

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós Graduação em Odontologia



TESE

**Obtenção, Caracterização e Aplicação (*in vitro*) de
Nanoscaffold Injetável Funcionalizado Com Substâncias
Bioativas**

Bianca Palma Santana

Pelotas, 2011

Bianca Palma Santana

**Obtenção, Caracterização e Aplicação (*in vitro*) de Nanoscaffold Injetável
Funcionalizado com Substâncias Bioativas.**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Materiais Dentários.

Orientador: Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño
Co-Orientador: Rodrigo Varella de Carvalho

Pelotas, 2011

Dados de Catalogação da Publicação

S232o Santana, Bianca Palma

Obtenção, caracterização e aplicação (in vitro) de nanoscaffold injetável funcionalizado com substâncias bioativas / Bianca Palma Santana ; orientador: Neftalí Lenin VillarrealCarreño; co-orientador: Rodrigo Varella de Carvalho. – Pelotas: UFPel, 2011.

145 f. : tab. ; fig.

Tese (Doutorado). Materiais Dentários. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

1. Engenharia Tecidual. 2. Matriz Extracelular. 3. Polpa Dentária.
4. Odontologia. I. Carreño, Neftalí Lenin Villarreal (orient.)
II. Carvalho, Rodrigo Varella de (co-orient.) III. Título.

D151

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^o. Neftalí Lenin VillarrealCarreño (orientador)

Prof. Dr^o. Luciano Casagrande

Prof. Dr^o. Cláudio Martin Pereira de Pereira

Prof. Dr^o. Cesar Henrique Zanchi

Prof. Dr^o. Luciano da Silva Pinto

Profa. Dr^a. Fabiana Kömmling Seixas (suplente)

Prof. Dr^o. Fabio Renato Manzolli Leite (suplente)

Dedicatória

É com muito Amor que dedico este trabalho,

aos meus pais José Campos Santana e Nilce Marina Palma Santana, que sempre acreditaram em meus sonhos, dando forças para que eles se realizassem. Educaram-me para a vida, me deram tudo o que poderiam oferecer, dentre o principal, o AMOR.

*“Ouve, meu filho, a instrução de teu pai,
Não desprezes o ensinamento de tua mãe.
Isso será, pois, um diadema de graça para a tua cabeça
E um colar para teu pescoço” (Provérbios, 8-9)*

a meu marido Flaviano Moreira, sofremos juntos, rimos juntos, trabalhamos juntos, sempre ao meu lado, sempre dentro do meu coração, sempre amigo, sempre companheiro e sempre dedicado.

*“O amor é paciente, é bondoso.
Não tem inveja, não é orgulho, não é arrogante, nem escandaloso.
Não busca seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor.
Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade.
Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.
O amor jamais acabará” (I Coríntios 13, 4-8).*

Agradecimento

Ao Prof. Dr. Flávio Demarco pela excelente coordenação da Pós Graduação, sempre solícito quando a ele recorri.

Ao Prof. Dr. NeftalíCarreño pela orientação, sempre pronto a dirimir qualquer dúvida que fosse apresentada.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Carvalho pela co-orientação que mesmo a distância eu tive o seu apoio.

A Fernanda Nedel sou eternamente grata pela imensa ajuda, pelas horas que passamos juntas, e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos alunos de graduação da Engenharia de Materiais e aos de Odontologia, que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

Nota Preliminar

A presente Tese foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – Estrutura em Artigos, que consta no Apêndice D do referido manual, página 38.

Resumo

SANTANA, Bianca Palma. **Obtenção, Caracterização e Aplicação (*in vitro*) de Nanoscaffold Injetável Funcionalizado Com Substâncias Bioativas**. 2011. 145f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O desenvolvimento de *scaffolds* para aplicação na engenharia tecidual deve ser biocompatível, onde os produtos de degradação não devam ser citotóxicos, tumorigênicos, nefrotóxicos ou causar qualquer outro efeito tóxico ao organismo. Apesar do largo uso em engenharia tecidual, existe um esforço para melhorar a funcionalidade deste material para futuras aplicações. Parâmetros importantes deveriam ser observados em relação às propriedades que poderiam influenciar o comportamento celular: tamanho dos poros, formato dos poros, e tratamento da superfície, por exemplo. Dentre os materiais utilizados pela produção de scaffolds, os polímeros naturais têm sido os mais empregados, dada a sua grande flexibilidade de desenho e degradabilidade. Scaffolds utilizando nano-materiais permitem uma similaridade maior com a matriz extracelular natural e estes sistemas poderiam ser combinados com indutores biológicos (por exemplo lectinas) para direcionar respostas biológicas específicas. O objetivo geral de nossa pesquisa é obter um hidrogel de alginato funcionalizado com nano/micro fibras a base de hidroxiapatita e dióxido de titânio, bem como substâncias bioativas (lectinas), visando à aplicação *in vitro* para futura utilização em regeneração do tecido pulpar.

Palavras-chave: Engenharia Tecidual, Matriz extracelular, Polpa Dentária.

Abstract

SANTANA, Bianca Palma. **Preparation, Characterization and Application (in vitro) of functionalized Nanoscaffold Injectable with Bioactive Substances.** 2011. 145f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The development of scaffolds for tissue engineering should be biocompatible, where the degradation products should not be cytotoxic, tumorigenic, nephrotoxic or cause any toxic effects to the body. Despite the widespread use in tissue engineering, there is an effort to improve the functionality of this material for future applications. Important parameters should be observed in connection with properties that could influence the behavior of cells: pore size, pore shape, and surface treatment, for example. Among the materials used for the production of scaffolds, natural polymers have been the most widely used, given its high design flexibility and degradability. Scaffolds using nano-materials allow a greater similarity to natural extracellular matrix and these systems could be combined with biological inducers (eglectins) to address specific biological responses. The aim of our research is to obtain an alginate hydrogel functionalized nano/micro fiber based hydroxyapatite and titanium dioxide as well as bioactive substances (lectins), to the application in vitro for later use in the pulp tissue regeneration.

Keywords: Tissue Engineering, Extracelular Matrix, Dental Pulp.

Lista de Figuras

Projeto de pesquisa

Figura 1	Fluxograma dos procedimentos experimentais adotados neste trabalho, sendo que outras técnicas metodológicas podem ser integradas ao longo do desenvolvimento do projeto.....	35
Figura 2	Micrografia por MEV. Hidrogel de Alginato a 2% a 50µm.....	36
Figura 3	Micrografia por MEV. Hidrogel de Alginato a 2% com TiO ₂ a 50µm.....	37
Figura 4	Micrografias por MEV. A) fibras de hidroxiapatita1mm, B) fibra de hidroxiapatita a 10µm, evidenciando sua superfície microporosa e mesoporosa.....	37
Figura 5	Esquema ilustrativo da obtenção do Hidrogel de Alginato: (A) Hidrogel de Alginato; (B) Hidrogel de Alginato com fibras nano e micro estruturadas de TiO ₂ e (C) Hidrogel de Alginato com fibras nano e micro estruturadas de Hidroxiapatita.....	38
Figura 6	Preparo das amostras para realização de sua caracterização E: Hidrogel de alginato e suas diferentes modificações.....	39
Figura 7	Esquema ilustrativo dos testes realizados para verificação da proliferação celular junto ao <i>nanoscaffold</i> , para posterior escolha do material que obtiver melhores resultados. A) Cultivo das DPSC; B) Preparo das células (DPSC) com o nanoscaffold para avaliação de proliferação; C) Aplicação do teste WST1.....	41
Figura 8	Preparo das amostras para teste de proliferação.Placa de 96 poços. G1 - Hidrogel de Alginato; G2 - Hidrogel de Alginato, Hidroxiapatita; G3 - Hidrogel de Alginato, Hidroxiapatita, Lectina; G4 - Hidrogel de Alginato, Dióxido de Titânio;G5 - Hidrogel de Alginato, Dióxido de Titânio, Lectina; GC – Grupo Controle (com os hidrogéis sem células); SC – células tronco (apenas células em meio DMEM).....	42
Figura 9	Esquema ilustrativo da avaliação <i>in vitro</i> da adesão, proliferação e direfenciação celular no nanoscaffold injetável com células tronco de polpa dentária. A – preparo das raízes unirradiculares para avaliação do crescimento pulpar; B – avaliação da proliferação celular; C- Avaliação da diferenciação celular; D – imunohistoquímica.....	44

Anexo

Figura 1	Esquemas de um Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV. Fonte:Universidade de São Paulo (2009).....	56
----------	---	----

Relatório do trabalho de campo

Figura 1	Fluxograma dos procedimentos experimentais adotados durante o projeto para a obtenção, caracterização e aplicação (<i>in vitro</i>) de nanoscaffold injetável funcionalizado com substâncias bioativas.....	60
Figura 2	Fluxograma que demonstra os procedimentos realizados no processo de obtenção da resina de dióxido de titânio (TiO_2) para impregnação na fibra orgânica e obtenção das nano/micro fibras estruturadas com superfícies mesoporosas e microporosas.....	63
Figura 3	Caracterização das nano/micro fibras de dióxido de titânio (TiO_2) em diferentes temperaturas, através da Microscopia Eletrônica de Varredura.....	64
Figura 4	Caracterização das nano/microfibras de dióxido de titânio (TiO_2) em diferentes temperaturas, através do Infra Vermelho.....	65
Figura 5	Caracterização das nano/micro fibras de dióxido de titânio (TiO_2) em diferentes temperaturas, através da Difração de Raio X.....	66
Figura 6	Fluxograma que demonstra os procedimentos realizados no processo de obtenção e caracterização da resina $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para impregnação na fibra orgânica e obtenção das nano/micro fibras estruturadas com superfícies mesoporosas e microporosas.....	69
Figura 7	Caracterização das nano/micro fibras de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ em diferentes temperaturas, através da Microscopia Eletrônica de Varredura.....	70
Figura 8	Caracterização das nano/micro fibras de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ em diferentes temperaturas, através do Infra Vermelho.....	71
Figura 9	Caracterização das nano/micro fibras de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ em diferentes temperaturas, através Difração de Raio X.....	72

Figura 10	O fluxograma demonstra os procedimentos realizados no teste de citotoxicidade com as nano/micro de TiO_2 e $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	75
Figura 11	Teste de citotoxicidade com as nano/micro fibras de TiO_2 e $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ em diferentes concentrações.....	76
Figura 12	O fluxograma demonstra os procedimentos realizados para obtenção do Hidrogel de Alginato 2%.....	79
Figura 13	Caracterização da obtenção do Hidrogel de Alginato 2% através da Microscopia Eletrônica de Varredura.....	80
Figura 14	Fluxograma que demonstra os procedimentos realizados na modificação do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras.....	82
Figura 15	Caracterização da modificação do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras através da Microscopia Eletrônica de Varredura.....	84
Figura 16	Caracterização da modificação do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras através do Infra Vermelho.....	85
Figura 17	Caracterização da modificação do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras através da Difração de Raio X.....	86
Figura 18	Análise quantitativa de EDX dos elementos presentes no Hidrogel de Alginato não modificado e modificado pelas nano/micro fibras.....	87
Figura 19	Resultados da viscosidade obtida do Hidrogel de Alginato não modificado e modificado pelas nano/micro fibras.....	88
Figura 20	Teste de viabilidade e proliferação celular do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras.....	90
Figura 21	Teste de viabilidade e proliferação celular do Hidrogel de Alginato (HAccl) e Hidrogel de Alginato modificado com nfTD (AHnfTDcell) e com nfHY (AHnfHYcell) e seus respectivos controles (sem células), além do controle positivo (apenas células) e controle negativo (apenas DMEM) em diferentes intervalos de tempo (3, 6, 24 e 48h).....	91
Figura 22	Microscopia para visualização da adesão e proliferação celular (setas) no Hidrogel de Alginato não modificado e modificado com nano/micro fibras em um período de 3,6 e 24h.....	92

Artigo 1

Figure 1	Flow Chart of the experiment steps for the fabricating of nfTD and nfHY ceramics by the biotemplating process, alginate hydrogel modification and cell attachment and growth.....	99
Figure 2	Schematic representation of the resin impregnation in organic fiber, pyrolysis at 800°C, 1,000°C, 1,200°C, and the nano/micro ceramic fibers obtaining.....	101
Figure 3	FTIR spectra of nfTD (a), nfHY (b).....	104
Figure 4	XRD patterns of nfTD (a) and nfHY(b).....	106
Figure 5	Mouse fibroblast cell line (3T3/NIH) activity (MTT assay) in response to different dilutions ranging from 10mM to 0.001mM from nfTD, nfHY and C (control group); the standard deviations of the absorbance at 540nm are represented. There was none difference between the two types of nano/micro-fibers tested, and the concentration has also not influenced the results of viability. When compared to control, there was not a decrease in cell viability for the nano/micro-fibers.....	107
Figure 6	a – nfTD: a2, diameter of approximate 730nanometers; a3, superficial characteristics of nfTD fibers. b – nfHY: b2, diameter of approximate 944 nanometers, b3, Inside the fibers, image obtained by Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG SEM). The samples were calcined at 1,200°C in ambient atmosphere.....	109
Figure 7	SEM micrographs at 100x magnification: untreated 2% alginate hydrogel (a: 1-4), treated with nfTD (b: 1-4) and nfHY (c: 1-4). In the micrographs numbered at 2, 3 and 4, we observe the cell/scaffold after 3, 6 and 24 hours respectively, rounded cells could be seen attached to the surface of the materials, larger cytoplasm extensions and cell proliferation, cells were almost covering all the scaffold surface.....	110

Artigo 2

Figure 1	Chemical formula of Alginate building blocks: α -L-guluronic and β -D-mannuronic acids.....	122
Figure 2	Schematic representation of the egg-box association of alginate cross linked by calcium ions.....	123
Figure 3	FTIR spectra of HA (1a), AH with nfTD (3a) and AH with nfHY	126

	(2a).....	
Figure 4	XRD patterns of AH, and AH combined with nfTD(a) and nfHY(b).....	126
Figure 5	Quantitative results of AH (1) combined with nfTD (2) and nfHY (3).....	127
Figure 6	Quantitative measurement mouse of fibroblast cell 3T3 viability and proliferation on AH and AH combined with nfTD and nfHY. Data were used as mean $\pm$ SD, $n=9$, $*p<0,05$ in comparison with AH with cell.....	128

Lista de Tabelas

Projeto de pesquisa

Tabela 1	Grupos utilizados para funcionalização.....	40
----------	---	----

Artigo 1

Table I	Viscosity of hydrogel alginate combined nano/micro fibers in similar conditions.....	108
---------	--	-----

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de abreviaturas e siglas

mL - Mililitros

μl – Microlitros

ABS - Albumina bovina sérica

ANOVA -Análise de variância

BMPs -Proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês: bonemorphogeneticproteins)

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ – Hidroxiapatita

cm⁻¹ - por centímetro

CO₂ – Gás Carbônico

ConA - Concanavalin A

DMEM - Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco

DMP-1 – proteína da matriz dentinária¹,

DPSCsCélulas-tronco da polpa de dentes permanentes de humanos

DSPP – Sialoproteínadentinária

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EDX - Espectrômetro de dispersão de energia de raios X

ELISA - Ensaio Imunoenzimático(do inglês: enzimelinkedimmunosorbentassays)

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos (fibroblastgrowthfactor)

GAPDH - gliceraldeído fosfato dehidrogenase (do inglês: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

H – hematoxilina

E - eosina

HA – Hidrogel de Alginato

IGF-I; Fator de crescimento derivado da insulina (do inglês: InsulinGrowthFactor – 1)

IgG - Imunoglobulina G

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

NaC₆H₇O₆- Alginato de Sódio

NGF - Fator de crescimento neural (do inglês: *Neuronal GrowthFactor*)

nm – nanômetros

rpm – Rotações por minuto

RT- FTIR real time Fourier transforminfraredspectroscopy (espectroscopia no infravermelho pela transformada de Fourier em tempo real)

RT – PCR -Transcriptase reversa - Reação de polimerase em cadeia (do inglês: reverse transcription-polymerasechainreaction.

Scaffold - Molde ou guia de matriz extracelular

SFB - soro fetal bovino

TGFβ - Fator transformador de crescimento-beta

TiO₂ - Dióxido de Titânio

WST1 - water-solubletetrazoliumsalt

Sumário

1.	Projeto de pesquisa	29
1.1	Introdução.....	29
1.2	Revisão de Literatura.....	30
1.3	Objetivos.....	34
1.3.1	Geral.....	34
1.3.2	Específico.....	34
1.4	Metodologia (Materiais E étodos).....	35
1.4.1	Obtenção e caracterização do nanoscaffold a base de hidrogel de Alginato com fibras nano e micro estruturadas, com superfícies microporosas e mesoporosas.....	36
1.4.2	Funcionalização do nanoscaffold com lectinas.....	40
1.4.3	Avaliação in vitro da adesão, proliferação e direfenciação celular no nanoscaffold injetável com células tronco de polpa dentária em raízes de dentes humanos.....	44
1.5	Cronograma.....	48
1.6	Resultados, impactos esperados, possíveis dificuldades e soluções previstas.....	49
1.7	Aspectos Éticos.....	51
1.8	Referências.....	52
1.9	Anexos.....	54
2.	Relatório do trabalho de campo.....	60
3.	Artigo 1.....	95
4.	Artigo 2.....	119
5.	Conclusão final.....	134
6.	Referências.....	136



1. Projeto de pesquisa

1.1 Introdução

A engenharia tecidual alia ferramentas das ciências da vida, com princípios da engenharia dos materiais para desenvolver substitutos biológicos que visem restabelecer a função de um órgão debilitado ou perdido (LANGER e VACANTI, 1993). Na odontologia, uma das áreas em que se estuda a perspectiva de regeneração tecidual, é a da polpa dentária (KATCHBURIAN e ARANA, 2004; SHI et al., 2005; THESLEFF e SHARPE, 1997). Células tronco presentes no interior do tecido pulpar têm a capacidade de se diferenciarem em outras linhagens celulares como por exemplo em odontoblastos (GRONTHOS et al., 2002; MIURA et al., 2003; NEDEL et al., 2009). Quando o dente é acometido por cárie ou trauma a polpa tem habilidade de ativar células presentes no interior do tecido para se diferenciarem em células odontoblasto-símile, e assim produzir dentina regenerativa (SILVA, TARQUINIO, DEMARCO, PIVA, e RIVERO, 2006).

Para que ocorra o processo de regeneração é necessário um substituto da matriz extracelular chamado de *scaffold*, que proporcionará condições físico químicas e biológicas para o desenvolvimento do novo órgão (TAQVI e ROY, 2006). As raízes dentárias possuem uma morfologia que dificulta a aplicação de *scaffolds* tradicionalmente desenvolvidos para outras áreas da odontologia, como aqueles para a regeneração óssea. Atualmente, no nosso melhor conhecimento, não existem *scaffolds* injetáveis desenvolvidos para a odontologia, na área de regeneração do órgão pulpar. Sendo assim, o desenvolvimento de um *nanoscaffold* injetável a base de hidrogel de alginato, possibilitaria que as células presentes no interior da polpa exerçam um papel de direcionamento e diferenciação de células-tronco da polpa dental em células odontoblasto-símile (CASAGRANDE et al., 2010; DEMARCO, 2009). Além disso, fibras nanoestruturadas e microestruturadas serão utilizadas para aumentarem a área de contato entre célula e *scaffold*. Ainda, a funcionalização com lectinas (substâncias bioativas) pretende aumentar a adesão, migração, crescimento e diferenciação celular de células tronco da polpa dentária incubadas em contato com o *nanoscaffold* injetável (NISHIMURA et al., 2004; WIMER e MANN, 2002).

O desenvolvimento de um *nanoscaffold* injetável com uma composição inédita e aplicação na regeneração do órgão pulpar, significa a possibilidade de em um

futuro próximo dar origem a processos de patente, auto-suficiência da indústria nacional nessa área estratégica do conhecimento, além de uma potencial expansão e utilização nas demais áreas da saúde.

1.2 Revisão de Literatura

Os estudos em engenharia tecidual vêm crescendo a cada ano, e sua técnica consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, através do recrutamento de tecidos do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivados sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc). Após, estes *scaffolds* são reinseridos no paciente (BARBANTI, ZAVAGLIA, e DUEK, 2006), podendo sanar pequenos defeitos (LANZA R., 2007). A engenharia tecidual alia ferramentas das ciências da vida, com princípios da engenharia dos materiais para desenvolver substitutos biológicos que visem restabelecer a função de um órgão debilitado ou perdido (LANGER e VACANTI, 1993). Como uma ciência multidisciplinar, os trabalhos envolvem conhecimentos das áreas de biologia, ciências da saúde e ciência dos materiais (GRIFFITH e NAUGHTON, 2002; LANGER e VACANTI, 1993).

Os três elementos essenciais para a engenharia de tecidos são: células com capacidade de resposta (células-tronco), atividade morfogenética (fatores de crescimento e diferenciação) e presença de moldes ou condutores de matriz extracelular (do inglês: *scaffold*) (LANGER e VACANTI, 1993); (LANZA R., 2007; NAKASHIMA e AKAMINE, 2005). A angiogênese, crescimento de novos vasos sanguíneos, também representa um papel importantíssimo, pois sem o aporte sanguíneo adequado, permitindo a oxigenação-nutrição do tecido, não haverá possibilidade de regeneração do mesmo (NEDEL ET AL., 2009; NÖR, 2006).

Na odontologia, uma das áreas em que se estuda a perspectiva de regeneração tecidual, é a da polpa dental que é um tecido conjuntivo frouxo, composto por vasos, nervos, células, fibras e substância intercelular (KATCHBURIAN e ARANA, 2004). Os odontoblastos, por meio de seus prolongamentos fazem com que sejam parte integrante da dentina e a dentina considerada um prolongamento da polpa (KATCHBURIAN e ARANA, 2004; SHI ET AL., 2005; THESLEFF e SHARPE, 1997). Em resposta à destruição dos odontoblastos por cárie ou trauma, a polpa ativa células presentes no interior do

tecido para se diferenciarem em células odontoblasto-símile, e assim produzir dentina regenerativa (SILVA et al., 2006). Células tronco de polpa dentária, presentes no interior do tecido pulpar têm a capacidade de se diferenciarem em outras linhagens celulares (GRONTHOS et al., 2002; MIURA et al., 2003; NEDEL et al., 2009). Demarco et. al. (2009) observou por meio de expressão gênica de marcadores odontoblásticos e formação de tecido pulpar-símile *in vivo*, a diferenciação celular das células-tronco de tecido pulpar (DPSC) em células odontoblasto-símile.

Os fatores de crescimento TGF β -1 e TGF β -3 (fator transformador de crescimento-beta); proteínas morfogenéticas de osso particularmente as BMP-2 e BMP-7; FGF, IGF-I; NGF (LIU, JIN, RITCHIE, SMITH, e CLARKSON, 2005; MITSIADIS e RAHIOTIS, 2004; SMITH e LESOT, 2001), presentes na dentina e polpa, agem tanto como fatores mitogênicos como quimotáticos para as células pulpares e ultimamente vem sendo encontrados em ensaios e experimentos *in vitro*. Estes fatores de crescimento são secretados por fibroblastos pulpares e odontoblastos funcionais.

A diferenciação e o direcionamento de células-tronco da polpa dental em células odontoblasto-símile pode ocorrer com a incorporação de fatores de crescimento no *scaffold* (CASAGRANDE et al., 2010; DEMARCO, 2009). Smith et al, (2001) e Tziafas (2004) observaram que a aplicação de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) em dentina de roedores demonstrou a estimulação de odontoblastos para a formação de dentina reacional, evidenciando então que a dentina pode ser considerada um reservatório de fatores de crescimento “fossilizados”, os quais poderiam ser liberados em decorrência da solubilização da mesma, e de acordo com Graham et al., (2006) o capeamento pulpar direto com hidróxido de cálcio promove o reparo pulpar devido a estes fatores.

O *scaffold* proporciona condições físicoquímicas e biológicas para desenvolvimento das células, funcionando como matriz para a regeneração tecidual (TAQVI e ROY, 2006), podendo ainda ser empregados como sistema de carregamento para direcionar respostas celulares específicas (CHANG, LIN, KUO, e LIU, 2005; WEI, JIN, GIANNOBILE, e MA, 2006), deve ser biocompatível, minimizando reações imunológicas; biodegradável, onde os produtos de degradação

não devam ser citotóxicos, tumorigênicos, nefrotóxicos ou causar qualquer outro efeito tóxico ao organismo.

Dentre os materiais utilizados para produção de *scaffolds*, polímeros sintéticos são os mais empregados, (LIU e MA, 2004). Contudo, é crescente a utilização de polímeros naturais para tal finalidade, pois apresentam biodegradabilidade e são biomiméticos, reproduzindo de maneira muito próxima a matriz extracelular original (TIBBITT e ANSETH, 2009). Os polímeros naturais exibem razão de degradação controlada na presença de fluidos corpóreos e têm a vantagem do reconhecimento biológico, facilitando a adesão e proliferação celular. No entanto, eles podem suscitar resposta imune e podem conter impurezas patológicas, além de haver menor controle de suas propriedades de resistência (FREED et al., 2006).

Entretanto, muitos estudos estão sendo desenvolvidos para melhorar a funcionalidade destes polímeros para futuras aplicações. A utilização de nanomateriais na produção de *scaffolds* também proporciona maior similaridade à matriz extracelular natural (TIBBITT e ANSETH, 2009), como exemplo, nano e micro fibras de hidroxiapatita e dióxido de titânio, podendo estes ser combinados com indutores biológicos (como lectinas) ou fatores de crescimento (TGF β -1, BMPs) para direcionamento de respostas biológicas específicas (GOLDBERG, LANGER, e JIA, 2007; NISHIMURA et al., 2004).

As lectinas, classe de proteínas de plantas e de outros organismos estão envolvidas em diversas funções biológicas, por exemplo: na adesão celular, na migração celular, crescimento celular e indução de apoptose (NISHIMURA et al., 2004; WIMER e MANN, 2002). A utilização de nanocompostos funcionalizados para o estudo da regeneração tecidual pode ter suas aplicações ampliadas quando se associa moléculas biologicamente ativas. Uma das possibilidades de aplicação de materiais nanoestruturados é sua funcionalização com as lectinas (NISHIMURA et al., 2004).

Scaffolds, a base de hidrogéis, apresentam uma série de vantagens na área biomédica: podem carrear e proteger células, proteínas, fatores de crescimento ou drogas frágeis; exibem adequada permeabilidade para transportar nutrientes e metabólitos; demonstram biocompatibilidade e biodegradabilidade; e algumas formulações podem ser injetadas *in vivo* como um líquido que geleifica a

temperatura corpórea (HOFFMAN, 2002; JEONG, LEE, GUTOWSKA, e AN, 2002; ROY e GUPTA, 2003).

Em anos recentes, o hidrogel a base de alginato (HA) tem encontrado aplicações na medicina (NOVIKOVA et al., 2006), farmacologia (TONNESEN e KARLSEN, 2002), biologia (SONE et al., 2002), odontologia (DOBIE, SMITH, SLOAN, e SMITH, 2002; KAIGLER, CIRELLI, e GIANNOBILE, 2006), e utilizado em grande escala na Engenharia Tecidual (CATHERINE e PETER, 2008; KAWAGUCHI et al., 2006; PARK, KANG, KIM, MOONEY, e LEE, 2009). O HA apresenta característica biocompatível, podendo ser utilizado em forma de esferas ou gel, tem a propriedade de absorver água sem se dissolver (JEN, WAKE, e MIKOS, 1996).

Para uso odontológico, os *scaffolds* atualmente não estão disponíveis com a possibilidade de serem injetáveis, sendo assim o desenvolvimento de um *nanoscaffold* injetável a base de hidrogel de alginato e fibras nanoestruturadas e microestruturadas, com superfícies microporosas e mesoporosas, funcionalizado com substâncias bioativas (ex.: lectinas), e células-tronco de polpa dentária, pode ser de grande relevância para engenharia do tecido pulpar em um primeiro momento, em função da necessidade de se injetar o *scaffold* no interior da câmara pulpar ou no canal radicular, possibilitando que exerça um papel de direcionamento e diferenciação de células-tronco da polpa dental em células odontoblasto-símile (CASAGRANDE et al., 2010; DEMARCO, 2009).

1.3 Objetivos

1.3.1 Geral

Obter, caracterizar e aplicar o *nanoscaffold* a base de hidrogel de alginato com fibras nanoestruturadas e microestruturadas, com superfícies microporosas e mesoporosas, de hidroxiapatita e dióxido de titânio. Funcionalizá-lo com substâncias bioativas, como lectinas, para que possa ser empregado na engenharia tecidual, em regeneração de tecido pulpar *in vitro*, com células-tronco de polpa dentária, podendo dar origem a patentes além da elaboração de novas metodologias para o desenvolvimento desse material.

1.3.2 Específico

- Obter o hidrogel de alginato modificado com fibras nanoestruturadas e microestruturadas, com superfícies microporosas e mesoporosas, de hidroxiapatita e dióxido de titânio.
- Caracterização físico-química, e morfológica do hidrogel modificado (*nanoscaffold*).
- Funcionalizar lectinas ao *nanoscaffold*, e realizar a caracterização físico-química, e morfológica do novo material.
- Avaliar a adesão e proliferação de células tronco pulpare (DPSC) no *nanoscaffold* funcionalizado com lectinas.
- Avaliar a capacidade de diferenciação de células tronco da polpa dental (DPSC) semeadas no *nanoscaffold in vitro*, com o modelo de cultivo dentário.

1.4 Metodologia (materiais e métodos)

Para demonstrar os diferentes passos do projeto foi desenvolvido o fluxograma abaixo:

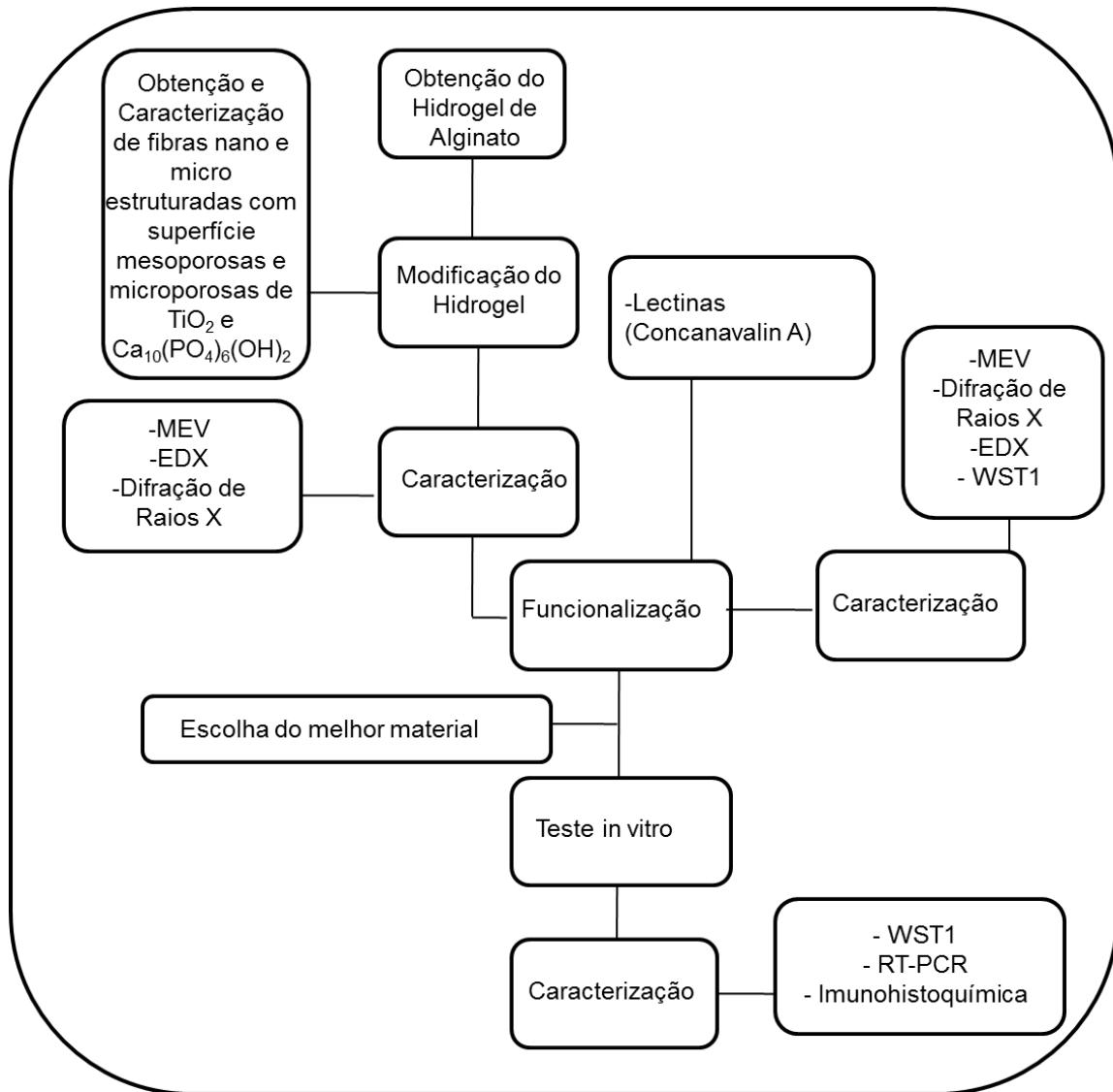


Figura 1. Fluxograma dos procedimentos experimentais adotados neste trabalho, sendo que outras técnicas metodológicas podem ser integradas ao longo do desenvolvimento do projeto.

