



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIELA BOMFIM DE BARROS

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ESTRUTURAS NANOTUBULARES DE DIÓXIDO DE TITÂNIO FUNCIONALIZADAS COM EMULSÕES DE LÍQUIDO IÔNICO E ÓLEO FIXO DE PEQUI (*Caryocar coriaceum* Wittm) E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE OSTEÓBLASTOS

**Recife
2017**

DANIELA BOMFIM DE BARROS

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ESTRUTURAS NANOTUBULARES DE DIÓXIDO DE TITÂNIO FUNCIONALIZADAS COM EMULSÕES DE LÍQUIDO IÔNICO E ÓLEO FIXO DE PEQUI (*Caryocar coriaceum* Wittm) E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE OSTEOLASTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Giovanna Machado

Co-orientadoras: Prof^a. Dra. Janaina Melo

Prof^a. Dra. Regina Célia Bressan

**Recife
2017**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Barros, Daniela Bomfim de

Síntese e caracterização de estruturas nanotubulares de dióxido de titânio funcionalizadas com emulsões de líquido iônico e óleo fixo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) e avaliação da citotoxicidade sobre osteoblastos / Daniela Bomfim de Barros. – 2017.

97 f. : il.

Orientadores: Giovanna Machado, Janaina Melo, Regina Célia Bressan. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2017.

Inclui referências e anexos.

1. Materiais biomédicos 2. Implantes artificiais I. Machado, Giovanna (orientadora) II. Melo, Janaina (coorientadora) III. Bressan, Regina Célia (coorientadora) IV. Título.

610.28

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 049

DANIELA BOMFIM DE BARROS

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ESTRUTURAS NANOTUBULARES DE DIÓXIDO DE TITÂNIO FUNCIONALIZADAS COM EMULSÕES DE LÍQUIDO IÔNICO E ÓLEO FIXO DE PEQUI (*Caryocar coriaceum* Wittm) E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE OSTEÓBLASTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE, Área de Concentração Biotecnologia, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 31/07/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr.^a Giovanna Machado

Orientadora
(CETENE)

Dr.^a Márcia Vanusa da Silva

Examinadora Titular
(UFPE)

Dr.^a Germana Michelle de Medeiros e Silva

Examinadora Titular
(CETENE)

Dr.^a Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Examinadora Suplente
(Cpqam/FIOCRUZ)

Dr.^a Karina Lidianne Alcântara Saraiva

Examinadora Suplente
(Cpqam/FIOCRUZ)

Dedico este trabalho ao Senhor Deus, Autor e Consumador da minha fé e aos meus pais, irmã e noivo pelo incentivo, carinho, cuidado e por estarem sempre ao meu lado, sempre torcendo e acreditando em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todo o amor e misericórdia, pois nos momentos difíceis, nos quais as forças pareciam se esvaír, Ele sempre se fez presente e me ajudou a superar os obstáculos para, assim, alcançar mais uma vitória em minha vida;

Aos meus pais, Antônio Pedro Bomfim de Barros e Maria da Conceição Bomfim de Barros, por existirem, me amarem e apoiarem incondicionalmente;

À minha irmã, Rafaela Bomfim de Barros, pela relação fraterna, conversas nos momentos de dificuldade e apoio irrestrito;

Ao meu noivo, Bruno Leonardo Alves Chalegre, por todo o amor, carinho, amizade, compreensão e paciência, sempre demonstrados;

Às minhas avós, Lúcia Maria do Bomfim Ribeiro (*in memoriam*) e Diva Bomfim de Barros (*in memoriam*) por terem sido, para mim, exemplos de mulheres perseverantes, fortes, batalhadoras e decididas;

Ao meu avô, José Ribeiro de Barros (*in memoriam*), que certamente estaria orgulhoso por mais esta conquista;

Aos meus amigos e anjos Leonardo Martins, Viviane Lansky, Marcela Sarmiento, Nandara Costa e Zilmar Pimenta, por toda a ajuda, carinho, amizade, companheirismo e momentos de divertimento. Vocês moram no meu coração!

Ao meu cunhado Hélder Lopes por toda a ajuda em Recife. Muito obrigada, Hélder!

À minha orientadora, Professora Doutora Giovanna Machado, pela orientação e colaboração nessa trajetória;

Às minhas co-orientadoras, Professora Doutora Regina Bressan e Professora Doutora Janaina Melo também pela orientação e colaboração;

Às professoras Doutoras Tereza Correia e Márcia Vanusa pela colaboração;

Aos professores Doutores Victor Hugo Vitorino Sarmiento e Jean Costa pelas contribuições intelectuais;

À minha amiga Sarah Romini por toda a ajuda e colaboração ao longo da pesquisa, tendo sido essencial em diversos momentos. Obrigada, Sarinha!

À Isabel Renata Arruda, pela paciência, além de toda a ajuda oferecida ao longo de todo o período do mestrado;

À Keicyanne dos Anjos por auxiliar nos experimentos com as células e por ajudar a esclarecer dúvidas que surgiam;

À Henrique Barbosa, por sempre estar disposto a ajudar e a dirimir dúvidas, além de contribuir significativamente para o andamento da pesquisa;

À Whanderson Falcão por toda a amizade, auxílio, colaboração, companheirismo, trocas de experiências e momentos compartilhados;

Aos amigos Rayane Santos e Wesley Félix também pela amizade, companheirismo e colaboração;

À Iwanne Lima Coelho por todo o auxílio com a parte estatística do trabalho;

A todos os colegas do laboratório de Nanotecnologia que ajudaram e contribuíram para elucidar as dúvidas que surgiam no decorrer da pesquisa;

Ao CETENE por ter cedido sua estrutura para a concretização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, à Universidade Federal de Pernambuco e à FACEPE pela ajuda financeira;

Por fim, a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e que, porventura, não foram citados, meus sinceros agradecimentos!

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

Simone de Beauvoir

RESUMO

Implantes biomédicos têm sido bastante usados a fim de substituir ou reparar tecidos com lesões, podendo ser de origem natural ou sintética. Porém, em alguns casos, pode acontecer corrosão desses implantes com consequente liberação de íons para o organismo ou mesmo osseointegração imperfeita, o que pode gerar danos à saúde, bem como ocasionar a perda parcial ou total do implante. Neste sentido, tratamentos de superfície de TiO_2 , com a finalidade de produzir nanotubos (NTs), têm sido amplamente utilizados, pois tais nanotubos auxiliam na otimização da biocompatibilidade, mimetizam a estrutura nanométrica do osso e são resistentes à corrosão. A funcionalização desses nanotubos com moléculas bioativas também tem sido estudada, pois pode auxiliar a melhorar a ação dos implantes. O presente estudo objetivou a obtenção de nanotubos de dióxido de titânio (TiO_2) por meio de oxidação anódica, sua caracterização e, posteriormente, funcionalização com emulsões do líquido iônico ditetrafluorborato de 1,8-bis (3-metilimidazol-1-íneo) octano (LIBF_4) e óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm (pequi) e aplicação do sistema frente aos osteoblastos, a fim de avaliar sua citotoxicidade, adesão celular e potencial osteogênico. Os NTs de TiO_2 foram caracterizados por Difração de raios-X (DRX), que comprovou a presença da fase anatase no TiO_2 , importante para a nucleação da hidroxiapatita e a mesma técnica também evidenciou a cristalinidade do LIBF_4 ; a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) demonstrou a presença de camadas de NTs organizados; o óleo de *Caryocar coriaceum* Wittm. foi caracterizado por meio Cromatografia gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-FID), que mostrou ser o ácido oleico seu composto majoritário, com 42,33% da composição do óleo; as análises de TG/DSC do óleo, LIBF_4 e emulsões indicam sua estabilidade térmica; as análises reológicas mostraram que todos os sistemas apresentaram comportamento newtoniano típico de emulsões, o que também corrobora com sua estabilidade; o potencial zeta, tamanho de partícula (DLS) e índice de polidispersão (PDI) também confirmaram a estabilidade das emulsões, com potencial na faixa entre -30v e +30v, tamanhos entre 200 e 1000 nm e polidispersão abaixo de 0,2; já a funcionalização foi confirmada por espectroscopia Raman, que indicou que houve a deposição das amostras na superfície dos nanotubos. Também foram feitos testes para a avaliação da citotoxicidade do óleo de pequi, do líquido iônico e das emulsões selecionadas pelo ensaio de redução do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) e verificou-se que, em 72 horas, boa parte das amostras apresentou citotoxicidade abaixo de 50%. Por fim, foi feita análise da adesão celular por microscopia de fluorescência das amostras de TiO_2 funcionalizadas com as emulsões, que mostrou ser a amostra NTs+EM6 a que teve melhor aderência dos osteoblastos (109%) em relação às superfícies que apresentaram apenas NTs (100%). Dessa

forma, são necessários estudos mais detalhados a fim de investigar o potencial mitogênico da emulsão EM6.

Palavras-chave: Líquido iônico. Tratamento de superfície. Funcionalização. Osseointegração. LIBF₄. Óleo de pequi.

ABSTRACT

Biomedical implants have been widely used in order to replace or repair tissues with lesions, which may be of natural or synthetic origin. However, in some cases, corrosion of implants with consequent release of ions to the organism may happen or even imperfect osseointegration can occur, which can cause damage to health, as well as partial or total implant loss. In this sense, surface treatment of TiO₂, in order to produce nanotubes (NTs), has been widely used, because such nanotubes aid in the optimization of biocompatibility, mimic the nanometric structure of the bone and are resistant to corrosion. The functionalization of these nanotubes with bioactive molecules has been studied, as it may help to improve the action of the implants. The present study aimed to obtain titanium dioxide (TiO₂) nanotubes by means of anodic oxidation, its characterization and, later, functionalization with emulsions of the ionic liquid 1,8-bis (3-methylimidazolium-1-yl) octanetrafluoroborate (LIBF₄) and fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm (pequi) and application of the system to osteoblasts in order to evaluate their cytotoxicity, cell adhesion and osteogenic potential. The TiO₂ NTs were characterized by X-ray diffraction (XRD), which confirmed the presence of the anatase phase in TiO₂, important for the nucleation of hydroxyapatite and the same technique also showed the crystallinity of LIBF₄; Scanning Electron Microscopy (SEM) demonstrated the presence of layers of NTs organized; The oil of *Caryocar coriaceum* Wittm was characterized by gas chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID) which showed that oleic acid was its major compound, with 42,33% of the composition of the oil; The TG / DSC analyzes of the oil, LIBF₄ and emulsions indicate its stability; The rheological analyzes showed that all the systems presented typical newtonian behavior of emulsions which also corroborates its stability; The zeta potential, particle size (DLS) and polydispersity index (PDI) also confirmed the stability of the emulsions, with potential in the range of -30v to + 30v, sizes between 200 and 1000 nm and polydispersion below 0,2; The functionalization was confirmed by Raman spectroscopy, which indicated the deposition of the samples on the surface of the nanotubes. Tests were carried out to evaluate the cytotoxicity of pequi oil, ionic liquid and emulsions selected by the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay, and it was found that within 72 hours a good part of the samples showed cytotoxicity below 50%. Finally, the cell adhesion was analyzed by fluorescence microscopy of the TiO₂ samples functionalized with the emulsions, which showed to be the NTs + EM6 sample, which had a better adhesion of the osteoblasts (109%) in relation to the surfaces that presented only NTs (100%). Thus, more detailed studies are needed to investigate the mitogenic potential of EM6 emulsion.

Keywords: Ionic liquid. Surface treatment. Functionalization. Osseointegration. LIBF₄. Pequi oil.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Esquema mostrando a osseointegração finalizada entre o titânio e o osso.	20
Figura 2 Exemplos de biomateriais utilizados na área biomédica: (A) implante ortopédico, (B) dentário e (C) lente intraocular.	21
Figura 3 Fases cristalográficas do titânio: a) fase α ou hexagonal compacta e b) fase β ou corpo centrado.	23
Figura 4 Microestrutura do tecido ósseo.	27
Figura 5 Pequizeiro florido.	28
Figura 6 Esquema dos principais tipos de emulsões.	32

ARTIGO: ANÁLISE DA ADERÊNCIA CELULAR SOBRE NANOTUBOS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO FUNCIONALIZADOS COM EMULSÕES DE LÍQUIDO IÔNICO E ÓLEO FIXO DE PEQUI (*CARYOCAR CORIACEUM* WITTM.)

Figura 1 Esquema de anodização de nanotubos de TiO ₂	36
Figura 2 Esquema do processo de obtenção do óleo de fixo de Caryocar coriaceum.	37
Figura 3 Estrutura química do Líquido iônico Ditetrafluorborato de 1,8-bis (3-metilimidazol-1-íneo) octano.	38
Figura 4 Esquema do processo de obtenção das emulsões.	39
Figura 5 Difratoograma de DRX dos nanotubos (NTs) de TiO ₂ antes (NTs STT) e após (NTs TT 400°C) o tratamento térmico. Ti refere-se ao pico do titânio e A indica a fase anatase do TiO ₂	43
Figura 6 Difratoograma de DRX do [BisOct(MIM) ₂][2BF ₄] (LIBF ₄).	44
Figura 7 Imagens de MEV dos NTs em diferentes magnitudes: (a) 20.000x e (b) 30.000x.	45
Figura 8 Cromatograma do perfil de ácidos graxos da amostra óleo da semente de pequi.	45
Figura 9 Análise termogravimétrica do Óleo de pequi (a) Curvas de TG e DTG e (b) TG e DSC.	47
Figura 10 Análise termogravimétrica do LIBF ₄ (a) Curvas de TG e DTG e (b) TG e DSC.	48
Figura 11 Análises termogravimétricas das emulsões EM1 a EM6 (a) Curvas de TG e DTG e (b) TG e DSC.	50
Figura 12 Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as amostras EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6.	51
Figura 13 Espectros dos componentes da emulsão $\lambda = 785$ nm.	52
Figura 14 Espectros Raman da Emulsão, TiO ₂ -Emulsão e TiO ₂ -emulsão após a lavagem com tampão. $\lambda = 785$ nm.	53

Figura 15 Citotoxicidade do óleo de Pequi em 72h.....	54
Figura 16 Porcentagem de células viáveis (%), incubadas por 72 h, a 37°C, em placa de Petri contendo diferentes concentrações de óleo de pequi: 15,63 (1); 31,25 (2); 62,5 (3); 125 (4) µg/ml (5). Valores médios de viabilidade celular, em cada dosagem, foram estatisticamente diferentes entre si, pela regressão em análise de variância ($p < 0,05$).....	54
Figura 17 Citotoxicidade do óleo do LIBF4 em 72h.....	55
Figura 18 Porcentagem de células viáveis (%), incubadas por 72 h, a 37°C, em placa de Petri, contendo diferentes concentrações de óleo de pequi: 15,63 (1); 31,25 (2); 62,5 (3); 125 (4); e 250 µg/ml (5). Valores médios de viabilidade celular, em cada dosagem, foram estatisticamente diferentes entre si, pela regressão em análise de variância ($p < 0,05$).....	55
Figura 19 Citotoxicidade das emulsões EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6 em 72h.....	56
Figura 20 Porcentagem de células viáveis (%), incubadas por 72 h, a 37°C, em placas de Petri, com as emulsões EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6. Médias seguidas por letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.....	57
Figura 21 Avaliação dos osteoblastos cultivados sobre diferentes amostras.....	59
Figura 22 Quantificação da adesão dos osteoblastos sobre diferentes amostras NTs (nanotubos), NTs+ óleo (nanotubos e óleo), NTs + LI (nanotubos e líquido iônico), NTs + EM1 (nanotubos e emulsão 1), NTs + EM2 (nanotubos e emulsão 2), NTs + EM3 (nanotubos e emulsão 3), NTs + EM4 (nanotubos e emulsão 4), NTs + EM5 (nanotubos e emulsão 5), NTs + EM6 (nanotubos e emulsão 6). Médias seguidas por letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,01$), pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, com dados transformados pelo modelo log (x).....	60

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 Classificação de dispositivos médicos implantáveis. 24

ARTIGO: ANÁLISE DA ADERÊNCIA CELULAR SOBRE NANOTUBOS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO FUNCIONALIZADOS COM EMULSÕES DE LÍQUIDO IÔNICO E ÓLEO FIXO DE PEQUI (*CARYOCAR CORIACEUM* WITTM.)

Tabela 1 Proporções de fase oleosa, fase aquosa (com e sem LI) e Tween 80 das amostras EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6. 38

Tabela 2 Perfil de ácidos graxos do óleo da semente de pequi extraído a frio. Os valores em triplicata, estão expressos em média \pm desvio-padrão. 46

Tabela 3 viscosidade das amostras EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6. 51

Tabela 4 DLS (nm), PDI e potencial zeta (mV) das emulsões. 52

Tabela 5 Avaliação de adesão celular¹ de osteoblastos em diferentes substratos funcionalizados. . 60

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

[BisOct(MIM)2] [2BF ₄]	1,8-bis (3-metilimidazol-1-neo) octano
[BMIM] [PF ₆]	hexafluorofosfato de IL-1-butil-3-metil-imidazolium
µg/mL	Microgramas por mililitro
µm	Micrmetro
A	Anatase
A/O	gua em leo
A ₁ /O/A ₂	gua em óleo em gua
ANOVA	Análise de Variância
<i>C. coriaceum</i>	<i>Caryocar coriaceum</i>
Ca	Cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
Cp-Ti	Titânio comercialmente puro
Cu	Cobre
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DI	gua deionizada
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
DRX	Difraco de Raios X
DSC	Calorimetria Explortria Diferencial
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Emulsão
Fe	Ferro
GC-FID	Cromatografia gasosa com Detector por Ionizao de Chama
He	Hélio
HOS	<i>Human osteosarcom cells</i>
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
kV	quilovolt
LI	Líquido iônico
LIBF ₄	Líquido iônico BF ₄

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL/min	Mililitros por minuto
mol/L	mol por litro
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
mV	Milivolt
N ₂	Nitrogênio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sódio Anidro
nm	Nanômetro
NTs	Nanotubos
O/A	Óleo em água
O ₁ /A/O ₂	Óleo em água em óleo
P	Fosfato
Pa.s.	Pascal
PBS	Solução Fosfato Salina
PDI	Índice de Polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
STT	Sem Tratamento Térmico
TGA	Análise Termogravimétrica
Ti	Titânio
TiO ₂	Dióxido de titânio
TT	Tratamento Térmico
V	Volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 OSSEOINTEGRAÇÃO	20
2.2 BIOMATERIAIS: CONCEITO E EVOLUÇÃO	21
2.2.1 Classificação dos biomateriais	22
2.2.2 Titânio	22
2.2.3 Implantes biomédicos	24
2.3 TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE	26
2.4 <i>CARYOCAR CORIACEUM</i> WITTM. (PEQUI)	27
2.5 LÍQUIDOS IÔNICOS.....	30
2.6 EMULSÕES.....	31
3 ARTIGO: ANÁLISE DA ADERÊNCIA CELULAR SOBRE NANOTUBOS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO FUNCIONALIZADOS COM EMULSÕES DE LÍQUIDO IÔNICO E ÓLEO FIXO DE PEQUI (<i>CARYOCAR CORIACEUM</i> WITTM.)	33
4 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO A- NORMAS DA REVISTA <i>BIOMATERIALS</i>	82

1 INTRODUÇÃO

Denomina-se biomaterial todo e qualquer material de origem natural ou sintética, que possa ser empregado em substituição total, parcial ou mesmo na reparação de tecidos lesionados, a fim de auxiliar na reconstituição da estrutura biológica perdida ou debilitada, visando restaurar forma e função (GEETHA et al., 2009).

Os biomateriais podem ser feitos a partir de metais, cerâmicas, polímeros e compósitos. Entre os biomateriais, os metálicos têm sido bastante utilizados na área médica, pois auxiliam a reforçar a estrutura ou restauram a função de tecidos duros, os quais são utilizados em próteses de joelho, quadril, reconstrução facial, implantes dentários, entre outros (OH et al., 2005).

O metal mais utilizado para a confecção de implantes biomédicos é o titânio (Ti), o qual possui inúmeras propriedades que fazem do mesmo um excelente biomaterial. Algumas dessas características incluem: elevada biocompatibilidade, resistência à corrosão, simples fabricação, baixo custo e resistência à corrosão (ZHOU et al., 2005; ORÉFICE et al., 2012). Tais características do titânio se devem, em sua maioria, ao fenômeno conhecido como passivação, que resulta na formação de uma fina camada de dióxido de titânio (TiO_2), a qual pode surgir de maneira espontânea ou mesmo por ação de ácidos fortemente oxidantes e que impede a liberação de íons para o meio externo (LIU; CHU; DING, 2005).

Dentre as diversas problemáticas associadas ao uso de implantes encontram-se a corrosão e a osseointegração imperfeita. No primeiro caso, a corrosão dos implantes dentro do organismo leva à liberação de íons que, em grande quantidade, podem gerar riscos à saúde do paciente, já na segunda situação, o processo de osseointegração, que consiste na união estável entre o osso e a superfície do material metálico, pode não acontecer de forma bem-sucedida podendo, inclusive, ocasionar desde infecções relativamente brandas a infecções mais severas. Dessa forma, faz-se necessário que haja um tratamento da superfície do biomaterial, a fim de torná-la bioativa. A anodização, por exemplo, é um tipo de tratamento onde há a produção de um filme na superfície do metal, decorrente de oxidação gerada pelo tratamento eletrolítico do ânodo. Tal processo de oxidação anódica é capaz de produzir nanotubos, estruturas cilíndricas de dimensões nanométricas, as quais conseguem mimetizar a estrutura óssea, aumentando a biocompatibilidade e facilitando, assim, o processo de integração óssea (MINAGAR et al., 2012; ANUSAVICE et al., 2013).

A funcionalização de nanotubos de dióxido de titânio (TiO_2) com moléculas bioativas tem sido amplamente utilizada para melhorar a capacidade osteoindutora e, assim, reduzir o risco de rejeição dos implantes biomédicos (WENG et al., 2012; MAHO et al., 2013). Diversas são as

moléculas bioativas utilizadas, dentre elas quitosana (BUMGARDNER et al, 2007), quercitina (MOHAN; ANANDAN; RAJENDRAN, 2016), icariin (ZHANG et al, 2016), entre outras.

A aplicação terapêutica do pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) é bastante diversificada, o que tem levado à realização de diversos estudos para a comprovação das atividades anti-inflamatória, acelerando o processo de reparação cutânea de feridas (OLIVEIRA et al., 2010;SARAIVA et al., 2011), hipolipêmica (FIGUEIREDO et al., 2016), antifúngica (PASSOS et al., 2008; SANCHES et al., 2008), gastroprotetora (QUIRINO et al., 2009), antimicrobiana (ARARUNA et al., 2013) e antioxidante (TORRES et al., 2016).

Os líquidos iônicos (LI), sais fundidos formados por um cátion orgânico e um ânion inorgânico e com um baixo ponto de fusão (GOLEDZINOWSKI et al.,1993), também possuem ampla aplicação: em superfície de implantes dentários para melhor ancoragem e maior área de superfície (MAHO et al., 2013); na produção de resinas dentais e apresentam eficácia no combate a *Streptococcus mutans* (WENG et al., 2012); atividade cariostática e potencial para transmitir propriedade anticariogênica a materiais dentários à base de resina (ANTONUCCI et al., 2009); também possuem propriedades que envolvem lubrificação (PREOCANIN; KALLAY, 2006; MONTI, 2008; WANG, 2009; VALLEE; HUMBLLOT; PRADIER, 2010) e proteção contra a corrosão (MINAMI,2009).

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, que consistem na mistura de dois líquidos imiscíveis, ou seja, são compostos pela micibilização de uma fase hidrofílica e outra lipofílica, estabilizada por uso de tensoativos e, em alguns casos, até mesmo de cotensoativos (MADAAN et al, 2014).

Neste contexto, o presente trabalho se justifica pela alta relevância da realização de estudos que visem desenvolver metodologias inovadoras que aumentem a adesão de células formadoras do osso na superfície do implante, estimulem sua proliferação e diminuam o risco de infecções.

1.1 OBJETIVOS

GERAL

Este trabalho tem como objetivo principal a síntese e caracterização de estruturas nanotubulares de dióxido de titânio, bem como o desenvolvimento de emulsões a partir de líquido iônico e óleo fixo de pequi para a funcionalização destes nanotubos, a fim de melhorar a capacidade destes sistemas sobre osteoblastos.

ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar os nanotubos a partir do processo de oxidação anódica;
- ✓ Produzir as emulsões de líquido iônico e óleo fixo de pequi;
- ✓ Funcionalizar os nanotubos de TiO_2 com as misturas de óleos fixos e líquidos iônicos através da técnica de *Spin Coating*;
- ✓ Caracterizar as amostras através das técnicas de Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Cromatografia gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-FID), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise Termogravimétrica (TG), Reologia, Raman, potencial zeta, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Índice de Polidispersão (PDI);
- ✓ Avaliar a citotoxicidade das soluções incorporadas (óleo, líquido iônico e emulsões);
- ✓ Avaliar a morfologia, adesão, espalhamento e densidade celular dos osteoblastos humanos nas matrizes funcionalizadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OSSEOINTEGRAÇÃO

No ramo de implantes dentários as pesquisas de Branemark (1983) desenvolveram o conceito de osseointegração quando investigavam a cicatrização óssea em coelhos. Neste estudo, uma câmera óptica de titânio foi inserida no osso para observar o processo de osteogênese (formação óssea) em coelhos. Após alguns meses, quando da retirada desta câmera, observou-se que a mesma estava fortemente fixada ao osso e o tecido ao redor não mostrava sinais de inflamação. O fenômeno da osseointegração é, portanto, definido como a união estável e funcional entre o osso e a superfície do material implantado, com a ausência de tecido fibroso na interface osso-implante (BRANEMARK,1983).

A osseointegração (**Figura 1**) ocorre em três estágios, nos quais se processam diversos eventos. Primeiramente ocorre alteração do pH, liberação de enzimas e proteínas reguladoras na superfície do implante. Uma camada glicoproteica e aquosa é formada, servindo de substrato para a adesão, proliferação e diferenciação celular. Em seguida, células osteogênicas migram para a superfície do implante através da rede de fibrina. As células secretam uma matriz orgânica sem colágeno, que fornece sítios para a nucleação de fósforo e cálcio. Por fim, ocorre a formação de colágeno e a mineralização da matriz com a consequente remodelação óssea(KHAN; RAMACHANDRAN; SENTHIL, 2012).

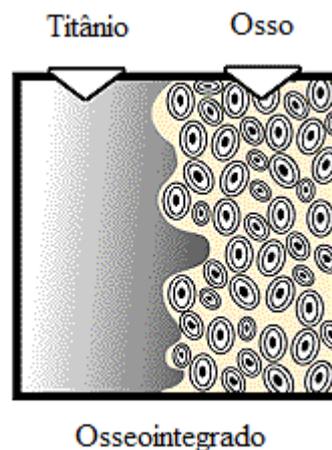


Figura 1 Esquema mostrando a osseointegração finalizada entre o titânio e o osso.

