

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**



SYBELE SASKA

**Materiais compósitos orgânico-inorgânicos a base de celulose
bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento,
OGP e OGP [10-14], para regeneração óssea**

**TESE DE DOUTORADO
2011**

SYBELE SASKA

Materiais compósitos orgânico-inorgânicos a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, OGP e OGP [10-14], para regeneração óssea

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto
Co-orientadores: Prof. Dr. Younès Messaddeq
Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar

**Araraquara
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

R926a	<p>Saska, Sybele</p> <p>Materiais compósitos orgânico-inorgânicos a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, OGP e OGP [10-14], para regeneração óssea / Sybele Saska. – Araraquara : [s.n], 2011 256 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Reinaldo Marchetto Coorientador: Younès Messaddeq Coorientador: Ana Maria Minarelli Gaspar</p> <p>1. Celulose bacteriana. 2. Compósitos. 3. Regeneração óssea. 4. Peptídeos. 5. Osteoindução. I. Título.</p>
-------	---

SYBELE SASKA

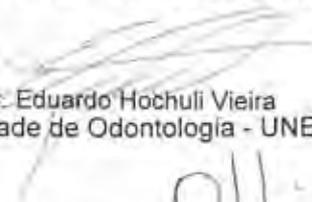
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 26 de agosto de 2011

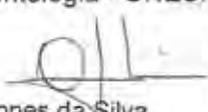
BANCA EXAMINADORA



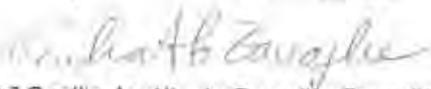
Prof. Dr. Reinaldo Marchetto
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira
Faculdade de Odontologia - UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva
Escola de Engenharia – USP, São Carlos



Profª Drª Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Faculdade de Engenharia Mecânica – UNICAMP, Campinas



Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Universidade Federal Fluminense – UFF, Duque de Caxias-RJ

DADOS CURRICULARES

Sybele Saska

1. DADOS PESSOAIS

Nascimento: 04/03/1981, São Paulo – SP

Filiação: Luiz Antonio Saska e Vera Lucia Colleti Saska

RG: 30.464.941-7/ SSP/ 13/06/1996

CPF: 219.670.018-55

Endereço residencial: Rua Luiz Saska, 134

Jardim Celiamar – Araraquara – SP

CEP: 14.806-153

Telefone: (16) 3324-4364

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2007 – Atual

Doutorado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Título: Materiais compósitos orgânico-inorgânicos a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios dos fatores de crescimento, OGP e OGP [10-14], para regeneração óssea

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Bolsista: FAPESP

2000 – 2006

Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista – UNESP

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Artigos completos publicados em periódicos: 17

3.2 Artigos aceitos para publicação: 1

Relacionado à Tese de Doutorado: “Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposite for bone regeneration”. International Journal of Biomaterials.

3.3 Trabalhos completos publicados em anais de eventos: 2

3.4 Resumos publicados em anais de eventos: 45

4. PATENTES

4.1 SASKA, S., GASPAR, Ana Maria Minarelli, RIBEIRO, S. J. L., MESSADDEQ, Younès, MARCHETTO, R. (UNESP e FAPESP). **Methods for obtaining reabsorbable composites, composites, membrane, scaffold and its uses**. 30 maio 2010. PCT, 30 maio 2011.

4.2 ABDALLA, C. M., GASPAR, Ana Maria Minarelli, RIBEIRO, S. J. L., SASKA, S, MESSADDEQ, Younès. (UNESP, USP e FAPESP). **Método de utilização de membrana de celulose bacteriana intra articular sobre superfície lesada de patela**. 10 Jun 2011.

5. PRÊMIOS RELEVANTES:

- 2010** IADR/Heraeus Travel Award in Dental Materials - com o trabalho intitulado: "New (bacterial cellulose-collagen)-hydroxyapatite nanocomposite with growth factors for bone regeneration", 88th IADR General Session, Barcelona – Espanha. **Saska, S. et al.**
- 2009** 1º Lugar - Painel de Pesquisa com o trabalho intitulado: "Adesivos a base de cianoacrilato para síntese de tecido mole". XX COBRAC - Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial. Fortaleza, Brasil. **Saska, S. et al.**
- 2006** Menção Honrosa com o trabalho intitulado: "Uso de fixação reabsorvível para tratamento de fratura de malar em criança. Relato de Caso", 26ª Jornada Acadêmica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba "Prof. Dr. Miguel Carlos Madeira. **Saska, S. et al.**

DEDICATÓRIA

À *Deus*, por estar sempre presente na minha vida e tornar tudo possível.

Aos meus pais, *Luiz Antonio* e *Vera*, que são meu alicerce, e por todos os esforços que fizeram para eu alcançar meus objetivos, com todo amor e sabedoria.

Ao meu eterno e grande amor, *Fabio*, pelo apoio incondicional por todos estes anos, sempre presente em minha vida dando todo suporte para eu relevar as dificuldades com sabedoria. Acima de tudo, pelo verdadeiro amor dedicado em todos os dias das nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Reinaldo Marchetto**, pelo apoio à pesquisa e pela confiança depositada em mim. Além de toda paciência em interpretar meus inúmeros e inúmeros resultados. Meu sincero muito obrigado.

Ao meu co-orientador, **Younès Messaddeq**, que abriu as portas de seu laboratório e depositou toda sua confiança e creditou em um potencial a ser lapidado. O meu sincero muito obrigado, por mostrar o quão valioso é pesquisar ciência básica e de me proporcionar enriquecedores conhecimentos.

A minha co-orientadora e amiga, **Profª. Dra. Ana Maria Mineralli Gaspar** pelos ensinamentos desde os primeiros anos de graduação até o presente, pela oportunidade de poder aprender a enfrentar os desafios da ciência juntas. Minha incentivadora pela carreira de docente, minha “mãe acadêmica”. Meu sincero muito obrigado por todos esses anos de convívio e amizade. E você é uma das pessoas responsáveis por eu concluir mais uma etapa da minha vida.

Ao meu co-orientador “por tabela”, **Prof. Dr. Sidney J. L. Ribeiro**, cuja vida reflete a história daqueles que fizeram a docência uma missão. Acolhendo-me no grupo de pesquisa e sempre instigou o porquê de desenvolver estes compósitos, estimulando sempre a encontrar as respostas não explicáveis. Espero que esta tese venha elucidar inúmeros questionamentos feitos ao longo desses anos. Meu reconhecimento e gratidão, muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira** pelos ensinamentos e por todo trabalho *in vitro* com cultura celular.

Ao **Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti** pelo apoio e cessão do seu laboratório para a realização da parte experimental *in vivo*. Meu muito obrigado!

Ao **Prof. Dr. Luiz Geraldo Vaz** pela disponibilidade em me ajudar nos ensaios mecânicos.

A **Profª. Dra. Andréa Gonçalves** pela ajuda imprescindível nas análises radiográficas.

A **Profa. Dra. Marisa Veiga Capela** pelos ensinamentos e pela realização das análises estatística.

Aos meus irmãos Cinthia e Júnior e aos demais familiares que sempre me apoiaram e incentivaram para concretizar esta conquista.

A minha grande amiga e irmã, Thais, pelos tempos preciosos que passamos juntos desde a faculdade.

Aos Professores, Eduardo Hochuli Vieira e Mário F. R. Gabrielli, que desde o início me incentivaram a fazer pós-graduação em ciências básicas, deixando a paixão pela cirurgia e traumatologia para outro momento. Muito obrigada pelos incentivos, vocês em partes são responsáveis por esta conquista.

Aos integrantes e ex-integrantes do grupo de Materiais Fotônicos: Adriana, Beto, Caiut, Danilo, Denise, Elaine, Laís, Lílian, Lucas, Karina, Kíria, Marco Cebim, Maurício, Molíria, Wanderson e Yannick. Agradeço especialmente a Sílvia e a Camila pela ajuda na caracterização das amostras, ao Hernane pelos ensinamentos em química e por também ajudar a operar os equipamentos, e sem dúvidas, ao César, sempre pronto em ajudar e solucionar todos os problemas técnicos do grupo. A Tchamara, amiga e também sempre posta a ajudar. Muito obrigada a todos vocês pelo companheirismo de todos esses anos.

E não poderia esquecer-se de agradecer a integrante pernambucana mais querida do grupo, Luciana, que nesses anos foi uma companheira de pesquisa e amiga, aprendemos muito juntas. Obrigada pela ajuda nas cirurgias dos animais, mesmo não gostando de operar. Muito obrigada!

Aos meus parceiros do Grupo de Síntese, Estrutura e Aplicações de Peptídeos e Proteínas, em especial, ao Anderson, Caroline, Davi (Pardal), Eduardo (Lentilha), Graziely, Larissa, Marisa, Saulo, e também aos ex-integrantes João, Ronaldo e Wanessa, pelo convívio amigo e pela ajuda direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho. Principalmente a Larissa e a Carol pela ajuda, a Larissa pela ajuda nas cirurgias dos animais e síntese dos peptídeos marcados e a Carol pelas análises de liberação.

A Empresa Fibrocel pelo fornecimento das membranas de celulose bacteriana.

A todos os docentes e servidores do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química e de Química Geral e Inorgânica que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Morfologia, Marcelo e Pedro que ajudaram no processamento das peças e cortes histológicos, em especial ao Luiz que processou a maior parte do material, mesmo com problemas de saúde, minha admiração pelo seu profissionalismo.

Aos colegas Lucas, Larissa e Roger do Laboratório de Cultura de Células, FORP-USP, a ajuda de vocês foi imprescindível para concluir os experimentos *in vitro*, especialmente ao Lucas, que desde o início sempre se dedicou a este trabalho como se fosse o dele.

As funcionárias da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca por todo apoio necessário durante esses anos.

A FAPESP, pela bolsa concedida e apoio financeiro.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

**“Algo só é impossível até que alguém
duvide e prove o contrário”**

Albert Einstein

RESUMO

Esta tese apresenta a preparação e caracterização de novos materiais compósitos orgânico-inorgânicos baseados em celulose bacteriana (CB) produzida pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, colágeno tipo I (COL), hidroxiapatita (HA) e peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, “osteogenic growth peptide” OGP e “osteogenic growth peptide [10-14]” OGP [10-14] para aplicação em regeneração óssea. Estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados para avaliar o potencial osteocondutor, osteoindutor e a bioatividade destes compósitos. Os peptídeos foram sintetizados pelo método da fase sólida (estratégia Fmoc; SPFS-Fmoc); foram purificados e caracterizados por HPLC, espectrometria de massas e análise de aminoácidos. Os compósitos foram preparados nas seguintes composições, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL. Os compósitos CB-COL foram preparados inicialmente pela funcionalização da CB pura hidratada pela esterificação do aminoácido glicina empregando a metodologia SPFS-Fmoc, e em seguida realizou-se a incorporação do colágeno empregando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). Nos compósitos CB-HA, a precipitação da HA foi realizada em CB pura hidratada seguindo ciclos alternados de imersão em soluções de cloreto de cálcio e fosfato de sódio, respectivamente. Adicionalmente, para preparação dos compósitos (CB-COL)-HA, o compósito CB-COL foi empregado como matriz para precipitação da HA, cuja precipitação foi similar ao compósito CB-HA. Para preparação dos compósitos (CB-HA)-COL, foram utilizadas matrizes de CB-HA para incorporação do colágeno empregando EDC. As caracterizações realizadas neste trabalho confirmaram a incorporação do COL às matrizes de CB e CB-HA por análises de espectroscopia (FT-IR e Raman) e a difração de raios-X (DRX) mostrou as alterações no padrão de cristalinidade da CB após a incorporação do colágeno. Nos compósitos contendo HA, as análises de microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS), DRX, FT-IR, Raman, ressonância magnética nuclear do ^{31}P em estado sólido (RMN do ^{31}P) demonstraram que nas amostras contendo CB-HA a principal fase precipitada foi hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) e no compósito (CB-COL)-HA foi carbonato-apatita. A presença dos peptídeos nas amostras foi confirmada por Raman, bem como pela análise de liberação controlada do OGP marcado com 5,6-carboxifluoresceína, que

ocorreu em um período de 10 h. A análise termogravimétrica revelou que a porcentagem de fase inorgânica nos compósitos contendo HA não excedeu 50% da massa residual, e que no compósito CB-COL, a massa residual de COL foi aproximadamente 8%; adicionalmente, a estabilidade térmica dos compósitos não foi alterada pela esterilização por radiação gama. As caracterizações foram complementadas pelas análises de taxa de intumescimento e ângulo de contato e resistência à tração. Os experimentos *in vitro* realizados com células osteogênicas obtidas de calvária de ratos recém-nascidos revelaram as membranas contendo HA obtiveram um atraso na adesão e proliferação celular, bem como, menor atividade de fosfatase alcalina, comparado as membranas CB e CB-COL, com ou sem peptídeo. Por outro lado, as membranas CB e CB-COL contendo OGP comparativamente na ausência deste peptídeo ou contendo OGP [10-14], favoreceram maior mineralização da matriz. A análise *in vivo* foi realizada empregando regeneração óssea guiada, em defeitos ósseos não-críticos em fêmur de ratos, os quais foram tratados com as respectivas membranas contendo OGP [10-14] adsorvidos. Estas membranas foram eficazes para regeneração óssea guiada para o modelo animal experimental proposto, promovendo a osteocondução e a osteoindução. Os compósitos contendo HA foram bioativos e as membranas CB-HA e CB-HA OGP [10-14] promoveram uma melhor reparação óssea em comparação às demais, sendo que a membrana CB-HA OGP [10-14] foi mais eficaz, apresentando uma reparação óssea em um menor tempo do que as outras membranas. Desta forma, os novos compósitos deverão ser considerados como um biomaterial alternativo para engenharia tecidual óssea.

Palavras-chaves: celulose bacteriana, compósitos, regeneração óssea, peptídeos regulatórios, osteoindução.

ABSTRACT

This thesis presents the preparation and characterization of new organic-inorganic composite materials based on bacterial cellulose (BC) synthesized by bacteria *Gluconacetobacter xylinus*, type I collagen (COL), hydroxyapatite (HA) and regulatory peptides of growth factors, osteogenic growth peptide (OGP) and osteogenic growth peptide [10-14] (OGP[10-14]) for application in bone regeneration. *In vitro* and *in vivo* studies were performed to evaluate the properties osteoconductive and osteoinductive, and bioactivity these composites. The peptides were synthesized through solid phase methodology (SPS - Fmoc strategy) and purified and characterized by HPLC, mass spectrometry and amino acid assay. The composites were prepared such as, BC-COL, BC-HA, (BC-COL)-HA and (BC-HA)-COL. Hydrated BC was modified initially by esterification of glycine amino acid through SPS - Fmoc strategy followed by cross-linking of type I collagen employing 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) for preparation of BC-COL composite. In the BC-HA composite, the biomimetic precipitation technique was performed for precipitation of HA on hydrated BC; BC membranes were sequentially incubated in solutions of CaCl_2 followed by Na_2HPO_4 , respectively. Additionally, the preparation of (BC-COL)-HA composites, the BC-COL composite was used as template for precipitation of HA crystals, following the biomimetic precipitation technique employed to BC-HA composite; and the preparation of (BC-HA)-COL, the BC-HA composite was used as template for collagen incorporation employing EDC. Characterizations performed in this study confirmed collagen incorporation to BC and BC-HA matrices by spectroscopy analysis (FT-IR and Raman) and that by X-ray diffraction (XRD) showed changes in the pattern BC crystallinity after collagen incorporation. In the composites containing HA, analysis of scanning electron microscopy/energy-dispersive spectroscopy (SEM/EDS), XRD, FT-IR, Raman, ^{31}P solid-state nuclear magnetic resonance (^{31}P NMR) revealed that in the samples containing BC-HA, principal precipitated phase was calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA) and (BC-COL)-HA was precipitated carbonated apatite. Peptide incorporation in the samples was confirmed by Raman scattering, as well as by release analysis of labeled OGP with 5,6-carboxyfluorescein, whose release

occurred at 10 h. Thermogravimetric analyses revealed that the percentage of the mineral phase in the composites containing HA did not exceed 50% of the total weight, and in the BC-COL composite presented a residue around 8%. In addition, thermal stability of composites was not changed by sterilization by gamma radiation. The characterization was complemented by swelling, contact angle and tensile strength tests. Cell culture experiments performed with osteogenic cells were obtained by of newborn rat calvarial revealed that features of cell morphology for cultures grown on membranes containing HA showed a delay in cell adhesion and proliferation, as well as, lower alkaline phosphatase activity compared to BC and BC-COL membranes, with or without peptide. Furthermore, the membranes BC and BC-COL containing OGP promoted greater matrix mineralization compared to these membranes with OGP [10-14] or without peptide. *In vivo* analyze was performed employed guided bone regeneration in non-critical bone defects in rat femur, which were treated with respective developed composites and peptide OGP [10-14] adsorbed in these samples. The results revealed that these membranes with OGP [10-14] were effective for guided bone regeneration to experimental animal model proposed, promoting osteoconduction and osteoinduction. In addition, composites containing HA were bioactive. However, BC-HA and BC-HA OGP [10-14] membranes promoted better bone regeneration in relation to other membranes, and the BC-HA OGP [10-14] membrane was more effective presenting a bone repair in less time than the other membranes. Thus, these new composites should be considered as an alternative biomaterial for bone tissue engineering.

Keywords: bacterial cellulose, composites, bone regeneration, regulatory peptides, osteoinduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura primária dos peptídeos OGP e OGP [10-14].....	10
Figura 2 - Fluxograma da metodologia desenvolvida.....	26
Figura 3 - Celulose bacteriana de 5 mm de espessura padronizadas em 25 mm de diâmetro.....	32
Figura 4 - Fluxograma da preparação dos compósitos.....	35
Figura 5 - Representação dos níveis de interação gota-superfície de acordo com o ângulo de contato.....	41
Figura 6 - Rato na posição dorsal (A); tricotomia, assepsia e marcação do local da incisão no lado esquerdo (B) e no lado direito (C).....	47
Figura 7 - Incisão (A) e rebatimentos dos tecidos com exposição do osso fêmur (B).....	47
Figura 8 - Preparo do defeito ósseo. Sequência das brocas utilizadas para preparação do defeito ósseo; perfuração com broca lança (A); defeito criado com a broca lança (B); perfuração com broca helicoidal (C) e defeito ósseo realizado com a broca helicoidal (D).....	48
Figura 9 - Colocação da membrana de CB-COL sobre o defeito ósseo (A); membrana de CB-COL adaptada sobre o defeito ósseo (B); membrana de (CB-COL)-HA adaptada sobre o defeito ósseo (C).....	49
Figura 10 - Sutura do segundo plano com Vicryl 4-0 (A); sutura do primeiro plano com mononylon 4-0 (B).....	49
Figura 11 - Cromatograma obtido em escala analítica do peptídeo OGP [10-14]. ...	54
Figura 12 - Cromatogramas obtidos em escala analítica do peptídeo OGP em a: bruto e em b: purificado.....	54
Figura 13 - Cromatogramas obtidos em escala analítica do peptídeo OGP-CF (A – bruto; B – purificado).....	57
Figura 14 – A: Espectro de fluorescência do peptídeo OGP-CF. B: curva padrão OGP-CF, mostrando a equação da reta e o coeficiente de correlação.....	58
Figura 15 – Curva de liberação do peptídeo OGP-CF adsorvido na membrana CB; em A, a reta pontilhada indicando a liberação máxima (600 min) deste peptídeo no sistema; em B, curva de liberação com valores das médias e as barras indicando erro padrão para experimento em triplicata.....	58
Figura 16 – Compósitos após a secagem em estufa. A: membrana CB-COL e B: membrana (CB-COL)-HA.....	59

- Figura 17** – Reação de esterificação esquemática entre os grupos OH da CB com os grupos COOH do Fmoc-Gly (passo 1). Obtenção da CB modificada e pronta para acoplamento do colágeno (passo 2).60
- Figura 18** - Micrografia de MEV das membranas de CB e CB OGP [10-14]: A: superfície da CB e B: seção transversal da CB; C: superfície da CB OGP [10-14] e D: seção transversal da CB OGP [10-14].....61
- Figura 19** - Micrografias de MEV mostrando a superfície da membrana do compósito CB-COL (A), seção transversal do compósito CB-COL (B), superfície da membrana do compósito CB-COL OGP [10-14] (C) e regiões com porosidade da superfície da membrana do compósito CB-COL OGP [10-14] (D).....62
- Figura 20.** Micrografias de MEV mostrando em A e B superfície da membrana do compósito CB-HA nos aumentos de 30.000x e 60.000x respectivamente, e em C e D micrografias de MEV superfície da membrana do compósito CB-HA OGP [10-14] nos aumentos de 15.000x e 60.000x respectivamente.63
- Figura 21** - Espectro de EDS para CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B). Aumento 2.000x.64
- Figura 22** - Micrografias de MEV mostrando em (A) e (B) a superfície da membrana do compósito (CB-COL)-HA, e em (C), imagem de MEV em seção transversal do compósito (CB-COL)-HA.....65
- Figura 23.** Micrografias de MEV mostrando em A (15.000x) e B (60.000x) a superfície da membrana do compósito (CB-COL)-HA OGP [10-14].66
- Figura 24** - Espectro de EDS para as amostras (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B). Aumento 2.000x.67
- Figura 25** - Micrografias de MEV mostrando em (A) e (B) a superfície da membrana do compósito (CB-HA)-COL, e em (C), imagem de MEV em seção transversal do compósito (CB-HA)-COL.....68
- Figura 26** - Micrografias de MEV mostrando em A e B a superfície da membrana do compósito (CB-HA)-COL OGP [10-14].....69
- Figura 27** - Espectro de EDS para as amostras (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B). Aumento 2.000x.70
- Figura 28** - Padrões de difração de DRX da CB, colágeno puro, CB-COL com os respectivos picos assinalados.....71
- Figura 29** - Padrões de difração de DRX para as amostras CB (a) e CB-HA (b) com respectivos picos de difração assinalados; seta: picos referentes à CDHA e a HA e asterisco: picos referentes à CB.....72