1.4.1 Obtenção e caracterização do nanoscaffold a base de hidrogel de alginato com fibras nano e micro estruturadas, com superfícies microporosas e mesoporosas.

A metodologia abaixo pode ser observada junto ao esquema da figura 5.

- **Hidrogel de alginato:** dois gramas de Alginato de Sódio – $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ (VETEC QUÍMICA FINA LTDA), serão misturados em 80 ml de água deionizada e deixados por mais uma hora para a completa homogeneização da mistura, até chegar a temperatura de 40°C sendo chamada de mistura A.

O Sulfato de Cálcio P.A Dihidratado – $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (VETEC QUÍMICA FINA LTDA) será pesado em uma balança de precisão (0,8 g) e misturado com água deionizada lentamente em um agitador magnético até completar o volume desejado (20 ml) e deixado por mais uma hora para completa homogeneização da mistura, sendo chamada de mistura B.

Após o término de uma hora as duas soluções (A+B) serão vertidas em um Becker sobre o agitador magnético por mais 30 minutos, até formar uma solução homogenia (C), formando o Hidrogel de Alginato a 2% que de acordo com TAN et al. (2009) é a concentração mais fluida do material. Sua estrutura e morfologia podem ser observada nas figura 2.

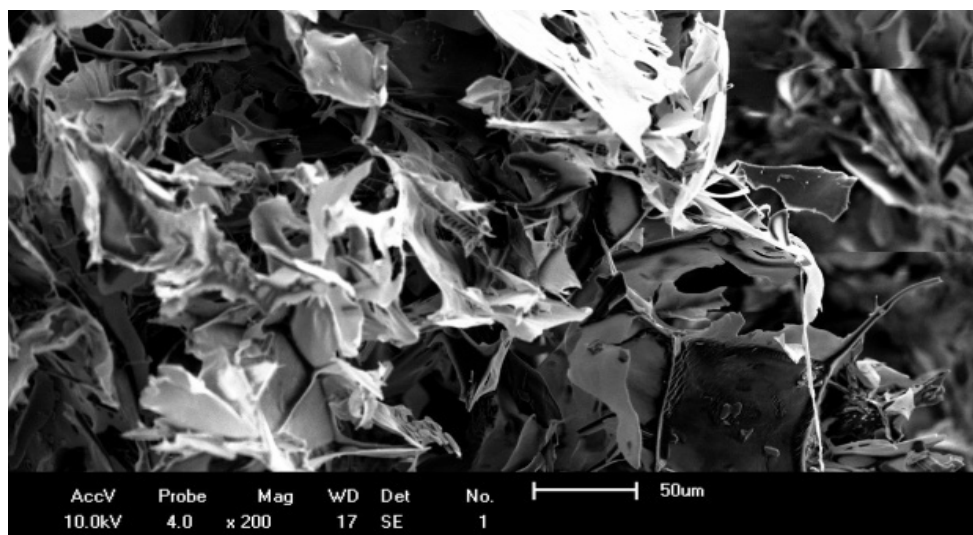


Figura 2: Micrografia por MEV. Hidrogel de Alginato a 2% a 50µm.

- **Hidrogel de Alginato e TiO_2 (Dióxido de Titânio)**. Em 40 ml da solução C, serão adicionados 0,02 g de TiO_2 nanoparticulado. Após, a solução será levada para o ultrason por 30 minutos para uma completa mistura, formando uma nova solução. Sua estrutura e morfologia podem ser observadas na figura 3.

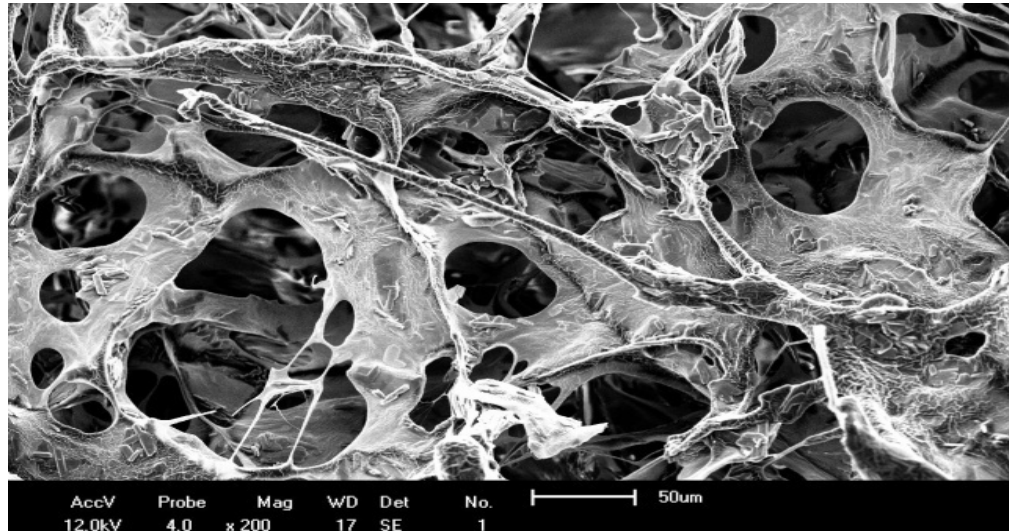


Figura 3: Micrografia por MEV. Hidrogel de Alginato a 2% com TiO_2 a 50µm.

- **Hidrogel de Alginato e $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Hidroxiapatita)**: Como visto na obtenção do Hidrogel de Alginato, a hidroxiapatita nanoparticulada (figura 4) será adicionada no lugar da solução de Sulfato de Cálcio em mesma quantidade (0,8 g).

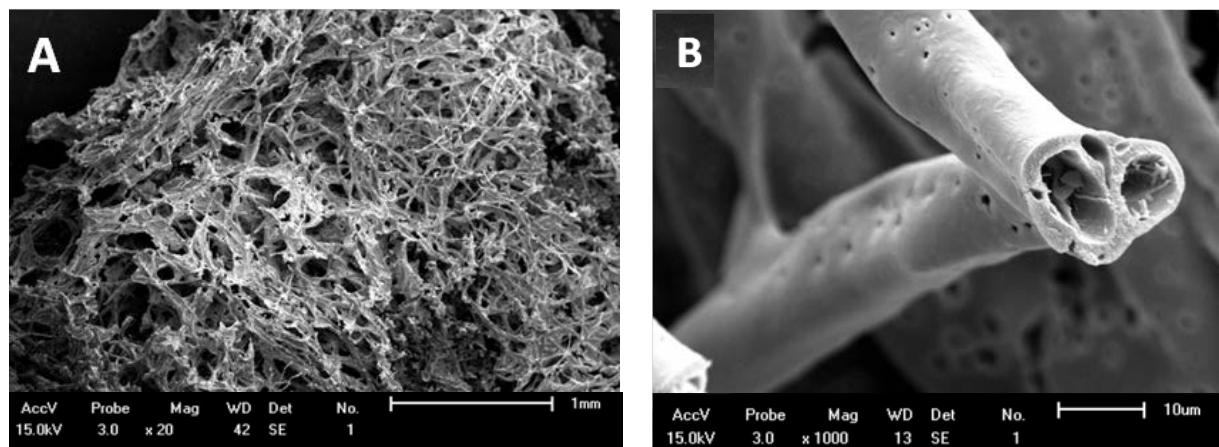


Figura 4: Micrografias por MEV. A) fibras de hidroxiapatita 1mm, B) fibra de hidroxiapatita a 10µm, evidenciando sua superfície microporosa e mesoporosa.

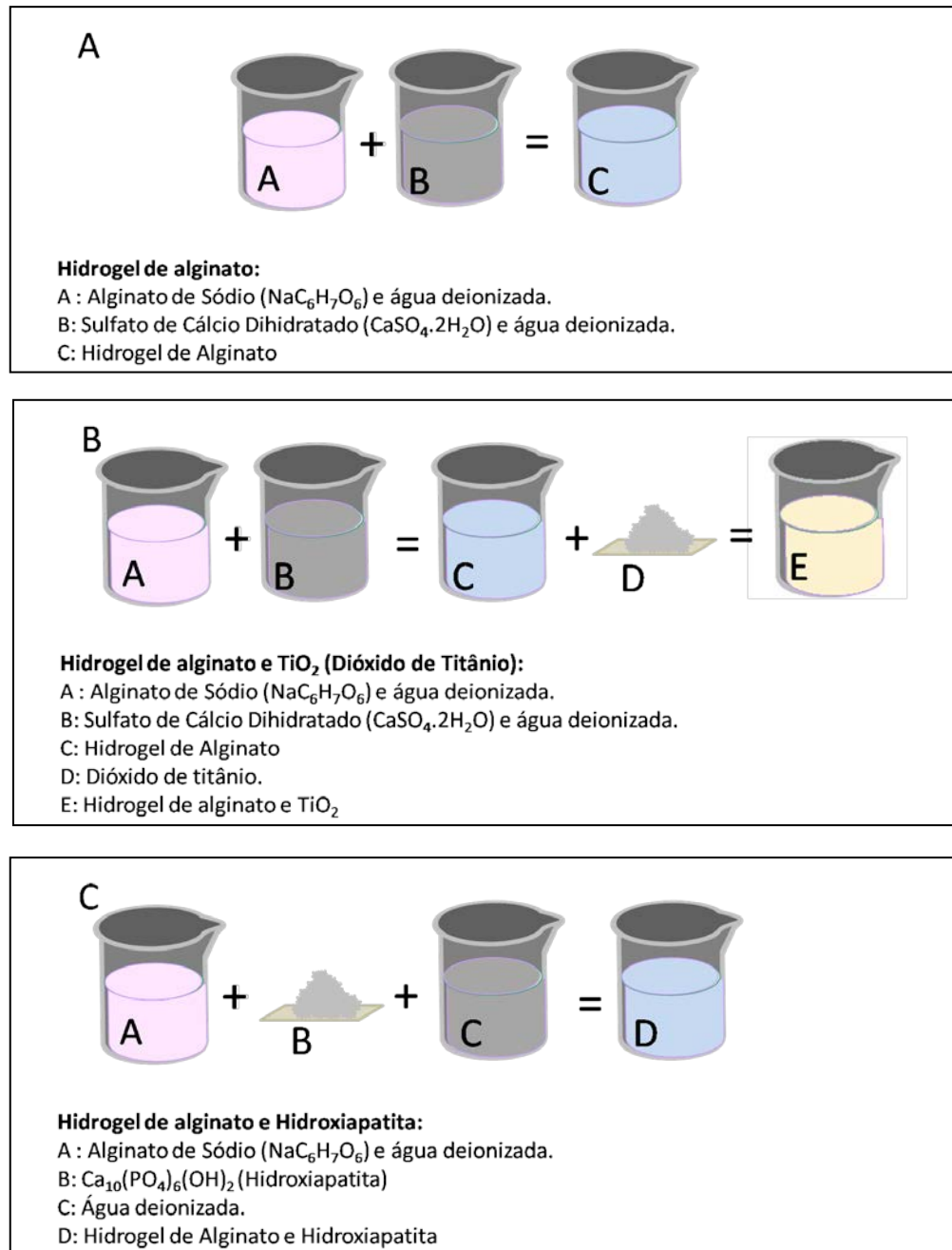


Figura 5: Esquema ilustrativo da obtenção do Hidrogel de Alginato: (A) Hidrogel de Alginato; (B) Hidrogel de Alginato com fibras nano e micro estruturadas de TiO_2 e (C) Hidrogel de Alginato com fibras nano e micro estruturadas de Hidroxiapatita.

Preparo das amostras para caracterização (observar o esquema na figura 6):

O Hidrogel de Alginato e suas diferentes modificações serão colocados em um Becker e tampado com papel filme, levado a uma bandeja com Nitrogênio Líquido para manter o seu resfriamento, e deixado no Liofilizador L101 (Liotop) por 24h, para retirar a umidade da amostra.

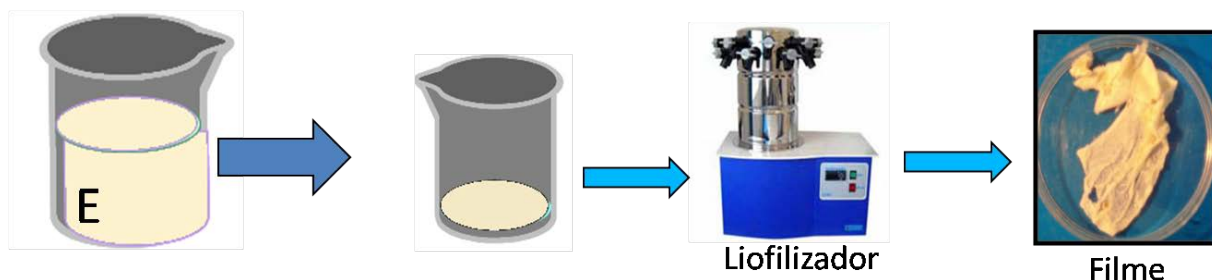


Figura 6: Preparo das amostras para realização de sua caracterização.
E: Hidrogel de alginato e suas diferentes modificações.

Aparelhos utilizados para caracterização. Em anexo 1 se encontra maiores detalhes técnicos dos aparelhos:

MEV – O microscópio eletrônico de varredura será utilizado para a análise da morfologia e micro-estrutura dos *scaffolds*. Após o preparo das amostras (conforme o esquema da figura 5), elas serão colocadas em porta amostras do microscópio (“stub”), com adesivos condutores, e uma camada de ouro será depositada em alto vácuo para que a amostra se torne um condutor térmico e elétrico, sendo possível a realização de sua leitura.

EDX – Para a leitura das amostras no EDX, identificando quantitativamente os elementos presentes nas amostras, após preparadas conforme o esquema da figura 5, serão levadas ao aparelho colocadas no porta amostra do mesmo dando início a realização das leituras.

Difração de Raios X – para a leitura das amostras no aparelho de Difração de Raios X, identificando a estrutura do material, sua composição de fases, tamanho dos cristais caso eles se formem identificando o estado da matéria (líquido, gasoso, amorfo), as amostras serão preparadas conforme esquema da figura 5 e levadas ao porta amostras do aparelho dando início a sua leitura.

1.4.2 Funcionalização do nanoscaffold com lectinas.

Serão funcionalizados os grupos de hidrogel de alginato com fibras nanoestruturadas e microestruturas com lectinas, conforme tabela 01.

Tabela 1. Grupos utilizados para funcionalização.

GRUPOS	MATERIAIS
G1	Hidrogel de Alginato
G2	Hidrogel de Alginato, Hidroxiapatita
G3	Hidrogel de Alginato, Hidroxiapatita, Lectina
G4	Hidrogel de Alginato, Dióxido de Titânio
G5	Hidrogel de Alginato, Dióxido de Titânio, Lectina

Durante a preparação do hidrogel de alginato conforme o esquema da figura 5, será adicionado a lectina (ConA) 5µg/ml (NISHIMURA et al. 2004), sobre uma placa de aquecimento e agitação do material.

Em seguida o novo material será caracterizado através dos aparelhos citados acima (MEV, EDX e Difração de Raios X).

Após os grupos preparados dar-se-á o início dos testes com células tronco pulpares (DPSC), verificando sua adesão e proliferação junto ao *nanoscaffold*, para posterior escolha do material que obtiver melhores resultados.

Os testes abaixo poderão ser observados junto ao esquema da figura 7:

Cultivo das células tronco pulpares (DPSC): As DPSC serão cultivadas em meio DMEM (Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco) em baixo teor de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml) em garrafas para cultivo celular. A garrafa será incubada em uma estufa de CO₂ com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a 37°C, 95% de ar e 5% de CO₂. Quando as células chegarem a subconfluência (80% de ocupação da área da garrafa de cultivo) serão lavadas com o meio SFB tampão fosfato salino com pH 7,2 e destacadas da garrafa com tripsina/EDTA, 0,25 %. Para a inativação da tripsina/EDTA, a solução DMEM e SFB será adicionada em um volume no mínimo igual ao volume de tripsina/EDTA usado. Em um tubo de 15 ml adiciona-se o conteúdo das garrafas e leva-se o mesmo para a centrífuga por 5 minutos com rotação de 1000 rpm, ocorrendo a precipitação celular no fundo do tubo (*Pellet*). O sobrenadante será removido e adicionado 5ml de meio DMEM a 10% de

SFB para uma nova homogeneização das células e a contagem será realizada na câmara de Neubauer utilizando-se 40µl do material.

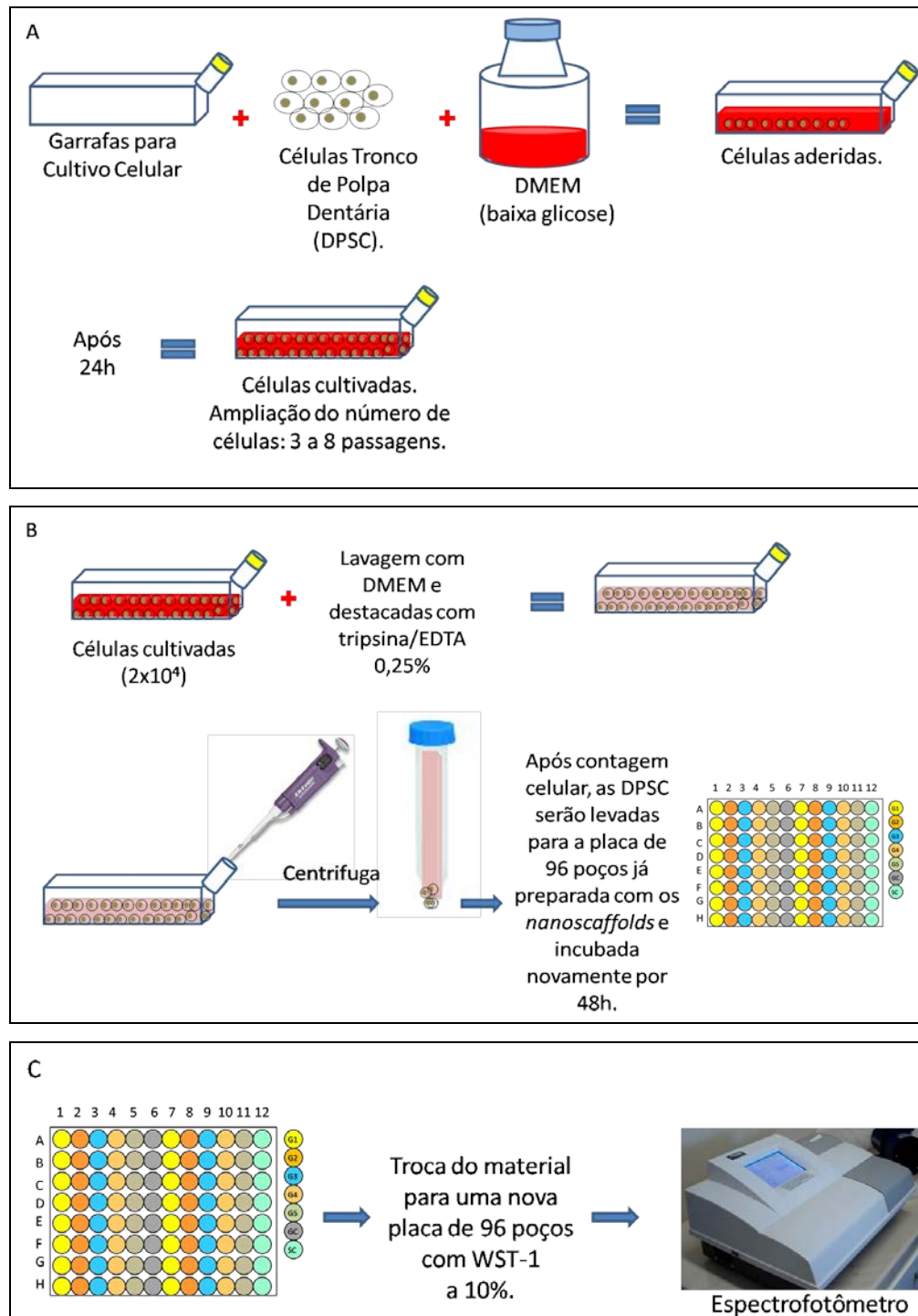


Figura 7: Esquema ilustrativo dos testes realizados para verificação da proliferação celular junto ao *nanoscaffold*, para posterior escolha do material que obtiver melhores resultados. A) Cultivo das DPSC; B) Preparo das células (DPSC) com o *nanoscaffold* para avaliação de proliferação; C) Aplicação do teste WST-1.

Preparo das células (DPSC) com o nanoscaffold para avaliação de proliferação:

1° passo: 100µl de Hidrogel de cada amostra será colocado na placa de 96 poços, sendo testados em oito repetições por 2 vezes, conforme o esquema da figura 8.

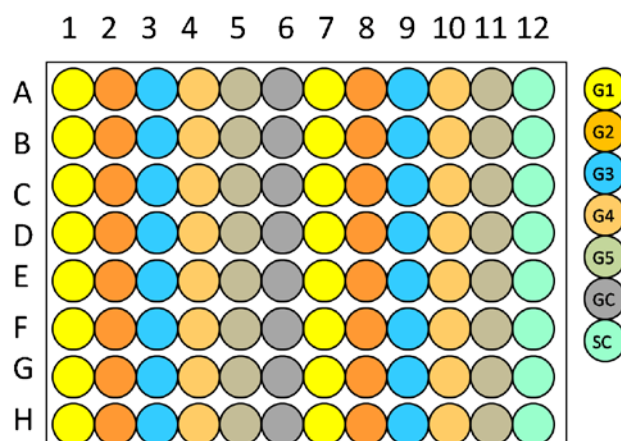


Figura 8: Preparo das amostras para teste de proliferação
]. Placa de 96 poços. G1 - Hidrogel de Alginato; G2 - Hidrogel de Alginato, Hidroxiapatita; G3 - Hidrogel de Alginato, Hidroxiapatita, Lectina; G4 - Hidrogel de Alginato, Dióxido de Titânio; G5 - Hidrogel de Alginato, Dióxido de Titânio, Lectina; GC – Grupo Controle (com os hidrogéis sem células); SC – células tronco (apenas células em meio DMEM).

2° passo: Na placa de cultivo celular (ELISA) de 96 poços será colocado 2×10^4 células por poço, levadas a um shaker por 5 minutos a 150rpm, e incubadas novamente (37°C em 5% CO₂) por 48h.

Aplicação do teste WST-1:

A avaliação nos grupos será checada após 3,7,14, 21 e 28 dias. Em cada ponto de tempo analisado, 10µl de WST-1 serão adicionados a 90µl de DMEM, sendo incubado por 6 horas para desenvolver a reação. Então, 100µl serão removidos para cada poço e colocado em placas de 96 poços, sendo então a leitura realizada com leitor de ELISA com filtro de 450 nm. Os dados serão submetidos a análise estatística.

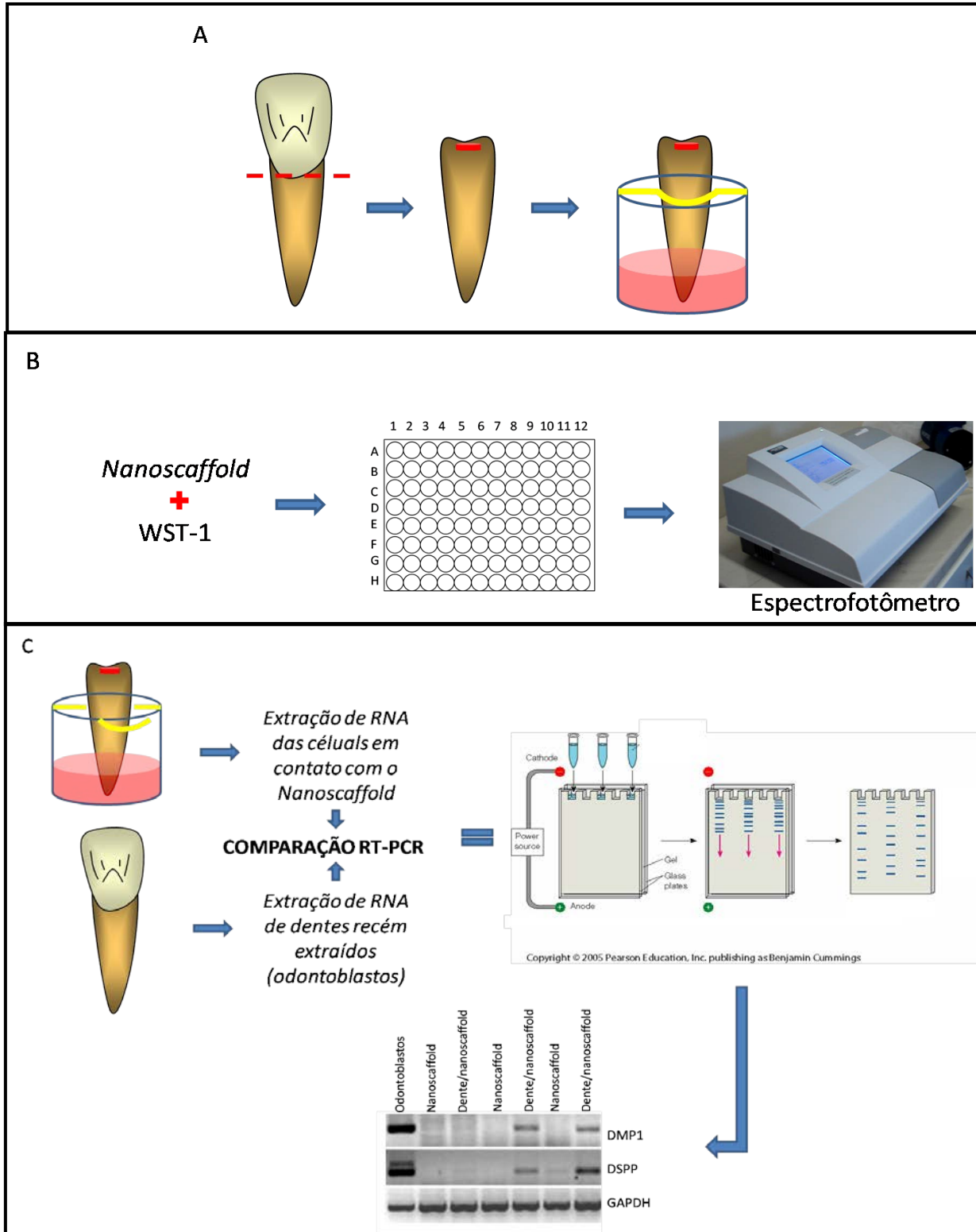
Escolha do melhor material com relação à proliferação celular:

A análise estatística para a verificação do melhor material será realizada através do teste de Análise de Variância (ANOVA) e complementado com o teste de

comparações múltiplas Tukey post hoc considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo (considerando a distribuição normal dos dados).

1.4.3 Avaliação *in vitro* da adesão, proliferação e diferenciação celular no nanoscaffold injetável com células tronco de polpa dentária em raízes de dentes humanos.

Os testes abaixo poderão ser observados junto ao esquema da figura 9:



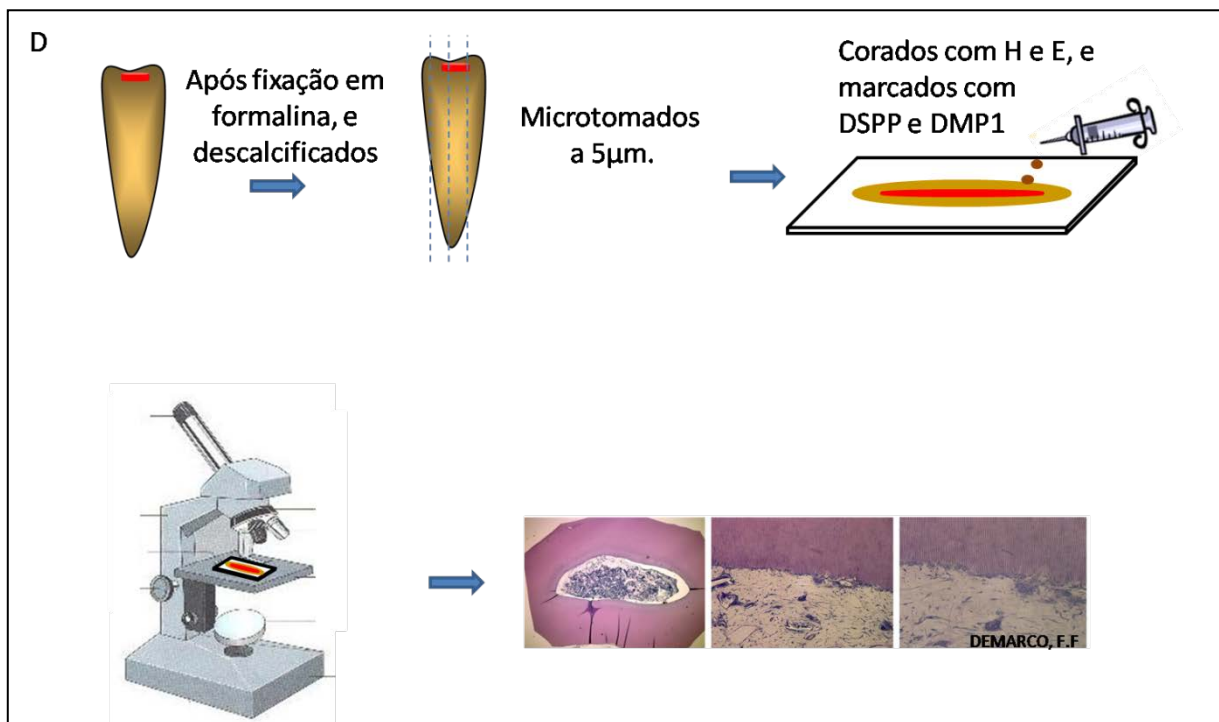


Figura 9. Esquema ilustrativo da avaliação *in vitro* da adesão, proliferação e diferenciação celular no nanoscaffold injetável com células tronco de polpa dentária. A – preparo das raízes unirradiculares para avaliação do crescimento pulpar; B – avaliação da proliferação celular; C- Avaliação da diferenciação celular; D - imunohistoquímica.

