que limita o seu uso e eleva o interesse pelos pesquisadores por outros fosfatos de cálcio, como o fosfato de cálcio amorfo (ACP), fosfato octacálcico (OCP) e fosfato tricálcico (TCP), pois possuem maior solubilidade, fazendo com que suas propriedades físico-químicas e biológicas superem as da hidroxiapatita (HA) (HENCH, 1998, GUASTALDI et al., 2010).

O índice de bioatividade (Ib) é o tempo necessário para ocorrer 50% de ligação interfacial entre um biomaterial e o tecido ósseo. Biomateriais com Ib superior a 8 são classificados como de classe A e são osteoprodutores, ou seja, provocam um aumento da atividade dos osteoblastos e osseocondutores, asseguram o crescimento ósseo em toda superfície. Os biomateriais que se encontram na faixa de 0-8 são classificados como classe B e são somente osseocondutores (GUASTALDI et al., 2010, HENCH, 1998).

No Quadro 4 se observa o índice de bioatividade (Ib) de alguns biomateriais e sua atividade em relação aos tecidos ósseo e mole (GUASTALDI et al., 2010)

Quadro 4 – Índice de bioatividade (Ib) de algumas biocerâmicas

Biomaterial	Ib	Classe bioatividade	Ligação osso	Ligação tecido mole
Vidro Bioativo (4555)	12,5	A	Sim	Sim
Vidro Bioativo (5254)	10,5	A	Sim	Sim
Cerâmica Bioativa (AW)	6,0	B	Sim	Não
Hidroxiapatita (HÁ)	3,1	B	Sim	Não
Alumina	0	-----	Não	Não

Fonte: Adaptado de Hench, 1998.

Os fosfatos de cálcio podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} .

A camada de apatita biologicamente ativa na superfície do implante reduz a energia na interface com o tecido ósseo, apressurando a presença de proteínas e células para o início das atividades celulares, resultando na formação da estrutura óssea (KOKUBO et al., 2003).

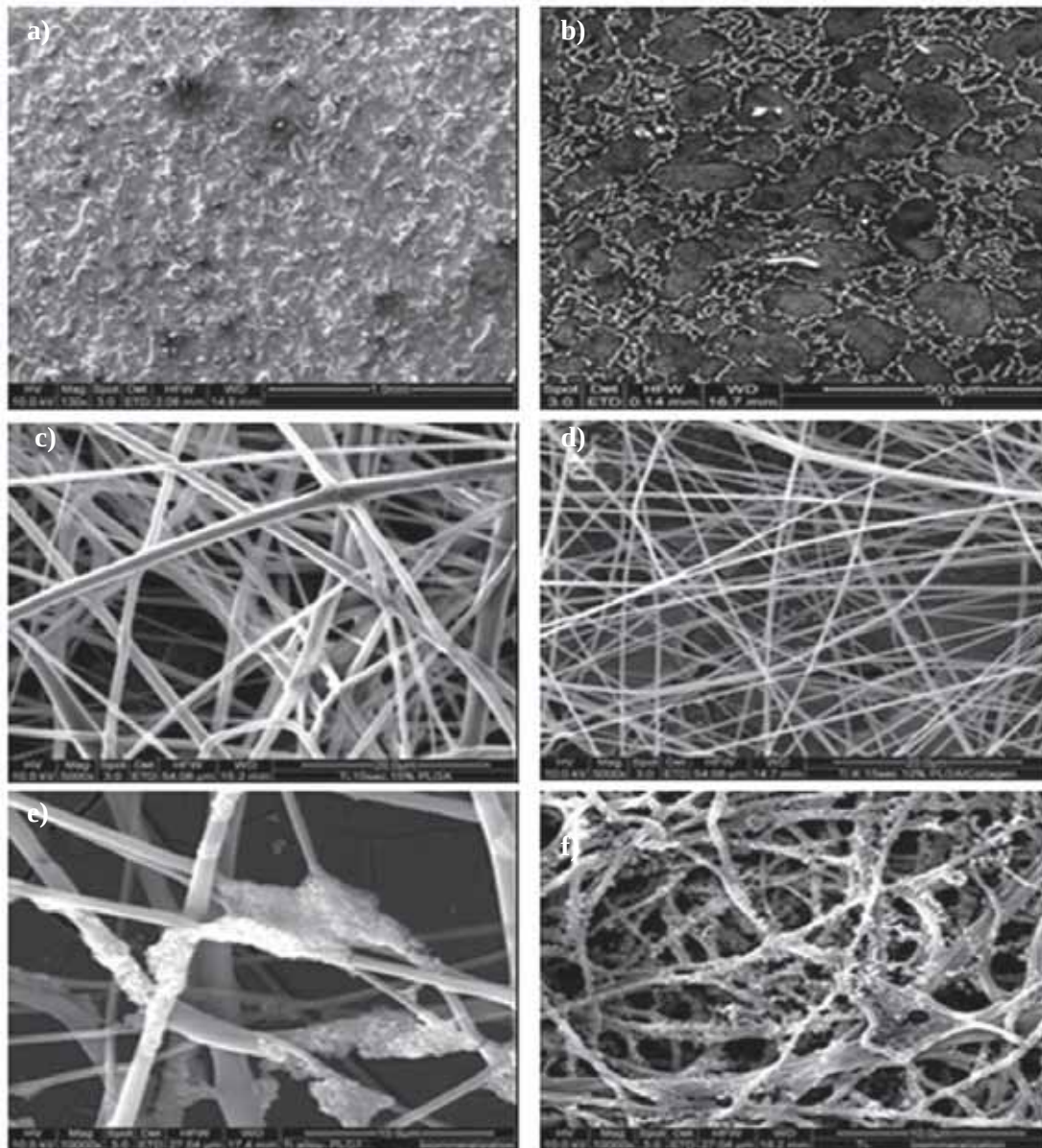
Recentemente, Ravichandran et al. (2012), associaram o tratamento alcalino a deposição do copolímero poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e fibras colágenas sobre a superfície do titânio comercialmente puro (TiCP) e da liga Ti6Al4V com o objetivo de aumentar a adesão de células progenitoras mesenquimais, propiciando assim uma osseointegração mais rápida, pois em superfícies lisas leva geralmente de 3 a 6 meses.

Após a eletrofiação de PLGA/fibras colágenas foi realizada a imobilização de Ca/P com soluções de cloreto de cálcio (CaCl_2) e difosfato de sódio (Na_2HPO_4), tornando a superfície bioativa e alterando a molhabilidade.

Na Figura 3 observam-se as imagens de Ravichandran, onde se visualiza as nanofibras do polímero PLGA, nanofibras com colágeno e a formação de hidroxiapatita aderida às fibras.

Com os resultados alcançados, este estudo foi um incentivo para a utilização neste trabalho do polímero poli (ϵ -caprolactona) PCL, com tratamento alcalino prévio e após a eletrofiação a incorporação de Ca/P, com a finalidade de aumentar a adesão celular, diferenciação e proliferação reduzindo o tempo da osseointegração.

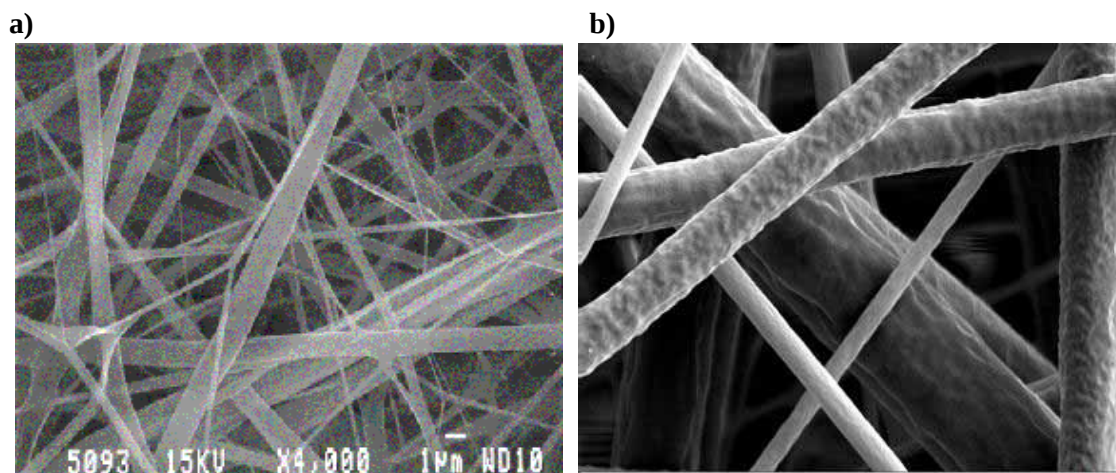
Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo do TiCP (a), após tratamento alcalino (b) nanofibras do polímero PLGA sobre a liga de TiCP (c) nanofibras do polímero PLGA e colágeno (d), nanofibras do polímero PLGA após mineralização Ca/P (e), nanofibras do polímero PLGA e colágeno após mineralização com Ca/P (f)



Fonte: Adaptado de Ravichandran et al., 2012

As nanofibras poliméricas formadas através da eletrofiação são similares à matriz extra celular natural o que melhora a interação celular (Figura 4).

Figura 4 – Imagem da matriz extra-celular original de submucosa de intestino humano(a) e manta de PCL eletrofiada (b)



Fonte: Adaptado de Catalani, 2011

Nesse estudo após a eletrofiação de PLGA/fibras colágenas formou-se uma superfície com camada uniforme de fibras poliméricas. E com o tratamento de imobilização de Ca/P houve a formação da hidroxiapatita.

O ângulo de contato diminuiu significativamente tanto para as amostras de titânio puro, como para as de Ti6Al4V. A cultura de células mostrou maior adesão nas amostras mineralizadas, ocorrendo a adesão celular, diferenciação e proliferação. Esta pesquisa mostrou a eficácia do tratamento ácido/alcalino com eletrofiação de polímeros e mineralização com Ca/P como um eficiente método para aumentar a osseointegração.

2.3 ELETROFIAÇÃO

Desde os anos 90, a eletrofiação vem sendo aplicada na engenharia de tecidos na fabricação de suporte celular (XIE et al., 2008). Este consiste em um processamento a partir de soluções poliméricas, onde se pode obter como resultado final micro ou nano fibras de polímeros, que mimetizam a matriz extra-celular natural, responsáveis pela adesão celular e desenvolvimento (ABEDIN et al., 2010).

O processo de eletrofiação foi patenteado por J.F.Cooley¹ e W.J.Morton² em 1902 e através desta patente surgiu o método fundamentado em fontes de alta tensão para produzir filamentos, e não gotas, recebendo o nome de *electrospinning* (COOLY, 1902, MORTON, 1902).

O equipamento é composto por uma bomba de infusão e uma fonte de alimentação e dispõe de um ajuste individual de tensão e a frequência da tensão pode ser variada. Na eletrofiação ocorre um processo de aplicação de forças eletrostáticas e de arraste na solução para a formação das microfibras ou nano fibras (GUERRINI, 2006).

Existem alguns parâmetros que interferem na eletrofiação dos quais se destacam:

- Tensão elétrica aplicada na solução;
- Viscosidade da fibra, ou seja, concentração polímero/solvente;
- Adição de sais na solução;
- Vazão de alimentação (saída da solução do capilar);
- Distância de trabalho (entre a extremidade do capilar até o coletor)

Existem várias pesquisas variando esses parâmetros e mostrando as modificações nos diâmetros, degradação e morfologia das fibras geradas por este processo.

Guerrini et al.(2006), avaliou os efeitos da modificação da tensão aplicada e a adição ou não de cloreto de alumínio no polímero poli(álcool vinílico), PVOH, a tensão foi variada de 15kV para 18kV e os resultados obtidos mostraram uma variação na morfologia das fibras e no diâmetro médio.

Ito et al. (2005), utilizou o polímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), PHBV, com imersão em solução que mimetiza os fluídos corporais (SBF) para formação de hidroxiapatita. O resultado mostrou que com o SBF as fibras tornaram-se

hidrofílicas e ocorreu uma diminuição no tempo de degradação, ou seja, degradação mais rápida, porém, não houve mudança significativa na adesão celular.

O solvente utilizado no preparo da solução que será eletrofiada, também pode interferir nas propriedades das fibras.

Tsang et al. (2004) realizaram um estudo que foi utilizado quatro solventes diferentes, clorofórmio, tetrahydrofurano, acetona e acetato de etila para dissolver o PCL. No estudo se observou alterações no ângulo de contato com o solvente hidrofóbico (clorofórmio e acetato de etila) e hidrofílicos (tetrahydrofurano e acetona), porém mostrou que com todos os solventes ocorreu a adesão, proliferação e diferenciação celular e é importante ressaltar que o solvente após a eletrofiação é eliminado na secagem (evaporado), não interferindo na biocompatibilidade.

Para uma boa ancoragem celular existem algumas características importantes, como, composição química, cristalinidade, morfologia do suporte e o processamento dos materiais, que também interferem na degradação.

O grau de cristalinidade está diretamente relacionado à degradação, afetando a adsorção de líquido, por exemplo, polímeros com alta cristalinidade exibem alta resistência à tensão e apresentam lenta taxa de degradação (CARDOSO, 2010).

A morfologia das fibras interferem na atividade de adesão celular e consequente proliferação e diferenciação.

Xie et al. (2009), prepararam nanofibras de PCL com diâmetro em torno de 250nm e demonstrou que as fibras alinhadas podem induzir células tronco embrionárias a se diferenciarem em linhagens neurais específicas. As nanofibras aleatórias são mais interessantes para a engenharia tecidual e as nanofibras alinhadas para a engenharia neuro-tecidual (XIE et al., 2009).

O processamento dos materiais está relacionado ao tipo de fibras (mantas) fabricadas, e no caso da eletrofiação são produzidas fibras na escala de micrômetros e nanômetros, que variam de cinco microns a dezenas de nanômetros e se aproximam da escala do tamanho das células e estruturas da matriz extra-celular.

Existem vários métodos utilizados para a fabricação de suporte celular, porém na eletrofiação as fibras podem ser geradas em 3D, tornando o suporte mais semelhante às naturais, logo, a superfície torna-se mais propícia ao desenvolvimento das células e a bioquímica superficial será mais real e na eletrofiação também a taxa de porosidade será alta (>80%), o que aumenta a fixação celular (MA et al., 2005).

Alguns métodos de fabricação de suporte celular:

- Injeção de gás (*gas foaming*) (HARRIS et al., 1998);
- Deposição por fusão (*melt moulding*) (HUTMACHER et al., 2004);
- *Film casting and solute leaching* (TESEMA et al., 2005);
- *Emulsion freeze drying* (SULTANA et al., 2008);
- Eletrofiação (KURPINSKI et al., 2010).

A técnica de injeção de gás (*gas foaming*) consiste na formação de mantas com alta porosidade através de polímero sem a utilização de solventes orgânicos, nem altas temperaturas. Nesta técnica é adicionado ao polímero, a solução de cloreto de sódio (NaCl) e essa mistura é comprimida para formação de discos sólidos, em seguida são expostos a alta pressão de gás de CO₂ por 48h para ocorrer a saturação do polímero com o gás (HARRIS et al., 1998).

A deposição por fusão (*melt moulding*) é a fabricação de suporte celular através da deposição de fibras 3D pelo sistema CAD (computação). Dentre as muitas utilizações na área biomédica, destaca-se, a de cicatrização de feridas. Esta técnica oferece praticidade para a construção em quantidade e qualidade para a utilização na Engenharia de Tecidos (HUTMACHER et al., 2004).

A preparação de suporte celular, *film casting and solute leaching*, ocorre através da dispersão das partículas de sal da solução polimérica. O solvente em que o polímero é dissolvido evapora para produzir uma membrana de composição polímero/sal. As partículas de sal passam pelo processo de lixiviação, resultando em poros (TESEMA et al., 2005, YANG et al., 2006).

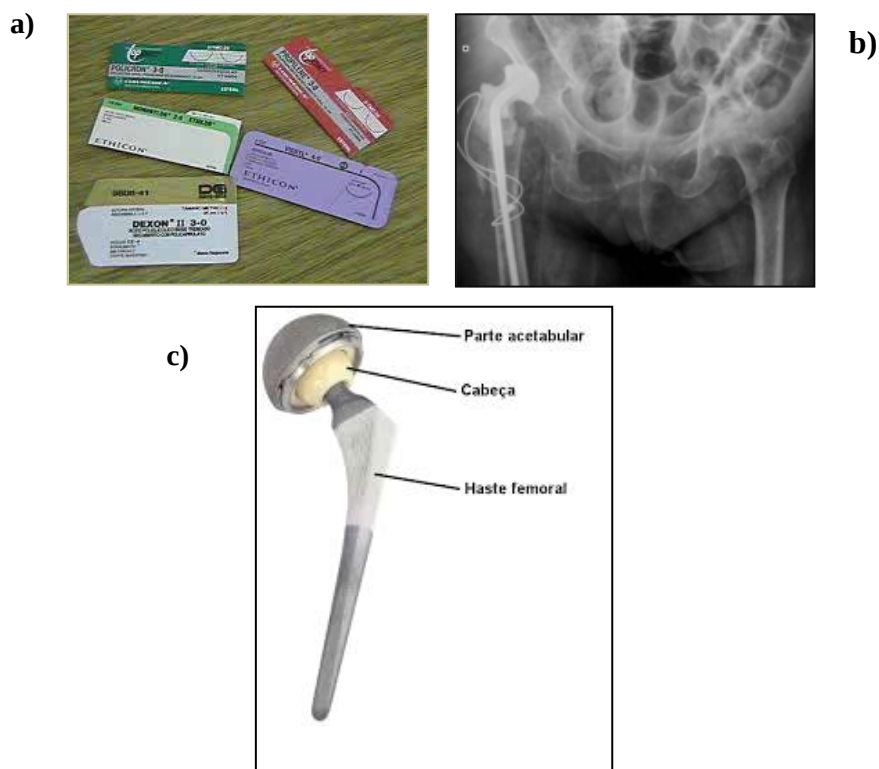
Emulsion freeze drying, método empregado para produção de scaffolds com alta porosidade através da separação da água do solvente por congelamento (SULTANA et al., 2008).

Vários tipos de polímeros naturais são utilizados na confecção de fibras para suporte celular, como quitosana (ZHANG et al., 2008), colágeno (SONG et al., 2008), gelatina (CASPER et al., 2007) e polímeros sintéticos, como, PCL poli(ε-caprolactona) (MA et al., 2005), PLLA poli(ácido-L-láctico), (SUI G et al., 2007), PLGA poli(ácido láctico-co-glicólico), (FU Y C et al., 2008), PHBV poli (hidroxibutirato-co-valerato) (LAN-XIN LÜ, et al., 2012).

Alguns exemplos de aplicações de polímeros são em fios de sutura biodegradáveis, em dispositivos ortopédicos (Figura 5), sistemas de liberação de drogas,

recobrimento de cânulas uretrais, tecido epidérmico e muscular (SASMAZEL et al, 2008).

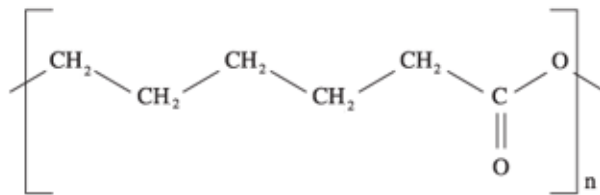
Figura 5 – Aplicações de polímeros (a) Fios de sutura biodegradáveis, (b) prótese de quadril, (c) radiografia prótese/quadril.



Fonte: www.ufsm.br/ www.medicinadoquadril.com.br

O poli (ϵ -caprolactona) PCL é um polímero da classe dos poliésteres alifáticos sintéticos, da família das policaprolactonas semi-cristalino, termoplástico, biodegradável, bioreabsorvível e derivado do petróleo, é amplamente empregado na eletrofiação (Figura 6). Seu ponto de fusão é na faixa de 60°C e a temperatura de transição vítrea está entre -60°C e -70°C (DUARTE, 2004, BARBANTI et al., 2006, ROA et al., 2010). O módulo de elasticidade do PCL é 0,4GPa (BARBANTI et al., 2005) e o valor de cristalinidade é 70%.

Figura 6 – Fórmula estrutural do PCL poli (ε-caprolactona)



Fonte: Vogelsanger N et al., 2003.

Possui boa compatibilidade biológica, sendo muito utilizado na área biomédica, farmacêutica e na engenharia tecidual (RHEE, 2004, TANG et al., 2004, 2006, SUNG et al., 2004, KIM et al., 2004, CIAPETTI et al., 2003, ANSELME, 2000, NAVA et al., 2005, RAI et al., 2005).

Seu tempo de degradação in vivo, é bem lento, 24 a 36 meses, o que o torna muito interessante na engenharia tecidual (BARBANTI et al., 2005).

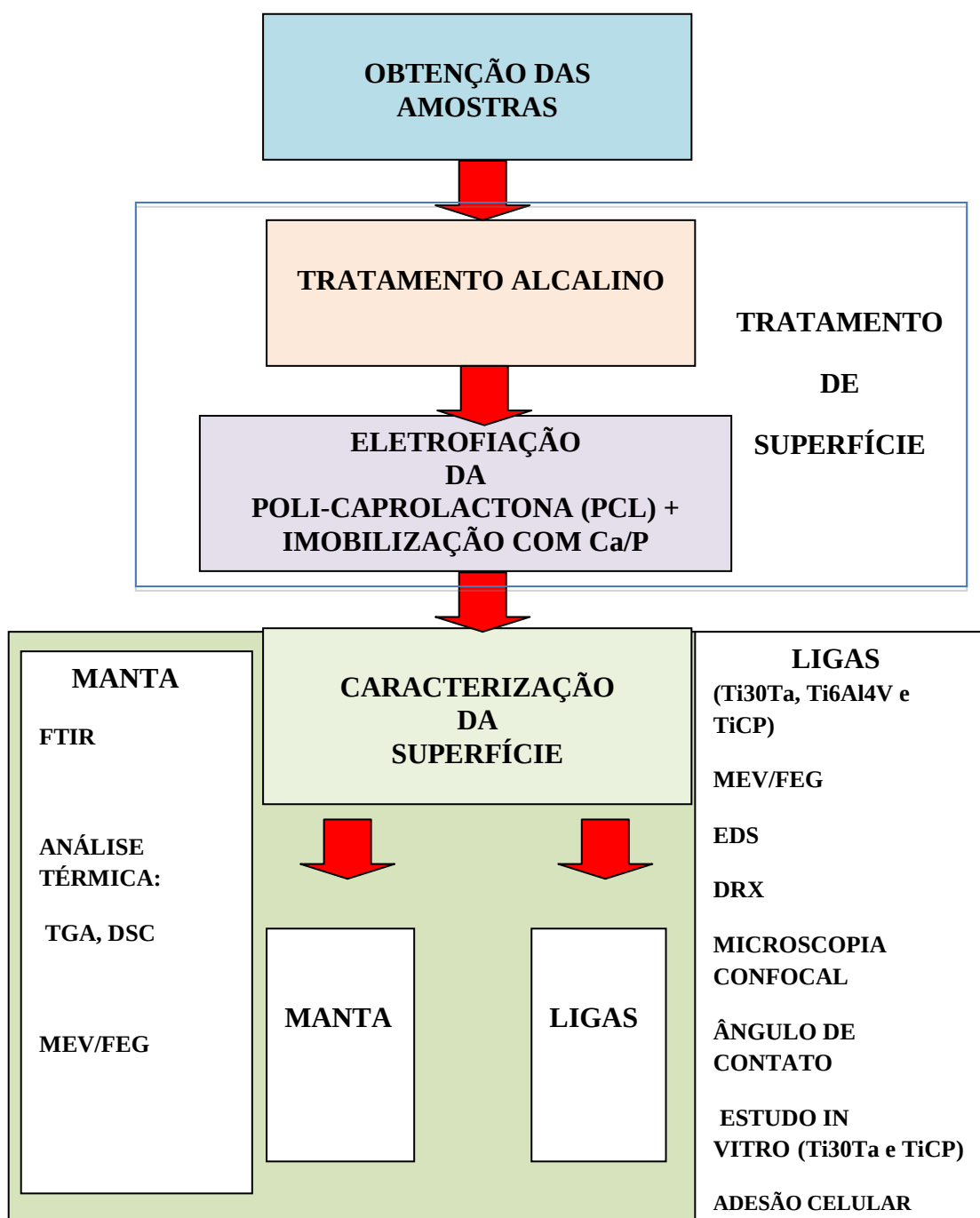
O poli (ε-caprolactona) PCL tem sido muito empregado em pesquisas biomédicas por suas boas propriedades para esta área. Este consiste em um polímero com grande potencial na reparação óssea e de cartilagem. No estudo de Williams et al.(2005), foram fabricados *scaffolds* porosos de PCL através da computação via *selective laser sintering* (SLS) e mostrou potencial para a reparação de tecidos ósseos (WILLIAMS et al., 2005).

Vários estudos demonstram seu bom desempenho na adesão, proliferação e diferenciação celular (WILLIAMSON et al., 2004, TANG et al., 2006, SUNG et al., 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 7 é possível observar o fluxograma da metodologia empregada neste estudo.

Figura 7 – Fluxograma da metodologia empregada

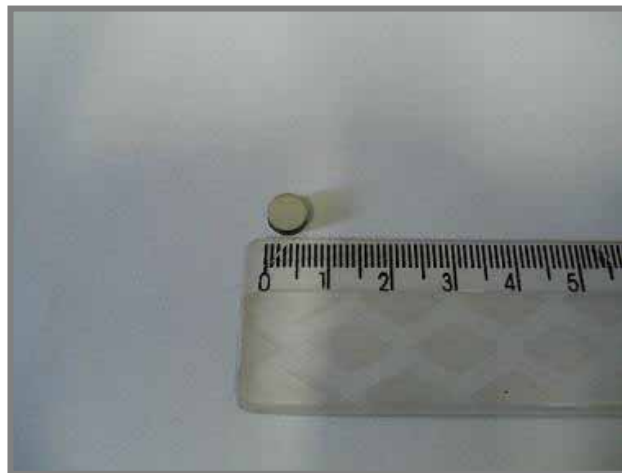


3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os lingotes da liga Ti30Ta foram obtidos a partir da fusão dos elementos puros em forno a arco voltaico, com atmosfera de argônio e cadinho de cobre refrigerado a água. O tratamento térmico de homogeneização foi realizado após essa etapa a 1000°C por 24h com resfriamento dentro do forno (KONATU, 2014).

Posteriormente, com o emprego do forjamento rotativo a frio foi possível a obtenção de barras com 6 mm de diâmetro. Após o tratamento térmico de solubilização a 900 °C por 2 horas, foram seccionados discos com 3 mm de espessura. Como grupo controle foram utilizados discos da liga comercial Ti6Al4V e titânio comercialmente puro (TiCP), com as mesmas dimensões, como mostra a Figura 8.

Figura 8 – Amostra de Ti30Ta com 6 mm de diâmetro e 3mm de espessura



3.2 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE

O tratamento de superfície das amostras foi realizado em três etapas: 1) tratamento alcalino seguido de imersão em HCl, 2) eletrofição do polímero (ϵ -caprolactona) PCL e 3) imobilização de fosfato de cálcio.

3.2.1. Tratamento Alcalino

Antes do tratamento alcalino as amostras foram lixadas com lixas de carbeto de silício # 100 e limpas em banho ultrassônico (modelo UltraCleaner 800 A, marca Unique) por 30 minutos para retirada das impurezas.