Fonte: <http://www.intelligentdental.com/wp-content/uploads/2012/03/image002.gif>

Existem alguns fatores determinantes para o sucesso do implante, dentre eles: biocompatibilidade do implante, características de design, características da superfície do implante, estado do arcabouço, técnica cirúrgica e condições de carga do implante. A escolha adequada do

biomaterial a ser usado na confecção do implante também pode ser de primordial importância para o sucesso do mesmo (ISA; HOBKIRK, 2000).

2.2 BIOMATERIAIS: CONCEITO E EVOLUÇÃO

Os biomateriais foram definidos, inicialmente, como materiais que interferem em sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir um tecido, órgão ou função do corpo. No entanto, na atualidade, com o avanço das tecnologias, bem como cuidados com a saúde, a palavra foi refinada, designando, agora, substância, palavra esta projetada para assumir forma usada para direcionar, por controle de interações, o curso de qualquer procedimento (YANO et al., 2013).

São inúmeras as aplicações dos biomateriais, dentre elas: dispositivos médicos cardiovasculares (*stents*, enxertos, entre outros), aplicações ortopédicas e dentárias (implantes, arcabouços teciduais projetados, etc), aplicações oftalmológicas (lentes de contato, próteses retiniais, etc), bioeletrodos e biossensores, queimaduras e substitutos da pele, suturas e sistemas de liberação controlada de fármacos (*drug delivery*) (**Figura 2**) (REZAIE; BAKHTIARI; ÖCHSNER, 2015).

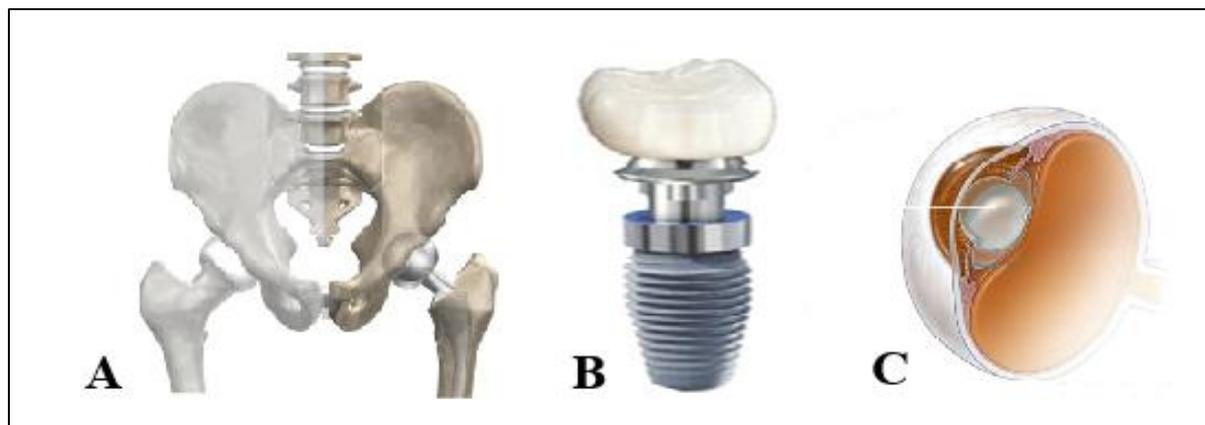


Figura 2 Exemplos de biomateriais utilizados na área biomédica: (A) implante ortopédico, (B) dentário e (C) lente intraocular.

Fonte: elaborado pela autora.

Há 60 anos o termo “biomateriais” ainda não havia sido criado e os mesmos como os conhecemos atualmente não existiam. No entanto, a existência desses materiais remonta aos tempos antigos e existem diversas evidências do uso dos mesmos ao longo da história, sendo algumas delas: suturas usadas há mais de 32.000 anos; descoberta da prótese mais antiga conhecida datada de 2.600 anos achada em Tebas, Egito; dentes de ouro usado por chineses, romanos e astecas há 2.000 anos, entre outros (RATNER et al., 2004).

Alguns eventos históricos propiciaram um grande avanço no conhecimento relativo aos biomateriais. A Revolução Industrial trouxe consigo a mecanização dos sistemas produtivos, auxiliando no desenvolvimento e aprimoramento de materiais. Já a Segunda Guerra Mundial ofereceu grande demanda por biomateriais, haja visto a grande quantidade de pacientes gravemente feridos. Em 1975 foi criada a *Society for Biomaterials*, com a missão de promover avanços em todos os aspectos da ciência de biomateriais, educação e qualificação profissional a fim de melhorar a saúde humana e qualidade de vida (RATNER et al., 2004; SOCIETY FOR BIOMATERIALS, 2014).

2.2.1 Classificação dos biomateriais

Os biomateriais se classificam, basicamente, em função da resposta do organismo (compatibilidade com o tecido circundante) e de acordo com sua origem (LYMAN, 1974; GIBBONS, 1975; WILLIAMS, 1976).

De acordo com a resposta do sistema biológico existem quatro tipos de biomateriais: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioabsorvíveis. Os materiais biotoleráveis são os que, após implantação, são envolvidos por tecido fibroso, não conseguindo se unir ao osso; já os bioinertes, após implantação, não são envolvidos por tecido fibroso e, desse modo, permitem a união com o osso. Os bioativos realizam difusão de íons, promovendo união química na superfície do implante, o que favorece a integração do biomaterial com o osso e os bioabsorvíveis são aqueles que lentamente são degradados e substituídos, aos poucos, por tecidos novos (LÓPEZ, 2007; PARIDA; BEHERA; MISHRA, 2012).

Já de acordo com a origem e composição química dos biomateriais, os mesmos podem ser classificados em metálicos, cerâmicos, poliméricos, compósitos e de vidro. Dentre eles, os biomateriais metálicos se destacam, pois são os mais utilizados na área biomédica, sob a forma de implantes dentários, parafusos, placas de fixação, entre outros, sendo o titânio (Ti) e suas ligas os mais usados (NAVARRO et al., 2008).

2.2.2 Titânio

O titânio (Ti) e suas ligas são os metais mais usados na fabricação de biomateriais metálicos, sendo usados na reposição de tecidos duros, aplicações cardiovasculares e válvulas cardíacas (RENZ, 2007). Sua biocompatibilidade se dá devido à camada de óxido formada na superfície do metal (DAVIS, 2003; SUL et al., 2001).

Titânio é um metal de transição, o qual possui número atômico e massa atômica 22 e 48,88, respectivamente. É, também, o nono elemento mais abundante encontrado na crosta terrestre e necessita ser extraído de reservas minerais de rutilo e ilmenita. O titânio é um material que apresenta alotropia, ou seja, possui duas formas cristalinas (**Figura 3**), sendo elas fase α e fase β . A fase α , com estrutura hexagonal compacta, ocorre em temperaturas abaixo de 882°C, já a fase β , que se apresenta na forma de cristal cúbico de corpo centrado, ocorre em temperaturas acima de 882°C (PRASAD et al., 2015).

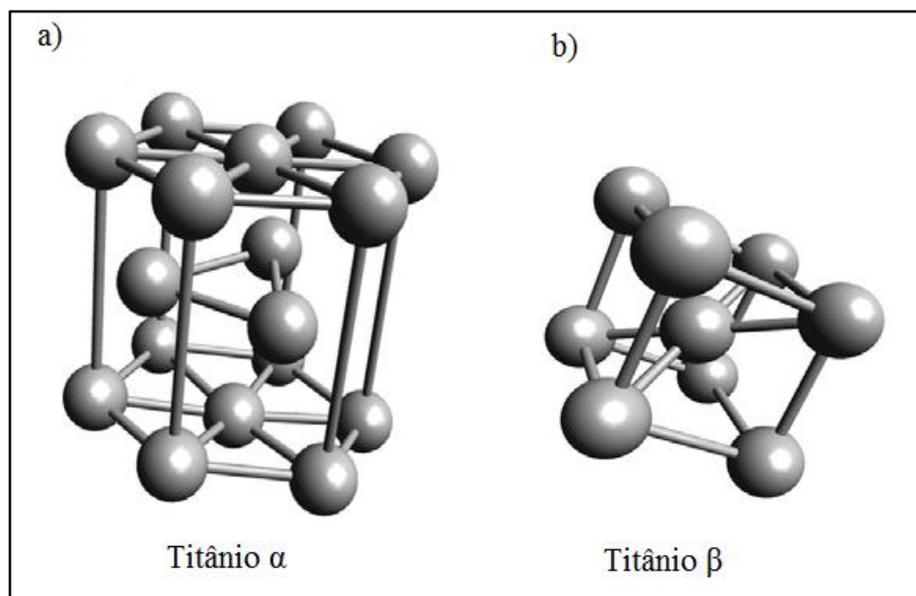


Figura 3 Fases cristalográficas do titânio: a) fase α ou hexagonal compacta e b) fase β ou corpo centrado.

Fonte: Adaptado de PRASAD et al. (2015).

Com base na composição e fases predominantes à temperatura ambiente, as ligas de titânio se classificam em três tipos: ligas α , ligas β e ligas $\alpha+\beta$. Ligas α contém elementos como alumínio e estanho e possuem resistência, dureza e soldabilidade maior que ligas β . As ligas de fase β , que contém elementos de transição como vanádio, nióbio e molibdênio, possuem elevada forjabilidade e têm sido bastante usadas em aplicações biomédicas e aeroespaciais. Já as ligas do tipo $\alpha+\beta$ (a liga mais conhecida é a Ti-6Al-4V, bastante usada como biomaterial) são aquelas que apresentam ambas as fases em sua composição (combina as melhores características das duas fases) podendo conter de 10 a 50% de fase β em temperatura ambiente e sendo controladas através de tratamento térmico (HENRIQUES, 2009).

De acordo com a resistência à corrosão, ductibilidade e força, o titânio comercialmente puro (CP) encontra-se disponível em quatro graus distintos (1, 2, 3 e 4). O CP-Ti grau 1 possui a maior resistência à corrosão, formabilidade e menor força; o CP-Ti grau 2 é o mais usado na área médica; o CP-Ti grau 3 possui aplicações que podem envolver temperaturas criogênicas; já o CP-grau 4

apresenta força mais elevada com formabilidade moderada. Desse modo, o titânio CP constitui-se em uma escolha bastante atraente para os implantes biomédicos (FORT WAYNE METALS, 2017). Pesquisas na área de materiais nanoestruturados têm atraído atenção da comunidade científica devido ao surgimento crescente de novas aplicações científicas e tecnológicas que exploram suas propriedades. De modo geral, nanomateriais são utilizados na síntese química, catálise, biossensores e dispositivos eletrônicos (CHAUDHURI et al, 2012; ZHU et al, 2015) e recentemente tem também sido aplicados como biomateriais, neste último podemos destacar os implantes biomédicos.

2.2.3 Implantes biomédicos

Como o próprio nome sugere, os implantes biomédicos são dispositivos médicos e estruturas que são inseridos diretamente no corpo do paciente, desenvolvidos pela indústria a partir de estudos de engenharia biomédica e usados para aumentar a qualidade de vida do paciente. Um dos implantes biomédicos que mais ganhou destaque na última década foi o implante de quadril, pois não apenas pessoas com faixa etária acima de 60 anos, com deterioração óssea e articular, recorrem a esse tipo de implante, mas também pessoas jovens, com mobilidade articular inferior àquela ideal (BIOMEDICAL ENGINEERING GUIDE, 2017).

Com base nas finalidades para as quais os implantes se destinam, existe uma classificação em três grandes categorias (**Tabela 1**): implantes cardiovasculares, implantes ortopédicos e implantes para outras utilizações (KHAN et al., 2014).

Tabela 1 Classificação de dispositivos médicos implantáveis.

Implantes ortopédicos	Implantes cardiovasculares	Outros implantes médicos
Substituições reconstrutivas de articulações ^a	Dispositivos de passo ^b	Implantes de otolaringe ^{b,c}
<ul style="list-style-type: none"> • Substituições de joelho • Implantes de substituição de quadril • Outras substituições reconstrutivas de articulações 	<ul style="list-style-type: none"> • Dispositivos de terapia de ressincronização cardíaca • Defibriladores-cardioversores implantáveis • Marcapassos cardíacos implantáveis 	<ul style="list-style-type: none"> • Implantes cocleares • <i>Stents</i> de vias aéreas e esofágicas • Implantes cosméticos-implantes de seio
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Implantes de ombro 	<ul style="list-style-type: none"> • Acessórios de passo-condutores de passo, baterias de passo 	Implantes oftálmicos ^b

✓ Implantes de cotovelo	Stents cardíacos e implantes relacionados ^{b,c}	• Lentes intraoculares
✓ Implantes de tornozelo	• Stents coronários- stents de liberação de fármacos, stents coronários de metal puro	• Glaucoma e outras lentes
✓ Substituições de articulações	• Implantes relacionados ao stent- Enxertos sintéticos- enxertos vasculares, enxertos periféricos- filtros de veia cava	Neuroestimuladores ^b
Implantes espinhais ^a	Implantes cardíacos estruturais ^a	Implantes gastroenterológicos ^b
• Implantes toracolombares	• Válvulas cardíacas e acessórios	• Bandas gástricas
• Espaçadores intervertebrais	• Válvulas cardíacas de tecido	• Stents biliares
• Dispositivos de preservação do movimento	• Dispositivos de assistência ventricular	• Implantes urológicos
• Implantes cervicais	✓ Gravadores de <i>loop</i> inseríveis	Dispositivos ginecológicos ^b
• Estimuladores implantáveis espinhais	✓ Monitores hemodinâmicos implantáveis	• Reparo de tecidos moles
Ortobiológicos ^b		• Dispositivos intra-uterinos
• Ácido hialurônico		Implantes de drogas ^c
• Substitutos ósseos		• Implantes hormonais
• Fatores de crescimento ósseo		• Produtos de braquiterapia
• Cimento ósseo		• Bombas de drogas implantáveis
Implantes de traumatismo ^b		
• Dispositivos de fixação interna		
• Implantes craniomaxilofaciais		
• Estimuladores trauma implantáveis		

^aSuporte estrutural e mecânico

^bSuporte funcional

^c*Drug delivery* localizado

Fonte: Khan et al. (2014).

De acordo com Khan et al. (2014), os implantes ortopédicos continuarão a ser o maior e mais rentável segmento de dispositivos implantáveis do mercado e isso decorre do fato de ser crescente a prevalência de doenças musculoesqueléticas degenerativas, mudanças no estilo de vida que colocam as pessoas em risco e ferimentos provocados por acidentes, exercícios, entre outros, ou seja, a demanda de pacientes é crescente. Boa parte dos implantes ortopédicos são feitos à base de titânio (Ti) que, como se sabe, é um material que, dentre muitas características, possui elevada resistência à corrosão e biocompatibilidade superior. Entretanto, mesmo em implantes de titânio, infecções são o principal problema associado a dispositivos implantáveis, o que pode até mesmo levar à perda do bioimplante. Desta forma, novos tratamentos estão sendo testados a superfícies destes implantes para aumentar a biocompatibilidade deste ao corpo. A seguir serão abordados alguns tratamentos de superfície desenvolvidos para este fim.

2.3 TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE

Os tratamentos de superfícies têm sido bastante requisitados para aplicações biomédicas, uma vez que tais modificações otimizam características como biocompatibilidade, atividade biológica, resistência mecânica, entre outros. (LIU; CHU; DING, 2005; GITTENS et al., 2014).

Os métodos de tratamentos de superfície se classificam em três tipos: métodos físico-químicos (imobilização de um ou mais grupos químicos na superfície do material), biológicos (imobilização de biomoléculas) e de recobrimento (deposição de recobrimento ou filmes finos) (ANUSAVICE; SHEN; RAWLS, 2013).

O processo eletroquímico conhecido como anodização é um exemplo de tratamento de superfície, onde ocorre a formação de um filme de óxido que, microscopicamente, auxilia na formação de estruturas nanotubulares, as quais conseguem biomimetizar a estrutura óssea (**Figura 4**) (MINAGAR, 2012; CHU, 2013; ARSI et al., 2017).

A anodização eletroquímica é utilizada para melhorar as propriedades mecânicas do implante, fabricar as topografias de superfícies requeridas, e melhorar a resistência à corrosão, bioatividade e condutividade óssea (KIRMANIDOU et al., 2016). O processo envolve a conexão do implante metálico ao pólo positivo de um circuito elétrico e a imersão em uma solução eletrolítica, contendo agentes oxidantes. A superfície do implante é oxidada, engrossando a camada de TiO₂ até um máximo de 40µm (SHAHALI; JAGGESSAR; YARLAGADDA, 2017).

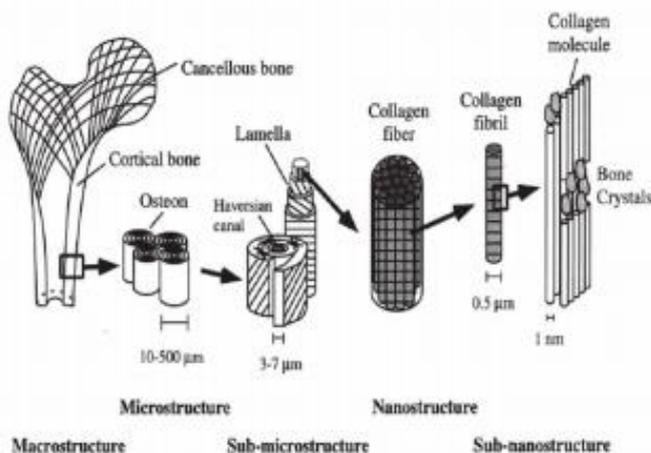


Figura 4 Microestrutura do tecido ósseo.

Fonte: CASADEI, 2009.

Na medicina, nanomateriais funcionalizados têm sido bastante requisitados, podendo servir às mais diversas aplicações. Devido a isso, os óleos e líquidos iônicos (LI) têm atraído grande atenção para si na área biomédica (MCNAMARA et al., 2015; MIRABELLO et al., 2015). A seguir serão abordadas nas sessões 3.4 e 3.5 as propriedades, características e aplicações destes materiais (óleo de pequi e líquido iônico) que serão utilizados para a funcionalização dos nanotubos de TiO_2 .

2.4 *CARYOCAR CORIACEUM* WITTM. (PEQUI)

O pequizeiro é uma planta perene, que pode ser classificada como frutífera ou oleaginosa, em razão das suas características e formas de utilização. É pertencente à família *Caryocaraceae*, da ordem Theales (Rizobolácea), composta de 25 espécies reunidas em dois gêneros, *Caryocar L.* e *Anthodiscus*. O gênero *Caryocar* possui 16 espécies, das quais, 12 são encontradas no território brasileiro (ARAÚJO, 1995; FRANCO et al., 2004). Em contraposição a informação de Oliveira (1998) que relata que são 19 espécies, das quais apenas oito de ocorrência no país (OLIVEIRA, M. E. B. D., 2009).

A planta apresenta porte arbóreo (**Figura 5**), que atinge em média de 6 a 8 m de altura. As folhas do pequizeiro são ricas em tanino, fornecendo substância tintorial (BARRADAS, 1971) e suas inflorescências produzem um número variado de flores (hermafroditas e actinomorfas), grandes (5,0 a 7,5 cm de diâmetro) e de cor variando de esverdeada a branca, e com antese crepuscular. Geralmente, a floração ocorre entre agosto e novembro, dependendo da região de ocorrência, e a maturação dos frutos leva de três a quatro meses após a polinização, com baixa taxa de crescimento de frutos. Porém, uma planta de pequi pode produzir de 500 a 2.000 frutos/safra (ARAÚJO, 1995; SILVA; MEDEIROS- FILHO, 2006; RAMOS; SOUZA, 2011).

Frutos de diversas espécies do gênero *Caryocar* são conhecidos popularmente pelos nomes de pequi, piqui, piquiá e piqui vinagreiro. O Brasil é considerado o centro de dispersão do gênero, este fato, explica a sua diversidade no país (PEIXOTO, 1973; GIACOMETTI, 1993; ALMEIDA et al., 1998). Por este motivo ocorrem espécies na quase totalidade do território brasileiro (PEIXOTO, 1973; GIACOMETTI, 1993; ALMEIDA et al., 1998) do Amazonas a São Paulo, incluindo Pará, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Tocantins (PEIXOTO, 1973; ALMEIDA & SILVA, 1994). Ademais, podem ser encontradas em dois dos quatro domínios geoambientais do nordeste brasileiro denominados: Meio Norte e Caatinga. Sendo constituído pelos Estados do Maranhão e do Piauí em uma zona de transição entre a Amazônia e o Sertão, com pluviometria anual entre 1.000 e 2.500 mm (REBOUÇAS, 1997). É caracterizado por uma diversidade de ecossistemas e pela biodiversidade, com destaque para as espécies frutíferas nativas, como por exemplo, pequizeiro (*Caryocar coriaceum* Wittm.), cujos frutos são amplamente utilizados pelas populações locais. A espécie *C. coriaceum* ocorre também na parte setentrional do nordeste brasileiro e cresce naturalmente em planícies secas na região da Chapada do Araripe no estado do Ceará, exercendo por sua vez, um importante papel socioeconômico na região e circunvizinhanças nos Estados de Pernambuco, Piauí e Goiás (LORENZI, 1992; MATOS, 2007; OLIVEIRA et al., 2008; JÚNIOR et al., 2013; SILVA et al., 2015).



Figura 5 Pequizeiro florido.

Fonte: <http://www.caliandradocerrado.com.br/2010/03/cerrado-flor-do-pequi.html>

O fruto de pequi é uma drupa de forma depresso-globosa, carnoso com epicarpo coriáceo, de coloração verde-clara a levemente amarelada quando maduro, apresentando endocarpo espinhoso. Suas dimensões variam de 4-7 cm de altura e 6-8 cm de diâmetro, com a massa média alcançando

aproximadamente 120 g, mas com variação de 100 a 220 g. Em geral, o fruto contém apenas um caroço (putâmen ou pirênio) desenvolvido, porém, às vezes, pode conter até três ou quatro caroços. O caroço (com a polpa) é empregado no preparo de pratos típicos e na culinária regional. A polpa é oleaginosa, farinácea e tem consistência pastosa, apresenta coloração variando do amarelo-creme ao amarelo-intenso e, algumas vezes, alaranjada. É comumente utilizada como ração para alimentar os animais. Além disso, é utilizada também para extração e fabricação caseira ou industrial de óleo comestível, geléias, doces, licores e ração para alimentação animal; a amêndoa é usada para consumo in natura, na extração de óleo e fabricação de sabão, e na indústria de cosméticos para fabricação de cremes e sabonete (LORENZI, 1992; ARAÚJO, 1995; SILVA; MEDEIROS- FILHO, 2006; OLIVEIRA, 2009). O óleo extraído da polpa e da amêndoa apresenta grande potencial de uso para a produção de combustíveis e lubrificantes (OLIVEIRA et al., 2008).

A polpa da fruta de Pequi possui aproximadamente 76% de óleo (matéria seca), 3% de proteínas, 14% de fibra e 11% de outros carboidratos (MARX et al., 1997). Por outro lado, o endocarpo (semente) possui 6,76% de carboidratos, 1,02% de proteínas e 10% de lipídios. A semente da polpa representa apenas 25% da fruta. Embora o epicarpo (casca) represente 75% da fruta, há poucos estudos nutricionais nesta parte provavelmente porque é um resíduo dispensado pela população regional (ROESLER et al., 2007; QUIRINO et al., 2009).

Na medicina popular, são atribuídas diversas propriedades medicinais à planta, aos frutos e ao óleo. As cascas da árvore e dos frutos são utilizadas em infusões como antifebris e diuréticos (CORREIA., 1926), as folhas no tratamento de resfriados, gripes, edemas. O óleo do fruto é usado para tratamento de queimadura; como afrodisíaco (VIEIRA; MARTINS., 2000), e como bálsamo em casos de reumatismo (BRANDÃO et al., 2002). A polpa é rica em vitaminas (A), (B), (E) sendo comumente utilizada como remédio contra resfriados e gripe, combinada com mel. Também é rica em sais minerais, especialmente P, Ca, Cu e Fe (ARAÚJO, 1995; AGRA et al., 2007).

O valor terapêutico do pequizeiro atribuído à medicina popular vem sendo pesquisado e uma ampla variedade de experimentos científicos atesta sua real eficácia. Extrato da cera epicular extraído das folhas do pequizeiro demonstrou atividade antifúngica, por inibir o crescimento de *Cryptococcus neoformans* (PASSOS et al., 2002), além de apresentar atividade moluscicida por combater o hospedeiro intermediário causador da esquistossomose (ROMANCINI; AQUINO, 2007), efeito leishmanicida por inibir a proliferação da forma promastigota da *Leishmania amazonensis* e atividade antimicrobiana por inibir o crescimento de enterobactérias (PAULA-JÚNIOR et al., 2006). O extrato da casca do pequizeiro demonstrou interferência sobre a curva de parasitemia do *Trypanosoma cruzi*, reduzindo o número de parasitos no sangue (HERZOG-SOARES et al., 2002). No óleo extraído da polpa foram encontrados antioxidantes naturais que diminuiram o estresse oxidativo e,

consequentemente, promoveu proteção contra danos ao DNA (MIRANDA-VILELA et al., 2008; BATISTA et al., 2010).

2.5 LÍQUIDOS IÔNICOS

Líquidos Iônicos (LI) são sais fundidos que possuem ponto de fusão menor que o de sais inorgânicos comuns. Apresentam excelentes propriedades, tais como: volatilidade inexistente, alta estabilidade térmica, baixa pressão de vapor e ampla janela eletroquímica, boa miscibilidade com compostos orgânicos. Além disso, a variação de sua estrutura pode influenciar suas interações polares e dispersivas. Os LI possuem um campo amplo de aplicações podendo ser utilizados em catálise (MARTINS et al., 2008), bem como em sistemas eletroquímicos no uso como proteção anticorrosiva (BROWN et al., 2012). Também possuem um papel importante na área de nanomateriais por terem propriedades de fácil ajuste. Estas propriedades podem ser alteradas realizando modificações na estrutura química, principalmente atribuídas ao tipo de cátion/ânion ou ao tamanho da cadeia alquílica (FRIZZO et al., 2015). Alguns estudos têm mostrado a interação entre LI e a superfície do titânio e suas ligas em que estes são utilizados também como lubrificantes (JIMÉNEZ; BERMÚDEZ, 2009; MINAMI, 2009; ZHOU; LIANG; LIU, 2009; CHEN et al., 2012). Outros estudos utilizando métodos teóricos avançados têm mostrado a interação em partículas carregadas em superfícies de Titânio (MONTI et al., 2008; WANG et al., 2009; VALLEE; HUMBLLOT; PRADIER, 2010; SUZUKI et al., 2011).