- Figura 30** - Padrões de difração de DRX para as amostras CB (a), CB-COL (b), CB-HA (c), (CB-COL)-HA (d) e (CB-HA)-COL (e). Os picos de difração assinalados por seta: são picos referentes à CDHA e a HA, e os picos assinalados por asterisco: são picos referentes à CB; e os picos referentes ao OCP estão assinalados por ponto cheio (●).73
- Figura 31 - A:** espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras: CB (a), colágeno puro (b), CB-glicina (c) e do compósito CB-COL (d). **B:** espectro na região de $1800 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ mostrando as bandas da região de 1645 e 1545 cm^{-1} em maior detalhe.....75
- Figura 32** - Espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras CB (a) e do compósito CB-HA (b).77
- Figura 33 - A:** espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras: (a) CB, (b) COL, (c) CB-COL, (d) CB-HA, (e) (CB-COL)-HA, e (f) (CB-HA)-COL. **B:** espectro na região de $1800 - 400 \text{ cm}^{-1}$ mostrando as bandas da região de 870 e 838 cm^{-1} em maior detalhe.....78
- Figura 34** – Espectros do espalhamento Raman das amostras CB e CB OGP [10-14]. Abaixo estão representados os espectros na região de $1800 - 100 \text{ cm}^{-1}$ mostrando as bandas da região de 1602 a 1625 cm^{-1} em maior detalhe.....80
- Figura 35** – Espectros do espalhamento Raman das amostras CB-COL, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, com ou sem OGP [10-14]. Espectros na região de $1800 - 100 \text{ cm}^{-1}$ mostrando as bandas da região de $1602 - 1625 \text{ cm}^{-1}$ para amida I e de $961 - 954 \text{ cm}^{-1}$ para íons PO_4^{3-} em maior detalhe.81
- Figura 36** - Espectro de RMN-MAS do ^{31}P para amostra CB-HA e sua respectiva deconvolução.83
- Figura 37** - Espectro de RMN-MAS do ^{31}P para amostra (CB-COL)-HA e sua respectiva deconvolução.....84
- Figura 38** - Espectro de RMN-MAS do ^{31}P para amostra (CB-HA)-COL e sua respectiva deconvolução.....85
- Figura 39** - Curvas termogravimétricas para as amostras CB e CB OGP [10-14], antes e após esterilização com radiação gama (γ).88
- Figura 40** - Curvas termogravimétricas para as amostras CB, CB-COL e CB-COL γ (A); curvas termogravimétricas para as amostras dos compostos CB-COL, CB-COL γ , CB-COL OGP [10-14] e CB-COL OGP [10-14] γ (B).90
- Figura 41** - Curvas termogravimétricas das amostras CB, CB-HA e CB-HA γ (A); curvas termogravimétrica para as amostras dos compostos CB-HA, CB-HA γ , CB-HA OGP [10-14] e CB-HA OGP [10-14] γ (B).92
- Figura 42** - Curvas termogravimétricas das amostras CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL antes e após a esterilização com radiação gama 20 (kGy).93

- Figura 43 - A:** curvas termogravimétricas das amostras CB, (CB-COL)-HA, (CB-COL)-HA γ , (CB-COL)-HA OGP [10-14] e (CB-COL)-HA OGP [10-14] γ . **B:** curvas termogravimétricas das amostras CB, (CB-HA)-COL, (CB-HA)-COL γ , (CB-HA)-COL OGP [10-14] e (CB-HA)-COL OGP [10-14] γ96
- Figura 44 -** Porcentagem de intumescimento dos compósitos antes e após a esterilização com radiação gama 20 kGy. Barras verticais mostram o erro padrão.....97
- Figura 45 - A)** Amostras do grupo da CB antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: CB T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB OGP T=0s e T=10s, respectivamente. **B)** Amostras do grupo da CB antes da esterilização com radiação gama 20 KGy; a e b: CB T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB OGP T=0s e T=10s, respectivamente.....99
- Figura 46 - A)** Amostras do grupo da CB-COL antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: CB-COL T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB-COL OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB-COL OGP T=0s e T=10s, respectivamente. **B)** Amostras do grupo da CB-COL antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: CB-COL T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB-COL OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB-COL OGP T=0s e T=10s, respectivamente. 100
- Figura 47 - A)** Amostras do grupo da CB-HA antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: CB-HA T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB-HA OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB-HA OGP T=0s e T=10s, respectivamente. **B)** Amostras do grupo da CB-HA antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: CB-HA T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB-HA OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB-HA OGP T=0s e T=10s, respectivamente..... 102
- Figura 48 - A)** Amostras do grupo da (CB-COL)-HA antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: (CB-COL)-HA T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: (CB-COL)-HA OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: (CB-COL)-HA OGP T=0s e T=10s, respectivamente. **B)** Amostras do grupo da (CB-COL)-HA antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: (CB-COL)-HA T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: (CB-COL)-HA OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: (CB-COL)-HA OGP T=0s e T=10s, respectivamente..... 102
- Figura 49 - A)** Amostras do grupo da (CB-HA)-COL antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: (CB-HA)-COL T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: (CB-HA)-COL OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: (CB-HA)-COL OGP T=0s e T=10s, respectivamente. **B)** Amostras do grupo da (CB-HA)-COL antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: (CB-HA)-COL T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: (CB-HA)-COL OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: (CB-HA)-COL OGP T=0s e T=10s, respectivamente..... 103

- Figura 50** - Típicas curvas de tensão-deformação das membranas CB (A), CB-HA (B), (CB-HA)-COL (C), CB-COL (D) e (CB-COL)-HA (D) antes e após a esterilização sob carga de tração..... 105
- Figura 51** - Epifluorescência de células osteoblásticas cultivadas sobre membranas de CB (A, D e G), CB OGP (B, E e H) e CB OGP [10-14] (C, F e I), em 01 (A-C), 03 (D-F) e 07 (G-I) dias. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alex Flúor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação do DNA por DAPI), o núcleo celular. Barra para A-I = 100 μm 109
- Figura 52** - Epifluorescência de células osteoblásticas cultivadas sobre membranas de CB-COL (A, D e G), CB-COL OGP (B, E e H) e CB-COL OGP [10-14] (C, F e I), em 01 (A-C), 03 (D-F) e 07 (G-I) dias. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alex Flúor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação do DNA por DAPI), o núcleo celular. Barra para A-I = 100 μm 110
- Figura 53** - Epifluorescência de células osteoblásticas cultivadas sobre membranas de CB-HA (A, D e G), CB-HA OGP (B, E e H) e CB-HA OGP [10-14] (C, F e I), em 01 (A-C), 03 (D-F) e 07 (G-I) dias. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alex Flúor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação do DNA por DAPI), o núcleo celular. Barra para A-I = 100 μm 111
- Figura 54** - Epifluorescência de células osteoblásticas cultivadas sobre membranas de (CB-COL)-HA (A, D e G), (CB-COL)-HA OGP (B, E e H) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (C, F e I), em 01 (A-C), 03 (D-F) e 07 (G-I) dias. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alex Flúor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação do DNA por DAPI), o núcleo celular. Barra para A-I = 100 μm .
..... 113
- Figura 55** - Epifluorescência de células osteoblásticas cultivadas sobre membranas de (CB-HA)-COL (A, D e G), (CB-HA)-COL OGP (B, E e H) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (C, F e I), em 01 (A-C), 03 (D-F) e 07 (G-I) dias. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alex Flúor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação do DNA por DAPI), o núcleo celular. Barra para A-I = 100 μm .
..... 114
- Figura 56** - Proliferação de células osteoblásticas derivadas de calvária de rato cultivadas sobre membranas de CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com ou sem peptídeos OGP e OGP [10-14] adsorvidos, avaliada aos 10 e 14 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. (*) significância estatística quando comparado CB entre as todas as membranas estudadas ($p < 0,01$) para o período de 10 dias; (**) significância estatística entre as membranas em 14 dias ($p < 0,01$)..... 115
- Figura 57** - Conteúdo de proteína total ($\text{mg de proteína.mL}^{-1}$) de células osteoblásticas derivadas de calvária de rato cultivadas sobre membranas de CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, com ou sem os peptídeos OGP e OGP [10-14] adsorvidos, avaliada aos 14 e 17 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão..... 118

- Figura 58** – Atividade de ALP (μmol timolftaleína/h/mg de proteína) de células osteoblásticas derivadas de calvária de rato cultivadas sobre membranas de CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, com ou sem os peptídeos OGP e OGP [10-14] adsorvidos, avaliada aos 14 e 17 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($p < 0,05$).. 119
- Figura 59** - Formação de matriz mineralizada detectada por vermelho de Alizarina aos 21 dias em culturas de células osteoblásticas. Nódulos de mineralização foram observados sobre as membranas CB (A-C) e CB-COL (E e F). Barra para A-C = 200 μm 122
- Figura 60** – Mineralização das culturas de células osteoblásticas crescidas sobre as membranas CB e CB-COL em 21 dias, expressadas pelo valor mensurado da absorbância em 405 nm. Os valores estão apresentados como média \pm e desvio padrão (Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$; ** $p > 0,05$)..... 123
- Figura 61** - Imagens radiográficas digital do grupo controle (I). A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, em 120 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada..... 130
- Figura 62** – Grupo controle: 07 dias. **A:** infiltrado inflamatório (I) e coágulo sanguíneo (C) no interior do defeito ósseo; neoformação óssea trabecular (seta); **B:** formação de matriz osteóide (seta) adjacente a parede do defeito ósseo (F), medula óssea (mo), infiltrado inflamatório (I) e coágulo sanguíneo; **C:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O) adjacente ao defeito ósseo (DO); osteoblastos sendo englobados pela matriz osteóide (setas). 131
- Figura 63** – Grupo controle: 15 dias. **A:** neoformação óssea trabecular em fase de mineralização (osso imaturo) (setas) e medula óssea em remodelação (MO); **B:** formação de matriz osteóide (O) adjacente a parede do defeito ósseo (DO), trabéculas ósseas imaturas (setas), espaços medulares (EM); **C:** em maior aumento, observa-se presença de osteoblastos ativos (cabeça de seta) sintetizando a matriz osteóide adjacente ao defeito ósseo (DO), a qual se apresenta como trabéculas ósseas imaturas (T); osteoblastos sendo englobados pela matriz osteóide (setas)..... 133
- Figura 64** – Grupo controle: 30 dias. **A:** reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), osso fêmur (F) e medula óssea reparada (MO); **B:** inúmeros vasos sanguíneos (setas pretas) e ósteons (cabeças de setas), pequenos espaços medulares (em) aprisionados no interior deste tecido ósseo; lamelas ósseas paralelas (seta verde) e intersticiais (seta branca) **C:** nota-se a presença de lamelas paralelas nas corticais ósseas externas e internas (setas verdes), fibras colágenas desorganizadas no interior do defeito ósseo (seta branca) e vasos sanguíneos (setas pretas). 134

- Figura 65** – Grupo controle: 120 dias. **A:** reparação do defeito ósseo por osso maduro; **B:** Osso maduro com presença de inúmeros vasos sanguíneos e ósteons (om) e na cortical óssea interna observa-se lamelas ósseas paralelas (seta verde); **C:** nota-se a presença de lamelas paralelas nas corticais ósseas internas (seta verde), vasos sanguíneos (setas azuis), ósteons (setas pretas) e inúmeros osteócitos (cabeças de setas). 136
- Figura 66** - Imagens radiográficas digital do subgrupo IId - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 120 dias observa-se a cortical óssea reparada. 137
- Figura 67** - Imagens radiográficas digital do subgrupo IIe - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 30 dias observa-se a cortical óssea interna totalmente reparada e em 120 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada. 138
- Figura 68** – Grupo II: 07 dias. **A e B:** neoformação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos (NF) e observa-se também a presença das membranas CB (A) e CB OGP [10-14] (B) (setas pretas); **C e D:** neoformação óssea trabecular imatura (NF) adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e no canal medular, espaços medulares (em), infiltrado inflamatório (asterisco) e respectivas membranas (seta); **E e F:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e trabéculas ósseas; osteoblastos sendo englobados pela matriz osteóide (setas). 139
- Figura 69** – Grupo II: 15 dias. **A e B:** remodelação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos com presença de grandes espaços medulares (em) e trabéculas ósseas finas (setas) em A, em B espaços medulares menores e trabéculas mais espessas, e observa-se também a presença das membranas CB (A) e CB OGP [10-14] (B); **C e D:** remodelação óssea com grandes espaços medulares (em) em C e menores em D; matriz osteóide (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e as membranas (asterisco); em C observa-se na ampliação macrófago adjacente a membrana (seta); **E e F:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e trabéculas ósseas imaturas; osteoblastos sendo englobados pela matriz osteóide (setas). 141

- Figura 70** – Grupo II: 30 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), parede do defeito ósseo (DO) e medula óssea reparada (MO); **C e D:** inúmeros vasos sanguíneos (setas pretas), espaços medulares aprisionados no interior das trabéculas ósseas em remodelação (T) e membrana adjacente ao tecido ósseo reparado (asterisco); lamelas ósseas paralelas (seta verde) e fibras colágenas desorganizadas (seta branca); **E:** nota-se a presença de lamelas intersticiais (seta verde) e concêntricas (seta azul) no tecido ósseo neoformado (NF), fibras colágenas imaturas, não organizadas no interior do defeito ósseo (seta vermelha) e vasos sanguíneos (setas pretas); **F:** o tecido ósseo neoformado (NF) apresenta-se mais organizado em relação às fibras colágenas, lamelas intersticiais (seta verde) e vasos sanguíneos (setas pretas). 143
- Figura 71** – Grupo II: 120 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso maduro (OM) e medula óssea reparada (MO); em B ainda observa-se presença de pequenos espaços medulares (cabeças de setas); e observa-se também a presença das membranas CB (A) e CB OGP [10-14] (B) (setas); **C e D:** inúmeros vasos sanguíneos (cabeças de setas), ósteons (setas pretas) e membrana adjacente ao tecido ósseo reparado (asterisco); lamelas ósseas paralelas (seta verde) e concêntricas (seta azul); **E e F:** nota-se a presença de lamelas concêntricas (setas azuis) no tecido ósseo neoformado, vasos sanguíneos (cabeças de setas), ósteons (setas pretas). 145
- Figura 72** – Grupo II: 120 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas CB (A) e CB OGP [10-14] (B) (setas). 146
- Figura 73** - Imagens radiográficas digital do subgrupo III d - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 15 dias observa-se a cortical óssea interna em reparação e em 120 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada. 147
- Figura 74** - Imagens radiográficas digital do subgrupo III e - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 15 dias observa-se a cortical óssea interna totalmente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada. 147
- Figura 75** – Grupo III: 07 dias. **A e B:** neoformação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos (NF) e observa-se também a presença das membranas CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B) (asterisco) e infiltrado inflamatório (I); **C e D:** neoformação óssea trabecular imatura (NF) adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e no canal medular, medianos espaços medulares (em), infiltrado inflamatório (I) e respectivas membranas (asterisco); **E e F:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e trabéculas ósseas imaturas (T); osteoblastos sendo englobados pela matriz osteóide (setas). 149

Figura 76 – Grupo III: 15 dias. **A e B:** remodelação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos com presença de medianos espaços medulares (em) e também da medula óssea (MO), e observa-se a presença das membranas CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** remodelação óssea com medianos espaços medulares (em); em C e em D observa-se na ampliação macrófagos (setas) adjacente as respectivas membranas (asterisco); **E e F:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e trabéculas ósseas imaturas (T)..... 151

Figura 77 – Grupo III: 30 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), parede do defeito ósseo (DO) e medula óssea reparada (MO), e observa-se a presença das membranas CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B) (asterisco); **C:** inúmeros vasos sanguíneos (setas pretas), espaços medulares aprisionados no interior das trabéculas ósseas em remodelação (T) e membrana adjacente ao tecido ósseo (asterisco); **D:** lamelas paralelas na região da cortical óssea interna (seta verde), presença de vasos sanguíneos (setas pretas) e espaços medulares no interior do tecido ósseo reparado (RO) e membrana adjacente ao tecido ósseo (asterisco); células multinucleadas são observadas adjacentes as membranas CB-HA (C) e CB-HA OGP [10-14] (D) (ampliação); **E:** nota-se a presença de lamelas concêntricas (seta azul) no tecido ósseo neoformado, vasos sanguíneos (setas pretas) e ósteon (cabeça de seta); **F:** o tecido ósseo reparado apresenta-se mais organizado em relação às fibras colágenas, lamelas paralelas (setas verde) e vasos sanguíneos (setas pretas). 153

Figura 78 – Grupo III: 120 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso maduro (OM) e medula óssea reparada (MO); em B ainda observa-se presença de espaços medulares (cabeças de setas); e observa-se também a presença das membranas CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** inúmeros vasos sanguíneos (setas), ósteons (cabeças de setas) e membrana (asterisco) adjacente ao tecido ósseo reparado (RO); **E e F:** nota-se a presença de lamelas paralelas (setas verdes) e concêntricas (setas azuis) no tecido ósseo reparado, vasos sanguíneos (setas pretas), ósteons (cabeças de setas)..... 155

Figura 79 – Grupo III: 120 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B) (setas)..... 156

Figura 80 - Imagens radiográficas digital do subgrupo IVd – A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 15 dias observa-se a cortical óssea interna reparada e em 120 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada. 157

Figura 81 - Imagens radiográficas digital do subgrupo IVe - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 7 dias observa-se a cortical óssea interna praticamente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada..... 157

Figura 82 – Grupo IV: 07 dias. **A e B:** neoformação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos (NF); em A observa-se maior presença de tecido conjuntivo (TC) no interior do defeito ósseo; observa-se também a presença das membranas CB-COL (A) e CB-COL OGP [10-14] (B) (asterisco) e infiltrado inflamatório (I); **C e D:** neoformação óssea trabecular imatura, adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e do canal medular presença de matriz osteóide (O); infiltrado inflamatório (I) e respectivas membranas (asterisco); **E e F:** observa-se em presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O), a qual não apresenta-se mineralizada; presença de tecido conjuntivo denso (TC). 159

Figura 83 – Grupo IV: 15 dias. **A e B:** remodelação óssea das trabéculas imaturas (NF) no interior dos defeitos ósseos e também da medula óssea (MO), e observa-se a presença das membranas CB-COL (A) e CB-COL OGP [10-14] (B) (asterisco) e infiltrado inflamatório (I); **C e D:** remodelação óssea das trabéculas ósseas neoformadas (NF) com medianos espaços medular (em), e infiltrado inflamatório (I); **E:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e trabéculas ósseas imaturas (T); **F:** observa-se osteoblastos englobados (cabeças de setas) pela matriz osteóide (O) adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e início de formação dos vasos sanguíneos (setas). 161

Figura 84 – Grupo IV: 30 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), parede do defeito ósseo (DO) e medula óssea reparada (MO), e observa-se a presença das membranas CB-COL (A) e CB-COL OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** presença de vasos sanguíneos (setas pretas), ósteons (cabeças de setas) e espaços medulares no interior do tecido ósseo reparado (RO); em D, observam-se lamelas paralelas na região da cortical óssea externa (seta verde); **E e F:** nota-se formação de lamelas concêntricas envolvendo os ósteons (cabeça de seta) no tecido ósseo neoformado (NF) e vasos sanguíneos (seta preta). 163

Figura 85 – Grupo IV: 120 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso maduro (OM) e medula óssea reparada (MO); em A ainda observa-se presença de espaços medulares (cabeças de setas); observa-se também a presença das membranas CB-COL (A) e CB-COL OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** vasos sanguíneos (setas pretas), ósteons (cabeças de setas) no tecido ósseo reparado (OM) e presença de lamelas paralelas na região da cortical óssea externa em C e interna em D (seta verde); **E e F:** presença de lamelas concêntricas (setas azuis) em torno dos ósteons (cabeças de setas) no tecido ósseo reparado e vasos sanguíneos (setas pretas); em E, observa-se lamelas paralelas (seta verde) e intersticiais (asterisco). 165

Figura 86 – Grupo IV: 120 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas CB-COL (A) e CB-COL OGP [10-14] (B) (setas). 166

- Figura 87** - Imagens radiográficas digital do subgrupo Vd - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 7 dias observa-se a cortical óssea interna praticamente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada..... 167
- Figura 88** - Imagens radiográficas digital do subgrupo Ve - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 7 dias observa-se a cortical óssea interna praticamente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada..... 167
- Figura 89** – Grupo V: 07 dias. **A e B:** neoformação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos (NF); observa-se presença de tecido conjuntivo (TC) no interior do defeito ósseo e presença das membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (asterisco) e infiltrado inflamatório (I); **C e D:** neoformação óssea trabecular imatura (NF); adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e do canal medular presença de matriz osteóide (O); infiltrado inflamatório (I) e respectivas membranas (asterisco); **E e F:** observa-se em presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O), a qual não apresenta-se mineralizada..... 169
- Figura 90** – Grupo V: 15 dias. **A e B:** remodelação óssea das trabéculas imaturas (NF) no interior dos defeitos ósseos e também da medula óssea (MO), e observa-se a presença das membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (asterisco) em A, observa-se trabéculas ósseas mais finas do que em B; **C e D:** remodelação óssea das trabéculas ósseas neoformadas (NF) com grandes espaços medular (em), matriz osteóide (O) adjacente a parede do defeito ósseo (DO); **E e F:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e as trabéculas ósseas imaturas (T)..... 172
- Figura 91** – Grupo V: 30 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), parede do defeito ósseo (DO) e medula óssea reparada (MO), e observa-se a presença das membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** presença de vasos sanguíneos (setas pretas), ósteons (cabeças de setas) e espaços medulares no interior do tecido ósseo reparado (RO); **E:** formação de lamelas concêntricas (seta azul) envolvendo os espaços medulares no tecido ósseo neoformado e lamelas intersticiais bem definidas (setas vermelhas); **F:** nota-se formação de lamelas concêntricas (seta azul) envolvendo os ósteons (cabeça de seta) no tecido ósseo neoformado e vasos sanguíneos (seta preta) e também lamelas intersticiais bem definidas (setas vermelhas). 174
- Figura 92** – Grupo V: 30 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (setas)..... 175