Em seguida, as amostras de Ti30Ta foram imersas em NaOH (1M) e as amostras de Ti6Al4V e titânio comercialmente puro CP em NaOH (5M) a 60°C por 24h, em banho termostatizado (marca Tecnal TE-184) para o tratamento alcalino (Figura 9). Em seguida, as amostras foram lavadas em água deionizada e deixadas para secar em temperatura ambiente. Após a secagem as amostras foram imersas em solução de HCl (10M) por 1h e em seguida lavadas em água deionizada e colocadas em estufa por 24h a 40°C.

Figura 9 – Banho termostatizado marca Tecnal TE-184



3.2.2. Eletrofiação

Após o tratamento alcalino foi realizado a eletrofiação do PCL sobre a superfície das ligas de Ti30Ta, Ti6Al4V e TiCP e separada uma parte somente da fibra para as análises FTIR, análises térmicas e MEV/FEG. Na Figura 10 se observa as amostras antes e após a eletrofiação com PCL.

Figura 10 – Amostras com tratamento alcalino e após a eletrofiação



Foi utilizado o PCL (MM 70.000 g/mol - 90.000 g/mol) fornecido pela empresa Sigma Aldrich, uma mistura de clorofórmio / acetona (Merck 99,0 %) e (Synth 99,5 %), na proporção 1:1 em massa.

Para as soluções, uma concentração de 13,6% em massa de PCL foi dissolvida para eletrofiação de PCL, mantidas sob agitação mecânica por 24h de preparação da solução. Para o processo de eletrofiação, utilizou-se um equipamento composto por uma bomba de infusão KD Scientific, mod. KD-100 e uma fonte de alimentação CA/CC simultânea (Testtech) (Figura 11). Este equipamento é capaz de gerar simultaneamente tensão contínua de 0 a + 16kV com corrente de saída de até 10mA, bem como, tensão alternada de até 20 kV de pico a pico. O equipamento dispõe de um ajuste individual de tensão e a frequência da tensão alternada pode ser variada de 30 Hz a 1 kHz continuamente. A fonte alternada é implementada em um transformador com ambos os terminais flutuantes, de tal maneira, que se podem ligar as duas fontes em série, o que

permite uma tensão sobreposta a uma tensão contínua. Ambas as fontes também podem ser operadas separadamente a fim de manter o transformador desconectado e utilizar apenas a fonte (CC). Para evidenciar a operação de medição adequada da fonte foi utilizado um osciloscópio *Tektronix* modelo TDS-2002 e uma ponteira de alta tensão P6015A. A fim de importar dados da corrente trafegada pelo circuito ao longo do tempo foi utilizado um multímetro ICEL modelo MD6450. Como anteparo coletor foi utilizado uma placa de alumínio com alojamento para as amostras e como saída do material utilizou-se uma seringa de 20 mL, conectada a uma agulha com Ø 1,0 mm no capilar em aço inox.

Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros de processamento das amostras eletrofiadas durante 120 segundos.

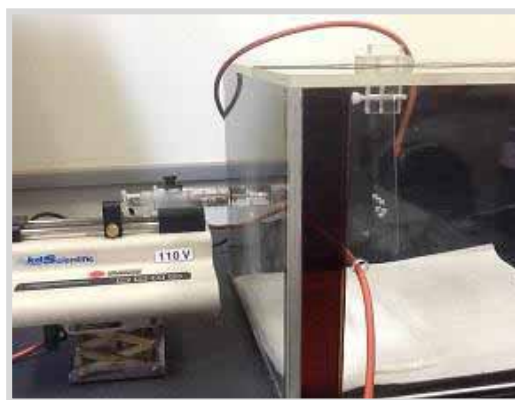
Tabela 1: Condições de processamento de obtenção das fibras em CA/CC (ALMEIDA, 2014)

Amostra	Tensão	Tensão	Frequência	Distância	Vazão
	(CA) [kV]	(CC) [kV]			
PCL	7,2	12,0	205	120	8,0

Figura 11 – Equipamento utilizado para a eletrofiação, (a) fontes de tensão

(b) bomba de infusão e anteparo coletor

(a)

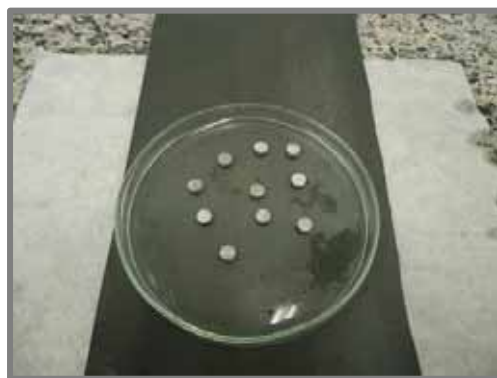


(b)

3.2.3. Imobilização de apatita empregando solução cálcio/fosfato

Essa etapa seguiu a metodologia proposta por Ravichandran et al., 2011. Após a eletrofiação com PCL (poli (ϵ -caprolactona)), as amostras foram imersas em solução de 0,5M CaCl_2 , por 600 segundos. Em seguida, foram lavadas em água deionizada por 60 segundos, e imersas em solução de 0,3 M Na_2HPO_4 , por 600 segundos e lavadas em água deionizada por 60 segundos (Figura 12). Este processo foi considerado 1 ciclo, foram realizados 3 ciclos, sendo que no segundo e o terceiro ciclo, as amostras ficaram imersas nos sais por 300 segundos. Após a mineralização as amostras foram colocadas no dessecador por 24h.

Figura 12 – Amostras durante o processo de mineralização com Ca/P



3.3 CULTURA CELULAR

A cultura celular foi realizada para avaliação da biocompatibilidade e da capacidade de adesão e proliferação celular na liga Ti30Ta e no Ti CP após tratamento alcalino, eletrofiadas com o polímero PCL e eletrofiadas seguida de imersão com cálcio e fosfato. É importante essa avaliação, pois uma melhor interação celular acelera a osseointegração.

Neste trabalho foram realizadas cultura de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) de segunda passagem. As células ADSC foram armazenadas em freezer a -80°C e descongeladas em banho maria a 37°C para a cultura. Para o cultivo celular foi utilizado 13 ml de meio de cultura *DMEM/Ham's f12* e colocadas em placas de 24 poços e em seguida na estufa de CO_2 por 24h. As trocas do meio de cultura foram realizadas de 48 em 48h até que a população celular atingiu 70% de confluência e então

foram removidas com 3 ml de tripsina (0,025% de tripsina/EDTA) para digestão enzimática das células e colocados por 5 min na estufa de CO₂ (o crescimento celular nesta fase foi acompanhado em microscópio óptico invertido), em seguida, foi levado para a centrífuga para separação das células. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado e as células ADSC foram colocadas para suspensão em meio de cultura. Assim foi colocado 1000µl de células em cada poço da placa juntamente com as amostras (Figura 13) e foi colocado na estufa de CO₂ por 24h.

Antes do procedimento de cultura de células as amostras foram esterilizadas com radiação gama (CNEM-IPEN).

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em câmara de fluxo laminar em condições estéreis (Figura 14) na Universidade do Colorado – *Fort Collins - USA*.

As imagens foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG) e as amostras foram tratadas com ouro no equipamento *Sufter Coater*, marca *Baltec*, modelo SCD050 para melhorar o nível de emissão de elétrons.

Figura 13 – (a) Amostras na placa de 24 poços com células (ADSC) para cultura de 1 dia, (b) cultura de 4 dias e (c) cultura de 7 dias



(a)



(b)



(c)

Figura 14 – Câmara de fluxo laminar onde foram realizados os procedimentos laboratoriais na Universidade do Colorado – *Fort Collins* - *USA*



3.4 CARACTERIZAÇÃO DA FIBRA DO POLÍMERO (ϵ -CAPROLACTONA) PCL APÓS ELETROFIAÇÃO

Foi realizada a análise de infravermelho para identificação da composição da manta polimérica (ϵ - caprolactona) PCL após a eletrofiação, verificando a presença dos compostos fenólicos do polímero. Foi utilizado o equipamento de espectrofotometria em Infravermelho da marca Shimadzu- modelo IR Prestige-21.

Para a obtenção das temperaturas de início e final de degradação e a taxa residual foi utilizada a análise termogravimétrica (TGA) com a fibra PCL antes e após a imobilização de fosfato e cálcio. Foram realizadas as análises de TGA no equipamento de TG/DTA *SII Nanotechnology* - Seiko, modelo 6000, instalado na FEG/UNESP (Figura 15). Foi utilizado 10,3mg da amostra, com variação da temperatura ambiente até 1000°C com uma taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de gás nitrogênio (100ml/min).

Figura 15 – Equipamento TG/DTA *SII Nanotechnology* – Seiko, modelo 6000



Por meio das curvas da calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidos os valores de transição vítrea (t_g) da fibra antes e após a imobilização de Ca/P, temperatura de fusão (t_m) da fibra e no resfriamento a cristalização.

O equipamento utilizado foi *SII Nanotechnology* – Seiko, modelo 6220, instalado na FEG/UNESP (Figura 16). Foi utilizado 10mg da fibra em panela de alumínio. O aquecimento inicial para determinar a T_g foi de -80°C a 0°C e após 5 min foi resfriada a uma temperatura de 0°C a -80°C , após 5 min, de -80°C a 0°C . Todas as etapas foram realizadas a uma taxa de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Para determinar a T_m e a cristalização a temperatura inicial foi de -75°C a 100°C , taxa de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, resfriada de 100°C a -75°C , taxa de $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e o segundo aquecimento de -75°C a 100°C , a uma taxa de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sobre atmosfera de nitrogênio ($20\text{ ml}/\text{min}$).

Figura 16 - Equipamento *SII Nanotechnology* – Seiko, modelo 6220



3.5 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS LIGAS APÓS ELETROFIAÇÃO

Neste trabalho foi utilizado um equipamento FEI Magellan 400L instalado na UFSCar/LCE (Figura 17) para a microscopia eletrônica de varredura da superfície das ligas e da fibra de PCL e para a obtenção de detalhes composicionais, foi utilizado o detector de elétrons retro-espalhado (EDS). Para melhorar o nível de emissão de elétrons foi realizado metalização com ouro no equipamento Supter Coater, Bal-tec, modelo SCD 050 (Figura 18). Para a obtenção do diâmetro das fibras de PCL foi utilizado o software image J.

Figura 17 – Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Magellan 400L



Figura 18 – Equipamento *Supter Coater*, *Baltec*, modelo SCD 050



Para visualização dos picos formados após os tratamentos de superfície, as amostras foram analisadas por difração de raios X em um equipamento marca Panalytical, modelo Empyrean, instalado no DEMAR-EEL-USP (Figura 19), mediante uma radiação de Cu-K α , voltagem de 40kV, corrente de 30mA e intervalo angular de 10 a 90°.

Figura 19-Difratômetro marca Panalytical, modelo Empyrean



Para a avaliação da hidrofiliicidade da superfície das amostras foi utilizado o equipamento goniômetro modelo DSA 100, marca Krüss, instalado na FEG/UNESP (Figura 20). Este equipamento dispõe de uma câmara de alta resolução para a captação de imagens. As imagens são transmitidas e ampliadas para um computador, que por meio de um software faz o cálculo do ângulo de contato do líquido (3 μ l de água deionizada) gotejado na superfície da amostra.

Figura 20 – Goniômetro modelo DSA 100 marca Krüss



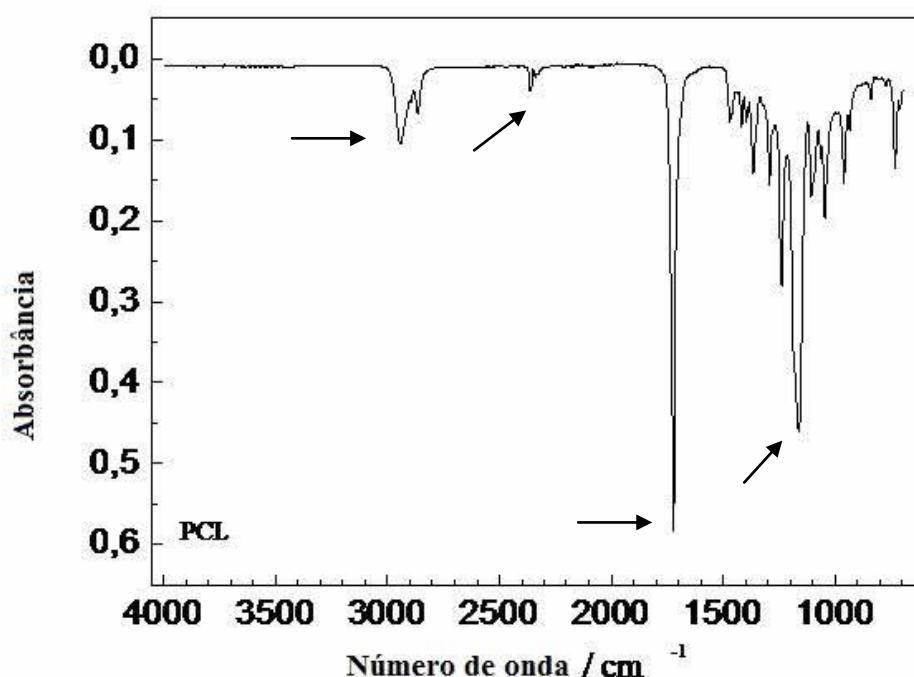
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA FIBRA DO POLÍMERO (ϵ -CAPROLACTONA) PCL APÓS ELETROFIAÇÃO

Para a análise da fibra de PCL foi realizada a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) da manta de PCL e da manta de PCL com mineralização de Ca/P, análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da manta PCL e da manta PCL com mineralização.

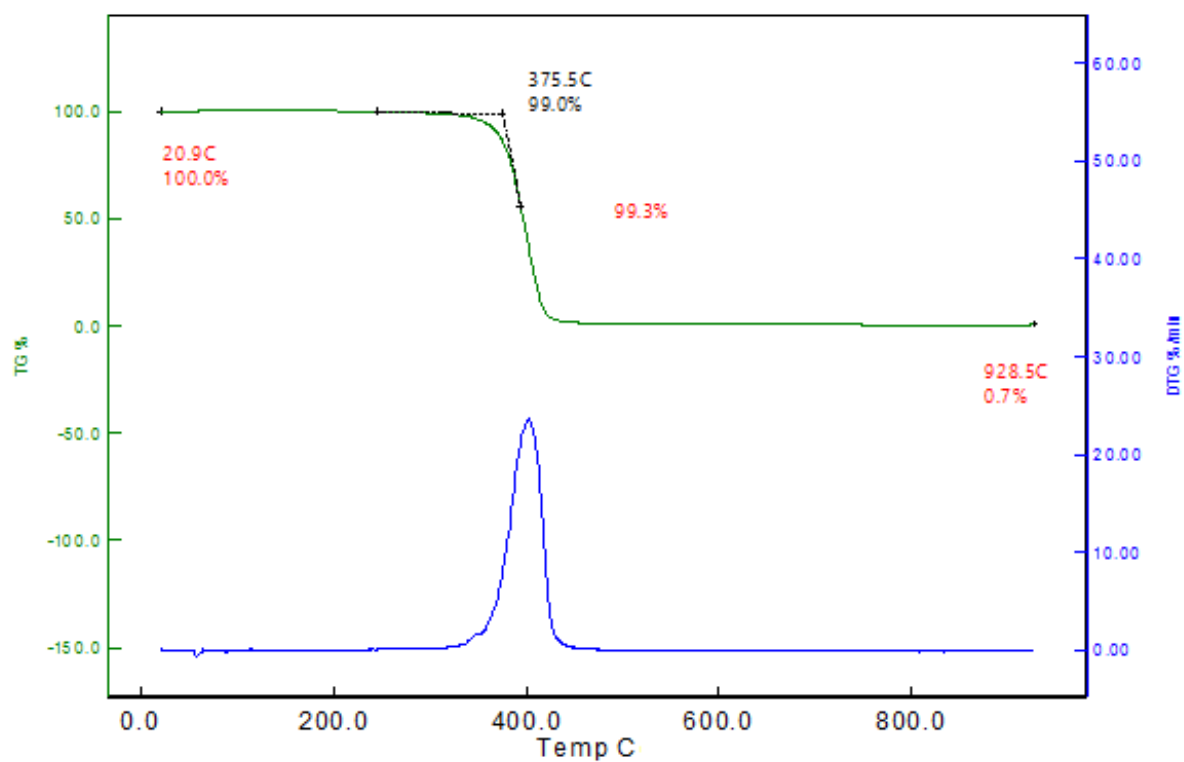
De acordo com a análise de FTIR típica do PCL poli (ϵ -caprolactona) foi identificado os compostos fenólicos do polímero após a eletrofiação no pico 2865 - 2359 cm^{-1} para o estiramento C-H, 1419 - 1367 cm^{-1} para a deformação C-H, na região do pico 1721 cm^{-1} para o estiramento carbonila C=O e no pico 1163 cm^{-1} para o estiramento C-O (Figura 21). Com os picos encontrados foi constatado que o método utilizado, a eletrofiação, conservou as bandas fenólicas do PCL.

Figura 21 – FTIR da manta de PCL poli (ϵ -caprolactona)



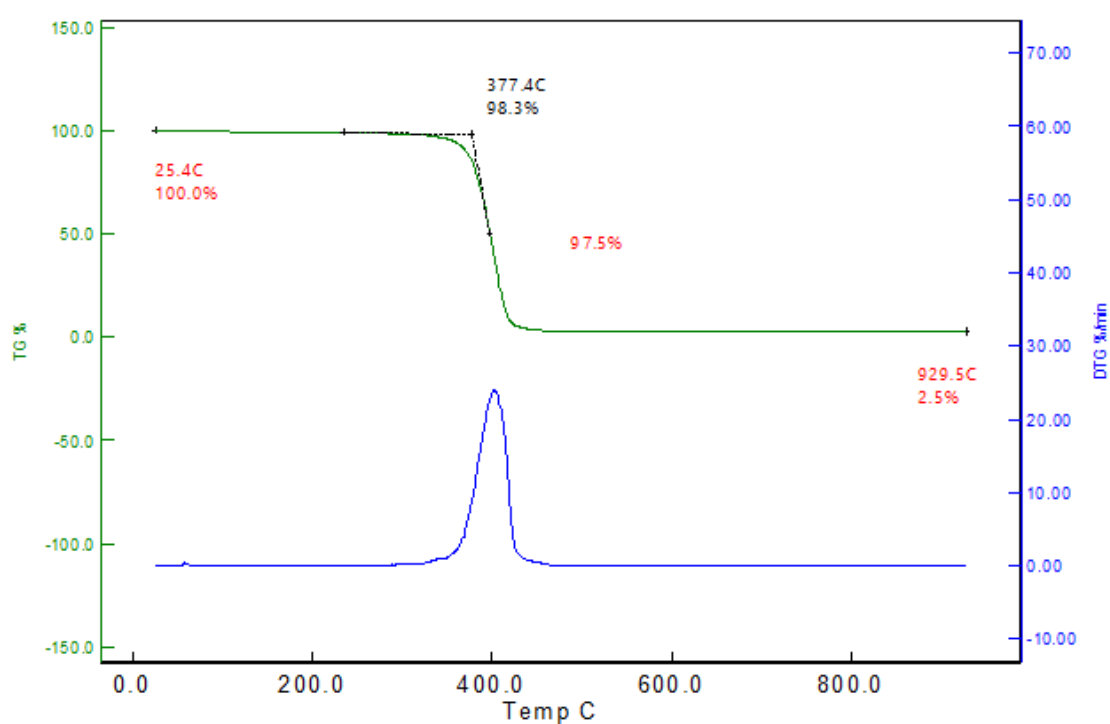
Com a análise do PCL (Figura 22), foi observado um único pico, o que indica a presença de apenas um tipo de polímero, o PCL. O início da degradação ocorre a partir de 375,5°C, com uma perda de massa de 99,3% e taxa residual 0,7%.

Figura 22 – Análise Termogravimétrica (TGA) da manta de PCL



A manta de PCL com imobilização de Ca/P pode ser observado no gráfico (Figura 23) onde foi observado o início da degradação em 377,4°C, perda de massa (degradação) foi de 97,5% com resíduo de 2,5%. Estes resultados podem ser explicados devido à imersão do PCL em solução e os resíduos devido à presença de cálcio e fosfato.

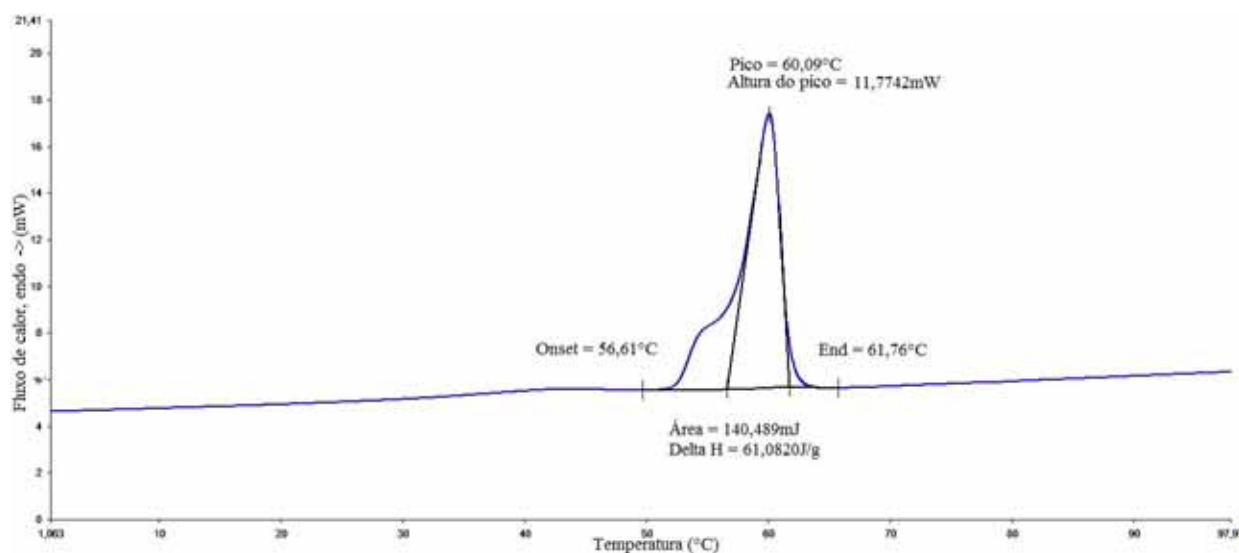
Figura 23 – Análise termogravimétrica (TGA) da manta de PCL com imobilização de Ca/P.



A partir das curvas de DSC da manta de PCL, foram obtidos os valores da temperatura de fusão (T_m), transição vítrea (T_g), (Figuras 24 e 25), e a temperatura de cristalização (T_c) no resfriamento (Figura 24). Com as curvas do DSC verificou a ausência do solvente (clorofórmio), o que mostrou que ocorreu a sua evaporação, constatando uma eletrofiação bem sucedida.

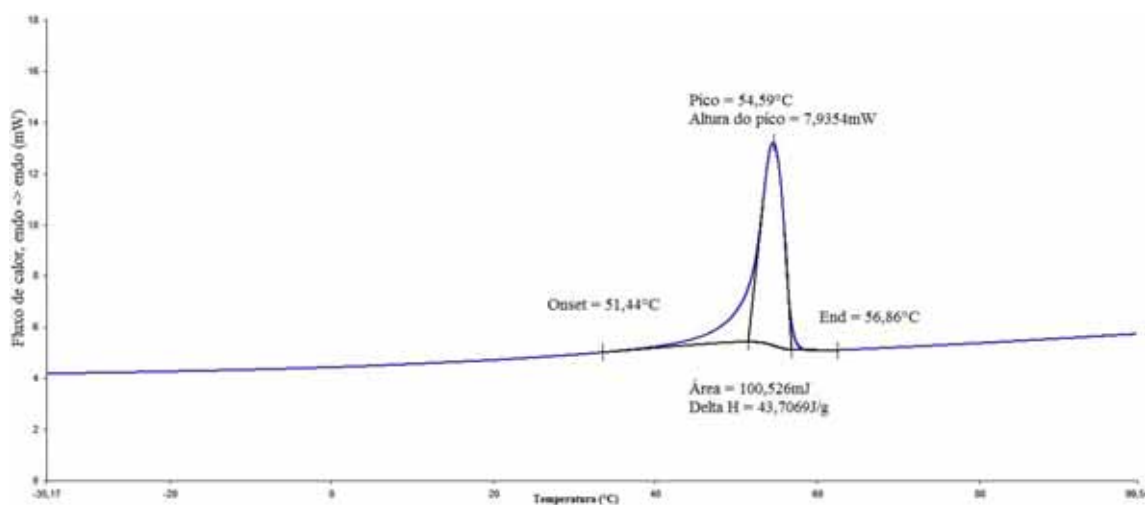
Na Figura 24 foi observado as curvas de DSC no primeiro aquecimento, e foi possível constatar o pico endotérmico de fusão na temperatura de 60°C e a entalpia (ΔH) na temperatura 61 J/g.

Figura 24 – Curvas de DSC (1ºaquecimento) da manta de PCL



Os valores da temperatura de fusão e entalpia mensuradas durante o segundo aquecimento ($54,59^{\circ}\text{C}$ e $43,7\text{J/g}$) foram menores que os valores no primeiro aquecimento (Figura 25). Estes resultados indicaram que as propriedades térmicas do PCL não foram alteradas pelo processo de eletrofiação. Os valores obtidos no primeiro aquecimento estão de acordo com outros estudos de PCL líquido (MIDDLETON et al., 2000, YANG et al., 2006).