A principal diferença entre líquidos iônicos a temperatura ambiente (RTILs) e sal fundido simples é a assimetria molecular incorporada (pelo menos em um dos íons), geralmente o cátion. Essa assimetria se opõe ao forte pedido de carga devido às interações iônicas que normalmente causariam a cristalização do sistema e, assim, é obtida uma ampla gama de líquidos (HANSEN; McDONALD, 1975; HANSEN; McDONALD, 1986). Suas propriedades levam a um número crescentes de aplicações como solventes ou meios de reação, sendo que algumas foram interpretadas como resultado de características estruturais de fase líquida a nível molecular (ROGERS; SEDDON, 2005; CANONGIA LOPES; PADUA, 2006).

As propriedades globais dos líquidos iônicos são resultantes das propriedades compostas de cátions e ânions que incluem as superácidas, básicas, hidrofílicas; miscíveis em água, imiscíveis em água; hidrofóbicas (HUDDLESTON et al., 2001).

Em 2009, Wang et al. estudou a interface entre a superfície do TiO₂ (rutilo) (110) e o hexafluorofosfato de IL-1-butyl-3-metil-imidazolium [BMIM] [PF₆], à temperatura ambiente utilizando simulação dinâmica molecular clássica. Os resultados demonstraram a formação de camadas

na região interfacial, outro fator observado foi a influência da estrutura e hidrofiliicidade do LI investigado com o aumento de tamanho da Nanopartícula de TiO₂. Suas excelentes propriedades têm direcionado recentemente os LI para estudos a fim de potencializar as propriedades biológicas que os LIs podem exibir e que podem ser manipuladas em conjunto com as propriedades químicas e físicas. Neste contexto propriedades como densidade e a viscosidade se destacam para a síntese destes materiais, assim como a sua solubilidade em água, pois estas propriedades permite que os LI possam ser utilizados em fluídos biológicos de forma particular na preparação de emulsões ou lipossomas (FLORINDO, 2012).

O líquido iônico [BisOct(MIM)2][2BF4] é um LI dicatiônico, o qual possui estrutura cristalina e características de hidrofobicidade (FRIZO et al., 2015) No presente estudo, o referido líquido iônico não conseguiu se unir, por meio de mistura física, com o óleo de pequi e, por este motivo, foi necessária a criação de emulsões, com a presença de uma fase aquosa (água ou água e LI), uma fase oleosa (óleo de Pequi) e um tensoativo (Tween 80).

2.6 EMULSÕES

O uso de emulsões tem sido amplamente divulgado devido a sua aplicação em diversas áreas, tais como farmacêutica, alimentícia, cosmética, entre outras (MASSON, 2005; SINGH et al, 2012). O termo emulsão (EM) é derivado da palavra latina *emulgeo*, que quer dizer “ordenhar”. Como o próprio nome sugere, tal palavra é utilizada para designar sistemas de aspecto leitoso, os quais são compostos por uma preparação líquida bifásica, contendo dois líquidos imiscíveis, que não ficam dispersos por períodos de tempo muito longos (MADAAN et al, 2014).

Emulsões são, portanto, definidas como sistemas termodinamicamente instáveis, com diâmetro de gotículas na ordem de 0,1-100 µm, heterogêneos, onde uma fase está dispersa como finas gotículas (fase dispersa, interna ou descontínua) em outra líquida (fase dispersante, externa ou contínua), que é estabilizada por um agente emulsificante, que torna os líquidos miscíveis, formando uma espécie de filme ao redor das partículas, produzindo assim uma emulsão estável (SINGH et al, 2012).

Conforme supracitado, uma emulsão é formada a partir três fases: fase aquosa (polar), fase oleosa (apolar) e um sistema de emulsificantes, os quais auxiliam a manter as fases adequadamente dispersadas. De acordo com a hidrofilia ou lipofilia da fase dispersante, as emulsões podem ser de, basicamente, dois tipos: óleo em água (O/A), onde a fase oleosa encontra-se dispersa na fase aquosa ou água em óleo (A/O), onde a fase aquosa está dispersa na oleosa. Há também situações em que podemos observar a presença de emulsões denominadas múltiplas, que podem ser do tipo água em

óleo em água (A1/O/A2) ou óleo em água em óleo (O1/A/O2) (**Figura 6**) (SALAGER, 2000; SCHRAMM, 2005).

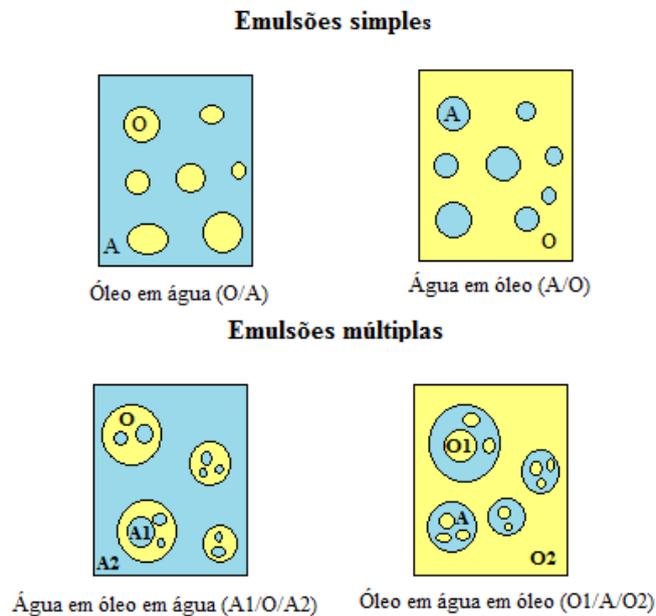


Figura 6 Esquema dos principais tipos de emulsões.

Fonte: Adaptado de SALAGER (2000).

Os tensoativos (também conhecidos como surfactantes) são substâncias que auxiliam na formação de emulsões por meio de diversos mecanismos, reduzindo a tensão superficial e formando dupla camada elétrica na superfície dos glóbulos, o que evita sua aproximação e conseqüente agregação (SILVA & SOARES, 1996). No entanto, deve-se atentar para o fato de que para que uma emulsão seja bastante estável, faz-se necessária a utilização de altas concentrações de tensoativos, o que pode ser prejudicial na presença de sistemas biológicos (FARIA et al, 2012).

3 ARTIGO: ANÁLISE DA ADERÊNCIA CELULAR SOBRE NANOTUBOS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO FUNCIONALIZADOS COM EMULSÕES DE LÍQUIDO IÔNICO E ÓLEO FIXO DE PEQUI (*CARYOCAR CORIACEUM* WITTM.)

Daniela Bomfim de Barros^{a*}, Maria T. S. Correia^a, Márcia Vanusa da Silva^a, Henrique Barbosa Gonçalves^a, Keicyanne Fernanda Lessa dos Anjos^b, Regina Célila Bressan Queiroz Figueiredo^b, Isabel R. S. Arruda^c, Whanderson Falcão dos Santos^c, Jean Cláudio Santos Costa^d, Victor Hugo Vitorino Sarmiento^e, Clarissa Piccinin Frizzo^f, Caroline Bender^f, Janaina Crespo^g, Janaína Viana de Melo^h, Giovanna Machado^c

^a Universidade federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^b Departamento de Biologia Celular e Ultraestruturas, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/CPqAM), Av. Prof. Moraes Rego, s/n°, Campus UFPE, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brasil.

^c Laboratório de Nanotecnologia, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Av. Prof. Luiz Freire, 01, Cidade Universitária, CEP: 50740-540, Recife, PE, Brasil.

^d Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Av. Universitária, Ininga, CEP: 64049550, Teresina, PI, Brasil.

^e Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Av. Vereador Olímpio Grande, s/n°, Centro, CEP: 49500-000, Itabaiana, SE, Brasil.

^f Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade de Santa Maria (UFSM), Camobi, CEP: 97105900, Santa Maria, RS, Brasil.

^g Departamento de Física e Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), CEP: 95070560, Caxias do Sul, RS, Brasil.

^h Faculdade Boa Viagem (FBV), Rua Jean Emile Favre, Imbiribeira, CEP: 51200060 - Recife, PE – Brasil.

Abstract

The present study aimed at obtaining titanium dioxide (TiO₂) nanotubes by means of anodic oxidation, its characterization and, later, functionalization with emulsions of the ionic liquid ditetrafluoroborate 1,8-bis (3-methylimidazol-1-ene) octane and fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm (pequi) and application of the system in front of osteoblasts, in order to evaluate its cytotoxicity, cell adhesion and osteogenic potential. The method used for the deposition of the emulsions on the TiO₂ nanotubes was *Spin Coating*, procedure used to deposit uniform thin films in substrates. A characterization of the samples by Scanning Electron Microscopy (SEM), X-ray Diffraction (XRD), Thermogravimetry (TG), Zeta Potential, Polydispersion Index (PDI), Dynamic Light Scattering (DLS), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Rheology and Raman Spectroscopy. Tests were performed for an evaluation of the cytotoxicity of pequi oil, the ionic liquid and the emulsions selected by the MTT reduction assay and found that within 72 hours, a good part of the samples showed cytotoxicity below 50% (IC₅₀). Regarding the functionalized samples, the one that provided the best adhesion was the one containing EM6, which offers more in-depth studies, to be evaluated for its osteogenic capacity.

Keywords: Surface treatment, functionalization, pequi oil, ionic liquid, bone, osseointegration

1 INTRODUÇÃO

O titânio (Ti) e suas ligas são biomateriais metálicos os quais exibem uma combinação de várias propriedades, tais como: baixo módulo de elasticidade, força mecânica desejável, peso leve, resistência à corrosão e biocompatibilidade notáveis. Essas propriedades atraentes são devido à formação de camada protetora de óxido de TiO_2 na superfície de titânio, que permite e contabiliza seu uso extensivo como material de implante nos últimos anos [1-5]

A natureza biologicamente inerte dos implantes de titânio quando utilizada no ambiente do corpo humano restringe seu uso de uma aplicação de longo prazo [6-7]. As funções normais em longo prazo dos implantes estão relacionadas à integração óssea precoce e rígida. A falta de integração vem da diferença de estrutura e propriedades entre materiais de osso/tecido e implante [8]. Há uma falta de aderência inicial entre os implantes de Ti e osso que ocorre devido ao encapsulamento do tecido fibroso ao redor do implante. Com isso, resulta no seu deslocamento e afrouxamento precoce [9]. Para que estas dificuldades sejam evitadas faz-se necessário a modificação da superfície, aumentando assim, a bioatividade e melhorando as propriedades da superfície do material do implante para que haja uma interação direta com a superfície celular [10].

Na literatura são conhecidos vários métodos de modificação de superfície utilizados para desenvolver revestimento bioativo e promover adesão e proliferação de célula [11-15] A anodização é considerada um método bastante utilizado para a fabricação de diferentes tipos de películas de óxido protetor em metais [16,17]. Esta técnica produz camadas de óxido espessas, coloração, além de revestimentos porosos. As alterações nas superfícies de titânio em altas tensões, através deste método, influenciam na cristalização da superfície de óxido e, assim, proporcionam porosidade e rugosidade preferenciais [18-20]

As superfícies dos materiais de Ti podem ser alteradas e modificadas em nanoescala para que possa ser realizado o ajuste e o controle das características da superfície, visto que as propriedades da superfície dos materiais de implante afetam intimamente a adsorção inicial de proteínas do fluido biológico, além do recrutamento seletivo, bem como na ativação de funções celulares favoráveis [21]. A formação de nanotubos TiO_2 , a nível nanométrico, em eletrólito contendo fluoreto é atualmente uma abordagem mais sofisticada para a estruturação de superfície [22].

De acordo com a estrutura do TiO_2 , é possível inferir que materiais possam interagir com os dois locais presentes na superfície do TiO_2 , ou seja, é possível funcionalizá-lo. Óleos e líquidos iônicos (LIs) são fortes candidatos a essas funcionalizações, sendo estes últimos sais fundidos que possuem uma combinação de propriedades [23-26].

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, que consistem na mistura de dois líquidos imiscíveis, ou seja, são compostos pela micibilização de uma fase hidrofílica e outra lipofílica, estabilizada por uso de tensoativos e, em alguns casos, até mesmo de cotensoativos [27]. No presente estudo observou-se a imiscibilidade entre o óleo de pequi e o líquido iônico, por isso recorreu-se à formulação de emulsões.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo principal sintetizar e caracterizar as estruturas nanotubulares de TiO_2 e funcionalizar os mesmos com emulsões de *Caryocar coriaceum* Wittm com LiBF_4 como agentes funcionalizantes para a melhorar a capacidade osteoindutora.

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 Síntese da matriz nanotubular de TiO_2

As amostras foram produzidas a partir de chapas metálicas de titânio com espessura de 0,5 mm e grau de pureza de 96,6%. Tais amostras passaram por limpeza utilizando detergente (neutro) e, em seguida, foram imersas em acetona P.A. e colocadas em banho de ultrassom por 60 segundos. Após, as amostras foram secas à temperatura ambiente. Os nanotubos foram sintetizados por meio do processo de oxidação anódica, com eletrólito a base de 89,3% de etilenoglicol (Sigma-Aldrich), 10% de água deionizada (DI), com pH 6,0 e 0,7% de fluoreto de amônia (Sigma-Aldrich), em um potencial de 30V por 30 minutos a 2A. Após o término da anodização, as amostras, mais uma vez, foram lavadas em acetona P.A. por 60 segundos em ultrassom, para a remoção de solução eletrolítica vestigial. Os nanotubos produzidos pelo processo de anodização encontravam-se em fase amorfa e, com a finalidade de cristalizar os nanotubos na fase anatase, foi realizado tratamento térmico a 400°C por 3 horas. As amostras foram cortadas em quadrados de 1cm^2 e encaminhadas para realização de difração de raios-X (DRX) (**figura 1**).

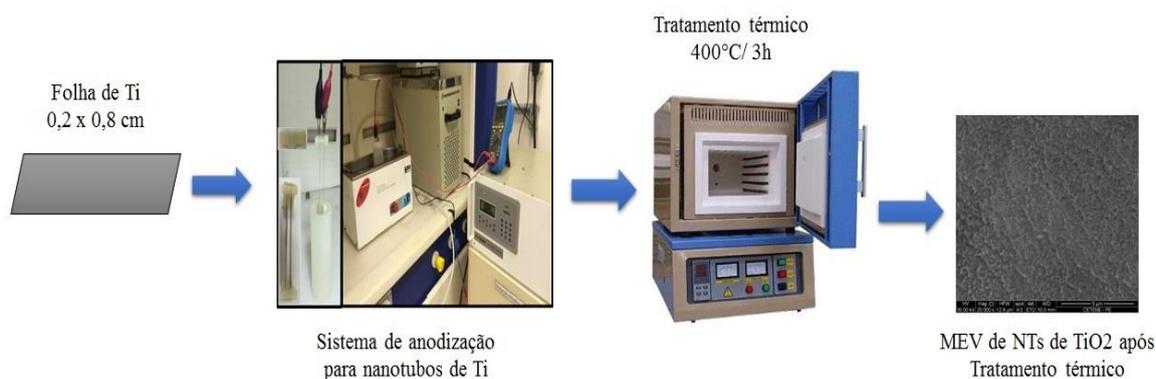


Figura 1 Esquema de anodização de nanotubos de TiO₂.

Fonte: elaborado pela autora.

2.2 Coleta e identificação do material vegetal

As amostras de *Caryocar coriaceum* Wittm foram coletadas na Floresta Nacional do Araripe-Apodi (Ceará, Brasil), identificado e processado no laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Bioquímica, do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

2.3 Obtenção do óleo fixo

As sementes de *C. coriaceum* foram lavadas com água corrente e colocadas em placas de Petri na estufa a 50°C por 48 horas. Após, foram retiradas da estufa, colocadas para resfriar e, posteriormente, trituradas e reservadas em pequenos sacos de papel alumínio e deixadas no dessecador até o preparo para extração do óleo (**figura 2**)

A seguir, foi feita a pesagem de 5 gramas da semente triturada em papel de filtro e, logo mais, a transferência do material para almofariz, onde houve a adição de aproximadamente 6,5 gramas de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). A amostra foi então retornada para papel de filtro com auxílio de espátula e inserida no aparato Soxhlet com auxílio de pinça e reservada. Foram adicionadas pérolas de Borax em um balão de fundo chato, o mesmo foi pesado. Com auxílio de proveta e funil, adicionou-se aproximadamente 240 ml de *n*-hexano ao balão de fundo chato. Posteriormente foi realizada a montagem do sistema de condensadores e Soxhet na Bateria Sebelin. Após verificação da presença de água destilada e gelo nos recipientes dos condensadores, a bomba foi ligada para a circulação da água nos mesmos. A chapa aquecedora foi ligada entre 60-70°C e a água nos condensadores foi mantida sempre gelada, repondo o gelo e aguardando de 6 a 8 horas de extração. Logo mais, as chapas

aquecedoras foram desligadas, o resfriamento dos balões foi aguardado e o sistema Soxhlet/ balão foi retirado.

Por fim, foi colocada água destilada no banho-maria do rotaevaporador e aquecida a 50°C. Em um isopor foram colocados água e gelo, a bomba de água foi ligada e o condensador mantido sempre com água gelada. O balão coletor e o de fundo chato foram acoplados ao rotaevaporador e a válvula do vácuo aberta. O *Trap* e a bomba (pressão de 300 a 400) foram ligados e a válvula do vácuo fechada. O balão foi descido até o banho-maria e o rotor foi ligado e aumentado à medida que o solvente ia evaporando, deixado girando até que todo solvente evaporasse. O rotor, o *Trap* e o a bomba à vácuo foram desligados e o banho-maria foi subido. A válvula de água foi aberta e a bomba de água desligada. O balão de fundo chato foi retirado e levado para o fluxo de gás nitrogênio industrial para retirar o resíduo do solvente até o peso do balão estabilizar. O balão com o óleo foi pesado e seu peso anotado. O óleo obtido foi transferido para frascos âmbar e armazenado em freezer (-20°C). A figura abaixo apresenta o esquema de etapas desde a obtenção das sementes de Pequi até a extração do óleo fixo.



Figura 2 Esquema do processo de obtenção do óleo de fixo de *Caryocar coriaceum*.

Fonte: elaborado pela autora.

2.4 Obtenção do Ditetrafluorborato de 1,8-bis (3-metilimidazol-1-íneo) octano

O líquido iônico Ditetrafluorborato de 1,8-bis (3-metilimidazol-1-íneo) octano foi sintetizado e gentilmente cedido pela Dra. Clarissa Piccinin Frizzo, do Departamento de Química, do Centro de

Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A **figura 3** mostra a estrutura química do Líquido iônico Ditetrafluorborato de 1,8-bis (3-metilimidazol-1-íneo) octano.

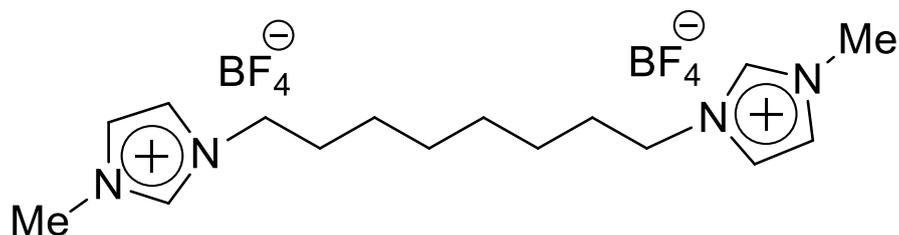


Figura 3 Estrutura química do Líquido iônico Ditetrafluorborato de 1,8-bis (3-metilimidazol-1-íneo) octano.

Fonte: elaborado pela autora.

2.5 Formulação das emulsões

Neste trabalho, foram executadas vinte emulsões, as quais foram constituídas por três fases: oleosa (óleo fixo de *C. coriaceum*), aquosa (dez emulsões com a fase aquosa contendo apenas água pura e dez emulsões com fase aquosa com água contendo o LI BF_4) e tensoativo (Tween 80 em até 5% da composição total das emulsões). As vinte emulsões foram observadas quanto a sua homogeneidade e, após uma semana, verificou-se que apenas seis emulsões se mantiveram estáveis, não separando fase, ou seja, permaneceram homogêneas. As emulsões que não separaram fase foram selecionadas e denominadas EM1, EM2, EM3, EM4, EM5, contendo apenas água na fase aquosa e EM6, possuindo LI BF_4 como componente diferencial de sua fase aquosa. A composição das amostras encontra-se presente na **tabela 1**.

Tabela 1 Proporções de fase oleosa, fase aquosa (com e sem LI) e Tween 80 das amostras EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6.

Amostra	Fase aquosa sem LI	Fase oleosa (mL)	Tween 80 (mL)
EM 1	4,5 mL	0,25 mL	0,25 mL
EM 2	4,5 mL	0,3 mL	0,2 mL
EM 3	4,5 mL	0,35 mL	0,15 mL
EM 4	4,0 mL	0,8 mL	0,2 mL
EM 5	4,5 mL	0,4 mL	0,1 mL
Amostra	Fase aquosa com LI	Fase oleosa (mL)	Tween 80 (mL)
EM 6	4,5 mL	0,3 mL	0,2 mL

Fonte: elaborado pela autora.

Para formular as emulsões, inicialmente, houve a adição de água pura ou água com LIBF4 e, em seguida, foi acrescentada a fase oleosa (Pequi). A seguir somou-se o Tween 80 à mistura e a mesma foi homogeneizada com auxílio do ultrasonicador por 3 minutos, 60% de amplitude e 4 de pulso (**figura 4**)

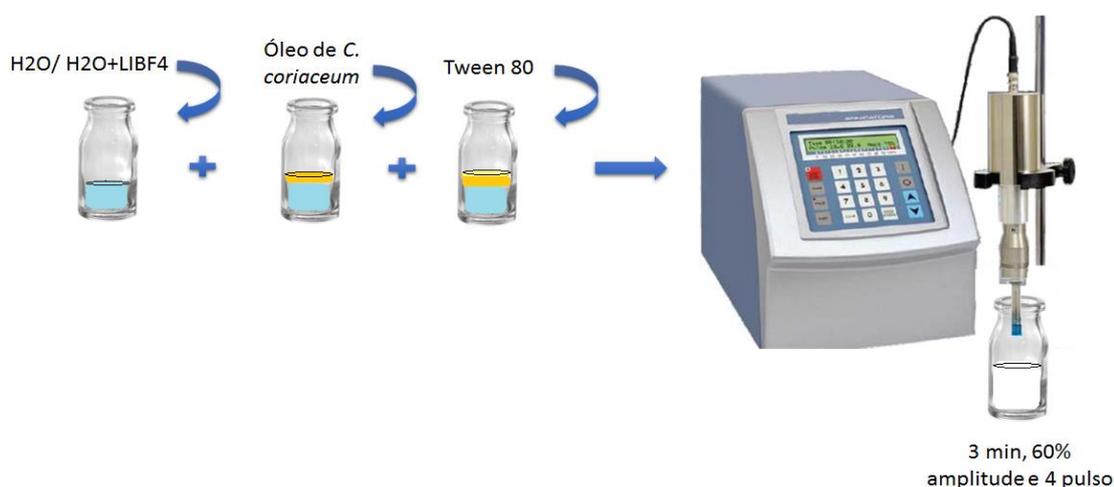


Figura 4 Esquema do processo de obtenção das emulsões.

Fonte: elaborado pela autora.

2.6 Funcionalização da superfície dos NTs com as emulsões por técnica de *Spin Coating*

O método utilizado para impregnação das matrizes nanotubulares com as emulsões foi o de *Spin coating*, onde as amostras foram gotejadas em um substrato, o qual possui movimentos rotatórios, com controle de velocidade para deposição da camada (emulsão). O fluido foi espalhado em decorrência da ação da força centrípeta, formando um filme fino na superfície de TiO₂. Os filmes foram feitos por intermédio da deposição de 100 µL das emulsões sobre as amostras de TiO₂, em uma velocidade de 500rpm, seguida de uma aceleração de 2000rpm, utilizando o equipamento Spin Coater Model WS-650Mz-23 (Laurell Technologies Corporation).

2.7 Avaliação da biocompatibilidade

2.7.1 Cultivo de osteoblastos

Com a finalidade de realizar os experimentos de compatibilidade biológica, foram usadas as células de osteosarcoma HOS (ATCC® CRL1543™), as quais foram incubadas em estufa a 37°C e

5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Após incubação, as culturas de células que apresentaram confluência entre 70 e 80% foram tratadas com solução de Tripsina a 0,5% e EDTA 0,025% por 5 minutos a 37°C. Ao final deste tempo, já com as células desprendidas, foi adicionado meio de cultura fresco contendo SFB, a fim de inibir a ação proteolítica da tripsina. A suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos e o pellet resultante foi ressuspenso em mais meio de cultivo para posterior contagem em câmara de Neubauer a fim de estimar a densidade da suspensão celular obtida. A densidade utilizada nos experimentos biológicos foi de 1×10^5 células/mL.

2.7.2 Avaliação da citotoxicidade das soluções incorporadas

Para a melhor compreensão do comportamento dos osteoblastos frente às amostras de óleo fixo de Pequi, líquido iônico e emulsões em diferentes concentrações, foi feito um estudo através do ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) (Sigma Aldrich). O princípio da técnica consiste em reduzir o MTT por meio de redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas, formando então cristais púrpuras de formazan, os quais são solubilizados com o auxílio de dimetilsulfóxido (DMSO) e analisados por meio de espectrofotometria. Os osteoblastos humanos foram aderidos em placas de 96 poços, contendo meio DMEM suplementado com 10% de SFB e incubados *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o período, o meio foi removido e as células foram incubadas com as amostras previamente diluídas em meio de cultura por 72h. Em seguida, o meio foi retirado e foram adicionados 100µl de meio de cultura sem vermelho de fenol suplementando com 10% de SFB e 10µl de MTT (5mg/mL) e a placa foi, novamente, incubada nas condições já citadas e com luz ausente. Após o período de 3 horas, a solução de MTT foi retirada e 100µl de DMSO foram adicionados a fim de solubilizar os cristais precipitados. As placas foram agitadas por 15 minutos, no escuro, e a absorbância dos poços foi medida a 595nm no leitor de ELISA. Células HOS incubadas apenas com meio serviram como controle.

2.7.3 Teste de adesão

A avaliação da adesão das células humanas nas superfícies foi verificada por meio de microscopia de fluorescência. Após incubação de 24 horas das amostras {NTs, NTs + óleo, NTs + líquido iônico, NTs + emulsão 1, NTs + emulsão 2, NTs + emulsão 3, NTs + emulsão 4, NTs + emulsão 5, NTs + emulsão 6} com HOS, as células foram lavadas com PBS e fixadas em formaldeído 3,7% (em PBS). Após fixação, as células foram lisadas com Triton x-100 e marcadas na região do citoesqueleto, especificamente os filamentos de actina, com 5 rodamina-faloidina diluído em 200 µL de PBS. Ao final foi feita marcação do núcleo com o 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI). Entre os

tratamentos, houve lavagem das amostras com tampão PBS. Após a marcação, as amostras foram visualizadas no microscópio de fluorescência ZIESS Observer Z.1 ApoTome.