- Figura 93** – Grupo V: 120 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso maduro (OM) e medula óssea reparada (MO); em B observa-se presença de espaços medulares no interior do osso reparado; presença das membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** lamelas concêntricas em torno dos ósteons (setas pretas) no tecido ósseo reparado (OM) e presença de lamelas paralelas na região da cortical óssea interna (C e D), e adjacente aos espaços medulares no interior do osso reparado (D) (setas verdes); **E e F:** presença de lamelas concêntricas (setas azuis) em torno dos ósteons (setas pretas) e lamelas paralelas (seta verde); em E, vasos sanguíneos (cabeças de setas). 176
- Figura 94** – Grupo V: 120 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (setas)..... 177
- Figura 95** - Imagens radiográficas digital do subgrupo VI d – A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 7 dias observa-se a cortical óssea interna praticamente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada. 178
- Figura 96** - Imagens radiográficas digital do subgrupo VI e – A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 7 dias observa-se a cortical óssea interna praticamente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada. 178
- Figura 97** – Grupo VI: 07 dias. **A e B:** neoformação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos (NF); observa-se presença de tecido conjuntivo (TC) no interior do defeito ósseo em A, e presença das membranas (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B) (asterisco) e infiltrado inflamatório (I); **C e D:** neoformação óssea trabecular imatura (NF); presença de matriz osteóide (O) adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e ao canal medular; infiltrado inflamatório (I) e respectivas membranas (asterisco); **E e F:** observa-se em presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O), a qual não apresenta-se mineralizada, e osteoblastos sendo englobados pela matriz (setas). 180
- Figura 98** – Grupo VI: 15 dias. **A e B:** remodelação óssea das trabéculas imaturas (NF) no interior dos defeitos ósseos e também da medula óssea (MO), e observa-se a presença das membranas (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** remodelação óssea das trabéculas ósseas neoformadas (NF) com grandes espaços medular (em), matriz osteóide (O) adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e infiltrado inflamatório (I); **E e F:** presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) sintetizando a matriz osteóide (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e as trabéculas ósseas imaturas (T)..... 182

- Figura 99** – Grupo VI: 30 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), parede do defeito ósseo (DO) e medula óssea reparada (MO), e observa-se a presença das membranas (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** presença de vasos sanguíneos (setas pretas), ósteons (cabeças de setas) e espaços medulares no interior do tecido ósseo reparado (RO); em D, presença de lamelas paralelas na região do cortical óssea externa; **E e F:** formação de lamelas concêntricas (setas azuis) envolvendo os espaços medulares e os ósteons (cabeças de setas) no tecido ósseo neoformado e lamelas intersticiais bem definidas (setas vermelhas); vasos sanguíneos (setas pretas)..... 184
- Figura 100** – Grupo VI: 120 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso maduro (OM) e medula óssea reparada (MO); presença das membranas (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** lamelas concêntricas e intersticiais bem definidas no osso maduro (OM) e presença de lamelas paralelas na região da cortical óssea interna (C e D) e externa (D) (setas verdes); **E** : presença de lamelas concêntricas (setas azuis) em torno dos ósteons e intersticiais (estrelas); **F:** presença de lamelas concêntricas (setas azuis) em torno dos ósteons e lamelas paralelas (setas verdes) e intersticiais (estrelas). 186
- Figura 101** – Grupo VI: 120 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B) (setas)..... 187
- Figura 102** – Tendência linear proposta para reabsorção da membrana de CB versus o tempo..... 188

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos. Fase da apatita, fórmula química e razão molar Ca/P.....	21
Tabela 2 - Grupos protetores dos aminoácidos utilizados na síntese do OGP e OGP [10-14].	27
Tabela 3 - Composição das amostras que foram confeccionadas.....	31
Tabela 4 - Ângulos de contato e condições de molhabilidade.	40
Tabela 5 - Divisão dos animais em grupos de acordo com o material a ser implantado.....	46
Tabela 6 - Classificação para intensidade de reação inflamatória presente nos espécimes.	52
Tabela 7 - Rendimento da purificação e pureza relativa do OGP [10-14] e do OGP 55	
Tabela 8 - Frequência das principais de celulose e de proteínas.	76
Tabela 9 - Principais valores para os descolamentos químicos do ³¹ P, razões molares Ca/P e morfologia dos cristais das referidas fases inorgânicas das amostras CB-HA, (CB-HA)-COL e (CB-COL)-HA.	87
Tabela 10 - Temperatura <i>Tonset</i> dos compósitos desenvolvidos antes e após a esterilização, relacionados à decomposição da CB.	88
Tabela 11 - Valores mensurados para o ângulo de contato para as amostras CB, CB-COL, CB-HA (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, com adição de OGP e OGP [10-14].	98
Tabela 12 - Valores mensurados no ensaio de resistência à tração para as amostras CB, CB-HA, (CB-HA)-COL, CB-COL e (CB-COL)-HA antes e após a esterilização com radiação gama (20 kGy).	106
Tabela 13 – Valores mensurados para MTT das culturas de células osteoblásticas derivadas de calvária de rato cultivadas sobre membranas de CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com ou sem peptídeos OGP e OGP [10-14] adsorvidos, avaliada em 10 e 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (letras diferentes indicam diferença estatísticas entre os grupos e tempos (p < 0,05).	116
Tabela 14 – Valores mensurados para atividade da ALP das culturas de células osteoblásticas derivadas de calvária de rato cultivadas sobre membranas de CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com ou sem peptídeos OGP e OGP [10-14] adsorvidos, avaliada em 14 e 17 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (letras diferentes indicam diferença estatísticas entre os grupos e tempos (p < 0,05).	120

-
- Tabela 15** - Densidade óssea do osso neoformado medida em pixels da região central dos defeitos ósseos dos referidos grupos I, II, III, IV, V e VI da análise experimental *in vivo* segundo os períodos experimentais. Os valores estão apresentados são as médias \pm erro padrão em mmPb referentes a escala padrão de chumbo utilizada nas radiografias ($p < 0,05$). 129
- Tabela 16** – Valores mensurados para a espessura das respectivas membranas estudadas nos seguintes períodos de análise 07, 15, 30 e 120 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (letras diferentes indicam diferença estatísticas entre os grupos e tempos ($p < 0,05$))..... 187

LISTA DE ABREVIATURAS

1. Aminoácidos

Ala (A) -	Alanina
Arg (R) -	Arginina
Phe (F) -	Fenilalanina
Gly (G) -	Glicina
Gln (Q) -	Glutamina
Leu (L) -	Leucina
Lys (K) -	Lisina
Pro (P) -	Prolina
Tyr (Y) -	Tirosina
Thr (T) -	Treonina

2. Outras

A	-	Absorbância
ACN	-	Acetonitrila
ACP		Fosfato de cálcio amorfo
ALP		Fosfatase alcalina
ANOVA		<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
ATP		Adenosina trifosfato
Boc	-	t-Butiloxicarbonila
BMPs		Proteínas morfogenética óssea
C ₁₈	-	Grupo octadecil
CB	-	Celulose bacteriana
CB-COL		Celulose bacteriana - colágeno
(CB-COL)-HA		(Celulose bacteriana - colágeno)-hidroxiapatita
CB-HA		Celulose bacteriana – hidroxiapatita
(CB-HA)-COL		(Celulose bacteriana – hidroxiapatita)-colágeno
CDHA		Hidroxiapatita deficiente em cálcio
CF		5,6 carboxifluoresceína
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COL	-	Colágeno
CPP		Pirofosfato de cálcio
DAPI		<i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i> dihydrochlorido

		(Dihidrocloro 4,6-diamidino-2-fenilindole)
DCM	-	Diclorometano
DCP		Fosfato de dicálcio
DCPD		Fosfato de dicálcio dihidratado
DIC	-	N,N-Diisopropilcarbodiimida
DIEA	-	Diisopropiletilamina
DMF	-	Dimetilformamida
DRX	-	Difratometria de raios-X
EDC		1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDS		Espectroscopia de energia dispersiva
EDT	-	1,2-etanoditol
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
e-PTFE	-	Politetrafluoroetileno expandido
ES-MS		Espectroscopia de massas
FGF		<i>Fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento fibroblástico)
Fmoc	-	9-fluorenilmetiloxycarbonila
FT-IR		Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GI	-	Grau de incorporação
H&E		Hematoxilina-eosina
HA	-	Hidroxiapatita
hBMSC		<i>Human Bone Marrow Stromal Cells</i>
HOBt	-	1-hidroxibenzotriazol
HPLC		<i>High-performance liquid cromatography</i>
IGF		<i>Insulin-like growth factor</i>
M-CSF		<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
MTT		brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]
NMP	-	N-metilpirrolidona
OCP		Fosfato de octacálcio
OGP		“Osteogenic growth peptide” (Peptídeo de crescimento osteogênico)

OGP [10-14]		“ <i>Osteogenic growth peptide</i> [10-14]” (Peptídeo de crescimento osteogênico [10-14])
OPA		Orto-ftalaldeído
PB		<i>Phosphate buffer</i> (tampão fosfato de sódio)
PBS		<i>Phosphate buffer solution</i>
PDGF		<i>Platelet-derived growth factor</i>
PLA		poli (ácido láctico)
PLGA		poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
Pmc	-	2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonila
RANK-L		<i>Receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand</i>
RI		Radiografia imediata
RMN		Ressonância magnética nuclear
ROG	-	Regeneração óssea guiada
RTG	-	Regeneração tecidual guiada
SBF		<i>Simulated body fluid</i>
SPFS	-	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
t-Bu	-	t-Butílico
TA		Temperatura ambiente
TCP		Fosfato de tricálcio
TG		análise termogravimétrica
TGF		<i>Transforming growth factor</i> (Fator de transformação do crescimento)
TFA	-	Ácido Trifluoracético
TIS	-	Triisopropilsilano
T _{onset}		Temperatura de decomposição
Tris	-	Tris(hidroximetil)metilamina
trt	-	Tritila
UDP		glicose-1-fosfato uridil transferase
UV-vis	-	Ultravioleta-visível

Índice

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Compósitos	3
1.2	Estrutura e propriedades do tecido ósseo	4
1.3	Fator de Crescimento	7
1.3.1	Peptídeos de crescimento osteogênico – (OGP e OGP [10-14])	9
1.4	Celulose Bacteriana (CB)	12
1.5	Colágeno	16
1.6	Hidroxiapatita	19
2	OBJETIVOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1	Síntese química do OGP e do OGP [10-14]	26
2.1.1	Análise de aminoácidos	28
2.1.2	Espectrometria de Massas	29
2.2	Síntese do peptídeo OGP marcado com carboxifluoresceína	29
2.3	Preparação das Membranas de Celulose Bacteriana	30
2.3.1	Preparação dos compósitos	31
2.3.1.1	Preparação dos compósitos de celulose bacteriana e colágeno (CB-COL)	32
2.3.1.2	Preparação dos compósitos de celulose bacteriana e hidroxiapatita (CB-HA)	34
2.3.1.3	Preparação dos compósitos de celulose bacteriana, colágeno e hidroxiapatita [(CB-COL)-HA]	34
2.3.1.4	Preparação dos compósitos de celulose bacteriana, hidroxiapatita e colágeno [(CB-HA)-COL]	34
2.3.2	Determinação da liberação do peptídeo nos compósitos	36
2.3.3	Incorporação dos peptídeos, OGP e OGP [10-14], nas amostras	36
2.4	Caracterização dos compósitos	37
2.4.1	Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)	37
2.4.2	Difratometria de raios-X (DRX)	37
2.4.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	38
2.4.4	Espectroscopia de espalhamento Raman	38
2.4.5	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido dos núcleos ³¹ P	38
2.4.6	Análise termogravimétrica (TG)	39
2.4.7	Taxa de intumescimento	39
2.4.8	Ângulo de contato	40
2.4.9	Ensaio mecânico de resistência à tração	41
2.5	Análises <i>in vitro</i>	42
2.5.1	Isolamento das células e cultura primária de células osteogênicas	42
2.5.2	Morfologia celular	42
2.5.3	Proliferação e viabilidade celular	43
2.5.4	Atividade de fosfatase alcalina (ALP)	44
2.5.4.1	Medida do conteúdo de proteína total	44
2.5.4.2	Medida da atividade da ALP	44
2.5.5	Formação de matriz mineralizada	45
2.5.6	Análise estatística	46
2.6	Análise <i>in vivo</i>	46
2.6.1	Procedimento cirúrgico	46
2.6.2	Análise radiográfica dos espécimes <i>ex vivo</i>	50
2.6.3	Processamento histológico	51
2.6.4	Análise estatística	51

3.1 Síntese e purificação dos peptídeos OGP e OGP [10-14]	53
3.1.1 Caracterização dos peptídeos OGP [10-14] e OGP	55
3.2 Síntese e purificação do peptídeo OGP marcado com carboxifluoresceína	56
3.3 Determinação da liberação do peptídeo nos compósitos	57
3.4 Caracterização dos compósitos	59
3.4.1. Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis) nas amostras CB/Fmoc-Gly	59
3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)	60
3.4.2.1 Membrana de celulose bacteriana.....	60
3.4.2.2 Compósito celulose bacteriana – colágeno (CB-COL)	60
3.4.2.2 Compósito celulose bacteriana – hidroxiapatita (CB-HA)	62
3.4.2.3 Compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL	64
3.4.3 Difratomia de raios-X (DRX)	71
3.4.3.1 Compósito celulose bacteriana – COL (CB-COL).....	71
3.4.3.2 Compósito celulose bacteriana – hidroxiapatita (CB-HA)	72
3.4.3.3 Compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL	73
3.4.4 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	74
3.4.4.1 Compósito celulose bacteriana – COL (CB-COL).....	74
3.4.4.2 Compósito celulose bacteriana – hidroxiapatita (CB-HA)	76
3.4.4.3 Compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL	77
3.4.5 Espectroscopia de espalhamento Raman	79
3.4.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido dos núcleos ³¹ P das amostras CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL	82
3.4.7 Análise termogravimétrica (TG) das amostras CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL	87
3.4.8 Taxa de intumescimento e Ângulo de contato	97
3.4.9 Ensaio mecânico de resistência à tração	104
3.5 Análises <i>in vitro</i>	108
3.5.1 Morfologia celular	108
3.5.2 Proliferação e viabilidade celular	115
3.5.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)	117
3.5.3.1 Medida do conteúdo de proteína total.....	117
3.5.3.2 Medida da atividade da ALP.....	118
3.5.4 Formação de matriz mineralizada	121
3.5 Análises <i>in vivo</i>	129
3.6.1 Análises radiográfica e histológica	129
Grupo I: Controle	129
Grupo II: Membranas de CB e CB OGP [10-14]	137
Grupo III: Membranas de CB-HA e CB-HA OGP [10-14]	146
Grupo IV: Membranas de CB-COL e CB-COL OGP [10-14].....	156
Grupo V: Membranas de (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP [10-14].....	166
Grupo VI: Membranas de (CB-HA)-COL e (CB-HA)-COL OGP [10-14]	177
5 CONCLUSÕES	194
6 PERSPECTIVAS	196
REFERÊNCIAS	197
ANEXOS	214

1 INTRODUÇÃO

O aumento de expectativa de vida, bem como o interesse na qualidade de vida, atualmente estimula o desenvolvimento de novos biomateriais para diversas aplicações clínicas.

A engenharia tecidual recentemente conquistou grandes avanços no desenvolvimento de biomateriais tridimensionais para reconstrução de tecido ósseo, dentre eles, vários materiais aloplásticos, tais como: biocerâmicas [β -trifosfato de cálcio (β -TCP), fosfato de cálcio bifásico (DCP) e hidroxiapatita (HA)], biovidros, polímeros (celulose bacteriana, colágeno, ácido (polilático-co-glicólico), polietileno poroso de alta densidade) e osso bovino poroso desmineralizado e liofilizado, bem como, a associação entre esses biomateriais (HENCH, 1998; OZTURK et al., 2005; BURSTEIN et al., 2006; DUSKOVA et al., 2006; KLEIN; GLATZER, 2006; CZAJA, et al., 2007).

Os enxertos autólogos ósseos (autoenxertos ósseos) ainda são considerados “padrão ouro” para reconstrução de defeitos ósseos relacionados a enfermidades congênitas, traumas ou lesões oncológicas, devido a suas propriedades biológicas favoráveis, pois por si só possuem as três propriedades primordiais, osteocondução, osteogênese e osteoindução; além disso, este tipo de enxerto apresenta ausência de rejeição imunológica. Contudo, a utilização de autoenxertos resulta em algumas desvantagens como: 1. quantidade e áreas doadoras limitada; 2. o potencial de morbidade da área doadora; 3. considerável reabsorção; 4. viabilidade limitada por causa da escassez de vascularização em caso de enxertos não vascularizados; 5. tempo cirúrgico adicional (BURCHARDT, 1983). Algumas desvantagens dos autoenxertos, aloenxertos e/ou xenoenxertos que limitam o emprego destes materiais em alguns protocolos cirúrgicos específicos levaram a engenharia tecidual e a biotecnologia a desenvolverem novos materiais e métodos promissores para reparação dos tecidos, principalmente para tecido ósseo. Com isso, os substitutos ósseos ou de tecido mole, sintéticos e/ou processados biotecnologicamente tornaram-se materiais potenciais para aplicações clínicas nas diversas áreas da saúde.

Um biomaterial ideal deve apresentar variedade de formas e tamanhos, com suficiente resistência para ser usado em locais onde há incidência de carga, e também ser biocompatível, biodegradável e ser substituído pela neoformação

tecidual, e quando implantado em tecido ósseo deverá ser principalmente osteocondutor.

Recentemente, as membranas reabsorvíveis ganham espaço para aplicação em regeneração óssea guiada (ROG) com o desenvolvimento de novos biomateriais, pois os resultados mostram que não há diferença significativa na neoformação óssea com emprego de membranas não reabsorvíveis e de reabsorvíveis quando usadas em ROG. A regeneração óssea guiada controla a estimulação de neoformação óssea em defeitos ósseos pelos processos de osteogênese, osteocondução ou osteoindução, restabelecendo as características estruturais e funcionais. Os quatro princípios que regem a ROG são: 1. restrição de infiltrado de tecido conjuntivo no local do defeito; 2. criação e manutenção do espaço; 3. proteção fundamental do coágulo; 4. estabilização da ferida.

Nos anos 90, as membranas de escolha para ROG eram as não reabsorvíveis compostas de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE) (BOSCH et al., 1995; KAY, et al., 1997), devido a suas características biológicas inertes, e, por apresentar resultados efetivos e previsíveis como barreira mecânica. Porém este material apresenta desvantagens, como a necessidade de fixação com parafusos, bem como, de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, além do seu alto custo. Dentre os materiais mais usados atualmente como membranas reabsorvíveis pode-se citar o colágeno (principalmente do tipo I), o poli (ácido láctico), o poli (ácido láctico-co- ácido glicólico), a poliglactina 910 e o polietilenoglicol (KAY et al., 1997; GOISSIS et al., 1999; TAKAKUDA et al., 2003; TAGUCHI et al., 2005; DUSKOVA et al., 2006; SONG et al., 2007; RODRIGUES et al., 2010; FORTI et al., 2011). Estas membranas ainda podem estar associadas à biocerâmicas ou a fatores de crescimento apresentando propriedades osteoindutoras.

Apesar dos avanços conquistados no desenvolvimento de novos biomateriais para engenharia tecidual, ainda busca-se um compósito orgânico-inorgânico preparado com polímeros orgânicos e cerâmicos bioativos, com características e propriedades mecânicas similares ao autoenxerto ósseo. Com base nestas necessidades que se objetivou neste trabalho, desenvolver membranas reabsorvíveis para ROG, de baixo custo, baseado em celulose bacteriana, colágeno tipo I, hidroxiapatita e fator de crescimento, com a capacidade de promover a regeneração do tecido ósseo num menor tempo, não necessitando de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção.

1.1 Compósitos

Uma definição comumente empregada para materiais compósitos é descrita como, aqueles que possuem pelo menos dois constituintes, ou duas fases com propriedades físico-químicas distintas e que são separados por uma interface. O intuito de produzir compósitos tem por finalidade combinar diferentes materiais para produzir um único dispositivo com propriedades superiores às dos componentes unitários. (ORÉFICE et al., 2006). Separadamente os constituintes do compósito mantêm suas características, porém quando misturados eles formam um composto com propriedades próprias, inerentes à nova composição. Dois exemplos de compósitos fibrosos naturais relacionados a este trabalho são: 1. a madeira, a qual é formada basicamente por fibras de celulose e lignina (resina amorfa que une as fibras de celulose); 2. o tecido ósseo, o qual é formado por uma fase inorgânica, basicamente de carbonato-apatita, depositada numa matriz orgânica, cuja composição é em torno de 95% de colágeno tipo I. Dessa forma, os compósitos são formados pela matriz, que é a fase contínua (“rede de fibras”) e envolve a outra fase, a fase dispersa. Dentre os vários tipos compósitos, os compósitos poliméricos apresentam algumas vantagens como: baixo peso, resistência à corrosão e a temperaturas elevadas e boas propriedades mecânicas, quando comparados aos materiais convencionais de engenharia (CONTANT et al., 2004).

No entanto, o alvo atual da engenharia tecidual é o desenvolvimento de compósitos poliméricos, livres de metal, com propriedades mecânicas comparáveis aos tecidos vivos, principalmente ao tecido ósseo, para substituição ou reconstrução parcial ou total do órgão ou tecido a ser reparado. Compósitos formados a partir da combinação de polímeros naturais (colágeno, celulose, polihidroxibutirato) ou sintéticos [poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), poli (ácido láctico), poli(ϵ -caprolactona)] associados às biocerâmicas têm se destacado na comunidade acadêmica (ZHANG et al., 2004; CHEN; WU, 2005; WIEGAND et al., 2006; HONDA et al., 2007; SONG et al., 2007; YU et al., 2008; HUTCHENS et al., 2009; CARDOSO et al., 2010) por serem biocompatíveis, excelentes osteocondutores, bioativos e com propriedades mecânicas satisfatórias, além de serem reabsorvíveis, portanto materiais em potencial para serem aplicados em terapias da medicina regenerativa.