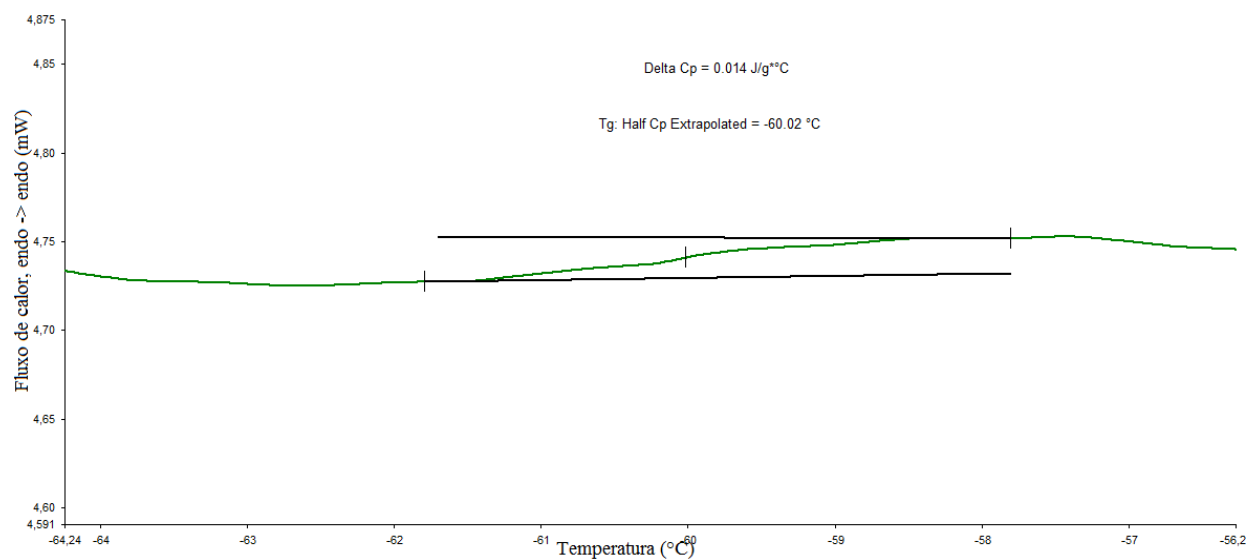
Figura 25 – Curvas de DSC (2º aquecimento) da manta de PCL



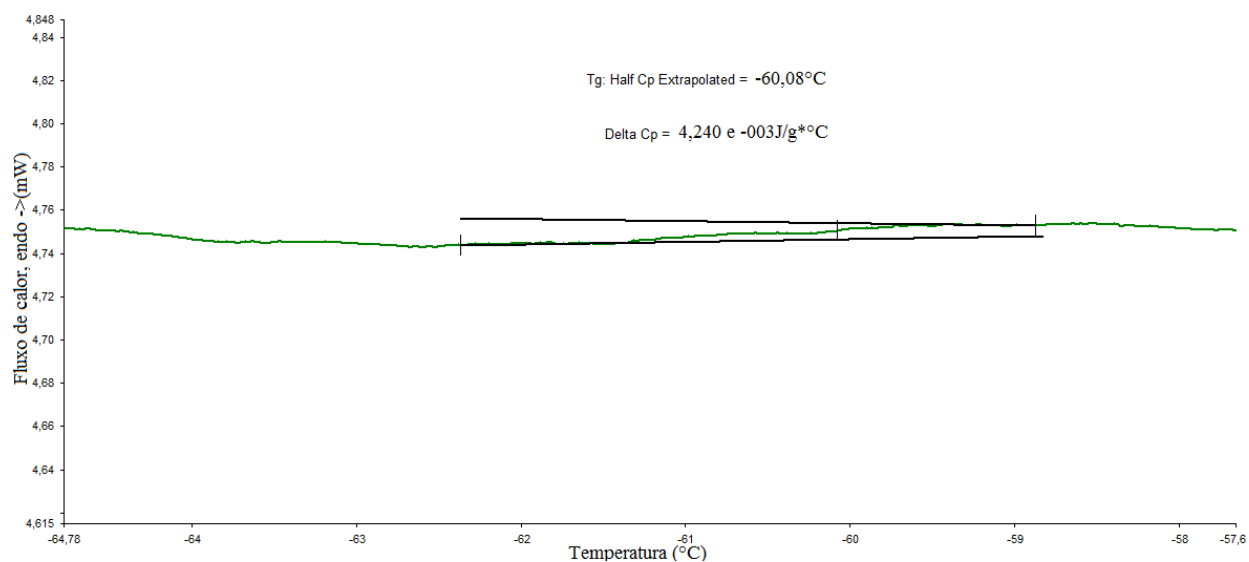
Nas Figuras 26 (a) e 26 (b), se observa a transição vítrea do PCL a $-60,02^{\circ}\text{C}$, e a transição vítrea do PCL após imobilização com Ca/P em $-60,8^{\circ}\text{C}$, respectivamente, caracterizado pela variação da entalpia do material. De acordo com as curvas de DSC se observou que não houve mudança significativa na transição vítrea após a imobilização Ca/P, sendo os valores de temperatura equiparáveis aos da literatura (ROA et al., 2004, BARBANTI et al, 2005, FRANCHETTI et al., 2006).

Figuras 26 (a) e (b) – Curvas de DSC da manta de PCL (a) e manta PCL com imobilização Ca/P (b), mostrando a transição vítrea (T_g)

(a)



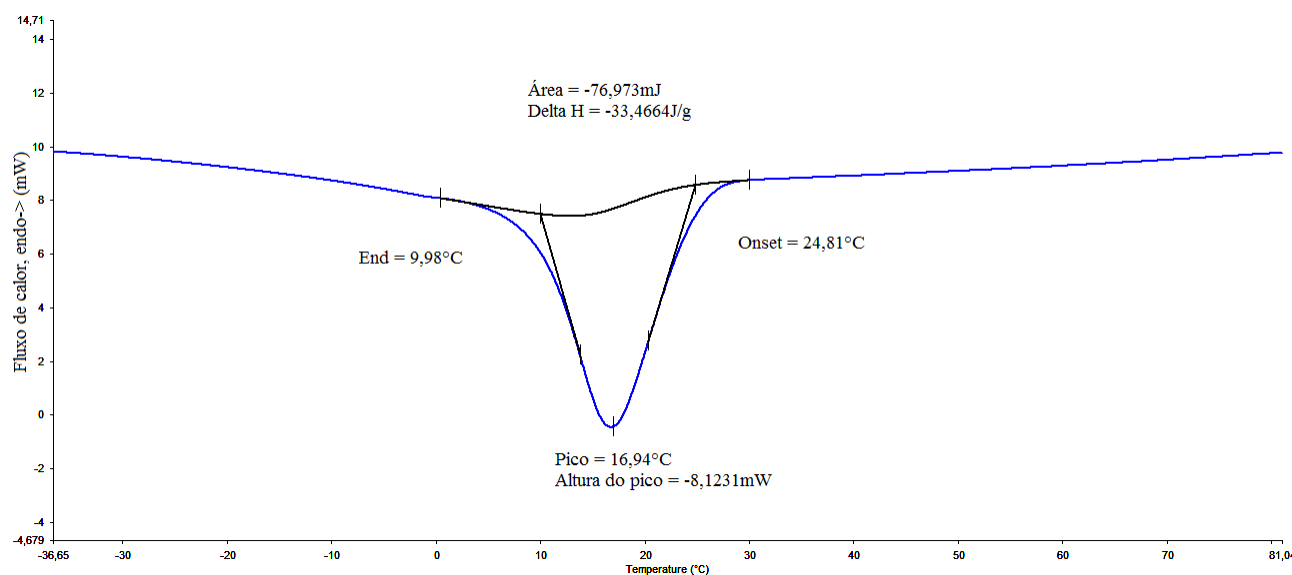
(b)



Na Figura 27 se observou no gráfico de resfriamento da manta de PCL a temperatura de cristalização, com o pico exotérmico de 16,94°C associado com a entalpia (ΔH) de -33,46J/g (*onset*, *endset*, 24,81°C e 9,98°C, respectivamente),

A cristalinidade é um dos fatores que influenciam na ancoragem celular, e também na degradação do polímero (BARBANTI et al., 2005, DE PAOLI, 2008). Esta é influenciada pelo momento em que ocorre a cristalização das cadeias, durante o processo de eletrofiação, antes ou depois do coletor metálico (LIM et al., 2008).

Figura 27 – Curva DSC de resfriamento da manta de PCL, mostrando a temperatura de cristalização



Com o DSC do primeiro aquecimento foi calculado a porcentagem de cristalinidade do PCL por meio da equação (1):

$$X_c (\%) = (\Delta H_f) / (\Delta H_f^0) * 100 \quad (1)$$

onde os parâmetros são:

X_c = grau de cristalinidade (%)

ΔH_f = entalpia de fusão (J/g)

ΔH_f^0 = entalpia de fusão de uma amostra de polímero 100% cristalino = 136 (J/g) (RUELLE et al., 2012)

De acordo com a equação (1), o grau de cristalinidade foi de 44,91% para as fibras de PCL. Lowery, et al. encontraram valores similares para a eletrofiação de PCL (46,7%) e estes valores estão de acordo com a dissolução do polímero, por exemplo, Lim, et al. obtiveram valores de cristalinidade de 56%, 54% e 50%, para 10, 12 e 14% de dissolução de polímero, respectivamente. Como apresentado anteriormente, a baixa cristalinidade ajuda na degradação e é interessante no uso para materiais biomédicos.

Tabela 2 – Valores obtidos na análise térmica da fibra de PCL eletrofiada

Material	Transição vítreia (T _g) °C	Temperatura de fusão (T _m) °C	Cristalinidade (%)	Temperatura de cristalização (T _c) °C
PCL	-60,02	60,09	44,91	16,94
PCL/mineralizada	-60,80	-----	-----	-----

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que as fibras de PCL se mostraram uniformes, homogêneas, sem porosidade e de formato cilíndrico, o que caracterizou que o processo de eletrofiação foi adequado (Figura 28).

As fibras se mostram aleatórias, e vários trabalhos disponíveis em literatura revelam que a orientação mais favorável para a interação celular são as fibras aleatórias (LAN-XIN-LÜ et al., 2011).

Em relação ao diâmetro das fibras neste estudo foram obtidos valores na escala de micrometros, 500nm a aproximadamente 2400nm. Na Figura 29 pode-se observar o gráfico de barras da frequência dos diâmetros das nanofibras. A média da maior frequência é 900nm. Este valor também foi obtido em outro estudo com PCL realizado por Lim et al (2008) e de acordo com este estudo existe uma forte ligação entre os diâmetros das fibras eletrofiadas e as soluções utilizadas no processo em altas concentrações.

Os valores dos diâmetros das fibras de PCL após a mineralização com Ca/P aumentaram, o que pode ser explicado pelo processo de imobilização, pois ocorre imersão das amostras em solução de CaCl_2 e Na_2PO_4 ocorrendo a dilatação das fibras de PCL (Figura 28).

Várias pesquisas mostram que os diâmetros cada vez menores das fibras poliméricas propiciam uma melhor adesão e proliferação das células, os valores variam aproximadamente de 957 a 250nm (ZHANG et al., 2005, SANTOS et al., 2007, RAVICHANDRAN et al., 2012).

Figura 28 - Micrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura, FEI Magellan 400L, a) e b) Manta PCL, c) e d) Manta PCL mineralizada

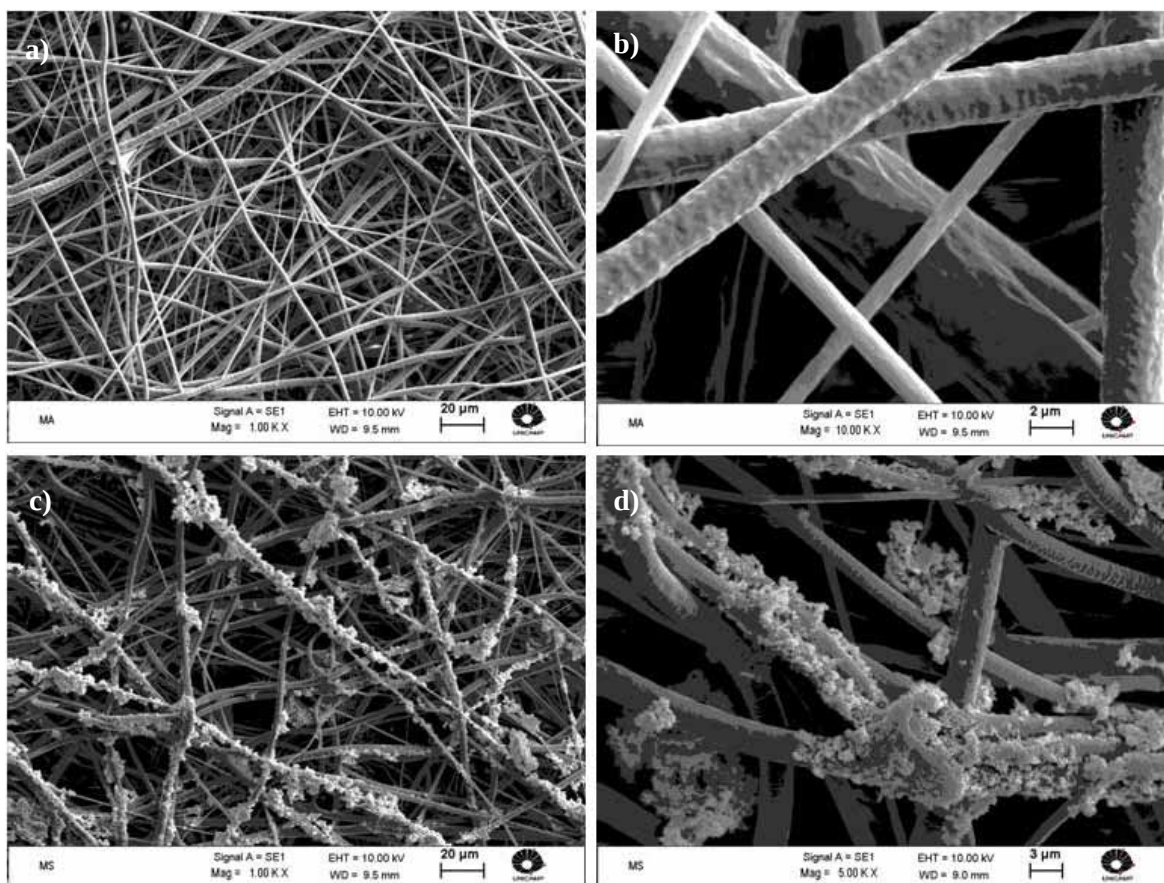


Figura 29 – Gráfico do diâmetro das fibras de PCL

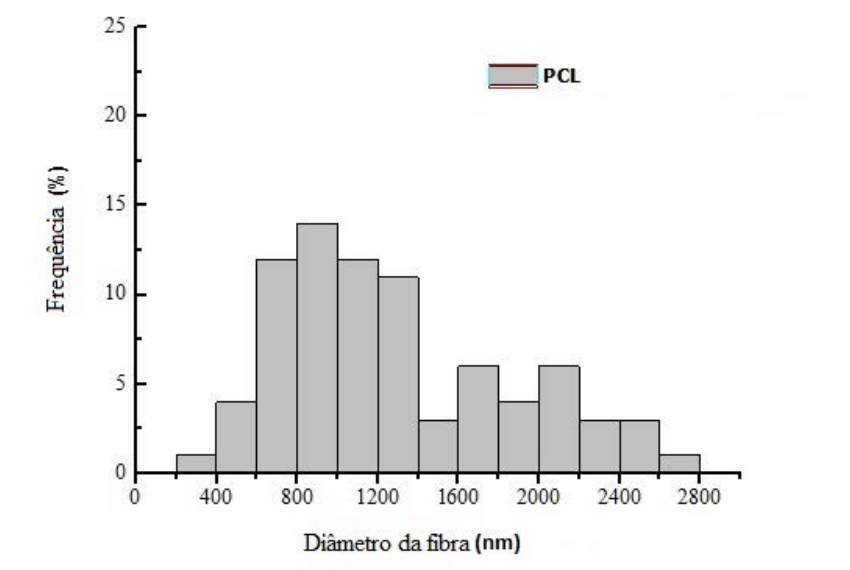
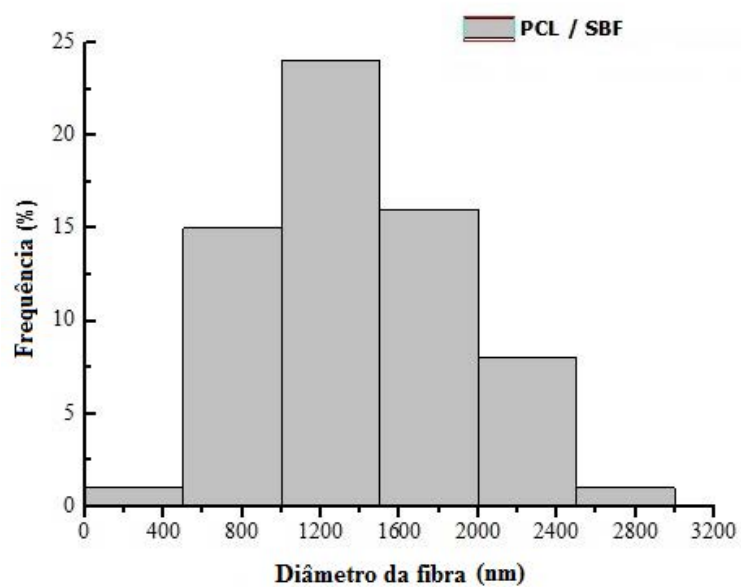
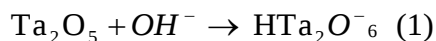


Figura 30 – Gráfico do diâmetro das fibras de PCL após a mineralização com Ca/P

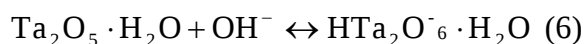
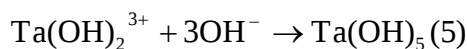
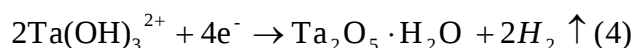
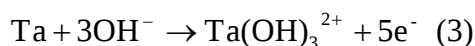
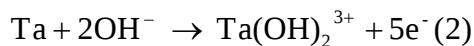


4.2 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS LIGAS APÓS ELETROFIAÇÃO

A morfologia das fibras eletrofiadas sobre a superfície da liga Ti30Ta e a presença de cálcio e fosfato foram observados por meio do MEV e EDS. A liga Ti6Al4V e Ti CP foram utilizados como grupo controle. Antes da eletrofiação, as amostras lixadas (Figura 31 a) foram submetidas a um pré-tratamento com solução de NaOH (Figura 31 b). Este tratamento é similar ao tratamento alcalino proposto por Kokubo (1998). A superfície das amostras possuem uma camada passiva (TiO₂) que reage com a solução de NaOH formando uma camada de hidrogel de tantalato de sódio, hidratado e amorfo, de acordo com a equação 1. A diferença entre a metodologia proposta por Ravichandran, utilizada neste estudo, e Kokubo ocorre após a imersão em NaOH. As amostras não foram submetidas ao tratamento térmico a 600°C para estabilizar a camada amorfa de tantalato de sódio. As amostras foram imersas em HCl e, neste caso, não foi formada uma superfície porosa. Os valores de molaridade usada nas ligas Ti30Ta foram baseados em estudos anteriores (CAPELLATO et al., 2014).



Em seguida o substrato metálico de tântalo reage com o NaOH como segue:



A superfície após a deposição de PCL pode ser observada na Figura 28c. As fibras processadas por eletrofiação normalmente tem uma distribuição unimodal enquanto fibras bimodal foram observadas com formação em gotas por meio de um processo similar, o processo *electrospray*. Fibras bimodais alternando em micro e nanofibras foram observadas por Deitzel et al (2001) em Poli (óxido de etileno) (PEO)/água com concentração de 8% e concentrações maiores. Esta formação incomum também foi

observado em nosso estudo (Figura 31 c). De acordo com esses autores, a formação é fortemente influenciada por parâmetros, como, taxa de alimentação, voltagem utilizada na eletrofiação, e outras propriedades da solução como a concentração. Nesta formação existem dois diâmetros: primário e secundário (Figura 32).

Após a eletrofiação as amostras foram imersas em solução de 0,5M de CaCl_2 e 0,3M de Na_2HPO_4 para mineralização, de acordo com a metodologia de Ravichandran et al (2012). Na Figura 31d foi observada a formação de cristais de apatita e na Figura 32 os cristais de apatita estão aderidos às fibras. Uma observação mais detalhada da superfície após a mineralização nos leva a conclusão que a deposição de apatita foi diferente nas amostras de Ti30Ta, Ti6Al4V e TiCP. Para o titânio e a liga Ti6Al4V a deposição da apatita se apresenta entre as fibras, enquanto para a liga Ti30Ta a apatita foi formada sobre as fibras. Esse comportamento pode ser associado ao pré-tratamento com NaOH. É evidente nas imagens (28b, 36b e 41b) que as superfícies são diferentes após a imersão em NaOH seguido de HCl. Provavelmente, a diferença do substrato abaixo das fibras, tantalato de sódio, para a liga Ti30Ta e titanato de sódio para a liga Ti6Al4V e TiCP, respectivamente, podem interferir na distribuição da apatita.

Figura 31: Micrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura FEI Magellan 400L, a) Liga Ti30Ta lixada, b) Liga Ti30Ta após tratamento alcalino em NaOH(1M) a 60°C por 24h e imersão em HCl por 1h, c) Liga Ti30Ta com PCL, d) Liga Ti30Ta com PCL e mineralização

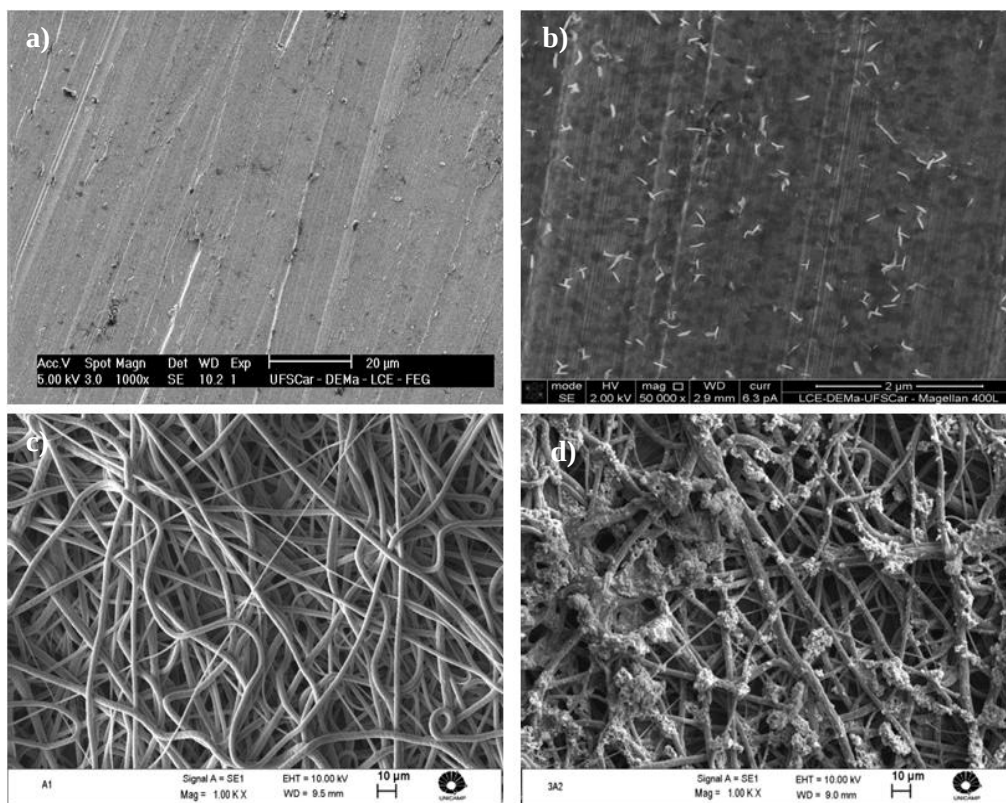
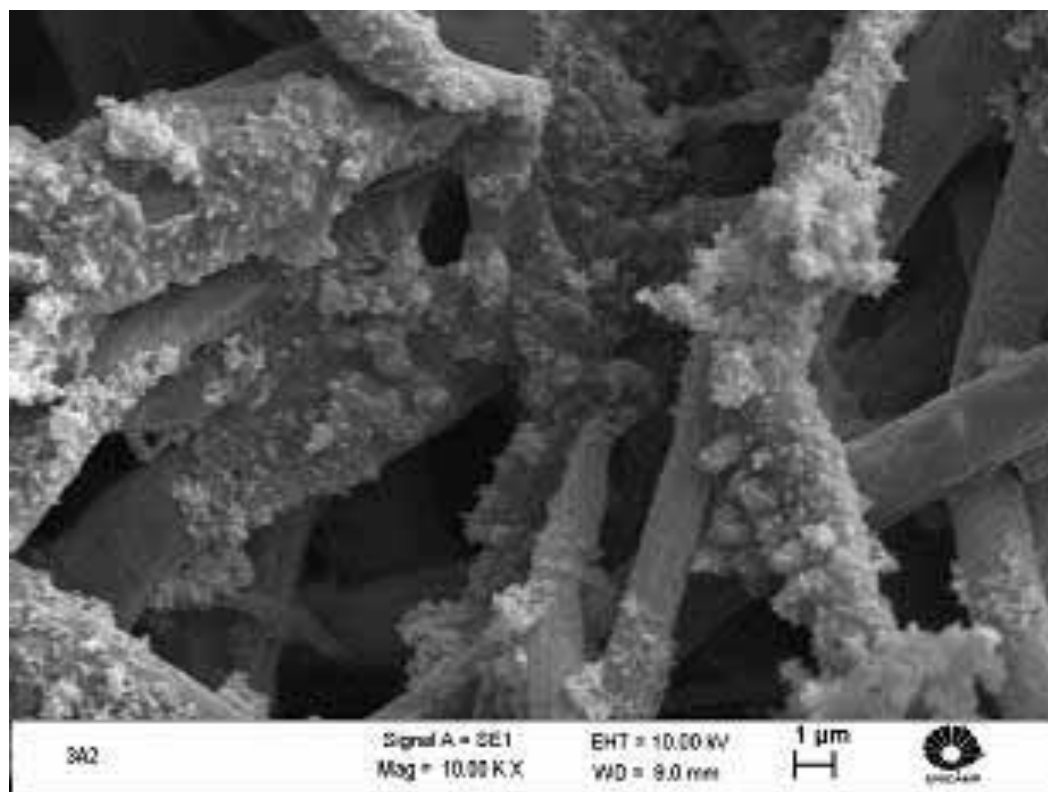


Figura 32 – Microscopia eletrônica de varredura das fibras de PCL sobre a superfície da liga Ti30Ta após mineralização



Por meio da microscopia confocal da amostra lixada (Figura 33 a) e após o tratamento alcalino (Figura 33 b), foi visualizada a topografia da superfície, mostrando o que o tratamento alcalino (NaOH) provocou na superfície em termos de rugosidade.