Preparo das raízes unirradiculares para avaliação do crescimento pulpar:

Serão selecionados 20 dentes unirradiculares extraídos por indicação ortodôntica, com o consentimento prévio do paciente ou responsável (Anexo 2). Os grupos de melhor desempenho com relação ao teste anterior serão utilizados para esse experimento, com a intenção de se avaliar a proliferação celular, a adesão e diferenciação de células tronco pulpares (DPSC) em odontoblastos, indicando uma possível regeneração pulpar.

Logo após a extração, as coroas serão removidas com discos diamantados, os tecidos periodontais residuais com curetas periodontais estéreis e a polpa dentária com auxílio de um extirpa nervos. As medidas de comprimento das raízes serão registradas. As raízes serão imediatamente transportadas ao laboratório de cultivo celular em meio de cultura DMEM com 20% de antibiótico (estreptomicina e penicilina) (TECLES, 2008).

Depois de preparadas, fios metálicos serão adaptados às raízes e levadas a

placas de cultivo celular (ELISA) de 12 poços em meio específico (DMEM) em baixo teor de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). O ápice radicular estará mergulhado no meio de cultura como ilustra a figura 9A. As raízes serão tratadas com 10% de EDTA, pH 7,2 por 1 minuto e logo lavadas com PBS estéril.

O *nanoscaffold* (previamente submetido à esterilização por radiação gama) junto com as células (aproximadamente 2×10^4) será agitado para que haja a união entre *nanoscaffold*-célula, em seguida injetado no canal radicular e logo toda a amostra será incubada a 37°C em 5% CO₂ entre 1 e 60 dias, sendo o meio de cultura trocado todos os dias.

Avaliação da proliferação celular:

A avaliação da proliferação pulpar será checada entre 1 e 60 através do teste colorimétrico (corante WST1). Em cada ponto de tempo analisado, uma proporção de 10µl de WST1 para 100µl de *nanoscaffold* será colocado em placas de 96 poços e incubado por 1 hora para desenvolver a reação. A leitura será realizada com um espectrofotômetro com filtro de 450 nm. Os dados serão submetidos a análise estatística utilizando o teste ANOVA e complementado com o teste de comparações múltiplas Tukey considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Para cada avaliação os experimentos serão repetidos 3 vezes.

Avaliação da diferenciação celular:

A diferenciação celular será realizada por meio de análise da expressão gênica utilizando a técnica de RT-PCR. Para tal entre 3 e 60 dias, o RNA das células em contato com o *nanoscaffold* será extraído seguindo o protocolo para extração de RNA com adição de 1mL de Trizol[®], e comparado com o RNA de odontoblastos obtidos de dentes recentemente extraídos utilizando o mesmo protocolo. Para verificação da diferenciação serão empregados *primers* da DSPP – sialo proteína dentinária e DMP-1 – proteína da matriz dentinária¹, considerados marcadores de diferenciação odontoblástica. Como controle será empregado o gene constitucional GAPDH. Os produtos obtidos serão separados utilizando 1,5% de gel de agarose por eletroforese e serão corados com brometo de etílio e imagens digitais serão

tiradas com fundo ultravioleta. Três experimentos independentes serão realizados para verificar a reprodutibilidade dos resultados.

Avaliação da proliferação, localização e morfologia celular:

Microscópio Óptico aumento de 400x: Ao final dos intervalos de tempo de cultivo os dentes serão fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas, descalcificados e posteriormente seccionados longitudinalmente. Serão então emblocados em parafina e microtomados a 5µm, sendo corados em H (hematoxilina) e E (eosina) e encaminhados para a realização de reações imunoistoquímicas e posterior leitura.

Para a imunoistoquímica investigando a diferenciação celular odontoblástica, marcadores odontoblásticos como DSPP e DMP1, serão examinados. Os anticorpos primários anti-DSPP e anti-DMP-1 serão diluídos em PBS contendo 0,1% de albumina bovina sérica (ABS), sendo as secções histológicas incubadas *over night* a 4°C. Após lavagem em SFB os cortes serão incubados com os anticorpos secundários e então tratados com complexo estreptoavidina-biotina, conforme instruções do fabricante. As secções serão reveladas com 3-3 diaminobenzidina e contra coradas com hematoxilina de Mayer, sendo assim montadas em Permount. Os controles negativos serão obtidos pela incubação das secções com IgG diluída nas mesmas condições de cada anticorpo empregado.

1.5 Cronograma

Atividade	Anual			
	2009	2010	2011	2012
A	X	X	X	X
B	X	X		
C	X	X		
D	X	X		
E	X	X		
F	X	X	X	
G			X	X

LEGENDA:

Atividade A– Revisão bibliográfica periódica;

Atividade B– Obtenção do Hidrogel de alginato e caracterização com fibras nano e micrométricas;

Atividade C– Ensaaios;

Atividade D – Caracterização do nanoscaffold (físico-química e microestrutural);

Atividade E– Testes de Citotoxicidade

Atividade F –Melhorar e otimizar as percentagens de material biológico em função da concentração, tamanho, distribuição e tamanho de poros dentre outros; Projetar e propor a utilização dos novos materiais adsorventes; testes *in vitro*.

Atividade G – Elaboração de artigos, eventuais patentes, trabalhos científicos. Divulgação dos resultados através do sitio na internet do grupo. Bem como elaboração da tese.

1.6 Resultados, impactos esperados, possíveis dificuldades e soluções previstas.

Resultados e impactos esperados (indicadores de progresso ao final de cada 6 meses de projeto):

- **1º Semestre 2009** – Continuidade na Revisão Bibliográfica e iniciação da síntese de nanocompósitos;
- **2º Semestre 2009** – Término da síntese de fibras nano e microestruturadas com superfície microporosa e mesoporosa;
- **1º Semestre 2010** – Início da caracterização físico-química e microestrutural do *nanoscaffold*, funcionalizado com lectina e fator de crescimento;
- **2º Semestre 2010** – Finalização da caracterização físico-química e microestrutural do *nanoscaffold* injetável e possível ajuste para melhorar e otimizar as percentagens de material biológico em função da concentração, dentre outros;
- **1º Semestre 2011** – Projetar e propor a utilização dos novos materiais adsorventes;
- **2º Semestre 2011** – Elaboração de artigos, eventuais patentes, trabalhos científicos. Divulgação dos resultados através de artigos em revistas científicas indexadas e sitio na internet do grupo de pesquisa, bem como o início de elaboração da tese.
- **1º Semestre 2012** – Elaboração de artigos, eventuais patentes e trabalhos científicos;
- **2º Semestre 2012** – Finalização da tese e apresentação para a banca examinadora.

Possíveis dificuldades e soluções previstas:

Dificuldades:

- Manipulação e obtenção do material,
- Proporção correta da Lectina e fator de crescimento assim como a funcionalização deles junto ao hidrogel de alginato.
- Proporção correta de DPSC e nanoscaffold,
- Manutenção da esterilidade do material,
- Acompanhamento do Crescimento celular,
- Citotoxicidade do material,
- Maior incorporação celular.

Soluções previstas:

- Melhor forma de esterilização (óxido de etileno), e armazenamento do material.
- Vários testes piloto com células e lectina e fator de crescimento,
- Desenvolvimento de novas Metodologias.

1.7 Aspectos éticos

Somente se desenvolverá a pesquisa mediante aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas, para garantir a cientificidade da pesquisa e sua eticidade.

1.8 Referências

- BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, E. A. R. (2006). Degradação acelerada de suportes de poli(e-caprolactona) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. **Polímeros**, 16, 141-148.
- BRASIL, S. D. (2009). http://www.shimadzu.com.br/desktop_default.aspx.
- CASAGRANDE, L., DEMARCO, F. F., ZHANG, Z., ARAUJO, F. B., SHI, S., e NÖR, J. E. (2010). Dentin-derived BMP-2 and Odontoblastic Differentiation, **J Dent Res**
- CATHERINE, K. K., e PETER, X. M. (2008). Maintaining dimensions and mechanical properties of ionically crosslinked alginate hydrogel scaffolds <I>in vitro</I> (Vol. 84A, pp. 899-907).
- CHANG, C. H., LIN, F. H., KUO, T. F., e LIU, H. C. (2005). Cartilage tissue engineering. . **Biomed Eng Appl Basis Commun** (17), 1-11.
- SÃO PAULO, U. (2009). Microscópio Eletrônico de Varredura com EDS e Sistema de Nanolitografia (Vol. <http://fap.if.usp.br/~lff/mev.html>).
- DEMARCO, F. F. (2009).Dentin and scaffold porogen effect on the dental pulp stem cells differentiation. Enviado para publicação.
- DOBIE, K., SMITH, G., SLOAN, A. J., e SMITH, A. J. (2002). Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. **Connect Tissue Res**, 43(2-3), 387-390.
- FREED, L. E., GUILAK, F., GUO, X. E., GRAY, M. L., TRANQUILLO, R., HOLMES, J. W., RADISIC, M., SEFTON, M. V., KAPLAN, D., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. (2006). Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. **Tissue Eng**, 12(12), 3285-3305.
- GOLDBERG, M., LANGER, R., e JIA, X. (2007). Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. **J Biomater Sci Polym Ed**, 18(3), 241-268.
- GRAHAM, L., COOPER, P. R., CASSIDY, N., NOR, J. E., SLOAN, A. J., e SMITH, A. J. (2006). The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. **Biomaterials**, 27(14), 2865-2873.
- GRIFFITH, L. G., e NAUGHTON, G. (2002). Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. **Science**, 295(5557), 1009-1014.
- GRONTHOS, S., BRAHIM, J., LI, W., FISHER, L. W., CHERMAN, N., BOYDE, A., DENBESTEN, P., ROBEY, P. G., e SHI, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J Dent Res**, 81(8), 531-535.
- HOFFMAN, A. S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. **Adv Drug Deliv Rev**, 54(1), 3-12.
- JEN, A. C., WAKE, M. C., e MIKOS, A. G. (1996). Review: Hydrogels for cell immobilization. **Biotechnol Bioeng**, 50(4), 357-364.
- JEONG, B., LEE, K. M., GUTOWSKA, A., e AN, Y. H. (2002). Thermogelling biodegradable copolymer aqueous solutions for injectable protein delivery and tissue engineering. **Biomacromolecules**, 3(4), 865-868.
- KAIGLER, D., CIRELLI, J. A., e GIANNOBILE, W. V. (2006). Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering. **Expert Opin Drug Deliv**, 3(5), 647-662.

- KATCHBURIAN, E., e ARANA, V. (2004). *Histologia e embriologia oral: texto-atlas-correlações clínicas* (2 ed.). Rio de Janeiro
- KAWAGUCHI, M., FUKUSHIMA, T., HAYAKAWA, T., NAKASHIMA, N., INOUE, Y., TAKEDA, S., OKAMURA, K., e TANIGUCHI, K. (2006). Preparation of carbon nanotube-alginate nanocomposite gel for tissue engineering. *Dent Mater J*, 25(4), 719-725.
- LANGER, R., e VACANTI, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926.
- LANZA R., L. R., VACANTI J. (2007). *Principles of Tissue Engineering* (3 ed.). San Diego, USA.
- LIU, J., JIN, T., RITCHIE, H. H., SMITH, A. J., e CLARKSON, B. H. (2005). *In vitro* differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 41(7), 232-238.
- LIU, X., e MA, P. X. (2004). Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, 32(3), 477-486.
- MITSIADIS, T. A., e RAHIOTIS, C. (2004). Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injury. *J Dent Res*, 83(12), 896-902.
- MIURA, M., GRONTHOS, S., ZHAO, M., LU, B., FISHER, L. W., ROBEY, P. G., e SHI, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 5807-5812.
- NAKASHIMA, M., e AKAMINE, A. (2005). The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod*, 31(10), 711-718.
- NEDEL, F., ANDRE DDE, A., DE OLIVEIRA, I. O., CORDEIRO, M. M., CASAGRANDE, L., TARQUINIO, S. B., NOR, J. E., e DEMARCO, F. F. (2009). Stem cells: therapeutic potential in dentistry. *J Contemp Dent Pract*, 10(4), 90-96.
- NISHIMURA, H., NISHIMURA, M., ODA, R., YAMANAKA, K., MATSUBARA, T., OZAKI, Y., SEKIYA, K., HAMADA, T., e KATO, Y. (2004). Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells--including bone marrow mesenchymal stem cells--on various scaffolds. *Experimental Cell Research*, 295(1), 119-127.
- NÖR, J. E. (2006). Tooth regeneration in operative dentistry, *Operative Dentistry* (Vol. v.31, pp. 633-642).
- NOVIKOVA, L. N., MOSAHEBI, A., WIBERG, M., TERENCEHI, G., KELLERTH, J. O., e NOVIKOV, L. N. (2006). Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J Biomed Mater Res A*, 77(2), 242-252.
- PARK, H., KANG, S. W., KIM, B. S., MOONEY, D. J., e LEE, K. Y. (2009). Shear-reversibly crosslinked alginate hydrogels for tissue engineering. *Macromol Biosci*, 9(9), 895-901.
- ROY, I., e GUPTA, M. N. (2003). pH-responsive polymer-assisted refolding of urea- and organic solvent-denatured alpha-chymotrypsin. *Protein Eng*, 16(12), 1153-1157.
- SHAMPO, M. A., e KYLE, R. A. (1981). Max von Laue. *Jama*, 246(13), 1412.
- SHI, S., BARTOLD, P. M., MIURA, M., SEO, B. M., ROBEY, P. G., e GRONTHOS, S. (2005). The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*, 8(3), 191-199.
- SILVA, A. F., TARQUINIO, S. B., DEMARCO, F. F., PIVA, E., e RIVERO, E. R. (2006). The influence of haemostatic agents on healing of healthy human

- dental pulp tissue capped with calcium hydroxide. *Int Endod J*, 39(4), 309-316.
- SMITH, A. J., e LESOT, H. (2001). Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*, 12(5), 425-437.
- SONE, T., NAGAMORI, E., IKEUCHI, T., MIZUKAMI, A., TAKAKURA, Y., KAJIYAMA, S., FUKUSAKI, E., HARASHIMA, S., KOBAYASHI, A., e FUKUI, K. (2002). A novel gene delivery system in plants with calcium alginate microbeads. *J Biosci Bioeng*, 94(1), 87-91.
- TAQVI, S., e ROY, K. (2006). Influence of scaffold physical properties and stromal cell coculture on hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*, 27(36), 6024-6031.
- TECLES, O; LAURENT, P; AUBUT, V e ABOUT, I. (2008). Human tooth culture: a study for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *J. biomed Mater Res B Appl Biomater*, 85(1), 180-187.
- THESLEFF, I., e SHARPE, P. (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev*, 67(2), 111-123.
- TIBBITT, M. W., e ANSETH, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 103(4), 655-663.
- TONNESEN, H. H., e KARLSEN, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 28(6), 621-630.
- TZIAFAS, D. (2004). The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res*, 38(3), 314-320.
- WEI, G., JIN, Q., GIANNOBILE, W. V., e MA, P. X. (2006). Nano-fibrous scaffold for controlled delivery of recombinant human PDGF-BB. *J Control Release*, 112(1), 103-110.
- WIMER, B. M., e MANN, P. L. (2002). Mitogen information summaries. *Cancer Biother Radiopharm*, 17(5), 569-597.

1.9 Anexos

ANEXO 1 – Aparelhos utilizados para caracterização dos materiais.

Microscópio Eletrônico de Varredura - MEV

De acordo com a Universidade de São Paulo (2009) o Microscópio Eletrônico de Varredura possui, além das características bem conhecidas deste tipo de equipamento, capacidade de gerar imagens de amostras isolantes sem a necessidade de metalização, através do modo baixo vácuo. Este recurso é especialmente útil para caracterizar amostras biológicas não resistentes a grandes diferenças de pressão e qualquer outro tipo de amostra onde não é desejada a metalização.

Na figura 1 encontramos os principais componentes do MEV. A coluna, com o canhão eletrônico e a série de lentes eletrônicas, e o sistema de alto vácuo, são similares nos dois tipos de equipamentos. Um conjunto de bobinas defletoras faz com que o feixe varra a amostra. Assim, a imagem é montada ponto a ponto, linha por linha, do mesmo modo que a imagem no visor de televisão. A imagem pode ser observada diretamente, ou fotografada.

Princípio de Funcionamento: Dentro da coluna de alto vácuo, os elétrons gerados a partir de um filamento termiônico de tungstênio, por aplicação de corrente, são acelerados por uma diferença de potencial entre catodo e anodo, entre 0,3 kV a 30 kV. O feixe gerado passa por lentes condensadoras, que reduzem o seu diâmetro, e por uma lente objetiva, que o focaliza sobre a amostra. Logo acima da lente objetiva existem dois estágios de bobinas eletromagnéticas, responsáveis pela varredura do feixe sobre a amostra. O feixe interage com a região de incidência da amostra até uma profundidade que pode variar de $\sim 1 \mu\text{m}$ a $\sim 6 \mu\text{m}$, dependendo da natureza da amostra. Esta região é conhecida por volume de interação, o qual gera os sinais que são detectados e utilizados para a formação da imagem e para microanálise.

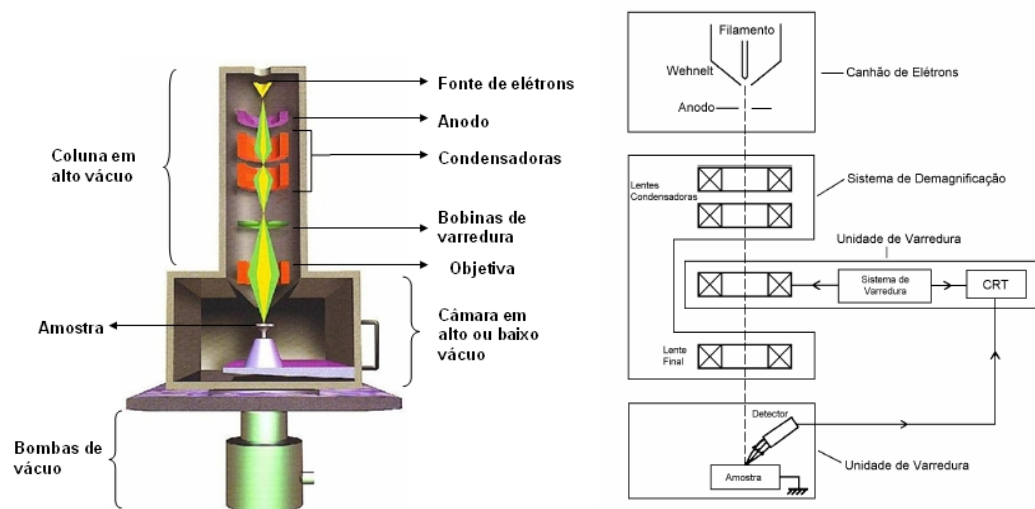


Figura1: Esquemas de um Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV. Fonte: Universidade de São Paulo (2009).

EDX

Segundo a empresa SHIMADZU do Brasil (2009), o espectrômetro de dispersão de energia de raios X (EDX) é uma técnica muito útil para a caracterização elementar da estrutura da superfície dos materiais. Com esta técnica é possível detectar quase todos os elementos da tabela periódica desde que estejam presentes na amostra em quantidade suficiente e tenham número atômico maior que o do berílio ($Z = 4$).

O EDX tem sido usado para controle de qualidade e teste de análise em muitas indústrias, incluindo indústrias de computadores, semicondutores, metais, cimento, papel e polímeros. Tem sido usado, também, na medicina para análise de sangue, tecidos, ossos e órgãos, e no controle de poluição para identificação de amianto bem como, nos estudos de arqueologia e oceanografia. A maior vantagem do EDX é a velocidade na coleta dos dados devido à eficiência dos detectores. As desvantagens são: a pobre resolução na largura dos picos (os picos no EDX são aproximadamente 100X maiores que o comprimento do pico natural, isto faz com que muitos picos se superponham), a intensidade dos picos são relativamente pequenas em relação ao “background” (devido ao alto “background” formado pela radiação e pelos elétrons que sofrem desaceleração na superfície quando colidem com os átomos).

Difração de Raios X

Desde a descoberta da estrutura cristalina por Max vonLaue em 1912 (SHAMPO e KYLE, 1981), a técnica de difração de raios X evoluiu rapidamente como um método eficiente e preciso para uso em pesquisa científica e tecnológica, e para ensaios não-destrutivos em aplicações industriais. Na atualidade, é a única técnica para a determinação precisa de estruturas cristalinas simples (como é o caso de materiais inorgânicos), e estruturas complexas, tais como, proteínas e vírus, e também para diversas outras aplicações, como a visualização direta de defeitos cristalinos e quantificação em tempo real da dinâmica de fenômenos ultra-rápidos.

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

		Universidade Federal de Pelotas Faculdade de Odontologia de Pelotas Programa de Pós-Graduação em Dentística			
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO					
Eu, _____, natural de _____, sexo _____, cor _____, residente na _____, cidade de _____, telefone _____, portador do RG _____, aceito doar o(s) dente(s): _____ para a pesquisa titulada: Obtenção, Caracterização e Aplicação (<i>in vitro</i>) de Nanoscaffold Injetável Funcionalizado Com Substâncias Bioativas, ciente de que o(s) mesmo(s) será(ão) utilizado(s) para o desenvolvimento de um novo material para aplicação odontológica. Estou consciente de que este(s) dente(s) foi(ram) extraído(s) por indicação terapêutica para a melhoria da minha saúde, como documentado em meu prontuário. Estou ciente de que esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Pelotas, e que os dentes serão utilizados para estudo laboratorial, não comprometendo minha identidade. Pelotas, _____ de _____ de 20 ____. _____ ASSINATURA DO DOADOR OU RESPONSÁVEL LEGAL Pesquisador Responsável: Bianca Palma Santana Tel. 3027-6068 <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border-top: 1px solid black; text-align: center;">Assinatura do Pesquisador</td> <td style="width: 50%; border-top: 1px solid black; text-align: center;">Assinatura do doador Nome e RG:</td> </tr> </table>				Assinatura do Pesquisador	Assinatura do doador Nome e RG:
Assinatura do Pesquisador	Assinatura do doador Nome e RG:				
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO					
Eu, _____, natural de _____, sexo _____, cor _____, residente na _____, cidade de _____, telefone _____, portador do RG _____, aceito doar o(s) dente(s): _____ para a pesquisa titulada: Obtenção, Caracterização e Aplicação (<i>in vitro</i>) de Nanoscaffold Injetável Funcionalizado Com Substâncias Bioativas, ciente de que o(s) mesmo(s) será(ão) utilizado(s) para o desenvolvimento de um novo material para aplicação odontológica. Estou consciente de que este(s) dente(s) foi(ram) extraído(s) por indicação terapêutica para a melhoria da minha saúde, como documentado em meu prontuário. Estou ciente de que esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Pelotas, e que os dentes serão utilizados para estudo laboratorial, não comprometendo minha identidade. Pelotas, _____ de _____ de 20 ____. _____ ASSINATURA DO DOADOR OU RESPONSÁVEL LEGAL Pesquisador Responsável: Bianca Palma Santana Tel. 3027-6068 <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border-top: 1px solid black; text-align: center;">Assinatura do Pesquisador</td> <td style="width: 50%; border-top: 1px solid black; text-align: center;">Assinatura do doador Nome e RG:</td> </tr> </table>				Assinatura do Pesquisador	Assinatura do doador Nome e RG:
Assinatura do Pesquisador	Assinatura do doador Nome e RG:				



2. Relatório do trabalho de campo

Seguindo o fluxograma do projeto, o desenvolvimento do mesmo iniciou-se com a Obtenção e Caracterização das fibras nano e micro estruturadas com superfície mesoporosas e microporosas de dióxido de titânio e (nfTD) e hidroxiapatita (nfHY) (Figura 1- letra A –) no laboratório do Curso de Engenharia de Materiais da UFPel (Universidade Federal de Pelotas).

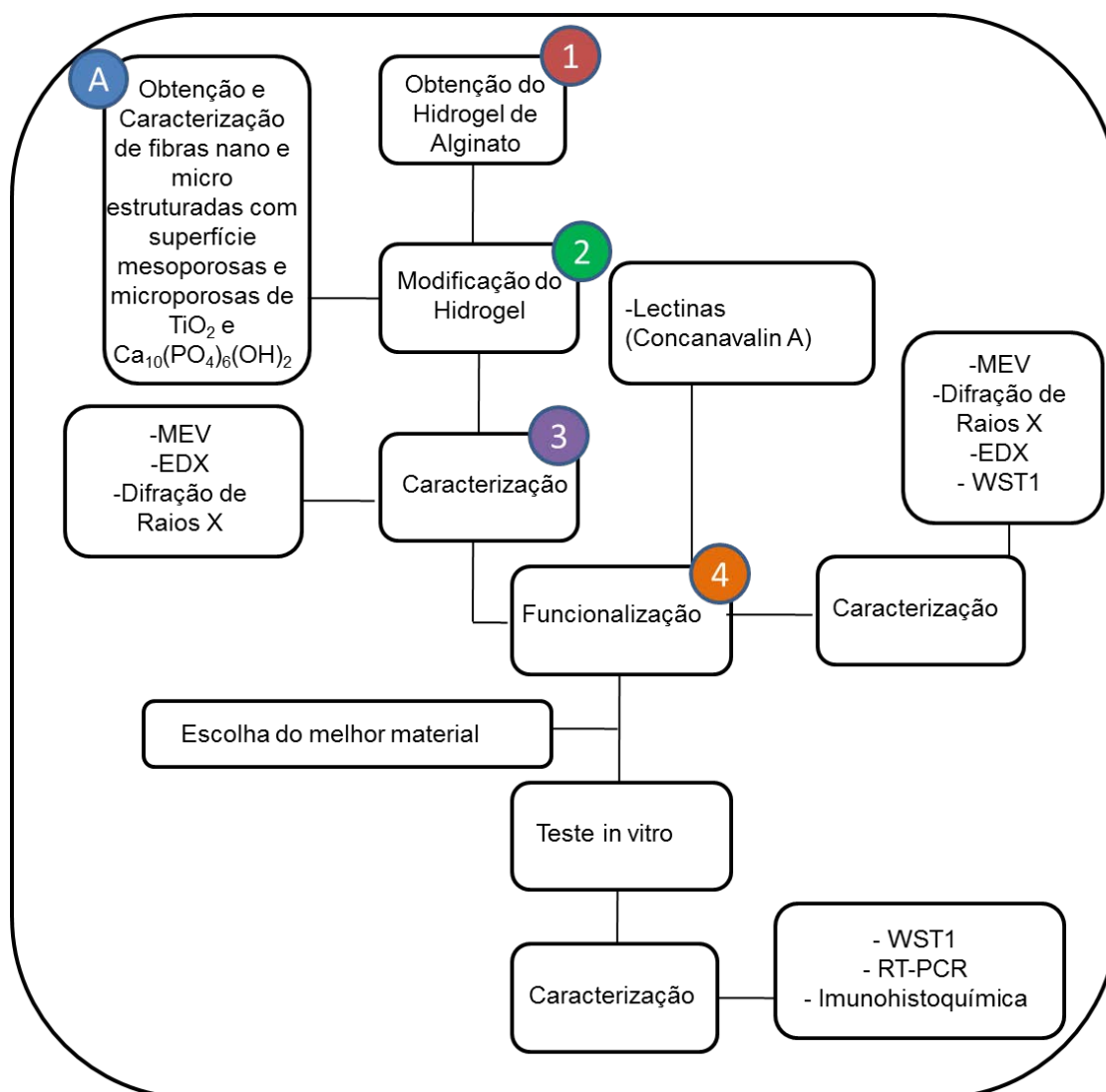


Figura 1: Fluxograma dos procedimentos experimentais adotados durante o projeto para a obtenção, caracterização e aplicação (*in vitro*) de nanoscaffold injetável funcionalizado com substâncias bioativas.



Obtenção e Caracterização de fibras nano/micro estruturadas

MÉTODO DE PECHINNI:

O método de Pechinni, também chamado método dos precursores poliméricos para a preparação de cerâmicas, envolve a capacidade que alguns ácidos orgânicos α -hidroxicarboxílicos possuem para formação de quelatos com a maioria dos cátions. Quando um álcool polihídrico é adicionado aos quelatos, sob aquecimento e agitação, ocorre a formação de um éster devido a condensação entre grupos hidroxilas e carboxilas do ácido cítrico. O polímero formado apresenta grande homogeneidade na dispersão dos íons metálicos e um tratamento térmico adequado é realizado para a eliminação da parte orgânica e obtenção da fase cerâmica desejada.



Obtenção e Caracterização de fibras nano/micro estruturadas com superfície mesoporosas e microporosas de TiO_2

MATERIAIS:

Isopropóxido de Titânio- $\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Ti}$ (ACROS ORGANICS)

Ácido Cítrico - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (SYNTH LTDA)

EtilenoGlicol - $\text{OHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (SYNTH LTDA)

Água Destilada - H_2O

METODOLOGIA:

Obedecendo a razão de 3 mols de ácido para 1 mol de metal, o ácido cítrico foi pesado em uma balança de precisão (57,639 gramas), misturado a 45ml de água destilada até sua homogeneização, formando a solução A. O isopropóxido de titânio foi pesado (28,426 gramas – ou 29,91ml) e misturado a solução A, formando a solução B. A solução B foi agitada por 4h, em seguida adicionou-se a ela o etileno glicol (34,27ml), obedecendo a razão 40% etileno glicol/60% ácido cítrico (m/m), sob agitação até homogeneização. Todas as misturas foram agitadas a temperatura de

90°C, formando a solução C final, ou seja, a resina pronta para ser impregnada sobre a fibra orgânica.

A impregnação da resina na fibra orgânica, foi feita com o auxílio de uma pipeta, gotejando-a uniformemente sobre a fibra, a fibra foi elevada em um suporte com papel filtro, fazendo com que através da gravidade o excesso da resina pudesse ser retirado.

Depois de retirado o excesso, a fibra foi seca em estufa a 90°C por 2h, posteriormente levada ao forno e calcinada a 800°C, 1000°C e 1200 °C por 2h, obtendo as nano/micro fibras de Dióxido de titânio.

CARACTERIZAÇÃO:

As nano/micro fibras foram caracterizadas da seguinte forma:

- Microscópio eletrônico de Varredura (Shimadzu SSX-550 – Japão): as amostras foram levadas ao MEV, metalizadas sob o stub e as micrografias realizadas.
- Infra vermelho (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, IRPrestige-21, Shimadzu – Japão): As amostras foram compactadas com Nujol e levadas ao infra vermelho.
- Raio X (XRD, Shimadzu, model XRD-6000 – Japão): As amostras foram colocadas até o preenchimento do orifício do porta amostra, ficando nivelada com a parte superior do mesmo para o início da leitura.

O Fluxograma abaixo (Figura 2) demonstra os passos realizados para a fabricação das nano/micro fibras de Dióxido de Titânio (TiO_2).