1.2 Estrutura e propriedades do tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado em constante processo de remodelamento, e possui uma estrutura tridimensional constituída principalmente de cristais inorgânicos de apatita e fibras colágenas. Como descrito acima, o osso é um composto orgânico-inorgânico nanoestruturado contendo três níveis de estrutura, exibindo propriedades mecânicas, como alta resistência à fratura e flexibilidade. Os três níveis estruturais compreendem o nanométrico (proteínas colágenas e não colágenas e cristais de HA), o micrométrico (lamelas ósseas, canais de Havers ou ósteons, e as células) e o macrométrico (osso cortical e osso trabecular) (LIU; WEBSTER, 2006).

A macroestrutura do tecido ósseo consiste, portanto, em osso cortical (compacto), osso trabecular (esponjoso) e medula óssea, bem como, os vasos sanguíneos. No osso cortical, a matriz colágena está organizada em forma de lamelas intersticiais, paralelas e concêntricas, sendo que as intersticiais estão presentes em toda matriz óssea mineralizada entre as lamelas concêntricas e paralelas; as paralelas encontram-se principalmente nas regiões das corticais ósseas, interna e externa, e as concêntricas, geralmente em torno de vasos sanguíneos e/ou terminações nervosas constituindo os canais de Havers ou ósteons, que estão interconectados por canais de Volkmann, os quais se comunicam com a medula óssea. No osso trabecular, as fibras colágenas se orientam de forma desorganizada na matriz óssea, e este osso se organiza em formas de trabéculas ósseas circundadas por espaços medulares constituídos principalmente de células mesenquimais e hematopoiéticas, vasos sanguíneos e tecido adiposo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O osso cortical é encontrado nas diáfises dos ossos longos e na superfície externa dos ossos planos, e o osso trabecular é encontrado nas extremidades e cavidades medulares de ossos longos, bem como nas vértebras e no centro de ossos planos. No entanto, as diferenças entre esses dois tipos de ossos, cortical e trabecular, não são somente estruturais, mas também funcionais. Enquanto o osso cortical possui a função de proteção dos tecidos e órgãos vitais, devido a resistência a incidência de cargas, o osso trabecular, menos resistente, atua nas funções metabólicas. (MARX; GARG, 1998).

Os constituintes do tecido ósseo estão em equilíbrio dinâmico, ou seja, as células mortas estão sempre sendo repostas e adicionalmente, a fase mineral e o colágeno estão em processo constante de reabsorção e deposição durante a vida adulta saudável, permitindo a manutenção da forma e volume dos ossos (AMADEI et al., 2006). A fase mineral do osso compreende 70% de seu peso e consiste basicamente de cristais de carbonato-apatita. O osso representa o maior reservatório de cálcio do corpo humano. Além das funções de sustentação e proteção de tecido vital, ele desempenha também função metabólica realizando trocas de minerais com o sangue. Além disso, serve como um filtro para uma variedade de íons gerados no sangue, os quais podem ser preliminarmente aderidos à matriz orgânica iniciando o processo de mineralização, ou em uma fase posterior, serem incorporados à rede dos cristais de apatita (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Durante o processo de neoformação óssea, na ossificação intramembranosa, as células mesenquimais presentes na medula óssea se diferenciam em osteoblastos e iniciam a síntese de matriz osteóide, formando assim o osso primário ou imaturo. As fibras de colágeno são depositadas randomicamente formando uma estrutura entrelaçada não mineralizada. Conforme ocorrem as trocas iônicas entre os tecidos e o fluído sanguíneo, a matriz vai sendo mineralizada e este osso vai sendo reabsorvido e sendo substituído por osso secundário ou lamelar, numa fase denominada de osso composto. As células envolvidas no processo de osteogênese, manutenção e remodelação óssea são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoblastos são células completamente diferenciadas responsáveis pela osteogênese, cuja função é sintetizar os componentes orgânicos da matriz óssea, como proteínas colágenas (colágeno do tipo I e V) e proteínas não colágenas (sialoproteína óssea, fibronectina, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, proteoglicanos, fosfatase alcalina, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), entre outras) (ANSELME, 2000). Desta forma regula a expressão gênica dessas proteínas para promover um equilíbrio dinâmico das trocas iônicas, principalmente de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , iniciando a nucleação de cristais de apatita a matriz óssea.

Os osteoblastos estão localizados na superfície dos ossos em formação, constituindo uma espécie de epitélio. A atividade de síntese pode ser medida pela morfologia destas células: quando empenhadas na produção de matriz, elas têm citoplasma basofílico e um formato cuboidal a colunar, ao passo que quando a

atividade de síntese diminui, elas se tornam planas e os basófilos citoplasmáticos diminuem. A matriz neoformada na superfície de ossos mais velhos é chamada osteóide e se localiza entre a superfície do osso mais velho e a camada de osteoblastos; esta matriz não é calcificada e a aposição de osso é completada quando os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} são depositados nesta matriz neoformada. Quando a matriz osteóide é secretada, alguns desses osteoblastos são aprisionados e estas células passam a ser denominadas osteócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; AMADEI et al., 2006). Portanto, os osteócitos são células maduras, inclusas na matriz e estão distribuídos randomicamente. A cavidade onde eles se encontram é chamada de lacuna e o espaço ocupado pelas extensões citoplasmáticas é chamado canalículo. Essas lacunas estão conectadas umas às outras, bem como aos espaços vasculares por canalículos onde passam fluídos e nutrientes essenciais para manutenção do tecido ósseo. Essas células vivas correspondem por 15% do peso do osso e são responsáveis pelo processo incessante de remodelamento. Os osteócitos secretam fatores de crescimento que facilitam o recrutamento de pré-osteoblastos para a remodelação do esqueleto (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A remodelação óssea se dá pela ação simultânea da síntese e da reabsorção óssea e ocorre pela ação das células denominadas osteoclastos, que são células gigantes multinucleadas, geralmente encontradas em cavidades na superfície do osso; estas células agem como destruidoras do osso e podem ser vistas em pequenos grupos ou isoladamente em superfícies que estão sendo erodidas ou reabsorvidas (AMADEI et al., 2006).

Acredita-se que a diferenciação de células pré-osteoblásticas em osteoclastos está relacionada à expressão da RANK-L (*receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand*) e M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), sendo que a RANK-L é imprescindível para maturação dos macrófagos. O paratormônio age em osteoblastos e em células da medula óssea, produzindo RANK-L, e a interleucina-1 estimula a síntese de M-CSF por células da medula óssea favorecendo a diferenciação dos osteoclastos (TEITELBAUM, 2000; AMADEI et al., 2006; BIELBY et al., 2007).

1.3 Fator de Crescimento

A reparação óssea é um processo fisiológico complexo envolvendo muitos fatores regulatórios locais e sistêmicos, como fatores de crescimento e diferenciação celular, hormônios, citocinas, e proteínas da matriz extracelular. Essas moléculas interagem com células pré-osteoblásticas desencadeando o processo de formação tecidual. Porém os estágios de migração, proliferação, quimiotaxia, diferenciação celular e síntese de proteína extracelular podem ser afetados, já que cada uma dessas etapas é dependente das condições no local da injúria, como nível de fatores de crescimento, hormônios, nutrientes e pH (TSIRIDIS et al., 2007).

A maioria dos fatores de crescimento atua como mediadores locais desempenhando sua função a concentrações muito baixas nos líquidos corporais, da ordem dos picogramas. A função dos fatores de crescimento é regulada por diferentes mecanismos que controlam a ativação genética. Após o estímulo inicial fornecido pelas plaquetas frente a uma injúria, o próprio tecido é capaz de sintetizar algumas das substâncias necessárias para dar continuidade ao processo de reparo, como citocinas pró-inflamatória, fatores de crescimento da superfamília TGF- β (*transforming growth factor- β*), entre outros fatores, bem como, fatores angiogênicos (TSIRIDIS et al., 2007).

Células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteoclastos estão sujeitas à ação de fatores de crescimento. A função dos fatores de crescimento não é somente de estimular a proliferação de células mediante a regulação do ciclo celular, iniciando a mitose, mas também de manter a sobrevivência celular, além de estimular a migração, a diferenciação e também a apoptose celular. Os osteoblastos se proliferam mediados por fatores de crescimento liberados por si próprios e pelo osso durante o processo de reabsorção; dentre os mais importantes estão o TGF- β e os fatores liberados pela matriz óssea, como o fator de crescimento similar a insulina (IGF-1 e 2), o fator de crescimento fibroblástico (FGF-2) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (AMADEI et al., 2006; TSIRIDIS et al., 2007), os quais são mitogênicos potentes (ASSOIAN et al., 1983; BIELBY et al., 2007). Além disso, outros fatores são secretados durante o processo de reparação, tais como os morfogenéticos (BMPs) e fatores angiogênicos (VEGF- *vascular endothelial growth factor*) (BIELBY et al., 2007). O TGF- β desempenha papel no desenvolvimento

embrionário, diferenciação celular, secreção de hormônio e função imunológica, e atua sinergicamente com o TGF- α na indução da transformação fenotípica (ASSOIAN et al., 1983). Dentro da superfamília dos TGF- β , estão incluídos TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 e os outros fatores importantes, como BMPs 1-8, os quais promovem vários estágios de ossificação intramembranosa e endocondral durante o processo de reparação óssea (CHO et al., 2002).

Dentre esses vários fatores de crescimento, a BMP-2 ganhou atenção da comunidade científica na sua utilização em combinação com diversos carreadores para promoção de regeneração óssea, principalmente na engenharia tecidual. Na literatura, a busca incessante por desenvolver um biomaterial com excelentes propriedades osteoindutoras, como o osso autógeno, para cirurgias reconstrutivas, recentemente mostrou que alguns polímeros e biocerâmicas podem ser ótimos carreadores para as BMPs, principalmente o colágeno (PANG et al., 2004; EPPLEY et al., 2005; JUNG et al., 2006; SINGH et al., 2006).

O conceito de osteoindução foi primeiro descrito por Urist em 1965 (URIST, 1965) quando observou a neoformação óssea no interior de matrizes ósseas desmineralizadas. Desde então, estas proteínas tem sido descritas como fatores responsáveis pela neoformação óssea (EPPLEY et al., 2005; VEILLETTE; MCKEE, 2007), pois por meio de quimiotaxia, as BMPs atraem células mesenquimais para o local da formação óssea e induz a conversão destas células em uma linhagem pré-osteoblásticas. As BMP-2, 6 e 9 são descritas como importantes para o início do processo de diferenciação das células mesenquimais em pré-osteoblastos, enquanto as BMP-4 e 7 agem preferencialmente para promover a diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos (CHEN et al., 2003). Estudos clínicos utilizando rhBMP-2 empregando colágeno como carreador para protocolo cirúrgico de coluna vertebral apresentaram resultados similares ou superior comparado com autoenxertos (BODEN et al., 2000; BODEN et al., 2002; SINGH et al., 2006; GLASSMAN et al., 2008). Contudo, a relação custo-eficácia das BMPs é questionável, devido à grande quantidade necessária (12 mg; 1,5 mg.mL⁻¹, dose terapêutica do INFUSE) para se obter uma regeneração óssea eficaz em comparação às técnicas cirúrgicas convencionais (EPSTEIN, 2011).

Nos últimos anos, a tendência tem sido o emprego de peptídeos sintéticos, pela facilidade de reconhecimento e ligação aos sítios específicos das proteínas da matriz extracelular, aumentando a interação célula-material, e por não promoverem

reação imunogênica. Neste contexto, a sequência de aminoácidos específica, Arg-Gly-Asp (RGD), das proteínas da matriz extracelular como a fibronectina e a osteopontina, é reconhecida pelos receptores transmembranais (integrinas) (OLIVIER et al., 2004; KIM et al., 2008), e promove uma melhor adesão, e conseqüentemente uma maior proliferação de células osteoblásticas. Esta sequência RGD tem sido bastante explorada para a funcionalização de biomateriais com intuito de estimular o processo inicial de adesão celular (HU et al., 2003; JUNG et al., 2005; FINK et al., 2011).

Desta forma, neste presente trabalho, sequências peptídicas reguladoras de fator de crescimento ósseo, OGP e OGP [10-14], foram escolhidas para conferir aos compósitos desenvolvidos propriedade de osteoindução.

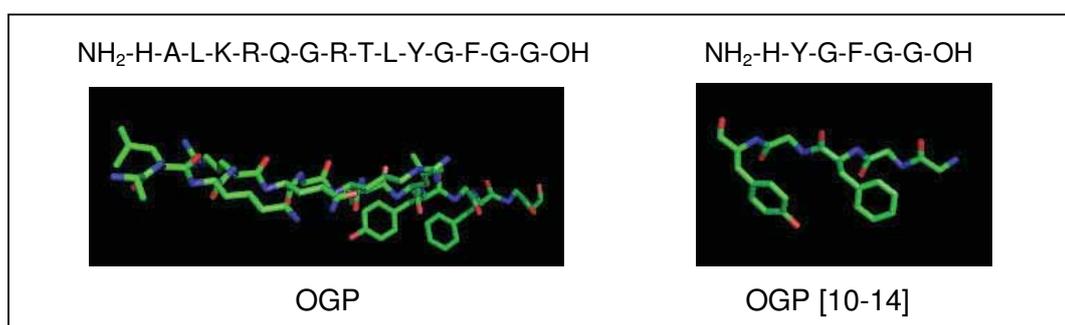
1.3.1 *Peptídeos de crescimento osteogênico – (OGP e OGP [10-14])*

O peptídeo de crescimento osteogênico (OGP – *osteogenic growth peptide*) foi descoberto no início dos anos 90, e trata-se de um peptídeo de ocorrência natural cuja estrutura primária (Figura 1) é idêntica à sequência C-terminal da histona H4. Está presente fisiologicamente no soro humano, de ratos, e aparentemente de outras espécies de mamíferos em concentração micromolar (BAB et al., 1992), ou seja, esta conservação evolucionária indica a importância biológica do OGP (GREENBERG et al., 1995). A maioria (cerca de 90%) do OGP sérico encontra-se especialmente na forma de um complexo de proteína de ligação OGPBP-OGP (OGPBP: OGP *binding protein*) (BAB et al., 1992). O OGP pode se ligar não covalentemente a α_2 -macroglobulina (α_2 -M) do soro, em ambas as formas, nativa e ativada. A forma ativada gera ligações covalentes com as proteinases, em um processo que envolve uma mudança conformacional, tornando a molécula mais compacta, desta forma, diminui a disponibilidade do OGP para o sistema. A forma nativa aumenta imediatamente a disponibilidade do OGP para o sistema circulatório (GAVISH et al., 1997). Além disso, α_2 -M parece ser a principal, se não o único complexo OGPBP plasmático.

A concentração do OGP sérico é aumentada transitoriamente durante uma injúria local ao tecido ósseo, medula óssea ou a reações osteogênicas sistêmicas, e também quando baixas doses de OGP exógeno, requerido para a estimulação da formação óssea, sugerem uma função auto-regulativa para os complexos OGPBPs

(BAB et al., 1992; GUREVITCH et al., 1996; GREENBERG et al., 1997). Bab et al. (1999) verificaram que o OGP endógeno é um produto da clivagem proteolítica do PreOGP, o qual é traduzido do mRNA da H4(85-103). Este mecanismo biossintético, aparentemente está presente em muitas, se não em todas, as células, podendo desempenhar uma função crucial no circuito de *feedback* positivo do OGP, controlando a proliferação e diferenciação celular. Ainda, a clivagem proteolítica do OGP pode gerar o pentapeptídeo OGP [10-14].

Figura 1 – Estrutura primária dos peptídeos OGP e OGP [10-14].



A função do OGP e de seus derivados, como o pentapeptídeo OGP [10-14] (Figura 1) é de estimular a osteogênese e a hematopoiese. Age na proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras e de células progenitoras hematopoiéticas. A regeneração hematopoiética está relacionada ao um efeito secundário do OGP (CHEN et al., 2000; BAB; CHOREV, 2002; HUI et al., 2007).

In vitro os peptídeos, OGP e OGP [10-14], possuem excelente potencial mitogênico para células de linhagem osteoblástica e fibroblásticas (BAB et al., 1992; GREENBERG et al., 1993; BAB; EINHORN, 1994), favorecem o aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e da mineralização da matriz óssea (ROBINSON et al., 1995; BAB; CHOREV, 2002); além disso, o OGP mostrou-se ter uma melhor atividade da ALP quando comparado aos hormônios de crescimento e ao FGF (ROBINSON et al., 1995). Ainda, tanto o OGP quanto o OGP [10-14] regulam diretamente a diferenciação de células mesenquimais de medula em osteoblastos favorecendo assim a neoformação óssea (CHEN et al., 2007; VANELLA et al., 2010).

Chen et al. (2000) verificaram que a preservação da sequência C-terminal, principalmente das cadeias laterais da Tyr e Phe, bem como, os resíduos de Gly são

importantes para ser ter uma ótima bioatividade, além disso, esses autores observaram que o OGP [10-14] indicou uma melhor atividade osteogênica em reverter a perda óssea trabecular em camundongos, comparado ao OGP. Outros estudos *in vivo* demonstraram que a administração diária via sistêmica do OGP estimulou a ossificação endocondral em locais de fratura tanto em ratos quanto em coelhos, reduzindo o tempo de reparação óssea (SUN; ASHHURST, 1998; BRAGER et al., 2000; GABET et al., 2004), além disso, aumentou a densidade trabecular óssea e estimulou a modelação óssea de osso imaturo para osso lamelar (BAB et al., 1992; GREENBERG et al., 1995).

In vivo, o OGP regula a expressão dos fatores de crescimento de transformação TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, fator de crescimento fibroblástico FGF-2, fator de crescimento insulínico IGF-1 e do colágeno tipo I (BRAGER et al., 2000). Além disso, o OGP favorece a reparação da medula óssea recém transplantada ou irradiada, com aumento considerável das células hematopoiéticas (GUREVITCH et al., 1996), e ainda com a vantagem de ser prontamente sintetizado, pode substituir ou suplementar a terapia convencional, a qual é muito cara. OGP [10-14] quando foi utilizado por via sistêmica em ratos com medula óssea danificada por tratamento quimioterápico, apresentou ser eficaz na regulação hematopoiética num estágio inicial do sistema de regulação dos fatores de crescimento hematopoiéticos (CHEN et al., 2000). Defeitos ósseos tratados com scaffolds de PLGA com OGP sintético adsorvido foram reparados em um menor tempo em relação aos animais que receberam o OGP por via sistêmica; este estudo apontou um importante resultado na via de administração destes peptídeos, revelando um efeito terapêutico mais eficaz quando aplicado localmente (SHUQIANG et al., 2008).

Desta forma, estes peptídeos apresentam um grande potencial para serem utilizados na medicina regenerativa, bem como, empregando-os na funcionalização de biomateriais.

1.4 Celulose Bacteriana (CB)

A celulose é o biopolímero mais abundante no mundo, com uma produção anual de mais de 50 bilhões de toneladas (YU et al., 2008), a maior parte da produção ocorre a partir das paredes celulares das plantas, entretanto, pode ser obtida química e enzimaticamente por ação bacteriana. A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de β -D-glicopiranosose unidas em cadeias longas, não ramificadas, por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). Este polímero pode ser dividido em duas formas nativas: celulose pura, obtida diretamente de seu estado natural, por exemplo, do algodão, da celulose bacteriana, da celulose produzida por algumas algas; e a celulose complexa, que inclui a maior parte da celulose presente na natureza, componente fundamental da parede celular de plantas superiores, que contém impurezas como lignina, pectina e hemicelulose (ATALLA; VANDERHART, 1999).

Atualmente acredita-se que a CB, um dos biopolímeros mais promissores, possa se tornar um dos produtos biotecnológicos mais importantes tanto para área da saúde quanto para o setor industrial, pois pode ser obtida em larga escala com baixo custo de fabricação a partir de rotas biossintéticas de bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*. Esta celulose é quimicamente pura, livre de componentes biogênicos como ligninas, hemiceluloses e outros polissacarídeos encontrados embebidos na celulose vegetal, fator que diminui o custo final da produção.

Gluconacetobacter xylinus (*Acetobacter xylinum*) é uma bactéria gram-negativa quimioheterotrófica, que secreta celulose como camada de exopolissacarídeos; esta celulose extracelular está disposta em forma de fitas compostas de microfibrilas flutuantes organizadas de forma linear ao longo do eixo axial da bactéria (BROWN JR et al., 1976). Vigorosos tratamentos com bases fortes em altas temperaturas permitem a remoção das células bacterianas embebidas na trama e é possível conseguir um biomaterial não pirogênico, atóxico e biocompatível (CZAJA et al., 2006).

A membrana formada em condições de cultura estática resulta numa estrutura tridimensional constituindo em um sistema ultrafino de nanofibras (10-50 nm), cujas fibras são orientadas uniaxialmente, o que não ocorre em celulose vegetal, cuja

dimensão das fibras é micrométrica. Esta estrutura 3-D da CB resulta numa celulose altamente cristalina (60-80%) quando comparado à celulose vegetal (~40%) e similar à cristalinidade do algodão (~70%) (YU et al., 2008), além disso, apresenta uma maior resistência mecânica (CZAJA et al., 2004). As ligações de hidrogênio inter e intra-molecular é que mantêm as cadeias de celulose juntas conferindo essas propriedades, além de baixa solubilidade e alta retenção de água.

A síntese da celulose pelo *Gluconacetobacter xylinus* é catalisada por quatro enzimas:

- glicoquinase, responsável pela fosforilação da glicose (C₆H₁₀O₅)_n;
- fosfoglicomutase, a qual catalisa a isomerização da glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato;
- glicose-1-fosfato uridiltransferase, que sintetiza UDP-glicose (UDPG);
- celulose sintase, a qual produz celulose a partir da UDP-glicose.

Na ausência ou carência da enzima glicose-1-fosfato uridiltransferase não ocorre à formação das microfibrilas de celulose (VALLA et al., 1989).

Diferentemente de outros tipos de membrana sintética, a membrana de CB exibe uma alta resistência à corrosão química, é bioabsorvível, biocompatível, porosa, e, ainda possui boa resistência mecânica (GEYER et al., 1994), propriedades únicas que a tornam um biopolímero com grande potencial a ser explorado pela biotecnologia e outras áreas da ciência biomédica. Soma-se a isso, o seu potencial de uso em outros produtos comerciais, no campo alimentício (aditivo de baixo valor calórico, estabilizante, modificador de textura), nos setores farmacológicos (curativo temporário, excipiente, etc), na indústria de opto-eletrônicos (papel eletrônico), entre outras (KLEMM et al., 2005; BODHIBUKKANA et al., 2006; PERCORARO et al., 2008; EICHHORN et al., 2010).