O tratamento de superfície proporcionou micro rugosidades na superfície semelhante ao tamanho das células ósseas (Figura 33 b). A microscopia confocal mostrou maior rugosidade após o tratamento alcalino e HCl (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores da rugosidade média da liga Ti30Ta lixada e após tratamento alcalino e HCl

Ti30Ta	Rugosidade média (μm)
Lixada	0,62 $\pm$ 0,14
Tratamento alcalino/HCl	1,55 $\pm$ 0,38

Figura 33a – Microscopia confocal da liga Ti30Ta lixada

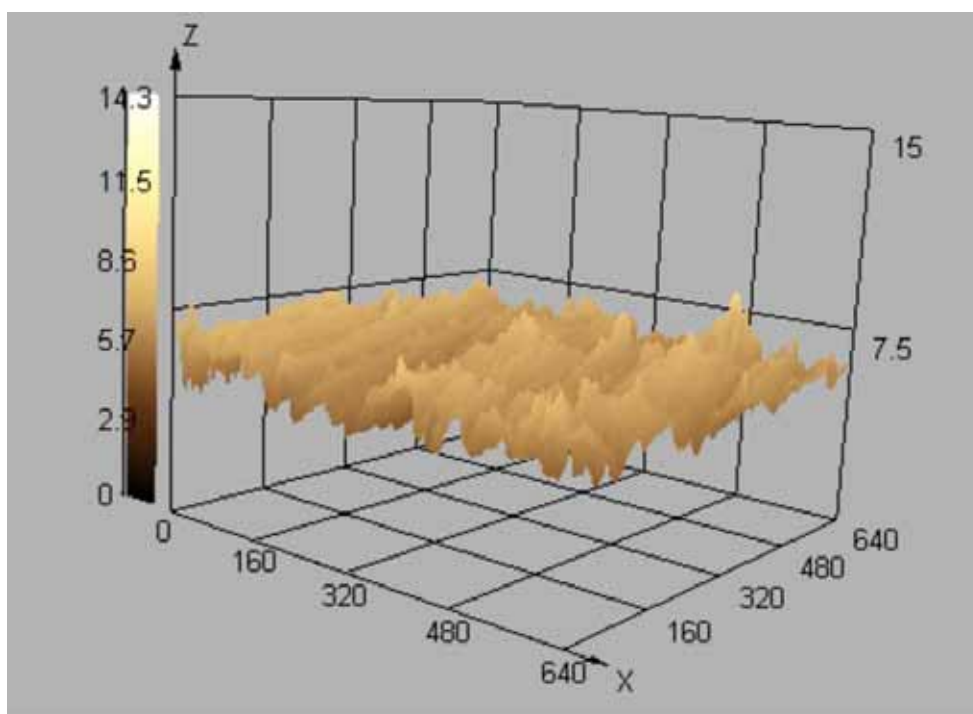
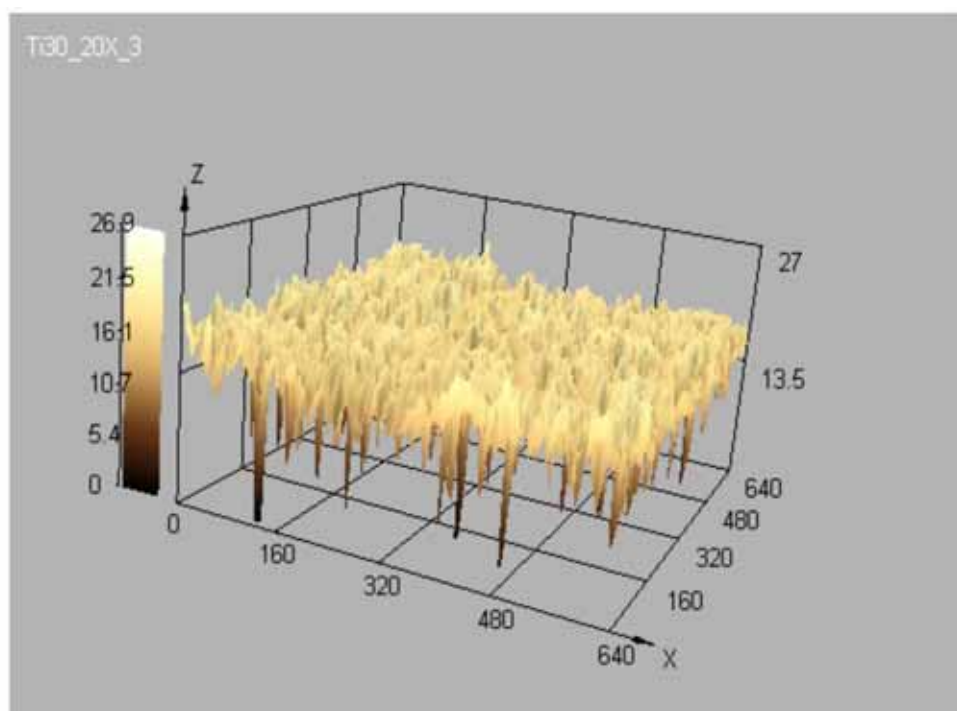


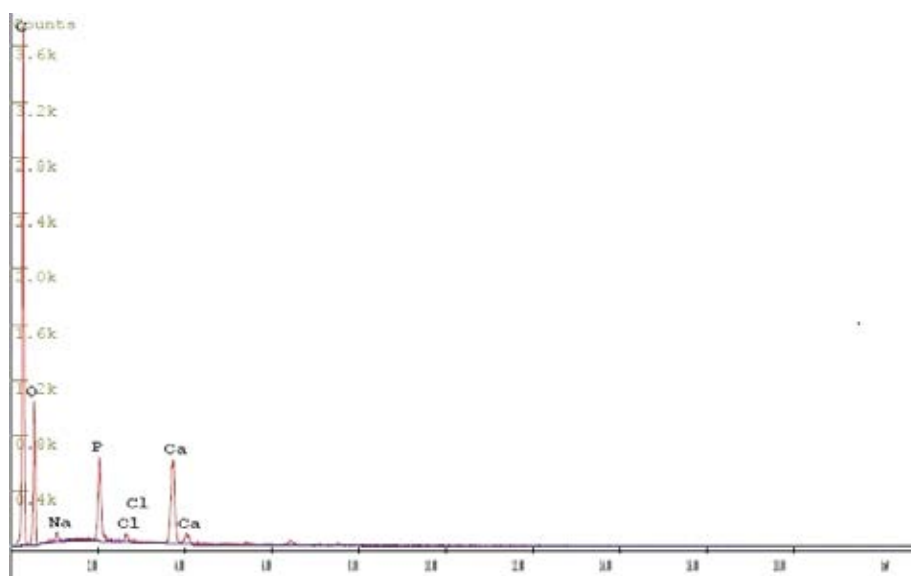
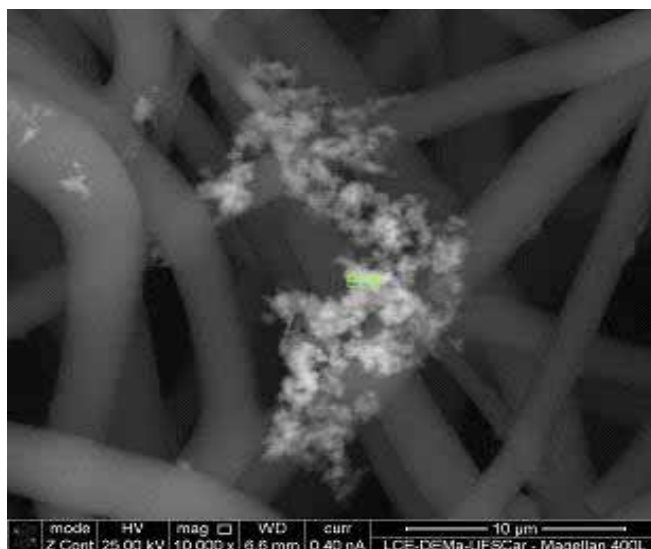
Figura 33b – Microscopia confocal da liga Ti30Ta após tratamento alcalino+ HCl. Os picos abaixo mostram a porosidade do NaOH na superfície da liga.



A composição das partículas formadas foi avaliada usando a espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Para a liga Ti30Ta o espectro confirmou a presença de sódio, cloro, cálcio e fosfato na superfície (Figura 34b). Sódio e cloro são resultantes do pré-tratamento com NaOH e HCl. A média de Ca/P foi de 1.52 abaixo da hidroxiapatita estequiométrica (1.67) e do osso humano (1.71). De acordo com a literatura, a formação de apatita deficiente em cálcio ocorre durante o método utilizado para a formação do fosfato de cálcio (CHEN et al., 2006).

Figura 34 – (a) região observada para determinação da apatita; (b) EDS da liga Ti30Ta após eletrofiiação com PCL e mineralização

(a)

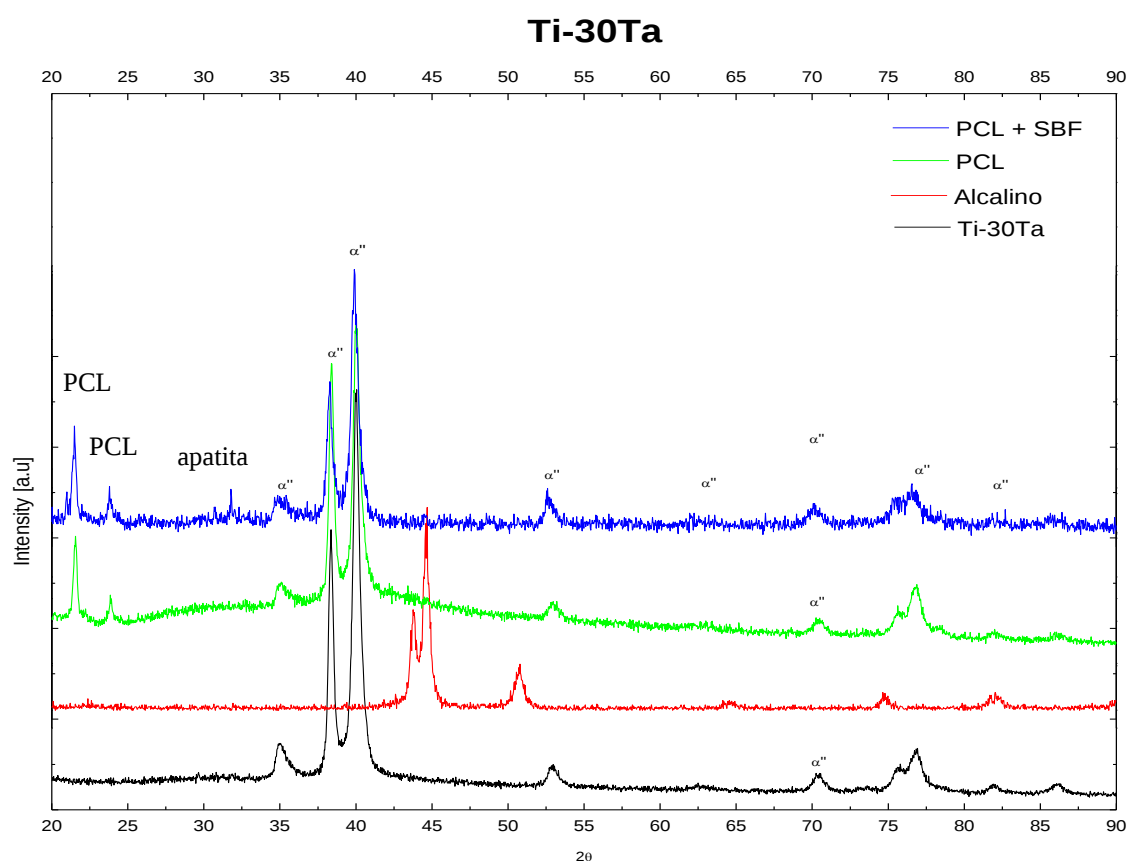


(b)

Na Figura 35 se verificou os picos obtidos após análise de raios X da liga Ti30Ta comparando as amostras tratadas com o substrato. Para os grupos NaOH e PCL nenhum pico adicional foi verificado.

Após o tratamento de imobilização da apatita na amostra eletrofiada, pico característico de apatita foi observado em aproximadamente 32° (KOKUBO, 1996, DUEK et al., 1999, LEGEROS, 2008). Esses resultados corroboram com as análises EDS realizadas nas amostras.

Figura 35 – Difração de raios X da liga Ti30Ta lixada, após tratamento alcalino com NaOH (1M) a 60°C por 24h e imersão em HCl por 1h, após eletrofiação com PCL e após eletrofiação com PCL e mineralização



Um estudo comparativo foi realizado com a liga Ti6Al4V e o titânio comercialmente puro (Ti CP).

Nas Figuras 36a e 36b é possível observar a superfície da liga Ti6Al4V antes e após o tratamento alcalino seguido de imersão em HCl, respectivamente.

Na Figura 36c pode ser observada a superfície após a deposição de PCL e, como na liga Ti30Ta, houve o recobrimento total da amostra com a formação de uma camada homogênea de polímero. Na Figura 36d após a imersão das amostras em solução formada por Ca/P houve a deposição de cristais nas fibras, e na Figura 37, com maior aumento, se observou que houve deposição de cristais na superfície da liga também, o que pode ser explicado pela diferença de molaridade durante o tratamento alcalino.

Figura 36 - Micrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura, FEI Magellan 400L, a) Liga Ti6Al4V lixada, b) Liga Ti6Al4V após tratamento alcalino em NaOH (5M) a 60°C por 24h e imersão em HCl por 1h, c) Liga Ti6Al4V com PCL poli (ϵ -caprolactona), d) Liga Ti6Al4V com PCL (ϵ -caprolactona) e mineralização

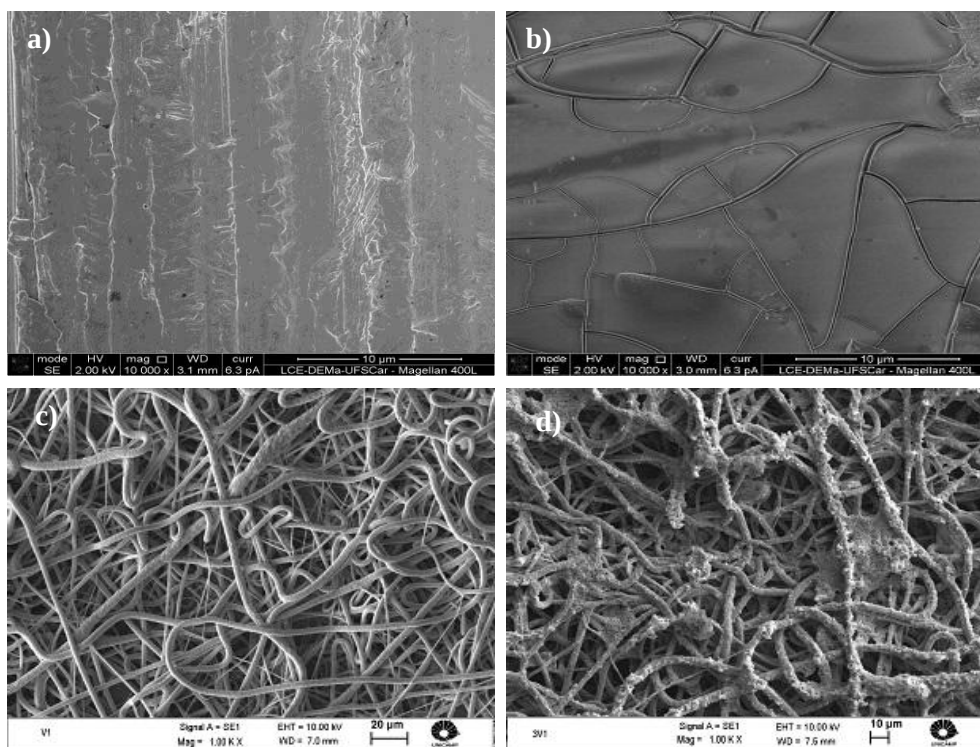
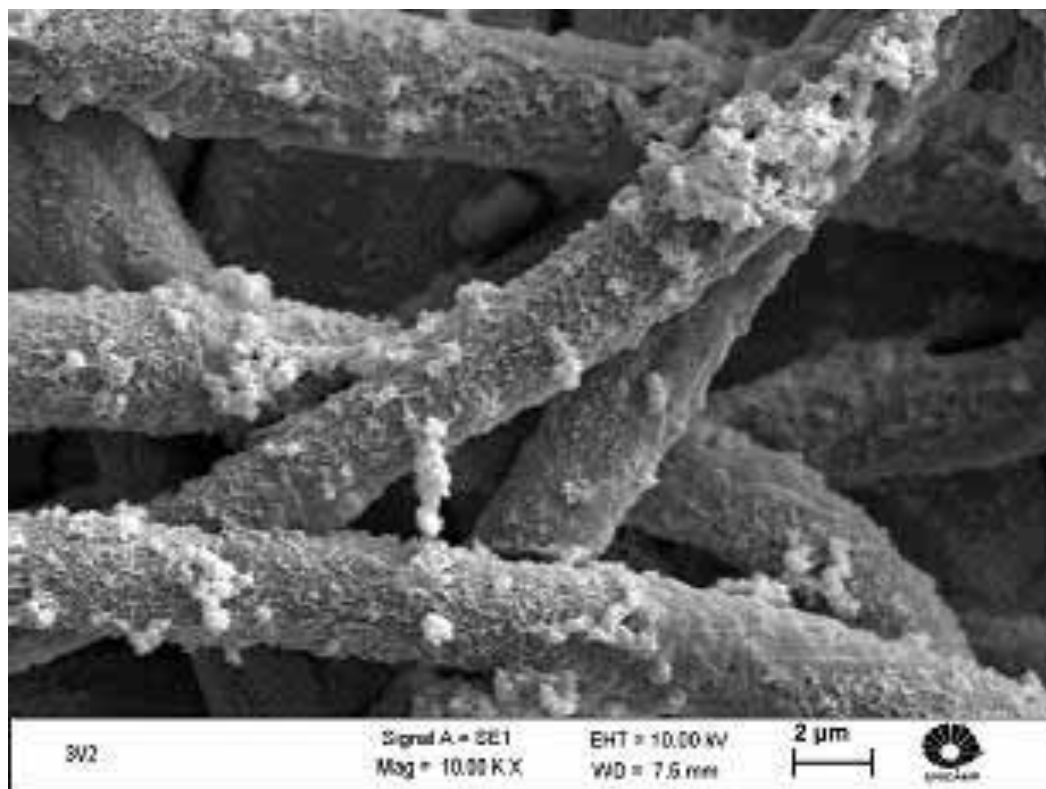


Figura 37 – Microscopia eletrônica de varredura das fibras de PCL sobre a superfície da liga Ti6Al4V após mineralização



A topografia da superfície da liga Ti6Al4V foi verificada por meio da microscopia confocal com a liga somente lixada e após o tratamento alcalino/HCl (Figuras 38a e 38b). Na Tabela 4 estão os valores da rugosidade média e foi observado que não houve mudança na rugosidade após o tratamento alcalino.

Figura 38a – Microscopia confocal da liga Ti6Al4V lixada

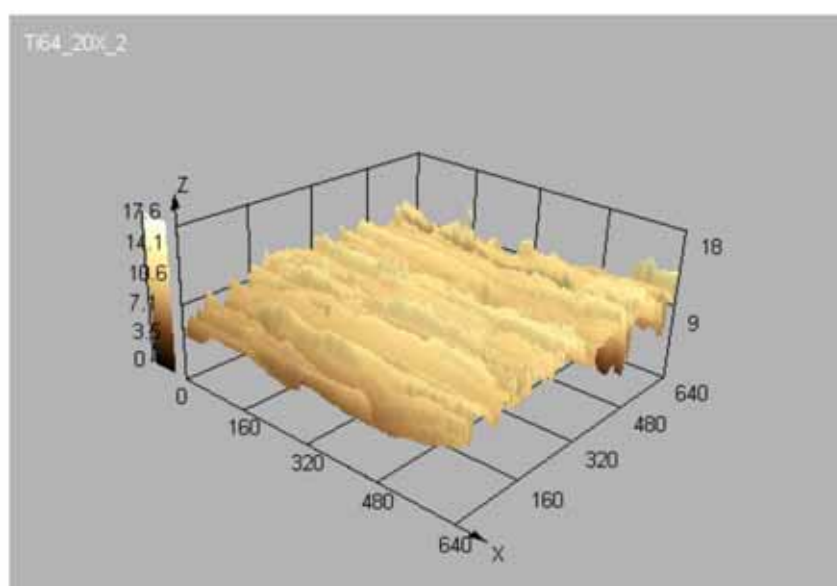


Figura 38b – Microscopia confocal da liga Ti6Al4V após tratamento alcalino/HCl

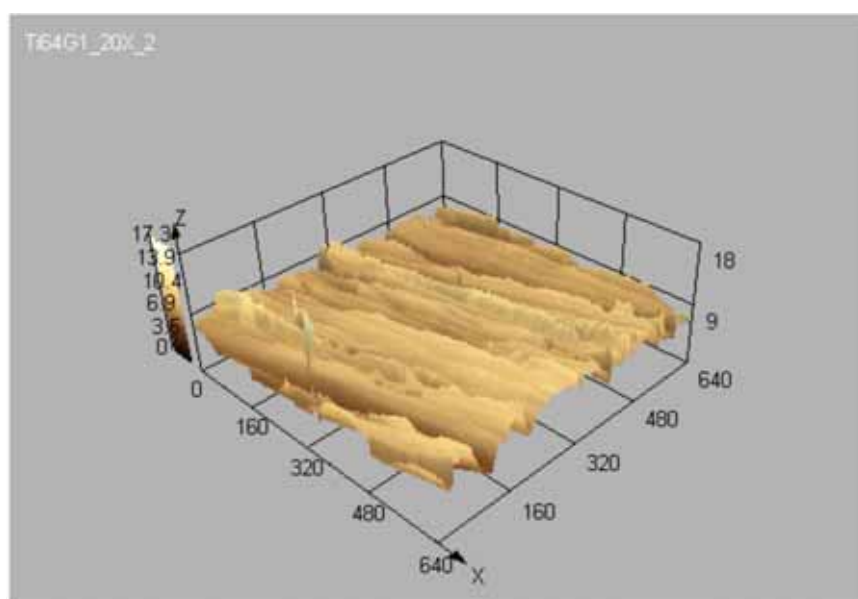
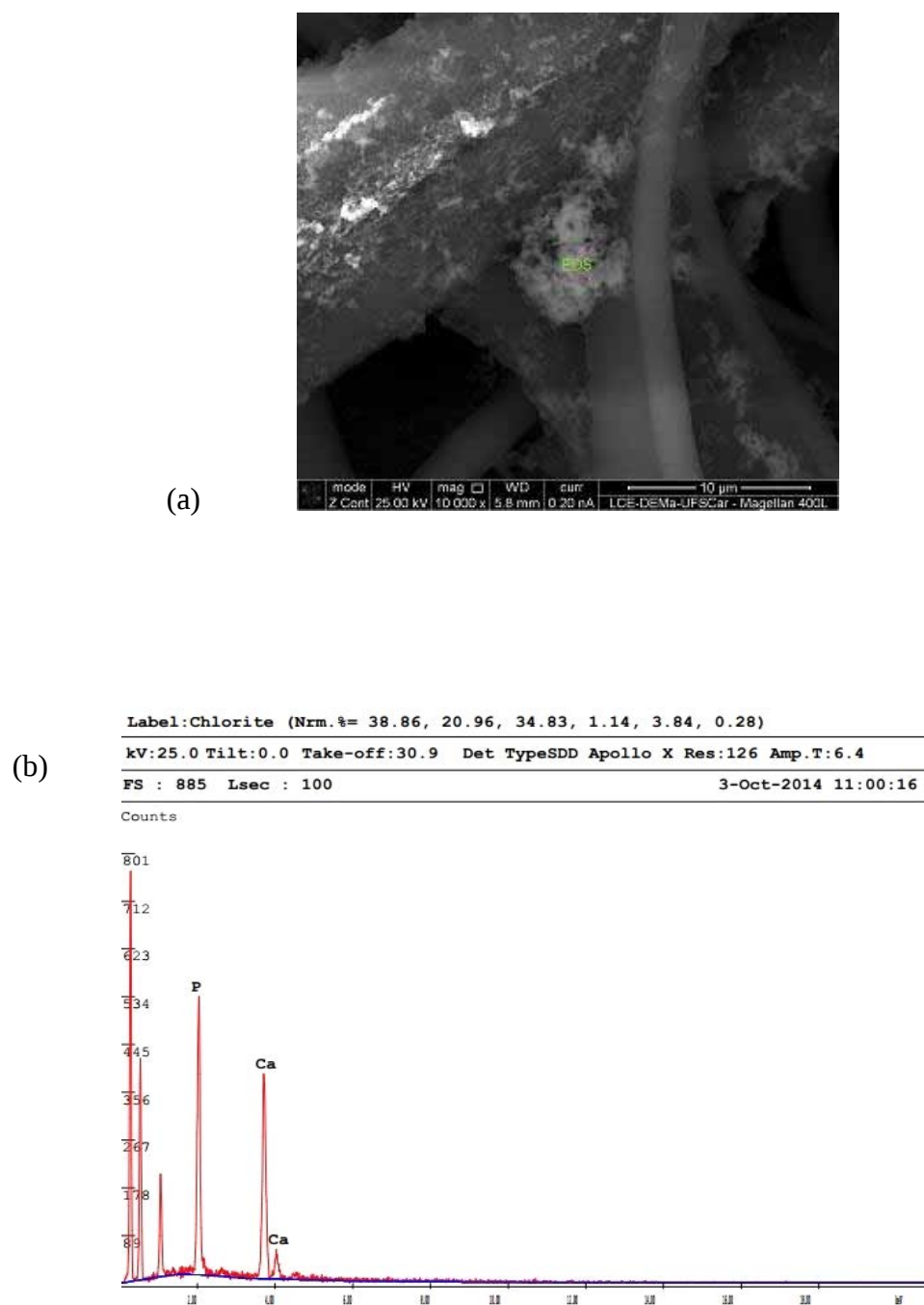


Tabela 4 – Valores de rugosidade média da liga Ti6Al4V lixada e após o tratamento alcalino/HCl

Ti6Al4V	Rugosidade média (μm)
Lixada	1,00 $\pm$ 0,03
Tratamento alcalino/HCl	0,98 $\pm$ 0,19

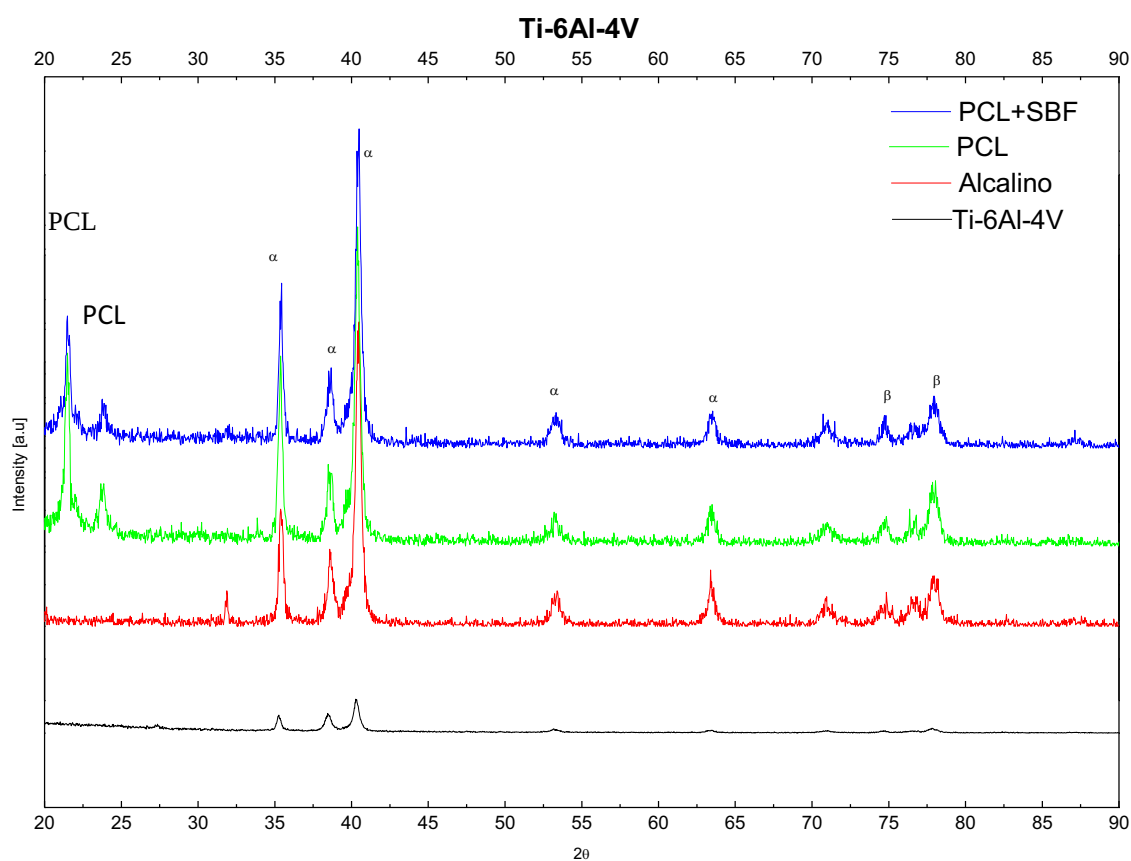
A análise da composição química da região contendo os cristais (Figura 39) confirmou a formação de vários tipos de fosfatos, a razão Ca/P variou de 1,0 a 1,20, o que indica a presença do fosfato dicálcio di-hidratado (DCPD), fosfato dicálcio anidro (DCPA) e pirofosfato de cálcio di-hidratado.