2.8 Caracterização das amostras

2.8.1 Difração de Raios X (DRX)

As difrações de raios X dos nanotubos de TiO_2 e do líquido iônico foram feitas por meio de difratômetro (Bruker-AXS/ D8 ADVANCE) com um tubo de radiação $\text{CuK}\alpha$ de 1,5406 nm, com intervalo de $10\text{-}50^\circ$ (2θ), ângulo rasante de $0,5^\circ$, 2 segundos de tempo de integração por ponto e passo angular de $0,05^\circ$.

2.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As ultraestrutura das superfícies dos nanotubos de TiO_2 , bem como a avaliação morfológica das células aderidas foram examinadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL-JSM-5600 LV (Tóquio, Japão) do Núcleo de Integração Tecnológica-1/ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) /FIOCRUZ, operando com tensão de aceleração de 10 kV.

2.8.3 Cromatografia gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-FID)

As amostras de óleo fixo de pequi foram analisadas através de Cromatografia gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-FID) em um sistema GC-FID analítico (Agilent Technology 7890) do CEAN/LAFIP do CETENE, equipado com uma coluna apolar DB-5ms (30 m de comprimento x 250 μm de diâmetro., 0,25 μm de espessura da película). A partir de 25 mg da amostra, foi adicionado 0,5 mL de solução de hidróxido de potássio em metanol a 0,5 mol/L e sistema passou por agitação por 2 minutos. Após, adicionados 2 mL de hexano P.A. e sistema sob agitação por 2 minutos. A amostra foi centrifugada por 6 minutos a 4500 rpm, a 25°C . O sobrenadante foi filtrado em filtro PTFE (0,22 μM) e posteriormente analisadas sob as seguintes condições cromatográficas: vazão He (mL/min) 1; temperatura inicial do forno ($^\circ\text{C}$) 150; rampa 150°C por 4 min, rampa de $4^\circ\text{C}/\text{min}$ até 280°C , mantendo por 5 min; temperatura de injetor ($^\circ\text{C}$) 300; volume de injeção 1; divisor 100:1; vazão Ar (mL/ min) 400; vazão N_2 (mL/min) 25; vazão H_2 (mL/min) 30; detector FID; temperatura detector ($^\circ\text{C}$) 300.

2.8.4 Análises Térmicas

No presente estudo, utilizou-se a aplicação simultânea de Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) em um instrumento STA, com melhor análise dos

sinais e, assim, produzindo mais informações. As análises foram realizadas no CETENE em um analisador térmico simultâneo NETZSCH STA 449 F3 Júpiter. A massa de material (óleo de Pequi, líquido iônico e emulsões) utilizado nos cadinhos de platina foi fixada em 2 mg, sob atmosfera de azoto dinâmico (50 mL/min) e taxa de aquecimento de 10°C / min no intervalo de temperatura de 25°C a 600°C. Os resultados obtidos foram tratados com o auxílio do software Proteus® da NETZSCH.

2.8.5 Reologia

As medidas reológicas das emulsões foram realizadas à temperatura de 25°C em reômetro de tensão controlada, modelo DHR/TA instruments, com geometria cone-placa, sendo o cone de aço inoxidável, com diâmetro de 60 mm, ângulo de 2 graus e espaçamento de 50 mm entre o cone e a placa. O ensaio de escoamento foi realizado variando a velocidade de cisalhamento de 0 a 200 s⁻¹. Para ajuste das curvas e determinação dos modelos, o software gráfico Origin foi utilizado. As medidas foram realizadas no Campus Professor Alberto Carvalho, em Itabaiana-SE.

2.8.6 Potencial Zeta, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Índice de Polidispersão (PDI)

Foi utilizado um instrumento modelo Litesizer 500 DLS/ELS e transmitância para setar os parâmetros de medida de maneira automática da marca Anton Paar, para medidas de potencial zeta foram utilizados a cubeta Omega de policarbonato, para análises de tamanho utilizamos cubetas de poliestireno.

2.8.7 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos com um equipamento SENTERRA da BRUKER acoplado a um microscópio ótico Olympus utilizando-se um laser diodo em 785 nm como radiação excitante e um detector CCD. Os espectros foram obtidos em condições ambiente utilizando-se a geometria de retro-espalhamento.

2.9 Análise estatística

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando-se o software estatístico Assistat Version 7.7. Para os testes de regressão em análise de variância o p foi considerado menor que 0,05; já para o teste de médias, foi aplicado o Teste de Tukey, com p ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

Os resultados aqui apresentados não compreendem os da mistura física proposta inicialmente entre o óleo fixo de pequi e o líquido iônico BF_4 , uma vez que ambos foram imiscíveis. Sendo assim, optou-se pela preparação de uma emulsão, a fim de miscibilizar os mesmos. Em vista disto, os resultados mostrados compreendem os estudos referente ao titânio, óleo, líquido iônico e suas respectivas emulsões.

3.1 Difração de Raios X (DRX) dos nanotubos de dióxido de titânio (TiO_2) e do Líquido iônico Ditetrafluorborato de 1,8-bis (3-metilimidazol-1-íneo) octano (BF_4)

Os difratogramas do DRX (**figura 5**) mostram que houve cristalização dos nanotubos na fase anatase. Antes e depois do tratamento térmico é possível verificar a presença dos picos de difração referentes ao substrato metálico conforme expostos no difratograma do titânio, segundo a ficha JCPDS (pdf n° 44-1294). Já após o tratamento térmico, foi identificado o plano de difração correspondente à família (101) da fase cristalina do TiO_2 anatase, conforme a ficha JCPDS (pdf n° 4-447).

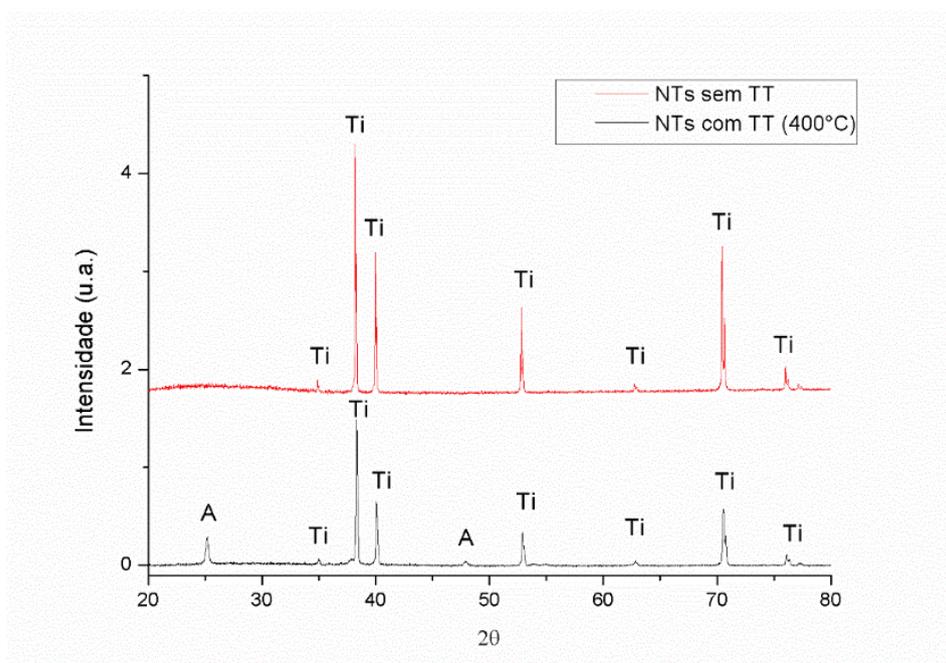


Figura 5 Difratograma de DRX dos nanotubos (NTs) de TiO_2 antes (NTs STT) e após (NTs TT 400°C) o tratamento térmico. Ti refere-se ao pico do titânio e A indica a fase anatase do TiO_2 .

Fonte: elaborado pela autora.

Já difratograma do [BisOct(MIM)2][2BF4] (**figura 6**) evidencia picos agudos, intensos e bastante definidos, característicos da natureza cristalina do material.

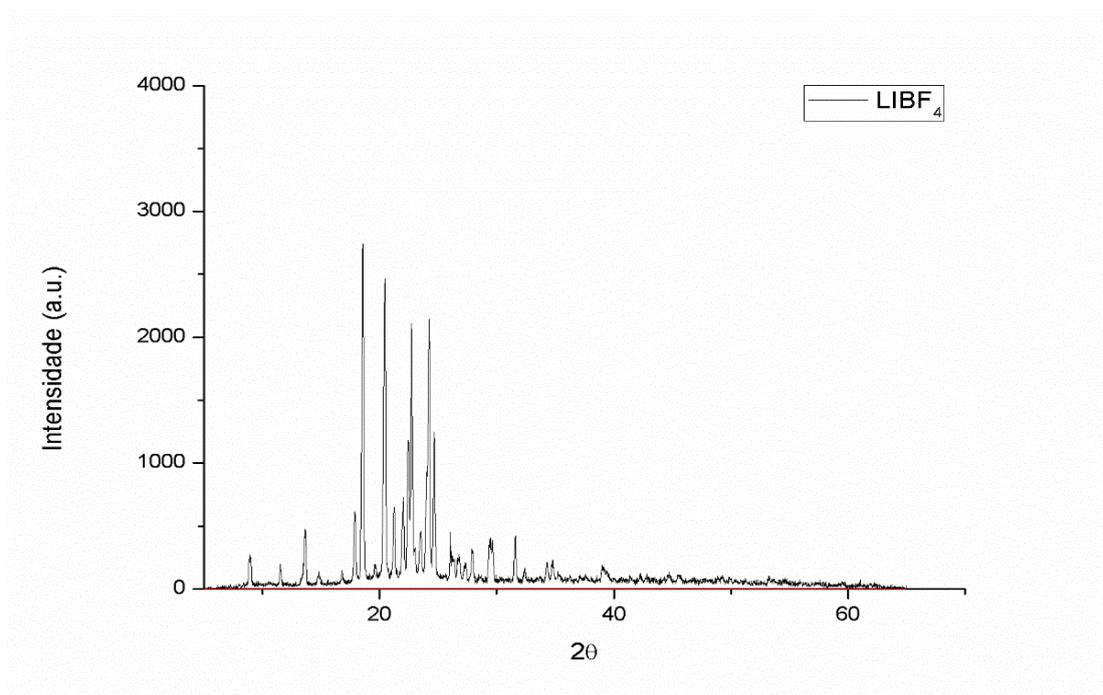


Figura 6 Difratograma de DRX do [BisOct(MIM)2][2BF4] (LIBF4).

Fonte: elaborado pela autora.

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos nanotubos de TiO₂

Através de imagens obtidas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi possível observar que houve, de fato, a formação de nanotubos de TiO₂ organizados e bem distribuídos (**Figura 7**) [28]. Parâmetros de voltagem, corrente, tempo de anodização, de subida e de descida da rampa de tensão foram otimizados para melhor diâmetro e comprimento, sendo neste caso os valores de 88nm e 800um, respectivamente.

Após o processo de oxidação anódica, os nanotubos foram submetidos a tratamento térmico a 400°C para melhor proliferação e mineralização dos osteoblastos, além de auxiliar na remoção de reagentes utilizados na anodização com potencial atividade citotóxica [29].

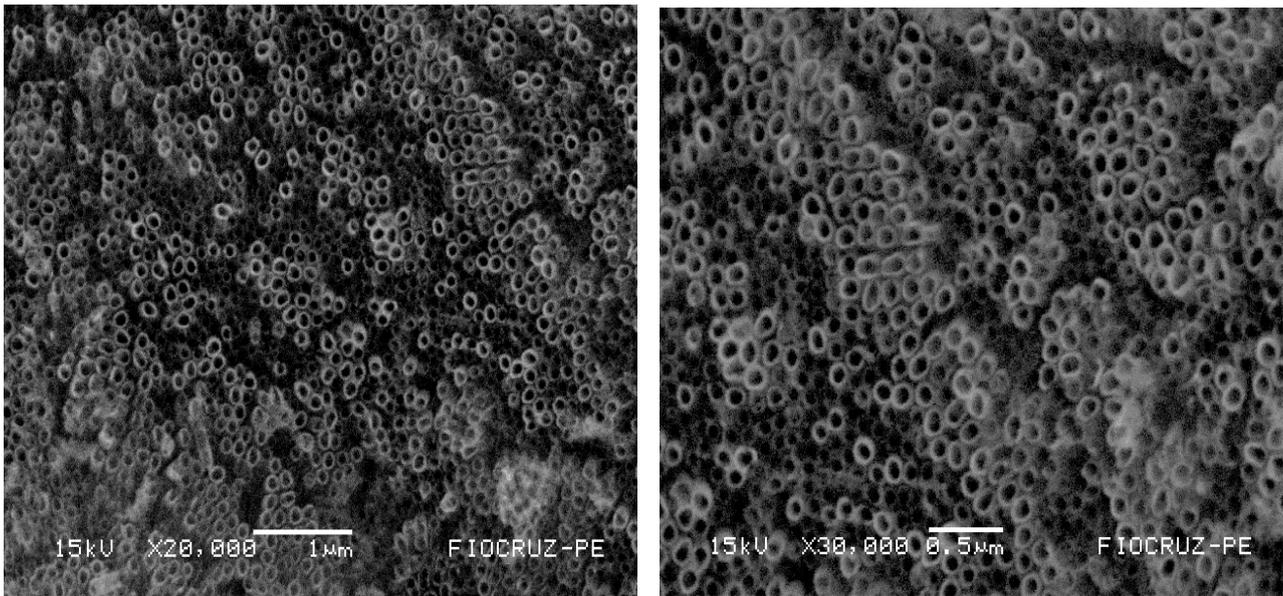


Figura 7 Imagens de MEV dos NTs em diferentes magnitudes: (a) 20.000x e (b) 30.000x.

Fonte: elaborado pela autora.

3.3 Cromatografia gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-FID) do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm. (Pequi)

Através das análises cromatográficas realizadas, foram identificados picos específicos, referentes a seis compostos presentes no óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm, conforme mostrado no cromatograma do perfil de ácidos graxos (**figura 8**). No referido cromatograma, é possível observar a presença dos seguintes ácidos graxos: palmitoleato metílico; palmitato metílico; linoleato metílico; ácido oleico cis-9 éster metílico; linolenato metílico; estearato metílico.

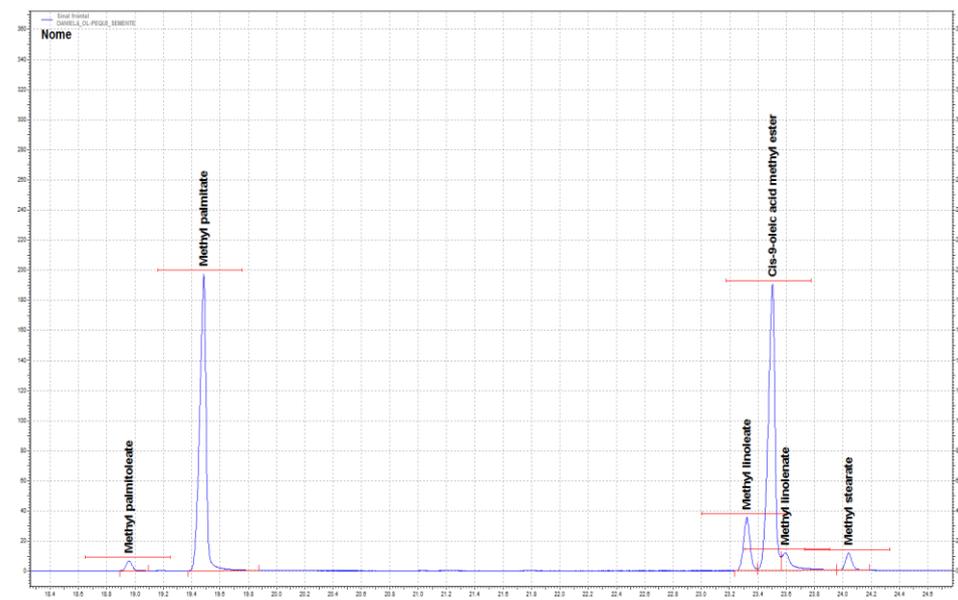


Figura 8 Cromatograma do perfil de ácidos graxos da amostra óleo da semente de pequi.

Fonte: elaborado pela autora.

O componente majoritário do óleo fixo já citado é o ácido oleico, constituindo 42,33% do teor do óleo, seguido do ácido palmítico com 42%. Dentre os compostos que se apresentam em menor proporção, encontram-se o ácido linoleico (7,5%), ácido linolênico (3,97%), ácido esteárico (2,44%) e ácido palmitoleico (1,36%), conforme descrito na **tabela 2**.

Tabela 2 Perfil de ácidos graxos do óleo da semente de pequi extraído a frio. Os valores em triplicata, estão expressos em média \pm desvio-padrão.

Ácidos Graxos (%)							
	Ácido palmítico (C16:0)	Ácido palmitoleico (C16:1)	Ácido esteárico (C18:0)	Ácido oleico (C18:1)	Ácido linoleico (C18:2)	Ácido linolênico (C18:3)	TOTAL
Média	42,00	1,36	2,44	42,33	7,50	3,97	99,60
DP (\pm)	0,17	0,01	0,09	0,16	0,04	0,26	

Fonte: elaborado pela autora.

3.4 Análises Termogravimétricas do Óleo de Pequi, Líquido iônico e emulsões

Os resultados da análise termogravimétrica dos materiais ÓLEO DE PEQUI, LIBF₄, EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6 estão apresentados nas Figuras 9, 10 e 11, respectivamente.

Na figura 9 o óleo de Pequi não apresentou degradação térmica no TG e nenhuma transição no DSC na faixa de temperatura avaliada: 40°C-160°C, o que demonstra a ausência de decomposição do óleo de Pequi.

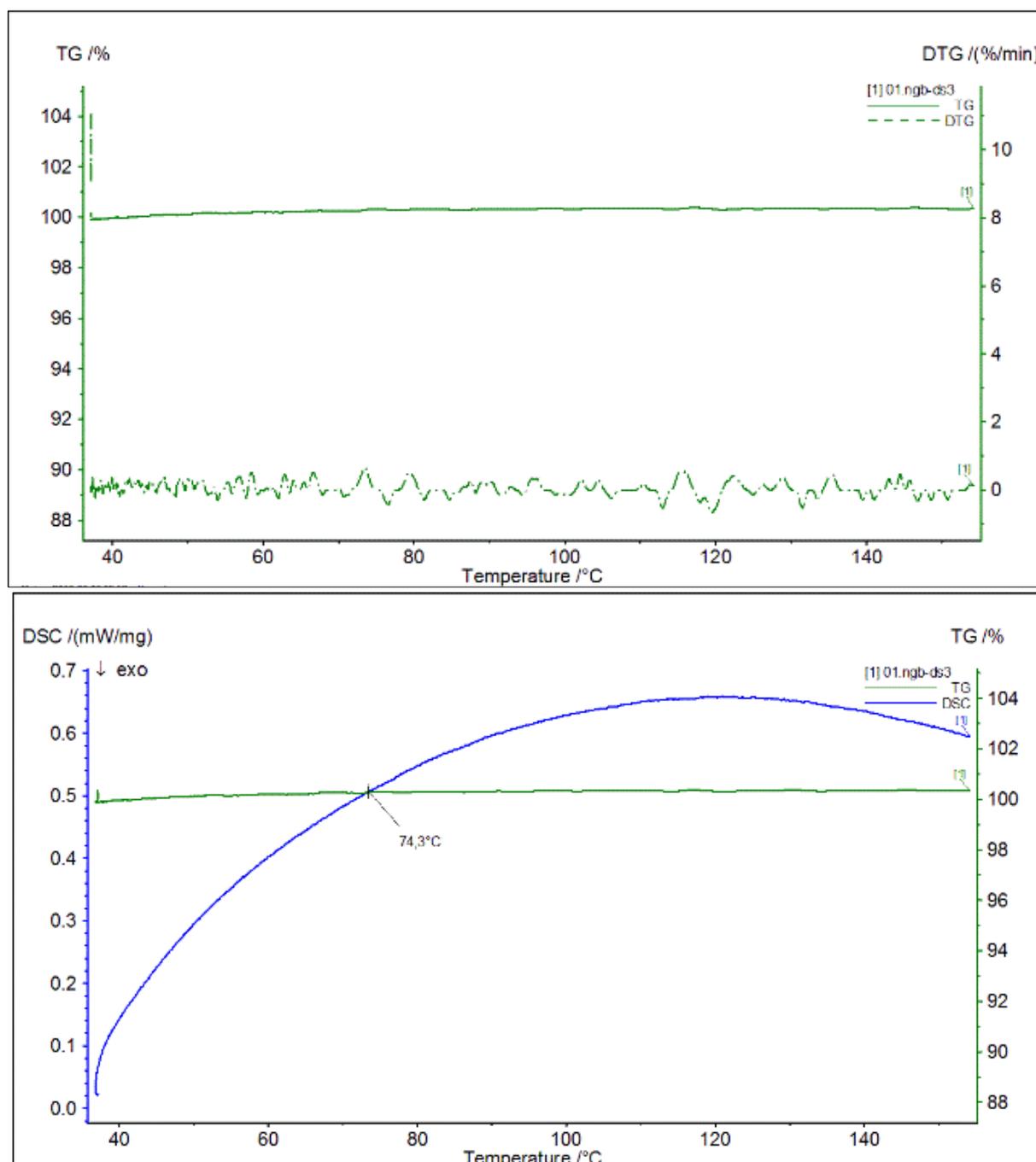


Figura 9 Análise termogravimétrica do Óleo de pequi (a) Curvas de TG e DTG e (b) TG e DSC.

Fonte: elaborado pela autora.

A amostra LiBF_4 , figura 10, apresentou uma degradação térmica no TG em 348°C com perda de massa de 5%. Entretanto, a degradação não finalizou, pois a análise foi somente até 500°C . No DSC o pico em 77°C pode estar relacionado a fusão do material ou evaporação de água ou solvente. O pico em 389°C está relacionado a degradação do material em concordância com o TG.