No Brasil, nas décadas de 80 e 90, o curativo de CB (Biofill®) foi usado como instrumento na reconstrução e substituição temporária da pele, em queimaduras e outras situações como úlceras crônicas e enxertos (REBELLO et al., 1987; FONTANA et al., 1990; MAYALL et al., 1990; WOUK et al., 1998; ANDRADE et al., 2010), apresentando características importantes, sendo biocompatível, inerte e seletivamente permeável, permitindo assim, trocas gasosas. Atuou também como uma barreira contra os microorganismos, proporcionando uma recuperação mais rápida e menos dolorosa ao paciente, reduzindo as cicatrizes provocadas por esses tipos de ferimentos. De acordo com FARAH (1990), a membrana de CB aplicada

sobre a região lesionada com perda de tecido epitelial agiu como uma nova pele, eliminando a sintomatologia dolorosa (pela isolação de terminações nervosas) e acentuando a absorção dos exudatos da ferida. Em odontologia, a membrana de CB foi empregada em regeneração óssea guiada em defeitos periodontais ou peri-implantares (NOVAES et al., 1990; NOVAES; NOVAES, 1993; NOVAES; NOVAES 1995; DOS ANJOS et al., 1998; SIMONPIETRI et al., 2000). A CB funcionou como uma barreira mecânica impedindo que células fibroblásticas e tecido conjuntivo fibroso invadissem o local dos defeitos ósseos, promovendo uma neoformação óssea efetiva no local, além de ser um tratamento de baixo custo.

Mundialmente, a CB também vem sendo extensivamente alvo de estudos tanto no desenvolvimento de novos materiais quanto nos estudos *in vitro* e *in vivo*, devido a suas excelentes propriedades físico-químicas e biológicas. KLEMM et al. (2001) utilizaram membranas tubulares de CB *in vivo* (BASYC[®]) em regeneração de artérias em microcirurgias, as quais foram efetivas servindo como um ótimo *scaffold* para microcirurgias vasculares. WIPPERMANN et al. (2009) também relataram que enxertos tubulares de CB em artéria carótida de porcos foram eficazes. Estudos *in vivo* em subcutâneo de ratos verificaram que a CB foi biocompatível, podendo ser usada como *scaffold* para produtos de engenharia tecidual (HELENIUS et al., 2006; MENDES et al., 2009); e em dorso nasal de coelho, a membrana de CB também se apresentou biocompatível, sendo considerada um bom material para uso na elevação do dorso nasal (AMORIM et al., 2009). A aplicação da membrana de CB como substituto de dura-máter apresentou ser eficaz em cirurgias realizadas em cães (MELLO et al., 1997). Mello et al. (2001) utilizaram a membrana de CB em regeneração do nervo periférico (nervo isquiático) e observaram o realinhamento e crescimento axonal após a recolocação do fragmento do nervo seccionado como enxerto. Além disso, a CB mostrou-se ser um *scaffold* com potencial para substituição de menisco (BODIN et al., 2007) e para cartilagem articular (GASPAR et al., 2011). Svensson et al. (2005) relataram que a CB promoveu uma melhor proliferação de condrócitos comparado ao colágeno tipo II, sugerindo que a CB pode ser um excelente *scaffold* para engenharia tecidual para cartilagem.

Fang et al. (2009) realizaram estudo *in vitro* com células mesenquimais derivadas da medula óssea de humanos (hBMSC) em compósito a base de CB e hidroxiapatita (HA), onde verificaram que este compósito não foi citotóxico e promoveu proliferação e diferenciação celular. Outros estudos *in vitro* relacionados a

compósitos CB-HA revelaram que os mesmos têm um ótimo potencial para aplicação em regeneração óssea (GRANDE et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2011). Portanto, compósitos de CB-HA poderão ser ótimos candidatos para regeneração óssea, devido a HA conferir a celulose propriedades bioativas e de osteocondução.

Basicamente, duas metodologias principais têm sido propostas para preparação de compósitos CB-HA. Uma inclui um processo biomimético, no qual a membrana de CB é submetida a um pré tratamento com soluções de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou CaCl_2 , e em seguida estas membranas são imersas em solução de SBF (*simulated body fluid*) para induzir a precipitação de HA, assim ocorrendo a formação de cristais de HA principalmente na superfície das membranas (BODIN et al., 2006; HONG et al., 2006; CROMME et al., 2007; NGE; SUGIYAMA, 2007; WAN et al., 2007; SHI et al., 2009; GAO et al., 2010; WAN et al., 2011). A outra metodologia consiste em uma incubação prévia das membranas de CB em solução de CaCl_2 , seguido posteriormente em imersão em solução de fosfato de sódio (HUTCHENS et al., 2006; HUTCHENS et al., 2009).

Outros compósitos a base de CB com potencial aplicação em medicina regenerativa têm sido desenvolvidos tais como compósitos de CB com colágeno (WIEGAND et al., 2006; LUO et al., 2008; ZHIJIANG; GUANG, 2011) e compósitos de CB, gelatina e HA (WANG et al., 2011). Compósitos de CB/colágeno promoveram maior adesão, espraiamento e proliferação celular em relação a CB pura em cultura de células fibroblásticas (3T3) (ZHIJIANG; GUANG, 2011) e ainda foram capazes de reduzir significativamente a quantidade de proteases (enzimas proteolíticas) e interleucinas além de reduzirem consideravelmente a atividade dos radicais livres (oxigênio reativo – ROS) (WIEGAND et al., 2006). Wang et al. (2011) demonstraram que os compósitos de CB/gelatina/HA exibiram excelente compatibilidade e proliferação celular para células mesenquimais de medula óssea. Desta forma, estes compósitos, CB/colágeno e CB/gelatina/HA poderão favorecer a reparação tecidual tanto de tecidos moles quanto de tecido ósseo.

De acordo com os resultados demonstrados na literatura, a CB, além de suas excelentes propriedades já descritas, tem servido também como uma eficiente matriz para o desenvolvimento de novos compósitos para aplicação na regeneração e engenharia tecidual.

1.5 Colágeno

O colágeno tipo I é a proteína animal mais abundante constituindo a matriz do osso, da pele, e de outros tecidos. As principais fontes de colágeno são a derme ou os tendões de origem animal tanto bovina quanto suína. A estrutura de tripla hélice do colágeno consiste da repetição da sequência de 03 resíduos de aminoácidos: Gly-Pro-X, podendo ser também hidroxiprolina ou hidroxilisina em substituição à prolina, onde o X pode ser qualquer resíduo de aminoácido. Devido a sua abundância nos tendões, o colágeno tipo I foi o primeiro a ser caracterizado. Suas fibrilas possuem enorme resistência à tensão. Estas fibrilas medem aproximadamente 50 nm de diâmetro e vários micrometros de comprimento, estando empacotadas lado a lado paralelamente em feixes, chamadas fibras colágenas (NELSON; COX, 2005).

A matriz de colágeno tipo I oferece um ambiente favorável para indução de diferenciação de osteoblastos *in vitro* e osteogênese *in vivo* (MIZUNO et al., 1997). O colágeno tipo III constitui as fibras reticulares dos tecidos e também é muito utilizado na confecção de membranas para ROG. As membranas de colágeno quando não mineralizadas são normalmente frágeis (baixa resistência mecânica à tração) dificultando sua manipulação clinicamente. A grande vantagem é que possuem excelente afinidade celular, estimulando a quimiotaxia de fibroblastos e agindo como suporte de migração dessas células (osteocondução). Outras vantagens são: boa adaptação a superfícies ósseas, principalmente de raízes dentárias e efeito hemostático (DUSKOVA et al., 2006). Quando embebidas na matriz óssea são gradualmente metabolizadas pela ação da enzima colagenase, ou ainda, podem ser incorporadas parcialmente na matriz óssea.

A reabsorção do colágeno ocorre paralelamente à neoformação óssea, bem como junto à neoformação de tecidos periodontais como cimento e ligamentos periodontais, com um tempo de reabsorção que varia de 06 a 08 semanas, dependendo da resistência do material, porém pode chegar a um período de 04 a 06 meses (HURZELER et al., 1998). Neste caso, o osso neoformado está protegido contra o crescimento de tecido conjuntivo dentro da região do defeito. Apesar de impedir infiltração celular, esta membrana é permeável para nutrientes, e a degradação ocorre através de reações enzimáticas sem irritar os tecidos adjacentes.

Os resultados revelam que essas membranas possuem adequada resistência mecânica (COÏC et al., 2010), além do mais, conseguem favorecer a manutenção do espaço a ser regenerado, semelhante às membranas não reabsorvíveis.

As membranas de colágeno desenvolvidas nos últimos anos têm apresentado características físico-químicas ideais para aplicação clínica (GOISSIS et al., 1998; CHARULATHA; RAJARAM, 2003; YUNOKI et al., 2004; RODRIGUES et al., 2010; FORTI et al., 2011). Segundo a literatura, a determinação da densidade da reação de reticulação (*cross-linking*) influencia diretamente as propriedades físicas das matrizes de colágeno, ou seja, o aumento da reticulação das fibrilas de colágeno proporciona o aumento da resistência à tração e à degradação enzimática e uma maior estabilidade térmica (PARK et al., 2002; CHARULATHA; RAJARAM, 2003; YUNOKI et al., 2004; RODRIGUES et al., 2010).

Um agente reticulador que tem apresentado resultados excelentes para a reticulação do colágeno é o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), na tentativa de substituir o glutaraldeído e entre outros agentes químicos convencionais empregado para reticular fibrilas de colágeno. O EDC é solúvel em água e atua como um catalisador da reação entre os grupos aminos e carboxílicos livres, em contraste do glutaraldeído e de outros agentes, pois o EDC não permanece como uma parte dessa ligação, simplesmente após a reação se torna um derivado de uréia solúvel em água, o qual possui baixa citotoxicidade. Por outro lado, os agentes convencionais participam da ligação covalente estável da reticulação, ou seja, impedindo que ocorra a depolimerização e liberação dos reagentes tóxicos residuais (PARK et al., 2002).

Estudos com membrana de colágeno em ROG têm relatado resultados satisfatórios *in vivo*, por exemplo, a taxa de regeneração óssea possui efetividade similar às membranas de e-PTFE, isto devido ao advento de membranas de colágeno com boa resistência mecânica. No passado, era difícil obter resultados tão satisfatórios e previsíveis devido à dificuldade de se produzir membranas de colágeno com estas características (CAPORALI et al., 2006; JUODZBALYS et al., 2007).

Uma excelente matriz para incorporação de colágeno é a CB, pois possui propriedades mecânicas consideráveis que podem conferir uma melhor resistência à tração para estas membranas. Segundo a literatura, os compósitos de CB-colágeno foram preparados empregando duas metodologias distintas; sendo uma delas,

adicionando colágeno tipo I ao meio de cultura das bactérias *Gluconacetobacter xylinus* (WIEGAND et al., 2006; LUO et al., 2008); e a outra foi realizada deixando as membranas de CB imersas em uma solução de colágeno para posterior liofilização (ZHIJIANG; GUANG, 2011). Nestas duas metodologias as moléculas de colágeno não se ligam covalentemente aos grupos hidroxilas da CB. No primeiro processo descrito, o colágeno foi incorporado ao meio de cultura durante a produção da celulose pelas bactérias, desta forma restringe a uniformidade em termo de quantidade de colágeno incorporado às fibras de CB; assim a homogeneidade do compósito é questionável devido ao fato de que a quantidade de colágeno é determinada pelo metabolismo da bactéria dificultando a padronização do conteúdo de colágeno no compósito. Esta padronização é primordial, uma vez que o objetivo final destes produtos é para aplicação médica. Além disso, as metodologias empregadas para purificação destes compósitos, CB-colágeno, também são questionáveis, pois a técnicas de purificação empregando solução de hidróxido de sódio (LUO et al., 2008) e autoclave, para purificação e esterilização (WIEGAND et al., 2006), desnaturam as moléculas de colágeno nos compósitos, devido ao elevado pH e elevada temperatura, respectivamente. Em adição, a esterilização por autoclave não elimina os resíduos bacterianos presentes na CB. Portanto, vendo a importância de tais compósitos na medicina atual e das deficiências apresentadas por estas metodologias empregadas, instigou-se a desenvolver compósitos alternativos mais eficientes e economicamente viáveis. Desta forma, neste trabalho os compósitos a base de CB e colágeno foram desenvolvidos com moléculas de colágeno ligadas covalente e homogeneamente à CB; além disso, a quantidade de colágeno incorporada pode ser controlada, e conseqüentemente esta incorporação pode ser padronizada.

1.6 Hidroxiapatita

Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos com razões molares Ca/P variadas, e a forma mais conhecida é a hidroxiapatita, a qual está presente nos ossos e dentes. A química estrutural da hidroxiapatita biológica é muito complexa, devido a sua composição não ser totalmente pura (não estequiométrica), frequentemente é uma hidroxiapatita deficiente em cálcio ou enriquecida com íons carbonatos, formando a carbonato-apatita (STEPHEN, 2005).

Apatita é um termo geral para minerais com fórmula química definida por: $M_{10}(Y)_6Z_2$ ¹. Este nome, **apatita**, foi dado por Werner em 1790 e tem origem da palavra grega *apato*, que significa engano, por ter sido confundida com a pedra preciosa turmalina (AOKI, 1991).

Os fosfatos de cálcio de relevância biológica são o fosfato de cálcio amorfo (ACP), a brushita (DCPD), a monetita (DCP), o fosfato octacálcio (OCP), o fosfato tricálcio (TCP), o pirofosfato de cálcio (CPP) e a hidroxiapatita (HA).

A hidroxiapatita (HA) pura, especificamente hidroxiapatita de cálcio, é um composto de composição estequiometria, $(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (Ca/P = 1,67), e cristalografia definida; pertence a um sistema hexagonal, cuja célula unitária contém uma representação completa do cristal de apatita, consistindo em grupos de Ca, PO₄ e OH empacotados juntos em um arranjo (STEPHEN, 2005). É um dos componentes do tecido ósseo e dentes e se pesquisa a muitos anos diferentes formas de sínteses e aplicações desses fosfatos de cálcio na reconstrução e regeneração de estruturas ósseas. As hidroxiapatita sintéticas, são muito utilizadas para esta finalidade por serem material bioativo e com razões molares Ca/P menor que 1,67, desta forma, mais eficazes clinicamente devido a suas similaridades com a composição do tecido ósseo e pela sua propriedade de osteocondução (REIKERAS; GUNDERSON, 2006).

As biocerâmicas têm diferentes taxas de solubilidade *in vitro*, a qual se reflete na degradação *in vivo* (DCP (monohidrogeno fosfato de cálcio) >> OCP (fosfato octacálcio) >> α-TCP (α-fosfato tricálcio) >> β-TCP (β-fosfato tricálcio) > CDHA

¹ Fórmula geral para apatitas. **M** - são tipicamente cátions metálicos divalentes como Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Pb²⁺ ou Cd²⁺; **Y** - são tipicamente um dos seguintes ânions trivalentes: PO₄³⁻, AsO₄³⁻, VO₄³⁻, CrO₄³⁻ ou MnO₄³⁻; **Z** - são geralmente F⁻, OH⁻, Br⁻ ou Cl⁻. O ânion divalente CO₃²⁻ no lugar de **Z**₂ dá origem às carbonatoapatitas.

(apatita deficiente de cálcio) \gg HA), ou seja quanto maior for a razão molar Ca/P menor a solubilidade (LE GUEHENNEC et al., 2004). Porém, a taxa de dissolução não é somente influenciada pela razão molar Ca/P. mas também pela influência de outros fatores como pH local, composição química, cristalinidade e tamanho das partículas (MISCH, 2006).

As biocerâmicas quando em contato com os tecidos e fluídos corporais iniciam-se na interface, material-tecido, reações em escala molecular do tipo dissolução de íons Ca^{2+} e PO_3^{4-} e conseqüentemente há um aumento do pH local promovido pela liberação de íons Ca^{2+} . Este aumento no pH estimula a atividade da fosfatase alcalina presente nas células osteoblásticas pré-existentes e concomitantemente, os osteoblastos ativos recém diferenciados, para sintetizarem mais fosfatase alcalina, colágeno tipo I e entre outras proteínas não colágenas. Dessa maneira, o pH da interface biomaterial-tecido se restabelece gradativamente, pois ao mesmo tempo ocorre a nucleação de cristais de fosfato de cálcio (HA) às fibras colágenas ou a transformação da biocerâmica em questão para uma fase mais estável. Estes fatos estão relacionados com a liberação de íons PO_3^{4-} das moléculas ATP, pirofosfato, entre outras, contendo fosfato dos tecidos adjacentes pela ação da ALP, além da ação dos tampões biológicos, que contém íons HCO_3^- , favorecendo a precipitação de carbonato-apatita, bem como, a diminuição de mediadores químicos no local, produzidos pelos leucócitos (STEPHEN, 2005). A Tabela 1 mostra a ocorrência dos fosfatos de cálcio em sistemas biológicos.

Vários íons presentes no meio fisiológico podem ser incorporados à rede da hidroxiapatita, dando origem não só as carbonato-apatitas, mas também as fluorapatitas, apatitas com substituições parciais de sódio, apatitas com substituições parciais de potássio, dentre outras. Os membros do grupo das apatitas são diferenciados com base nos seus ânions predominantes, isto é: fluorapatita (F), hidroxiapatita (OH) ou cloroapatita (Cl), dentre outros.

O íon carbonato, CO_3^{2-} , pode fazer substituições tanto no grupo da hidroxila OH quanto no do fosfato PO_4^{3-} , designadas como substituições do tipo A ou B, respectivamente. Nas substituições do tipo B, o aumento no teor de carbonato, associado a substituições de íons Ca^{2+} por íons Na^+ causam mudanças morfológicas nos cristais de apatita, desde acicular para bastões, sendo esta dupla substituição, necessária para que haja um balanço de cargas (LEGEROS, 1991). Os arranjos atômicos da fluorapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ e da cloroapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$, onde o

fluoreto (F) e o cloreto (Cl), respectivamente, substituem o grupo (OH) na estrutura da apatita, são similares, sendo que a fluorapatita apresenta-se como a forma mais estável dentre as apatitas.

Tabela 1 - Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos. Fase da apatita, fórmula química e razão molar Ca/P.

Fase da apatita	Fórmula	razão molar Ca/P
fosfato dicálcio (monetita) - DCP	CaHPO_4	1,0
fosfato dicálcio dihidratado (brushita) - DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
pirofosfato de cálcio - CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
fosfato octacálcio - (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
fosfato de cálcio amorfo - (ACP)	-----	1,40 - 1,50
α e β -fosfato tricálcio - (α e β -TCP)	$(\text{Ca})_9(\text{PO}_4)_6$	1,48
hidroxiapatita deficiente em cálcio - (CDHA)	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	1,50
hidroxiapatita - (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67

Fonte: Legeros (1991) e Stephen (2005).

Contudo, as biocerâmicas apresentam uma limitação em aplicação clínica, devido a baixa resistência mecânica, como por exemplo, baixo módulo de elasticidade, quando comparado a outros biomateriais metálicos e poliméricos, não permitindo que sejam usadas como forma de ancoragem para implantes submetidos a carregamentos, mas sim para o recobrimento em materiais de alta resistência mecânica (LIU; WEBSTER, 2006; CHEVALIER; GREMILLARD, 2009), ou como materiais de preenchimento ósseo. A HA sintética por ser um material biocompatível e bioativo é implantada sob a forma de blocos ou grânulos (CHO; GOSAIN, 2004; REIKERAS; GUNDERSON, 2006). O cimento de hidroxiapatita facilita o contorno ósseo além de ser clinicamente usado como uma biocerâmica reparadora de osso pela sua similaridade com a composição do osso mineral e pela capacidade de sua osteocondução. Sepulveda et al., (2002) mostraram que a hidroxiapatita apresenta alto potencial de osteocondução, sendo um importante biomaterial para a substituição óssea em ortopedia, cirurgia reconstrutiva crânio-facial, implante dento-alveolar e cirurgias orais. Kveton e Coelho (2004) realizaram uma revisão de 10 anos de experiências cirúrgicas com HA em osso temporal, onde 109 pacientes foram operados, dos quais 97% dos casos ocorreram regeneração e restabelecimento da integridade do osso temporal.

A busca e o desenvolvimento de novos materiais poliméricos bioativos tem atraído inúmeros pesquisadores para tentar solucionar os problemas de resistência mecânica destes compósitos orgânico-inorgânicos (HOLLISTER et al., 2005; LIU; WEBSTER, 2006; CHEVALIER; GREMILLARD, 2009). Compósitos a base de HA e colágeno tem apresentado bons resultados em termos de resistência mecânica e estabilidade química, portanto, um material em potencial para regeneração óssea (SONG et al., 2007; YUNOKI et al., 2007). Membranas compostas de HA/colágeno/PLGA demonstraram-se uma resistência à tração considerável para aplicação médica, além de apresentarem resultados efetivos *in vitro* com linhagem osteoblástica MC3T3-E1 (LIAO et al., 2005). *In vivo* compósitos a base de HA/colágeno/PLA favoreceram aumento da densidade óssea, neoformação trabecular e apresentou-se mais lamelar em comparação com compósito HA/PLA (WANG et al., 2008).