Figura 39 – (a) região observada para determinação da apatita (b) EDS da liga Ti6Al4V após eletrofaiação com PCL e mineralização



Os picos da difração de raios X da liga Ti6Al4V (Figura 40), mostram a presença do polímero (PCL) na faixa entre 20°, 24° (DUEK et al., 1999), e apesar do EDS ter confirmado a presença de cálcio e fosfato, na difração não foi possível visualizar com clareza a apatita, que, segundo a literatura se apresenta na região 32° aproximadamente (LEGEROS, 2008).

Figura 40 – Difração de raios X da liga Ti6Al4V lixada, após tratamento alcalino com NaOH (5M) a 60°C por 24h e imersão em HCl por 1h, após eletrofiação com PCL e após eletrofiação com PCL e mineralização



Nas Figuras 41a e 41b é possível observar a superfície do titânio puro antes e após o tratamento alcalino seguido de imersão em HCl, respectivamente. Nas Figuras 43a e 43b observa-se que com o tratamento alcalino a superfície passa a ser rugosa, o que é bom indicativo para a deposição das fibras.

A superfície após a deposição de PCL pode ser observada na Figura 41c. Com a eletrofição houve o recobrimento total da amostra com a formação de uma camada homogênea de polímero. A imersão das amostras após eletrofição em solução formada por Ca/P possibilitou a deposição de cristais nas fibras conforme visualizado na Figura 41 d e em maior aumento na Figura 42.

Figura 41 - Micrografia obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura, FEI Magellan 400L, a) Ticp lixado, b) Ticp após tratamento alcalino em NaOH(5M) a 60°C por 24h e imersão em HCl por 1h, c) Ticp com PCL poli (ϵ -caprolactona), d) Ticp com PCL (ϵ -caprolactona) e mineralização

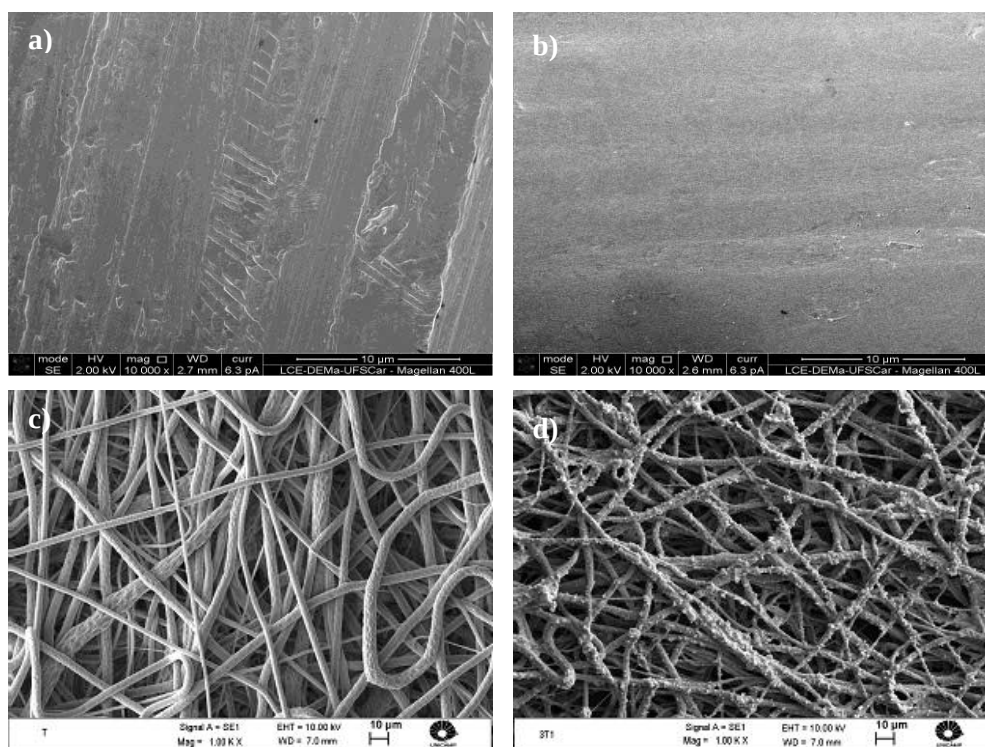
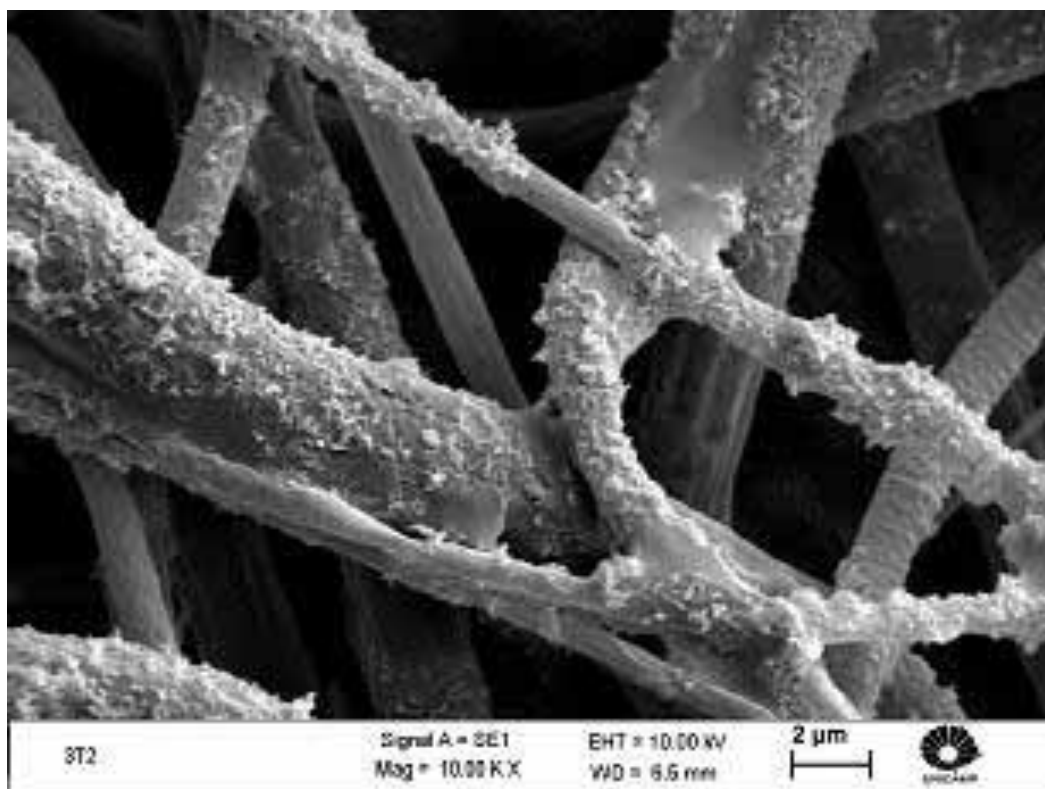


Figura 42 – Microscopia eletrônica de varredura das fibras de PCL sobre a superfície do titânio puro após mineralização



A microscopia confocal do Ti CP mostrou um aumento da rugosidade após o tratamento alcalino (Tabela 5).

Figura 43a – Microscopia confocal do titânio comercialmente puro lixado

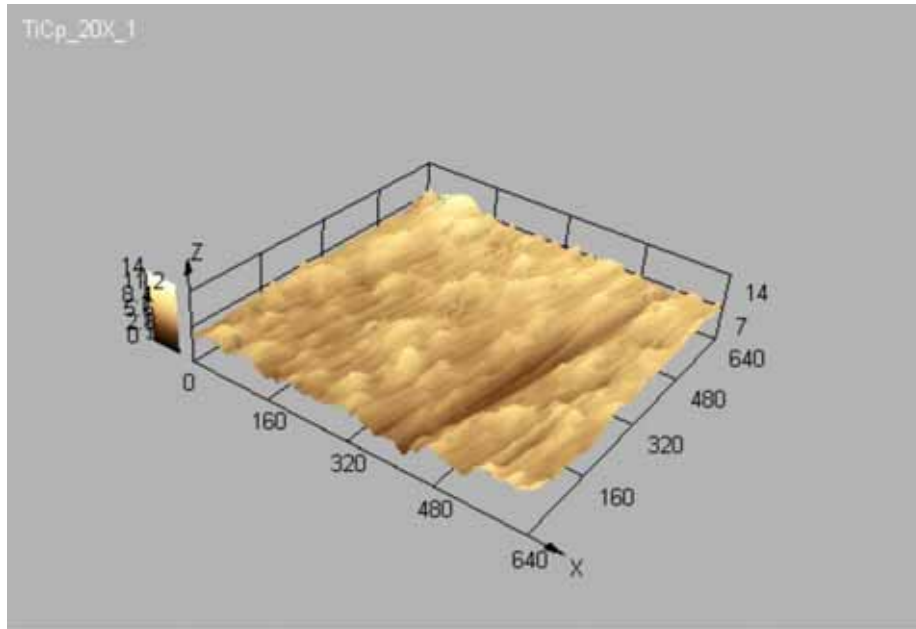


Figura 43b – Microscopia confocal do titânio comercialmente puro após tratamento alcalino/HCl

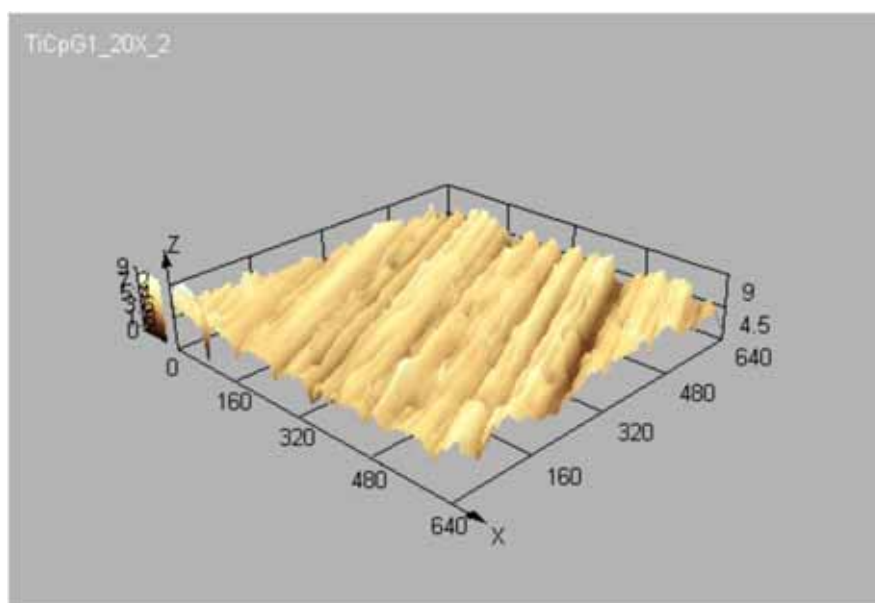


Tabela 5 – Valores de rugosidade do titânio comercialmente puro lixado e após tratamento alcalino/HCl

Titânio comercialmente puro (CP)	Rugosidade média (μm)
Lixado	0,68 $\pm$ 0,16
Tratamento alcalino/HCl	0,74 $\pm$ 0,07

De acordo com os resultados de rugosidade obtidos com a microscopia confocal das ligas Ti30Ta, Ti6Al4V e no Ti CP, constatou-se que na liga Ti30Ta os valores médios da rugosidade foram maiores, seguido pelo Ti CP, que também mostrou aumento e por último a liga Ti6Al4V que não houve alteração após o tratamento alcalino (Tabela 6).

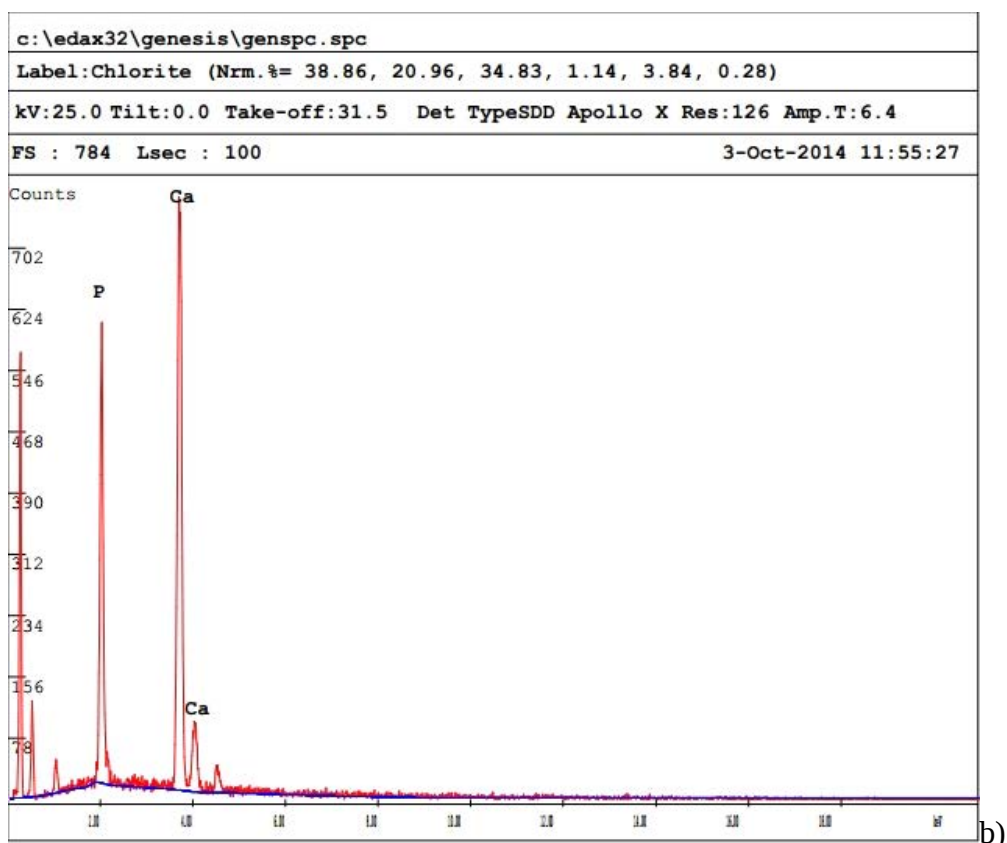
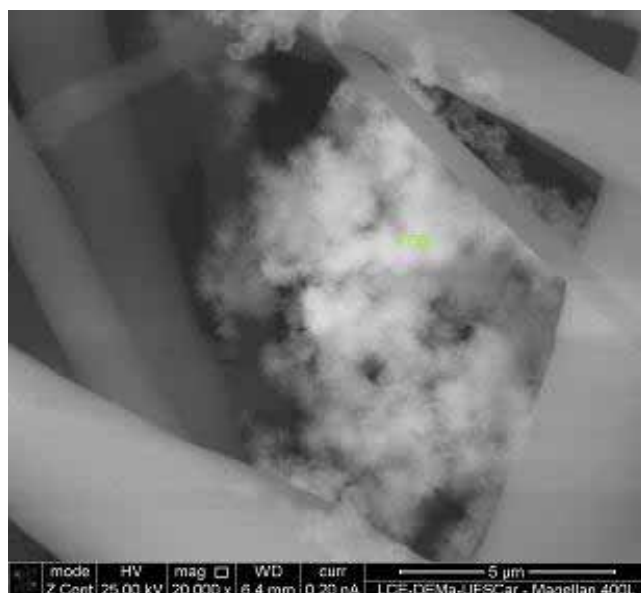
Tabela 6 – Valores da rugosidade da liga Ti30Ta, Ti6Al4V e do titânio comercialmente puro (CP)

Material/	Ti30Ta	Ti6Al4V	TiCP
Rugosidade média (μm)			
Lixado	0,62 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,03	0,68 $\pm$ 0,16
Tratamento alcalino/HCl	1,55 $\pm$ 0,38	0,98 $\pm$ 0,19	0,74 $\pm$ 0,07

A análise da composição química da região contendo os cristais (Figura 44) confirmou a formação de apatita. Somente cálcio e fosfato foram verificadas no EDS do TiCP. A razão Ca/P foi 1.95 abaixo da hidroxiapatita estequiométrica (1.67). Estes valores confirmam a nossa hipótese sobre o substrato uma vez que foi obtida a relação Ca/P mais elevada.

Figura 44 – (a) região observada para determinação da apatita (b) EDS do titânio puro após eletrofiação com PCL e mineralização

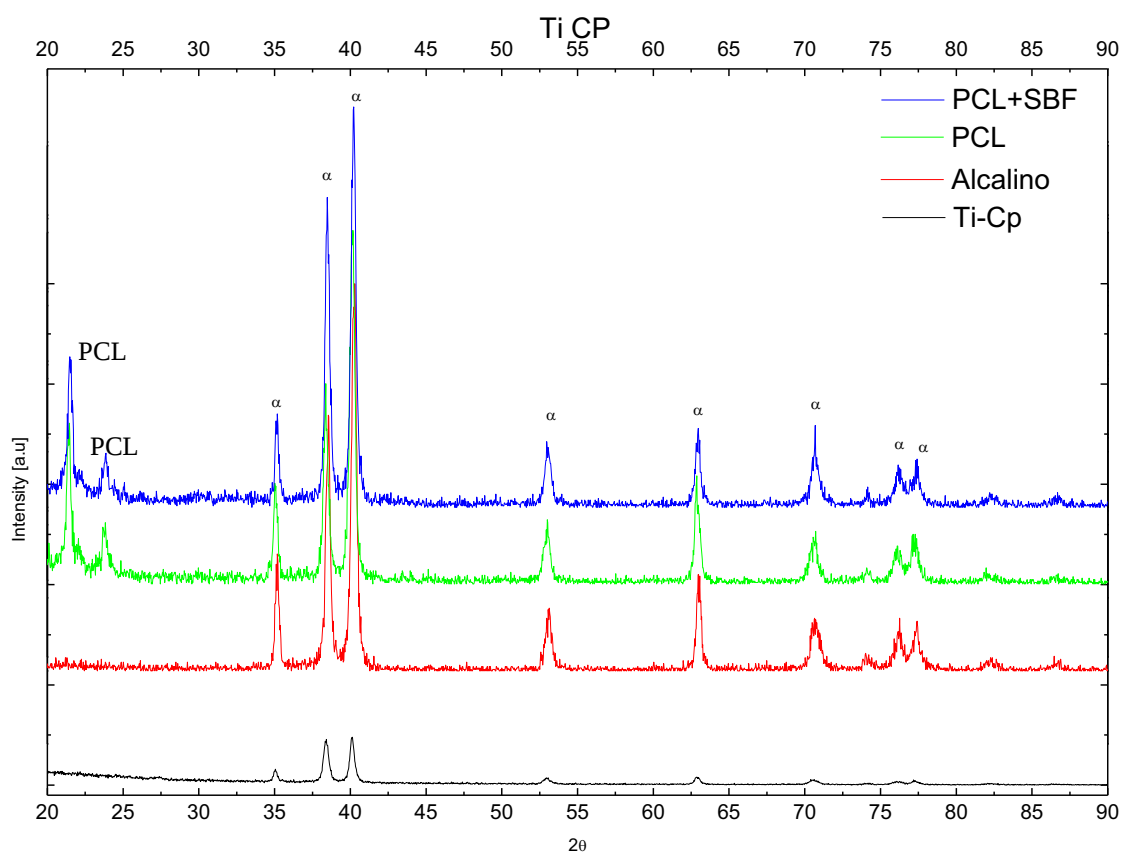
a)



Na difração de raios X do Ti CP foi observado os picos do polímero (PCL) na liga após a eletrofiação e com a mineralização com fosfato de cálcio entre 20° e 24° e como na liga Ti6Al4V não foi possível observar a apatita.

Após as análises de microscopia, EDS, difração de raios X, pôde-se observar que nos três materiais, Ti30Ta, Ti6Al4V e TiCP a eletrofiação cobriu toda a amostra de forma homogênea, porém com a mineralização com fosfato de cálcio a distribuição foi diferente; na liga Ti30Ta se apresentou sobre as fibras de PCL e na liga Ti6Al4V e no TiCP se apresentou entre as fibras e sobre o substrato, concluindo que o substrato interfere na deposição de apatita.

Figura 45 - Difração de raios X do titânio cp lixado, após tratamento alcalino com NaOH (5M) a 60°C por 24h e imersão em HCl por 1h, após eletrofiação com PCL e após eletrofiação com PCL e mineralização



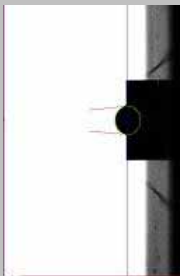
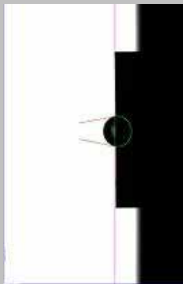
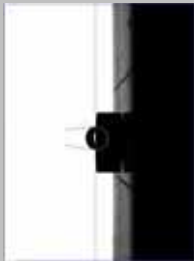
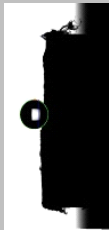
4.2.1 Molhabilidade

Nas aplicações biomédicas a hidrofilicidade da superfície é importante, pois proporciona o aumento da interação celular e consequente osseointegração. Com a medida do ângulo de contato pôde-se verificar se o material é hidrofílico ou hidrofóbico medindo a energia da superfície através do ângulo formado do líquido com a superfície.

Para caracterizar a molhabilidade da superfície das amostras determinou-se o ângulo de contato das ligas Ti30Ta e Ti6Al4V e do titânio comercialmente puro, somente lixadas, com o tratamento alcalino (NaOH) e imersão em HCl, após a eletrofiação com PCL e também com a mineralização de Ca/P.

A deposição das fibras de PCL seguidas pelo tratamento de biomineralização modificou a molhabilidade da superfície. A Tabela 7 mostra o ângulo de contato de cada material e tratamento. A superfície hidrofóbica foi obtida após a deposição de fibras de PCL eletrofiadas para os três materiais utilizados neste estudo, liga Ti30Ta (115,85°), Ti CP (109,35°) e liga Ti6Al4V (110,50°). Após a imobilização de apatita o ângulo de contato diminuiu para 69,82°, 81° e 72,80°, respectivamente, tornando a superfície hidrofílica.

Tabela 7 - Tabela com as medidas do Ângulo de Contato

Condição da amostra	Ti30Ta			Ti Cp			Ti6Al4V		
	Medida do ângulo (°)	Aspecto da gota (água deionizada)	Medida do ângulo (°)	Aspecto da gota (água deionizada)	Medida do ângulo (°)	Aspecto da gota (água deionizada)			
Lixada	66,54±2,60		59,68±2,87		59,70±3,81				
Tratamento alcalino/HCL	81,01±13,36		85,65±6,86		82,98±0,66				
Eletrofiadas PCL	115,85±3,76		109,35±2,25		110,50±3,04				
Eletrofiadas PCL/mineralização	69,82±13,11		57,34±41,04		72,80±5,14				

4.3 AVALIAÇÃO CELULAR

Para avaliação da morfologia celular foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG) sendo observado o desenvolvimento celular na superfície da liga Ti30Ta e do Ti CP, após 1, 4 e 7 dias de crescimento nos três grupos estudados: amostras lixadas, amostras revestidas com fibras de PCL eletrofiadas e amostras revestidas com fibras de PCL eletrofiadas biomíneralizadas.

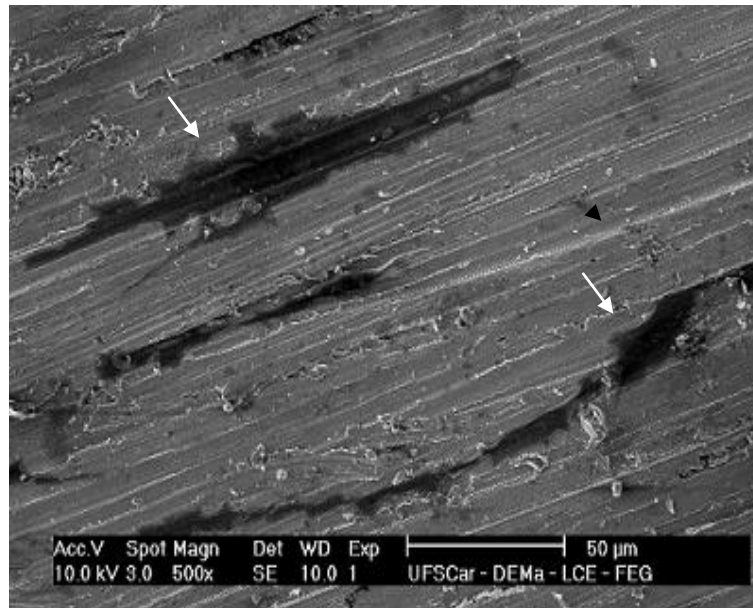
Nesse estudo foram utilizadas células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) similares às células-tronco mesenquimais (MSCs), as quais apresentam características fibroblásticas, que favorecem a diferenciação celular (SEKIYA et al., 2002).

O tecido adiposo tem sido muito utilizado por ser uma fonte promissora de células-tronco, por exemplo, em uma lipoaspiração é adquirido de 100 ml a 1 litro de tecido adiposo, pela facilidade de obtenção, baixo risco para os doadores (lipoaspiração) e outra vantagem é que pode ser utilizado de 8 a 10 passagens, pois mantém seu potencial proliferativo (ZUTTON et al, 2013, YARAK et al., 2010).

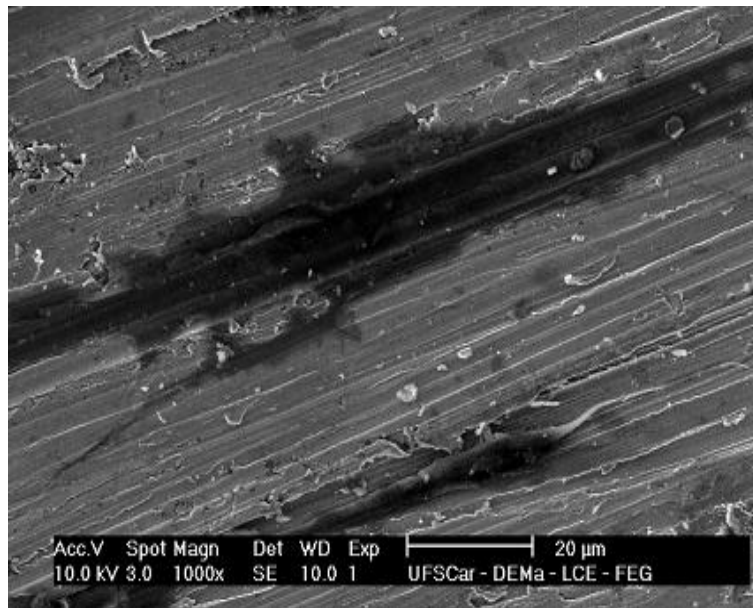
Nas Figuras 46 (a) e 46 (b) é possível observar na superfície da liga Ti30Ta lixada após 1 dia de cultura, manchas escuras alongadas na direção do lixamento da amostra, indicando a presença de células. Esse comportamento é um indicativo da biocompatibilidade da liga Ti30Ta, propícia para a adesão e proliferação celular (CAPELLATO et al., 2014).