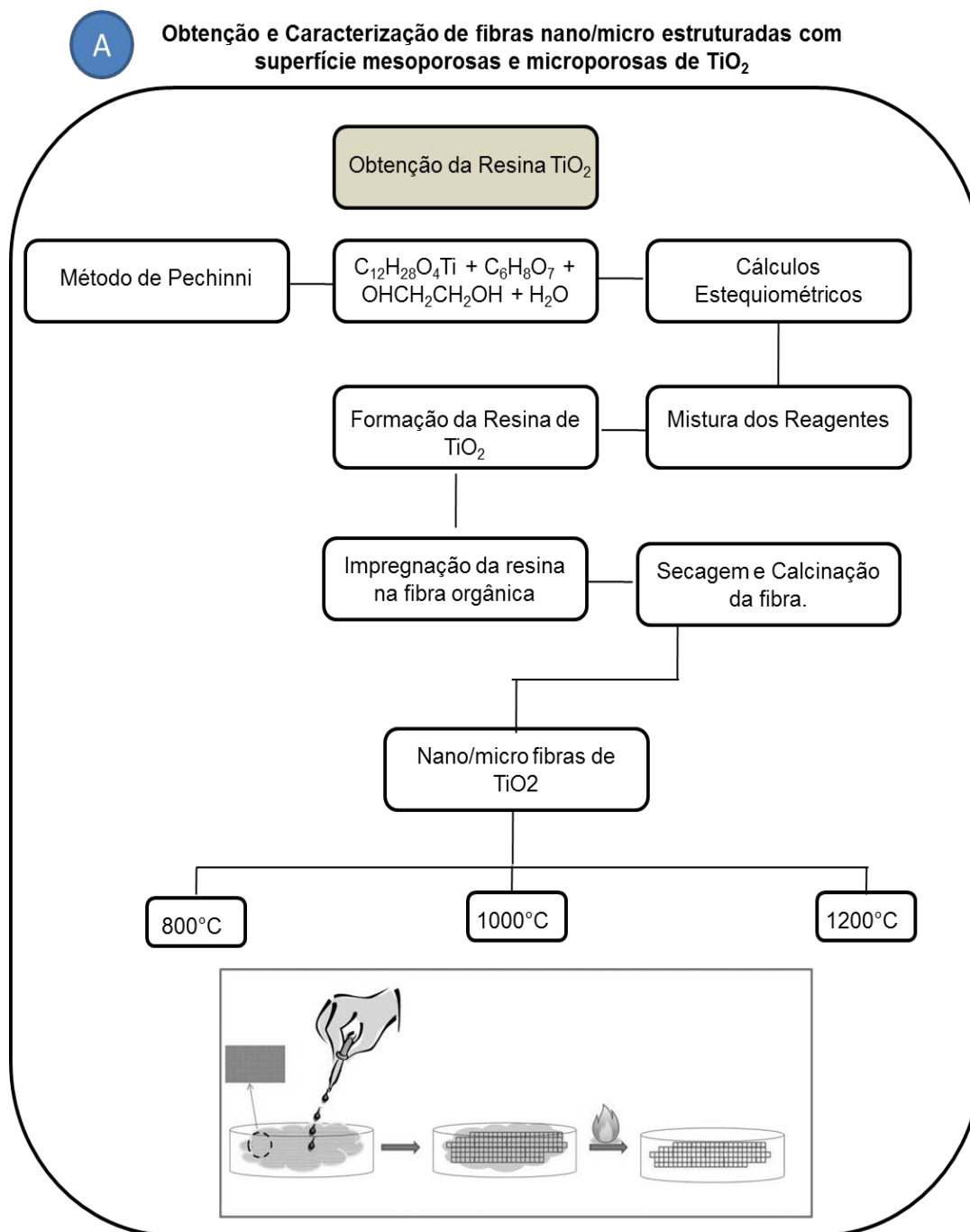


Figura 2: Fluxograma que demonstra os procedimentos realizados no processo de obtenção da resina de dióxido de titânio (TiO_2) para impregnação na fibra orgânica e obtenção das nano/micro fibras estruturadas com superfícies mesoporosas e microporosas.

As imagens abaixo (Figuras 3, 4 e 5) representam os resultados da caracterização do material.

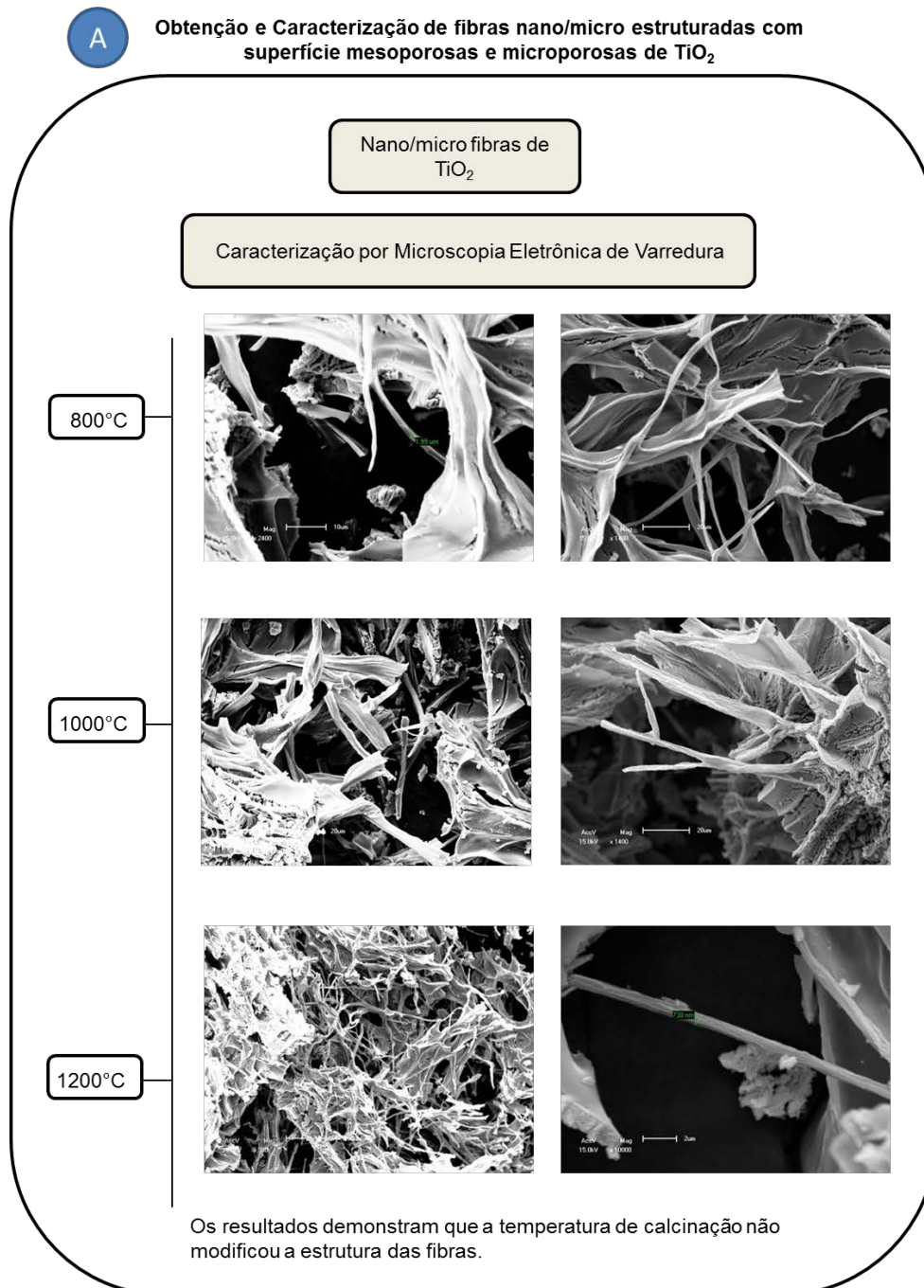
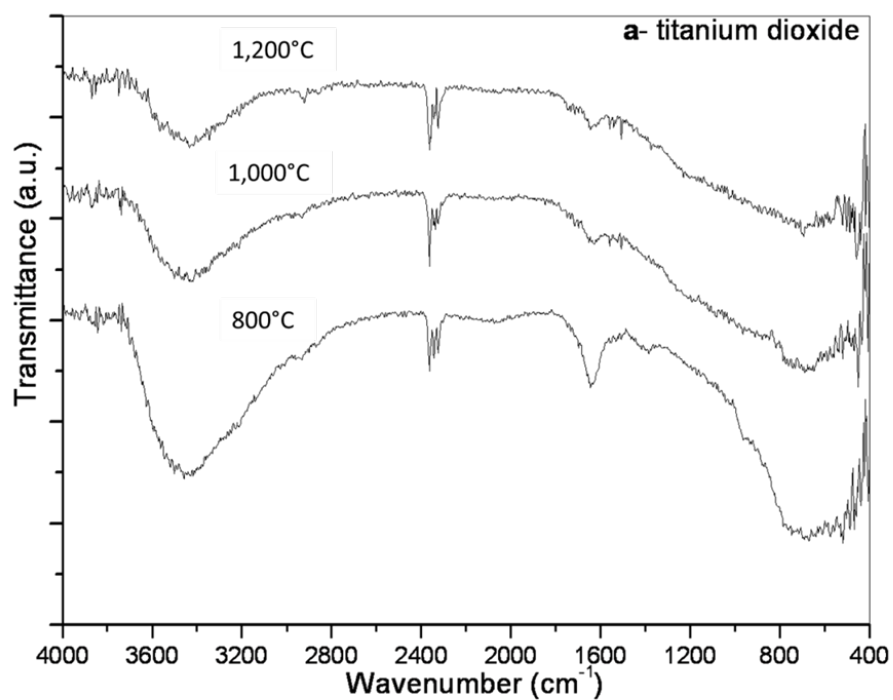


Figura 3: Caracterização das nano/micro fibras de dióxido de titânio (TiO_2) em diferentes temperaturas, através da Microscopia Eletrônica de Varredura.

A

Obtenção e Caracterização de fibras nano/micro estruturadas com superfície mesoporosas e microporosas de TiO_2 Nano/micro fibras de
 TiO_2

Caracterização por Infra Vermelho



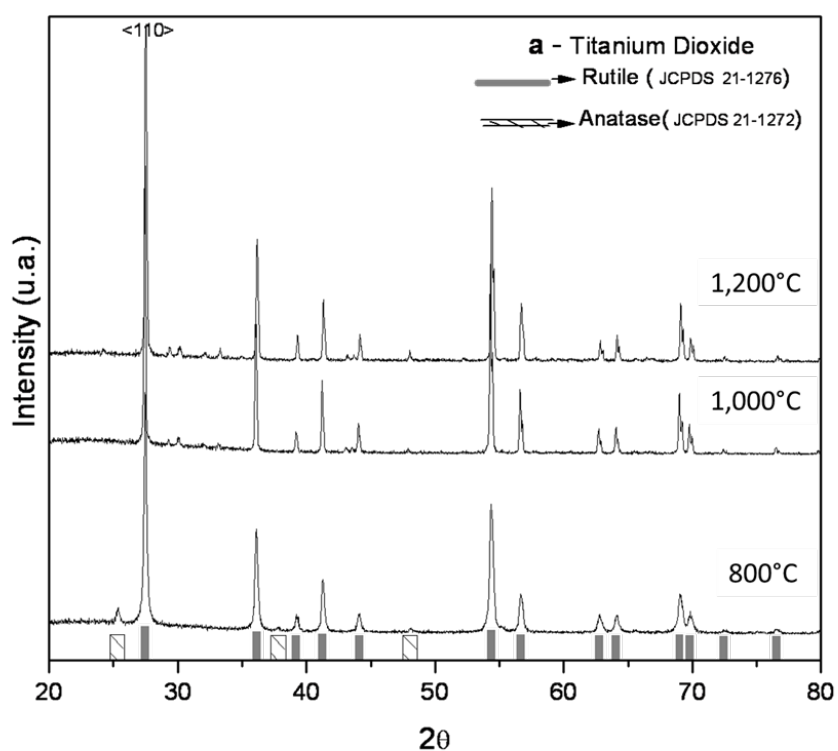
Os resultados demonstram que o Dióxido de Titânio está presente na amostra em todas as temperaturas de calcinação.

Figura 4: Caracterização das nano/microfibras de dióxido de titânio (TiO_2) em diferentes temperaturas, através Infra Vermelho.

A

Obtenção e Caracterização de fibras nano/micro estruturadas com superfície mesoporosas e microporosas de TiO_2 Nano/micro fibras de
 TiO_2

Caracterização por Difração de Raio X



Os resultados demonstram que o Dióxido de Titânio está presente na amostra em todas as temperaturas de calcinação, entretanto a 1200°C o resultado apresenta uma melhor leitura.

Figura 5: Caracterização das nano/micro fibras de dióxido de titânio (TiO_2) em diferentes temperaturas, através da Difração de Raio X.



Obtenção e Caracterização de fibras nano/micro estruturadas de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

MATERIAIS:

Nitrato de Cálcio - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (SYNTH LTDA)

Fosfato de Amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (SYNTH LTDA)

Ácido Cítrico - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (SYNTH LTDA)

EtilenoGlicol - $\text{OHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (SYNTH LTDA)

Água Destilada - H_2O

METODOLOGIA:

Obedecendo a razão de 4 mols de ácido para 1 mol de metal, o ácido cítrico foi pesado em uma balança de precisão (38,3397 gramas), misturado a 100ml de água destilada até sua homogeneização, formando a solução A. O nitrato de cálcio foi pesado (11,8075 gramas) e o fosfato de amônio (3,9618 gramas), ambos adicionados sobre agitação a solução A, até completa homogeneização formando a solução B. Em seguida adicionou-se a ela o etileno glicol (25,5598 gramas), obedecendo a razão 40% etileno glicol/60% ácido cítrico (m/m), sob agitação até completa homogeneização sob temperatura de 45°C, formando a solução C final, ou seja, a resina pronta para ser impregnada sobre a fibra orgânica.

A impregnação da resina na fibra orgânica, foi feita com o auxílio de uma pipeta, gotejando-a uniformemente sobre a fibra, a fibra foi elevada em um suporte com papel filtro, fazendo com que através da gravidade o excesso da resina pudesse ser retirado.

Depois de retirado o excesso, a fibra foi secada em estufa a 90°C por 8h, posteriormente levada a uma mufla e calcinada a 800°C, 1000°C e 1200 °C por 5h, obtendo as nano/micro fibras de Hidroxiapatita.

CARACTERIZAÇÃO:

As nano/micro fibras foram caracterizadas da seguinte forma:

- Microscópio eletrônico de Varredura (Shimadzu SSX-550 – Japão): as amostras foram levadas ao MEV, metalizadas sob o stub e as micrografias realizadas.
- Infra vermelho (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, IRPrestige-21, Shimadzu): As amostras foram compactadas com Nujol e levadas ao infra vermelho,.
- Raio X (XRD, Shimadzu, model XRD-6000): As amostras foram colocadas até o preenchimento do orifício do porta amostra, ficando nivelada com a parte superior do mesmo.

O Fluxograma abaixo (Figura 6) demonstra os passos realizados para a fabricação das nano/micro fibras de Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

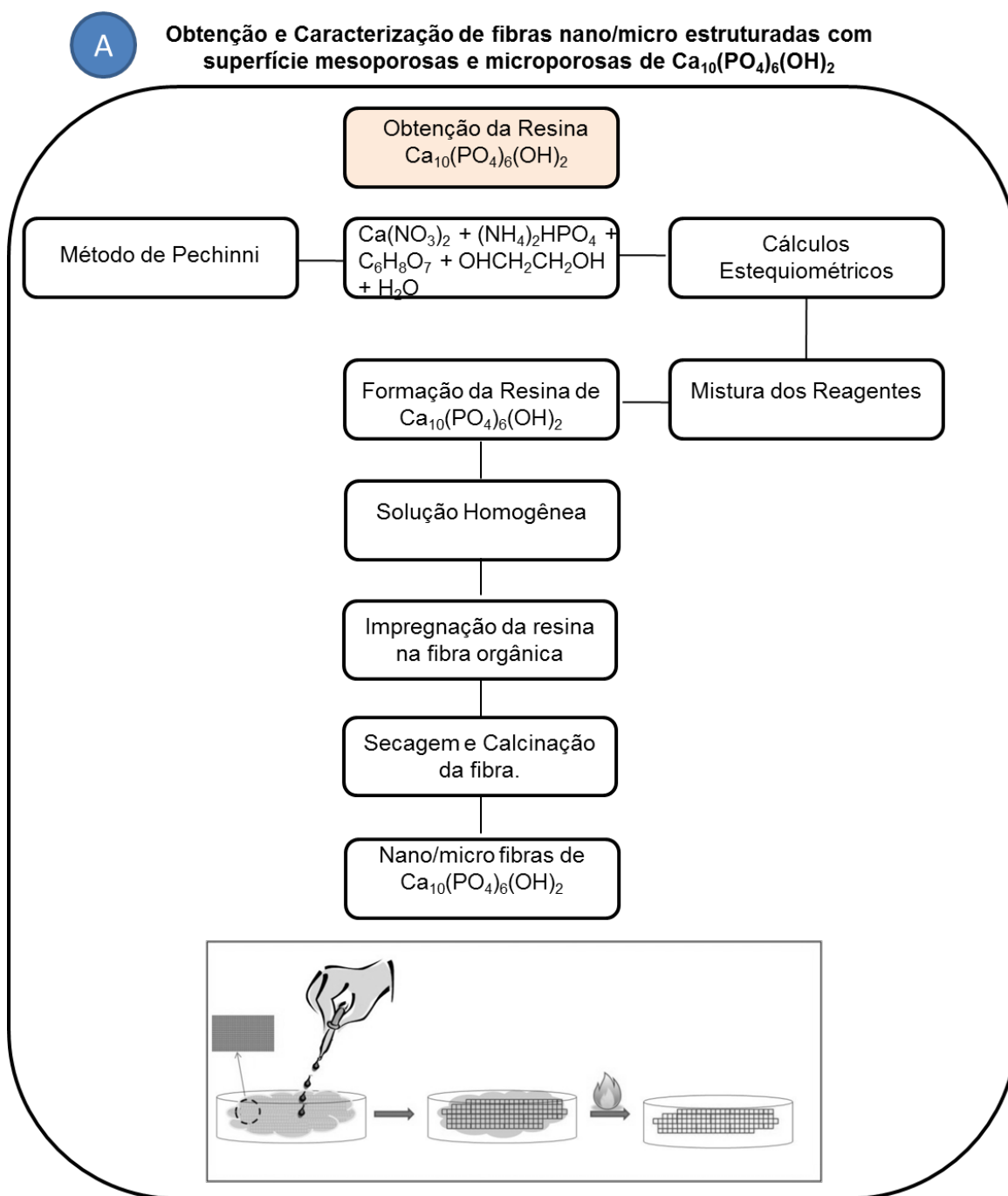


Figura 6: Fluxograma que demonstra os procedimentos realizados no processo de obtenção e caracterização da resina $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para impregnação na fibra orgânica e obtenção das nano/micro fibras estruturadas com superfícies mesoporosas e microporosas.

As imagens abaixo (Figura 7,8 e 9) representam os resultados da caracterização do material.

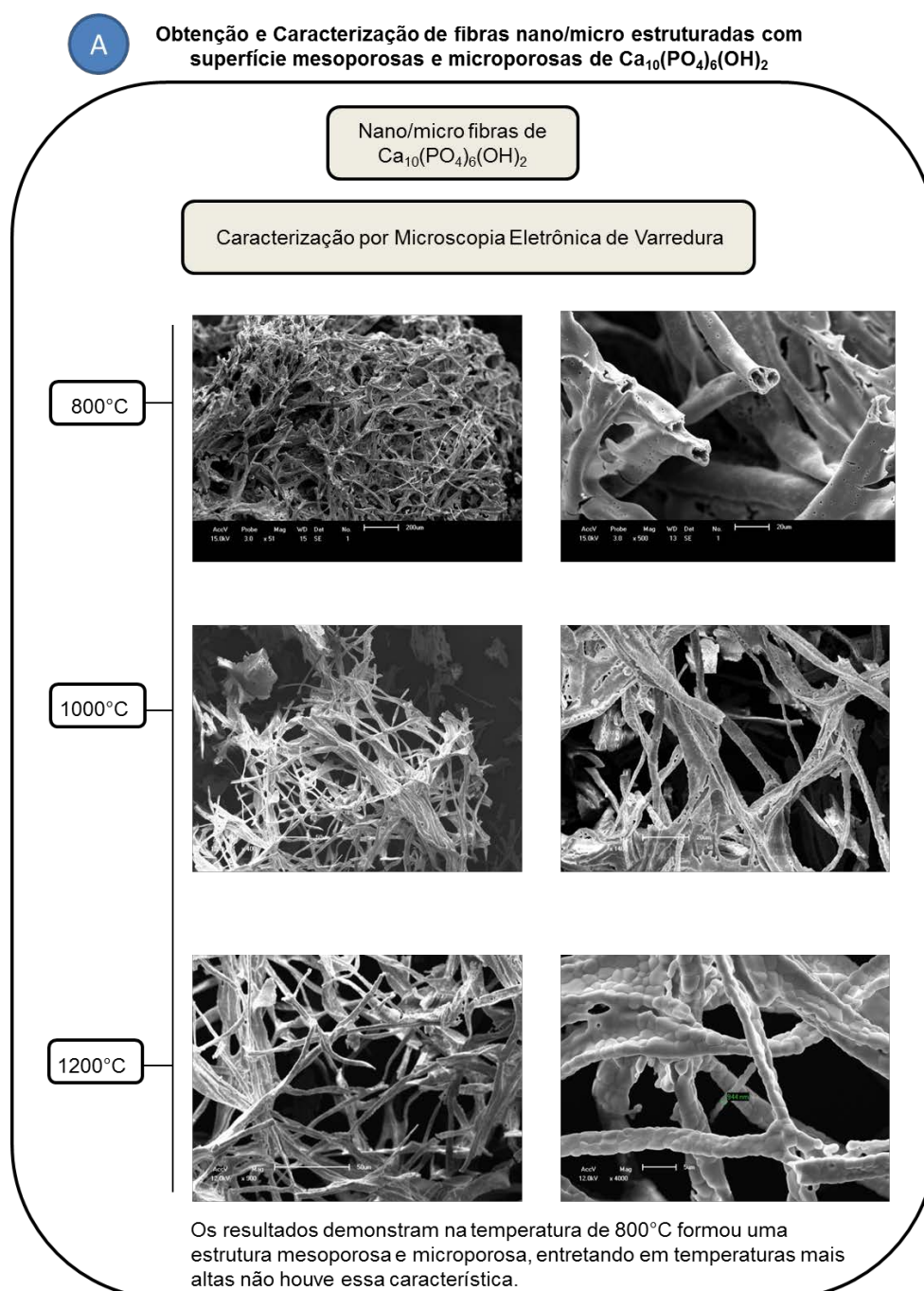


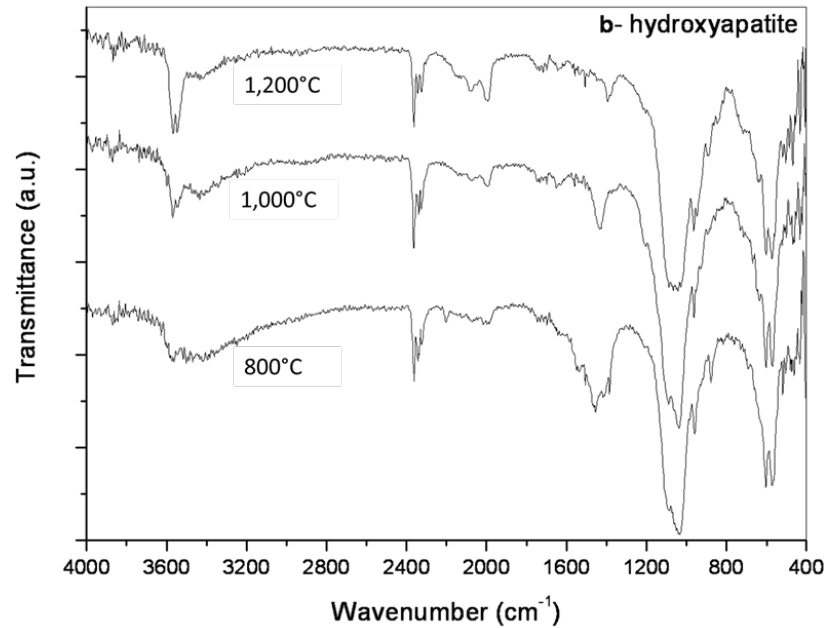
Figura 7: Caracterização das nano/micro fibras de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ em diferentes temperaturas, através da Microscopia Eletrônica de Varredura.

A

Obtenção e Caracterização de fibras nano/micro estruturadas com superfície mesoporosa e microporosa de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Nano/micro fibras de
 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Caracterização por Infra Vermelho



Os resultados demonstram que a Hidroxiapatita esta presente na amostra em todas as temperaturas de calcinação.

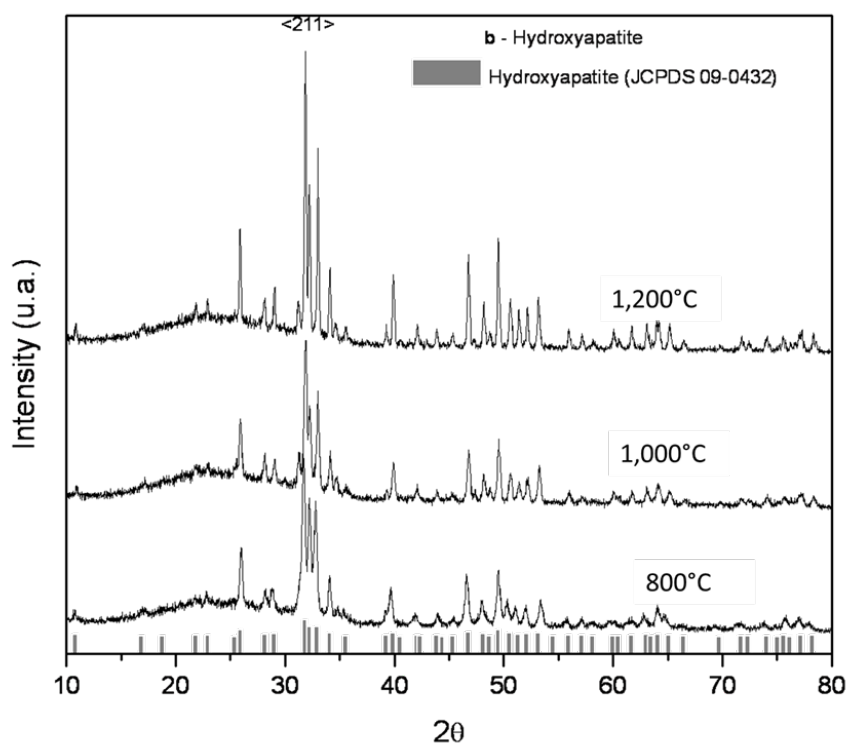
Figura 8: Caracterização das nano/micro fibras de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ em diferentes temperaturas, através do Infra Vermelho.

A

Obtenção e Caracterização de fibras nano/micro estruturadas com superfície mesoporosa e microporosa de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Nano/micro fibras de
 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Caracterização por Difração de Raio X



Os resultados demonstram que a Hidroxiapatita esta presente na amostra em todas as temperaturas de calcinação, entretanto a 1200°C o resultado apresenta uma melhor leitura.

Figura 9: Caracterização das nano/micro fibras de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ em diferentes temperaturas, através Difração de Raio X.

Além das caracterizações discriminadas no fluxograma do projeto, foi realizado o teste de citotoxicidade das nano/micro fibras no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFPel.



Citotoxicidade das fibras nano/micro estruturadas com superfície mesoporosas e microporosas de TiO_2 e $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

MATERIAIS:

Células 3T3

DMEM - Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco PBS

SFB - soro fetal bovino

Penicilina (100 U/mL)

Estreptomicina (100 mg/mL)

Garrafas para cultivo celular.

Tripsina/EDTA 0,25%

PBS

MTT

Placa de 96 poços

METODOLOGIA:

As 3T3 foram cultivadas em meio DMEM (Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) em garrafas para cultivo celular. A garrafa foi incubada em uma estufa de CO_2 com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a 37°C , 95% de ar e 5% de CO_2 . Quando as células chegaram a subconfluência (80% de ocupação da área da garrafa de cultivo) foram lavadas com o meio SFB tampão fosfato salino com pH 7,2 e destacadas da garrafa com tripsina/EDTA 0,25%. Para a inativação da tripsina/EDTA, a solução DMEM e SFB foi adicionada em um volume no mínimo igual ao volume de tripsina/EDTA usado.

Em um tubo de 15 mL adicionou-se o conteúdo das garrafas e levou-se o mesmo para a centrífuga por 5 minutos com rotação de 1000 rpm, ocorrendo a precipitação celular no fundo do tubo (Pellet). O sobrenadante foi removido e

adicionado 5mL de meio DMEM a 10% de SFB para uma nova homogeneização das células e a contagem foi realizada na câmara de Neubauer utilizando 40µl do material.

Para o teste de citotoxicidade as nano/micro fibras de dióxido de titânio e hidroxiapatita foram preparadas em diferentes diluições variando entre 100 mM a 0,001 mM em meio de cultivo DMEM. Em uma placa de 96 poços os produtos foram incubados em contato com as células (2×10^4 células por poço) para a avaliação da citotoxicidade por 24h. A citotoxicidade foi mensurada fotometricamente através do teste colorimétrico MTT (540 nm). Os resultados foram submetidos à Análise de Variância de uma via, complementado com o teste Tukey de comparações múltiplas ($p < 0,05$). Foi possível observar que os materiais testados não apresentaram citotoxicidade quando comparados ao grupo controle (células sem exposição a produtos).

O Fluxograma abaixo (Figura 10) demonstra os passos realizados para o teste de Citotoxicidade, entretanto as amostras utilizadas para esse experimento foram as sintetizadas a 1200°C para ambas nano/micro fibras de Dióxido de Titânio (nfTD) e hidroxiapatita (nfHY).