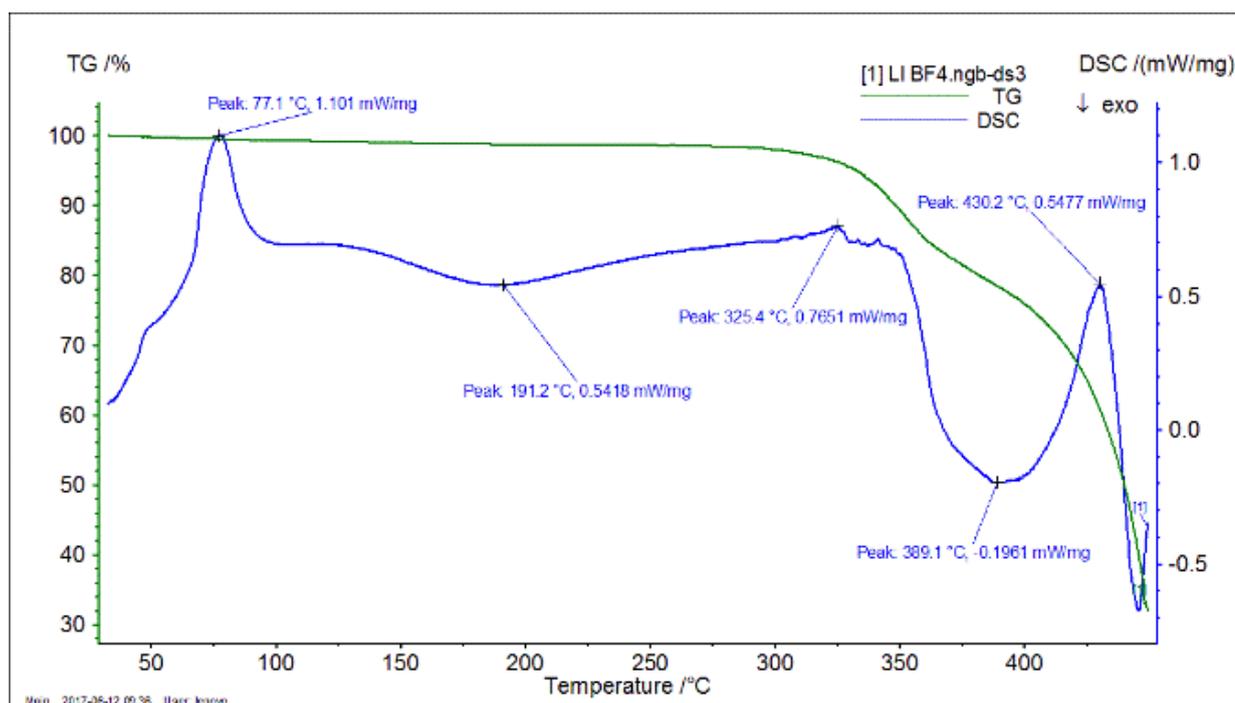
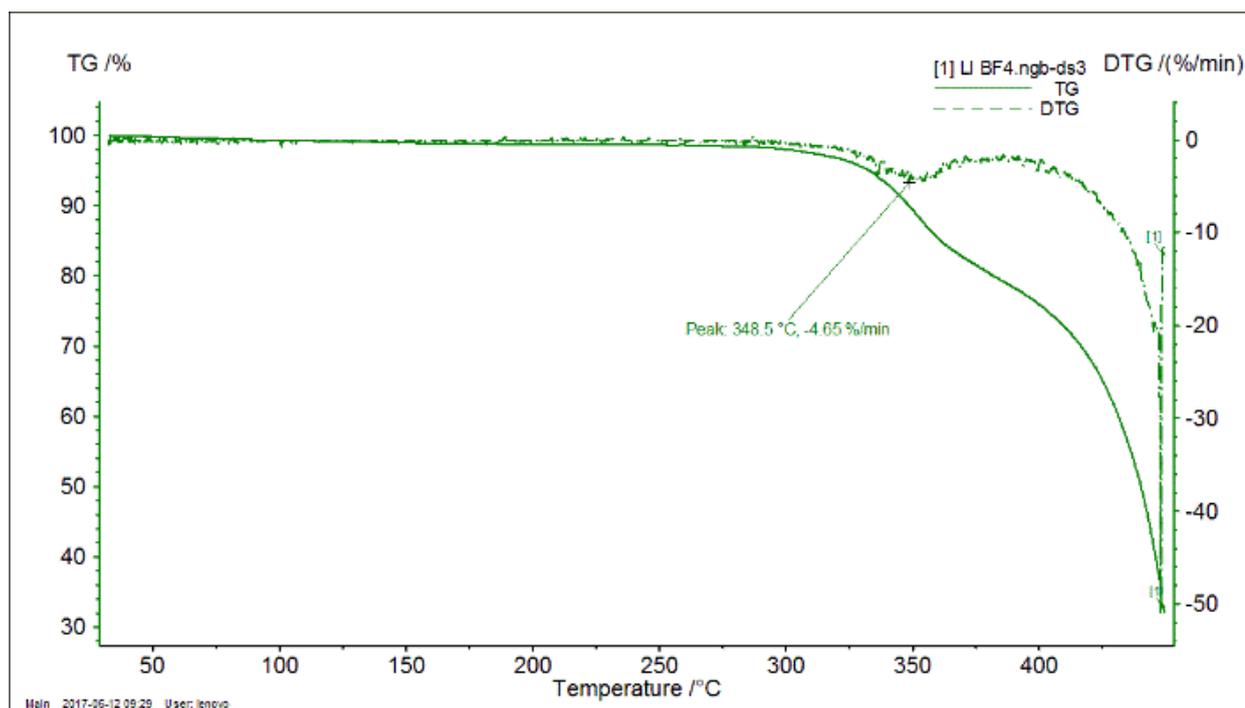
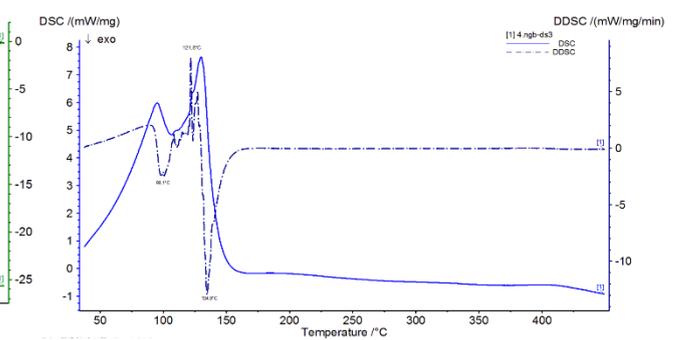
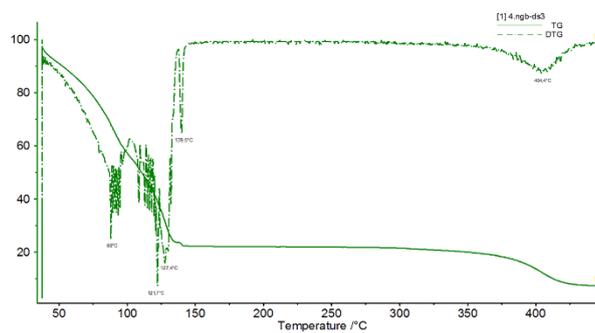
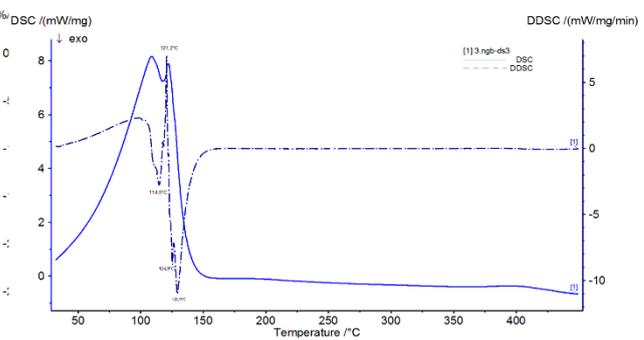
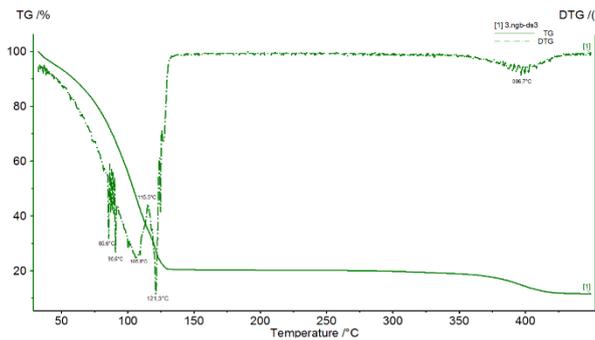
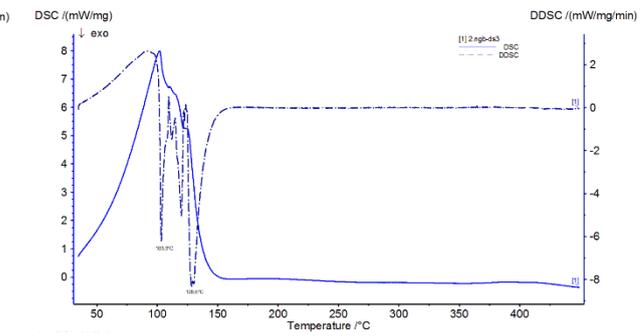
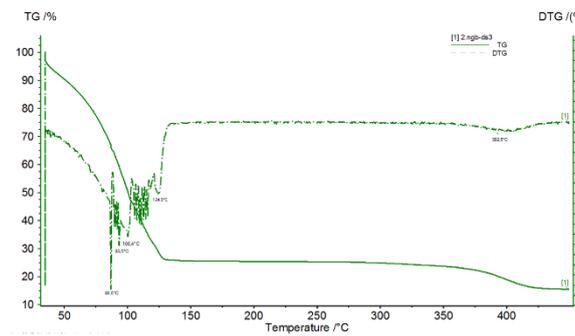
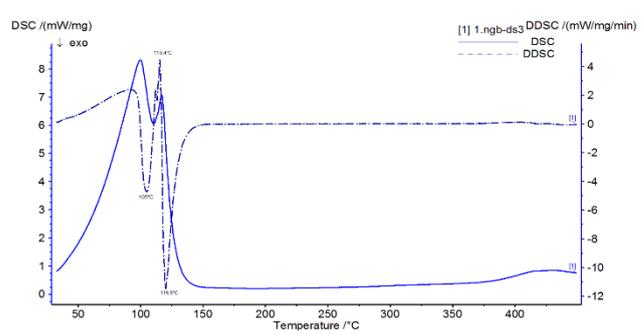
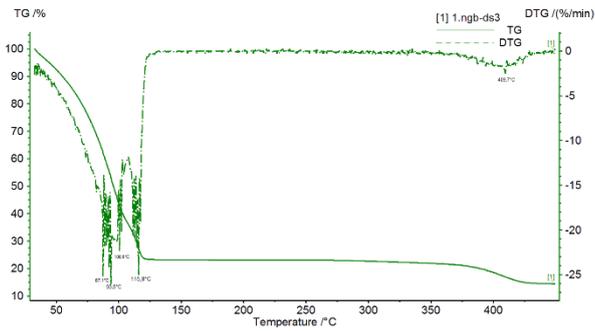


Figura 10 Análise termogravimétrica do LIBF4 (a) Curvas de TG e DTG e (b) TG e DSC.

Fonte: elaborado pela autora.

Já as amostras EM1-EM6, **figura 11**, apresentaram comportamento semelhante, ou seja, duas degradações no TG em aproximadamente 95°C (possivelmente água) e outra em 450°C (possivelmente degradação do material ou de algo que foi adicionado). O que altera é o percentual de perda de massa em cada amostra, sendo a massa residual na faixa de 7,3%-15,5%. No DSC ocorreu

uma transição endotérmica em 99°C que pode estar associada a fusão do material ou evaporação de água ou solvente presente na amostra.



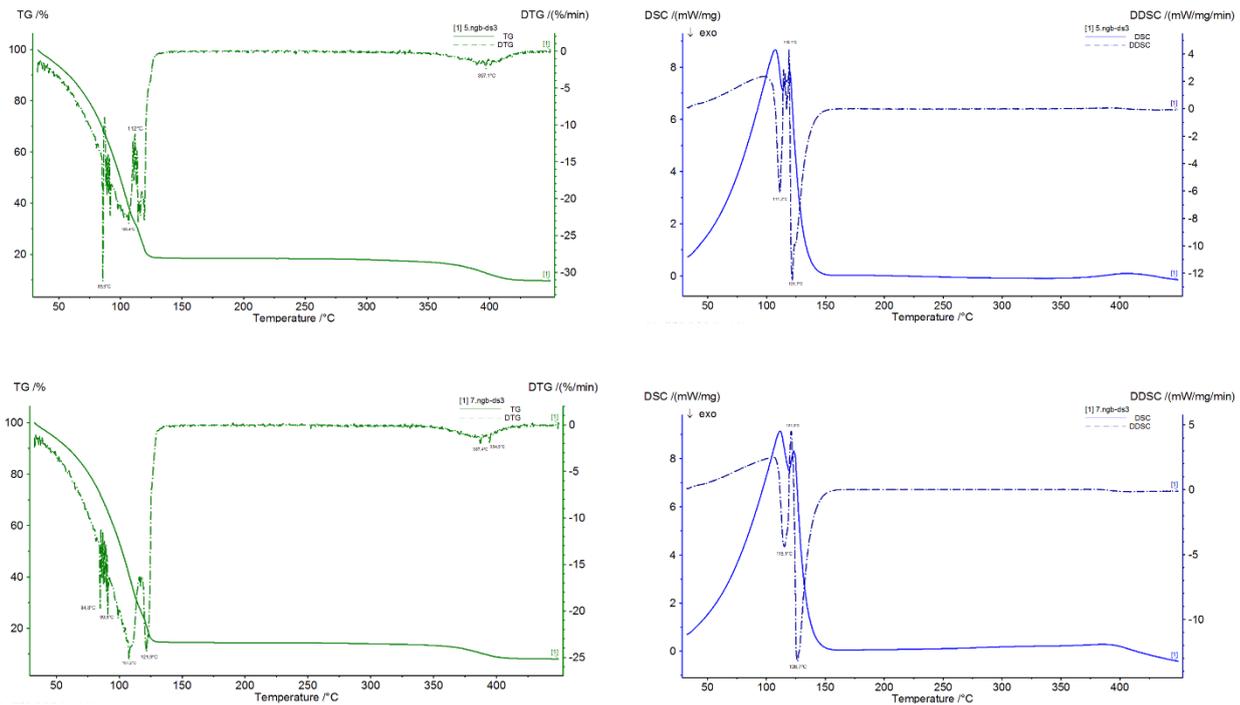


Figura 11 Análises termogravimétricas das emulsões EM1 a EM6 (a) Curvas de TG e DTG e (b) TG e DSC.

Fonte: elaborado pela autora.

3.5 Análises Reológicas das emulsões

A **figura 12** apresenta a curva de escoamento das emulsões do tipo óleo em água (O/A), sem a presença de líquido iônico, sendo representado pelas nomeações **EM1**, **EM2**, **EM3**, **EM4**, **EM5** e com a presença de líquido iônico, **EM6**. Todas as amostras apresentam comportamento linear, equivalente ao comportamento de um fluido newtoniano. Apesar de variações na 3 casa decimal, exceto para a amostra A4, todas apresentam viscosidade próxima a 0,04 Pa.s (**tabela 3**). A amostra EM4 apresenta uma viscosidade de 0,052 Pa.s. Este resultado pode ser devido a quantidade de fase oleosa (maior em relação a todas as outras). Dessa forma, pode-se concluir que a fase oleosa influencia na viscosidade dos sistemas e que a presença do líquido iônico na amostra A6 não modifica significativamente a viscosidade dos sistemas, pois todas as amostras estão bem próximas de 0,04 Pa.s.

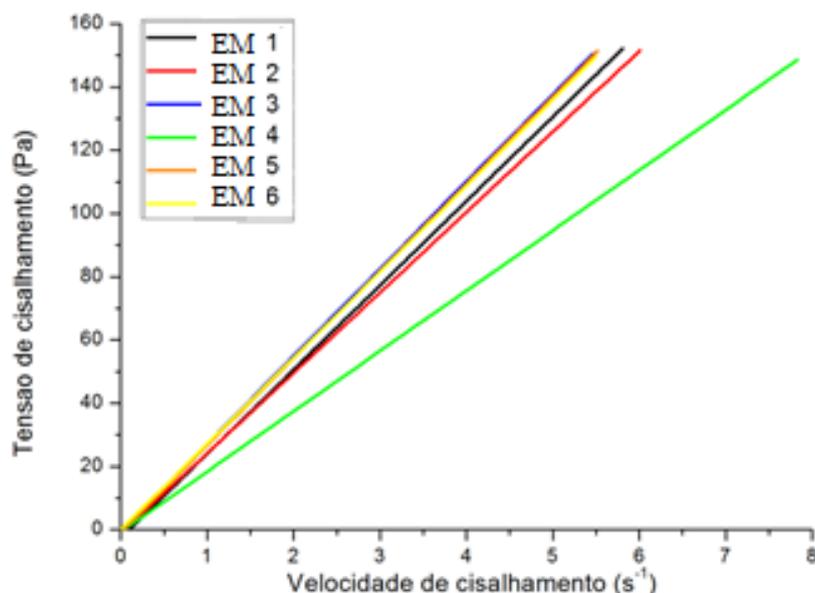


Figura 12 Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as amostras EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6.

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 3 Viscosidade das amostras EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6.

Amostra	Viscosidade (Pa.s)
EM 1	0,038
EM 2	0,039
EM 3	0,036
EM 4	0,052
EM 5	0,036
EM 6	0,034

Fonte: elaborado pela autora.

3.6 Potencial zeta, Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Índice de Polidispersão (PDI) das emulsões

De acordo com os dados demonstrados na **tabela 4**, os tamanhos das partículas das emulsões variam de 200 nm a 10000 nm. Já em relação aos resultados de índice de polidispersividade, valores de PDI abaixo de 0,2 indicam distribuição de partículas do tipo monomodal e homogêneo, o que

acontece com as amostras EM2, EM4 e EM6. Já os valores de potencial zeta, todos obtidos entre -30 mV e 30 mV.

Tabela 4 DLS (nm), PDI e potencial zeta (mV) das emulsões.

Emulsão	DLS (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
EM 1	230,07	0,148	-10,84 ± 0,3
EM 2	421,9	0,030	-28,0 ± 0,4
EM 3	635,3	0,184	-21,0 ± 0,1
EM 4	228,3	0,108	-29,9 ± 0,2
EM 5	543,4	0,123	-17,6 ± 0,3
EM 6	257,12	0,189	15,1 ± 0,2

Fonte: elaborado pela autora

3.7 Espectroscopia Raman dos nanotubos funcionalizados com as emulsões

A Figura 13 mostra os espectros Raman dos componentes da emulsão (Óleo de Pequi, LiBF_4 e Tween). Podemos observar, no espectro da emulsão, os principais modos vibracionais do Óleo de Pequi em torno 1064, 1298, 1441 e 1657 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos $\text{C}=\text{CH}_2$, $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{O}$, respectivamente.

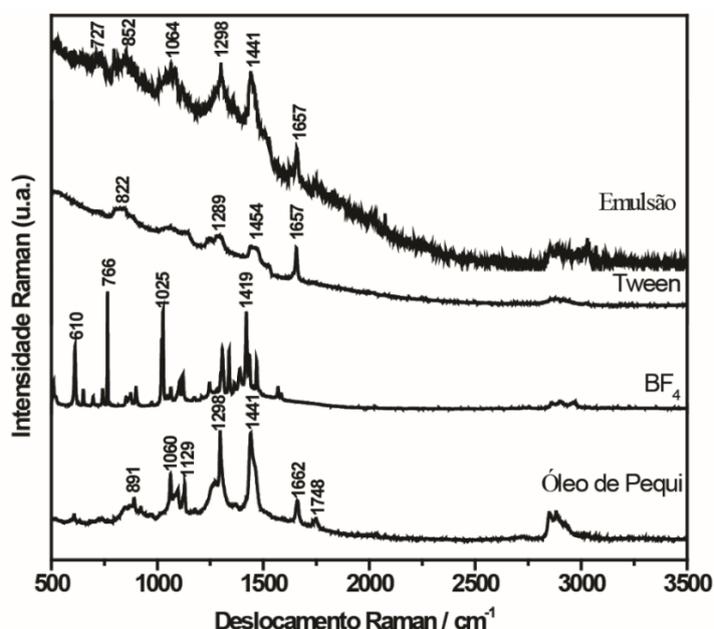


Figura 13 Espectros dos componentes da emulsão $l_0 = 785 \text{ nm}$.

Fonte: elaborado pela autora.

A Figura 14 mostra os espectros Raman da emulsão sobre os nanotubos de TiO_2 antes e após a lavagem com tampão. Os espectros Raman apresentados na Figura 02 mostram as frequências

vibracionais características, em ambos os casos da emulsão em torno 1120, 1274, 1443 e 1526 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos $\text{C}=\text{CH}_2$, $\text{C}=\text{C}$, respectivamente.

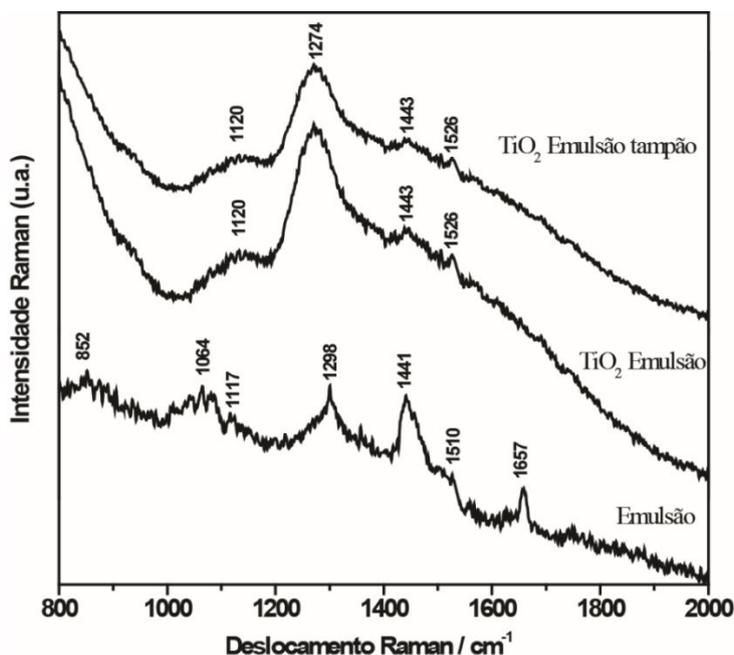


Figura 14 Espectros Raman da Emulsão, TiO₂-Emulsão e TiO₂-emulsão após a lavagem com tampão. $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$.

Fonte: elaborado pela autora.

Ao compararmos os espectros da emulsão com os espectros TiO₂-emulsão observamos variações tanto nas intensidades relativas como nos deslocamentos relativos, principalmente, das bandas em torno de 1274 e 1443 cm^{-1} atribuídas (estiramento $\text{C}=\text{CH}_2$ e $\text{C}=\text{C}$) do óleo de pequi, respectivamente.

3.8 Avaliação da citotoxicidade do óleo de Pequi, Líquido iônico e emulsões

Os resultados de MTT mostraram que o óleo de Pequi não apresentou citotoxicidade significativa nas concentrações testadas (**figura 15**). Após 72 horas de incubação, a concentração mais alta testada - de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - inibiu apenas 11% do crescimento celular.

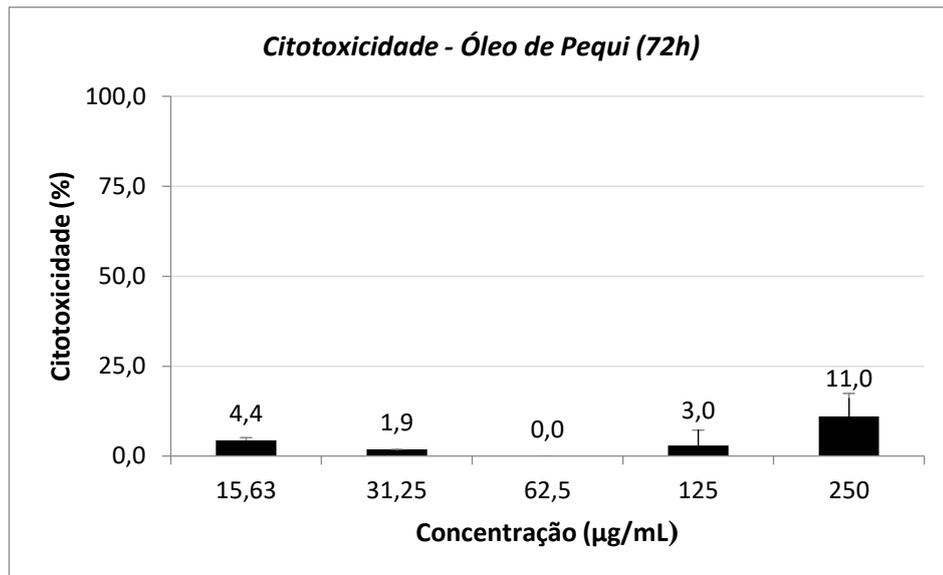


Figura 15 Citotoxicidade do óleo de Pequi em 72h.

Fonte: elaborado pela autora.

Com relação à viabilidade das células (**figura 16**), as concentrações 15,63 (1); 31,25 (2); 62,5 (3); 125 (4); e 250 µg/ml (5) apresentaram, em percentual, os valores de 102,92; 106,22; 113,51; 112,75; 101,31%, respectivamente. Portanto, a concentração que melhor propiciou viabilidade celular foi a de 62,5 µg/ml (3).

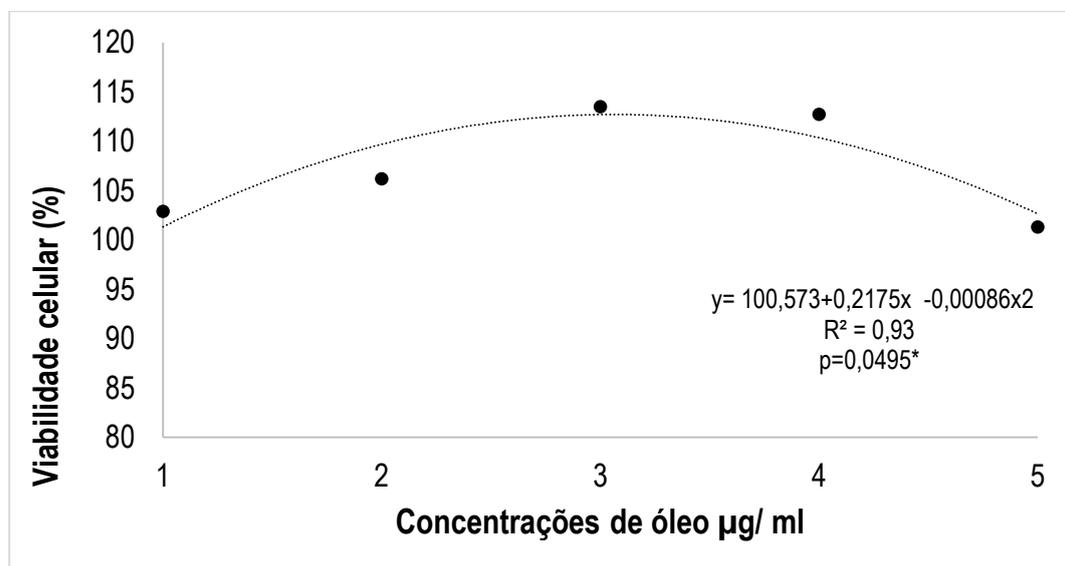


Figura 16 Porcentagem de células viáveis (%), incubadas por 72 h, a 37°C, em placa de Petri, contendo diferentes concentrações de óleo de pequi: 15,63 (1); 31,25 (2); 62,5 (3); 125 (4); e 250 µg/ml (5). Valores médios de viabilidade celular, em cada dosagem, foram estatisticamente diferentes entre si, pela regressão em análise de variância ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora.

Após 72 horas, os testes de MTT com o líquido iônico [BisOct(MIM)2][2BF4] mostram que o mesmo apresentou uma citotoxicidade significativa dentre as concentrações testadas, que foi a de 250 µg/mL (**figura 17**), com 58,5% de citotoxicidade.

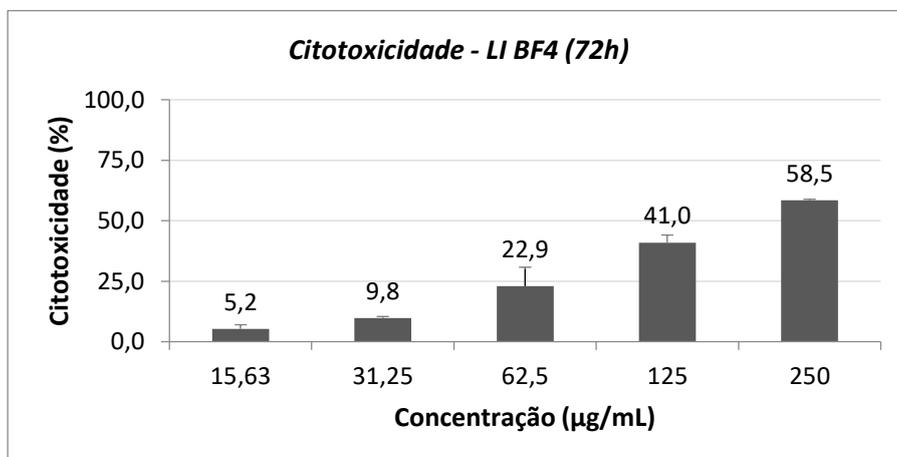


Figura 17 Citotoxicidade do óleo do LIBF4 em 72h.

Fonte: elaborado pela autora.

De acordo com o que está demonstrado na **figura 18**, à medida que ocorre o aumento da concentração, há uma diminuição da viabilidade celular. Os valores encontrados foram: 96,38; 90,99; 71,77; 57,02 e 41,96% para as concentrações 15,63 (1); 31,25 (2); 62,5 (3); 125 (4); e 250 µg/ml (5), respectivamente. A concentração capaz de causar um efeito citotóxico em 50% das células foi de 117,97 µg/mL de [BisOct(MIM)2][2BF4].

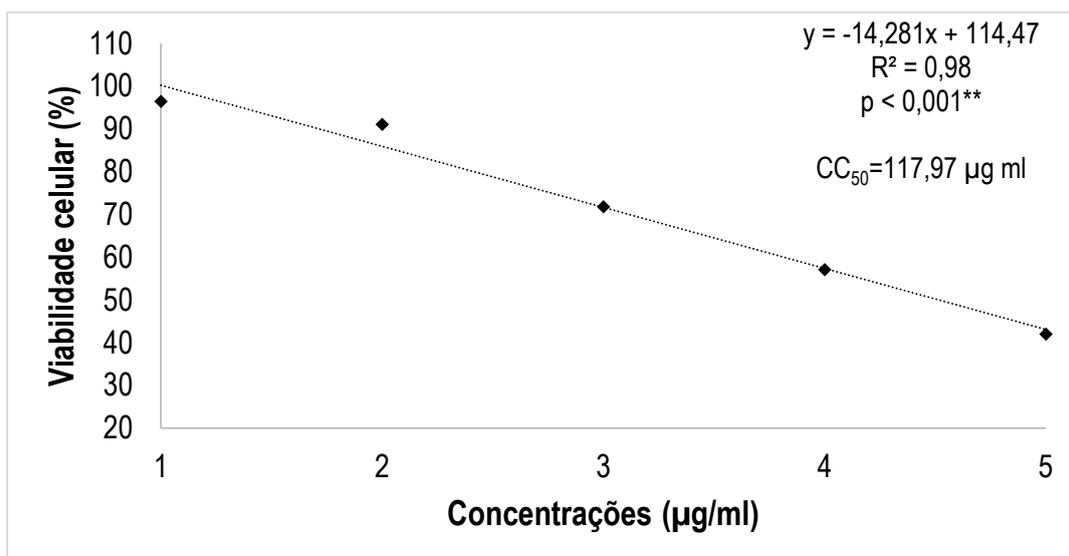


Figura 18 Porcentagem de células viáveis (%), incubadas por 72 h, a 37°C, em placa de Petri, contendo diferentes concentrações de óleo de pequi: 15,63 (1); 31,25 (2); 62,5 (3); 125 (4); e 250 µg/ml (5). Valores médios de viabilidade celular, em cada dosagem, foram estatisticamente diferentes entre si, pela regressão em análise de variância ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora.