Figura 46 – Imagens das células-tronco (ADSC) após 1 dia de cultura celular na liga Ti30Ta (500x) (a) e com aumento (1000x) (b)

(a)

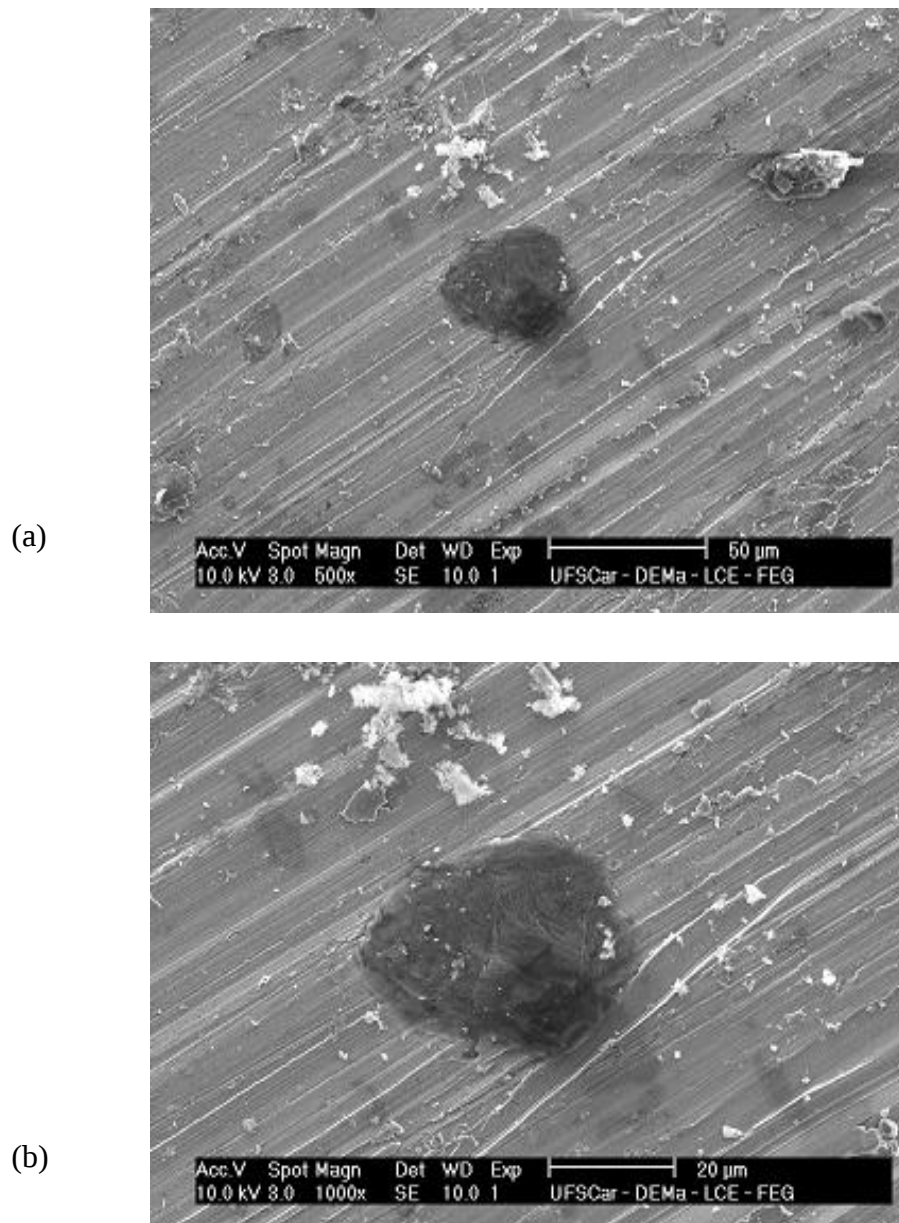


(b)



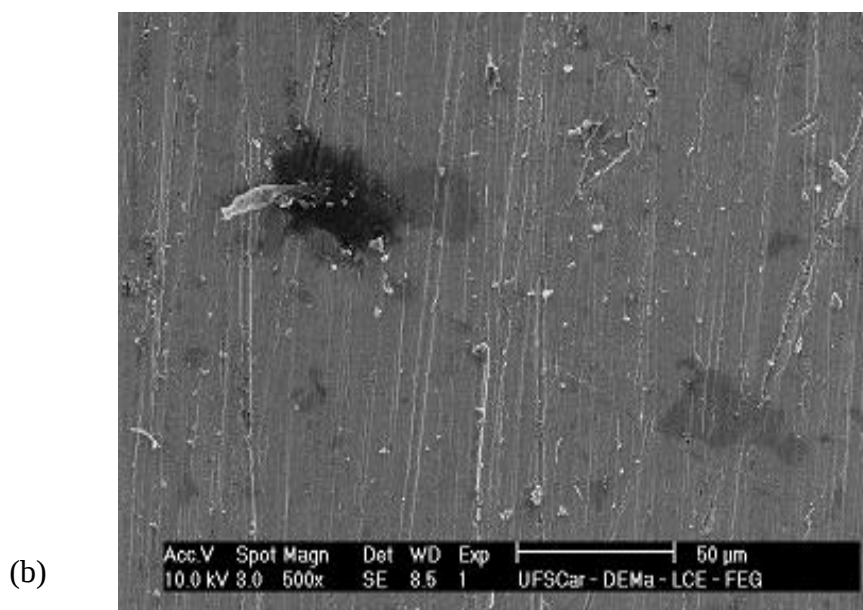
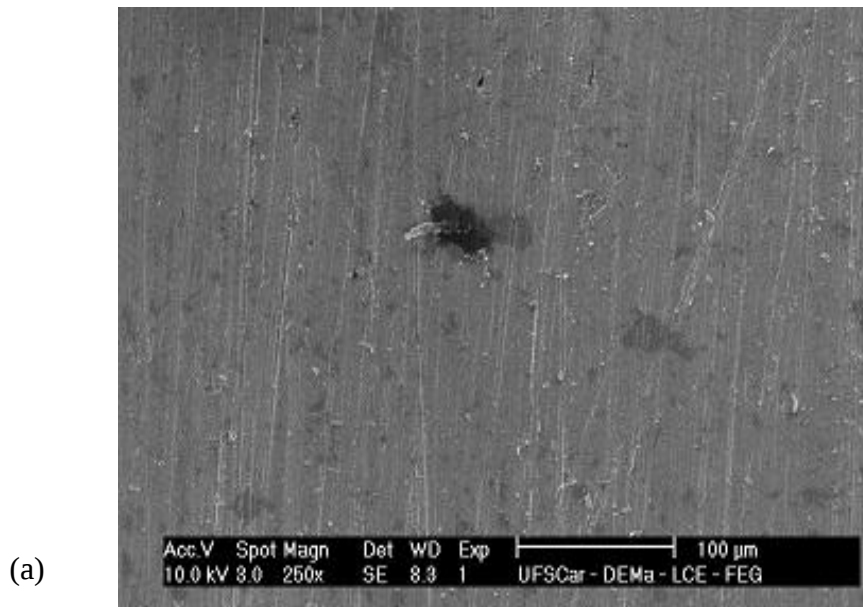
No entanto, não foi observado aumento na proliferação celular para 4 e 7 dias de análise. Nas Figuras 47 e 48 é observada uma adesão celular pouco significativa na superfície da liga Ti30Ta, para 4 e 7 dias, respectivamente.

Figura 47 – Imagens das células-tronco (ADSC) após 4 dias de cultura celular na liga Ti30Ta lixada (500x) (a) e com maior aumento (1000x) (b)



Nas Figuras 48 (a) e (b) é possível observar a superfície da liga Ti30Ta lixada após 7 dias de cultura com um aglomerado esférico celular.

Figura 48 – Imagens de células-tronco após 7 dias de cultura celular na liga Ti30Ta lixada (250x) (a) e aumento (500x) (b)



Após o recobrimento das superfícies com fibras de PCL eletrofiadas se verificou maior adesão celular. A superfície da liga Ti30Ta após 1 dia de cultura celular apresentou células entrelaçadas nas fibras do polímero, com maior espalhamento, corroborando com o estudo de Ravichandran et al.(2012). É interessante observar que não existe um contato direto das células com o substrato, o que pode ser explicado pela similaridade das fibras de PCL com a matriz extra-celular (Ravichandran, et al., 2012). O mesmo comportamento foi verificado no ensaio após 4 dias (Figuras 50(a)(b)).

Figura 49 – Imagens das células-tronco (ADSC) após 1 dia de cultura celular na liga Ti30Ta eletrofiada com PCL (500x) (a) e aumento (1000x) (b)

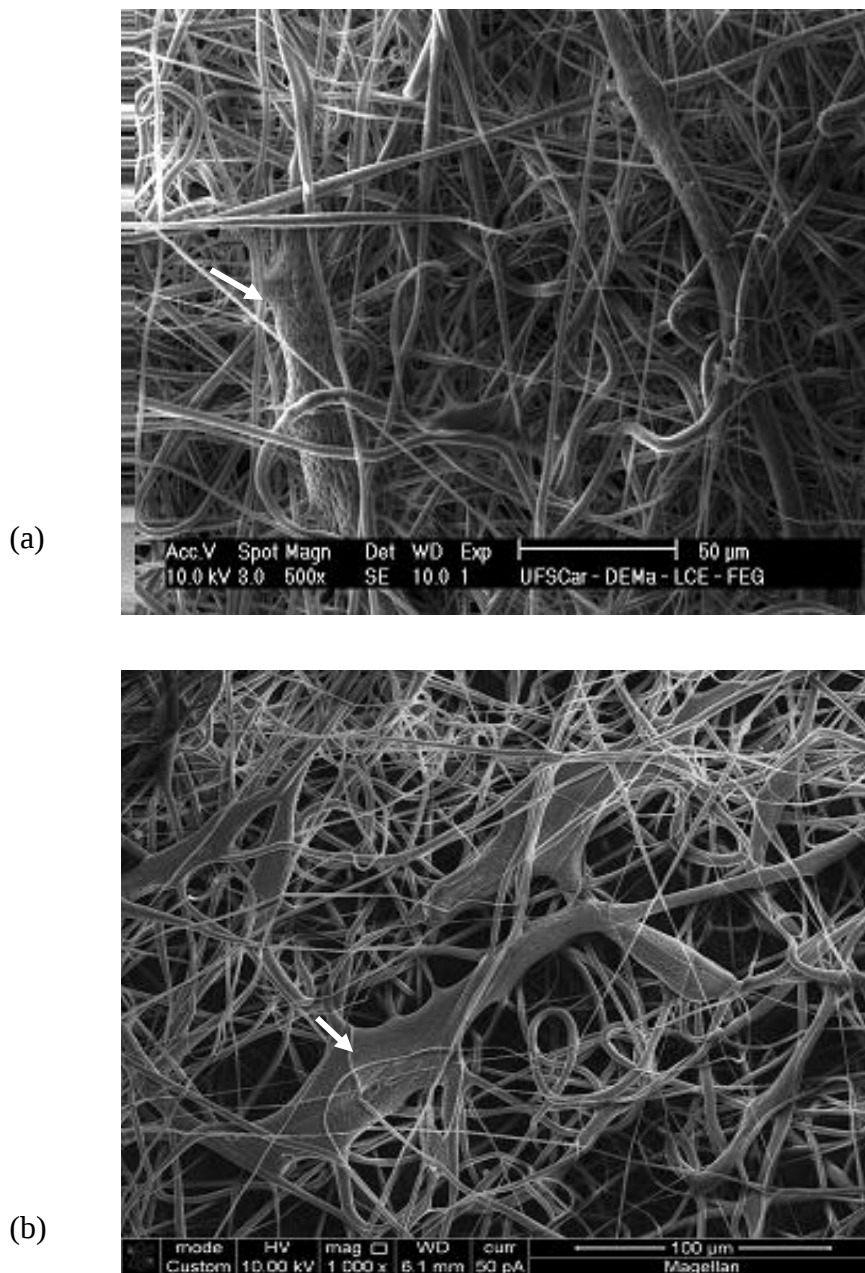
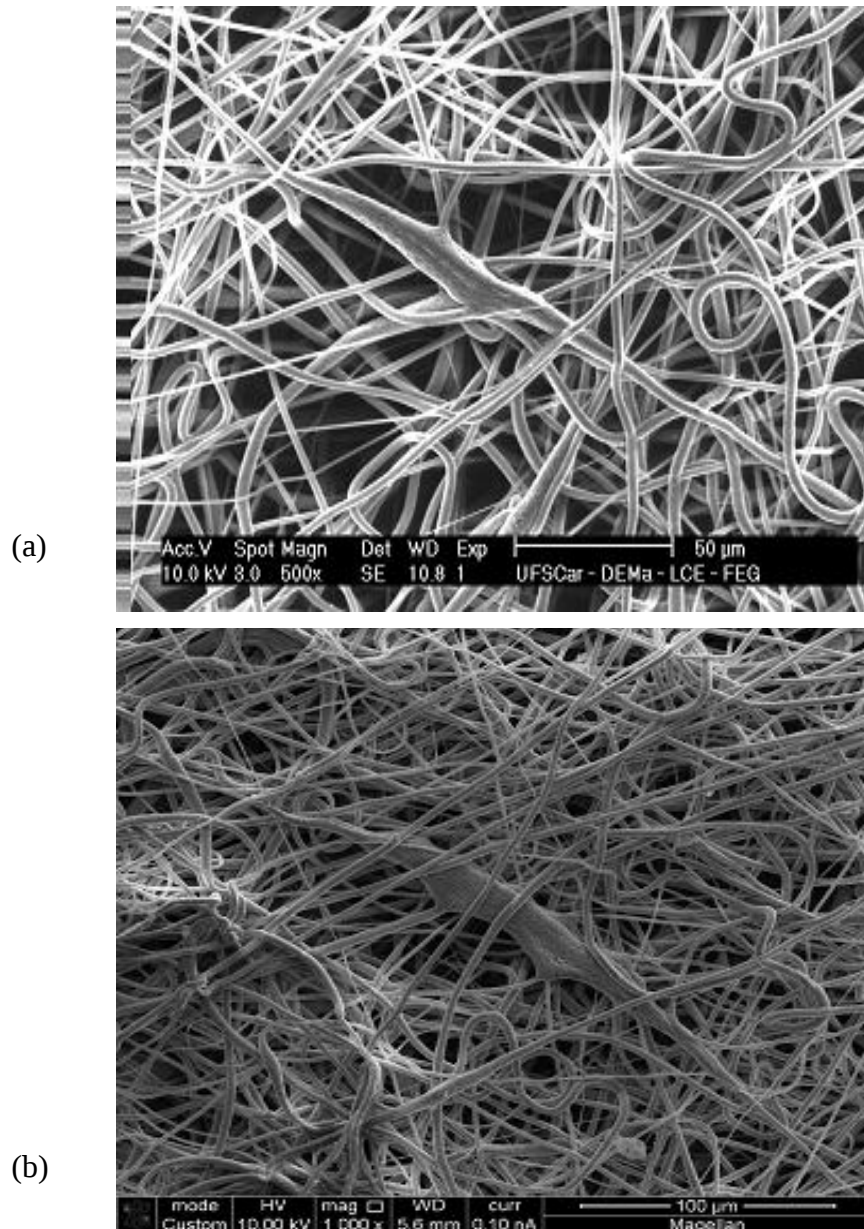
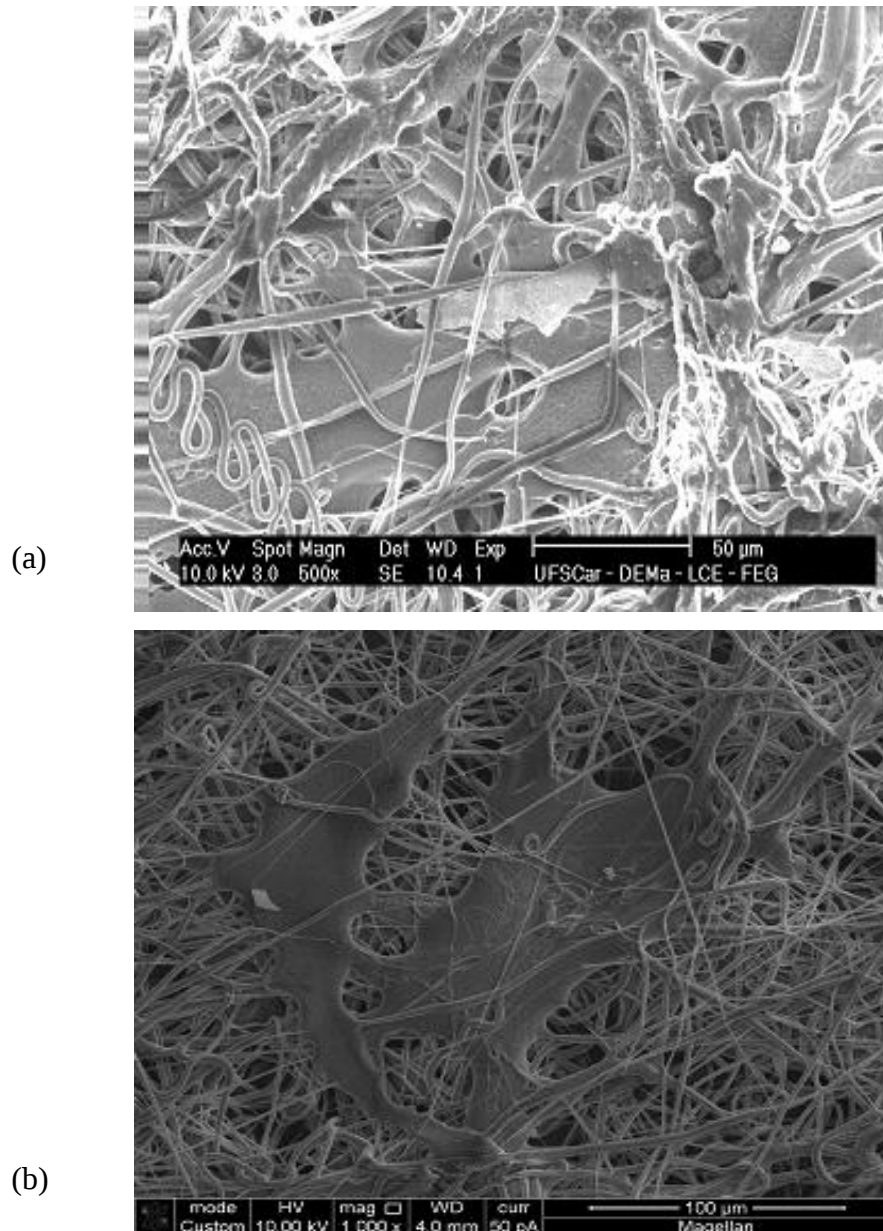


Figura 50 – Imagens das células-tronco (ADSC) após 4 dias de cultura celular na liga Ti30Ta eletrofiada com PCL (500x) (a) e aumento (1000x) (b)



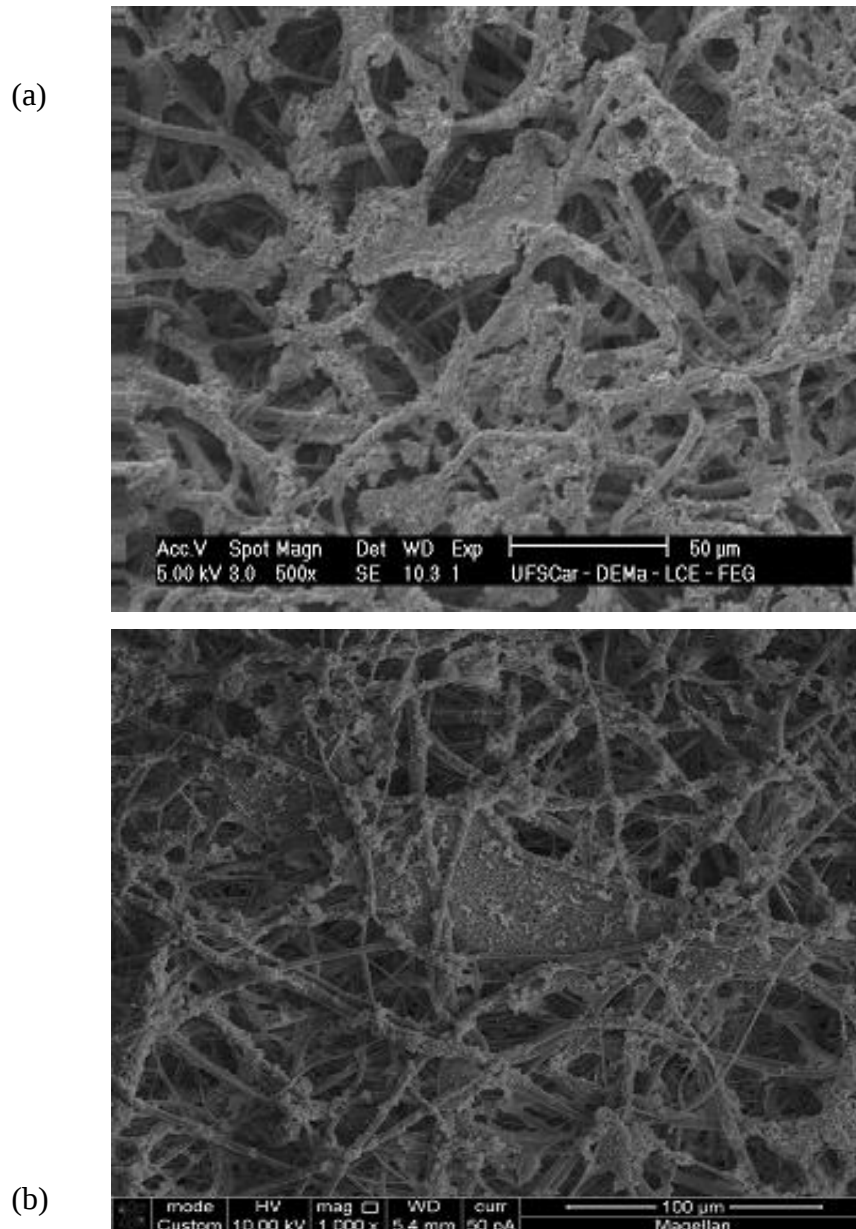
O aumento da proliferação celular foi observado para esse grupo após 7 dias de cultura (Figura 51). Na Figura 51 (b) com maior aumento é possível ver claramente as ramificações das células se proliferando.

Figura 51 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 7 dias de cultura celular na liga Ti30Ta eletrofiada com PCL (500x) (a) e aumento (1000x) (b)



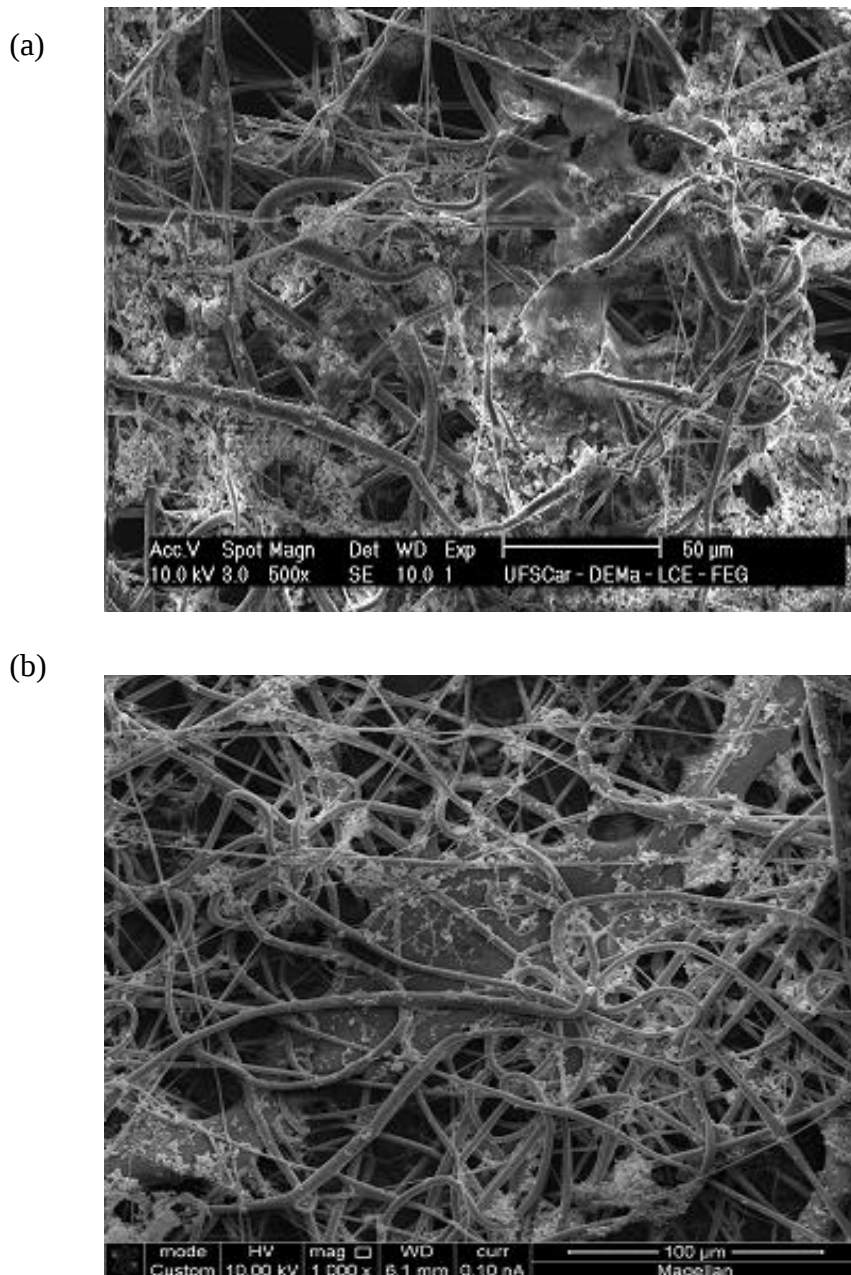
A mineralização das fibras de PCL possibilitou uma maior adesão celular com adesão das células nos cristais de apatita aderidos às fibras de PCL. Na Figura 52 (b) se observa a célula com os cristais de apatita, em maior aumento, e suas ramificações.

Figura 52 – Imagens das células-tronco após 1 dia de cultura celular na liga Ti30Ta eletrofiada com PCL e mineralização com Ca/P (500x) (a) e aumento (1000x) (b)



Após 4 e 7 dias de cultura ocorreu um aumento da proliferação e adesão celular. Nas Figuras 53 (a) e 53 (b) na superfície da liga Ti30Ta eletrofiada e mineralizada após 4 dias de cultura, é possível verificar células bem entrelaçadas e um bom espalhamento.