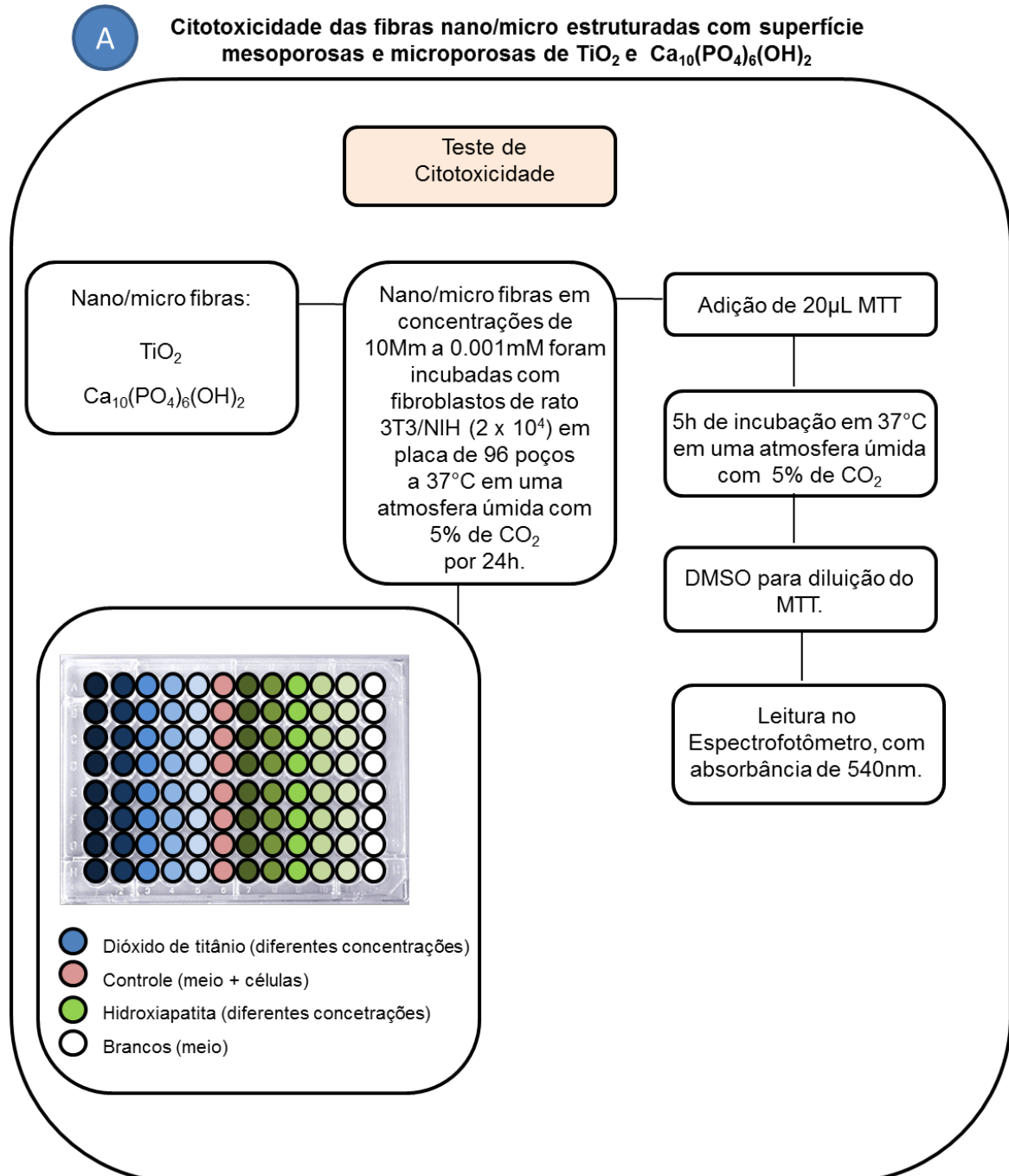


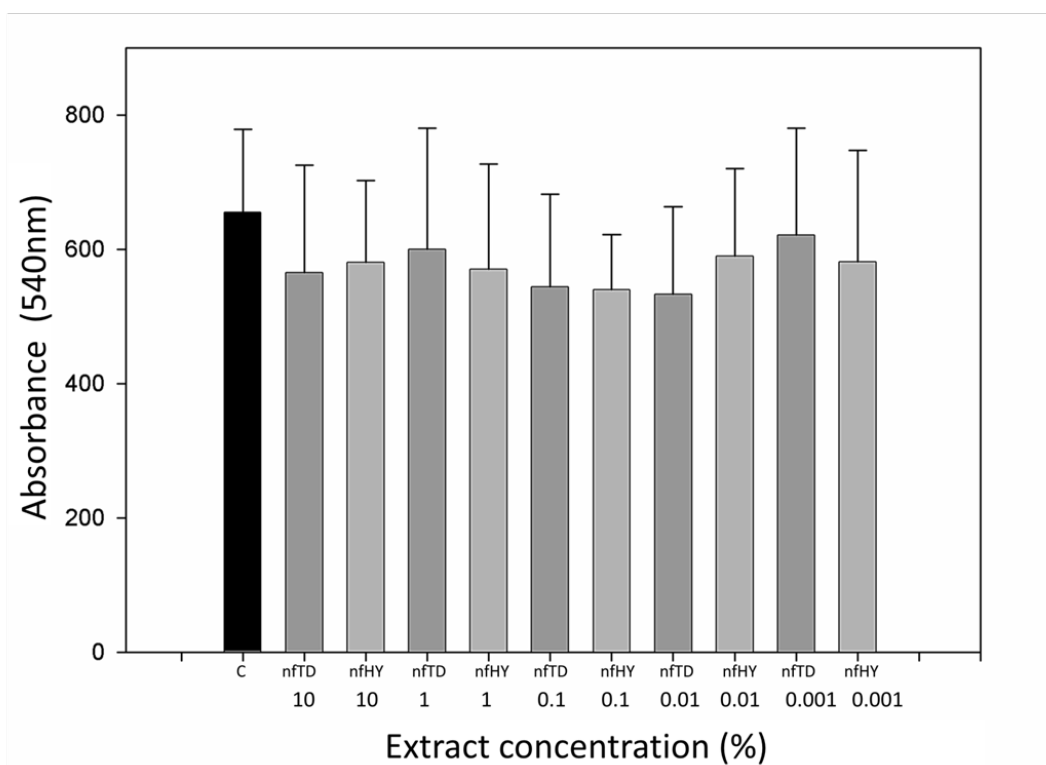
Figura 10: O fluxograma demonstra os procedimentos realizados no teste de citotoxicidade com as nano/micro de TiO_2 e $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

A figura abaixo (Figura 11) representa os resultados obtidos pelo teste de citotoxicidade das nano/micro fibras.

A

Obtenção e Caracterização de fibras nano/micro estruturadas com superfície mesoporosas e microporosas de TiO_2 e $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Teste de
Citotoxicidade



Foi possível observar que os materiais testados não apresentaram citotoxicidade quando comparados ao grupo controle (células sem exposição a produtos).

Figura 11: Teste de citotoxicidade com as nano/micro fibras de TiO_2 e $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ em diferentes concentrações.

Dando continuidade ao fluxograma do projeto no Item nº 1, temos a Obtenção do Hidrogel de Alginato.



Obtenção do Hidrogel de Alginato 2%

MATERIAIS:

Alginato de Sódio – $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ (VETEC QUÍMICA FINA LTDA).

Sulfato de Cálcio Dihidratado – $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (VETEC QUÍMICA FINA LTDA).

Água Deionizada – H_2O

Agitador Magnético e Barra Magnética Lisa de 7mm

Becker (250ml)

METODOLOGIA:

O alginato foi pesado em uma balança de precisão (2 gramas), em seguida colocado em um Becker. A água deionizada foi vertida no Becker lentamente com o agitador ligado até que completasse o volume desejado (80 ml) e deixado por mais uma hora para completa homogeneização da mistura, até chegar a temperatura de 40°C sendo chamada de mistura A.

O sulfato de cálcio foi pesado em uma balança de precisão (0,8 gramas) e colocado em um Becker e levado ao agitador magnético. A água deionizada foi vertida no Becker lentamente com o agitador magnético ligado até que completasse o volume desejado (20ml) e deixado por mais uma hora para completa homogeneização da mistura, sendo chamada de mistura B.

Após término de uma hora as duas soluções (A+B) foram vertidas em um novo Becker sobre o agitador magnético por mais 30 minutos, até formar uma solução homogenia (C). Obtendo-se 100 ml de hidrogel de alginato na concentração de 2%.

CARACTERIZAÇÃO:

O hidrogel de alginato 2% foi caracterizado da seguinte forma:

- Microscópio eletrônico de Varredura (Shimadzu SSX-550 - Japão): O Hidrogel foi dispensado em placas de petri com tamanho de 2mm de altura e 1 cm de diâmetro. Logo foram resfriados a -60°C por 24hs, em seguida levados ao liofilizador por mais 24hs. As amostras foram metalizadas sob o stub e as micrografias realizadas.
- Infra vermelho (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, IRPrestige-21, Shimadzu – Japão): Foi colocado 10mL do hidrogel de alginato em uma placa de petri, e levado a uma estufa a 50°C por 4h
- Raio X (XRD, Shimadzu, model XRD-6000 – Japão): o preparo das amostras foi realizado da mesma forma para leitura no Infra vermelho.
- Viscosímetro RV (Brookfield DV-II + Pro Viscometers -USA): 10 ml da amostras em gel foi levada para realizar a leitura em 60 RPM, Spindle S18 a 19°C.

O Fluxograma abaixo (Figura 12) demonstra os passos realizados para a fabricação do hidrogel de alginato.

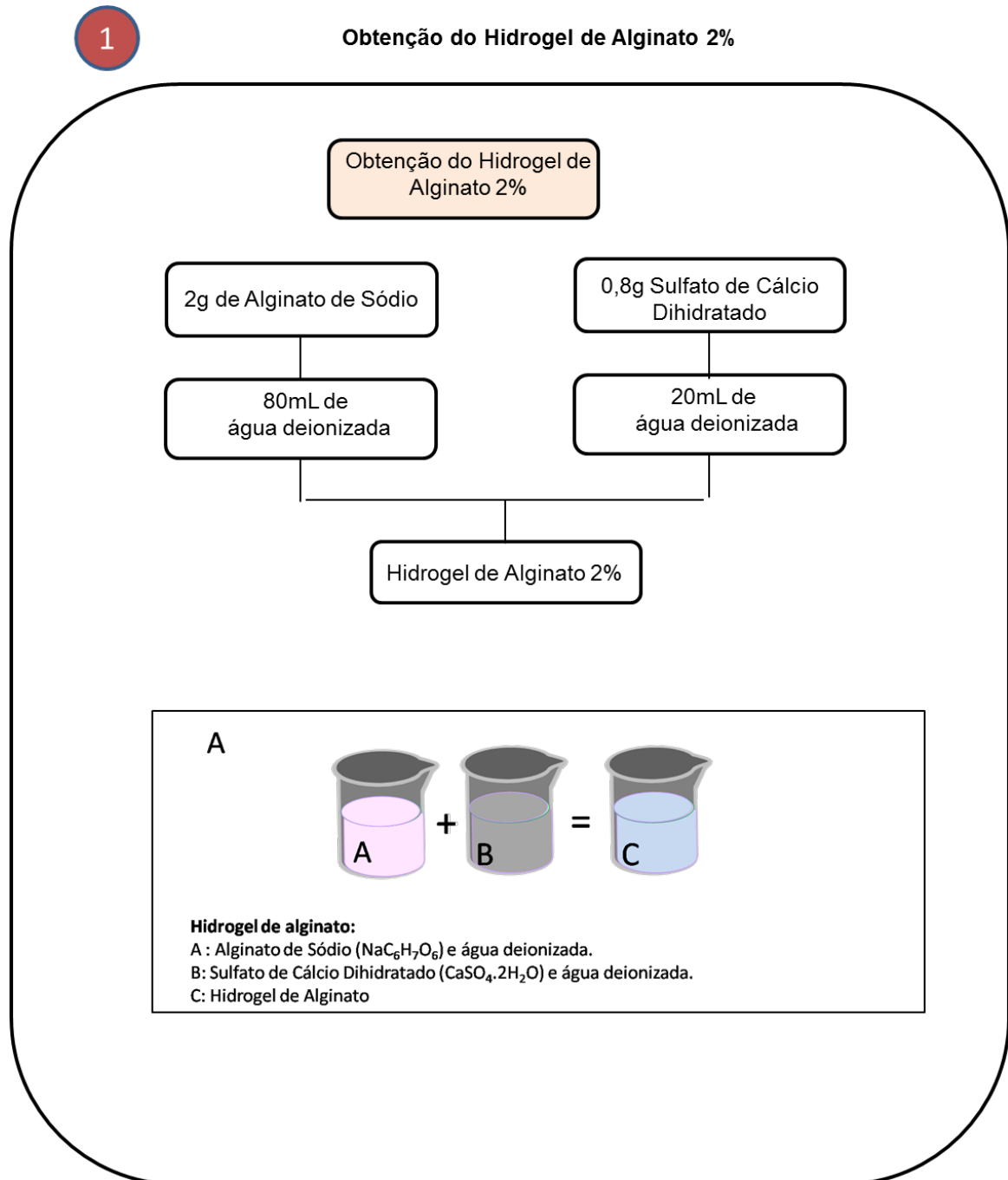


Figura 12: O fluxograma demonstra os procedimentos realizados para obtenção do Hidrogel de Alginato 2%.

A imagem abaixo representa o resultado da caracterização do material pelo Microscópio Eletrônico de Varredura. Os demais resultados se encontram nos gráficos e tabelas do hidrogel modificado com nano/micro fibras por motivos de comparação.

1

Obtenção do Hidrogel de Alginato 2%

Hidrogel de Alginato

Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura

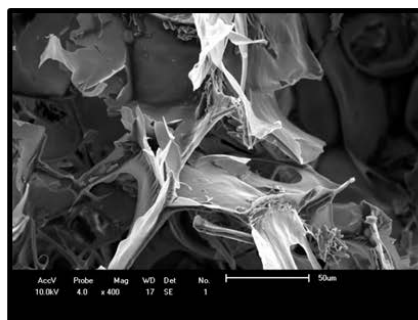
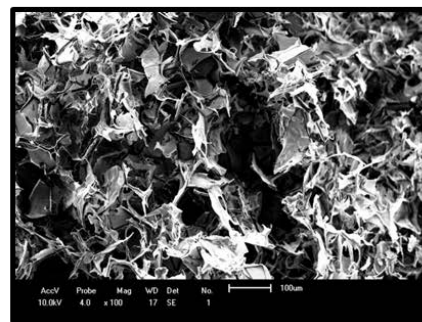
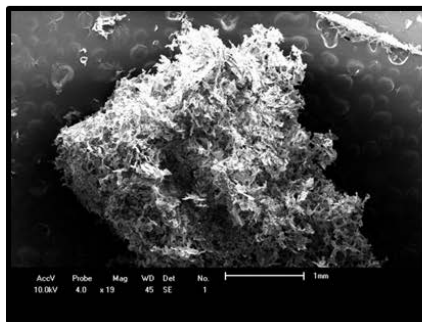


Figura 13: Caracterização da obtenção do Hidrogel de Alginato 2% através da Microscopia Eletrônica de Varredura.

No item nº 2 temos a modificação do hidrogel de alginato com nano/micro fibras de Dióxido de Titânio (nfTD) e Hidroxiapatita (nfHY).



Modificação do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras

MATERIAIS:

Nano/micro fibras de Dióxido de Titânio

Nano/micro fibras de Hidroxiapatita

Aagitador Magnético e Barra Magnética Lisa de 7mm

Becker (250ml)

METODOLOGIA:

Foram preparadas 3 amostras de hidrogel de alginato 2% (100ml), uma amostra é o grupo controle, e as outras duas foram adicionadas em cada uma delas as nano/micro fibras citadas acima.

Para cada amostra foi adicionado 0,07g de cada nano/micro fibra. As amostras foram levadas para o ultrassom aguardando-se um tempo de 15 minutos para que houvesse a mistura da solução de hidrogel com as nano/micro fibras obtendo-se então o Hidrogel de Alginato 2% com Dióxido de Titânio e o Hidrogel de Alginato 2% com Hidroxiapatita, ficando o Hidrogel de Alginato 2% como o grupo controle.

O Fluxograma abaixo (Figura 14) demonstra os passos realizados para a fabricação do hidrogel de alginato modificado com nano/micro fibras de dióxido de titânio (nfTD) e hidroxiapatita (nfHY).

2

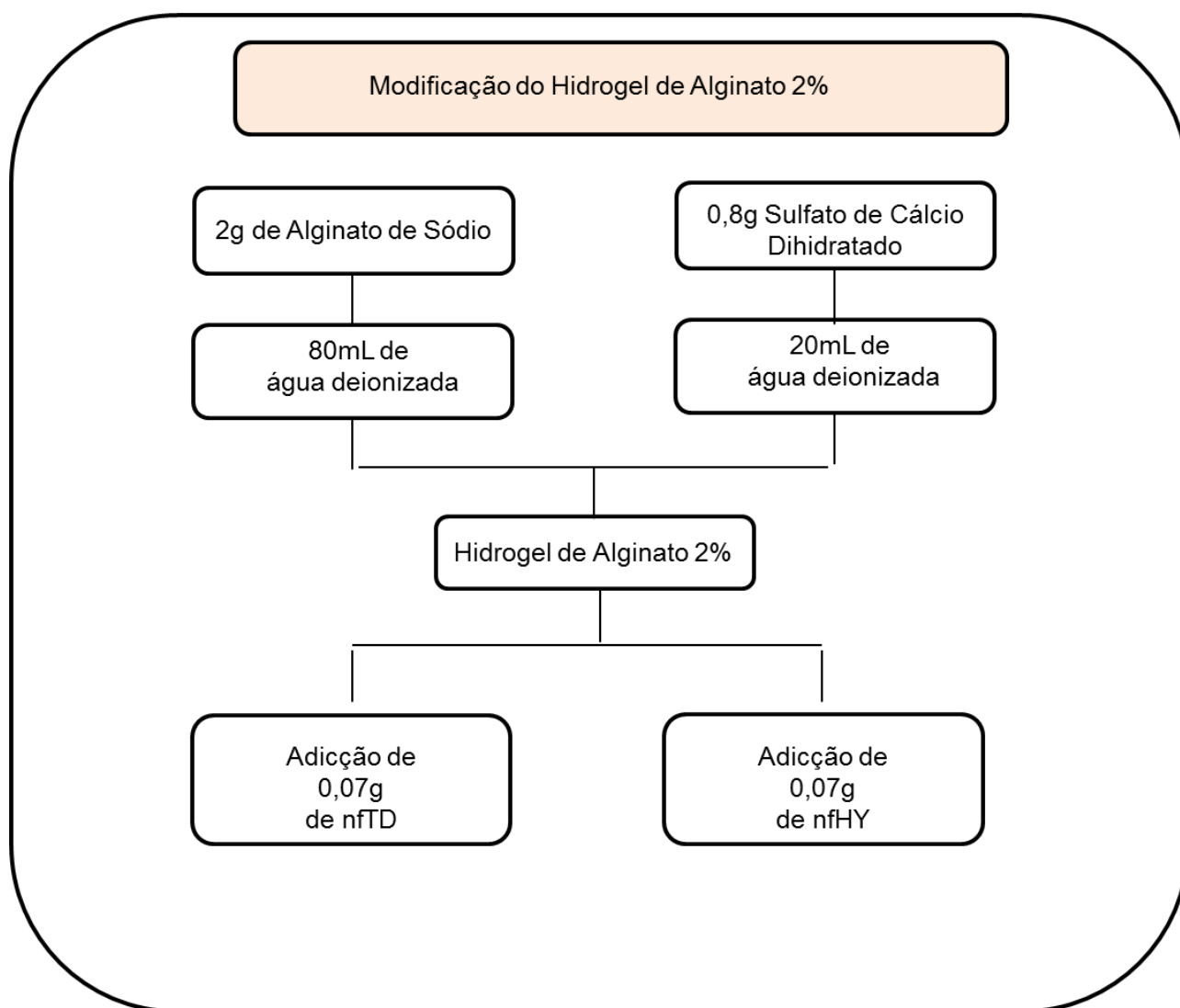
Modificação do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras

Figura 14: Fluxograma que demonstra os procedimentos realizados na modificação do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras.

A caracterização do hidrogel de alginato (item nº3) foi realizada da seguinte forma:

3

Caracterização do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras

- Microscópio eletrônico de Varredura (Shimadzu SSX-550 - Japão): O Hidrogel foi dispensado em placas de petri com tamanho de 2mm de altura e 1 cm de diâmetro. Logo foram resfriados a -60°C por 24hs, em seguida levados ao liofilizador por mais 24hs. As amostras foram metalizadas sob o stub e as micrografias realizadas.
- Infra vermelho (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, IRPrestige-21, Shimadzu – Japão): Foi colocado 10mL do hydrogel de alginato em uma palca de petri, e levado a uma estufa a 50°C por 4h.
- Raio X (XRD, Shimadzu, model XRD-6000 – Japão):o preparo das amostras foi realizado da mesma forma para leitura no Infra vermelho.
- EDX (EDX - Ray Ny - EDX 720, Shimadzu – Japão). As amostras foram liofilizadas da mesma forma para a leitura do MEV.
- Viscosímetro RV (Brookfield DV-II + Pro Viscometers - USA): 10 ml da amostras em gel foi levada para realizar a leitura em 60 RPM durante 3 minutos Spindle S18 a 25°C.

As imagens abaixo (Figura 15, 16, 17, 18 e 19) representam os resultados da caracterização do material não modificado e modificado.

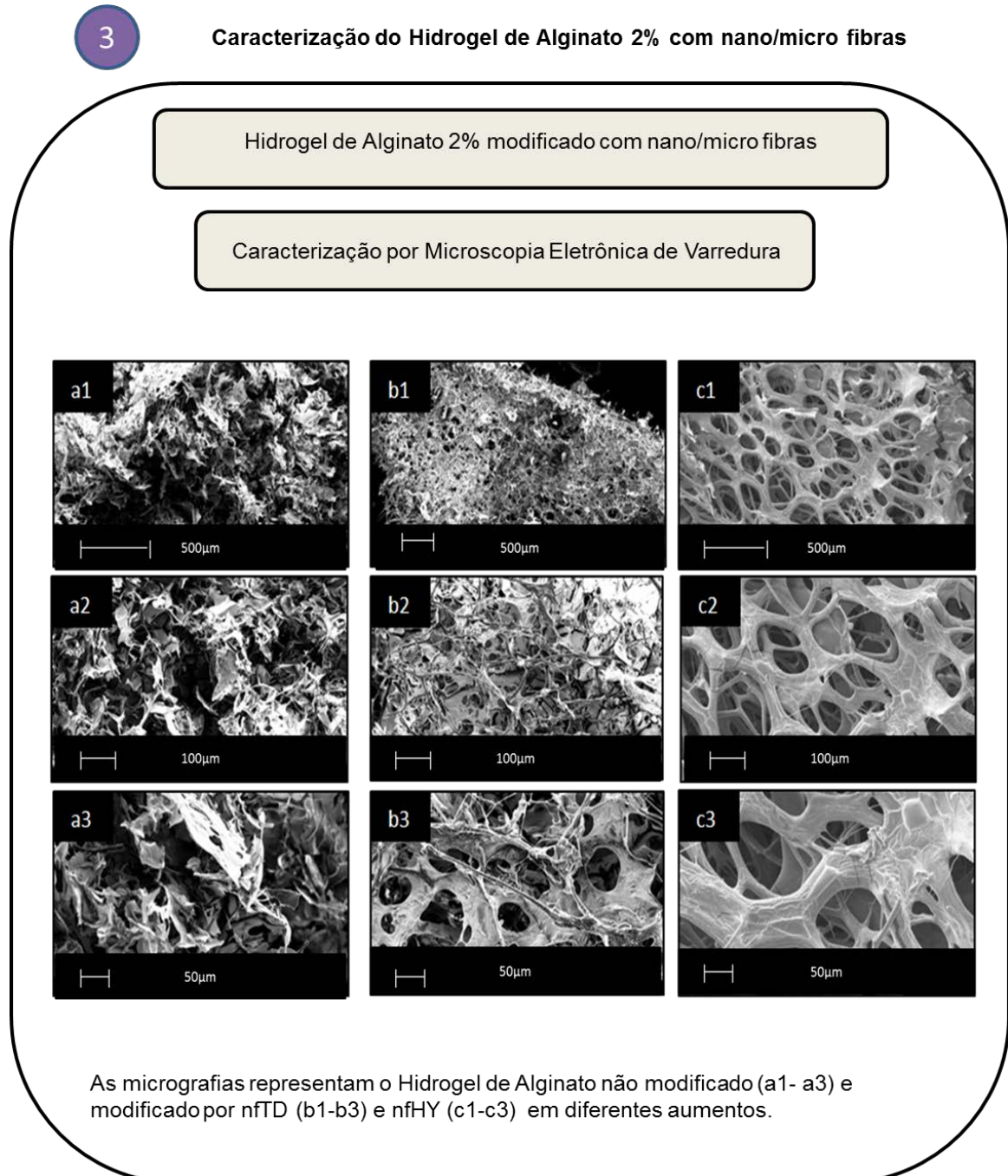


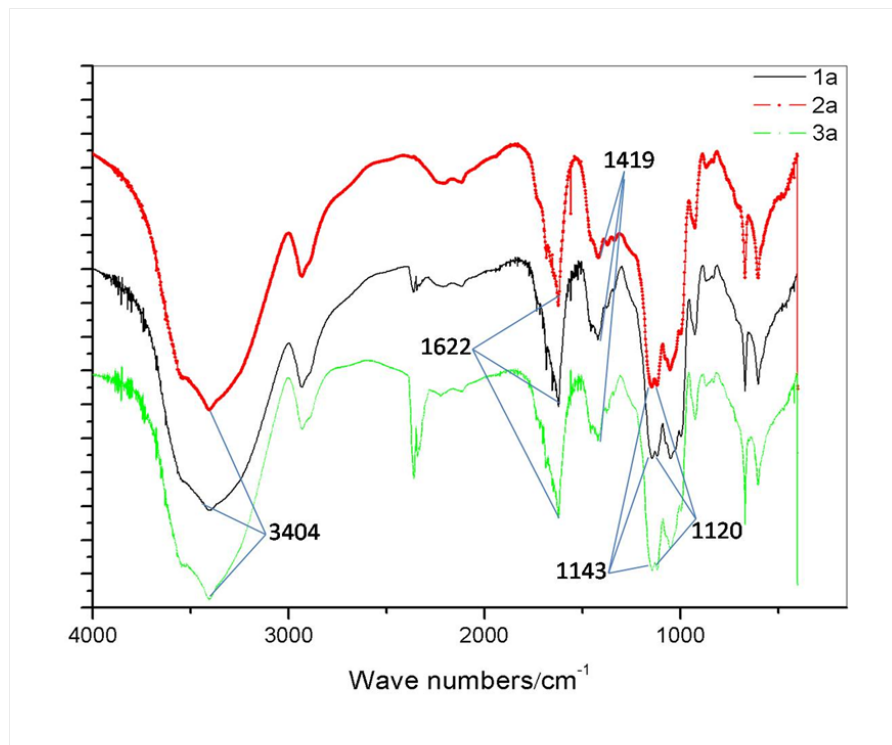
Figura 15: Caracterização da modificação do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras através da Microscopia Eletrônica de Varredura.

3

Caracterização do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras

Hidrogel de Alginato 2% modificado com nano/micro fibras

Caracterização por Infra Vermelho



Os resultados demonstram que o Hidrogel de Alginato manteve sua estrutura química quando combinado com as nano/micro fibras.

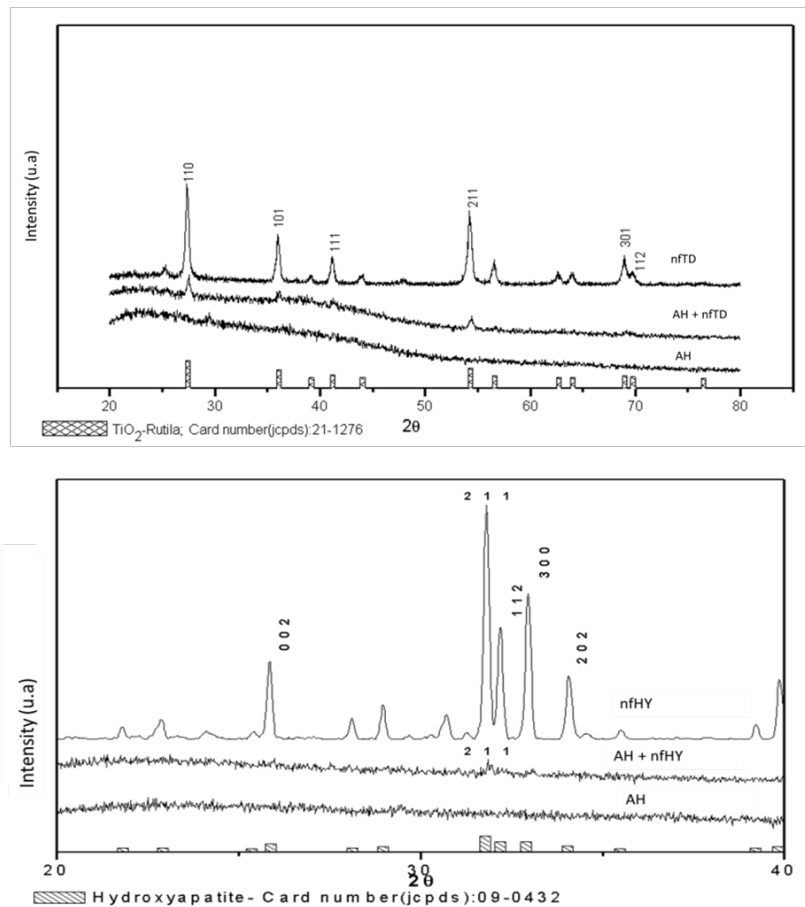
Figura 16: Caracterização da modificação do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras através do Infra Vermelho.

3

Caracterização do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras

Hidrogel de Alginato 2% modificado com nano/micro fibras

Caracterização por Difração de Raio X



Os resultados demonstram que as nano/micro fibras estão presentes no hidrogel de alginato.

Figura 17: Caracterização da modificação do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras através da Difração de Raio X.

3

Caracterização do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras

Hidrogel de Alginato 2% modificado com nano/micro fibras

Caracterização por EDX

1. Quantitative analyses of alginate hydrogel.				2. Quantitative analyses of alginate hydrogel combined with nano/micro ceramic fibers of titanium dioxide.			
Sample	Results	SD	Line analysis of X-ray	Sample	Results	SD	Line analysis of X-Ray
Ca	77,088%	0,232	Ca Ka	Ca	62,310%	0,113	Ca Ka
S	20,758%	0,101	S Ka	S	26,051%	0,046	S Ka
P	1,209%	0,060	P Ka	Ti	10,438%	0,031	Ti Ka
Fe	0,573%	0,036	Fe Ka	P	1,028%	0,019	P Ka
Cu	0,372%	0,024	Cu Ka	K	0,173%	0,011	K Ka

3. Quantitative analyses of alginate hydrogel combined with nano/micro ceramic fibers of hydroxyapatite.			
Sample	Results	SD	Line analysis of X-Ray
Ca	77,548%	0,072	Ca Ka
S	11,309%	0,019	S Ka
P	10,439%	0,024	P Ka
Si	0,346%	0,012	Si Ka
K	0,249%	0,009	K Ka
Fe	0,109%	0,003	Fe Ka

Os resultados demonstram a porcentagem dos elementos presentes no Hidrogel de Alginato e no Hidrogel de Alginato modificado pelas nano/micro fibras.

Figura 18: Análise quantitativa de EDX dos elementos presentes no Hidrogel de Alginato não modificado e modificado pelas nano/micro fibras.

3

Caracterização do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras

Hidrogel de Alginato 2% modificado com nano/micro fibras

Viscosidade

Tabela I. Viscosidade do hidrogel de alginato combinado com nano/micro fibras em condições similares.

Amostras	Temperatura (°C)	Viscosidade (mPa.s)
Hidrogel de Alginato	25°C	822,4
Hidrogel de Alginato/TiO ₂	25°C	847,9
Hidrogel de Alginato /Hydroxyapatite	25°C	948,1

Os resultados demonstram pouca variação da viscosidade entre as amostra.

Figura 19: Resultados da vicosidade obtida do Hidrogel de Alginato não modificado e modificado pelas nano/micro fibras.

Além das caracterizações descritas no item nº3 do projeto, foi realizado o teste de viabilidade e proliferação celular com o Hidrogel de Alginato e com o Hidrogel de Alginato modificado com as nano/micro fibras no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFPel.

MATERIAIS:

Células 3T3

DMEM - Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco PBS

SFB - soro fetal bovino

Penicilina (100 U/mL)

Estreptomicina (100 mg/mL)

Garrafas para cultivo celular.

Tripsina/EDTA 0,25%

PBS

WST1

Placa de 96 poços

METODOLOGIA:

As células foram cultivadas conforme o experimento de citotoxicidade das nano/micro fibras.

Para o teste de viabilidade e proliferação celular 100µL do Hidrogel de Alginato modificado e não modificado foi colocado na placa de 96 poços e esterilizado em Ultra Violeta por 40 minutos. Logo 100µL de células (2×10^4) foi colocada junto ao material e incubados por 3h, 6h, 24 e 48h. A viabilidade e proliferação celular foi mensurada fotometricamente através do teste WST1 em uma absorbância de 450 nm. Os resultados foram submetidos à Análise de Variância de uma via, complementado com o teste Tukey de comparações múltiplas ($p < 0,05$). Foi possível observar que os materiais testados não apresentaram citotoxicidade quando comparados ao grupo controle (células sem exposição a produtos).

O Fluxograma abaixo (Figura 20) demonstra os passos realizados para o teste de viabilidade e proliferação celular.