Os testes de MTT com as emulsões (**figura 19**) EM1, EM2 e EM6 não apresentaram nenhuma toxicidade. Já as emulsões EM3, EM4 e EM5 apresentaram citotoxicidade de 21,7%, 6,1% e 23,4%, respectivamente.

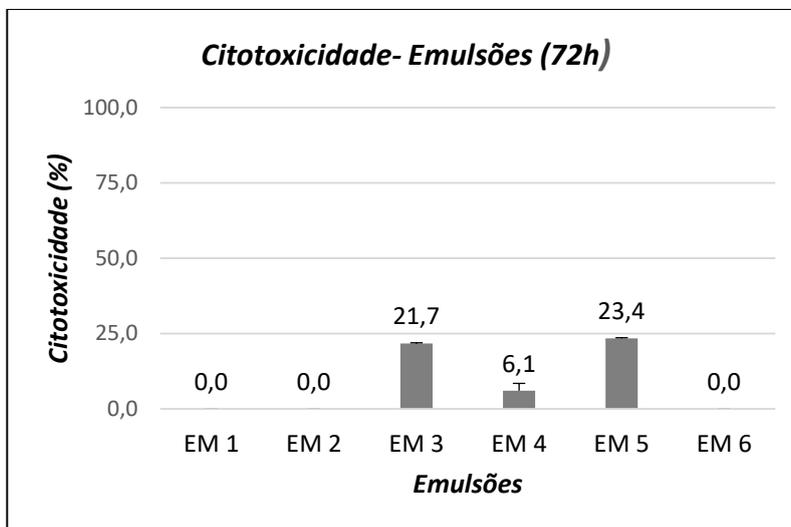


Figura 19 Citotoxicidade das emulsões EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6 em 72h.

Fonte: elaborado pela autora.

Já no que diz respeito à viabilidade das células frente às diferentes emulsões, há como inferir que cada concentração apresentou percentual de viabilidade distinto, no entanto a emulsão que melhor se destacou foi a emulsão 6 (EM6), que apresentou 212,17% de viabilidade (**figura 20**).

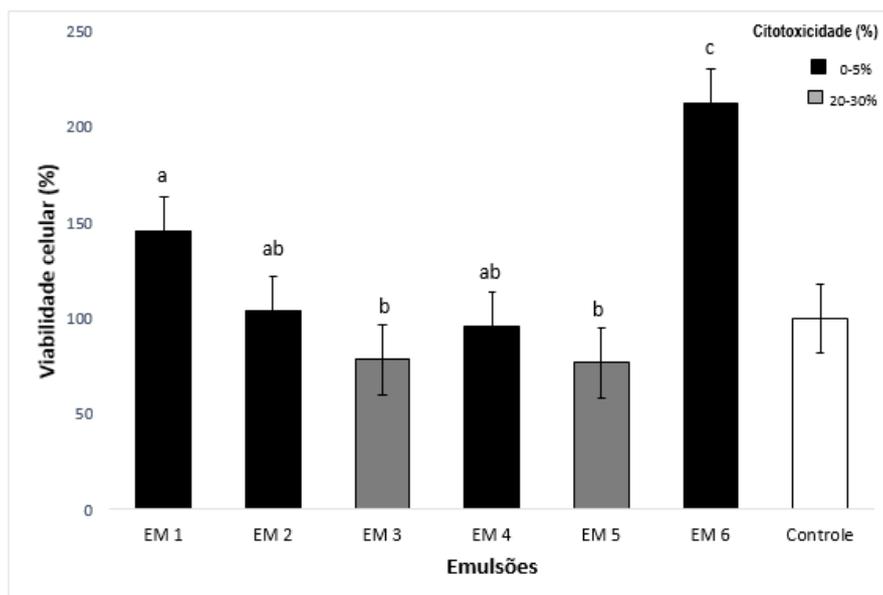


Figura 20 Porcentagem de células viáveis (%), incubadas por 72 h, a 37°C, em placas de Petri, com as emulsões EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6. Médias seguidas por letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Fonte: elaborado pela autora.

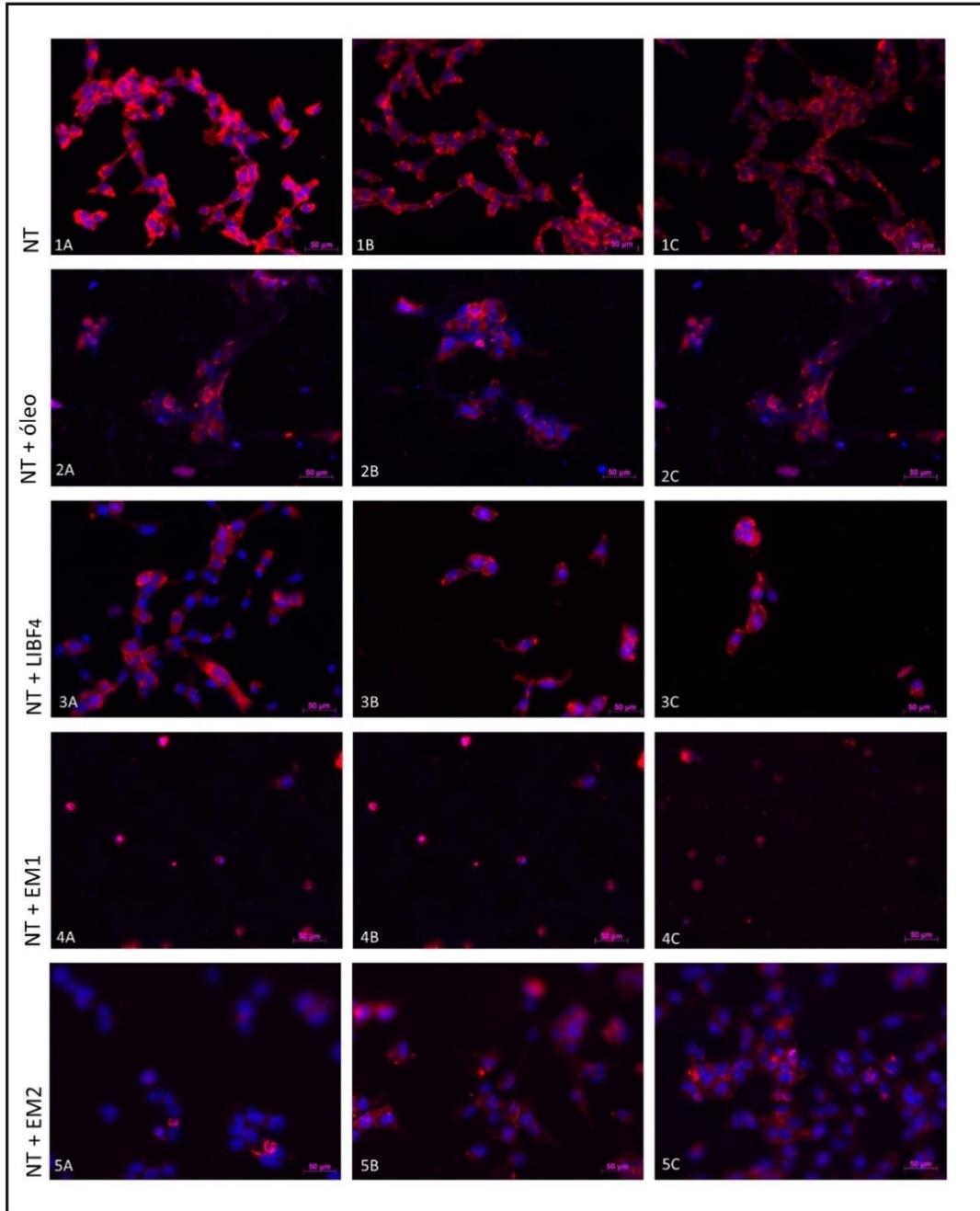
3.9 Avaliação da adesão celular

A fim de avaliar a adesão, espalhamento, morfologia e densidade celular por meio de análise microscópica de fluorescência, foi realizada a incubação das células por 24 horas. Ao final deste período, foi feita a marcação dos núcleos das células com o DAPI, que emite fluorescência na faixa correspondente ao azul, e os filamentos de actina foram marcados com a rodamina-faloidina, que emite fluorescência no comprimento de onda que corresponde ao vermelho.

As amostras de nanotubos de TiO_2 contendo apenas nanotubos, apresentaram células morfologicamente conservadas, com citoplasma espalhado, filamentos bem estruturados e células vizinhas bem aderidas entre si (**figura 21. 1A-1C**).

Ao contrário, as amostras NT + óleo (**figura 21. 2A-2C**), NT + LIBF₄(**figura 21. 3A-3C**), NT + EM1 (**figura 21. 4A-4C**), NT + EM2 (**figura 21. 5A-5C**), NT + EM3 (**figura 21. 6A-6C**), NT + EM4 (**figura 21. 7A-7C**) e NT + EM5 (**figura 21. 8A-8C**) apresentaram de média a baixa densidade celular quando comparadas ao controle, pois as poucas células aderidas às superfícies formavam grupos isolados, com pouco ou nenhum contato com células vizinhas, sendo possível observar um decréscimo na intensidade da fluorescência correspondente à marcação de actina. Filamentos curtos e desorganizados foram observados apenas na região perinuclear, o que não condiz com a distribuição esperada para este elemento do citoesqueleto.

Já a amostra NT + EM6 (**figura 21. 9A-9C**) foi a que mais se destacou devido a sua semelhança com o padrão de fluorescência seguido pela amostra controle, ou seja, a amostra foi capaz de induzir a adesão e proliferação celular, sugerindo a boa biocompatibilidade desse material funcionalizado.



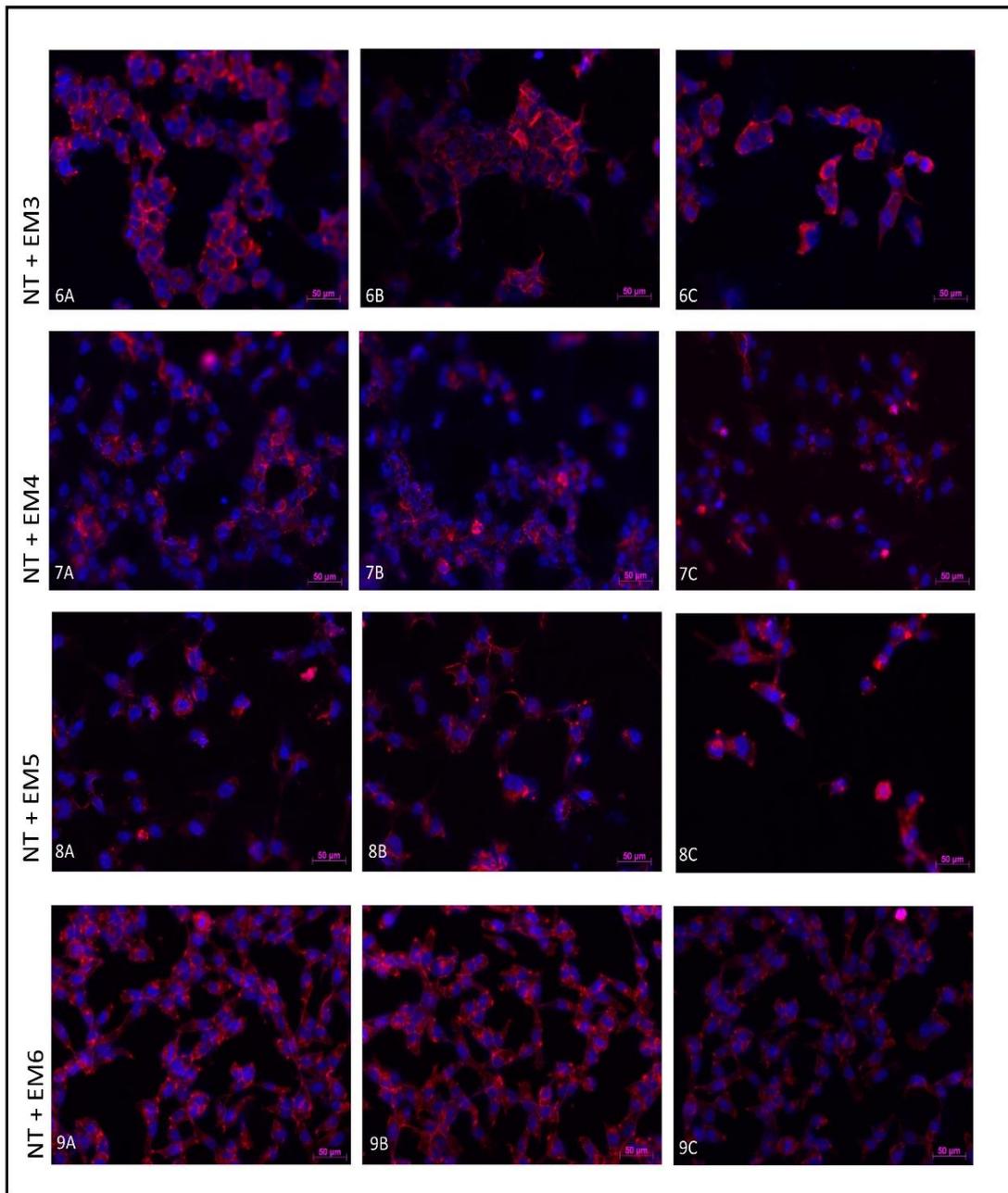


Figura 21 Avaliação dos osteoblastos cultivados sobre diferentes amostras.

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: imagens de microscopia de fluorescência evidenciam os filamentos de actina (vermelho) e núcleo (azul).

(1A-1C) Osteoblastos cultivados sobre NT após 24h de incubação;

(2A-2C) Osteoblastos cultivados sobre NT + óleo após 24h de incubação;

(3A-3C) Osteoblastos cultivados sobre NT + LIBF₄ após 24h de incubação;

(4A-4C) Osteoblastos cultivados sobre NT + EM1 após 24h de incubação;

(5A-5C) Osteoblastos cultivados sobre NT + EM1 após 24h de incubação;

(6A-6C) Osteoblastos cultivados sobre NT + EM1 após 24h de incubação;

(7A-7C) Osteoblastos cultivados sobre NT + EM1 após 24h de incubação;

(8A-8C) Osteoblastos cultivados sobre NT + EM1 após 24h de incubação;

(9A-9C) Osteoblastos cultivados sobre NT + EM1 após 24h de incubação.

Barra de escala = 50µm

Por meio das imagens que foram obtidas de microscopia de fluorescência, foi realizada a quantificação do número de células que aderiram às amostras, a fim de aferir indiretamente a proliferação celular. A média de cada contagem foi comparada à média do grupo controle. Os resultados foram expressos em porcentagem (**tabela 5 e figura 22**).

Tabela 5 Avaliação de adesão celular¹ de osteoblastos em diferentes substratos funcionalizados.

Tratamento	Adesão ²	Taxa de adesão (%)
NTs	68,2 ^{ab}	100
NTs+óleo	31,8 ^{bc}	46,6
NTs+LI	30,9 ^c	45,3
NTS+EM1	10,7 ^d	15,7
NTS+EM2	32,1 ^c	47,1
NTS+EM3	26,6 ^c	39,0
NTS+EM4	54,2^{abc}	79,5
NTS+EM5	30,6 ^{bc}	44,9
NTS+EM6	74,8^a	109,7

¹Os resultados foram expressos em valor médio de adesão de osteoblastos em diferentes substratos funcionalizados. Valores seguidos por letras em negrito representam os melhores percentuais de adesão;

²Médias seguidas por letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,01$), pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: elaborado pela autora

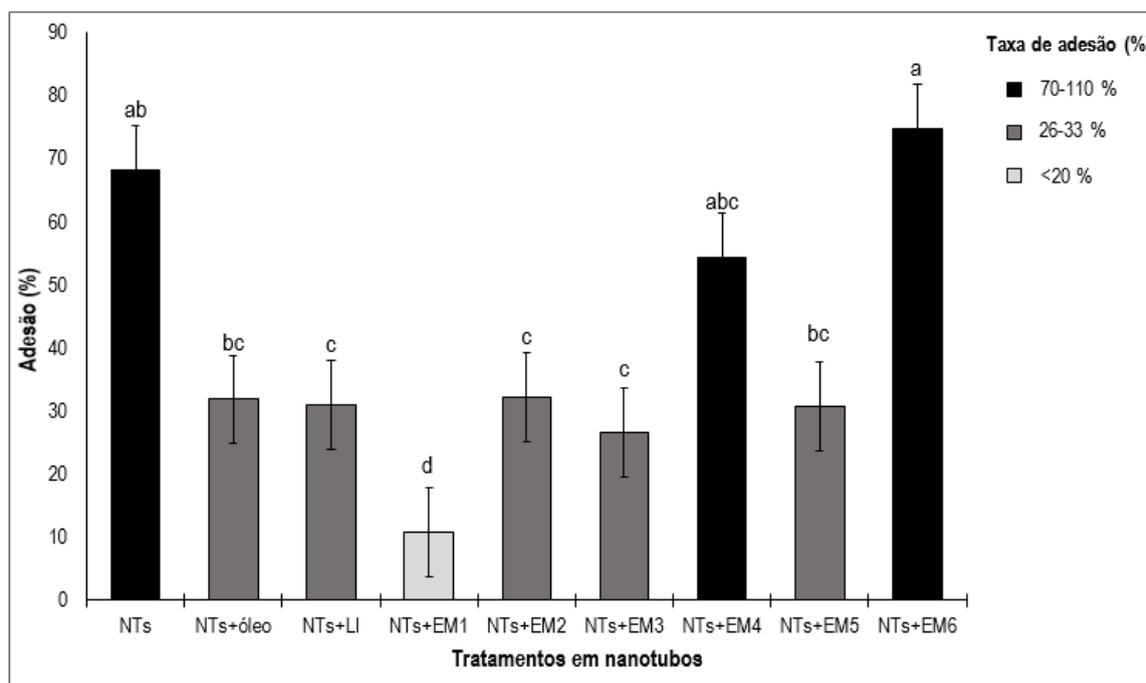


Figura 22 Quantificação da adesão dos osteoblastos sobre diferentes amostras NTs (nanotubos), NTs+ óleo (nanotubos e óleo), NTs + LI (nanotubos e líquido iônico), NTs + EM1 (nanotubos e emulsão 1), NTs + EM2 (nanotubos e emulsão 2), NTs + EM3 (nanotubos e emulsão 3), NTs + EM4 (nanotubos e emulsão 4), NTs + EM5 (nanotubos e emulsão 5), NTs + EM6 (nanotubos e emulsão 6). Médias seguidas por letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,01$), pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, com dados transformados pelo modelo log (x).

Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados obtidos para a maioria das amostras demonstraram uma redução significativa do número de células aderidas quando comparadas ao controle. No entanto, a máxima adesão celular ocorreu na amostra NTs+EM6, conforme já demonstrado, possuindo 109,7% de taxa de adesão, o que não é estatisticamente significativo, no entanto mostra um aumento de quase 10% de aderência, o que carece de investigações mais detalhadas.

4 DISCUSSÃO

De acordo com Arsi et al. [30], para suplantar a corrosão, bem como melhorar a textura da superfície e propriedades de biocompatibilidade, faz-se necessária a modificação de superfícies, sendo a anodização um método de tratamento bastante eficaz para a fabricação de diferentes tipos de filmes de óxido protetores em metais. Superfícies de titânio alteradas pelo método de anodização, em alta tensão, influenciam a cristalização da superfície da camada de óxido e, desse modo, proporcionam rugosidade e porosidade preferenciais. Segundo Chu [31], a anodização também proporciona a fabricação de nanotubos, os quais mimetizam a microestrutura do osso e, por isso, nanotubos de titânio têm atraído para si muita atenção. TiO_2 possui 3 formas cristalográficas distintas, sendo as principais anatase, rutilo e broquita [32]. No presente estudo, os nanotubos passaram por tratamento térmico após anodização, o que proporcionou o surgimento da fase anatase, que teve sua presença confirmada por análise de DRX. Esta forma cristalina foi selecionada por ser altamente organizada e por melhor favorecer a nucleação da hidroxiapatita, pois ocorre epitaxia das duas formas cristalinas, o que permite melhor osseointegração [33,34]. Já o difratograma do líquido iônico [BisOct(MIM)₂][2BF₄] demonstra sua natureza cristalina, que se explica por meio de presença de um cátion cercado por doze ânions [35].

As imagens obtidas por meio de MEV comprovam que, após anodização, houve a formação de nanotubos de TiO_2 com estrutura nanotubular altamente organizada, bem distribuída e bastante definida [33,34]. Não há um consenso sobre qual o melhor diâmetro para nanotubos de TiO_2 , no entanto alguns estudos têm demonstrado que valores entre 15 nm e 100 nm favorecem a molhabilidade, resultando em uma superfície hidrofílica, que é crucial para os processos de adsorção de proteínas, adesão e espraiamento celular [36,37]. Resultados de diâmetros de nanotubos obtidos neste estudo giram em torno de 90 nm, valor este que se encontra dentro da faixa de diâmetros, já estabelecida na literatura, que oferece melhor biocompatibilidade.

O conhecimento acerca do uso de plantas medicinais é importante para a obtenção de novas substâncias de interesse biológico. Nesse contexto, a caracterização química se torna de grande relevância, pois por meio da mesma é possível a identificação de compostos mais incidentes (majoritários), os quais podem ser isolados e testados quanto ao seu potencial biotecnológico, sem a interferência de outros componentes. Essa informação promove estudos de bioprospecção, desenvolvimento e exploração racional de recursos médicos derivados da flora nativa [38]. Por meio da caracterização química do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm (Pequi) foi possível identificar a presença predominante do ácido oleico, o que faz do mesmo seu composto majoritário. Resultados semelhantes foram obtidos nas pesquisas de Quirino et al. e Figueiredo et al. [39,40].

As análises térmicas consistem em uma série de técnicas nas quais uma propriedade de um material ou sistema é avaliada em função da temperatura durante um programa de tratamento térmico. Diversas são as propriedades possíveis de serem avaliadas (físicas, termodinâmicas, mecânicas, ópticas, magnéticas, elétricas, acústicas), mas as análises principais são associadas à avaliação de variação de massa, temperatura, entalpia e dimensões [41]. Neste trabalho, foram feitas análises térmicas (DSC e TG/DTG) do óleo, líquido iônico e das seis emulsões selecionadas. A amostra de óleo fixo de pequi não apresentou degradação térmica devido ao fato de não possuir tantos compostos voláteis quanto os presentes em óleos essenciais e o líquido iônico [BisOct(MIM)2][2BF4], por sua vez, também se mostrou estável, apresentando degradação térmica em 348°C [35-42]. Já as amostras EM1 a EM6 possuem características térmicas semelhantes, pois apresentam duas degradações, uma em 95°C e outra em 450°C e massa residual na faixa de 7,3%-15,5% [43].

A reologia que estuda as propriedades de escoamento dos líquidos, ou simplesmente em termos de viscosidade, e também em relação a várias propriedades viscoelásticas [44] estabeleceu-se como a ciência da deformação e de fluxo de matéria, ou seja, trata-se do estudo da forma na qual os materiais respondem a um estresse ou tensão aplicada. Ela descreve essa deformação que o corpo sofre, e neste contexto, estes corpos podem ser sólidos, líquidos ou gases [45-47]. A reologia da emulsão é uma manifestação direta da interação das forças que ocorrem no sistema. As determinações reológicas permitem obter informações acerca da organização estrutural e das interações entre os componentes que formam a emulsão. As instabilidades provenientes da variação no tamanho e no número de partículas e na orientação ou migração do emulsionante durante um período de tempo podem ser detectadas por meio de alterações na viscosidade aparente do produto [48-54]. Por meio de análises reológicas foi possível concluir que a fase oleosa influencia na viscosidade dos sistemas com maior quantidade de fase oleosa, como é o caso da EM4, que possui 8% de fase oleosa e viscosidade

de 0,052 Pa.s. A presença do líquido iônico na fase aquosa da EM6 não muda significativamente a viscosidade dos sistemas, pois todas as amostras estão bem próximas de 0,04 Pa.s.

Os tamanhos das partículas das emulsões estão de acordo com o estabelecido na literatura para emulsões, que são valores que variam de 200 nm a 10000 nm [55]. Já em relação aos resultados de índice de polidispersividade, valores de PDI abaixo de 0,2 indicam distribuição de partículas do tipo monomodal e homogêneo, o que reflete a qualidade da amostra quanto à estabilidade, que acontece com as amostras EM2, EM4 e EM6 [56]. Já os valores de potencial zeta, todos obtidos entre -30 mV e 30 mV, indicam estabilidade eletrostática de moderada a adequada [57]. Dessa forma, os resultados de tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta sugerem que os sistemas em estudo são consideravelmente estáveis, para o período de 30 dias.