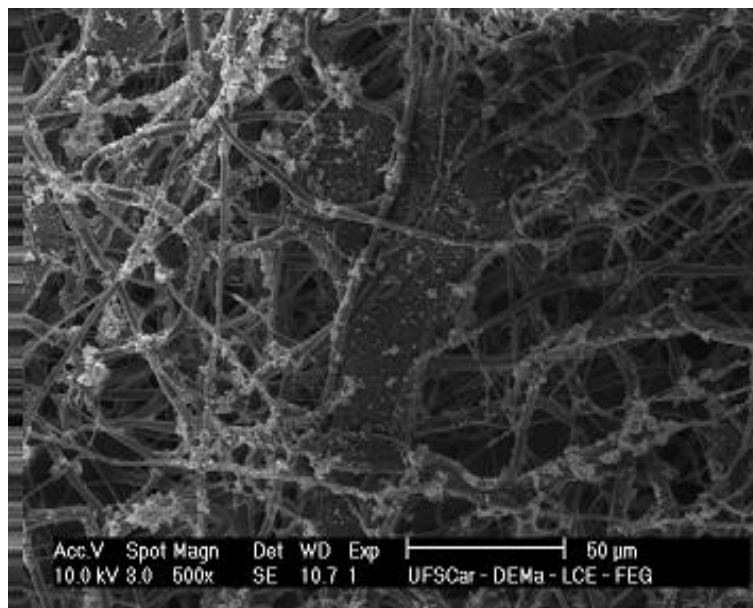
Figura 53 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 4 dias de cultura celular na liga Ti30Ta eletrofiada com PCL e mineralização com Ca/P (500x) e aumento (1000x) (b)



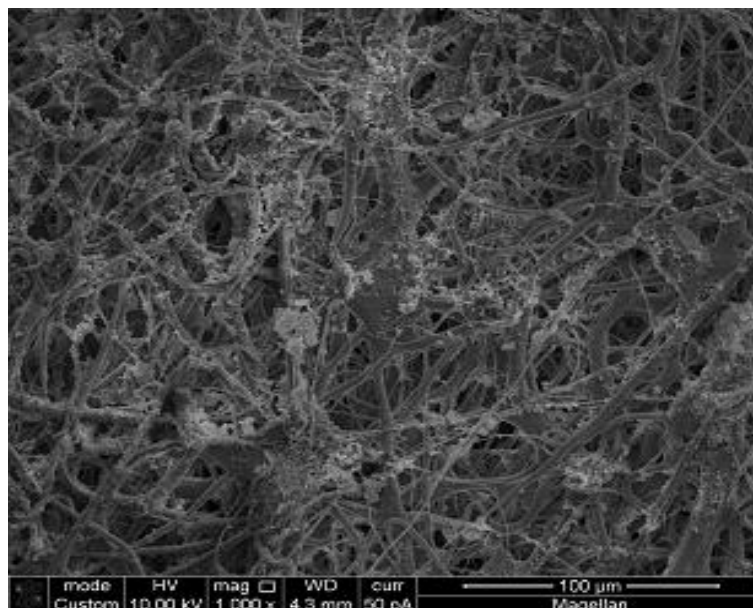
Nas Figuras 54 (a) e 54 (b) na liga Ti30Ta eletrofiada e mineralizada com cálcio e fosfato com cultura celular de 7 dias, se observa a predominância celular em toda a superfície da liga se proliferando, em comunicação com outras células.

Figura 54 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 7 dias de cultura celular da liga Ti30Ta após eletrofição com PCL e mineralização com Ca/P (500x) (a) e aumento (1000x) (b)

(a)



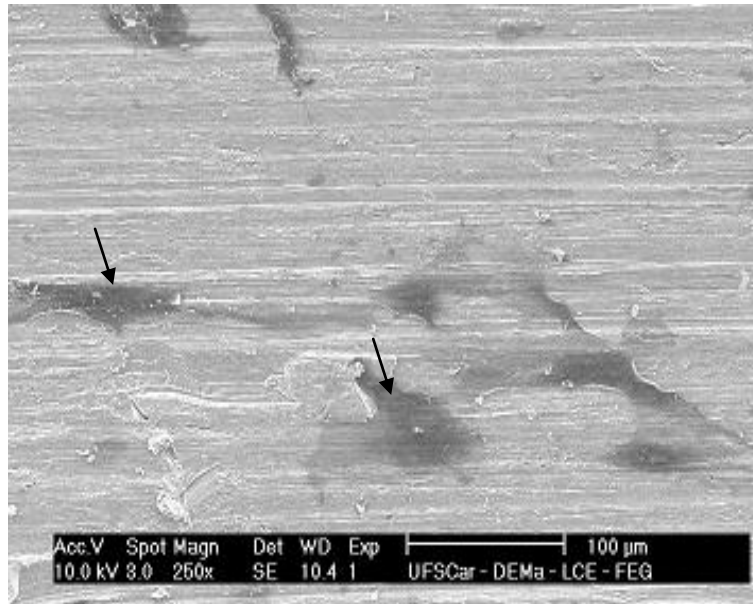
(b)



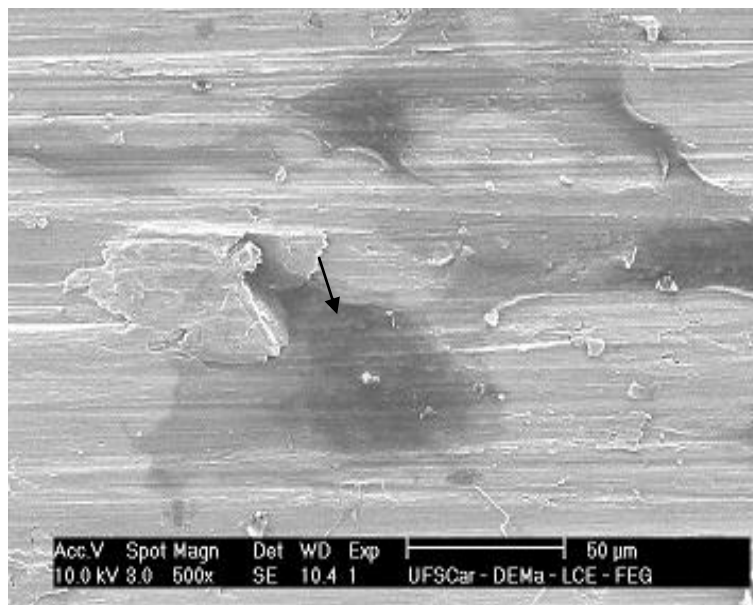
Os mesmos grupos foram avaliados para o titânio CP o qual foi usado como grupo controle. Nas Figuras 55 (a) e 55 (b) é possível observar na superfície do Ti CP lixado com 1 dia de cultura com células alongadas em toda a superfície. O mesmo comportamento foi verificado após 4 e 7 dias de cultura.

Figura 55 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 1 dia de cultura celular do TiCP lixado (250x) (a) e aumento (500x) (b)

(a)

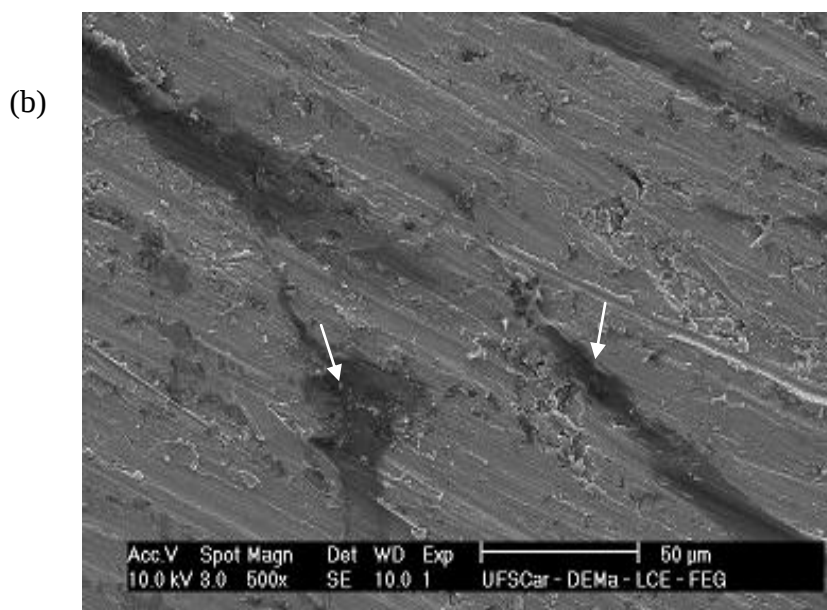


(b)



As Figuras 56 (a) e (b) mostram o TiCP lixado após 4 dias de cultura celular e é possível observar as células alongadas na superfície.

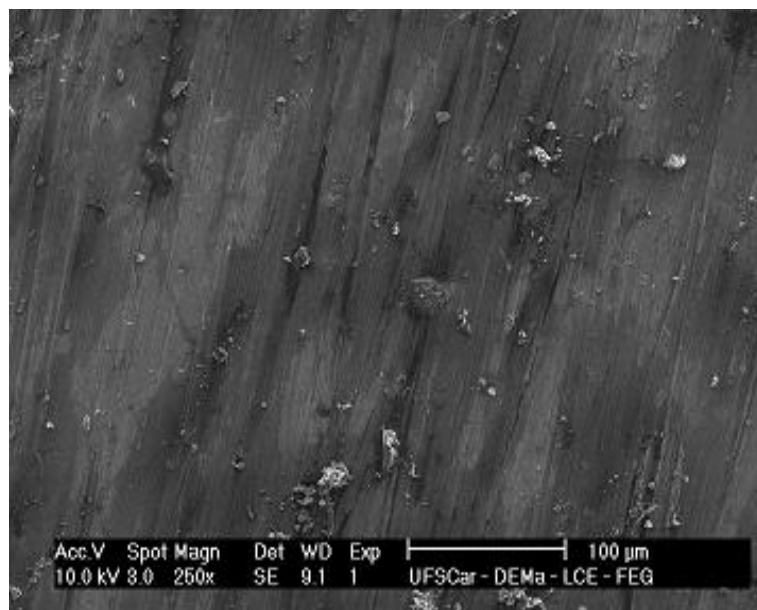
Figura 56 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 4 dias de cultura celular no TiCP lixado (250x) (a) e aumento (500x) (b)



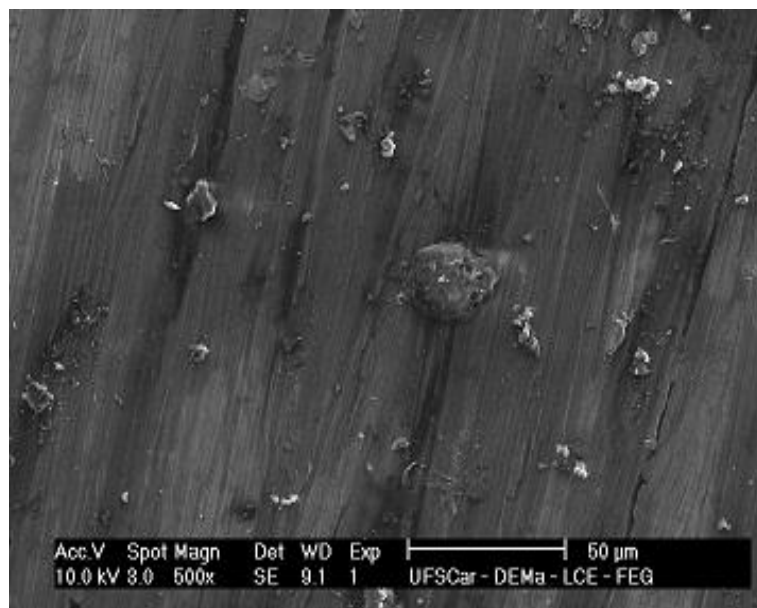
Nas Figuras 57 (a) e 57 (b) é possível visualizar na superfície do TiCP lixado após 7 dias de cultura, prolongamentos escuros na direção do lixamento da superfície.

Figura 57 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 7 dias de cultura celular do TiCP lixado (250x) (a) e aumento (500x) (b)

(a)

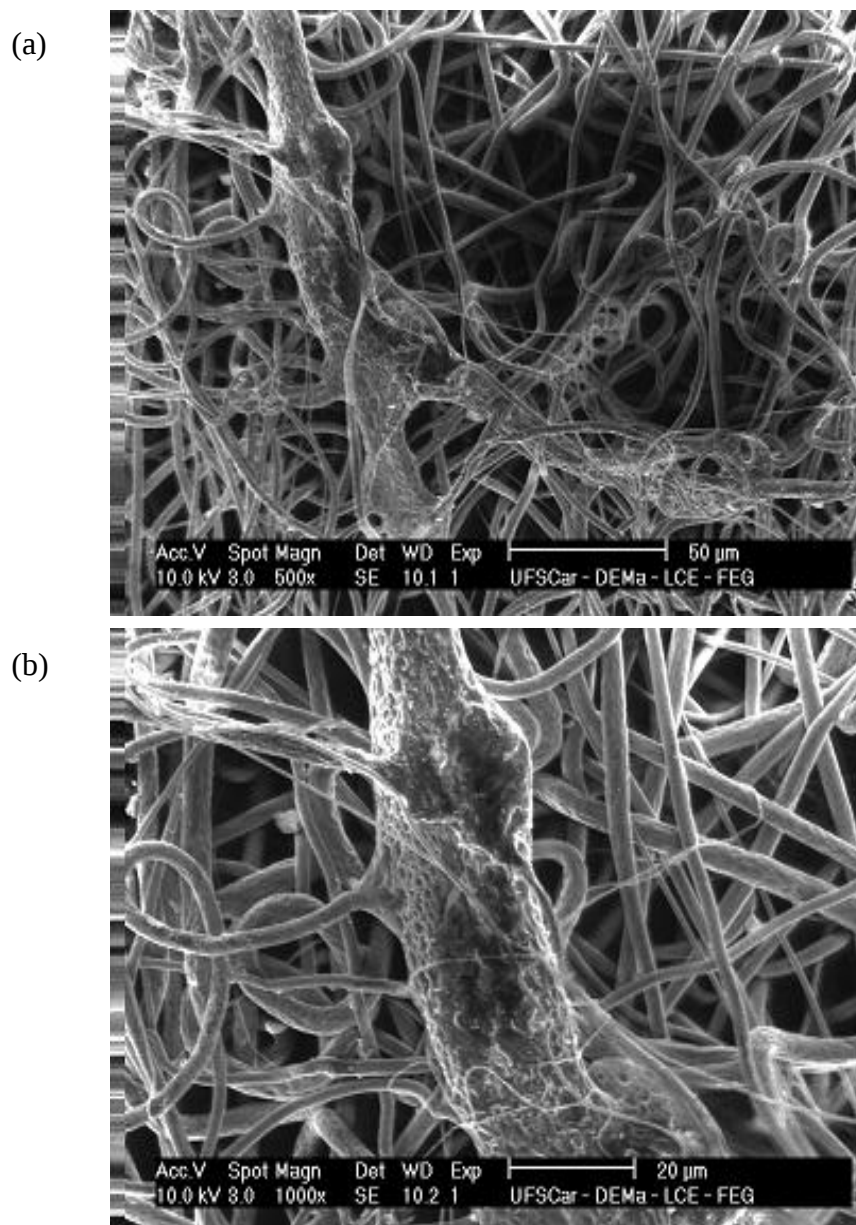


(b)



Nas Figuras 58 (a) e (b) na superfície do Ti CP eletrofiado se verifica a presença das células se entrelaçando nas fibras do polímero. Na Figura 58 (b) com maior aumento constatou-se a célula juntamente com a fibra.

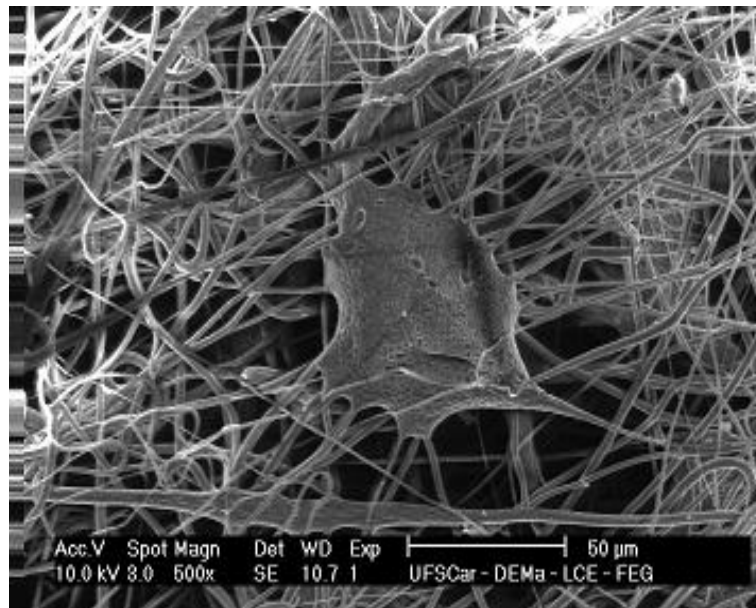
Figura 58 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 1 dia de cultura celular no TiCP eletrofiado com PCL (500x) (a) e aumento (1000x) (b)



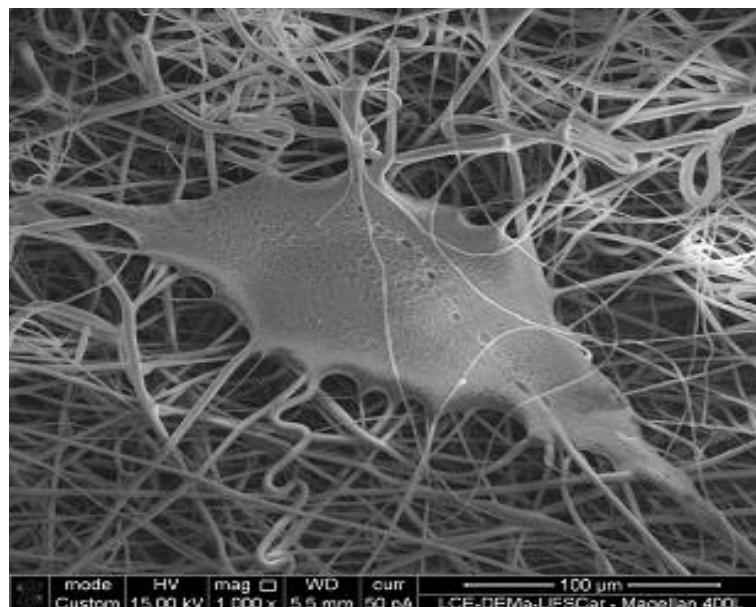
Nas Figuras 59 (a) e (b) se visualiza as células após 4 dias na amostra de Ti CP eletrofiado, nestas imagens é possível constatar prolongamentos celulares e a morfologia.

Figura 59 – Imagens de células-tronco após 4 dias de cultura celular no Ti CP eletrofiado com PCL (500x) (a) e aumento (1000x) (b)

(a)



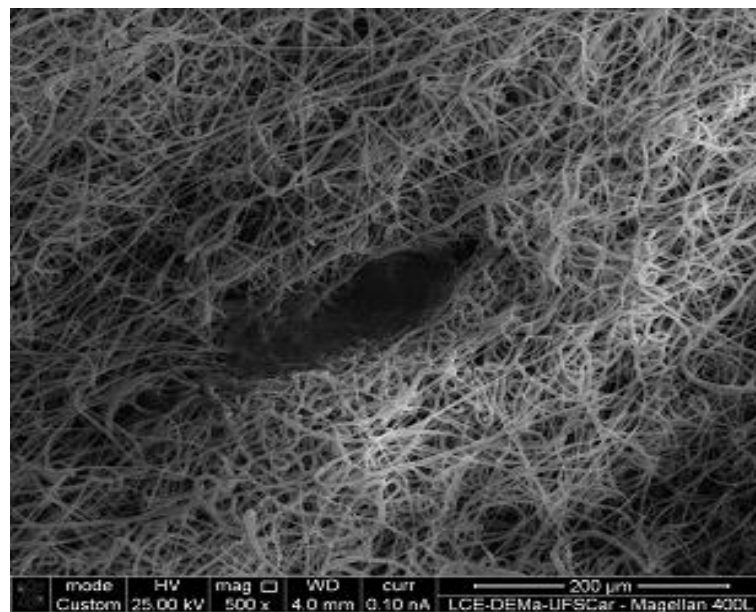
(b)



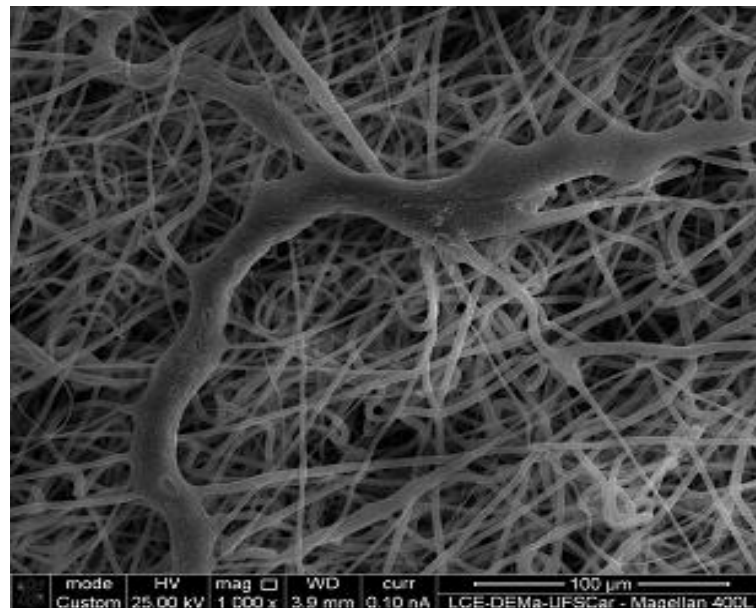
Nas Figuras 60 (a) e (b) as células com 7 dias no Ti CP eletrofiado, se mostra como um alongamento escuro (a) e na Figura com maior aumento (b) a célula acompanhando a direção da fibra.

Figura 60 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 7 dias de cultura celular do TiCP eletrofiadas com PCL (500x) (a) e aumento (1000x) (b)

(a)

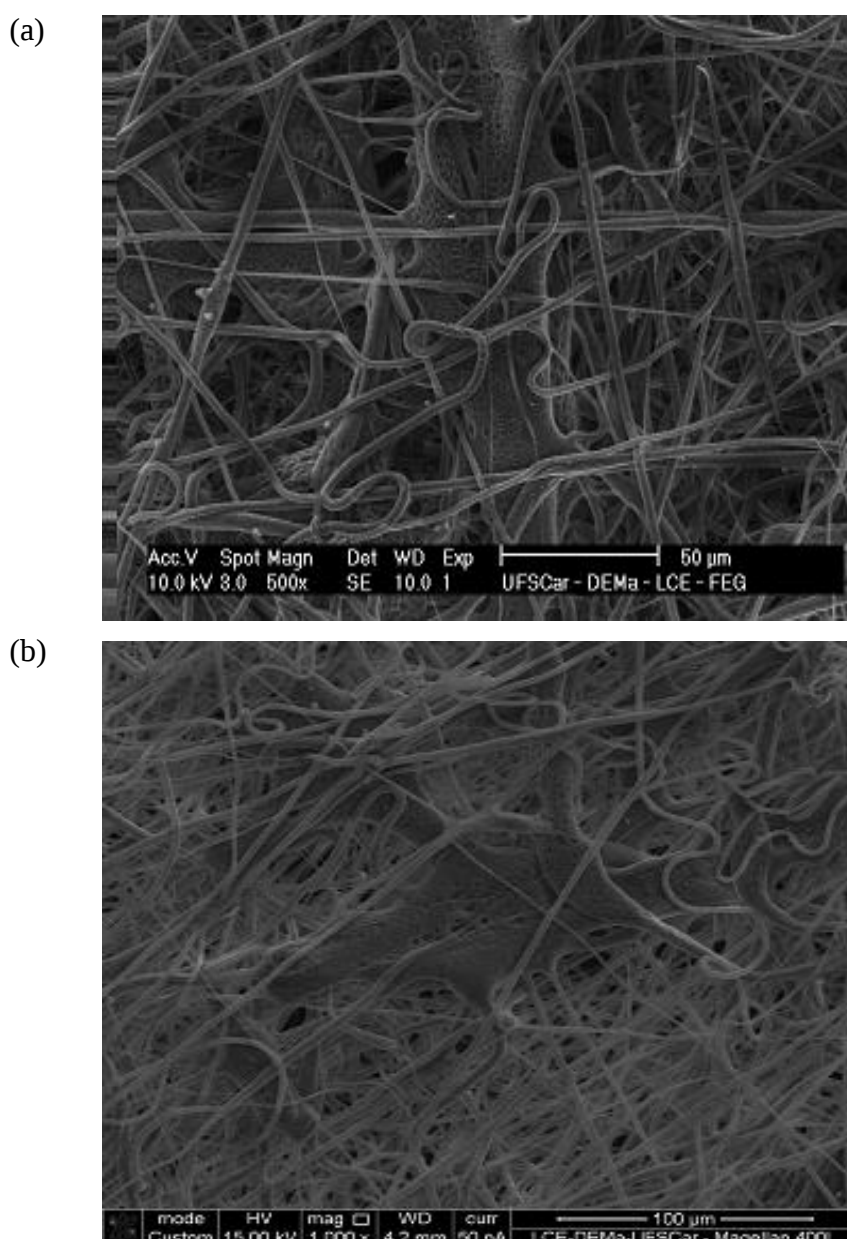


(b)



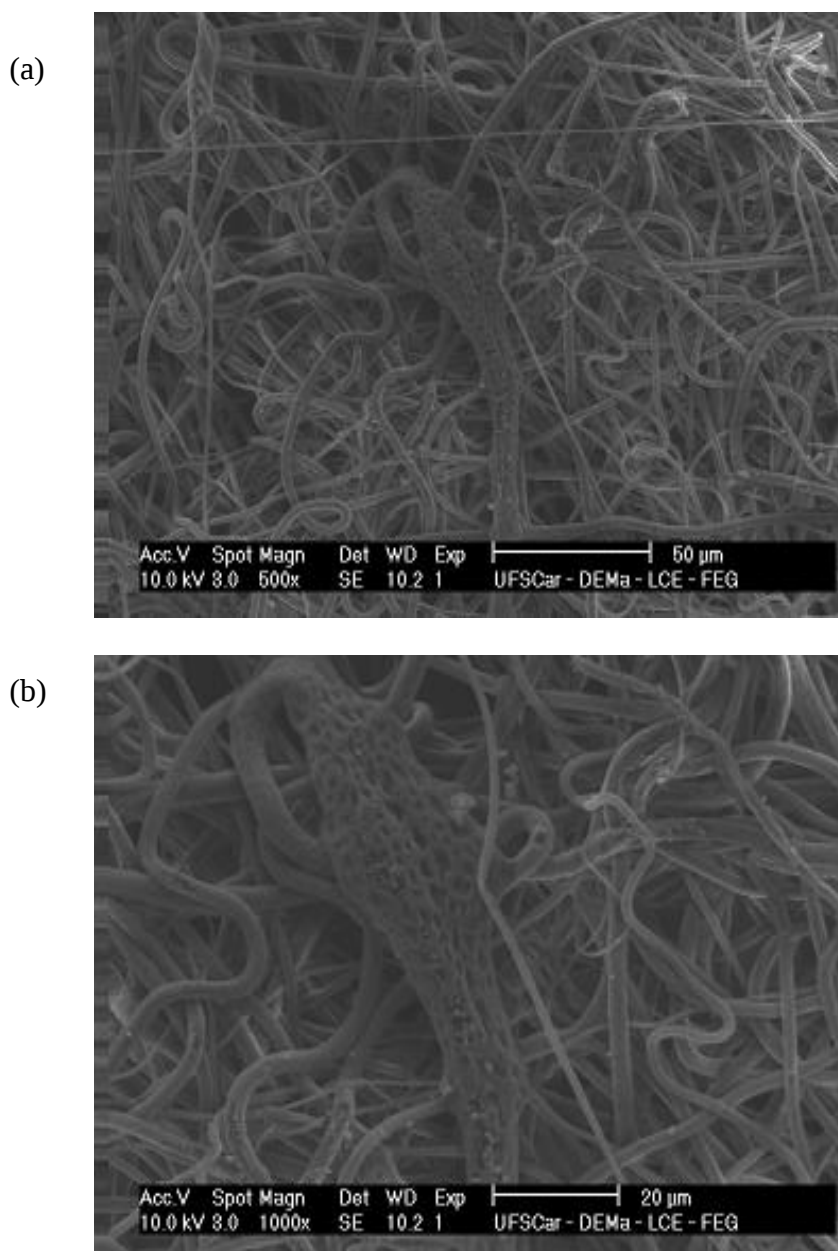
Nas Figuras 61 (a) e (b) é possível observar após 1 dia de cultura no Ti CP eletrofiado e mineralizado a distribuição celular e proliferação. De acordo com as microscopias constatamos que a interação entre material sintético e células depende das características da superfície do material, determinando como serão adsorvidas as moléculas biológicas (BOYAN et al., 1998).