2 OBJETIVOS

Este trabalho objetivou desenvolver compósitos a base de CB contendo as propriedades osteocondutivas do colágeno e bioativas da HA, e ainda adsorver os peptídeos reguladores de fatores de crescimento ósseo, OGP e OGP [10-14] a estes compósitos para proporcionar lhes propriedade de osteoindução. Para tanto, os objetivos específicos foram:

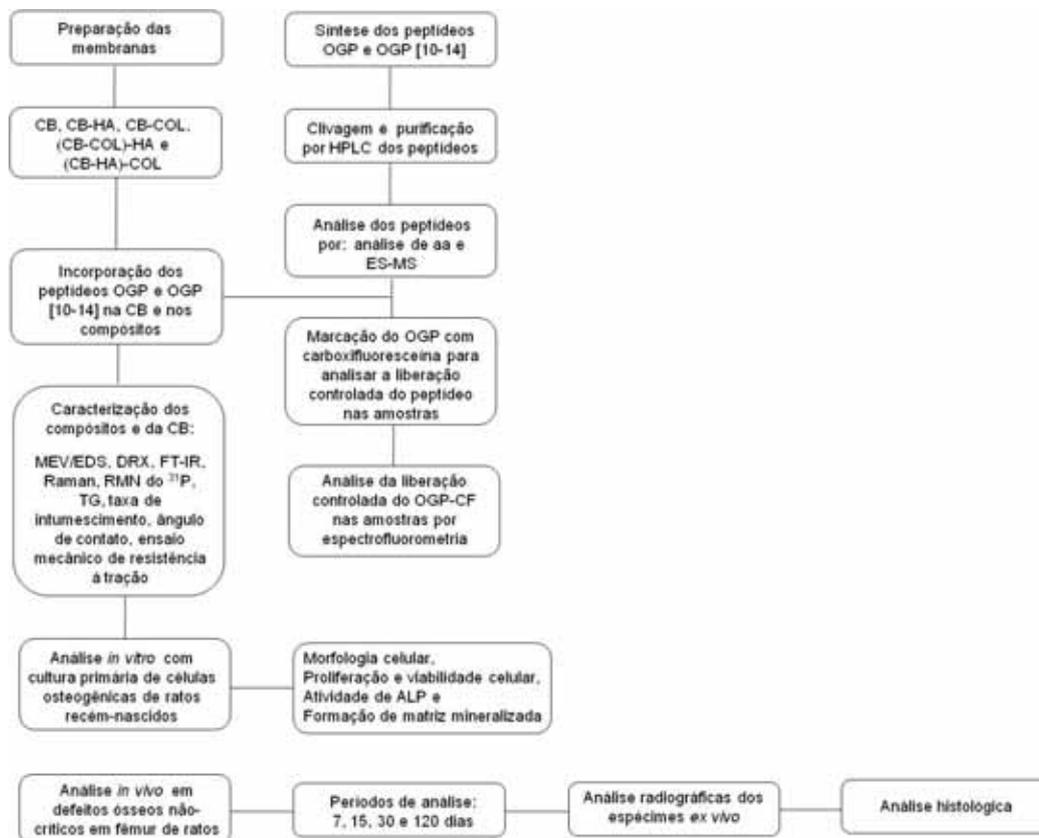
- Obtenção de materiais compósitos orgânico-inorgânicos estruturalmente formados por celulose bacteriana sintetizada por *Gluconacetobacter xylinus*, colágeno tipo I, hidroxiapatita e OGP ou OGP [10-14], na tentativa de gerar biomateriais com propriedades análogas à estrutura do tecido ósseo.
- Realizar caracterizações físico-químicas para melhor compreensão da interação do colágeno e dos cristais de hidroxiapatita a celulose bacteriana.
- Analisar a liberação controlada do peptídeo OGP-5,6 carboxifluoresceína por Espectroscopia de Fluorescência, após serem incorporados nas amostras.
- Analisar a influência da radiação gama empregada para esterilizar as membranas analisando se esta radiação interfere nas propriedades físico-químicas das mesmas.
- Avaliar a potencialidade destes biomateriais para regeneração óssea, bem como as propriedades osteoindutoras na presença de peptídeos sobre importantes eventos do processo de osteogênese *in vitro*, utilizando cultura primária de células osteogênicas.

- Análise do estudo *in vivo*, empregando regeneração óssea guiada, em defeitos ósseos não-críticos em fêmur de ratos para analisar a biocompatibilidade, a eficiência do peptídeo regulador empregado, bem como, a densidade óssea nos defeitos ósseos, além do comportamento de reabsorção das membranas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Com intuito de desenvolver novos compósitos orgânicos-inorgânicos bioativos, osteocondutores e osteoindutores à base de celulose bacteriana (CB) para regeneração óssea, neste trabalho foram desenvolvidas membranas para ROG, constituídas de CB, colágeno tipo I, hidroxiapatita e peptídeos moduladores de fatores de crescimento ósseo. Desta forma, primeiramente realizou-se a síntese dos peptídeos moduladores de fatores de crescimento ósseo, OGP e OGP [10-14], vastamente estudados na literatura na proliferação e diferenciação de células osteogênicas; concomitantemente prepararam-se os compósitos CB-HA, CB-COL, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL. Determinada a concentração dos peptídeos a ser incorporada nas amostras, avaliou-se também a liberação controlada dos mesmos. Além disso, para avaliar o potencial osteoindutor das amostras foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*. A Figura 2 apresenta o fluxograma do desenvolvimento deste trabalho.

Figura 2 - Fluxograma da metodologia desenvolvida.



2.1 Síntese química do OGP e do OGP [10-14]

Os peptídeos OGP e seu derivado OGP [10-14] (Figura 1) foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida (STEWART; YOUNG, 1984), segundo o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc) como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção da maioria das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN; WHITE, 2000). Partiu-se de 500 mg de uma resina Fmoc-Gly-Wang (grau de substituição de 0,66 mmol/g) (Novabiochem[®]) e diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt) (Fluka[®] e Advanced Chem Tech[®], respectivamente) como agentes de condensação. Na rota sintética após o acoplamento do quinto resíduo de aminoácido (Tyr), a peptidil-resina obtida foi dividida em duas frações; uma delas foi armazenada para futura desproteção e clivagem e com a outra se prosseguiu com a síntese da sequência do OGP, como ilustrado na Figura 1. Os grupos protetores das cadeias laterais dos Fmoc-aminoácidos estão representados

na Tabela 2. Os Fmoc-aminoácidos utilizados na síntese foram adquiridos da Novabiochem[®] ou da Advanced Chem Tech[®].

Tabela 2 - Grupos protetores dos aminoácidos utilizados na síntese do OGP e OGP [10-14].

Fmoc - aminoácido	Abreviação	Protetor da cadeia lateral
Arginina	Arg, R	pmc: 2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonila
Glutamina	Gln, Q	trt: tritila
Lisina	Lys, K	boc: tert-butiloxicarbonila
Tirosina	Tyr, Y	tbu: tert-butila
Treonina	Thr, T	tbu: tert-butila

Na etapa de condensação de cada aminoácido, foi utilizado um excesso molar, em relação ao grau de substituição inicial de três equivalentes para cada Fmoc-aminoácido e três equivalentes para DIC e HOBt, em uma mistura DCM (diclorometano):DMF (dimetilformamida) (1:1) (DCM, Synth[®] e DMF, Synth[®]). Na desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo Fmoc), foi empregada uma solução de piperidina 20% (v/v) (Merck[®]) em DMF.

A eficiência das etapas de condensação foi monitorada pelo teste de Kaiser (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (presença de grupos aminos livres), o processo de acoplamento era repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada com uma solução contendo 94,5% ácido trifluoracético (TFA), 2,5% etanoditiol (EDT), 0,5% tioanisol e 2,5% água deionizada a 25°C por 2 h sob agitação. Os reagentes desta solução foram adquiridos respectivamente da Fluka[®], Sigma[®] e Acros[®]; a água deionizada foi obtida através do sistema de filtração Barnstead, equipado com cartuchos para retenção de sais e de compostos orgânicos. Os peptídeos brutos OGP e OGP [10-14] foram precipitados e lavados com éter etílico gelado e centrifugado (seis vezes), dissolvidos em solução aquosa de ácido acético 10%, concentrados e liofilizados.

Ao final, os produtos isolados, foram analisados e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência, nas escalas analítica e semi-preparativa, respectivamente. O material bruto foi analisado primeiramente, em um cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico Varian ProStar, com uma coluna de fase reversa

C₁₈ (Phenomenex, 250 x 4,6 mm; d = 5 µm; 300 Å). Nesta análise foram utilizados solvente A (água deionizada contendo 0,045% de TFA) e solvente B [acetonitrila (Mallinckrodt[®]) contendo 0,036% de TFA] empregando um gradiente linear de 5 a 95% de B em 30 min com fluxo de 1,5 mL.min⁻¹, com detecção em 220 nm. Após esta análise, o peptídeo bruto foi purificado em modo semi-preparativo utilizando um Cromatógrafo System Gold BECKMAN, com coluna de fase reversa C₁₈ (Delta Pack - Waters, 300 x 19 mm; d = 5 µm; 100 Å). Nesta análise foram utilizados solvente A e solvente B empregando um gradiente ajustado de acordo com o perfil e o pico de eluição obtidos no cromatograma analítico, que foi de 25 a 45% de B em 120 min com fluxo de 5 mL.min⁻¹, com detecção em 220 nm.

A proporção de aminoácidos, bem como o rendimento da síntese e o conteúdo peptídico das sequências sintetizadas e purificadas foram determinados através de análise de aminoácidos e espectrometria de massas (ES-MS positivo).

2.1.1 Análise de aminoácidos

Os peptídeos foram previamente pesados (aproximadamente 1 mg) e hidrolisados em 1 mL de HCl 6 mol.L⁻¹ e 160 µL de Fenol 5% em água a 110°C por 72 h em atmosfera de N₂ sob agitação. Após a hidrólise, o material foi concentrado a vácuo, dissolvido posteriormente em tampão de diluição citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹, pH 2,2 e filtrado em unidade GV Millex (0,22 µm) (Millipore[®]) antes de ser injetado no aparelho.

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo Cromatógrafo Líquido Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A, empregando o método de funcionalização pós-coluna por orto-ftalaldeído (OPA). O sistema foi calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de eluição de cada aminoácido e o fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração da amostra.

Para cálculo da proporção relativa dos aminoácidos das amostras determinou-se a relação entre as suas concentrações unitárias e a média.

2.1.2 Espectrometria de Massas

Análises realizadas por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL/ESI) das amostras dos peptídeos puros, para confirmação e identificação dos picos com massa molecular correspondente aos valores teóricos dos mesmos. O sistema CL/ESI Waters - Micromass, constituído por um módulo de separação Alliance modelo 2690, detector "Photodiode Array" modelo 996, injetor automático com capacidade de 120 amostras e um espectrômetro de massa Micromass modelo ZMD. O sistema é controlado por uma Workstation Compaq modelo AP200.

Estes ensaios foram realizados no Departamento de Biofísica da UNIFESP.

2.2 Síntese do peptídeo OGP marcado com carboxifluoresceína

A síntese do peptídeo OGP (H_2N -A-L-K-R-Q-G-R-T-L-Y-G-F-G-G-OH) foi realizada manualmente seguindo a metodologia de síntese em fase sólida, como descrita acima. Posteriormente o peptídeo foi marcado com carboxifluoresceína para analisar a liberação controlada do mesmo nas membranas de CB.

Para tanto, nesta síntese foram utilizados: 1g de resina Fmoc-Gly-Wang (grau de substituição de 0,55 mmol/g - Novabiochem[®]), e DIC/HOBt (Fluka[®] e Advanced Chem Tech[®], respectivamente) como agentes de condensação. Na etapa de condensação de cada aminoácido, foi utilizado um excesso molar, em relação ao grau de substituição inicial de 3 equivalentes para cada Fmoc-aminoácido e 3 equivalentes para DIC e HOBt, em uma mistura DCM:DMF (1:1) (DCM, Synth[®] e DMF, Synth[®]).

Na rota sintética após o acoplamento do último resíduo de aminoácido (A = Alanina), a peptidil-resina obtida foi dividida em duas frações; uma foi armazenada para futura desproteção e clivagem e com a outra fração prosseguiu-se a marcação da com 5,6 carboxifluoresceína (CF) (Sigma[®]).

O protocolo sintético empregado para marcação da peptidil-resina (968 mg) foi o método de síntese em fase sólida utilizando CF e DIC/HOBt (Fluka[®]), como agentes de condensação, com um excesso molar em relação ao grau de substituição da peptidil-resina (0,33 mmol/g) de cinco equivalentes para cada reagente em uma mistura de DMF/DCM 9:1; a reação de acoplamento da CF à

peptidil-resina foi a temperatura ambiente por 2 h. Após o acoplamento, a CF-peptidil-resina obtida foi dividida em duas frações, e somente uma fração (546 mg) foi clivada.

A clivagem final do OGP-CF da respectiva resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada com uma solução contendo 95% TFA, 2,5% Tioanisol e 2,5% água deionizada, a 25 °C por 2 h sob agitação.

O peptídeo bruto OGP-CF foi precipitado e lavado com éter etílico gelado e centrifugado (seis vezes), dissolvidos em acetonitrila e água deionizada (1:1), concentrado e liofilizado.

Ao final, os produtos isolados, foram analisados e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- *high-performance liquid chromatography*), nas escalas analítica e semi-preparativa, respectivamente. O material bruto foi analisado primeiramente, em um cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico Varian, com uma coluna de fase reversa C₁₈ (Kromazil, 150 x 4,6 mm; d = 5 µm; 300 Å). Nesta análise foram utilizados solvente A (água deionizada contendo 0,045% de TFA) e solvente B (acetonitrila (Mallinckrodt®) contendo 0,036% de TFA) empregando um gradiente de 5 a 95% de B em 30 min com fluxo de 1,5 mL.min⁻¹, com detecção em 220 nm. Após esta análise, o peptídeo bruto foi purificado em modo semi-preparativo utilizando um Cromatógrafo System Gold BECKMAN, com coluna de fase reversa C₁₈ de fase reversa (Phenomenex, 250 x 21,2 mm; d = 5 µm; 300 Å). Nesta análise foram utilizados solvente A e solvente B empregando um gradiente ajustado de acordo ao perfil e ao pico de eluição obtidos no cromatograma analítico, que foi de 20 a 60% de B em 120 min com fluxo de 3 mL.min⁻¹, com detecção em 220 nm.

2.3 Preparação das Membranas de Celulose Bacteriana

As mantas de celulose bacteriana (CB) foram fornecidas pela empresa Fibrocel – Produtos Biotecnológicos LTDA, situada em Ibiporã (PR). O cultivo das bactérias *Gluconacetobacter xylinus* foi realizado em meio de cultura estática em frascos elenmeyers de 500 mL com tempo de cultivo de 120 h a 28 °C (5 mm de espessura). O meio de cultura foi composto de 2% (m/v) glicose, 0,5% (m/v) peptona, 0,5% extrato de levedura, 0,27% (m/v) fosfato dissódico anidro e 0,115% (m/v) ácido cítrico monohidratado.

A celulose foi obtida em forma de uma membrana gelatinosa formada na interface meio de cultura/superfície. Para remover as bactérias, a membrana passou por tratamento químico empregando solução de hidróxido de sódio 2% a 80°C por 1 h e em seguida utilizou-se solução de hipoclorito de sódio 1% por 30 min, sendo posteriormente lavada exaustivamente com água destilada e acondicionada em água deionizada. Após várias trocas de água deionizada as membranas foram autoclavadas por 15 minutos a 120°C.

Para obtenção das membranas CB as amostras foram secas a 50°C em molde prensado. Após a secagem, as membranas foram acondicionadas em envelopes apropriados para serem esterilizadas com radiação gama a 20 kGy pela EMBRARAD (Cotia - Brasil).

2.3.1 Preparação dos compósitos

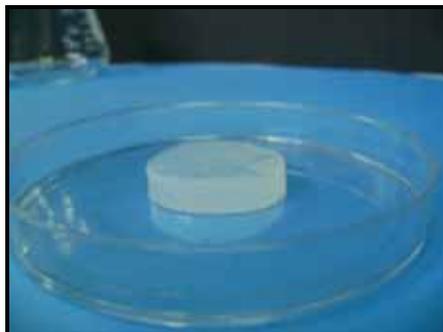
As membranas desenvolvidas foram a base de celulose bacteriana, colágeno tipo I, hidroxiapatita e peptídeos OGP e OGP [10-14] vide a Tabela 3.

Tabela 3 - Composição das amostras que foram confeccionadas.

amostras	amostras com OGP	amostras com OGP [10-14]
CB	CB	CB
CB-HA	CB-HA	CB-HA
CB-COL	CB-COL	CB-COL
(CB-COL)-HA	(CB-COL)-HA	(CB-COL)-HA
(CB-HA)-COL	(CB-HA)-COL	(CB-HA)-COL

Para confecção das respectivas membranas, previamente as matrizes de CB altamente hidratadas com 5 mm de espessura foram cortadas com auxílio de moldes de 25 mm e 13 mm de diâmetro interno (Figura 3). As amostras com 13 mm de diâmetro foram utilizadas para análise *in vitro*.

Figura 3 - Celulose bacteriana de 5 mm de espessura padronizadas em 25 mm de diâmetro.



2.3.1.1 Preparação dos compósitos de celulose bacteriana e colágeno (CB-COL)

No preparo destas amostras empregou-se solução de colágeno tipo I de tendão de rato (Sigma[®] – Saint Louis/EUA) e matrizes de CB altamente hidratadas com 5 mm de espessura e 25 mm de diâmetro.

Para a realização do processo de incorporação do colágeno, primeiramente foi realizada troca da água da CB por DMF. Esta troca foi realizada por meio de filtração à vácuo em filtro de placa porosa. Depois de completada a troca, realizou-se a modificação da superfície da CB pela esterificação de Fmoc-Gly (Advanced Chem Tech[®]) às hidroxilas livres da celulose. Esta reação de esterificação entre os grupos OH da CB e os grupos COOH do aminoácido foi realizada no intuito de disponibilizar grupos de maior potencial nucleofílico, aumentando a eficiência de ligação com os grupos carboxílicos do colágeno.

Para a reação de esterificação foram utilizados os seguintes reagentes: 238 mg de Fmoc-Gly; 162 mg de 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) (Sigma[®]); 127 μ L N-metilimidazol (NMI) (Fluka[®]) em 8 mL de DMF. O tempo de acoplamento foi em média de 2 h a TA. Após a reação foram realizadas várias lavagens com DMF e posterior imersão em DMF por 24 h para remoção completa do excesso dos reagentes.

A análise quantitativa por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis) foi utilizada para determinar grau de incorporação de Fmoc-Gly aos grupos OH da CB utilizando um aparelho Shimadzu UV1601-PC. A absorbância das amostras foi medida empregando um comprimento de onda de 290 nm.

Para realizar estas medidas, pequenas frações de CB/Fmoc-Gly foram pesadas e em seguida tratadas com piperidina 20% (v/v), em uma cubeta de quartzo (10 x 10 mm) após agitação prosseguindo-se com a leitura da absorbância, contra um branco onde se omitiu a amostra.

O grau de incorporação (GI) do aminoácido foi calculado empregando a equação abaixo:

Equação 1:

$$GI \text{ (mmol/g)} = \frac{A \text{ amostra} - A \text{ referência}}{1,65 \times \text{massa da amostra (mg)}}$$

GI – grau de incorporação; A - Absorbância

Após, este procedimento, foi realizada a desproteção dos grupos α -amínicos empregando uma solução de piperidina 20% (v/v) por 2 h a TA. Decorrida a desproteção, sucessivas lavagens com DMF foram realizadas para remoção do excesso da solução de piperidina, seguido de lavagens com DMF e posterior lavagens sucessivas com água deionizada para a troca de solventes e proceder à incorporação de colágeno a matriz de CB.

Para isso, empregou-se uma solução de colágeno tipo I (4 mg.mL^{-1}) e 5 mmol.L^{-1} de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) em 10 mL de água deionizada. Posteriormente os cilindros de CB/Gly foram imersos nesta solução ajustando-se o pH inicial em 6,0 com NaOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ mantendo-o nesta condição por 24 h a 4°C , sob agitação. Decorrido o período, as amostras foram lavadas com água deionizada a vácuo para remoção do excesso de colágeno e EDC. As amostras de CB-COL foram secas em molde prensado e acondicionadas em envelopes apropriados para serem esterilizadas com radiação gama a 20 kGy. As amostras de CB-COL também foram utilizadas para posterior incorporação dos peptídeos, OGP e OGP [10-14], as quais foram acondicionadas a temperatura de 4°C .

2.3.1.2 Preparação dos compósitos de celulose bacteriana e hidroxiapatita (CB-HA)

A hidroxiapatita foi incorporada à CB segundo a metodologia de Hutchens et al. (2006). Os cilindros de membranas de CB foram imersos em solução de etanol 20%, à temperatura ambiente (TA) por 24 h. Para precipitação da HA, cada uma das amostras previamente desidratadas foram imersas primeiramente em 20 mL de solução de CaCl_2 0,05 mol.L⁻¹ (pH 5,8) (Merck®) por 24 h a TA, e posteriormente cada amostra foi imersa em 20 mL de solução de Na_2HPO_4 0,1 mol.L⁻¹ (pH 9,2) (Chemco®) por 24 h a TA. O pH final da solução foi em média de 7,5.

Para obtenção das membranas CB-HA as amostras foram secas em molde prensado. Após a secagem, as membranas foram acondicionadas em envelopes apropriados para serem esterilizadas com radiação gama a 20 kGy. As amostras de CB-HA que foram utilizadas para posterior incorporação dos peptídeos, OGP e OGP [10-14], foram acondicionadas à temperatura de 4°C.

2.3.1.3 Preparação dos compósitos de celulose bacteriana, colágeno e hidroxiapatita [(CB-COL)-HA]

Para obtenção destas membranas foi incorporado inicialmente colágeno à CB seguida da incorporação de HA de acordo com os protocolos CB-COL e CB-HA descritos acima. As amostras de (CB-COL)-HA foram secas em molde prensado, e as membranas obtidas foram acondicionadas em envelopes apropriados para serem esterilizadas com radiação gama a 20 kGy. Os procedimentos para posterior incorporação dos peptídeos foram os mesmos daqueles descritos para CB-HA e CB-COL.