Ensaio com células são usados para a *screening* de compostos, a fim de determinar se as moléculas de teste possuem efeitos na proliferação celular ou mostram efeitos citotóxicos diretos que eventualmente levam à morte das células [58]. Um dos ensaios mais usados é o de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. As desidrogenases mitocondriais existem apenas em células com metabolismo ativo, ou seja, células viáveis. As desidrogenases mitocondriais clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto amarelado em outro de coloração azul escuro, chamado de formazan {E, Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, cristais insolúveis em soluções aquosas [57]. Neste estudo, foi feita a avaliação da citotoxicidade do óleo de pequi, líquido iônico e emulsões frente às células de osteossarcoma HOS- ATTC CRL1543 (linhagem celular cancerosa). Os resultados de citotoxicidade através do método MTT do óleo de Pequi demonstram claramente que todas as concentrações testadas apresentaram baixa toxicidade, no entanto a que mostrou menor toxicidade com ótima viabilidade dos osteoblastos em 72h foi a concentração de 62,5 µg/mL apresentando 113,51% de viabilidade dos osteoblastos, os quais mantiveram-se viáveis após 72h. Não houve então concentração capaz de causar um efeito citotóxico em 50% das células. Ainda não há na literatura relatos sobre a atividade do óleo fixo de pequi sobre os osteoblastos, entretanto foi realizado um estudo de citotoxicidade com óleo de pequi da espécie (*Caryocar brasiliense* Camb) na estrutura de uma membrana à base de colágeno frente às células de fibroblastos da linhagem VERO, provenientes de rim de macaco verde africano, cujos resultados demonstraram que concentrações de óleo inferiores a 25% da concentração proposta inicialmente não apresentaram citotoxicidade. Apesar da escassez de dados acerca da citotoxicidade do óleo de pequi na literatura científica, estudos realizado por Ferreira et al. [58] utilizando o método de Meyer, apontou que o óleo de pequi apresenta citotoxicidade quando em concentrações superiores à $827,67 \pm 4,67$ µg/mL por meio de *Artemia*

nauplii. Ressalte-se a importância de investigações futuras a fim de esclarecer o comportamento desse óleo *in vitro*. Já os resultados de MTT do líquido iônico dicatiônico [BisOct(MIM)2][2BF4] mostram que a concentração que apresentou menor toxicidade com melhor viabilidade dos osteoblastos foi a de 15,63 µg/mL, apresentando apenas 5,2% de inibição, ou seja, 96,38% de viabilidade. A concentração capaz de causar um efeito inibitório em 50% das células foi a de 117,97 µg/mL. Ainda não há estudos sobre a atividade do líquido iônico [BisOct(MIM)2][2BF4], no entanto Gindri et al. [59] investigaram a diferença de toxicidade entre dimetilimidazolium monocatiônico e dicatiônico baseados-IL(s) em osteoblastos (MC3T3-E1). Observou-se que a introdução de uma nova porção catiônica na estrutura de IL (dicatiônico), em oposição a uma porção catiônica em LI(s) monocatiônicos, reduziu a toxicidade do composto por 20 vezes. Segundo Kumar et. al. [60] os efeitos citotóxicos de dois Líquidos iônicos imidazólio dicatiônicos sintéticos frente às células osteossarcoma Saos-2 (linhagem celular cancerosa) e MC3T3-E1 células pré-osteoblastos (linhagens celulares não cancerosas) apresentaram após 48 horas de exposição baixo efeito tóxico contra as linhas celulares investigadas e, portanto, quantidades consideráveis desses respectivos compostos podem ser usadas sem causar danos nas células. Quanto aos resultados de MTT das emulsões observamos que não houve quadro citotóxico das formulações testadas para as emulsões EM1, EM2 e EM6 e para as emulsões EM3, EM4 e EM5 de 21,7%, 6,1% e 23,4% respectivamente. Ainda não há estudos sobre a atividade das emulsões, no entanto Moniruzzaman et al. [61] avalia a atividade citotóxica de microemulsões (ME(s)) não aquosas com IL/o *in vitro* usando um modelo epidérmico humano reconstruído (EPI-MODEL12), cujos resultados indicam que a viabilidade celular de IL/ o ME era superior a 80%, indicando baixa citotoxicidade da droga transportadora estudada.

A funcionalização das superfícies tem sido amplamente utilizada, pois auxilia na melhora da biocompatibilidade dos materiais [62]. A Figura 1 mostra os espectros Raman dos componentes da emulsão (Óleo de Pequi, BF₄ e Tween) e, segundo Sena et al. [63] e Baeten et al. [64], a caracterização do óleo geralmente é realizada considerando cinco regiões do espectro: A) 3100 - 2805 cm⁻¹; B) 1770 -1615 cm⁻¹; C) 1500 -1420 cm⁻¹; D) 1345 -1230 cm⁻¹; e, E)1150- 850 cm⁻¹. Podemos observar, no espectro da emulsão, os principais modos vibracionais do Óleo de Pequi em torno de 1064 cm⁻¹, 1298 cm⁻¹, 1441 cm⁻¹ e 1657 cm⁻¹ atribuídas aos estiramentos C=CH₂, C=C e C=O, respectivamente. Indicando que, sob estas condições, os modos vibracionais do óleo de pequi sobressaem em relação aos modos vibracionais dos outros componentes. Os picos vibracionais do óleo de pequi da espécie *Caryocar coryaceum* Witt, estão de acordo com a pesquisa realizada por Sena et al. [63], cujos resultados apontaram picos vibracionais de 1301 cm⁻¹, 1438 cm⁻¹ e 1654 cm⁻¹ estando na região de espectro entre 1345- 1230 (CH₂ em vibração de torção de fase); 1500 -1420 cm⁻¹ (C=C) e 1770-1615 cm⁻¹ (C=O) , respectivamente. Além disso, foi encontrado um pico vibracional de 1270 cm⁻¹ no qual

foi atribuído a uma vibração de flexão *cis* não conjugada ($=\text{CH}_2$). Já na Figura 2 são mostrados os espectros Raman da emulsão sobre os nanotubos de TiO_2 antes e após a lavagem com tampão. Os espectros Raman apresentados mostram as frequências vibracionais características, em ambos os casos, da emulsão em torno 1120 cm^{-1} , 1274 cm^{-1} , 1443 cm^{-1} e 1526 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos $\text{C}=\text{CH}_2$, $\text{C}=\text{C}$, respectivamente. Ao compararmos os espectros da emulsão com os espectros TiO_2 -emulsão observamos variações tanto nas intensidades relativas como nos deslocamentos relativos, principalmente, das bandas em torno de 1274 cm^{-1} e 1443 cm^{-1} atribuídas atribuídas (estiramento $\text{C}=\text{CH}_2$ e $\text{C}=\text{C}$ CH_2) do óleo de pequi, respectivamente. Podemos inferir de acordo com o estudo de Sena et al. (2010) que o espectro 1274 cm^{-1} pode está atribuído a uma vibração de flexão *cis*, não conjugada $=\text{CH}_2$, no qual foi identificado um pico vibracional de 1270 cm^{-1} . O pico vibracional de 1441 cm^{-1} do óleo de pequi está presente também na emulsão. Observamos um pico de 1443 cm^{-1} tanto na emulsão com nanotubos TiO_2 sem tampão quanto após a lavagem. Esse pico vibracional pode está atribuído a mistura do óleo de pequi com o surfactante e líquido iônico BF_4 com presença de grupamento (CH_2). As acentuadas variações de intensidade e de deslocamentos das bandas, sugerem que estas ligações, possivelmente, estão envolvidas nas ligações com os nanotubos TiO_2 . Outra informação relevante é que mesmo após a lavagem com o tampão a emulsão permaneceu na superfície dos nanotubos TiO_2 mostrando que há uma interação relativamente forte.

No presente estudo, os nanotubos de TiO_2 , funcionalizados com as emulsões (EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6) após 24 horas de incubação, foram observados quanto a adesão através de microscopia de fluorescência. O núcleo foi visualizado em azul pela marcação com o DAPI e os filamentos de actina em vermelho, marcados com a rodamina-faloidina, em diferentes campos da superfície das amostras. Embora não haja significância estatística no resultado de adesão celular da superfície funcionalizada com a emulsão EM6 em relação à superfície com apenas nanotubos, é notória a equivalência de adesão de ambas, sendo seu aspecto de células interligadas (fenômeno da filopodia) [65]. A adesão de osteoblastos nessa superfície funcionalizada é um pré-requisito para as posteriores funções destas células, por exemplo, para a deposição de cálcio na formação do osso. Dessa forma, mais estudos são necessários para avaliar as características de adesão das células nas superfícies funcionalizadas com a emulsão EM6.

5 CONCLUSÕES

- A anodização do titânio (Ti) é um processo essencial, pois através dele os nanotubos são produzidos. O tratamento térmico também é primordial, pois é ele que proporciona o surgimento da fase anatase, fase esta onde os osteoblastos conseguem realizar melhor nucleação da hidroxiapatita;
- Neste estudo, os NTs obtidos possuíam diâmetro na faixa de 88 nm, o que corrobora com a utilização de NTs com diâmetros abaixo de 100 nm, para melhor biocompatibilidade;
- Tratamentos na superfície do titânio (Ti), com finalidade de produzir nanotubos, bem como sua posterior funcionalização têm sido amplamente estudados. Óleos e líquidos iônicos possuem características bastante interessantes do ponto de vista biotecnológico e suas propriedades podem ser potencializadas quando da junção de ambos em um mesmo sistema que, no presente estudo, foram as emulsões;
- O óleo fixo de pequi, em diferentes concentrações (15,63; 31,25; 62,5; 125; e 250 µg/ml), não apresentou citotoxicidade em 72h. Tais concentrações foram, inclusive, capazes de estimular a viabilidade das células, onde a concentração de 62,5 µg/ml apresentou a maior viabilidade (113,51%). As demais concentrações apresentaram viabilidade em torno de 100%;
- O LIBF4 manteve a viabilidade celular em baixas concentrações (15,63; 31,25; 62,5; 125 µg/ml) em 72h. No entanto, a maior concentração, a de 250 µg/mL, apresentou-se citotóxica, atingindo 58,5% de citotoxicidade.
- Já dentre as emulsões testadas (EM1, EM2, EM3, EM4, EM5 e EM6) não houve citotoxicidade considerável. Uma delas, a EM6, permitiu a viabilidade celular e, inclusive, auxiliou na proliferação das células, apresentando 212,7% de viabilidade, mais que o dobro do controle (100%);
- Diversas foram as caracterizações (MEV, DRX, DSC, TGA, reologia, Potencial zeta, DLS, PDI) feitas no sentido de demonstrar a estabilidade das amostras de óleo de pequi, líquido iônico e emulsões e as mesmas foram suficientemente relevantes para a demonstração desse fato. O óleo fixo não apresentou degradação no intervalo de temperatura testado, o líquido iônico mostrou-se cristalino e termicamente estável e as emulsões, especialmente a EM6, apresentaram características importantes, as quais indicam elevada estabilidade dos sistemas emulsionados;
- A Espectroscopia Raman foi capaz de detectar que, de fato, houve a funcionalização dos nanotubos por parte das emulsões mesmo após ter sido feita a lavagem com tampão PBS;

- O uso de filmes de emulsões sobre as superfícies dos nanotubos não foi, em sua maioria, capaz de favorecer processos de adesão, bem como de proliferação celular. No entanto, a amostra funcionalizada com a EM6 apresentou uma porcentagem de adesão (109%) um pouco superior àquela do controle (100%), o que sugere que estudos aprofundados devem ser conduzidos, a fim de elucidar a atividade mitogênica, bem como a determinação da resposta fisiológica dos NTs funcionalizados com a mesma, uma vez que a amostra é bastante estável e, isoladamente, no teste de citotoxicidade, foi capaz de induzir a proliferação celular.

6 REFERÊNCIAS

- [1] M. Long, H.J. Rack, Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective, *Biomaterials*. 19 (1998) 1621-1639.
- [2] K. Niespodziana, K. Jurczyk, M. Jurczyk. The synthesis of titanium alloys for biomedical applications, *Rev. Adv. Mater. Sci.* 18 (2008) 236-240.
- [3] D. Mihov, B. Katerska. Some biocompatible materials used in medical practice, *Trakia Journal of Sciences*. 8 (2010) 119-125.
- [4] Minagar et al. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces, *Acta biomaterialia*. 8 (2012) 2875-2888.
- [5] M. Kulkarni et al. Titanium nanostructures for biomedical applications, *Nanotechnology*. 26 (2015) 062002.
- [6] D. A. Puleo, A. Nanci. Understanding and controlling the bone–implant interface, *Biomaterials*. 20 (1999) 2311-2321.
- [7] D. F. Williams. Titanium for medical applications. *Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*, Berlin: Springer. (2001) 13-24.
- [8] D. Ganguly, R. Shahbazian-yassar, T. Shokuhfar. Recent advances in nanotubes for orthopedic implants, *J. Nanotechnol. Smart Mater.* 1 (2014) 201.
- [9] K. Huo et al. Fabrication, modification, and biomedical applications of anodized TiO₂ nanotube arrays, *Rsc Advances*. 4 (2014) 17300-17324.
- [10] L. Mohan, C. Anandan, N. Rajendran. Electrochemical behaviour and bioactivity of self-organized TiO₂ nanotube arrays on Ti-6Al-4V in Hanks' solution for biomedical applications, *Electrochimica Acta*. 155 (2015) 411-420.
- [11] K. de Groot et al. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 21 (1987) 1375-1381.
- [12] I. Zhitomirsky, L. Gal-Or. Electrophoretic deposition of hydroxyapatite, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 8 (1997) 213-219.
- [13] T. Peltola et al. Calcium phosphate induction by sol-gel-derived titania coatings on titanium substrates in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 41 (1998) 504-10.
- [14] H.B Wen et al. Preparation of bioactive microporous titanium surface by a new two-step chemical treatment, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 9 (1998) 121-128.
- [15] K. Ozeki et al. Crystal chemistry of hydroxyapatite deposited on titanium by sputtering technique, *Bio-medical materials and engineering*. 10 (2000) 221-227.
- [16] A.I. Munoz et al. In vivo electrochemical corrosion study of a CoCrMo biomedical alloy in human synovial fluids, *Acta biomaterialia*. 21 (2015) 228-236.

- [17] B. Ben-Nissan, A.H. Choi, R. Choi, B.A. Roest, A. L. Bendavid. 2 - adhesion of hydroxyapatite on titanium medical implants, in: M. Mucalo (Ed.), Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications, Woodhead Publishing 2015. (2015) 21-51.
- [18] R. K. Alla et al. Surface roughness of implants: a review, Trends in Biomaterials and Artificial Organs. 25 (2011) 112-118.
- [19] A.R. Rafieerad et al. Surface characterization and corrosion behavior of calcium phosphate-base composite layer on titanium and its alloys via plasma electrolytic oxidation: A review paper, Materials Science and Engineering: C. 57 (2015) 397-413.
- [20] M.R. Kaluderovic, J.P. Schreckenba, Hans-Ludwig Graf. Titanium dental implant surfaces obtained by anodic spark deposition—from the past to the future, Materials Science and Engineering: C. 69 (2016) 1429-1441.
- [21] M. Wang et al. Greater osteoblast and mesenchymal stem cell adhesion and proliferation on titanium with hydrothermally treated nanocrystalline hydroxyapatite/magnetically treated carbon nanotubes, Journal of nanoscience and nanotechnology. 12 (2012) 7692-7702.
- [22] C. Moseke et al. TiO₂ nanotube arrays deposited on Ti substrate by anodic oxidation and their potential as a long-term drug delivery system for antimicrobial agents, Applied Surface Science. 258 (2012) 5399-5404.
- [23] T. Preocanin, N. Kallay. Point of Zero Charge and Surface Charge Density of TiO₂ in Aqueous Electrolyte Solution as Obtained by Potentiometric Mass Titration, Croatica chemica acta. 79 (2006) 95-106.
- [24] S. Monti et al. Peptide/TiO₂ surface interaction: A theoretical and experimental study on the structure of adsorbed ALA-GLU and ALA-LYS, Langmuir. 24 (2008) 3205-3214.
- [25] S. Wang et al. A molecular dynamics simulation of the structure of ionic liquid (BMIM⁺/PF₆⁻)/rutile (110) interface, Science in China Series B: Chemistry. 52 (2009) 1434-1437.
- [26] A. Vallee, V. Humblot, C-M Pradier. Peptide interactions with metal and oxide surfaces, Accounts of Chemical Research. 43 (2010) 1297-1306.
- [27] V. Madaan, A. Chanana, M.K. Kataria, A. Bilandi. Emulsion technology and recent trends in emulsion applications, International Research Journal of Pharmacy. 5 (2014) 533-542.
- [28] A.W. Tan et al. Review of titania nanotubes: Fabrication and cellular response, Ceramics International. 38 (2012) 4421-4435.
- [29] W.Q. Yu, Y.L. Zhang, X.Q. Jiang, F.Q. Zhang. *In vitro* behavior of MC3T3-E1 preosteoblast with different annealing temperature titania nanotubes, Oral Diseases. 16 (2010) 624-630.
- [30] R.I.M Asri, W.S.W. Harun, M. Samykano, N.A.C. Lah, S.A.C. Ghani, F. Tarlochan, M.R. Raza. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review, Materials Science and Engineering C. 77 (2017) 1261-1274.

- [31] P.K. Chu. Surface engineering and modification of biomaterials, *Thin Solid Films*. 528 (2013) 93-105.
- [32] S. Baghrti, K. Shameli, S.B.A. Hamid. Synthesis and Characterization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles Using Egg White Solution via Sol-Gel Method, *Journal of Chemistry*. 2013 (2012) 5.
- [33] M. Uchida, H.M. Kim, T. Kokubo, S. Fujibayashi, T. Nakamura. Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 64 (2003) 164-170.
- [34] F.L.R. Silva. Síntese e caracterização de nanoestruturas à base de dióxido de titânio, 2012. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. (2012).
- [35] C.P. Frizzo, A.Z. Tier, C.R. Bender, I.M. Gindri, M.A. Villetti, N. Zanatta, H. G. Bonacorso, M.A.P. Martins. *Ionic Liquids - Current State of the Art*. 1^a ed. Rijeka: InTech. (2015) 40.
- [36] Shin Dh et al. Wettability changes of TiO₂ nanotube surfaces, *Nanotechnology*. 22 (2011) 1-7.
- [37] N. K. Awad, S.L. Edwards, Y. S. Morsi. A review of TiO₂ NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis functionalization and potential use as bone implants, *Materials Science & Engineering C*. 76 (2017) 1401-1412.
- [38] D.A. Ribeiro, L.G.S. Oliveira, D.G. Macêdo, I.R.A. Menezes, G.M. Costa, M.A.P. Silva, S.R. Lacerda, M.M.A. Souza. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil, *Journal of Ethnopharmacology*. 155 (2014) 1522-33.
- [39] G. da Silva Quirino et al. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil, *Phytochemistry Letters*. 2 (2009) 179-183.
- [40] P.R.L. Figueiredo, I.B. Oliveira, J.B. Santana Neto, J.A. Oliveira, L.B. Ribeiro, G.S.B Ribeiro, G.S.B Viana, T.M. Rocha, L.K.A.M. Leal, M.R. Kerntopf, C.F.B. Felipe, H.D.M Coutinho, I.R.A. Menezes. *Caryocar coriaceum* Wittm. (Pequi) fixed oil presentes hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro, *Journal of Ethnopharmacology*. 191 (2016) 87-94.
- [41] R.L. Oréface, M.M. Pereira, H.S. Mansur. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. (2012).
- [42] K.S.R Brandão; U.M Nascimento; F.C. SILVA; A.G. SOUZA; M.M. CONCEIÇÃO. Avaliação da estabilidade térmica do óleo de pequi (*Caryocar Coriaceum* seed oil), In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA. 5 (2006) 172.
- [43] F.F OLIVEIRA; M.V.R. PAOLA; J.R MATOS. Análise térmica aplicada aos produtos cosméticos. *Cosmet. Toiletries*. 16 (2004) 52-54.
- [44] H.A. Barnes. Rheology of emulsions – a review, ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects***. 91 (1994) 89-95.
- [45] J.F. Steffe. *Rheological Methods in Food Process Engineering*, (Chapter 1). (1996) 418.
- [46] G. Schramm. *Reologia e reometria: Fundamentos teóricos e práticos*. (2006).

- [47] G.L. Teixeira. Estudo da estabilidade e comportamento reológico de emulsões de gordura de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) com diferentes tensoativos, 89f, Dissertação para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos. (2014).
- [48] Th.F. Tadros. Fundamental principles of emulsion rheology and their applications, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 91 (1994) 39-55.
- [49] A.G.C. Castro. A química e a reologia no processamento de alimentos. Instituto Piaget. (2003).
- [50] M.E. Aulton. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed. (2005) 677.
- [51] N.M. Mostefa, A.H. Sadok, N. Sabri, A. Hadji. Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modeling, *International Journal of Cosmetic Science*. 28 (2006) 211-218.
- [52] T. Tadros. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions, *Advances in colloid and interface science*. 108 (2004) 227-258.
- [53] T.V. Logaraj et al. Rheological behaviour of emulsions of avocado and watermelon oils during storage, *Food Chemistry*. 106 (2008) 937-943.
- [54] R.C.C. Frange, M.T.J. Garcia. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 30 (2010) 263-271.
- [55] A. G. Oliveira, M. V. Scarpa; M. A. Correa; L. F. R. Cera; T. P. Formariz. Microemulsões: Estrutura e Aplicações como Sistema de Liberação de Fármacos. *Química Nova*, 27 (2004), 131-138.
- [56] V.C. GUMIERO; P.A. ROCHA FILHO. Babassu nanoemulsions have physical and chemical stability. *Journal of dispersion science and technology*, 33 (2012) 1569-1573.
- [57] M. Kong, H.J. Park. Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier. *Carbohydrate Polymers*, 83 (2011), 1303-1310.
- [58] T. L Riss, R. A. Moravec, A. L Niles, S. Duellman, H. A Benink, T. J Worzella, L. Minor. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. 2013, 1-34.
- [59] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*. 65 (1983) 55-63.
- [60] B.S. Ferreira, C.G. Almeida, L.P. Faza, A. Almeida, C.G. Diniz, V.L. Silva, R.M. Grazul, M. Le Hyaric. M. Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods, *Molecules*. 16 (2011) 5875-5885.
- [61] I.M. Gindri et al. Dicationic imidazolium-based ionic liquids: a new strategy for non-toxic and antimicrobial materials, *RSC Advances*. 4 (2014) 62594-62602.
- [62] R.T.K. Kumar et al. Use of dicationic ionic liquids as a novel liquid platform for dielectrophoretic cell manipulation, *RSC Advances*. 6 (2016) 22594-22603.
- [63] M. Moniruzzaman et al. Ionic liquid-in-oil microemulsion as a potential carrier of sparingly soluble drug: Characterization and cytotoxicity evaluation, *International journal of pharmaceutics*. 400 (2010) 243-250.

- [64] V. G. Varanasi, M. F. Velten, T. Odatsu, A. Ilias, S. M. Iqbal, P. B, Surface Modifications and Surface Characterization of Biomaterials Used in Bone Healing Aswath, in: *Materials and Devices for bone disorders*, Elsevier Inc., 2017, 434-447.
- [65] D.M. Sena et al. Physicochemical and spectroscopical investigation of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) pulp oil, *Grasas y Aceites*. 61 (2010) 191-196.
- [66] V. Baeten, P. Hourant, M.T. Morales, R. Aparicio. Oil and fat classification by FT-Raman spectroscopy, *J. Agricult Food Chem*. 46 (1998) 2638-2646.
- [67] M.S. Stan, I. Memet, C. Fratila, E. Krasicka-Cydzik, I. Roman, A. Dinischiotu. . Effects of titanium-based nanotube films on osteoblast behavior in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research A*. 103 (2015) 48-56.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram, portanto, que emulsões contendo óleo fixo são capazes de funcionalizar a superfície anodizada do titânio, bem como estimular o crescimento celular na mesma.

Dentre as emulsões testadas, a emulsão EM6, utilizada neste estudo, foi capaz de permitir a maior viabilidade celular, ajudando na proliferação de osteoblastos.

Dessa forma, estudos mais aprofundados devem ser conduzidos, a fim de avaliar, de maneira mais aprofundada, o potencial biotecnológico de tais emulsões, em associação com biomateriais.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. D. F.; FREITAS, P. F. de; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007;
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B; SANO, S. M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMPRAPA-CPAC, 464p, 1998;
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 38p. (Documento, 54), 1994;
- ANTONUCCI, J. M.; ZEIGER, D. N.; TANG, K.; LIN-GIBSON, S.; FOWLER, B.O.; LIN, N. J. Synthesis and characterization of dimethacrylates containing quaternary ammonium functionalities for dental applications. **Dental Materials**, v. 28, n. 2, pp. 219-228, 2012;
- ANUSAVICE, K. J.; SHEN, C.; RAWLS, H. R. Phillips Materiais Dentários. 12ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013;
- ARARUNA, M. K. A.; SANTOS, K. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; BOLIGON, A. A.; STEFANELLO, S. T.; ATHAYDE, M. L.; SARAIVA, R. A.; ROCHA, J. B. T.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. A. Phenolic composition and in vitro activity of the Brazilian fruit tree *Caryocar coriaceum* Wittm. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 5, pp. 178-183, 2013.
- ARAÚJO, F.D. A review of *Caryocar brasiliense* (*Caryocaraceae*) – An economically valuable species of the central brazilian cerrados. *Economic Botany*, Bronx, v.49, n.1, p.40-48, 1995;
- ASRI, R. I. M.; HARUN., W. S.W.; SAMYKANO, M., LAH, N. A. C.; GHANI, S. A. C.; TARLOCHAN, F.; RAZA, M. R. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, pp. 1261-1274, 2017;
- BARRADAS, M. M. Estrutura do fruto e da semente do piqui – *Caryocar brasiliense* Camb. (*Caryocaraceae*). 129 f. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 1971;
- BATISTA, J.S et al. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar Coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arq. Inst. Biol**, v.77, n.3, p.441-447, 2010;
- BIOMEDICAL ENGINEERING GUIDE. **Biomedical implants**. Disponível em: <http://www.bmcentral.com/biomedical-implants/>. Acesso em: 15 mai. 2017;
- BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACEDO, J. F. Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: EPAMIG, 528p, 2002;
- BRANEMARK, P. I. Osseointegration and its experimental background. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 50, n. 3, p. 399-410, 1983;
- BROWN, P.; BUTTS, C.P.; EASTOE, J.; FERMIN, D.; GRILLO, I.; LEE, H.; PARKER, D.; PLANA, D.; RICHARDSON, R. M. Anionic surfactant ionic liquids with 1-butyl-3-methylimidazolium cations: characterization and application. **Langmuir**, v. 28, pp. 2502-2509;

BUMGARDNER, J. D.; CHESNUTT, B. M.; YUAN, Y.; YANG, Y.; APPLEFORD, M.; OH, S.; McLAUGHLIN, R.; ELDER, S. H.; ONG, J. L. The Integration of Chitosan-Coated Titanium in Bone: An In Vivo Study in Rabbits. **Implant Dentistry**, v. 16, n. 1, pp. 66-79, 2007;

CANONGIA LOPES, J. N. A; PADUA, A.A.H. Nanostructural organization in ionic liquids. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 7, p. 3330-3335, 2006;

CASADEI, A.P. – Arcabouço de PLLA/Hap sinterizado, com potencial de utilização em regeneração de tecido ósseo, Tese Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina, 2009;

CHAUDHURI, R. G.; PARIA, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications, **Chemical Review**, v. 112, pp 2373-2433, 2012.