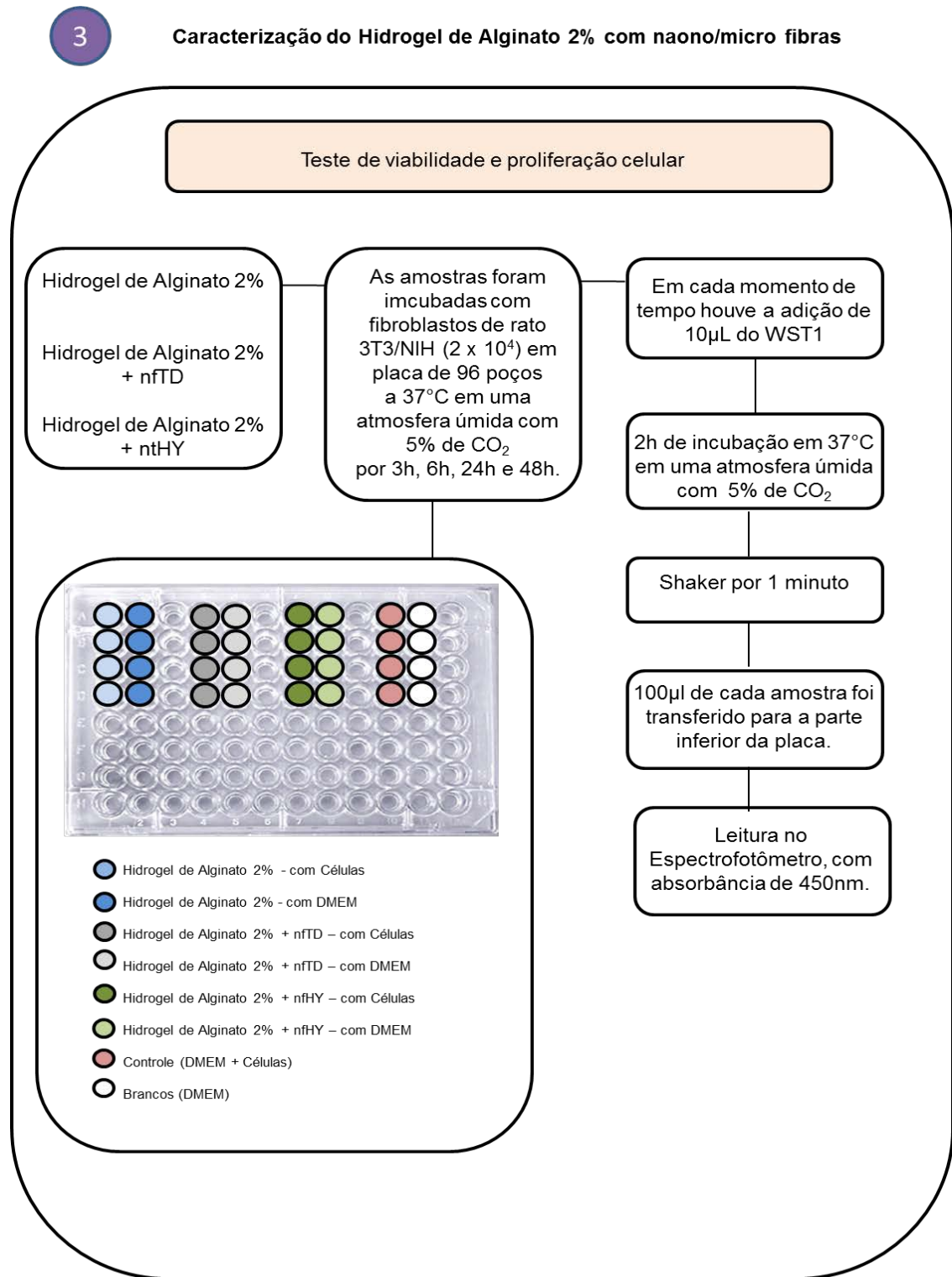


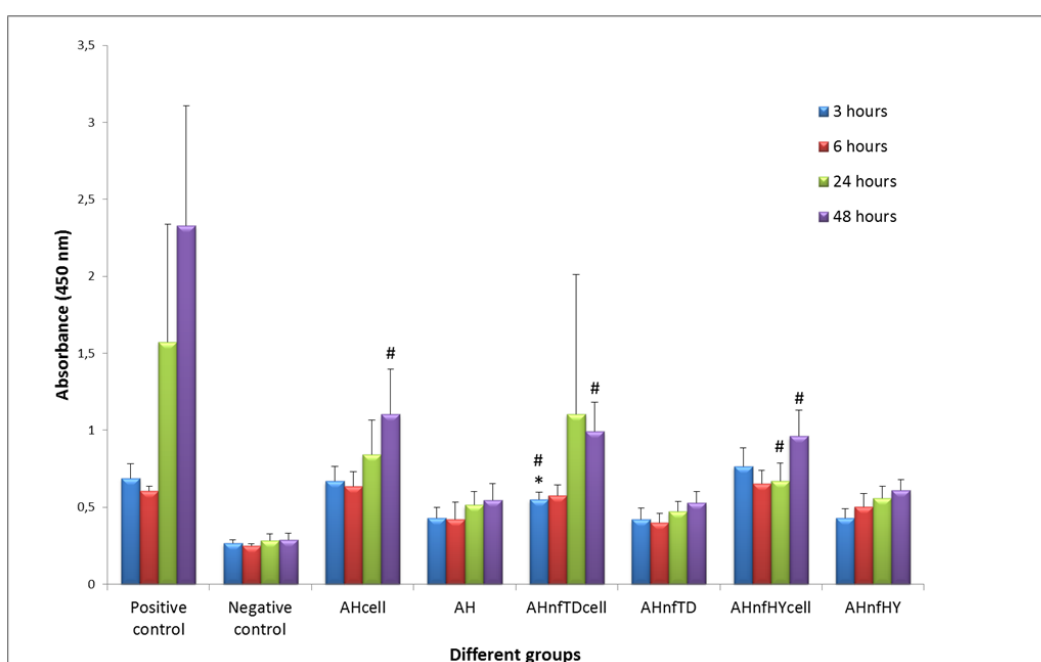
Figura 20: Teste de viabilidade e proliferação celular do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras.

A figura abaixo (Figura 21) representa os resultados obtidos pelo teste de viabilidade e proliferação celular do Hidrogel de Alginato não modificado e modificado com nfTD e nfHY.

3

Caracterização do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras

Teste de viabilidade e proliferação celular



* $p < 0,05$ em comparação com Hidrogel de Alginato com células.

$p < 0,05$ em comparação com grupo controle (células).

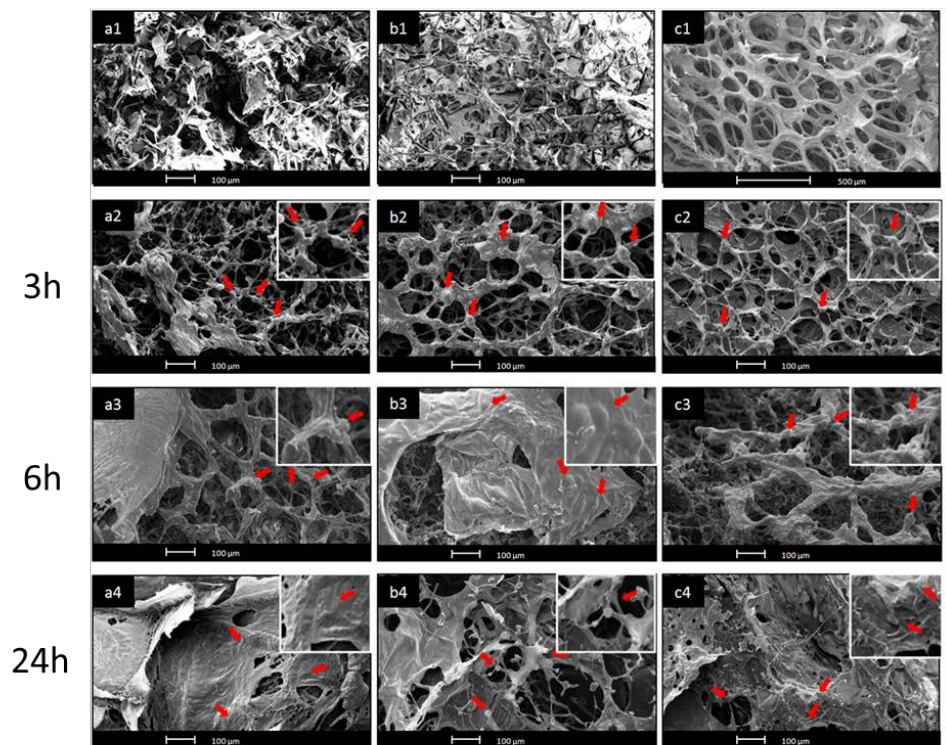
Figura 21: Teste de viabilidade e proliferação celular do Hidrogel de Alginato (HAccl) e Hidrogel de Alginato modificado com nfTD (AHnfTDcell) e com nfHY (AHnfHYcell) e seus respectivos controles (sem células), além do controle positivo (apenas células) e controle negativo (apenas DMEM) em diferentes intervalos de tempo (3, 6, 24 e 48h).

Dando continuidade aos experimentos, com o auxílio do MEV registramos o crescimento e proliferação celular no hidrogel de alginato e no hidrogel de alginato modificado, em 3h, 6h e 24h (Figura 22). Para leitura no MEV as amostras foram preparadas em placas de 24 poços, congeladas a -80°C e liofilizadas por 24h.

3

Caracterização do Hidrogel de Alginato 2% com nano/micro fibras

Crescimento e proliferação celular através de MEV



As micrografias representam a adesão e proliferação celular (setas) no Hidrogel de Alginato (a2-4), no AH modificado com nFTD (b2-4) e do AH modificado com nFHY (c2-4).

Figura 22: Microscopia para visualização da adesão e proliferação celular (setas) no Hidrogel de Alginato não modificado e modificado com nano/micro fibras em um período de 3,6 e 24h.

JUSTIFICATIVA

A continuidade do desenvolvimento da pesquisa conforme o fluxograma do projeto (item nº 4) não foi possível perante às dificuldades encontradas durante o desenvolvimento do mesmo. Para a caracterização dos materiais houve atraso na chegada de reagentes e equipamentos devido a demora na entrega e a dificuldade da importação dos mesmos. Para o desenvolvimento dos testes *in vitro* também houve atraso na implementação do laboratório visto que houve atraso na entrega de materiais, reagentes e células.

Sendo assim optou-se pela melhor caracterização do material, e também ensaios *in vitro* com fibroblastos de rato para testes de citotoxicidade dos mesmos.

Seguindo as normas do colegiado em relação ao prazo estipulado para cumprimento da defesa da Tese, o projeto entrou em fase final antecipadamente ao que foi aprovado pela banca de qualificação.



3. Artigo 1 *

Título: Nano/micro ceramic fibers combined scaffold: analysis of physical and biological properties for tissue engineering applications.

Bianca Palma Santana¹♦, Gian Francesco dos Reis Paganotto², Fernanda Nedel³, Evandro Piva¹, Rodrigo Varella de Carvalho⁴, Flávio Fernando Demarco¹, Neftali Lenin Villarreal Carreño².

¹Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Odontologia, RS, Brazil.

²Universidade Federal de Pelotas. Engenharia de Materiais, RS, Brazil.

³Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, RS, Brazil

⁴Universidade Norte do Paraná, PR, Brazil.

♦ Corresponding author at: Biomaterials Development and Control Center (CDC-Bio), School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil. CEP: 96015-560. Tel/Fax: + 55-53-3222-6690

E-mail: biancapalmasantana@hotmail.com (Bianca Santana)

*** Artigo formatado segundo normas do periódico Journal of Biomedical Materials Research Part A.**

3.1 Abstract

Alginate hydrogel (AH) has been used for different purposes, including tissue engineering, but there is an ongoing effort to overcome the limitations of the material. The inclusion of nanofibers in the hydrogel and having biotemplate that mimics the nature could be an interesting approach. In this study, we have showed a method to obtain nano/micro fibers of Titanium (nfTD) and Hydroxyapatite (nfHY) using cotton as biotemplate. The obtained fibers were incorporated in the alginate hydrogel and observed the mechanical characteristics and the biological response to these reinforced materials. We could verify that the nanofibers produced resemble the structure of the fibers in the natural collagen, without cell toxicity. The incorporation of nfTD or nfHY to the AH, has not increased the viscosity of the hydrogel, demonstrating also to be a feasible method to produce and scaffold with improved physical characteristics, such as higher porosities, which seemed to produce an enhanced environment for cell adhesion and proliferation. The findings of our study show that we have produced a promising material for biological application, especially as a injectable scaffold for tissue engineering approaches.

Keywords: tissue engineering, alginate hydrogel, scaffolds, titanium, hydroxyapatite.

3.2 Introduction

Tissue engineering is an emerging interdisciplinary science, aiming to develop different strategies for regeneration of damaged organs and tissues, relying on the principles of engineering and life sciences [1]. The interplay of three essential components scaffolds, responsive cells, and morphogens, constitute the grounding for this field [1, 2].

Scaffolds are substitutes for extracellular matrix, serving as a 3-D framework for cells during a limited period of time, providing an environment in which cell migration and proliferation can occur. Scaffolds can be built in different pre-determined shapes and composition and natural and synthetic polymers have been used for scaffold fabrication, synthetic polymers provide a better control of physicochemical properties, including degradation rate, microstructure, and mechanical strength [3]. On the other hand, natural polymer is advantageous once they contain information (*e.g.* amino acid sequences) that facilitates cell attachment or maintenance of differentiated function [1].

Different physic and mechanical properties of scaffolds, including the shape and size of pores, rate of porosity, and interconnectivity, play a pivotal role in cell behavior and in tissue formation [3, 4]. In addition, scaffolds should not be only a framework where cells will attach and proliferate, but it can also be functionalized with bioactive molecules, such as growth factors, to orientate cell differentiation, guide tissue formation or network vessel development [5].

In relation to natural polymers, alginate hydrogel (AH) is an attractive form of biomaterial, disclosing biological properties, like biocompatibility and bioactivity, derived from their chemical composition, morphology, and structure. These hydrogel may be used like beads or gel absorb water and swell readily without dissolving [6]. In recent years, AH have found applications in medicine [7], pharmacology [8], biological science [9], dentistry [10], and they have been used in a large scale in Tissue Engineering (TE) [11-15].

Recently, it has been demonstrated that nano/micro fibers combined scaffolds could produce an impact on the development of new tissues. Their innovative structure with a nano-network closely resembles the extracellular matrix, improving cell adhesion. The micro-fiber mesh also provides the mechanical support, with favorable pore size formation, controlled pore format and increased interconnectivity of the 3D scaffolds, which are important parameters for cell survival, proliferation and secretion [16, 17].

Bio-templates have attracted interest to synthesize micro cellular ceramic materials [18], and biological materials such as cotton [19], wood [20], paper [21], bacteria [22], which are abundant, renewable and almost inexpensive could be used as templates, trying to mimic the nature while implementing new technology.

The incorporation of titanium dioxide (TD) and hydroxyapatite (HY) used in various sizes and shape, commercial or synthesized in laboratories, may improve the surface characteristics of 3D scaffolds, with higher porosities rate, more porous uniformity and higher interconnectivity [23].

Despite the promising results observed when using alginate hydrogel, the possibility to use a bio-template and incorporating nano/micro fibers could improve the perspectives of using AH in tissue engineering.

Here we evaluated a new methodology for synthesize titanium dioxide and hydroxyapatite based on precursor method, which allow the deposition of precursor solution in a natural template, then the fibers obtained by thermal treatment were combined with alginate hydrogel, and characterized, in order to observe the biologic properties of this material in tissue engineering.

3.3 Materials and Methods

In Figure 1, we have a flowchart of how the experiment was conducted.

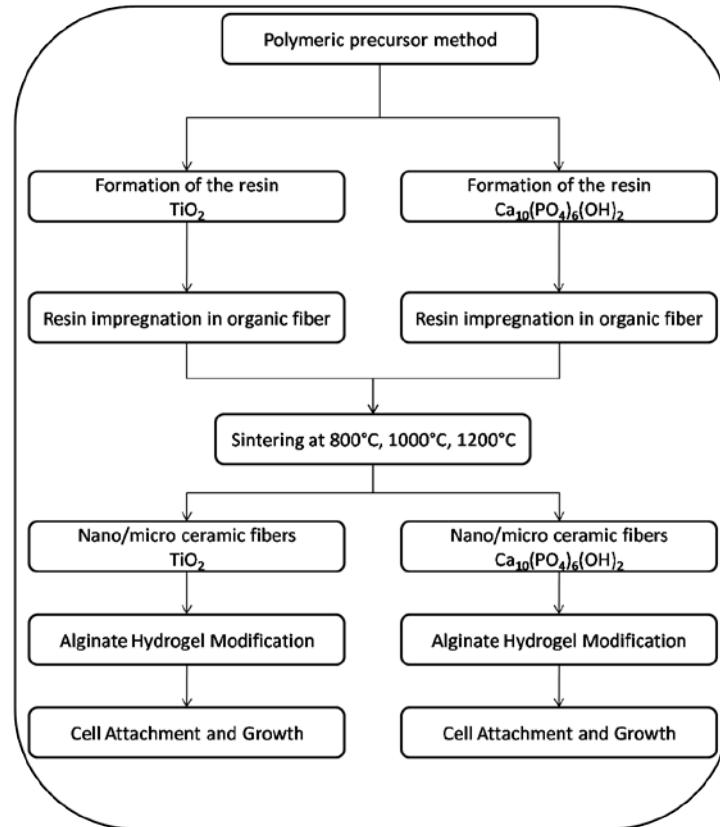


Figure 1. Flow Chart of the experiment steps for the fabricating of nfTD and nfHY ceramics by the biotemplating process, alginate hydrogel modification and cell attachment and growth.

Preparation of titanium dioxide resin and fibers

The resin preparation of titanium dioxide (TD) was synthesized by polymeric precursor method based in others researches [24].

The ratio of 3 moles of acid to 1mole of metal was set. Citric acid was used on a 57.64g mass and mixed with 45mL of distilled water until homogenization, forming the solution A. The titanium isopropoxide was weighed (28.43g - or 29.91 mL) and mixed to solution A to form solution B. The solution B was stirred for 4h, than ethylene glycol (34.27 ml) was incorporated, obeying the reason 40% ethylene glycol/60% citric acid (m/w) under stirring

until homogenization. All mixtures were shaken at a temperature of 90°C, forming the final solution C, which was ready to be impregnated with the organic fiber. Cotton was selected as the bio-template material. The resin impregnation into the organic fiber (cotton) was made with the aid of a pipette, dripping evenly over the fiber (Figure 2), and cotton was fixed on a pedestal with a paper filter, so by gravity the excess of resin could be removed. After drawing the excess, the fiber was dried at 90°C for 2 hours, then taken to a furnace and calcined at thermal treatments (800°C, 1,000°C and 1,200°C) for 5 hours, respectively, obtaining the nano/micro fiber of titanium dioxide (nfTD).

Preparation of Hydroxyapatite resin and fibers

The resin preparation of hydroxyapatite (HY) was synthesized by polymeric precursor method follow the similar process of titanium dioxide fiber. The resin method is also described in literature [25].

The ratio of 4 moles of acid to 1mole of metal was prepared. Citric acid was weighed on a precision scale (38.34g), mixed with 100mL of distilled water until the homogenization to form the solution A. The calcium nitrate (11.80g) and ammonium phosphate (3.96g) were weighed and added on stirring to the solution, until homogeneous to form the solution B. Then it was added to ethylene glycol (25.56g), according to the ratio 40% ethylene glycol/60% citric acid (w/w) under stirring for homogenization, at a temperature of 45°C, forming the solution C, that was ready to be impregnated on the organic fiber (cotton). The impregnation of resin into the organic fiber was similar to previously described for titanium dioxide. After removing the excess, the fiber was kiln-dried at 90 ° C for 8h, then taken to a furnace and calcined at thermal treatments (800°C, 1,000°C and 1,200°C) for 5 hours, respectively, obtaining the nano /micro fibers of hydroxyapatite (nfHY).

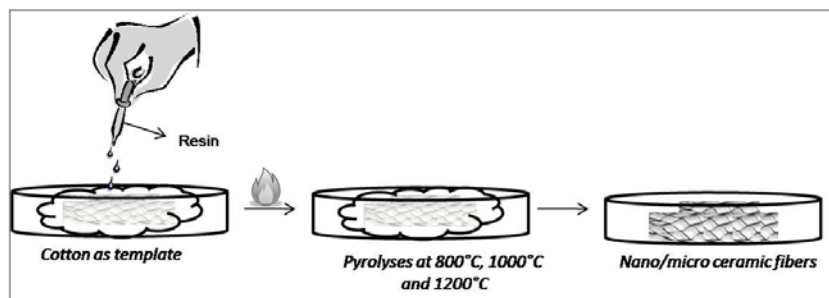


Figure 2. Schematic representation of the resin impregnation in organic fiber, pyrolysis at 800°C, 1,000°C, 1,200°C, and the nano/micro ceramic fibers obtaining.

FTIR spectroscopy

Infrared spectroscopy was used to characterize the structure of nano/micro fibers sintered at different temperatures. The infrared spectra were measured with an FTIR spectrophotometer (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, IRPrestige-21, Shimadzu). Each spectrum of samples was acquired via accumulation of 96 scans with a resolution of 4 cm⁻¹.

X-ray diffraction (XRD)

XRD patterns of fibers sintered at different temperatures were obtained by X-ray diffract meter (XRD, Shimadzu, model XRD-6000). The equipment uses the diffraction tube with copper target with a wavelength approximately equal to 1.54060 Å, with a power of 2kW, v30kV current of 30mA, and the analysis performed in the angle range from 20 to 80 degrees for nfTD, and from 10 to 80 for nfHY, at a speed of 1 degree/min in continuous scan.

Cytocompatibility Tests of nano/micro fibers

An immortalized mouse fibroblast cell line (3T3/NIH) was maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% L-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml) (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA). Mouse fibroblasts were maintained as a stock culture in DMEM and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air until subconfluency was reached. The nfTD and nfHY sintered at 1,200°C were prepared at different dilutions ranging from 10Mm to 0.001mM in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were incubated in a 96-well plate (2 x 10⁴ cells per well) in contact with the products for the evaluation of cytotoxicity for 24h at 37°C in a humidified atmosphere with 5% of CO₂. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) was used to assess cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity. After removing the products, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and then 180μL of medium added to 20 μL of MTT solution (5 mg of MTT/mL PBS) were added to each well. After 5h of incubation at 37°C in darkness the blue formazan precipitate was extracted from the mitochondria using 200 μL/well dimethyl sulfoxide (DMSO) on a shaker for 5 minutes at 150 rpm. The absorption was determined spectrophotometrically at 540nm. All experiments were carried out in triplicates. Data were submitted to one-way ANOVA and Tukey post-hoc tests, with p<0.05.

Morphological analysis

Nano/micro fibers

The nfTD and nfHY were crushed gently, gold-sputtered further on the structures and diameters were investigated using a scanning electron microscope (Shimadzu SSX-550 – Japan).

Hydrogel modification

Sodium alginate ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ —Vetec Química Fina Ltda) were dissolved in deionized water and mixed with calcium sulfate ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —Vetec Química Fina Ltda) forming the ionic cross-linking or the hydrogel (2% wt). The nano/micro fibers titanium dioxide and hydroxyapatite calcined at $1,200^\circ\text{C}$ were kept a constant concentration of 0.07% g/ml and they were added to the hydrogel under magnetic stirring.

The scaffold architecture before and after adding the nano/micro fibers were characterized using scanning electron microscopy (SEM). The hydrogel was placed in a 24-well plate, hydrogel samples with titanium dioxide and with hydroxyapatite were frozen in a refrigerator at -60°C for 24h, and lyophilized in freeze drier, then dry scaffold was coated with gold-sputtered and analyzed by SEM in 15kV.

Viscosity measurement

After being modified with the nano/micro fibers, the viscosity of hydrogel was measured by the Brookfield DV-II + Pro Viscometers (USA) with constant shear rate. The total volume measured was 10ml, the gel was placed in the rheometer and the rheological test lasted for tree minutes.

Attachment and proliferation of the cells in Hydrogel.

For the preliminaries studies about the attachment and proliferation of the cells, three replicas from all materials were incubated with 3T3 cells in a 24-well plate (2×10^4 cells per well) during 3, 6 and 24 hours. After incubation period, cell/hydrogel constructs were prepared using a freezing and lyophilizing method [26]. The 24-well cell/hydrogel scaffold was freezing at -20°C for 3h, then at -80°C for 24h. The samples were then lyophilized by

freeze-drying (L101, Liobras, Brazil) for 24h. The dry cell/hydrogel was coated with gold and analyzed by SEM.

3.4 Results

FT-IR analysis

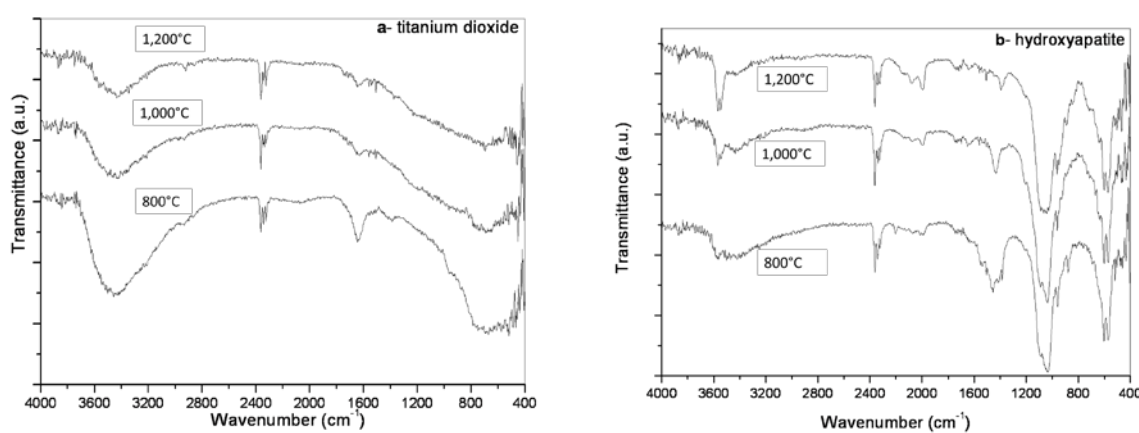


Figure 3. FTIR spectra of nfTD (a), nfHY (b).

The FTIR spectra of cotton-derived TD and HY ceramics sintered at 800°C, 1,000°C and 1,200°C for the specific times show in methodologies are given in Figure 3.

The FTIR for nfTD (Figure 3a) shows the spectra of different samples calcined in different temperatures. The peaks at about 1,620 and 3,400 cm^{-1} are attributed to adsorbed water molecules, band at 400-850 cm^{-1} corresponds to the Ti-O-Ti stretching vibration mode [27]. The peaks at about 3,000, 1,497 cm^{-1} are the C-H and C=C stretching vibration mode in aromatic ring, the peak at about 530 cm^{-1} results from the Ti-O in the TiO_2 lattice, the peaks at about 400 and 700 cm^{-1} are close related to the vibration mode of Ti-O in the rutile phase TiO_2 lattice [28].

For the nfHY (FIG. 3b.) was observed the stretch vibration of hydrogen bonded O-H groups in broad absorption band between 3,700 and 3,100 cm^{-1} , together with the absorption peak at 1,636 cm^{-1} . The characteristic stretching and vibrational modes of structural O-H groups in nfHY crystallites can be observed in two sharp peaks at 3,571 and 632 cm^{-1} respectively [29]. The peak at 3,642 cm^{-1} has been reported to be due to the OH^- stretching vibrations of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [30]. The main characteristic bands at around 1,090, 1,039, 599 and 571 cm^{-1} [31] are clearly observed, showed typical apatite characteristics. The bands located at 602, 962, 900–1,300 and 1,950–2,200 cm^{-1} is characteristic of PO_4^{3-} . Comparing the results it could be observed that the peaks in the nfHY sintered at 1200°C became stronger in intensity and better in resolution. These results clearly indicate the formation of typical HY structure [32].

XRD analysis

The XRD results are illustrated in Figure 4 display that the crystal phase of titanium dioxide and hydroxyapatite, existed in this biotemplate, indicated that the process by polymeric precursor method fiber organic derived TD, HY ceramics sintered, showed that the organic portion was removed leaving only the ceramic.

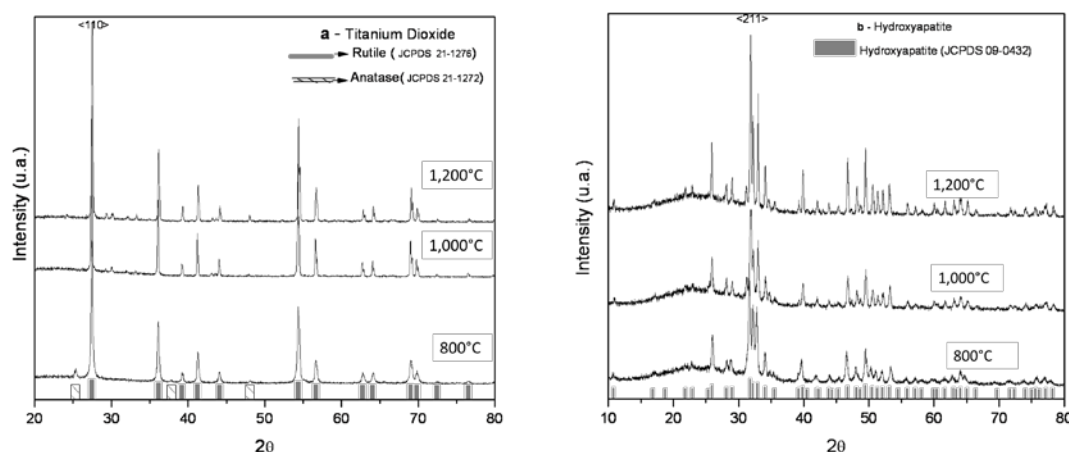


Figure 4. XRD patterns of nfTD (a) and nfHY (b).

In the XRD results nfTD in rutile and anatase phases are shown in Figure 4a. XRD patterns exhibited strong diffraction peaks at 27° , 36° and 55° above $1,000^\circ\text{C}$ indicating TD in the rutile phase. In 800° we observe the diffraction peaks at 25° and 48° indicating TD in the anatase phase in accordance with previous reports [27]. All peaks are in good agreement with the standard spectrum number of *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* - JCPDS 21-1276 and JCPDS 21-1272.

The XRD results nfHY (figure 4b), all the fibers calcined at different temperature demonstrate peaks identical to the standard spectrum (JCPDS 09-043), indicating the formation of apatite structure. It can be seen that the crystallinity increased with sintering temperature up to 1000°C [30]. The sample heated at 800°C had a grayish color due to the presence of some residual carbon from the template used for the preparation of fibers. The carbon was removed upon calcinations at $1,000^\circ\text{C}$ and the fibers were pure white in color.

Considering the findings from FTIR and XRD analyses, we have selected nfTD and nfHY sintered at $1,200^\circ\text{C}$, because better characteristics were observed for the fibers produced at these temperatures.

Nano/micro fibers cell viability.

The cell viability was confirmed by the MTT method (Figure 5), where the absorbance values are proportional to the number of viable cells.

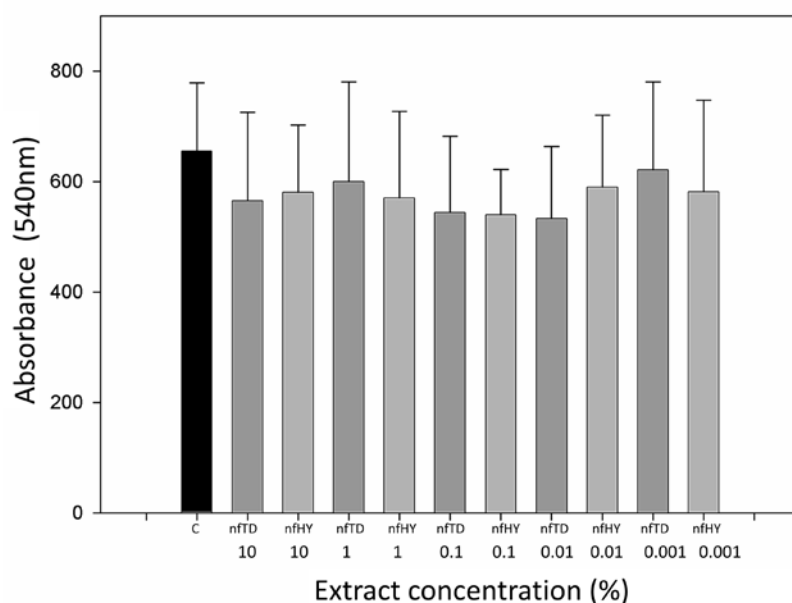


Figure 5. Mouse fibroblast cell line (3T3/NIH) activity (MTT assay) in response to different dilutions ranging from 10mM to 0.001mM from nfTD, nfHY and C (control group); the standard deviations of the absorbance at 540nm are represented. There was none difference between the two types of nano/micro-fibers tested, and the concentration has also not influenced the results of viability. When compared to control, there was not a decrease in cell viability for the nano/micro-fibers.