Figura 61 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 1 dia de cultura celular no TiCP após eletrofiação e mineralização com Ca/P (500x) (a) e aumento (1000x) (b)



Nas Figuras 62 (a) e (b) se observa o prolongamento celular com as fibras e os cristais de apatita.

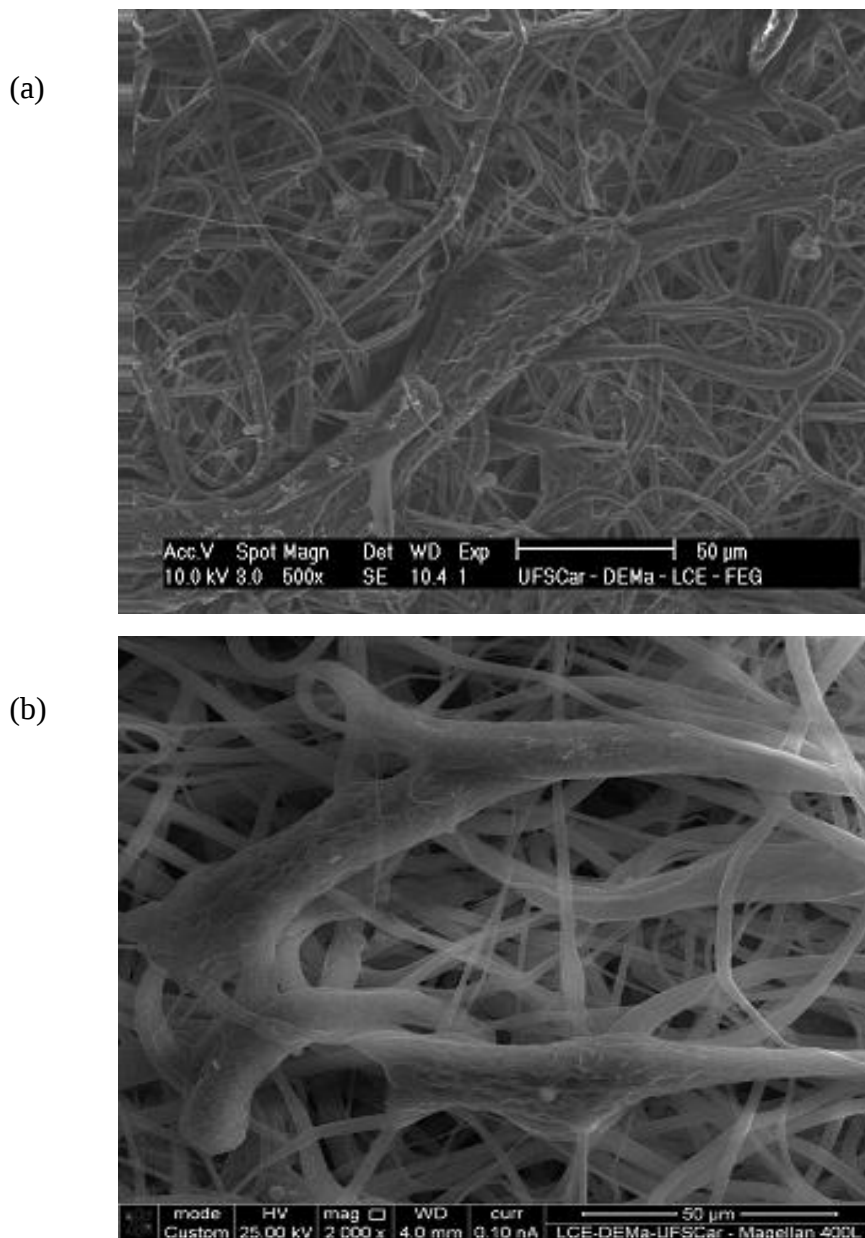
Figura 62 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 4 dias de cultura celular no TiCP após eletrofiação com PCL e mineralização com Ca/P (500x) (a) e aumento (1000x) (b)



Na Figura 63 (a) a superfície do Ti CP após a eletrofiação e mineralização se apresenta com as células (ADSC) na superfície e na Figura 63 (b) com maior aumento é possível observar a ramificação celular.

Com as análises de cultura celular com a liga Ti30Ta e Ti CP se observou que nos dois materiais ocorreu a adesão e proliferação celular após a eletrofiação com PCL e aumentou com a mineralização com fosfato de cálcio, porém, a liga Ti30Ta se mostra mais apropriada para uso como biomaterial devido ao seu menor módulo de elasticidade (69GPa).

Figura 63 – Imagens de células-tronco (ADSC) após 7 dias de cultura celular no TiCP após eletrofiação com PCL e mineralização com Ca/P (500x) (a) e aumento (2000x) (b)



5 CONCLUSÃO

Neste estudo, uma nova proposta de tratamento de superfície a partir da deposição de fibras do polímero (ϵ -caprolactona) (PCL) obtida por meio do método de eletrofiação e imersão da amostra em solução contendo cálcio e fosfato para crescimento de apatita foi desenvolvida.

A eletrofiação possibilitou a formação de uma camada uniforme do polímero PCL e com aspecto bimodal. O aspecto hidrofóbico dessas fibras foi atenuado pela presença da apatita acarretando na diminuição do ângulo de contato.

Foi possível observar que com a mudança do material (substrato) ocorreram mudanças na deposição do fosfato de cálcio.

Na liga Ti30Ta a razão cálcio-fosfato foi maior que na liga Ti6Al4V e no Ti CP.

O tratamento de superfície possibilitou uma maior adesão e proliferação celular na superfície da liga Ti30Ta o que indica a sua utilização em aplicações biomédicas.

6 TRABALHOS FUTUROS

- Análise da adesão do polímero com o substrato;
- Cinética das análises térmicas da fibra de PCL;
- Análise da % residual (TGA);
- Análise celular – Imunofluorescência, MTT

REFERÊNCIAS

ABE Y., KOKUBO T., YAMAMURO T., Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilising a biological process, **Journal of Materials Science:Materials in Medicine I**, 1, 4, 233-238, 1990.

ABEDIN, M., NICOLE R., Diversos caminhos evolutivos para a adesão celular. **Tendências em Biologia Celular**, 20 (12), 734-742, 2010.

ALBREKTSSON, T., ALBREKTSSON, B., Osseointegration of bone implants: a review of na alternative mode of fixation. **Acta Orthop Scan**, 58, 567-577, 1987.

ALI, S. A. M., DOHERTY, P. J., WILLIAAMS, D.F., Mechanisms of polymer degradation in implantable devices, 2. Poly (DL-lactic acid), **Journal Biom. Mat. Res.**, v.27, p. 1409-1418, 1993.

ALMEIDA, R.S. **Eletrofiação em corrente alternada/corrente contínua de nanocompósitos de poli (caprolactona) com óxido de grafeno e nanotubos de carbono visando aplicações como biomateriais**. Doutorado – Engenharia de Materiais – Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, 2014.

ALMEIDA, R.S. **Processo de eletrofiação por aplicação de CA do polímero Poli (fluoreto de vinilideno) – PVDF**, 2012.

AMARANTE, E. S., LIMA, L. A., Optimization of implants urfaces: titanium plasma spray and acid-etched sandblasting-current state, **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n.2, p. 166-173, abr./jun. 2001.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, 21, 7, 667-681, 2000.

BACAKOVA, L., et al., Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. **Biotechnology Advances**, 29, 6, 739-767, 2011.

BARBANTI, S. H., et al., Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **J.Mater. Sci. Mater. Med.**, 15, p.1315, 2005.

BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, E.A.R., Degradação acelerada de suportes de poli (ϵ - caprolactona) e poli (D,L – ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol 16, nº2, p.141-148, 2006.

BARRERE, F. et al., Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBF X5 solution. **Biomaterials**, v 23, n 9, p.1921-1930, May 2002.

BARRERE, F. et al., Nano-scale study of the nucleation and growth of calcium phosphate coating on titanium implants. **Biomaterials**, v 25, n 14, p 2901-2910, Jun 2004.

BATZER R., et al Prostaglandins mediate the effects of titanium surface roughness on MG63 osteoblast-like cells and alter cell responsiveness to $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. **J Biomed Mater Res**, 41, 3, 489-96, 1998.

BRAGA, N. A., FERREIRA N.G., Obtenção de titânio metálico com porosidade controlada por metalurgia do pó. **Química Nova**, 30, 2, 450-457, 2007.

BRÄNEMARK, P-I., ZARB, H.A., ALBREKTSSON, T. **Tissue-Integrated Prostheses Osseointegration in Clinical Dentistry**. Quintessence Publishing Co, Inc., Chicago, 1985.

BEST, S. M. et al., Bioceramics: Past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, 28, 1319-1327, 2008

BIELER, T. R., TREVINO, R.M., ZENG, L. **Alloys: Titanium**. Michigan State University, East Lansing, MI, USA, Elsevier, 2005.

BOYAN, B. D., et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. **J Biomed Mater Res**, 39, 1, 77-85, 1998.

BUSER, D.; WEBER, H. P.; BRÄGGER, U.; BALSIGER, C. Tissue integration of one-stage ITI implants: 3 –year results of a longitudinal study with hollow-cylinder and hollow-screw implants. **Int. J. Oral & Maxillofac. Implants.**; v.6, p.405-412, 1991.

CAPELLATO, P., et al., Interaction between mesenchymal stem cells and Ti30Ta alloy after surface treatment. **J.Biom.Mater.Res. Part A**, 102 A, 2014.

CARDOSO, G. B. C., **Matriz tridimensional polimérica com adição de cerâmicas para reconstruções ósseas**, 2010, 94f., Dissertação de mestrado acadêmico, Faculdade de Engenharia Mecânica, Depto de Engenharia de Materiais, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

CASPER, C. L., et al., Coating electrospun collagen and gelatin fibers with perlecan domain I for increased growth factor binding. **Biomacromolecules**, 8, 1116-23, 2007.

CATALANI, L. H., **A química dos polímeros a serviço da Medicina**, Laboratório de Biomateriais Poliméricos, Instituto de Química – USP, 2011.

CHEN, Y., et al., Composite coating of bonelike apatite particles and collagen fibers on poly-L-lactic acid formed through na accelerated biomimetic coprecipitation process. **Journal of Biomedical Research Part B: Applied Biomaterials**, 77B, 2, 315-322, 2006.

CHRISTENSON, R. H. Biochemical markers of bone metabolism: na overview. **Clin Biochem**, 30, 8, 573-93, 1997.

CIAPETTI, G., et al., Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. **Biomaterials**, 24, 21, 3815-3824, 2003.

COCHRAN D.L., et al., Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, 9, 3, 289-97, 1994.

COHEN, M. M. JR, The new bone biology: Pathologic, molecular and clinical correlates. Part A. **American Journal Med. Genet.**, 140^a, 2646-2706, 2006.

COOLY, J. F., **U.S.Patent** 692,691, 1902.

COSTA, A. C. F. M., et al., Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista eletrônica de Materiais e Processos**, 4, 3, 29-38, 2009.

DEITZEL, J.M., et al., The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, 42, 261-272, 2001.

DE JONG, W. F., Le substance minerale dans le os. **Rec. Trav. Chim.**, 45, 445-450, 1926.

DELIGIANNI, D. D., et al., Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti6Al4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. **Biomaterials**, 22, 1241-51, 2001.

DE PAOLI, M. A., **Degradação e estabilização de Polímeros**, 2º versão on-line (revisada), Chemkeys, 2008, p.228.

DINATO, J. C.; POLIDO, W. D. Implantes Osseointegrados. **Artes Médicas**; 1 ed., 2004.

DUARTE, M.A.T., et al., Thermal and Mechanical behavior of injection molded poly(3-hydroxybutyrate)/poly (ϵ -caprolactone)blends. **Materials Research**, 9, 1, 25-27, 2006.

DUEK, E. A. R., ZAVAGLIA C. A. C., BELANGERO, W. G., In vitro study or poly(lactic acid) pin degradation. **Polymer**, vol 40, 23, p 6465-6473, 1999.

FERREIRA, P.C., et al. Alumínio como fator de risco para a Doença Alzheimer, **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. Vol 16, 1, Ribeirão Preto, Jan/Feb. 2008.

FRANÇA, V. P., et al., Estudo comparativo experimental de compósito bioativo de matriz polimérica para aplicação em cirurgia plástica ocular na substituição tecidual. **Arq. Bras. Oftalmol.** 68, 4, 425-431, 2005.

FRANCHETTI, S. M. M., MARCONATO, J.C., Polímeros Biodegradáveis – Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, 29, 4, 811-816, 2006.

FU Y C, et al., Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2. **Biotechnol. Bioeng.** 99, 996-1006, 2008.

GEETHA, M., et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. **Progress in Materials Science**, 54, 3, 397-425, 2009.

GILDING, D. K., **Biocompatibility of clinical implant materials**, David F. Williams, v.2, p.211, 1981.

GOMES, L. S. M, et al. **Biomateriais em Artroplastia de Quadril: Propriedades, Estrutura e Composição**. Atheneu, São Paulo, 2010.

GUASTALDI, A.C., APARECIDA, A. H., Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, vol 33, nº6, São Paulo, 2010.

HABIBOVIC, P. et al. Biomimetic Hydroxyapatite coating on metal implants. **J. Am. Ceram. Soc.**, 85, 3, 517-522, 2002.

HARRIS, L. D., KIM, B. S., MOONEY, D. J. Open pore biodegradable matrices formed with gas forming. **J Biomed Mater Res**, 42, 396-402, 1998.

HELMUS, M. N. E TWEDEN, K., **Materials Selection**. In: Encyclopedic Handbook of Biomaterial and Bioengineering, Part A, v.2, p. 1429-1463, 1995.

HENCH, L. L., et al., Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials. **Journal of Biomedical Materials Research A**, 5, 6, 117-141, 1971.

HENCH, L.L., WILSON, J., An Introduction to Bioceramics, **World Scientific**, Singapore, 1993.

HENCH, L.L., Bioceramics: From concept to clinic. **J.Am.Ceram.Soc.**, 74, 7, July, 1487 - 1510, 1991.

HENCH, L. L., Biomaterials: A Forecast for the future, **Biomaterials**, 19, 16, 1419-1423, 1998.

HO, W. F., JU, C. P., CHERLIN, J. H. Structure and properties of cast binary Ti-Mo alloys. **Biomaterials**, 20, 22, 2115-2122, Nov. 1999.

HUTMACHER, D. W., SITTINGER, M., RISBUD, M. V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. **Trends in Biotechnology**, 22, 7, 354-362, 2004.

ITO, Y et al. A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 100, 1, 43-49, 2005.

JAISWAL, N., et al. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture Expanded Human Mesenchymal Stem Cells in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, 64, 295-312, 1997.

JOKSTAD, A., **Osteointegração e Implantes Dentários**, Editora Santos, São Paulo, 1ª edição, 2011.

JONASOVA, L. et al. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. **Biomaterials**, v 25, n 7-8, p. 1187-1194, Mar-Abr. 2004.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., **Histologia Básica**, Editora Guanabara Koogan S.A., 1995, 2004.

KATCHBURIAN, E., ARANHA V. **Histologia e Embriologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2004.

KIERSZENBAUM, A. L., TRES, L., **Histologia e Biologia Celular**, 3ªed., Elsevier, 2012.

KIESWETTER, K., et al. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. **J Biomed Mater Res**, 32, 55-63, 1996.

KIM, H. M., MIYAGI, F., KOKUBO, T., Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkaline treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 8, 341-347, 1997.

KIM, H. M., KNOWLES, J. C., KIM, H.E. Hydroxyapatite/poly (ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**, 25, 7-8, 1279-1287, 2004.

KIM, H. M., et al. Effect of biomimetic deposition on anodized titanium surfaces. **Journal of Dental Research**, 90, 6, 711-716, 2011.

KOOY, D., WEIL, S. Why stem cell? **Science**, 287, 1439-1441, 2000.

KOKUBO, T. Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process, **Thermochimica Acta**, 280/281, p 479-490, 1996.

KOKUBO, T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment, **Acta Mater.** 46, p 2519-2527, 1998.

KOKUBO, T., KIM, H., KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, 24, 13, 2161-2175, June 2003.

KONATU, T. R. **Análise da rota de processamento liga Ti30Ta visando aplicação biomédica**. 2014. 59f. Mestrado – Engenharia de Materiais, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá – Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2014.

KU, C. H. Effect of different Ti6Al4V surface treatments on osteoblasts behaviour. **Biomaterials**, 23, 6, 1447-54, 2002.

LACEFIELD, W.R., Current status of ceramic coatings for dental implants, **Implant Dentistry**, vol 7, Issue 4, 1998.

LAN-XIN-LÜ, et al., The effects of PHBV electrospun fibers with different diameters and orientations on growth behavior of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. **Biomedical Materials**, 7, 015002, 2012.

LAVENUS, S., LOUARN, G., LAYROLLE, P. Nanotechnology and Dental Implants. **Int Journal of Biomaterials**, 915327, 2010.

LEGEROS, R. Z. **Calcium phosphate in oral biology and Medicine**. Switzerland: S Karger Pub., 1991. 201 ISBN 380555236 X.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chem.Rev.**, v.108, n11, 4742-4753, 2008.

LI, S. M., GARREAU, H., VERT, M. Structure property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly (α -hydroxy acids) in aqueous media, Part 2: Degradation of lactide-glicolide copolymers, **J. Mater. Sci: Mater in Med.**, v.1, p 131-139, 1990.

LI, F., FENG, Q. L., CUI, F.Z. A Simple biomimetic method for calcium phosphate coating, **Surface & Coating Technology**, v 154, n 1, p. 88-93, 2002.

LIM, C.T., TAN, E.P.S. & NG, S.Y., **Appl. Phys. Lett**, 92, p. 141908, [http: dx.doi.org/10.1063/1.2857478](http://dx.doi.org/10.1063/1.2857478), 2008.

LINCKS, J. et al Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent surface roughness and composition. **Biomaterials**, 19, 23, 2219-32, 1998.

LIU, X., CHU, P.K., DING, C., Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, 47, 3-4, 49-121, Dec.2004.

LOHMANN, C.H., et al. Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH)₂D₃ through regulation of phospholipase A₂ activity and activation of protein kinase A. **J Biomed Mater Res**, 47, 2, 139-51, 1999.

LONG, M. W., Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells, **Blood cells, Molecules and Diseases**, 27, 3, 677-690, 2001.

LOWERY, J.L., DATTA, N., RUTLEDGE, G.C., Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly (ε-caprolactone) fibrous mats. **Biomaterials**, 31, 491-504, 2010.

MA Z W, et al., Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. **Tissue Eng.**, 11, 1149-58, 2005.

MARIE, P. J., Transcription factors controlling osteoblastogenesis, **Arch Biochem Biophys**, 473, 2, 98-105, 2008.

MATTOX, D.M. Physical vapor deposition (PVD) processes. **Metal Finishing**, 98, 1, 410-423, 2000.

MIDDLETON, J.C., TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, 21, 2335-2346, 2000.

MORTON, W. J., **U.S. Patent** 705, 631, 1902.

NAVA, D., et al., Thermal properties and interactions in blends of poly (ε-caprolactone) with unsaturated polyester resins. **Journal of Materials Processing Technology**, 143-144, 171-174, 2003.

NIEMEYER, T.C., et al, Atrito interno em baixa temperatura para amostras da liga Ti13Nb13Zr usadas como biomaterial. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, 25, 2, 89-91, 2006.

NIINOMI, M., Mechanical properties of biomedical titanium alloys. **Materials Science and Engineering A**, 243, 1-2, 231-236, March 1998.

NIINOMI, M., Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. **Journal of the Mechanical behavior of biomedical Materials**, 1, 1, 30-42, Jan 2008.

NISHIGUCHI, S., et al., Enhancement of bone-bonding strengths of titanium alloys implants by alkali and heat treatments. **Journal of Biomedical Materials Research**, 48, 5, 689-696, 1999.

NELEA, V., et al., Mechanical properties improvement of pulsed laser-deposited hydroxyapatite thin films by high energy ion- beam implantation. **Applied Surface Science**, 186, p. 483-489, 2002.

OLIVEIRA, N.T.C., GUASTALDI, A.C., Estudos eletroquímicos de ligas Ti-Mo de interesse para biomateriais. **Corrosão e Proteção de Materiais**, 26, 2, 46-52, 2007.

PETERSON, L.J., et al. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea** S. L.. Elsevier, 1942.

PISTNER, et al., Poly (L-lactide): a long-term degradation study in vivo I, Biological results, **Biomaterials**, v.14, p.671, 1993.

PONSONNET, L., et al., Effect of surface topography and chemistry on adhesion, orientation and growth of fibroblasts on nickel-titanium substrates. **Materials Science and Engineering C**, 21, 157-165, 2002.

RACK, H.J., QAZI, J.I. Titanium alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, 26, 1269-1277, 2006.

RAI, B. et al., Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2. **Biomaterials**, 26, 17, 3739-3748, 2005.

RATNER, B. D., et al., **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996.

RAVICHANDRAN, R., et al., Biomimetic surface modification of titanium surfaces for early cell capture by advanced electrospinning. **Biomed.Mater.**, 7, 2012, 015001.

RAVICHANDRAN, R. et al., Precipitation of nanohydroxyapatite on PLLA/PBLG/Collagen nanofibrous structures for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage. **Biomaterials.**, 33, 846-855, 2012.

RHEE, S. H. Bone-like apatite-forming ability and mechanical properties of poly (ϵ -caprolactone)/sílica hybrid as a function of poly (ϵ -caprolactone) content. **Biomaterials**, 25, 7-8, 1167-1175, 2004.

ROA, J.P.B., et al., Síntese e caracterização do copolímero poli(3-hidroxibutirato-co- ϵ -caprolactona) a partir de poli(3-hidroxibutirato) e poli(ϵ -caprolactona). **Polímeros**, 20, 3, 221-226, 2010.

RODRIGUES, L. B., Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, 9, 2, 63-76, Julh-Dez 2013.

RUELLE, B., et al., Semi-crystalline polymer/carbon nanotube nanocomposites: Effect of nanotube surface-functionalization and polymer coating on electrical and thermal properties. **Reactive and Functional Polymers**, 72, 6, 383-392, 2012.

SANTOS, A. R. JR., WADA, M. L. F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e Engenharia Tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 17, 4, 308-317, 2007.

SANTOS, M. L. et al., Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico, **Eclética Química**, vol 30, n 3, 2005.

SEKIYA, I, et al., Expansion of human adult stem cells from boné marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality, **Stem Cells**, 20, 530-541, 2002.

SIMÕES, J. **Alumínio e Sistema Nervoso Central**, Acta Médica Portuguesa, 7, 597-599, 1994.

SONG J. H., KIM H. E., KIM H. W., Electrospun fibrous web of collagen-apatite precipitated nanocomposite for bone regeneration. **J. Mater. Sci. Mater Med.** 19, 2925-32, 2008.

SUI G, et al., Poly-L-lactin acid/hydroxyapatite hybrid menbrane for bone tissue regeneration. **J Biomed Mater. Res. A.**, 82, 445-54, 2007.

SULTANA, N., WANG, N. Fabrication of HA/PHBV composite scaffolds through the emulsion freezing/freeze-drying process and characterisation of the scaffolds. **Journal Materials Science: Materials in Medicine**, 19, 7, 2555-2561, 2008.

SUNG, H., et al., The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. **Biomaterials**, 25, 5735-5742, 2004.

SCHWARTZ, Z, et al Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. **J Periodont Res**, 32, 1, 166-71, 1997.

TANG, Z. G., et al. Surface properties and biocompatibility of solvent- cast poly[ϵ -caprolactone] films. **Biomaterials**, 25, 19, 4741- 4748, 2004.

TANG, Z. G., HUNT, J. A. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation in vitro. **Biomaterials**, 27, 4409-4418, 2006.

TESEMA, Y., RAGHAVAN, D., STUBBS, J. Bone cell viability on methacrylic acid grafted and collagen immobilized porous poly (3-hydroxybutrate-co-3-hydroxyvalerate). **Journal of Applied Polymer Science**, 98, 5, 1916-1921, 2005.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicosdo metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 43, 6, 1999.

VOGELSANGER N., et al., Blendas biodegradáveis de poli (3-hidroxibutirato)/poli (ϵ -caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade. **Mat.Res.**, 6, 3, Apr/June, 2003.

XIE, J. et al., The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. **Biomaterials**, 30, 3, 354-362, 2009.

WILLIAMS, J. M., Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated. **Biomaterials**, 26, 4817-4827, 2005.

WILLIAMSON, M. R., COOMBES, A. G. A., Gravity spinning of polycaprolactone fibres for applications in tissue engineering. **Biomaterials**, 25, 459-465, 2004.

WEI, M., et al., Optimising the bioactivity of alkaline-treated titanium alloy. **Materials Science and Engineering C**, 20(2002), 125-134.

YANG, Q., et al., Preparation of Polycaprolactone Tissue Engineering Scaffolds by improved solvent casting/particulate Leaching method. **Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics**, 45, 6, 1171-1181, 2006.

YARAK, S., OKAMOTO, O.K., Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano:desafios atuais e perspectivas clínicas. **Na. Bras. Dermatol.**, 85, 5, 647-56, 2010.

ZHANG, Y.Z. et al., Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-Collagen nanofibers using fibroblasts. **Biomacromolecules**, 6, 2583-2589, 2005.

ZHANG, Y. et al., Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. **Biomaterials**, 29, 4312-22, 2008.

ZUTTON, M.S.S.R., et al., Células-tronco de tecido adiposo e a Importância da Padronização de um modelo animal para Experimentação pré-clínica, **Rev. Bras. Cardiol. Invasiva**, 21, 3, 281-287, 2013.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Albrektsson, T.: Direct bone Anchorage of dental implants. **J. Prosthet. Dent.** 50:255-261, 1983.

Branemark, P-I., Zarb, H. A. and Albrektsson, T.: Tissue-Integrated Prostheses. Osseointegration in Clinical Dentistry. Quintessence Publishing Co., Inc., Chicago, 1985.

Branemark, P-I.: Osseointegration and its experimental background. **J. Prosthet. Dent.** 50:399-410, 1983.

Branemark, P-I.: Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 3:81-100, 1969.

Eriksson, A.R. and Albrektsson, T.: Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: A vital microscope study in the rabbit. **J. Prosthet. Dent.** 50:101-107, 1983.

Hansson, H-A., Albrektsson, T. and Branemark, P-I.: Structural aspects of interface between tissue and titanium implants, **J. Prosthet. Dent.** 50:108-113, 1983.

Kinni, M., Hokama, S.N., Caputo, A.: Force transfer by osseointegration, **Int. J. Oral Max Implants.** 1:11-14, 1987.

Moy, P., Lewis, S., and Beumer, J.: Comparative analysis of one hundred consecutively placed "Core-Vents" to one hundred consecutively placed "Biotes" implants. Proceedings of Second International Congress on Preprosthetic Surgery (May, 1987).