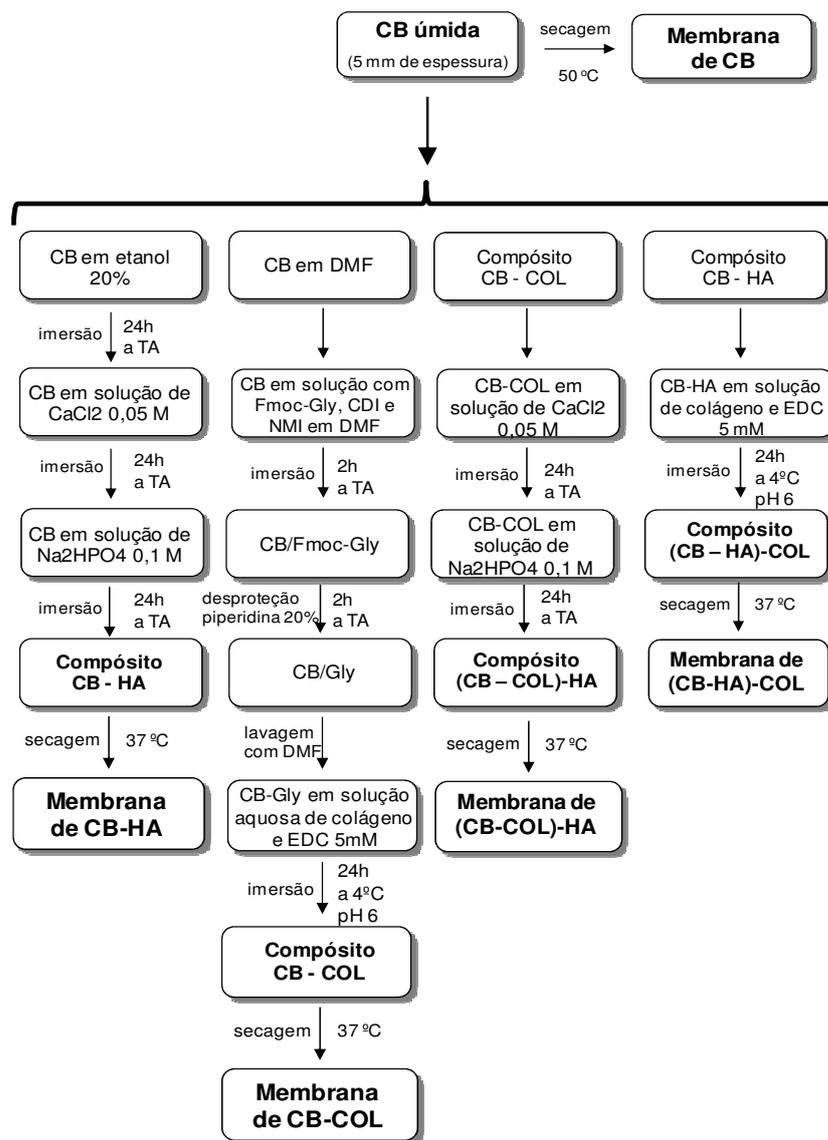
2.3.1.4 Preparação dos compósitos de celulose bacteriana, hidroxiapatita e colágeno [(CB-HA)-COL]

O preparo destas membranas constituiu-se primeiramente pela incorporação de HA à CB pelo protocolo CB-HA descrito acima, seguido da incorporação de colágeno pelo processo de adsorção empregando uma solução contendo colágeno tipo I (4 mg.mL⁻¹) e 5 mmol.L⁻¹ EDC em água deionizada; cada amostra foi imersa em 8 mL desta solução por 24 horas a 4°C sob agitação, ajustando o pH para 6,0 com solução de NaOH 0,2 mol.L⁻¹. A secagem destas amostras foi realizada em

molde prensado, posteriormente foram acondicionadas em envelopes apropriados para serem esterilizadas com radiação gama a 20 kGy. Os procedimentos para posterior incorporação dos peptídeos foram idênticos ao protocolo CB-HA e CB-COL.

O fluxograma apresentado na Figura 4 resume a preparação dos compósitos.

Figura 4 - Fluxograma da preparação dos compósitos.



2.3.2 Determinação da liberação do peptídeo nos compósitos

Para análise de liberação, a concentração do peptídeo OGP-CF incorporado às amostras membranas, foi de 10^{-6} mol.L⁻¹ para melhorar a sensibilidade do método. Cada amostra foi imersa em 25 mL de solução PBS (*phosphate buffer solution*, pH 7,2), em um volume capaz de preencher todo circuito do equipamento. As amostras foram mantidas sob agitação a uma temperatura de 37°C durante o período de análise. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados foram de 492 e 520 nm, respectivamente. As medidas foram realizadas em triplica. As aquisições dos dados da concentração de peptídeo liberada foram realizadas em um sistema fechado acoplado a um espectrofotômetro de fluorescência VARIAN CARY ECLIPSE (Analysis Package software) por meio de mangueiras de silicone ajustadas a um cubeta de fluxo de 450 µL (Hellma QS 10 x 4 mm), sendo todo fluxo da solução mantido por uma bomba peristáltica. O tempo de aquisição dos dados foi de 72 h, monitorado da seguinte maneira: a primeira medida em tempo inicial (T = 0 min), posteriormente seguido de medidas a cada 1 min durante 60 min, depois a cada 5 min durante a segunda hora e a cada 15 min durante 300 min. Após 5 h de aquisição, as medidas foram realizadas a cada 30 min até completar 8 h e a cada 1 h até completar as 72 h de análise.

2.3.3 Incorporação dos peptídeos, OGP e OGP [10-14], nas amostras

A incorporação dos peptídeos foi realizada pelo processo de adsorção. Por este processo o peptídeo interage aos compósitos e com a CB por ligações de hidrogênio e/ou iônicas, cuja liberação ocorre com a elevação da força iônica do meio (condições biológicas). A partir dos valores obtidos no ensaio de liberação do peptídeo OGP-CF, estimou-se o valor da concentração das soluções peptídicas em que as respectivas membranas foram imersas (10^{-8} mol.L⁻¹), assim obtendo-se uma concentração final incorporada aos materiais de 10^{-9} mol.L⁻¹, para os dois peptídeos. Esta concentração foi preestabelecida em estudos *in vitro* realizados anteriormente que, de acordo com Bab et al. (1992) e Spreafico et al. (2006), concentrações menores que 10^{-14} mol.L⁻¹ resultam em acentuada proliferação celular, sendo que a concentração de 10^{-9} mol.L⁻¹ promove uma melhor atividade da fosfatase alcalina, maior formação e mineralização de nódulos de osso neoformado. Para este processo, as amostras (13 mm de diâmetro) foram obtidas seguindo os respectivos

protocolos de processo descritos para CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL. Cada amostra foi imersa em 5 mL da respectiva solução por 72 h a 10°C.

2.4 Caracterização dos compósitos

As técnicas de caracterizações físico-químicas foram empregadas na tentativa de elucidar a interação do colágeno aos compósitos e identificar as fases de apatitas incorporados nas amostras (CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com ou sem peptídeos adsorvidos), e também de analisar o efeito da radiação gama sob as mesmas.

Para tanto, foram utilizadas as seguintes técnicas:

2.4.1 Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)

As micrografias foram realizadas para verificar a estrutura fina da morfologia da superfície das amostras e a microanálise semi-quantitativa por EDS para verificar a razão molar Ca/P dos compósitos CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL. Cada amostra foi colocada em suporte de cobre para a realização das microanálises semi-quantitativas com tensão de 5 Kv. Posteriormente, as amostras foram recobertas com uma camada de ouro com espessura de 10 nm durante 80 segundos, tensão de 3 Kv e corrente de 15 μ A. As micrografias foram realizadas sob tensão de 10-25 Kv. As micrografias e o EDS foram obtidos em microscópio eletrônico modelo FEG XL 30 (Philips) realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural (Universidade Federal de São Carlos – SP). O software ImageJ foi utilizado para analisar o tamanho das fibras da membrana de CB e a calibração foi feita utilizando a escala em barras da respectiva micrografia.

2.4.2 Difratomia de raios-X (DRX)

Os padrões de difração de raios-X, para determinar a estrutura cristalina, foram obtidos usando um difractômetro Siemens Kristalloflex, com um filtro de níquel e radiação de Cu ($K\alpha$), com varredura angular entre 4° a 70° com passo de 0,02 s (2θ) e tempo de aquisição de contagem de 3 s para cada amostra. As amostras

foram fixadas sobre um suporte de vidro. A identificação das fases cristalinas da celulose, I α e I β , e das fases de apatita presentes nos compósitos foi realizada comparando-se os dados obtidos com as fichas cristalográficas padrões da base de dados ICDD – PDF-2 (International Centre for Diffraction Data – Powder Diffraction File-2).

2.4.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR foram obtidos usando um espectrômetro FT-IR 8.300 – Shimadzu. As respectivas amostras foram previamente pesadas, trituradas e diluídas em KBr na proporção 1:100 para a confecção das pastilhas. Os espectros foram realizados sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com acúmulo de 32 varreduras, com uma resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de absorção de 4.000-400 cm⁻¹.

2.4.4 Espectroscopia de espalhamento Raman

Os espectros Raman das amostras foram adquiridos usando um espectrômetro Raman HORIBA JOBIN YVON modelo LabRAM HR 800, operando com um laser de He-Ne em 632,81 nm, e acoplado a uma câmera CCD modelo DU420A-OE-325 do mesmo fabricante como detector. Os espectros foram obtidos na região de 100 a 4.000 cm⁻¹, com 5 varreduras com tempo de 200 s por varredura.

2.4.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido dos núcleos ³¹P

Esta técnica foi empregada para elucidar a composição da fase inorgânica dos compósitos obtidos. Para esta análise, foi utilizado a técnica MAS (rotação em torno do ângulo mágico) para o monitoramento da formação e/ou interação das fases de HA nas amostras CB-HA, (CB-HA)-COL e (CB-COL)-HA. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente no espectrômetro de 300 MHz (9,4T), Varian Unity INOVA. Para a realização das medidas foi utilizado uma sonda de 7 mm MAS, com rotação de 5-6 kHz.

As medidas de alta resolução MAS do ^{31}P foram realizadas em 121,5 MHz. Os dados do ^{31}P foram coletados com um simples pulso de excitação ($\pi/2$) de 7 μs e com tempo de relaxação de 200 s. Todas as amostras foram referenciadas a partir da solução de H_3PO_4 85%. Para a deconvolução dos espectros obtidos foi utilizado o programa DMFIT (MASSIOT et al., 2002).

2.4.6 Análise termogravimétrica (TG)

As curvas de TG foram obtidas utilizando-se um equipamento TA-Instruments usando uma célula SDT. As amostras foram aquecidas em cadinho de alumina de 25°C a 600°C sob atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 100 mL.min⁻¹ com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

2.4.7 Taxa de intumescimento

As amostras CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com ou sem os peptídeos OGP ou OGP [10-14] sob a forma de membranas (13 mm de diâmetro) foram imersas separadamente em água deionizada por 240 min à temperatura ambiente. As membranas foram removidas em tempos determinados, inicialmente 1 e 5 min, seguida de medidas a cada 5 min até totalizarem 30 min e depois medidas a cada 15 min até um total de 240 min. O excesso de água superficial foi rapidamente removido com papel de filtro e em seguida as membranas foram pesadas imediatamente. O grau de intumescimento das amostras foi realizado em triplicata.

O conteúdo de água nas membranas intumescidas foi calculado pela seguinte equação:

Equação 2:
$$\text{Intumescimento (\%)} = [(M_i - M_s) / M_i] \times 100$$

onde M_s é o peso da membrana seca e M_i é o peso da membrana intumescida.

2.4.8 Ângulo de contato

O ângulo de contato foi medido por um equipamento Dataphysics modelo OCA-15 equipado com uma câmera CCD. O método utilizado para realizar as medidas foi o de gotejamento utilizando água deionizada (tensão superficial: 72.30 mN/m); a gota foi dispensada por uma seringa com uma agulha de 0,5 mm de diâmetro, com um volume de 10 μL , numa velocidade de gotejamento de 1 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ sobre as superfícies das membranas. As imagens das gotas capturadas foram analisadas empregando o software SCA20. Desta forma, o ângulo de contato formado pela gota na superfície da amostra foi mensurado. As medidas para ângulo de contato foram realizadas para todas as amostras representadas na Tabela 3, em triplicata ($n=3$), antes e após serem esterilizadas com radiação gama 20 kGy a temperatura ambiente. As medidas foram realizadas imediatamente após o gotejamento ($T=0\text{s}$) e após 10s ($T=10\text{s}$), e a média \pm erro padrão destes valores foram calculados. A medida do ângulo de contato entre a gota a superfície do material caracteriza a molhabilidade desta superfície conforme apresentado na Tabela 4. Esta propriedade influencia diretamente na resposta biológica de um material implantado podendo alterar adsorção de proteínas, coagulação sanguínea e principalmente afetar a adesão celular.

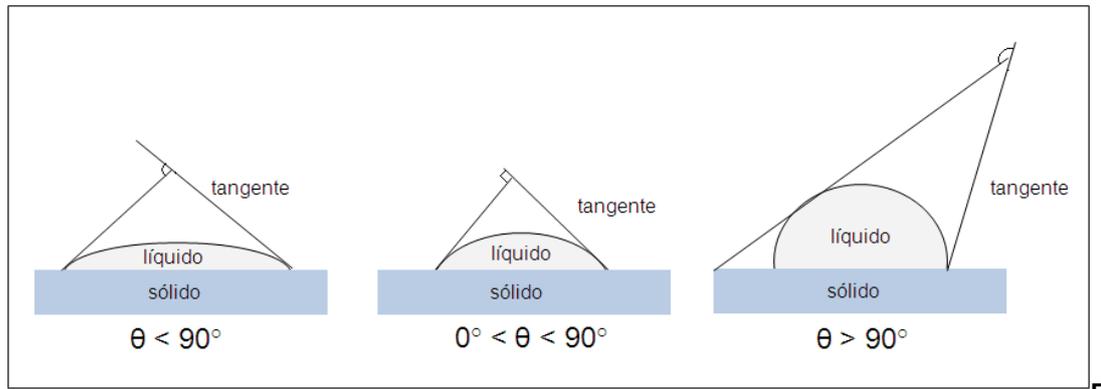
Tabela 4 - Ângulos de contato e condições de molhabilidade.

$\theta = 0$	molhabilidade completo
$0 < \theta < 90^\circ$	molhabilidade parcial
$\theta > 90^\circ$	não há molhabilidade

Fonte: Thomazini (2009).

Os diferentes ângulos de contatos formados no limite da interceptação do líquido com o sólido estão apresentados na Figura 5. Quando ocorre o espalhamento da gota do líquido ou molhabilidade em grau variado, a força de adesão entre as moléculas das duas fases supera a força de coesão; por outro lado, quando a força de atração entre as moléculas é superior a força de coesão entre as fases, não há molhabilidade ou espalhamento da gota.

Figura 5 - Representação dos níveis de interação gota-superfície de acordo com o ângulo de contato.



Fonte: Thomazini (2009). Figura adaptada.

2.4.9 Ensaio mecânico de resistência à tração

As propriedades mecânicas de limite de resistência à tração, alongamento e módulo de elasticidade foram realizadas em uma máquina de ensaios mecânicos dotada de servoválvula, MTS-810 (Material Teste System – MTS 810; MTS System Corporation – do Laboratório de Ensaios Mecânicos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese FOAR/UNESP), equipada com o software Test Star II, com uma célula de carga de 10kN e uma velocidade constante de 0,5 mm.min⁻¹. Os testes foram realizados com as membranas CB, CB-HA, CB-COL, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL antes e após a esterilização com radiação gama. As membranas foram recortadas de forma retangular com aproximadamente 6,50 - 7,50 mm de largura, e a espessura exata de cada amostra foi medida utilizando um paquímetro digital. Cinco amostras de cada tipo de membrana (n = 05) foram utilizadas para os ensaios mecânicos. Antes de cada medida, cada amostra foi imersa em solução SBF (*simulated body fluid*: solução de Kokubo) (KOKUBO et al., 1990), por 10 min a temperatura ambiente, para fim de simular a resistência à tração, das mesmas, nos primeiros minutos trans-cirúrgicos. De acordo com resultados prévios realizados, observou-se que a resistência à tração da celulose bacteriana úmida é maior em relação à CB seca (95,1 e 40 MPa, respectivamente). Decorrido os 10 min, o excesso de SBF foi rapidamente removido com papel de filtro e em seguida as amostras foram fixadas nos grampos acoplados a máquina MTS-810.

A análise dos dados foi realizada pelo software Test Works 4 do sistema Test Star II. A resistência à tração foi determinada pelo ponto máximo da curva tensão – deformação.

2.5 Análises *in vitro*

Para as análises *in vitro* as amostras foram preparadas na forma de disco, apresentando dimensões padronizadas de 13 mm de diâmetro ($n = 5$), e colocadas em placas com poços individualizados (2 placas de acrílico de 24 poços) esterilizadas. As amostras analisadas foram CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com ou sem peptídeos adsorvidos.

Para tanto, procedeu-se os seguintes ensaios:

2.5.1 Isolamento das células e cultura primária de células osteogênicas

As células foram isoladas de fragmentos de calvárias de ratos *Wistar* recém-nascidos com 2-4 dias (DE OLIVEIRA et al., 2007) por meio de digestão enzimática sequencial, com solução de tripsina e colagenase. As células foram plaqueadas sobre as respectivas membranas contidas em placas de 24 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço, e cultivadas por períodos de até 21 dias em Meio Essencial Mínimo, modificação α , com L-glutamina (α -MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 7 mmol.L^{-1} de β -glicerofosfato, $50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina, $5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de ácido ascórbico a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poliestireno.

2.5.2 Morfologia celular

A análise de adesão e morfologia celular foi realizada nos períodos de 1, 3 e 7 dias por fluorescência direta. As culturas crescidas sobre as superfícies das membranas foram processadas para fluorescência segundo metodologias previamente descritas (DE OLIVEIRA et al., 2003; DE OLIVEIRA; NANCI, 2004). Para tanto, as culturas foram fixadas por 10 min a temperatura ambiente em solução de paraformaldeído 4% em $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de tampão fosfato de sódio (PB), pH 7,2. A

permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0.5% em PB por 10 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB durante 30 min. As células foram marcadas por faloidina conjugada com Alexa Fluor 488, fluorescência verde, (1:200, Molecular Probes®), para visualização do citoesqueleto de actina. Antes da montagem das lâminas para observação no microscópio as amostras foram brevemente lavadas com água deionizada, e os núcleos celulares foram marcados com 300 nmol.L⁻¹ dihidroclorato de 4',6-diamidino-2-fenilindol, fluorescência azul, (DAPI, Molecular Probes®), por 5 min para visualização do DNA nuclear. Após a montagem das lâminas de vidro sobre as membranas com o kit *anti-fading* (Vectashield®, Vector Laboratories) e as amostras foram examinadas por um único examinador cegos aos grupos por epifluorescência usando um microscópio óptico (Leica DMLB, Alemanha) com objetivas *N Plan* (X10/0.25, X20/0.40) e HCX PL *Fuotar* (X40/0.75, X100/1.3), acoplado a uma câmara digital fotográfica (Leica DC 300F). As imagens adquiridas foram processadas utilizando-se o software *Adobe Photoshop* (Adobe Systems).

2.5.3 Proliferação e viabilidade celular

A análise da viabilidade celular foi determinada quantitativamente pelo ensaio colorimétrico de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT, Sigma®), cujo sal é reduzido sob a forma de cristais (cor púrpura) por proteinases mitocondriais ativas apenas em células viáveis. Ao 10^o e 14^o dia, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com tampão PBS aquecido a 37°C, em seguida as células foram incubadas em 10% de MTT (5 mg.mL⁻¹) em 1 mL de meio de cultura a 37°C por 4 h em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Decorrido este período, o meio de cada poço foi então aspirado e os cristais foram solubilizados em 1 mL de solução de isopropanol ácido (0,04 mol.L⁻¹ de HCl em isopropanol). As placas foram agitadas por 5 min para a solubilização completa do precipitado formado, e uma alíquota de 150 µL desta solução de cada poço foi transferida para placas de 96 poços. A absorbância foi medida por um espectrofotômetro (Epoch, BioTek Instruments, Inc., EUA) no comprimento de onda em 570 nm.

2.5.4 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

2.5.4.1 Medida do conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi determinado ao 14^o e 17^o dia, seguindo o método de Lowry et al. (1951). O meio de cultura foi removido dos poços e em seguida os poços foram lavados três vezes com PBS aquecido a 37°C e os poços foram preenchidos com 2 mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma[®]). Após 30 min, 1 mL do lisado de células de cada poço foi transferido para tubos de ensaio, e misturado a 1 mL de solução de Lowry (Sigma[®]) e deixados em repouso por 20 min a temperatura ambiente. Subsequentemente, o extrato foi diluído em 0,5 mL de solução de reagente fenol de Folin e Ciocalteu's (Sigma[®]) e novamente deixado em repouso a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, a absorbância foi determinada usando um espectrofotômetro (CE3021 – Cecil, Reino Unido) em 680 nm. O conteúdo de proteína total foi calculado, a partir de uma curva padrão determinada a partir com albumina bovina (Sigma[®]) dando uma faixa de 25 a 400 µg proteína.mL⁻¹ e os dados foram expressos em µg proteína.mL⁻¹.

2.5.4.2 Medida da atividade da ALP

A atividade de ALP foi avaliada no mesmo concentrado de células lisadas usadas para determinar o teor de proteína total. Desta forma, a atividade de ALP foi determinada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de monofosfato de timolftaleína, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Brasil). Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de monofosfato de timolftaleína, o qual foi misturado em 0,5 mL de tampão dietanolamina (0,3 mol.L⁻¹, pH 10,1) e deixados por 2 min a 37 °C. Após, foi acrescentada à solução uma alíquota de 50 µL obtida de cada poço, permanecendo por 10 min a 37 °C. Para obter a coloração foram adicionados 2 mL de Na₂CO₃ a 0,09 mol.L⁻¹ e NaOH a 0,25 mol.L⁻¹. Decorridos 30 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina, medida a partir da curva padrão usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 µmol de timolftaleína/h/mL. Os dados foram normalizados pelo

conteúdo de proteína total, que foi determinado pelo método de Lowry modificado (Lowry et al., 1951).

2.5.5 Formação de matriz mineralizada

A formação de matriz mineralizada foi detectada em 21 dias pela coloração vermelho de Alizarina (Sigma[®]), o qual cora áreas ricas em cálcio. No entanto, para esta análise somente as amostras sem hidroxiapatita foram analisadas. As culturas crescidas sobre as membranas foram fixadas com formalina a 10% por 2 h a temperatura ambiente. Depois da fixação, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcool etílico (30, 50, 70 e 100%), mantendo cada solução por 1 h respectivamente, e processadas para coloração com 2% de vermelho de Alizarina (Sigma[®]), pH 4,2 por 10 min. Após esse período, o excesso de corante foi removido pela lavagem abundante das membranas com água bidestilada e as placas foram novamente mantidas semi-abertas até a secagem. As membranas foram analisadas por epifluorescência em microscópio óptico (Leica DMLB) e imagens foram obtidas para documentação.