CHEN, X.; LI, Q.; ZHAO, J.; QIU, L.; ZHANG, Y.; SUN, B.; YAN. Ionic liquid-tethered nanoparticle/poly (ionic liquid) electrolytes for quasi-solid-state dye-sensitized solar cells. **Journal of Power Sources**, 207, 216–22., 2012;

CHU, P. K. Surface engineering and modification of biomaterials. **Thin Solid Films**, v. 528, 93–105, 2013;

DA SILVA QUIRINO, G. et al. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 179-183, 2009;

DAVIS, J. R. Handbook of Materials for Medical Devices. [s.l: s.n.]. p. 310;

FARIA, A. B.; PERES, D. D.; VLADI, T.M.K.; CONSIGLIERI, O.; VELASCO, M.V.R.; BABY, A.R. Desenvolvimento e avaliação de produtos cosméticos para higiene capilar contendo tensoativos “não-sulfatados”. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n.4, p. 521-527, 2012;

FIGUEIREDO, P. R. L.; OLIVEIRA, I. B.; SANTANA NETO, J. B.; OLIVEIRA, J. A.; RIBEIRO, L. B.; VIANA, G. S. B.; ROCHA, T. M.; LEAL, L. K. A. M.; KERNTOPF, M. R.; FELIPE, C. F. B.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A. *Caryocar coriaceum* Wittm. (Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.191, p.87-94, 2016;

FLORINDO, C. I. S. Estudo da biodisponibilidade de Princípios Activos Farmacêuticos por utilização de Líquidos Iónicos, 2012. Dissertação (Mestrado). Universidade Nova de Lisboa, Liboa, 2012;

FORT WAYNE METALS. CP Titanium. Disponível em: <http://www.fwmetals.com/services/resource-library/unalloyed-commercially-pure-cp-titanium1/>. Acesso em: 25 mai. 2017;

FRANCO, L.M.L; UMMUS, M.E.; LUZ, R.A. A distribuição do pequi (*Caryocar brasiliense*) na estação ecológica de Itirapina, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEÓGRAFOS, 6, 2004, Goiânia. Caderno de resumo... Goiânia: AGB, 2004, p. 253;

FRIZZO, C. P.; TIER, A. Z.; BENDER, C. R.; GINDRI, I. M.; VILLETTI, M. A.; ZANATTA, N.; BONACORSO, H. G., MARTINS, M. A. P. Ionic Liquids - Current State of the Art. 1^a ed. Rijeka: InTech, 2015. 40p.

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

GIACOMETTI, D.C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTÍFERAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas. Anais... Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 1993. P. 13-27;

GIBBONS, D.F., Biomedical materials. *Biophysics and Bioengineering*, v. 4, p. 367-375, 1975;

GITTENS, R. A. et al. Implant osseointegration and the role of microstructures: lessons for spine implants. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v.10, p.3363-3371, 2014;

GOLEDZINOWSKI, M.; BIRSS, V. I.; GALUSZKA, J. Oligomerization of low-molecular-weight olefins in ambient temperature molten salts. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, n. 8, pp. 1795–1797, 1993;

HANSEN, J. P.; McDONALD, I. R. *Phys. ReV. A*, 11, 2111, 1975;

HANSEN, J. P.; McDONALD, I. R. *Theory of Simple Liquids*, 2 ed; Academic Press: London, 1986;

HENRIQUES, V. A. R. Titanium production of aerospace applications. **Journal of Aerospace Technology and Management**, v. 1, n. 1, p. 7-17, 2009;

HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BE-ZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.1-2, 2002;

HUDDLESTON, J.G. et al. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. **Green chemistry**, v. 3, n. 4, p. 156-164, 2001;

ISA, Z. M.; HOBKIRK, J. A. Dental implants: Biomaterial, biomechanical and biological considerations. *Annals of Dentistry*, University of Malaya, v. 7, p. 27-35, 2000;

JIMÉNEZ, A. E.; BERMÚDEZ, M. D. Ionic Liquids as Lubricants of Titanium–Steel Contact. Part 2: Friction, Wear and Surface Interactions at High Temperature. **Tribology Letters**, v. 37, n. 2, pp. 431–443, 2010;

JÚNIOR, J. R. S.; ALBUQUERQUE, U. P.; PERONI, N. Traditional knowledge and management of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Pequi) in the Brazilian savanna, Northeastern Brazil. **Economic Botany**, v. 67, n. 3, p. 225-233, 2013;

KHAN, S. N.; RAMACHANDRAN, M.; SENTHIL, S. Osseointegration and more e A review of literature. **Indian Journal of Dentistry**, v. 3, n. 2, p. 72–76, 2012;

KHAN, W. MUNTIMADUGU, E.; JAFFE, M.; DOMB, A. J. (2014) Implantable Medical Devices. In: Domb A., Khan W. (eds) Focal Controlled Drug Delivery. Advances in Delivery Science and Technology. Springer, Boston, MA;

- KIRMANIDOU, Y.; SIDIRA, M.; DROSOU, M-E.; BENNANI, V.; BAKOPOULOU, A.; TSOUKNIDAS, A.; MICHAILEDIS, N.; MICHALAKIS, K. New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. **BioMed Research International**, v. 2016, p.21, 2016;
- LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R Reports**, v. 47, n. 2004, p. 49–121, 2005;
- LÓPEZ, J. Avaliação histomorfométrica do percentual de osseointegração ao redor de implantes recobertos por hidroxiapatita por meio de dois métodos de secção histológica. [s.l.] Universidade do Grande Rio, 2007;
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, v.1, 368p., 1992;
- LYMAN, D. J.; SEARE, Jr.; W. J.; Biomedical materials in surgery. **Materials Science**, v.4, p. 415-433, 1974;
- MA, H. L.; YANG, J. Y.; DAI, Y.; ZHANG, Y. B.; LU, B.; MA, G. H. Raman study of phase transformation of TiO₂ rutile single crystal irradiated by infrared femtosecond laser. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 18, p. 7497–7500, 2007;
- MA, Q.; LI, M.; HU, Z.; CHEN, Q.; HU, W. Enhancement of the bioactivity of titanium oxide nanotubes by precalcification. **Materials Letters**, v. 62, p. 3035-3038, 2008;
- MADAAN, V.; CHANANA A.; KATARIA, M. K.; BILANDI, A. Emulsion technology and recent trends in emulsion applications. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 5, n. 7, pp. 533-542, 2014;
- MAHO, A.; DELHALLEA, J.; MEKHALIF, Z. Study of the formation process and the characteristics of tantalum layers electrodeposited on Nitinol plates in the 1-butyl-1-methylpyrrolidinium bis (trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquid. **Acta Electrochimica**, v. 89, p. 346–358, 2013;
- MARTINS, M. A. P.; FRIZZO, C. P.; MOREIRA, D. N.; ZANATTA, N.; BONACORSO, H.G. Ionic liquids in heterocyclic synthesis. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, pp. 2015–2050, 2008;
- MARX, F.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Chemical composition of the fruit pulp and aroma of *Caryocar villosum*. **International Journal of Food Research and Technology**, v. 204, p. 442–444, 1997;
- MASSON, D.S. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes. 2005. 163f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005;
- MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil, 3ª edição. Imprensa Universitária, Fortaleza, Brasil, 394 pp, 2007;

- McNAMARA, K.; TOFAIL, S. A. M. Nanosystems: the use of nanoalloys, metallic, bimetallic, and magnetic nanoparticles in biomedical applications. **Physical Chemistry Chemical Physics**, n. 42, 2015;
- MINAGAR, S. et al. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v.8, n.8, p.2875–2888, 2012;
- MINAGAR, S.; BERNDT, C. C.; WANG, J.; IVANOVA, E.; WEN, C. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. **Acta Biomaterialia**, v.8, n.8, p.2875–2888, 2012;
- MINAMI, I. Ionic liquids in tribology. **Molecules**, v. 14, pp. 2286–305, 2009;
- MIRABELLO, V.; CALATAYUD, D. G.; ARROWSMITH, R. L.; GE, H.; PASCU, S. I. Metallic nanoparticles as synthetic building blocks for cancer diagnostics: from materials design to molecular imaging applications. **Journal Materials Chemistry B**, 3, 5657– 5672, 2015;
- MIRANDA-VILELA, A.L.; RESCK, I.S.; GRISOLIA, C.K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.956-963, 2008;
- MOHAN, L.; ANANDAN, C.; RAJENDRAN, N. Drug release characteristics of quercetin-loaded TiO₂ nanotubes coated with chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, pp. 1633–1638, 2016;
- MONTI, S.; CARRAVETTA, V.; BATTOCCHIO, C.; IUCCI, G.; POLZONETTI, G. Peptide/TiO₂ Surface Interaction: A Theoretical and Experimental Study on the Structure of Adsorbed ALA-GLU and ALA-LYS. **Langmuir**, v. 24, 3205–3214, 2008;
- NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopaedics. n. July, p. 1137–1158, 2008;
- NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, n. 27, p. 1137–1158, 2008;
- OH, K.; SHIM, H.; KIM, K. Properties of titanium-silver alloys for dental application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 74B, n. 1, p. 649-658, 2005;
- OLIVEIRA, K. A. K. B. de. Variabilidade genética entre e dentro de populações de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): do Estado de Goiás. 92f. Dissertação (Mestrado de Agronomia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1998;
- OLIVEIRA, M. L. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; TOMÉ, A. R.; MOTAC, E. F.; LIMA-VERDE, I. A.; PINHEIRO, F. G. M.; CAMPELLO, C. C.; MORAIS, S. M. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. Seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, pp. 214-219, 2010.
- OLIVEIRA, M.E.B. Características físicas, químicas e compostos bioativos em pequis (*Caryocar coriaceum* Wittm.) nativos da chapada do Araripe- CE. 2009. 146f. Tese (Doutorado em Nutrição), Centro Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009;
- OLIVEIRA, M.E.B; GUERRA, N.B.; BARROS, L.M; ALVES, R.E. Aspectos agrônômicos e de qualidade do pequi. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 32p. (Documentos, n.113), 2008;

- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012;
- PARIDA, P.; BEHERA, A.; MISHRA, S. C. Classification of biomaterials used in medicine. **International Journal of Advances in Applied Sciences**, v. 1, n. 3, p. 31-35, 2012;
- PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (*Caryocaraceae*) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 623-627, 2002;
- PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F. H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leave hydroethanolic extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p.625-630, 2006;
- PEIXOTO, A. R. 1973. O pequi e a lavoura no Cerrado. Pp. 197–226 em A. R. Peixoto, ed., Plantas oleaginosas arbóreas. Nobel, São Paulo, 1973;
- PRASAD, S.; EHRENSBERGER, M.; GIBSON, M. P.; KIM, H.; JR., E. A. M. Biomaterial properties of titanium in dentistry. **Journal of Oral Biosciences**, v. 57, n. 4, p. 192-199, 2015;
- PREOCANIN, T.; COP, A.; KALLAY, N. Surface potential of hematite in aqueous electrolyte solution: Hysteresis and equilibration at the interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 299, pp. 772–776, 2006;
- RAMOS, K. M. C; SOUZA, V. A. B.de. Características físicas e químico-nutricionais de frutos de pequi (Caryocar coriaceum Wittm.) em populações naturais da região Meio-Norte do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 2, p. 500-508, 2011;
- RATNER et al. Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine. 2ª ed. London: Academic Press, 2004;
- REBOUÇAS, A.C. Água na região Nordeste: desperdício e escassez. *Estudos Avançados*, São Paulo, v.11, n.29, p.127-154, 1997;
- RENZ, R. P. Avaliação da osseointegração de implantes de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfícies. 2007. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007;
- REZAIE, H. R.; BAKHTIARI, L.; OCHSNER, A. Biomaterials and Their Applications. Berlin: Springer International Publishing, 2015;
- ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; BARATA, R.H., SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.53–60, 2007;
- ROGERS, R. D.; SEDDON, K. R., Eds. Ionic Liquids IIIA: Fundamentals, Progress, Challenges, and Opportunities s Properties and Structure; ACS Symposium Series 901; American Chemical Society, Washington, D.C., 2005.
- ROMANCINI, R.M.; AQUINO, F.G. Aspectos da biologia reprodutiva do pequi-anão (*Caryocar brasiliense* ssp. *intermedium* Camb., *Caryocaraceae*) em plantio experimental. In:

ENCONTRO DE JOVENS TALENTOS DA EMBRAPA CERRADOS, 3, Planaltina, DF. Resumo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.49, 2007;

SALAGER, J. L. "Emulsion Properties and Related Know-how to Attain Them". In: MARTI-MESTRES, G.; NIELLOUD, F. Pharmaceutical emulsions and suspensions, cap. 2 e 3, New York, Marcel Dekker Inc., 2000;

SANCHES, D.L. Efeito das folhas e sementes do pequizeiro como antifúngico e bactericida. **Revista Agrociências**, v. 3, n. 2, pp. 28-31, 2008;

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R.; COSTA, J. G.; ROCHA, J. B.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (*Caryocaraceae*) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, pp. 504–510, 2011.

SCHRAMM, L. L. Emulsions, Foams and Suspensions: Fundamentals and Applications. Germany, Wiley, VCH, 2005;

SHAHALIA, H.; JAGGESSARA, A.; YARLAGADDAA, P. KDV.; Recent Advances in Manufacturing and Surface Modification of Titanium Orthopaedic Applications. **Procedia Engineering**, v. 174, 1067-1076, 2017;

SILVA, E. C.; SOARES, L. C. Tecnologia de Emulsões. **Cosmetics & Toietries** (ed. Port.), v. 8, n. 5, p; 37-46, 1996;

SILVA, F. L. R. Síntese e caracterização de nanoestruturas à base de dióxido de titânio, 2012. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2012;

SILVA, M. A. P.; MEDEIROS-FILHO, S. Morfologia de fruto, semente e plântula de piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista de Ciência Agronômica**, v.37, n.3, p. 320–325, 2006;

SILVA, R. R.V; GOMES, L J; ALBUQUERQUE, U.P. Plant extractivism in light of game theory: a case study in northeastern Brazil. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 11, n. 1, p. 6, 2015;

SINGH, V.; KATARIA, M. K.; BILANDI, A.; SACHDEVA, V. Recent advances in pharmaceutical emulsion technology. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 8, pp. 4250-4258, 2012;

SOCIETY FOR BIOMATERIALS. 2014. About the society. Disponível em: <https://www.biomaterials.org/about/about-society>. Acesso em: 20 mai. 2017;

SUL, Y. T. et al. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. **Medical engineering & physics**, v. 23, n. 5, p. 329–46, jun. 2001;

SUZUKI, S.; OHTA, Y.; KURIMOTO, T.; KUWABATA, S.; TORIMOTO, T. Modulating the immobilization process of Au nanoparticles on TiO₂(110) by electrostatic interaction between the surface and ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, pp.13585–13593, 2011;

TORRES, L. R. O.; SANTANA, F. C.; TORRES-LEAL, F. L.; MELO, I. L. P.; YOSHIME, L. T.; MATOS-NETO, E. M.; SEELAENDER, M. C. L.; ARAÚJO, C. M. M.; COGLIATI, B.;

- MACINI-FILHO, J. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology*, v. 97, pp. 205-216, 2016.
- UCHIDA, M.; KIM, H.-M.; KOKUBO, T.; FUJIBAYASHI, S.; NAKAMURA, T. Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 64, n.1, p. 164-170, 2003;
- UMBLOT, V.; PRADIER, C-M.; Peptide Interactions with Metal and Oxide Surfaces. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 10, pp 1297-1306, 2010.
- VALLEE, A.; HUMBLLOT, V.; PRADIER, C-M.; Peptide Interactions with Metal and Oxide Surfaces. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 10, pp 1297-1306, 2010;
- VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado. Uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.3, n.1, p.13-36, 2000;
- WANG, S.; CAO, Z.; LI, S.; YAN, T. A molecular dynamics simulation of the structure of ionic liquid (BMIM⁺/PF₆⁻)/ rutile (110) interface. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 52, pp. 1434–1437, 2009;
- WENG, Y.; CHONG, V. J.; HOWARD, L.; HUANG, R.; GREGORY, R. L.; XIE, D. A. Novel Antibacterial Dental Resin Composite. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 2, p. 130-135, 2012;
- WILLIAMS, D.F., Corrosion of implant materials, **Materials Science**, v.6, p. 237- 266, 1976;
- YAHIO, K. et al. Biomaterials The regulation of allogeneic human cells and tissue products as biomaterials. **Biomaterials**, v.34, n.13, p. 3165-3173, 2013;
- ZHANG, Y.; CHEN, L.; LIU, C.; FENG, X.; WEI, L.; Shao, L.; Self-assembly chitosan/gelatin composite coating on icariin-modified TiO₂ nanotubes for the regulation of osteoblast bioactivity. **Materials & Design**, v. 92, pp. 471–479, 2016;
- ZHOU, F.; LIANG, Y.; LIU, W. Ionic liquid lubricants: designed chemistry for engineering applications. **Chemical Society Reviews**, v. 38, pp. 2590–2599, 2009;
- ZHOU, Y. L.; NIINOMI, M.; AKAHORI, T.; FUKUI, H.; TODA, H. Corrosion resistance and biocompatibility of Ti–Ta alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: A**, v. 398, p. 28-36, 2005;
- ZHU, C.; DU, D.; EYCHMULLER, A.; LIN, Y. Engineering Ordered and Nonordered Porous Noble Metal Nanostructures: Synthesis, Assembly, and Their Applications. **Electrochemistry. Chemical Reviews**, v. 115, pp. 8896-8943, 2015.

ANEXO A- NORMAS DA REVISTA *BIOMATERIALS*

BIOMATERIALS

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.1
●	Editorial Board	
●	Guide for Authors	p.2
		p.2
		p.4



ISSN: 0142-9612

DESCRIPTION

Biomaterials is an international journal covering the science and clinical application of **biomaterials**. A biomaterial is now defined as a substance that has been engineered to take a form which, alone or as part of a complex system, is used to direct, by control of interactions with components of living systems, the course of any therapeutic or diagnostic procedure. It is the aim of the journal to provide a peer-reviewed forum for the publication of original papers and authoritative review and opinion papers dealing with the most important issues facing the use of biomaterials in clinical practice. The scope of the journal covers the wide range of physical, biological and chemical sciences that underpin the design of biomaterials and the clinical disciplines in which they are used. These sciences include **polymer synthesis** and characterization, **drug** and **gene vector** design, the **biology** of the host response, **immunology** and **toxicology** and self assembly at the nanoscale. Clinical applications include the therapies of **medical technology** and **regenerative medicine** in all clinical disciplines, and diagnostic systems that rely on innovative contrast and sensing agents. The journal is relevant to areas such as cancer diagnosis and therapy, implantable devices, drug delivery systems, gene vectors, bionanotechnology and tissue engineering.

Click here for [New Editorial Instructions](#).

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further

information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Biomaterials scientists, materials scientists, clinicians (vascular surgeons, orthopaedic surgeons, dentists), biomedical engineers, biochemists, pharmaceutical scientists, tissue engineers and medical device technologists.

IMPACT FACTOR

2016: 8.402 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017.

ABSTRACTING AND INDEXING

ADONIS
BECI
BIOSIS
Biomaterials Now and Current Titles in Dentistry
Elsevier BIOBASE
CTI
Chemical Abstracts
Current Contents
MEDLINE®
EMBASE
FIZ Karlsruhe
INSPEC
Polymer Contents
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

K.W. Leong, Columbia University, New York, NY, USA

Managing Editor

C. H. Quek, Bloomfield, New Jersey, USA

Associate Editors

Y. Byun, Seoul National University, Republic of Korea

B. Chan, The University of Hong Kong, Hong Kong

C.-S. Cho, Seoul National University, Republic of Korea

A.J. Garcia, Georgia Institute of Technology, USA

S.B. Goodman, Stanford University, USA

X-J. Liang, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing, China

Z. Liu, Soochow University, China

H.-Q. Mao, Johns Hopkins University, USA

Y. Nagasaki, University of Tsukuba, Japan

A. Pandit, National University of Ireland, Ireland

L.A. Poole-Warren, UNSW Australia, Sydney, New South Wales, Australia

H.-W. Sung, National Tsing Hua University, Taiwan

H. Yu, National University of Singapore, Singapore, Singapore

Honorary Editor

D.F. Williams, Wake Forest Institute of Regenerative Medicine, North Carolina, USA

International Editorial Board

H. Ai, Sichuan University, China

L. Ambrosio, University of Naples Federico II, Italy

J.M. Anderson, Case Western University, USA

C.R. Arciola, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna, Italy

S.F. Badylak, University of Pittsburgh, USA

T. Barker, Georgia Tech, USA

S.L. Bellis, University of Alabama at Birmingham, USA

D. Campoccia, Istituti Ortopedici Rizzoli, Italy

Y. Cao, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, China

R. Carrier, Northeastern University, Boston, USA

J. Chang, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai, China

G.-Q. Chen, Tsinghua University, China

T.V. Chirila, Queensland Eye Institute, Australia

P.K. Chu, City University of Hong Kong, Hong Kong
S. Cool, A STAR Institute of Medical Biology, Singapore
J. Dai, Chinese Academy of Sciences, China
W.H. de Jong, National Institute of Public Health and Environment, The Netherlands
W.-P. Deng, Taipei Medical University, Taiwan
P. Dubruel, Ghent University, Belgium
P. Ducheyne, University of Pennsylvania, USA

M.D.M. Evans, CSIRO Materials Science and Engineering, Australia
S.-S. Feng, National University of Singapore, Singapore
S. Gong, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA
D.W. Grainger, The University of Utah, Salt Lake City, USA
D.W. Grijpma, University of Twente, The Netherlands
X. Gu, Nantong University, China
V. Hasirci, Middle East Technical University, Turkey
W.E. Hennink, Utrecht University, The Netherlands
S.H. Hsu, National Taiwan University, Taiwan
J. Hunt, University of Liverpool, Liverpool, UK
D.W. Hutmacher, Queensland University of Technology, Brisbane, Queensland, Australia
K. Ishihara, The University of Tokyo, Japan
H. Iwata, Kyoto University, Japan
D.L. Kaplan, Tufts University, USA
K. Kataoka, University of Tokyo, Japan
H.W. Kim, Dankook University, The Republic of Korea
Y.H. Kim, Hanyang University, The Republic of Korea
C.J. Kirkpatrick, Johannes Gutenberg University, Germany
J.C. Knowles, University College London (UCL), London, UK
H.J. Kong, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA
J. Kopecek, University of Utah, USA
S.C. Kundu, Indian Institute of Technology Kharagpur, India
D. Lacroix, INSIGNEO Institute for in silico Medicine, Sheffield, UK
C.T. Laurencin, University of Connecticut, USA
D. S. Lee, Sungkyunkwan University (SKKU), Suwon, The Republic of Korea
R.J. Levy, The Children's Hospital of Philadelphia, USA
Y. Li, Zhongnan Hospital of Wuhan University, China
F.-H. Lin, National Taiwan University, Taiwan
W. Liu, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, China
I. Martin, University Hospital Basel, Switzerland
T. Okano, Tokyo Women's Medical University, Japan

R.O.C. Oreffo, University of Southampton, UK
H.W. Ouyang, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China
B. Ratner, University of Washington, USA
R.L. Reis, University of Minho, Braga, Portugal
U. Ripamonti, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa
W.M. Saltzman, Yale University, USA
D. Seliktar, Israel Institute of Technology Technion City, Israel
C.G. Simon, Jr., National Institute of Standards and Technology, USA
M. Sittinger, Charité University Hospital Berlin, Germany
M.M. Stevens, Imperial College London, UK
M.A. Swartz, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland
V. Trajkovic, University of Belgrade, Serbia
R.S. Tuan, University of Pittsburgh School of Medicine, USA
H. Uludag, University of Alberta, Canada
R.B. Vernon, Benaroya Research Institute, USA
E.A. Vogler, Pennsylvania State University, USA
W. Walsh, University of New South Wales, Australia
S.G. Wang, Chinese Academy of Sciences, China
A. Weiss, The University of Sydney, Australia
C. Werner, Leibniz Institute of Polymer Research, Dresden, Germany
M. Yamato, Tokyo Women's Medical University, Japan
H.S. Yoo, Kangwon National University, Republic of Korea
N.P. Ziats, Case Western University, USA
P. Zilla, University of Cape Town, South Africa

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the [Preparation section below](#).

INTRODUCTION

Types of article

Original Research: Provide a full length account of original research.

Review: Provide an in-depth and up to date critical review of a related topic.

Leading Opinion Paper: This article type may **only** be submitted by invitation from the Editor-in- Chief.

Contact details for submission

The peer review submission system for Biomaterials is located here: <http://ees.elsevier.com/biomat/> The Elsevier Editorial System (EES) is a web-based submission and review system. Authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process.

Referees, whose names are not normally disclosed to the authors, will study all contributions which the Editor-in-Chief deems to be of sufficient significance and interest to be sent for peer review. The criteria by which this initial assessment is made include relevance to the scope of the journal, the originality of the work and its significance to the broad development of the field of biomaterials.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable) Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements For

further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Mandatory Author Declaration

When uploading the manuscript, it is required that the corresponding author of each manuscript confirms on behalf of all authors that their submission complies in full with the [Author Declaration](#). Please note that the form itself doesn't have to be uploaded as part of the manuscript files.

This Declaration covers a number of logistic and ethical issues. The editorial process will not begin until and unless the corresponding author has answered the appropriate question during submission.

N.B.: The Author Declaration is independent of, and in addition to, the "Journal Publishing Agreement" agreement which is issued on acceptance.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used

in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Appendix (where necessary), Figures, Figure Captions and Tables, Supplementary Data. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote including fax number and e-mail address. An abbreviated title for use as a running headline should also be supplied. Authors are requested to acknowledge funding sources for the work.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but

if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

All manuscripts are to be supplied with an abstract of about 100-200 words in length.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Authors must provide 4-6 keywords for indexing purposes.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and must not be used. If a large number of symbols are used it is helpful if authors submit a list of these symbols and their meanings.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. Footnotes on the first page thanking or acknowledging people or places should be moved to the Acknowledgements section.

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in**

print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figures

Authors should aim to include not more than 8 figures in their manuscript.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web References

References to online sources should contain at a minimum the full URL and year the source was accessed. Furthermore, if known, the following information should be given: author names, dates, reference to a source publication. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Examples of formatting of online sources follow:

1. UK House of Commons Science and Technology Committee. Scientific Publications: Free for All? Tenth Report of Session 2003-4 Volume 1. London: The Stationary Office Ltd. Online. 2004 July. Available from URL: <http://www.publications.parliament.uk/pa/cm200304/cmselect/cmsstech/399/39902.html>
2. Wellcome Trust. Economic Analysis of Scientific Research Publishing. Histon, UK: Wellcome Trust. Online. 2003. Available from URL: http://www.wellcome.ac.uk/doc_wtd003181.html
3. Keeney M, Lai JH, Yang F. Recent progress in cartilage tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2011. Available from URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531126> (DOI: 10.1016/j.copbio.2011.04.003).

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to

supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article

directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Open data

This journal supports Open data, enabling authors to submit any raw (unprocessed) research data with their article for open access publication under the CC BY license. [More information](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Transparency

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, this gives you the opportunity to indicate why. If you submit [this form](#) with your manuscript as a supplementary file, the statement will appear next to your published article on ScienceDirect.

ARTICLE ENRICHMENTS

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a webbased viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. [More information and examples](#). Authors of this journal will receive an invitation e-mail to

create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Amendments to manuscripts

In order to maintain the integrity of the scientific record, the version that is published in an issue on ScienceDirect and in print MUST be identical. One set of page proofs will be sent to the corresponding author. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, but corrections are restricted to typesetting errors only. Proofs are NOT to be considered as drafts. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the responsibility of the corresponding author.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive 25 free paper offprints, or alternatively a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).