Viscosity Measurements

Table I. Viscosity of hydrogel alginate combined nano/micro fibers in similar conditions.

Sample	Temperature (°C)	Viscosity (mPa.s)
Alginate Hydrogel	25°C	822,4
Alginate Hydrogel/TiO ₂	25°C	847,9
Alginate Hydrogel/Hydroxyapatite	25°C	948,1

In Table I we can observe the viscosity values for the AH alone and when the hydrogel was combined with nfTD or nfHY. An increase in viscosity was observed after nano-fillers addition, especially for nfHY particles.

SEM observation

In Figure 6 it is exhibited SEM images of the fibers obtaining after sintering at 1200°C. These fibers retain the original fibrous cotton morphology, with cotton body removal, thus the nano/micro fibers morphology followed the template of cotton. The average diameter of produced nfTD and nfHY was measured to be around 400nm to 10µm (Figure 6a2;b2).

In Figure 6a3, we can observe the surface of the nfTD fibers, which show furrow, striated surface and hollow inside. Figure b3 is the nfHY fibers by Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (*FEG SEM*), and a snake skin-like surface, similar to the nfTD there is a hollow inside the fibers.

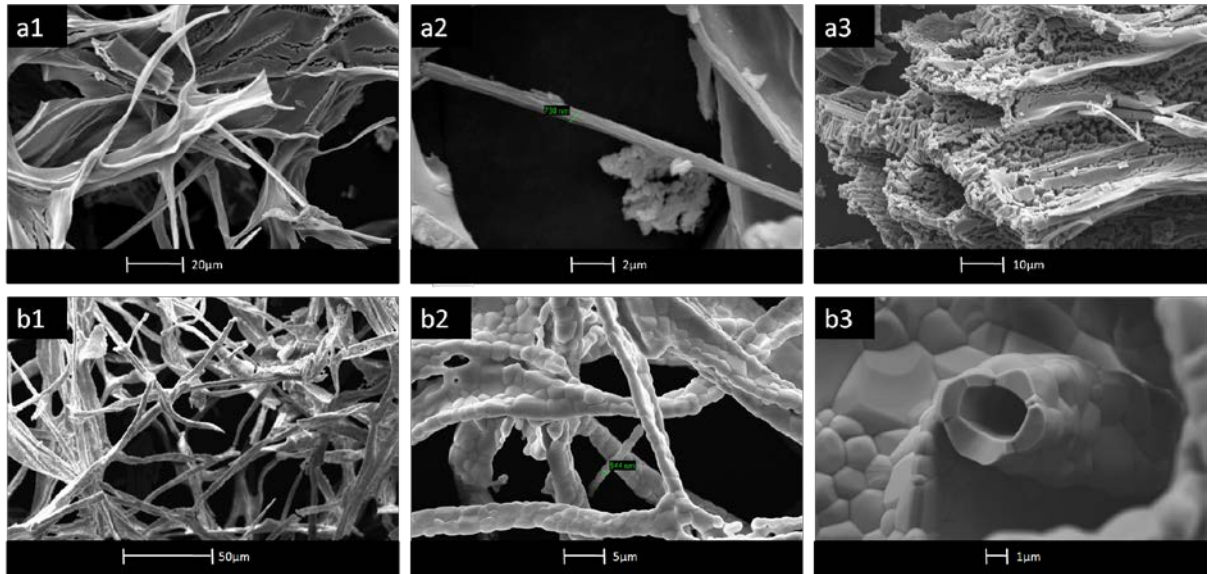


Figure 6.a – nfTD: a2, diameter of approximate 730 nanometers; a3, superficial characteristics of nfTD fibers. **b** – nfHY: b2, diameter of approximate 944 nanometers, b3, Inside the fibers, image obtained by Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG SEM). The samples were calcined at 1,200°C in ambient atmosphere.

The SEM micrographs of 2% AH, 2% AH with nfTD and 2% AH with nfHY are presented in Figure 7(a1, b1, c1). Compared with the unreinforced alginate hydrogel (Figure 7a1), the modified alginate hydrogel with nfTD (Figure 7b1) or nfHY (Figure 7c1) exhibit a novel structure for cell attachment and porosities around 100-300µm.

Comparing alginate with nfTD (Figure 7b1) and nfHY (Figure 7c1) we could observe that the alginate with nfHY had more porosity than the others suggesting that this material could be better. However, the *in vitro* proliferation of fibroblasts (3T3) on the different scaffolds showed that after 3h more cells were detected in nfTD (Figure 7b2) compared to other groups. Three hours after seeding, rounded cells could be seen attached to the surface of the materials. In the SEM images it is also possible to see (arrows) cells in cellular division; colonizing the inner surface of the pores and filopodia extension. After 6 hours, larger cytoplasm extensions were visible, and cell proliferation could be observed in all groups. After 24 hours, cells were almost covering all the scaffold surface in the three tested scaffolds,

demonstrating their ability to allow cell adhesion and proliferation, which are essential requirements for a scaffold material.

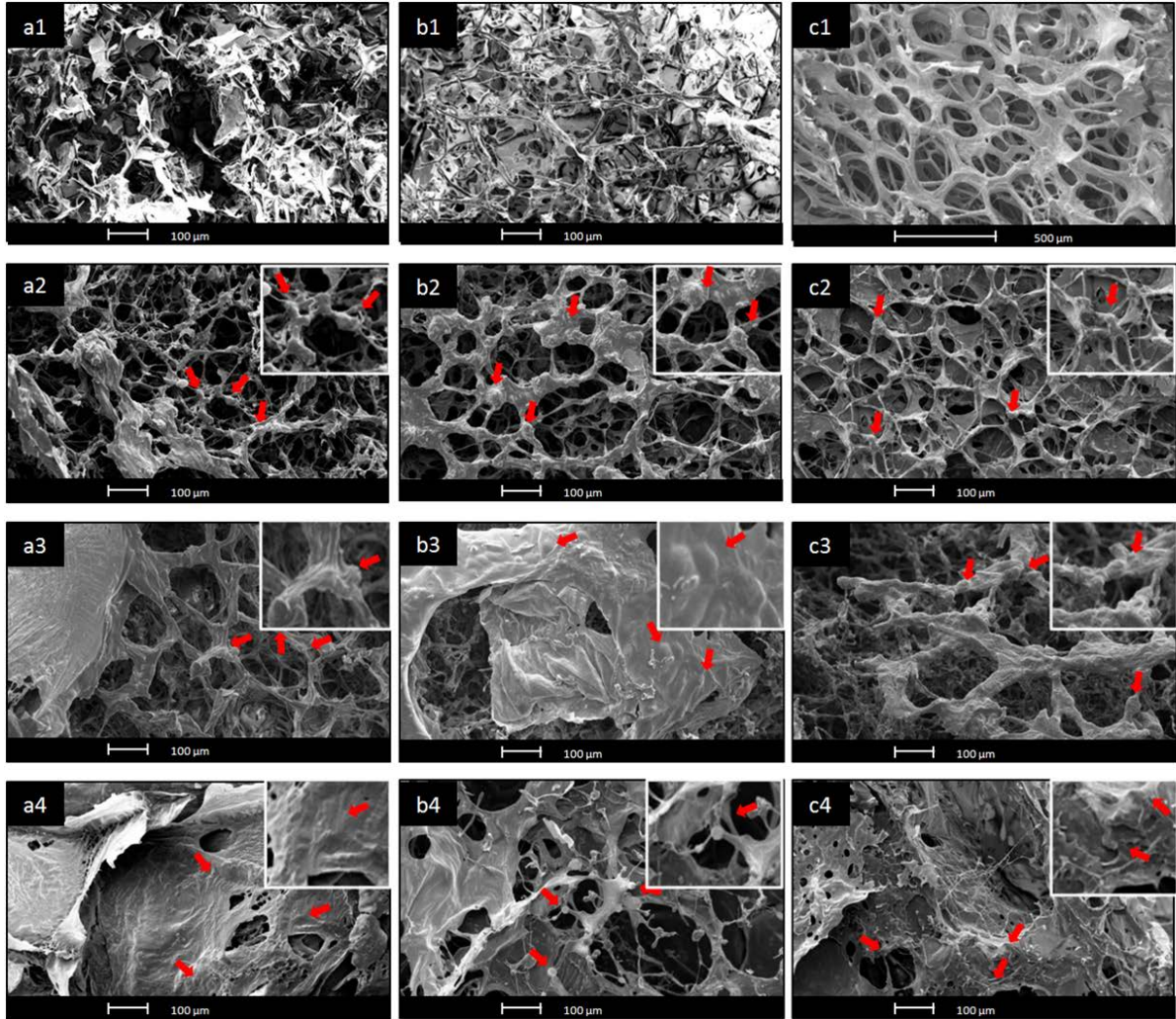


Figure 7. SEM micrographs at 100x magnification: untreated 2% alginate hydrogel (**a: 1-4**), treated with nfTD (**b: 1-4**) and nfHY (**c: 1-4**). In the micrographs numbered at 2, 3 and 4, we observe the cell/scaffold after 3, 6 and 24 hours respectively, rounded cells could be seen attached to the surface of the materials, larger cytoplasm extensions and cell proliferation, cells were almost covering all the scaffold surface.

3.5 Discussion

The overall results of our study demonstrated that the reinforcement of alginate hydrogel with nanofibers of titanium or hydroxyapatite, using cotton as the bio-template, produced scaffolds with improved physical properties, which were also favorable for cell adhesion and proliferation, disclosing promising potential as an injectable material for tissue regeneration usage.

Several studies have investigated the use of alginate hydrogel, with different application, such as gel for drug delivery [8, 33], cell encapsulation material [6, 34], and injectable cell transplantation vehicle [7]. The intracellular matrix of alginate present mixed salt of various cations found in sea water such as Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , and Na^{+} [35], with building blocks constituted from β -D-mannuronic and α -L-gulonic acids, joined by 1,4 linkages. Generally, the studies have demonstrated that material exhibited biocompatibility, low toxicity, and relatively low cost [36].

In tissue engineering, alginate hydrogel has been applied for cartilage repair [11], culture environment [12, 13], delivery carriers [14], exhibiting the advantage of gelling capacity, that can encapsulate various substances with minimal trauma [37], absorb water and swell readily without dissolving [34]. Diverse techniques and methodologies have been developed to control physical, chemical and gelling properties, to provide a gel with appropriate properties for specific applications, overcoming the disadvantage that is not naturally broken down enzymatically in mammals and with poor regulated degradation [38].

For the cells, alginate hydrogel is described as a biomaterial, but several factors affect cell behavior and affinity on hydrogels like the crosslink, the general chemistry of the monomers, gelling conditions (*e.g* temperature and pH), degradation and swelling [34, 39]. Alginate hydrogel has been modified by another polymers [40], proteins [41], peptide [15]

grow factor [10], and have been demonstrated to provide an acceptable environment of adhesion and proliferation.

It is well known that the alteration of the network structure and pore size can modify cell adhesion, morphology and function [42]. In this study, a new methodology for synthesizing nano/micro ceramic fibers of titanium dioxide and hydroxyapatite was described using cotton as the biotemplate. The methodology used in our study is quite different from others [25], involving the precursor solution impregnation in organic fibers, replicating the organic fibers in the ceramic fibers produced. Ceramics have already been used as scaffold or to reinforce them and the cytocompatibility of TD and HY has already been proved [1, 23, 43]. The findings from our study demonstrated that neither the nfTD or the nfHY have produced toxic effect, indicating that they could be incorporated in alginate hydrogel for applications in tissue engineering. In our study, we used the MTT assay to test the cell viability. The MTT assay measures the reduction of the tetrazolium component from MTT by viable cells, so the level of the reduction of MTT into formazan can reflect the level of cell metabolism. Several studies have used this method to observe the effect of the new material combination on cell viability and proliferation [20, 40]. It is also important to highlight that the incorporation of these nanofibers, despite the small increase in viscosity values, have not increased significantly this viscosity. Viscosity is an important parameter for materials designed for use as injectable substances [44]. Therefore, observing our results we could conclude that the addition of these nanofibers in the hydrogel were not able to change the capacity of the hydrogel to be applied as an injectable scaffold for applications in pulp tissue engineering approaches or for cartilage regeneration.

Biotemplates are used for trying to mimic the nature, while implementing new technology [20], providing a favorable environment for cell adhesion and proliferation. We observed that the methodology in our study to replace the cotton for the nanofibers, either

from hydroxyapatite or titanium, was capable to remove the organic structure from cotton, while maintained the physical structure of this natural template. The size of the nanofibers formed using the cotton biotemplate closely resembled the diameter of collagen fibers found in the extracellular matrix, with sizes varying between 50 and 500nm [45]. This fibrillar characteristic is important for cell attachment, proliferation, and differentiated function in tissue engineering approaches [5]. Titanium dioxide and hydroxyapatite are biomaterials that have been used in tissue engineering [1, 23, 43], and under SEM examination (Figure 7) we observed that the combination of alginate hydrogel with the nano/micro ceramic fibers create a new gel with more pores and interconnectivity, which are key features when looking for an ideal scaffold [5, 16, 17]. The alginate hydrogel, treated with nfHY showed an improved morphology due to the higher porosity produced, with a higher cell adhesion and proliferation when compared to the group with nfTD or the hydrogel alone. Hydroxyapatite is well known by its citocompatibility, being used in a series of different biological applications [46, 47]. However, it is noteworthy that after 24 hours, cells have almost covered the entire scaffold structure indicating that the alginate hydrogel, with or without nanofibers inclusion is a favorable environment for cell growth, corroborating previous reports in literature [6, 38, 48]. Nevertheless, we should emphasize that the increased porosity observed for hydrogels with nanofibers incorporation could play a significant role in the initial moments when scaffold are applied in tissue engineering, which are critical for the ability of cells to attach and then proliferate [49]. The observed improved porosity can also be favorable for initial vascularization [50], and angiogenesis plays a crucial role in the maintaining of initial tissue regeneration [5]. The regeneration of specific tissues aided by synthetic materials has been shown to be dependent on the porosity and pore size of the supporting three-dimensional structure [51].

These results are promising for tissue engineering approaches. Additional studies have been carried out in our laboratory to investigate the potentialities of these new reinforced hydrogels and the possibility to functionalize them with morphogen agents to produce an even better material, since morphogens are the responsible to

3.6 Conclusion

Here we described a single method to obtain hollow nano/micro ceramic fibers, which could be incorporated in alginate hydrogel, producing a material that could be useful for tissue engineering application, as an injectable material. The inclusion of nanofibers, which did not increase cell toxicity, has not increased the viscosity, producing hydrogels with higher and more structured porosities that provide an acceptable environment for cell adhesion and proliferation.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian Government agencies (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Financiadora de Estudos e Projetos - **FINEP** - and Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS), for the financial support (grants) and scholarships.

3.7 References

1. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
2. Nor, J.E., *Tooth regeneration in operative dentistry*. Oper Dent, 2006. **31**(6): p. 633-42.
3. Yang, S., et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors*. Tissue Eng, 2001. **7**(6): p. 679-89.
4. Demarco, F.F., et al., *Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells*. J Endod, 2010. **36**(11): p. 1805-11.
5. Demarco, F.F., et al., *Dental Pulp Tissue Engineering*. Braz Dent J 2011. **22**(1): p. 3-14.
6. Rowley, J.A., G. Madlambayan, and D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials*. Biomaterials, 1999. **20**(1): p. 45-53.
7. Novikova, L.N., et al., *Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation*. J Biomed Mater Res A, 2006. **77**(2): p. 242-52.
8. Tonnesen, H.H. and J. Karlsen, *Alginate in drug delivery systems*. Drug Dev Ind Pharm, 2002. **28**(6): p. 621-30.
9. Sone, T., et al., *A novel gene delivery system in plants with calcium alginate microbeads*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002. **94**(1): p. 87-91.
10. Dobie, K., et al., *Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro*. Connect Tissue Res, 2002. **43**(2-3): p. 387-90.
11. Chen, Y.B., et al., *Self-Assembled Rosette Nanotube/Hydrogel Composites for Cartilage Tissue Engineering*. Tissue Eng Part C Methods.
12. Huang, X., et al., *Microcapsules Embedded with Three-Dimensional Fibrous Scaffolds for Cell Culture and Tissue Engineering*. Tissue Eng Part C Methods.
13. Hunt, N.C. and L.M. Grover, *Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine*. Biotechnol Lett.
14. Lin, H.Y. and C.T. Yeh, *Alginate-crosslinked chitosan scaffolds as pentoxifylline delivery carriers*. J Mater Sci Mater Med.
15. Lee, J.W., et al., *The effect of spacer arm length of an adhesion ligand coupled to an alginate gel on the control of fibroblast phenotype*. Biomaterials.
16. Woo, K.M., V.J. Chen, and P.X. Ma, *Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment*. J Biomed Mater Res A, 2003. **67**(2): p. 531-7.
17. Tuzlakoglu, K., et al., *Nano- and micro-fiber combined scaffolds: a new architecture for bone tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2005. **16**(12): p. 1099-104.
18. Yan, J., et al., *Synthesis of uniform TiO₂ nanoparticles with egg albumen proteins as novel biotemplate*. J Nanosci Nanotechnol. **10**(9): p. 5767-75.
19. Fan, T., et al., *Biomorphic Al₂O₃ fibers synthesized using cotton as bio-templates*. Scripta Materialia, 2005. **53**(8): p. 893-897.
20. Gonzalez, P., et al., *A new generation of bio-derived ceramic materials for medical applications*. J Biomed Mater Res A, 2009. **88**(3): p. 807-13.
21. Popovska, N., et al., *Paper derived biomorphic porous titanium carbide and titanium oxide ceramics produced by chemical vapor infiltration and reaction (CVI-R)*. Journal of the European Ceramic Society, 2005. **25**(6): p. 829-836.
22. Lagziel-Simis, S., et al., *Protein-mediated nanoscale biotemplating*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(6): p. 569-73.
23. Rani, V.V.D., et al., *Fabrication of alginate/nanoTiO₂ needle composite scaffolds for tissue engineering applications*. Carbohydrate Polymers. **83**(2): p. 858-864.

24. Leite, E.R., et al., *Photoluminescence in amorphous TiO₂-PbO systems*. Applied Physics A: Materials Science & Processing, 2001. **73**(5): p. 567-569.
25. Varma, H.K. and S. Suresh Babu, *Synthesis of calcium phosphate bioceramics by citrate gel pyrolysis method*. Ceramics International, 2005. **31**(1): p. 109-114.
26. Peng, L., et al., *Preparation and Evaluation of Porous Chitosan/Collagen Scaffolds for Periodontal Tissue Engineering*, 2006. p. 207-220.
27. Xie, M., et al., *Synthesis of nanocrystalline anatase TiO₂ by one-pot two-phase separated hydrolysis-solvothermal processes and its high activity for photocatalytic degradation of rhodamine B*. J Hazard Mater. **176**(1-3): p. 139-45.
28. Liqiang, J., et al., *Effects of Sn dopant on the photoinduced charge property and photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles*. Applied Catalysis B: Environmental, 2006. **62**(3-4): p. 282-291.
29. Stoch, A., et al., *Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium and its alloy Ti6Al4V*. Journal of Molecular Structure, 2005. **744-747**: p. 633-640.
30. Ramanan, S.R. and R. Venkatesh, *A study of hydroxyapatite fibers prepared via sol-gel route*. Materials Letters, 2004. **58**(26): p. 3320-3323.
31. Wang, J., et al., *Fluoridated hydroxyapatite/titanium dioxide nanocomposite coating fabricated by a modified electrochemical deposition*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2009. **20**(5): p. 1047-1055.
32. Qian, J., et al., *Fabrication, chemical composition change and phase evolution of biomorphic hydroxyapatite*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(11): p. 3373-83.
33. Yu, C.Y., et al., *Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems*. Int J Pharm, 2008. **357**(1-2): p. 15-21.
34. Jen, A.C., M.C. Wake, and A.G. Mikos, *Review: Hydrogels for cell immobilization*. Biotechnol Bioeng, 1996. **50**(4): p. 357-64.
35. Gombotz, W. and S.F. Wee, *Protein release from alginate matrices* Advanced Drug Delivery Reviews 1998. **31**: p. 267-285.
36. Park, H., et al., *Shear-reversibly Crosslinked Alginate Hydrogels for Tissue Engineering*. Macromol Biosci, 2009.
37. Klöck, G., et al., *Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates*. Biomaterials, 1997. **18**(10): p. 707-713.
38. Augst, A.D., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as biomaterials*. Macromol Biosci, 2006. **6**(8): p. 623-33.
39. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering*. Chem Rev, 2001. **101**(7): p. 1869-79.
40. Kievit, F.M., et al., *Chitosan-alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment*. Biomaterials.
41. Sultzbaugh, K.J. and T.J. Speaker, *A method to attach lectins to the surface of spermine alginate microcapsules based on the avidin biotin interaction*. Journal of Microencapsulation, 1996. **13**(4): p. 363-376.
42. Oxley, H.R., et al., *Macroporous hydrogels for biomedical applications: methodology and morphology*. Biomaterials, 1993. **14**(14): p. 1064-1072.
43. Tolga Demirtas, T., A.G. Karakeçili, and M. Gumusderelioglu, *Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in-vitro characterization*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(2): p. 729-35.
44. Tan, R., et al., *Preparation and characterization of an injectable composite*. J Mater Sci Mater Med, 2009. **20**(6): p. 1245-53.
45. Elsdale, T. and J. Bard, *Collagen substrata for studies on cell behavior*. J Cell Biol, 1972. **54**(3): p. 626-37.

46. Guo, Y.-P., et al., *Magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres with hierarchical nanostructure for drug delivery systems*. Chemical Communications, 2011.
47. Iafisco, M., et al., *Conjugation of hydroxyapatite nanocrystals with human immunoglobulin G for nanomedical applications*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, (0).
48. Kolambkar, Y.M., et al., *An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects*. Biomaterials, 2011. **32**(1): p. 65-74.
49. Casagrande, L., et al., *Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation*. J Dent Res. **89**(6): p. 603-8.
50. Roosa, S.M.M., et al., *The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model*. Journal of Biomedical Materials Research Part A. **92A**(1): p. 359-368.
51. Cima, L.G., et al., *Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates*. J Biomech Eng, 1991. **113**(2): p. 143-51.



4. Artigo 2

Título: Preparation, modification and characterization of Alginate hydrogel with nano/micro ceramic fibers: a new perspective for tissue engineering in dentistry.

Bianca Palma Santana¹♦, Gian Francesco dos Reis Paganotto², Fernanda Nedel³, Evandro Piva¹, Rodrigo Varella de Carvalho⁴, Flávio Fernando Demarco¹, Neftali Lenin Villarreal Carreño².

¹Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Odontologia, RS, Brazil.

²Universidade Federal de Pelotas. Engenharia de Materiais, RS, Brazil.

³Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, RS, Brazil

⁴Universidade Norte do Paraná, PR, Brazil.

♦ Corresponding author at: Biomaterials Development and Control Center (CDC-Bio), School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil. CEP: 96015-560. Tel/Fax: + 55-53-3222-6690

E-mail: biancapalmasantana@hotmail.com (Bianca Santana)

*** Artigo formatado segundo normas do periódico Journal of Biomedical Materials Research Part A.**

4.1 Abstract

Dental pulp tissue engineering which consists in the complete formation of the root tissues and appendages has been studied and alginate hydrogel (AH) is a great perspective to be scaffold cause is biocompatibility and have been used in a large scale in tissue engineering. Nano/micro fibers combined with AH can modified this material mimics the extra cellular matrix. In our study, we combined nano/micro ceramic fibers of Titanium (nfTD) and Hydroxyapatite (nfHY) with AH and observe the chemical and biological response of this material. We demonstrate that AH combined with this fibers don't change the chemical structure and in cell viability and proliferation, the combined AH maintained the bioactivity and biocompatibility. These results show that we have produced a promising material that can be used in dental pulp tissue engineering, also we can combine an others factors like dental pulp stem cells and morphogens to enhance the natural regenerative capacity of the dental pulp or reconstruct it completely.

4.2 Introduction

Dental caries or trauma frequently leads to pulp necrosis, in these cases traditional endodontic therapy allows for control of the infection, but the dental roots are susceptible to fracture for the second trauma and tooth extraction is necessary addition it has been demonstrated that bacteria cannot be removed completely from the canal system (Nair et al. 2005, Haapasalo et al. 2011).

The materials and operative techniques used to repair dental pulp currently is pulp capping with calcium hydroxide where the cells adhere to osteodentin before differentiation into odontoblast to form tubular dentin, however, dental clinicians frequently face circumstances that to maintenance your vitality is no longer possible, and the materials that substitute then, are not a hundred percent reliant. The technic that could resolve this improvement is tissue engineering that has been grow in each year and consist in replacement organs and tissue.

Dental pulp engineering which consists in the complete formation of the root tissues and appendages has been studied [1-5], and it is known that for the technique becomes applicable it is necessary to integrate three key elements: molecular signals, which induce the differentiation of cells that constitute dental pulps; stem cells, that will respond to the signals and scaffolds that carry or attract these cells and provide an environment where they can proliferate, differentiate and develop a tissue with the characteristics and function of normal pulp [6-9].

Scaffolds has been studied and developed by many forms, many biomaterials, and her technology consist in to prepared cell/scaffolds to promote cell proliferation and differentiation for *in vivo* tissue. For the dental pulp regeneration, the scaffold should be injectable, proper that the stem cells substitute the damaged cells and regenerate them; alginate hydrogel is a kind of biomaterials that can contribute for these studies.

Alginate is a natural polymer that has been studied for tissue engineering, is a natural polysaccharide and has been widely used in drug delivery [10-12], cell encapsulation material [13, 14], and injectable cell transplantation vehicle [15, 16], proper to its biocompatibility, low toxicity, relatively low cost and kind gelation performance with divalent cations [17]. There is found in the intracellular matrix where it exists as a mixed salt of various cations found in sea water such as Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , and Na^+ [18]. Alginate building blocks are β -D-mannuronic and α -L-guluronic acids, joined by 1,4 linkages (Fig. 1). The ratio of the two sugars (mannuronic/guluronic acids) is generally 1.5, with some deviation depending on the source [18, 19]. Most of the divalent metal ions, such as calcium and zinc, form water insoluble alginate salts.

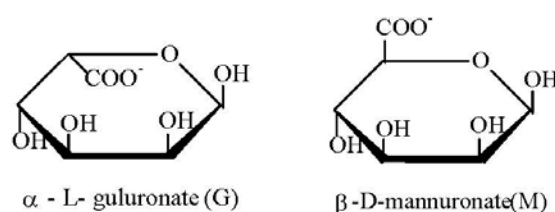


Figure 1: Chemical formula of Alginate building blocks: α -L-guluronic and β -D-mannuronic acids.

The crosslinking and gelation of the polymers are mainly achieved by the exchange of sodium ions from the guluronic acids with the divalent cations, and the stacking of these guluronic groups to form the characteristic egg-box structure (Figure. 2), [18]. A simple method to increase the ionic crosslinking density is adding sufficient amounts of divalent cations and is gradually diffuse out from the gel, it slowly degrades and is excreted in the urine [16], in this processes we obtaining the proper mechanical properties of Alginate Hydrogels (AH) [17].

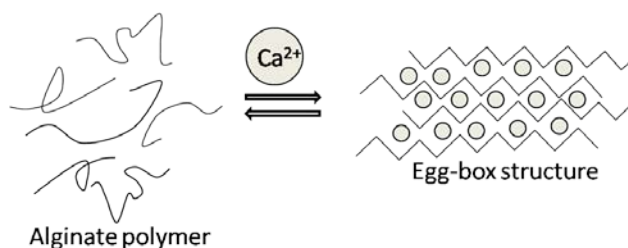


Figure 2: Schematic representation of the egg-box association of alginate cross linked by calcium ions.

The AH, can be used like beads or gel absorb water and swell readily without dissolving [20]. In recent years, AH have found applications in the medicine [16], pharmacology [11], biological science [21], dentistry [22], and have been used in a large scale in Tissue Engineering (TE) [23-27].

In this study, we prepare the alginate hydrogel 2%, modified them with nano/micro ceramic fibers of titanium dioxide (nfTD) and hydroxyapatite (nfHY) synthesized based on precursor method which allow the deposition of precursor solution in a natural template. The hypothesis is that the nano/micro fibers can modified AH promoting a better structural and organizational stability for cell attachment and proliferate without change the chemical and biological compositions of AH. To test this hypothesis, we observe the chemical composition by Infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX), and for biological analyses we use the cell viability and proliferation test (WST1) with fibroblasts in cultured on the gel (3D).

4.3 Materials and Methods

Alginate Hydrogel combined with Nano/micro ceramic fibers.

Sodium alginate ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ - Vetec Química Fina LTDA) were dissolved in deionized water and mixed with calcium sulfate ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Vetec Química Fina LTDA) forming the ionic cross-linking or the hydrogel (2% wt). The nano/micro fibers titanium dioxide and

hydroxyapatite was kept a constant concentration of 0,07% g/ml, they were added on the hydrogel during the magnetically stirred.

FTIR spectroscopy

Infrared spectroscopy was used to characterize the chemical structure of alginate hydrogel with and without nano/micro fibers. The infrared spectra of alginate hydrogel were measured with an FTIR spectrophotometer (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, IRPrestige-21, Shimadzu). Each spectrum of samples was acquired via accumulation of 96 scans with a resolution of 4 cm⁻¹.

X-ray diffraction (XRD)

The AH combined and not, were put in petri dishes (10ml) with 2X10mm, then the samples were kiln-dried at 50°C for 4h. XRD patterns of dry alginate hydrogel with and without the nano/micro fibers were obtained by diffract meter (XRD, Shimadzu, model XRD-6000). The equipment uses the diffraction tube with copper target with a wavelength approximately equal to 1.54060 Å, with a power of 2kW, v30kV current of 30mA, and the analysis performed in the angle range from 20 to 40 degrees for AH combined with nfTD, and from 20 to 80 for AH combined with nfHY, at a speed of 1 degree/min in continuous scan.

Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX)

The percentage determination of nfTD and nfHY in the sample was obtained by Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX - Ray Ny - EDX 720, Shimadzu). The samples were prepared by the same form to be analyzed in the XRD.

Cell viability and proliferation in alginate hydrogel

An immortalized mouse fibroblast cell line (3T3/NIH) was maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% L-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml) (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA). Mouse fibroblasts were maintained as a stock culture in DMEM and incubated at

37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air until subconfluency was reached. First AH and AH combined with nfTD and nfHY, were sterilized by exposure to germicidal UV light for 40min and were incubated in contact with the cells (3T3/NIH) at a density of 2×10^4 in 96-well ELISA for the evaluation of cell viability and proliferation for 3, 6, 24 and 48h at 37°C in a humidified atmosphere with 5% of CO₂. As control group the AH modified or not were prepared without cell, only DMEM. At each time point, 10µL of WST1 (Roche, Mannheim, Germany) was added to the wells containing samples and incubated for 2 hour. Then, 100 µL aliquots were removed from each well, and the optical density at 450 nm was determined in a microplate reader. All experiments were carried out in triplicates. Data were submitted to one-way ANOVA and Tukey post-hoc tests, with $p < 0.05$.

4.4 Results

FTIR spectroscopy analysis

Comparing FTIR spectra (Figure 5) of alginate hydrogel (1a) with nfTD (3a) or nfHY (2a), we observe that AH maintained their chemical structure, since that the characteristic peaks of sodium alginate is absorption at 2950 cm⁻¹ and 1413 cm⁻¹, due to stretching -CH₂, the carboxylic groups C-O-O show a broad absorption band due to the asymmetric stretch in 1622cm⁻¹ and due to the symmetric stretching into 1419cm⁻¹, and -C-OH (O-H stretching vibration is 3404cm⁻¹, C-O stretching vibration of secondary alcohol is 1120 cm⁻¹, C-O stretching vibration of tertiary alcohol is 1143 cm⁻¹), that can be verified in Figure 3.

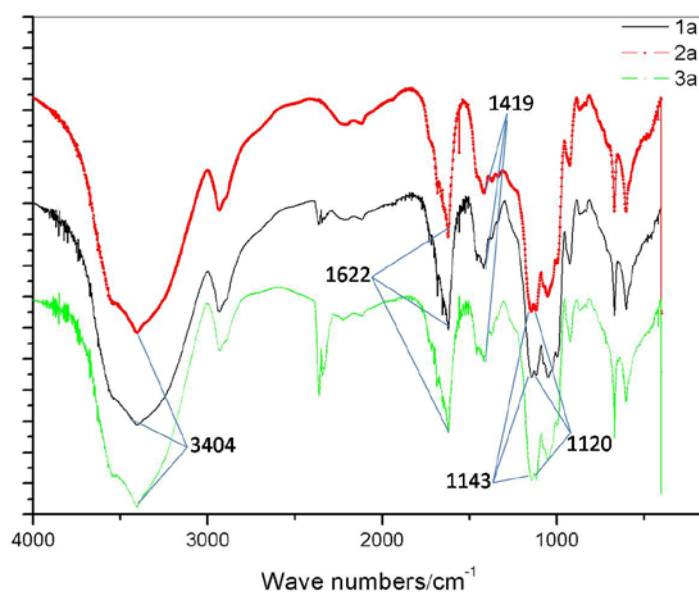


Figure 3: FTIR spectra of HA (1a), AH with nfHY (2a) and AH with nfTD (3a).

X-ray diffraction (XRD) analysis

The titanium dioxide and hydroxyapatite crystal phase existed in this injectable system can be proved by XRD analysis (Figure 4), indicated that the nfTD and nfHY preserved its structural characteristics during the process, which is favorable to maintain its bioactivity and biocompatibility.

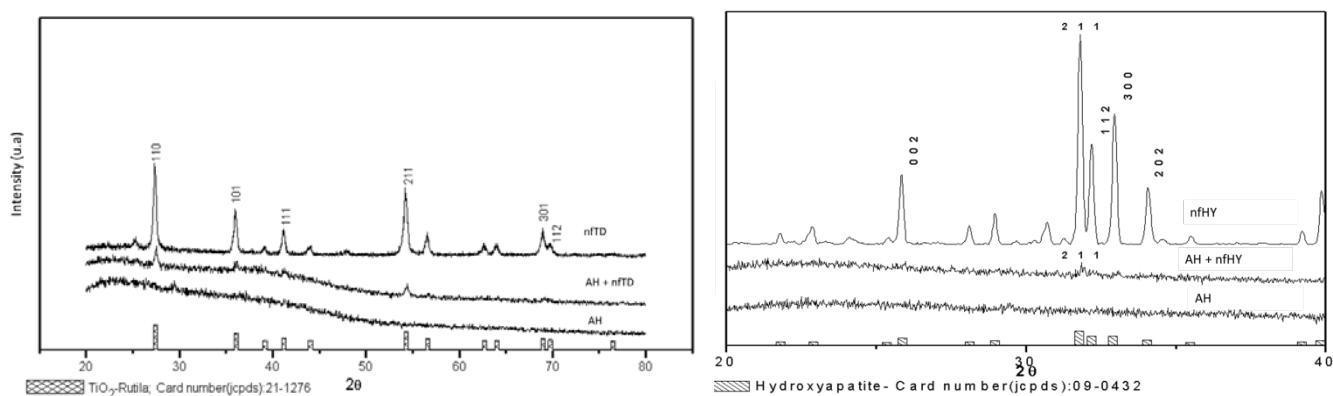


Figure 4: XRD patterns of AH, and AH combined with nfTD (a) and nfHY (b).

EDX

In EDX results (Figure 5) we can observe the quantitative concentration of nfTD and nfHY in AH.

1. Quantitative analyses of alginate hydrogel.				2. Quantitative analyses of alginate hydrogel combined with nano/micro ceramic fibers of titanium dioxide.			
Sample	Results	SD	Line analysis of X-ray	Sample	Results	SD	Line analysis of X-Ray
Ca	77,088%	0,232	Ca Ka	Ca	62, 310%	0,113	Ca Ka
S	20,758%	0,101	S Ka	S	26,051%	0,046	S Ka
P	1,209%	0,060	P Ka	Ti	10,438%	0,031	Ti Ka
Fe	0,573%	0,036	Fe Ka	P	1,028%	0,019	P Ka
Cu	0,372%	0,024	Cu Ka	K	0,173%	0,011	K Ka

3. Quantitative analyses of alginate hydrogel combined with nano/micro ceramic fibers of hydroxyapatite.			
Sample	Results	SD	Line analysis of X-Ray
Ca	77,548%	0,072	Ca Ka
S	11,309%	0,019	S Ka
P	10,439%	0,024	P Ka
Si	0,346%	0,012	Si Ka
K	0,249%	0,009	K Ka
Fe	0,109%	0,003	Fe Ka

Figure 5: Quantitative results of AH (1) combined with nfTD (2) and nfHY (3).

Cell viability and proliferation in alginate hydrogel

The quantitative data of fibroblast 3T3 viability and proliferation on the AH and in the AH modified with nfTD and nfHY for 3h, 6h, 24h and 48h is represent in Figure 6, as control groups where used AH without cells, the absorbance values are proportional to the number of viable cells in a period of 3h, 6h, 24h and 48h.

The quantitative evaluation of cell viability and proliferation with WST1 (Figure 6) comparing control group (only cells) with AH modified or not, show cell decreases in AH with 48h, AH modified with nfTD in 3h and 48h, AH modified with nfHY in 24h and 48h ($p < 0,05$). When compared AH not modified with other groups we observe cell adhesion decreases only in AH modified with nfTD in 3h.

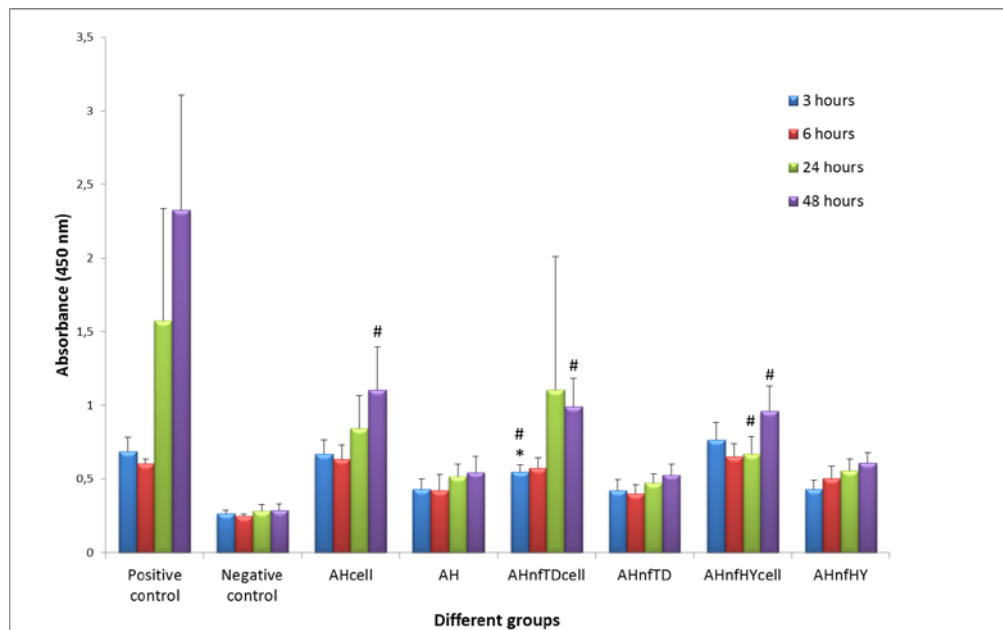


Figure 6: Quantitative measurement mouse of fibroblast cell 3T3 viability and proliferation on AH and AH combined with nfTD and nfHY. Data were used as mean $\pm$ SD, $n=9$, $*p<0,05$ comparing AHcell with another groups with cell (AHnfTDcell and AHnfHYcell) and $\#p<0,05$ comparing positive control (only cells) with groups with cell (AHcell, AHnfTDcell and AHnfHYcell).

4.5 Discussion

Dental pulp tissue engineering is a new approaches that have the objective to maintain tissue vitality and improve tooth survival [28]. When possible, the dentistry trying to maintenance the dental pulp vitality, a less invasive way, believing in their biological recovery, like [7] but frequently is not possible, perhaps because the pulp are extremely contaminated or the teeth have an incomplete apex formation and it has been demonstrated that bacteria cannot be removed completely from the canal system using current techniques in both primary root canal treatment [29].

The regeneration of dental pulp tissue in a necrotic infected tooth with apical periodontitis might be possible if the apex shows opening of more than 1.1mm or apicocectomized, and in the case of trauma, the tooth should be replanted in 45 min and if the

tooth is soaked in doxycycline or minocycline before replantation to be effectively disinfected [30, 31].

Techniques and materials are still being optimized in guide dental pulp tissue regeneration [22, 28, 32], and the objective of this study was to prepare, modify and evaluate a three-dimensional biodegradable alginate hydrogel scaffolds using nano/micro ceramic fibers of titanium dioxide and hydroxyapatite that have already been used to reinforce scaffolds and the cytocompatibility of TD and HY has already been proved [33-35].

Alginate hydrogel (AH) is an attractive form of biomaterial, disclosing biological properties, like biocompatibility and bioactivity, derived from their chemical composition, morphology, and structure, they have been used in a large scale in tissue engineering [23-27] and in dentistry AH has been used with growth factor [22], and demonstrated that can be used in dental pulp tissue engineering.

In this study we demonstrated that AH modified with nano/micro ceramic fibers don't change the chemical characteristics (Figure 3, 4), means that the concentration evaluated in EDX (Figure 5) is favorable to maintain the original properties of AH.

In the evaluation of cell viability, the results about AH compared with control group (cells only) indicate that have more difference in 48h with all the samples, but when we compare AH with AH modified by nfTD or nfHY the only statistical difference is in AH modified with nfTD in 3h, this results can be possible because of the first contact with cell/hydrogel cause in time of 24h the cells viability increased, suggesting that AH modified or not can provide an acceptable environment of cell adhesion and proliferation [3]. In resume AH modified or not remained bioactivity and biocompatibility, corroborating previous reports in literature [13, 36, 37], and with another modifications like bioactive substances can improve this results maintaining the initial tissue regeneration [38].

4.6 Conclusion

In our study we demonstrated that the combination of nano/micro ceramic fibers in alginate hydrogel don't change the chemical and physical characteristics but improved the morphological structure with more pores and interconnectivity of the material, proving that the material remains bioactivity and biocompatibility surging the opportunity to combine an others factors like dental pulp stem cells and morphogens to enhance the natural regenerative capacity of the dental pulp or reconstruct it completely.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian Government agencies (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Financiadora de Estudos e Projetos - **FINEP** - and Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS), for the financial support (grants) and scholarships.

4.7 References

1. Cordeiro, M.M., et al., *Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth*. J Endod, 2008. **34**(8): p. 962-9.
2. Mooney, D.J., et al., *Engineering dental pulp-like tissue in vitro*. Biotechnol Prog, 1996. **12**(6): p. 865-8.
3. Casagrande, L., et al., *Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation*. J Dent Res. **89**(6): p. 603-8.
4. Sakai, V.T., et al., *SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium*. J Dent Res. **89**(8): p. 791-6.
5. Nor, J.E., et al., *Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice*. Lab Invest, 2001. **81**(4): p. 453-63.
6. Nor, J.E., *Tooth regeneration in operative dentistry*. Oper Dent, 2006. **31**(6): p. 633-42.
7. Nakashima, M. and A. Akamine, *The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics*. J Endod, 2005. **31**(10): p. 711-8.
8. Nakashima, M., *Tissue engineering in endodontics*. Aust Endod J, 2005. **31**(3): p. 111-3.
9. Nakashima, M. and A.H. Reddi, *The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(9): p. 1025-32.
10. Yu, C.Y., et al., *Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems*. Int J Pharm, 2008. **357**(1-2): p. 15-21.
11. Tonnesen, H.H. and J. Karlsen, *Alginate in drug delivery systems*. Drug Dev Ind Pharm, 2002. **28**(6): p. 621-30.
12. Juliano, C., et al., *Preparation, in vitro characterization and preliminary in vivo evaluation of buccal polymeric films containing chlorhexidine*. AAPS PharmSciTech, 2008. **9**(4): p. 1153-8.
13. Rowley, J.A., G. Madlambayan, and D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials*. Biomaterials, 1999. **20**(1): p. 45-53.
14. Nicodemus, G.D. and S.J. Bryant, *Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. **14**(2): p. 149-65.
15. Tan, R., et al., *Preparation and characterization of an injectable composite*. J Mater Sci Mater Med, 2009. **20**(6): p. 1245-53.
16. Novikova, L.N., et al., *Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation*. J Biomed Mater Res A, 2006. **77**(2): p. 242-52.
17. Park, H., et al., *Shear-reversibly Crosslinked Alginate Hydrogels for Tissue Engineering*. Macromol Biosci, 2009.
18. Gombotz, W. and S.F. Wee, *Protein release from alginate matrices* Advanced Drug Delivery Reviews 1998. **31**: p. 267-285.
19. Draget, K.I., G. Skjak-Braek, and O. Smidsrod, *Alginate based new materials*. Int J Biol Macromol, 1997. **21**(1-2): p. 47-55.
20. Jen, A.C., M.C. Wake, and A.G. Mikos, *Review: Hydrogels for cell immobilization*. Biotechnol Bioeng, 1996. **50**(4): p. 357-64.
21. Sone, T., et al., *A novel gene delivery system in plants with calcium alginate microbeads*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002. **94**(1): p. 87-91.
22. Dobie, K., et al., *Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro*. Connect Tissue Res, 2002. **43**(2-3): p. 387-90.

23. Chen, Y.B., et al., *Self-Assembled Rosette Nanotube/Hydrogel Composites for Cartilage Tissue Engineering*. Tissue Eng Part C Methods.
24. Huang, X., et al., *Microcapsules Embedded with Three-Dimensional Fibrous Scaffolds for Cell Culture and Tissue Engineering*. Tissue Eng Part C Methods.
25. Hunt, N.C. and L.M. Grover, *Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine*. Biotechnol Lett.
26. Lin, H.Y. and C.T. Yeh, *Alginate-crosslinked chitosan scaffolds as pentoxifylline delivery carriers*. J Mater Sci Mater Med.
27. Lee, J.W., et al., *The effect of spacer arm length of an adhesion ligand coupled to an alginate gel on the control of fibroblast phenotype*. Biomaterials.
28. Demarco, F.F., et al., *Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells*. J Endod. **36**(11): p. 1805-11.
29. Saleh, I.M., et al., *Bacterial penetration along different root canal filling materials in the presence or absence of smear layer*. International Endodontic Journal, 2008. **41**(1): p. 32-40.
30. Banchs, F. and M. Trope, *Revascularization of Immature Permanent Teeth With Apical Periodontitis: New Treatment Protocol?* J Endod, 2004. **30**(4): p. 196-200.
31. Ritter, A.L.D.S., et al., *Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology*. Dental Traumatology, 2004. **20**(2): p. 75-84.
32. Yoshio, I., et al., *Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp*, 2009. p. NA.
33. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
34. Tolga Demirtas, T., A.G. Karakecili, and M. Gumusderelioglu, *Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in-vitro characterization*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(2): p. 729-35.
35. Rani, V.V.D., et al., *Fabrication of alginate/nanoTiO₂ needle composite scaffolds for tissue engineering applications*. Carbohydrate Polymers. **83**(2): p. 858-864.
36. Augst, A.D., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as biomaterials*. Macromol Biosci, 2006. **6**(8): p. 623-33.
37. Kolambkar, Y.M., et al., *An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects*. Biomaterials, 2011. **32**(1): p. 65-74.
38. Demarco, F.F., et al., *Dental Pulp Tissue Engineering*. Braz Dent J 2011. **22**(1): p. 3-14.



5. Conclusão Final

As nano/micro fibras de dióxido de titânio e hidroxiapatita foram sintetizadas através da fibra orgânica, demonstraram ser biocompatíveis e proporcionar uma melhor estrutura ao o Hidrogel de Alginato, que por vez não modificou sua característica química, física e biológica, podendo ser utilizado na engenharia tecidual com futuras aplicações na regeneração da polpa dentária.



6. Referências

- AUGST, A.D., H.J. KONG, AND D.J. MOONEY, Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci*, 2006. 6(8): p. 623-33.
- BANCHS, F. AND M. TROPE, Revascularization of Immature Permanent Teeth With Apical Periodontitis: New Treatment Protocol? *J Endod*, 2004. 30(4): p. 196-200.
- BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., e DUEK, E. A. R. (2006). Degradação acelerada de suportes de poli (ε-caprolactona) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. *Polímeros*, 16, 141-148.
- BRASIL, S. D. (2009). http://www.shimadzu.com.br/desktop_default.aspx.
- CASAGRANDE, L., DEMARCO, F. F., ZHANG, Z., ARAUJO, F. B., SHI, S., e NÖR, J. E. (2010). Dentin-derived BMP-2 and Odontoblastic Differentiation, *J Dent Res*
- CATHERINE, K. K., e PETER, X. M. (2008). Maintaining dimensions and mechanical properties of ionically crosslinked alginate hydrogel scaffolds <I>in vitro</I> (Vol. 84A, pp. 899-907).
- CHANG, C. H., LIN, F. H., KUO, T. F., e LIU, H. C. (2005). Cartilage tissue engineering. . *Biomed Eng Appl Basis Commun* (17), 1-11.
- CHEN, Y.B., et al., Self-Assembled Rosette Nanotube/Hydrogel Composites for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*.
- CIMA, L.G., et al., Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng*, 1991. 113(2): p. 143-51.
- CORDEIRO, M.M., et al., Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*, 2008. 34(8): p. 962-9.

DEMARCO, F.F., et al., Dental Pulp Tissue Engineering. Braz Dent J 2011. 22(1): p. 3-14.

DEMARCO, F.F., et al., Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. J Endod, 2010. 36(11): p. 1805-11.

DOBIE, K., SMITH, G., SLOAN, A. J., e SMITH, A. J., Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. Connect Tissue Res, 2002. 43(2-3): p. 387-90.

DRAGET, K.I., G. SKJAK-BRAEK, AND O. SMIDSROD, Alginate based new materials. Int J Biol Macromol, 1997. 21(1-2): p. 47-55.

ELSDALE, T. AND J. BARD, Collagen substrata for studies on cell behavior. J Cell Biol, 1972. 54(3): p. 626-37.

FAN, T., et al., Biomorphic Al₂O₃ fibers synthesized using cotton as bio-templates. Scripta Materialia, 2005. 53(8): p. 893-897.

FREED, L. E., GUILAK, F., GUO, X. E., GRAY, M. L., TRANQUILLO, R., HOLMES, J. W., RADISIC, M., SEFTON, M. V., KAPLAN, D., e VUNJAK-NOVAKOVIC, G. (2006). Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. Tissue Eng, 12(12), 3285-3305.

GOLDBERG, M., LANGER, R., e JIA, X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. J Biomater Sci Polym Ed, 18(3), 241-268. 2007.

GOMBOTZ, W. AND S.F. WEE, Protein release from alginate matrices Advanced Drug Delivery Reviews 1998. 31: p. 267-285.

GOMBOTZ, W. AND S.F. WEE, Protein release from alginate matrices Advanced Drug Delivery Reviews 1998. 31: p. 267-285.

GONZALEZ, P., et al., A new generation of bio-derived ceramic materials for medical applications. *J Biomed Mater Res A*, 2009. 88(3): p. 807-13.

GRAHAM, L., COOPER, P. R., CASSIDY, N., NOR, J. E., SLOAN, A. J., e SMITH, A. J. (2006). The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*, 27(14), 2865-2873.

GRIFFITH, L. G., e NAUGHTON, G. (2002). Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*, 295(5557), 1009-1014.

GRONTHOS, S., BRAHIM, J., LI, W., FISHER, L. W., CHERMAN, N., BOYDE, A., DENBESTEN, P., ROBEY, P. G., e SHI, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81(8), 531-535.

GUO, Y.-P., et al., Magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres with hierarchical nanostructure for drug delivery systems. *Chemical Communications*, 2011.

HOFFMAN, A. S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 54(1), 3-12.

HUANG, X., et al., Microcapsules Embedded with Three-Dimensional Fibrous Scaffolds for Cell Culture and Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*.

Hunt, N.C. and L.M. Grover, Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. *Biotechnol Lett*.

IAFISCO, M., et al., Conjugation of hydroxyapatite nanocrystals with human immunoglobulin G for nanomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (0).

JEONG, B., LEE, K. M., GUTOWSKA, A., e AN, Y. H. (2002). Thermogelling biodegradable copolymer aqueous solutions for injectable protein delivery and tissue engineering. *Biomacromolecules*, 3(4), 865-868.

JULIANO, C., ET AL., Preparation, in vitro characterization and preliminary in vivo evaluation of buccal polymeric films containing chlorhexidine. AAPS PharmSciTech, 2008. 9(4): p. 1153-8.

KAIGLER, D., CIRELLI, J. A., e GIANNOBILE, W. V. (2006). Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering. Expert Opin Drug Deliv, 3(5), 647-662.

KATCHBURIAN, E., e ARANA, V. (2004). Histologia e embriologia oral: texto-atlas-correlações clínicas(2 ed.). Rio de Janeiro

KAWAGUCHI, M., FUKUSHIMA, T., HAYAKAWA, T., NAKASHIMA, N., INOUE, Y., TAKEDA, S., OKAMURA, K., e TANIGUCHI, K. (2006). Preparation of carbon nanotube-alginate nanocomposite gel for tissue engineering. Dent Mater J, 25(4), 719-725.

KIEVIT, F.M., et al., Chitosan-alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment. Biomaterials.

KLÖCK, G., et al., Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. Biomaterials, 1997. 18(10): p. 707-713.

KOLAMBKAR, Y.M., et al., An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. Biomaterials, 2011. 32(1): p. 65-74.

LAGZIEL-SIMIS, S., et al., Protein-mediated nanoscale biotemplating. Curr Opin Biotechnol, 2006. 17(6): p. 569-73.

LANGER, R. AND J.P. VACANTI, Tissue engineering. Science, 1993. 260(5110): p. 920-6.

LANZA R., L. R., VACANTI J. (2007). Principles of Tissue Engineering(3 ed.). San Diego, USA.

LEE, J.W., et al., The effect of spacer arm length of an adhesion ligand coupled to an alginate gel on the control of fibroblast phenotype. *Biomaterials*.

LEE, K.Y. AND D.J. MOONEY, Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*, 2001. 101(7): p. 1869-79.

LEITE, E.R., et al., Photoluminescence in amorphous TiO₂-PbO systems. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 2001. 73(5): p. 567-569.

LIN, H.Y. and C.T. Yeh, Alginate-crosslinked chitosan scaffolds as pentoxifylline delivery carriers. *J Mater Sci Mater Med*.

LIQIANG, J., et al., Effects of Sn dopant on the photoinduced charge property and photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2006. 62(3-4): p. 282-291.

LIU, J., JIN, T., RITCHIE, H. H., SMITH, A. J., e CLARKSON, B. H. (2005). In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 41(7), 232-238.

MITSIADIS, T. A., e RAHIOTIS, C. (2004). Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injury. *J Dent Res*, 83(12), 896-902.

MIURA, M., GRONTHOS, S., ZHAO, M., LU, B., FISHER, L. W., ROBEY, P. G., e SHI, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 5807-5812.

MOONEY, D.J., et al., Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog*, 1996. 12(6): p. 865-8.

NAKASHIMA, M., e AKAMINE, A. (2005). The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod*, 31(10), 711-718.

Nakashima, M., Tissue engineering in endodontics. Aust Endod J, 2005. 31(3): p. 111-3.

NEDEL, F., ANDRE DDE, A., DE OLIVEIRA, I. O., CORDEIRO, M. M., CASAGRANDE, L., TARQUINIO, S. B., NOR, J. E., e DEMARCO, F. F. (2009). Stem cells: therapeutic potential in dentistry. J Contemp Dent Pract, 10(4), 90-96.

NICODEMUS, G.D. AND S.J. BRYANT, Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. Tissue Eng Part B Rev, 2008. 14(2): p. 149-65.

NISHIMURA, H., NISHIMURA, M., ODA, R., YAMANAKA, K., MATSUBARA, T., OZAKI, Y., SEKIYA, K., HAMADA, T., e KATO, Y. (2004). Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells--including bone marrow mesenchymal stem cells--on various scaffolds. Experimental Cell Research, 295(1), 119-127.

NÖR, J. E. (2006). Tooth regeneration in operative dentistry, Operative Dentistry (Vol. v.31, pp. 633-642).

NÖR, J.E., et al., Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. Lab Invest, 2001. 81(4): p. 453-63.

NOVIKOVA, L. N., MOSAHEBI, A., WIBERG, M., TERENCEHI, G., KELLERTH, J. O., e NOVIKOV, L. N. (2006). Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. J Biomed Mater Res A, 77(2), 242-252.

OXLEY, H.R., et al., Macroporous hydrogels for biomedical applications: methodology and morphology. Biomaterials, 1993. 14(14): p. 1064-1072.

PARK, H., KANG, S. W., KIM, B. S., MOONEY, D. J., e LEE, K. Y. (2009). Shear-reversibly crosslinked alginate hydrogels for tissue engineering. Macromol Biosci, 9(9), 895-901.

PENG, L., et al., Preparation and Evaluation of Porous Chitosan/Collagen Scaffolds for Periodontal Tissue Engineering, 2006. p. 207-220.

POPOVSKA, N., et al., Paper derived biomorphic porous titanium carbide and titanium oxide ceramics produced by chemical vapor infiltration and reaction (CVI-R). Journal of the European Ceramic Society, 2005. 25(6): p. 829-836.

QIAN, J., et al., Fabrication, chemical composition change and phase evolution of biomorphic hydroxyapatite. J Mater Sci Mater Med, 2008. 19(11): p. 3373-83.

RAMANAN, S.R. AND R. VENKATESH, A study of hydroxyapatite fibers prepared via sol-gel route. Materials Letters, 2004. 58(26): p. 3320-3323.

RANI, V.V.D., ET AL., Fabrication of alginate/nanoTiO₂ needle composite scaffolds for tissue engineering applications. Carbohydrate Polymers. 83(2): p. 858-864.

RITTER, A.L.d.S., et al., Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology. Dental Traumatology, 2004. 20(2): p. 75-84.

ROOSA, S.M.M., et al., The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 92A(1): p. 359-368.

ROWLEY, J.A., G. MADLAMBAYAN, AND D.J. MOONEY, Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. Biomaterials, 1999. 20(1): p. 45-53.

ROY, I., e GUPTA, M. N. (2003). pH-responsive polymer-assisted refolding of urea- and organic solvent-denatured alpha-chymotrypsin. Protein Eng, 16(12), 1153-1157.

SAKAI, V.T., et al., SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. J Dent Res. 89(8): p. 791-6.

SALEH, I.M., et al., Bacterial penetration along different root canal filling materials in the presence or absence of smear layer. International Endodontic Journal, 2008. 41(1): p. 32-40.

SÃO PAULO, U. (2009). Microscópio Eletrônico de Varredura com EDS e Sistema de Nanolitografia (Vol. <http://fap.if.usp.br/~lff/mev.html>).

SHAMPO, M. A., e KYLE, R. A. (1981). Max von Laue. Jama, 246(13), 1412.

SHI, S., BARTOLD, P. M., MIURA, M., SEO, B. M., ROBEY, P. G., e GRONTHOS, S. (2005). The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. Orthod Craniofac Res, 8(3), 191-199.

SILVA, A. F., TARQUINIO, S. B., DEMARCO, F. F., PIVA, E., e RIVERO, E. R. (2006). The influence of haemostatic agents on healing of healthy human dental pulp tissue capped with calcium hydroxide. Int Endod J, 39(4), 309-316.

SMITH, A. J., e LESOT, H. (2001). Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? Crit Rev Oral Biol Med, 12(5), 425-437.

SONE, T., NAGAMORI, E., IKEUCHI, T., MIZUKAMI, A., TAKAKURA, Y., KAJIYAMA, S., FUKUSAKI, E., HARASHIMA, S., KOBAYASHI, A., e FUKUI, K. (2002). A novel gene delivery system in plants with calcium alginate micro-beads. J Biosci Bioeng, 94(1), 87-91.

STOCH, A., et al., Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium and its alloy Ti6Al4V. Journal of Molecular Structure, 2005. 744-747: p. 633-640.

SULTZBAUGH, K.J. AND T.J. SPEAKER, A method to attach lectins to the surface of spermine alginate microcapsules based on the avidin biotin interaction. Journal of Microencapsulation, 1996. 13(4): p. 363-376.

TAN, R., et al., Preparation and characterization of an injectable composite. *J Mater Sci Mater Med*, 2009. 20(6): p. 1245-53.

TAQVI, S., e ROY, K. (2006). Influence of scaffold physical properties and stromal cell coculture on hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*, 27(36), 6024-6031.

TECLES, O; LAURENT, P; AUBUT, V e ABOUT, I. (2008). Human tooth culture: a study for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *J. biomed Mater Res B Appl Biomater*, 85(1), 180-187.

THESLEFF, I., e SHARPE, P. (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev*, 67(2), 111-123.

TIBBITT, M. W., e ANSETH, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 103(4), 655-663.

TOLGA DEMIRTAS, T., A.G. KARAKECILI, AND M. GUMUSDERELIOGLU, Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in-vitro characterization. *J Mater Sci Mater Med*, 2008. 19(2): p. 729-35.

TONNESEN, H. H., e KARLSEN, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 28(6), 621-630.

TUZLAKOGLU, K., et al., Nano- and micro-fiber combined scaffolds: a new architecture for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*, 2005. 16(12): p. 1099-104.

TZIAFAS, D. (2004). The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res*, 38(3), 314-320.

VARMA, H.K. AND S. SURESH BABU, Synthesis of calcium phosphate bioceramics by citrate gel pyrolysis method. *Ceramics International*, 2005. 31(1): p. 109-114.

WANG, J., ET AL., Fluoridated hydroxyapatite/titanium dioxide nanocomposite coating fabricated by a modified electrochemical deposition. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2009. 20(5): p. 1047-1055.

WEI, G., JIN, Q., GIANNOBILE, W. V., e MA, P. X. (2006). Nano-fibrous scaffold for controlled delivery of recombinant human PDGF-BB. *J Control Release*, 112(1), 103-110.

WIMER, B. M., e MANN, P. L. (2002). Mitogen information summaries. *Cancer Biother Radiopharm*, 17(5), 569-597.

WOO, K.M., V.J. CHEN, AND P.X. MA, Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A*, 2003. 67(2): p. 531-7.

XIE, M., et al., Synthesis of nanocrystalline anatase TiO₂ by one-pot two-phase separated hydrolysis-solvothermal processes and its high activity for photocatalytic degradation of rhodamine B. *J Hazard Mater*. 176(1-3): p. 139-45.

YAN, J., ET AL., Synthesis of uniform TiO₂ nanoparticles with egg albumen proteins as novel biotemplate. *J Nanosci Nanotechnol*. 10(9): p. 5767-75.

YANG, S., ET AL., The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*, 2001. 7(6): p. 679-89.

YOSHIO, I., et al., Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp, 2009. p. NA.

YU, C.Y., et al., Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems. *Int J Pharm*, 2008. 357(1-2): p. 15-21.