A quantificação foi avaliada pelo método colorimétrico descrito por Gregory et al. (2004). Primeiramente, 280 µL de ácido acético 10% foi adicionado em cada poço contendo as membranas coradas por vermelho de Alizarina, e as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 30 min sob agitação. Esta solução foi transferida para uma microcentrífuga e depois agitada por 1 min, e a suspensão foi coberta com 100 µL de óleo mineral (Sigma[®]), aquecida a 85°C por 10 min, e transferida para banho de gelo por 5 min. A suspensão foi então centrifugada a 20.000 g por 15 min e 100 µL de sobrenadante foi transferido para um novo tubo agora de microcentrífuga. Então, 40 µL de hidróxido de amônia a 10% foram adicionados para neutralizar o ácido contido na solução; assim, esta solução contendo 140 µL foi transferida para placas de 96 poços e em seguida a absorbância foi mensurada em um espectrômetro Epoch (Biotek) em 405 nm. Os valores observados foram normalizados por aqueles obtidos de membranas cultivadas na ausência de células (controle negativo).

2.5.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Statistica 8.0. Para análise de homogeneidade de variância foi empregado o Teste de Levene e para análise de normalidade foi empregado o Teste de Lilliefors. O teste de ANOVA foi realizado para avaliar os valores mensurados nas respectivas análises descritas acima: proliferação e viabilidade celular, atividade de ALP e Kruskal-Wallis para formação de matriz mineralizada e o pós-teste empregado foi para comparações múltiplas foi Teste de Tukey. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

2.6 Análise in vivo

2.6.1 Procedimento cirúrgico

O estudo constituiu de 120 ratos (*Rattus Norvegicus Holtzman*), adultos, machos, os quais foram divididos em seis grupos, (Tabela 5), contendo cinco (5) animais por grupo nos seguintes períodos de análise: 07, 15, 30 e 120 dias. Neste estudo foram selecionadas as amostras sem peptídeos e amostras com o peptídeo OGP [10-14], esta escolha foi determinada pelos estudos *in vitro* realizados previamente.

O experimento foi realizado dentro dos padrões da norma ASTM F981-04 “Standard Practice for Assessment of Compatibility of Biomaterials for Surgical Implants with Respect to Effect of Materials on Muscle and Bone” (Anexo 1), o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara – UNESP (Anexo 2).

Tabela 5 - Divisão dos animais em grupos de acordo com o material a ser implantado.

Grupo	Fêmur	
	Direito	Esquerdo
I	Controle	—————
II	CB	CB OGP [10-14]
III	CB-HA	CB-HA OGP [10-14]
IV	CB-COL	CB-COL OGP [10-14]
V	(CB-COL)-HA	(CB-COL)-HA OGP [10-14]
VI	(CB-HA)-COL	(CB-HA)-COL OGP [10-14]

Os animais foram anestesiados por meio de administração intramuscular de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e de cloridrato de xilazina (5 mg/Kg), dosagem esta suficiente para 30 minutos de anestesia. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob rigoroso protocolo asséptico. Após a anestesia e tricotomia da região dos membros posteriores, os animais foram acomodados em posição dorsal, onde receberam incisão sobre a região do fêmur (Figura 6), seguida de descolamento e rebatimento dos tecidos contendo epiderme, tecido muscular e periósteo, até a exposição do osso fêmur (Figura 7).

Figura 6 - Rato na posição dorsal (A); tricotomia, assepsia e marcação do local da incisão no lado esquerdo (B) e no lado direito (C).

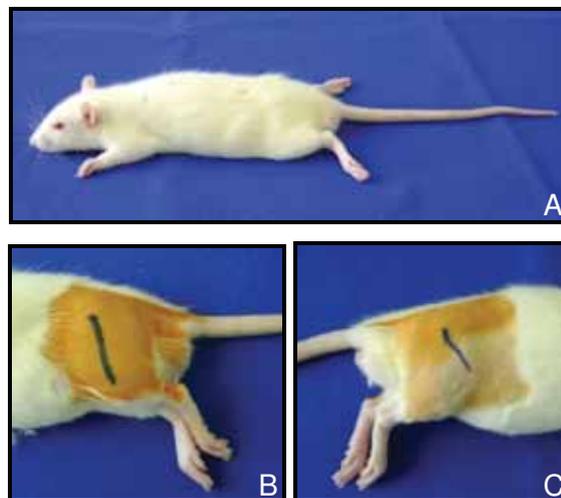


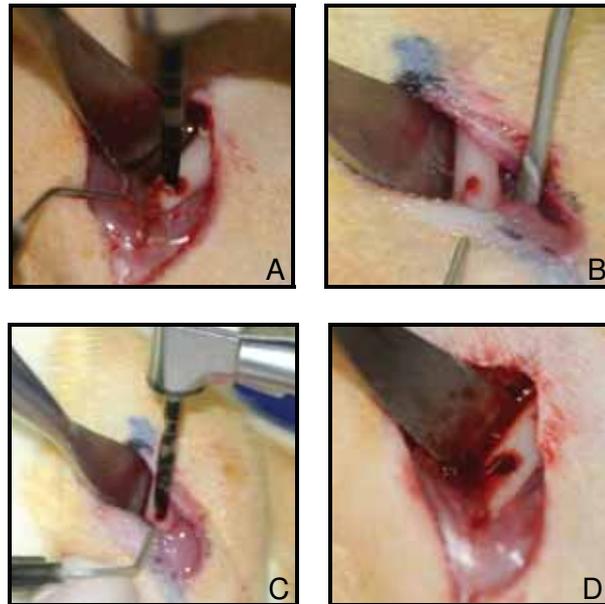
Figura 7 - Incisão e rebatimentos dos tecidos com exposição do osso fêmur.



Os defeitos ósseos não-críticos foram realizados com o auxílio de uma broca lança de 2,0 mm de diâmetro (Sistema Neodent, Brasil), seguido de uma broca helicoidal de 2,0 mm de diâmetro (Sistema Neodent, Brasil) sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9%. A confecção dos defeitos consistiu na perfuração do fêmur

em espessura total da primeira cortical até atingir a medula óssea mantendo-se a integridade da segunda cortical óssea (Figura 8).

Figura 8 - Preparo do defeito ósseo. Sequência das brocas utilizadas para preparação do defeito ósseo; perfuração com broca lança (A); defeito criado com a broca lança (B); perfuração com broca helicoidal (C) e defeito ósseo realizado com a broca helicoidal (D).



Em cada fêmur foi realizado um defeito ósseo, ou seja, um no fêmur direito e um no fêmur esquerdo. Cada defeito ósseo foi recoberto por um tipo de membrana seguindo a divisão dos grupos apresentada na Tabela 5, exceto o defeito controle que foi preenchido somente com coágulo sanguíneo (Figura 9). Não foram utilizados meios de fixação para as membranas, já que estas se estabilizam sob o perióstio pela reposição dos tecidos moles. No pós-operatório foi administrado Tramadol, na dosagem de $12,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, em dose única por via intraperitoneal, pós-efeito anestésico, segundo Cannon et al. (2010). A sutura do segundo plano foi realizada através de pontos simples com Vicryl 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson) e o primeiro plano foi suturado através de ponto contínuo com Mononylon 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson) (Figura 10).

Figura 9 - Colocação da membrana de CB-COL sobre o defeito ósseo (A); membrana de CB-COL adaptada sobre o defeito ósseo (B); membrana de (CB-COL)-HA adaptada sobre o defeito ósseo (C).

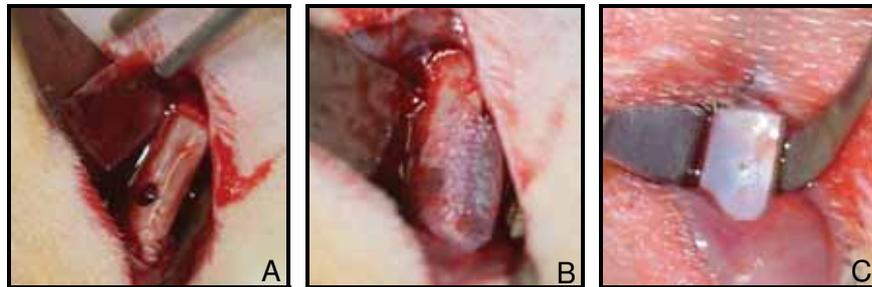
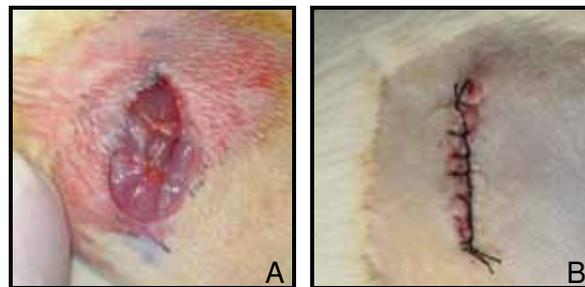


Figura 10 - Sutura do segundo plano com Vicryl 4-0 (A); sutura do primeiro plano com mononylon 4-0 (B).



A eutanásia dos animais ocorreu nos períodos de 7, 15, 30 e 120 dias de pós-operatório, com cinco (5) animais para cada período, correspondente às repetições de cada condição experimental. O procedimento foi realizado, primeiramente, por meio de anestesia geral com a administração intramuscular de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e de cloridrato de xilazina (5 mg/Kg) e após remoção dos fêmures, foi realizado o aprofundamento anestésico, e em seguida, as peças foram reduzidas preservando-se os tecidos moles supra-periostais e fixadas em solução de formol 10%. Antes de serem encaminhados para o processo histotécnico de rotina para coloração em hematoxilina e eosina (H&E), esses espécimes foram analisados radiograficamente.

2.6.2 Análise radiográfica dos espécimes ex vivo

A análise radiográfica dos espécimes foi realizada após os animais, dos referidos 06 grupos de estudos (Tabela 5), serem eutanasiados nos respectivos períodos de 7, 15, 30 e 120 dias; totalizando 220 espécimes. A análise consistiu em observar o osso neoformado no interior dos defeitos ósseos nos respectivos períodos de eutanásia. Como parâmetro de análise foi utilizado às Radiografias Imediatas (RI), que foram realizadas em animais eutanasiados do grupo controle (I). Para tanto, no fêmur esquerdo desses animais, foram confeccionados defeitos ósseos utilizando o mesmo protocolo cirúrgico para experimentação *in vivo*: os defeitos ósseos consistiram na perfuração do fêmur em espessura total da primeira cortical até atingir a medula óssea mantendo-se a integridade da segunda cortical óssea (defeito de 2 mm de diâmetro), desta forma, simulando o procedimento trans-cirúrgico, em seguida, foram realizadas as tomadas radiográficas.

Os exames radiográficos foram realizados utilizando o sistema digital DenOptix QST (Gendex Dental Systems, Des Plaines, IL) com placa de fósforo no tamanho 2 (31 x 41 mm) e utilizando aparelho de raios X Gendex 765DC com 7 mA; 65 kV e 0,04 s, pertencente ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP. A distância do cilindro localizador à placa de fósforo foi padronizada em 30 cm. Desta forma, o osso fêmur foi posicionado de forma com que o defeito ósseo ficasse perpendicular a placa de fósforo.

As placas de fósforo foram escaneadas numa resolução de 300 dpi, utilizando software VinxWin Pro e salvas no formato TIFF.

As imagens radiográficas foram analisadas em relação à média da densidade dos pixels de acordo com a reparação do defeito ósseo nos períodos de 7, 15, 30 e 120 dias utilizando as radiografias imediatas como parâmetro para as análises. Estas medidas foram realizadas com os programas VinxWin Pro e *Adobe Photoshop* 7.0. A densidade óssea foi medida em pixels da região central dos defeitos ósseos medindo o osso neoformado e comparando com a densidade da escala de chumbo (0,5 – 3,5 mmPb) radiografada juntos os espécimes.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico *Statistica* 8.0. O teste de ANOVA foi realizado para avaliar os valores mensurados para densidade óssea e o pós-teste empregado foi para comparações múltiplas foi Teste de Tukey. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

2.6.3 Processamento histológico

Os espécimes fixados em solução de formol 10% tamponado, após serem devidamente radiografados, foram descalcificados em solução de Anna Morse (MORSE, 1945), a qual é constituída de solução de ácido fórmico a 50% e solução de citrato de sódio a 20% na proporção 1:1 trocada a cada 48 h durante 30 a 60 dias. Após o período de descalcificação os espécimes foram lavados em água corrente por 24 h e depois imersos em uma solução de sulfato de sódio a 5% por 48 h para neutralização do excesso de ácido. Decorrido este período, os espécimes foram novamente lavados em água corrente por mais 6 h, e posteriormente imersos nas seguintes soluções: álcool 70% por 12 h, álcool 90% por 1 h, álcool absoluto por 24 h (realizando trocas a cada 8 h), lavagem rápida com álcool-xilol (1:1), seguido de imersão em xilol por 3 h (realizando troca a cada 1h) e inclusão final em parafina.

Os espécimes foram preparados com cortes semi-seriados de 6 µm para coloração em hematoxilina e eosina (H&E). Os cortes histológicos foram analisados e fotografados em um microscópio de luz (Jenaval-Zeiss) acoplado a uma câmara digital (Leica DFC425), pertencente ao Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP. Os parâmetros analisados foram: 1. qualidade do osso mineralizado; 2. atividade celular incluindo a presença de osteoblastos ativos, matriz osteóide e osteoclasto; 3. evidência de formação de tecido conjuntivo fibroso dentro do defeito ósseo; 4. processo de angiogênese; 5. reação inflamatória; 6. degradação das membranas. Estes parâmetros foram analisados por um único pesquisador.

2.6.4 Análise estatística

A análise estatística dos espécimes em relação à intensidade de reação inflamatória foi mensurada por meio de escore (Tabela 6) dado para cada espécime e correlacionando com os períodos de análise 7, 15, 30 e 120 dias. Para tanto, foram analisados 20 cortes histológicos de cada espécime.

Tabela 6 - Classificação para intensidade de reação inflamatória presente nos espécimes.

Classificação	Escore
ausente	0
muito leve	1
leve	2
moderada	3
intensa	4

Fonte: Norma ASTM F981-04

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Statistica 8.0. O teste de ANOVA foi realizado para avaliar os valores atribuídos a reação inflamatória presente em cada espécime seguindo a Tabela 6, nos respectivos períodos 7, 15, 30 e 120 dias. O pós-teste empregado foi para comparações múltiplas foi Teste de Tukey. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

Para análise estatística da degradação das membranas, primeiramente foi medido a espessura da membrana de cada respectivo espécime em cinco regiões diferentes em um mesmo corte histológico escolhido aleatoriamente dentre os vinte cortes de cada espécime. Os períodos de análise foram 7, 15, 30 e 120 dias. Essas medidas foram realizadas utilizando o programa ImageJ. Os resultados também foram analisados pelo Statistica 8.0. empregando o teste de ANOVA e o pós-teste Teste de Tukey. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese e purificação dos peptídeos OGP e OGP [10-14]

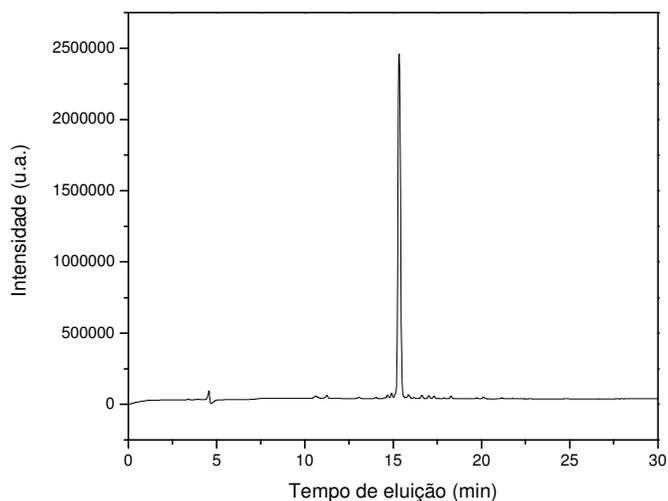
A síntese dos peptídeos, OGP e OGP [10-14], foi desenvolvida pela metodologia da fase sólida (SPFS) utilizando 500 mg de resina Fmoc-Gly-Wang (grau de substituição de $0,66 \text{ mmol.g}^{-1}$) em seringa de polipropileno de 10 mL, equipada com um filtro de polietileno poroso acoplada a um sistema à vácuo com frasco coletor de resíduos.

Após os acoplamentos dos primeiros cinco aminoácidos, a massa obtida na síntese foi de 720 mg, a qual foi dividida em duas frações iguais de 360 mg. A primeira fração foi desprotegida resultando em 304 mg de peptidil-resina, e com a segunda fração prosseguiu-se com o processo da síntese da sequência do OGP, que após desproteção resultou em 525 mg de peptidil-resina.

Cada uma das peptidil-resinas resultante do processo sintético foi submetida ao processo de clivagem utilizando 1 mL de solução de clivagem (94,5% TFA, 2,5% EDT, 0,5% tioanisol e 2,5% água deionizada) para cada 100 mg de peptidil-resina, a 25°C por 2 h sob agitação. Após o procedimento de clivagem foi realizada a extração dos respectivos peptídeos OGP e OGP [10-14] com ácido acético 10% em sistemas de seringas de polipropileno de 5 mL, equipadas com um filtro de polietileno poroso acopladas a um sistema de vácuo com frasco coletor para cada um dos peptídeos extraídos. O extrato bruto de cada peptídeo foi liofilizado e o valor da massa obtida para OGP e OGP [10-14] foram 21,7 mg e 3,7 mg, respectivamente.

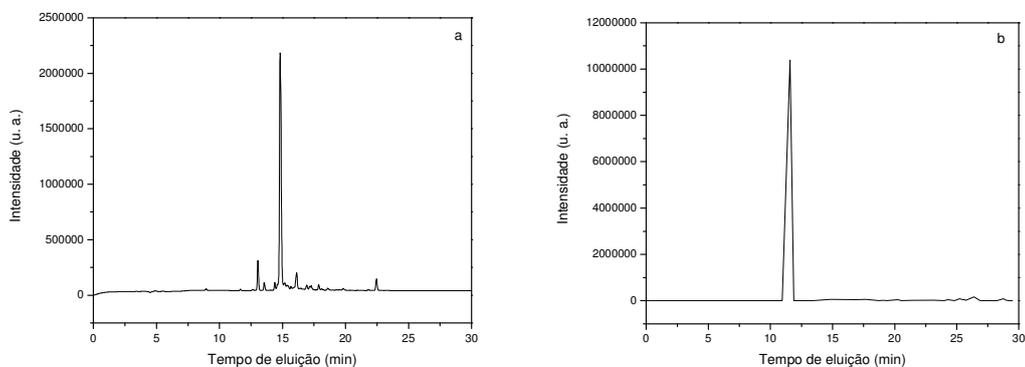
Os peptídeos assim obtidos foram submetidos à análise qualitativa em HPLC, e o perfil cromatográfico do extrato bruto do OGP [10-14] apresentou um pico único com porcentagem de pureza relativa de 97%; desta forma, devido ao valor da massa bruta deste peptídeo ter sido relativamente baixa, optou-se por não prosseguir com o processo de purificação em escala semi-preparativa, sendo esta massa considerada pura (Figura 11).

Figura 11 - Cromatograma obtido em escala analítica do peptídeo OGP [10-14].



A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos na análise do OGP, foi definida a condição relativa à concentração de solvente para purificação do peptídeo em escala semi-preparativa. Os cromatogramas obtidos antes e após o processo de purificação estão representados na Figura 12.

Figura 12 - Cromatogramas obtidos em escala analítica do peptídeo OGP em a: bruto e em b: purificado.



O perfil cromatográfico do OGP puro apresentou um pico único em relação ao cromatograma observado a partir da análise do extrato bruto. O parâmetro, tempo de retenção do OGP purificado foi mantido em relação ao pico correspondente ao OGP bruto (dados comprovados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, CL/ESI-MS).

O rendimento da purificação foi calculado através de uma relação com a massa do peptídeo em seu estado bruto. Os valores de rendimento da purificação e as purezas relativas dos peptídeos estão exemplificados na Tabela 7.

O valor de rendimento da purificação do OGP, e o valor da massa do OGP [10-14], embora baixos, é coerente com o processo de purificação de peptídeos. Os resultados de pureza relativa do peptídeo indicam que os métodos desenvolvidos para essa finalidade foram satisfatórios.

Tabela 7 - Rendimento da purificação e pureza relativa do OGP [10-14] e do OGP.

Peptídeo	Massa - peptídeo bruto (mg)	Massa - peptídeo após purificação (mg)	Rendimento da purificação (%)	Pureza relativa (%)
OGP [10-14]	3,7	-----	-----	97
OGP	21,7	5,2	24	100

3.1.1 Caracterização dos peptídeos OGP [10-14] e OGP

A identidade dos peptídeos OGP [10-14] e OGP foi confirmada por determinação das correspondentes massas moleculares, 499,5 e 1523,5 g.mol⁻¹, determinada pela técnica ES-MS positivo [ES m/z = 500 (M)] e [ES m/z = 1525 (M) e 763 (M+2H)⁺²], respectivamente.

Os resultados obtidos nas análises de aminoácidos para determinação da proporção relativa de cada um dos aminoácidos utilizados para a síntese dos peptídeos OGP e OGP [10-14] foram próximos aos valores teóricos. O aminoácido treonina pode sofrer degradação durante a hidrólise ácida o que pode explicar o aumento da diferença entre os valores teóricos e obtidos.

Contudo, os resultados mostraram que os procedimentos utilizados para a síntese das sequências, desproteção, clivagem e purificação foram obtidos com sucesso, levando à obtenção das sequências desejadas, sendo confirmadas através

dos dados de pureza relativa, massa molecular e análise de aminoácidos dos produtos sintetizados.

3.2 Síntese e purificação do peptídeo OGP marcado com carboxifluoresceína

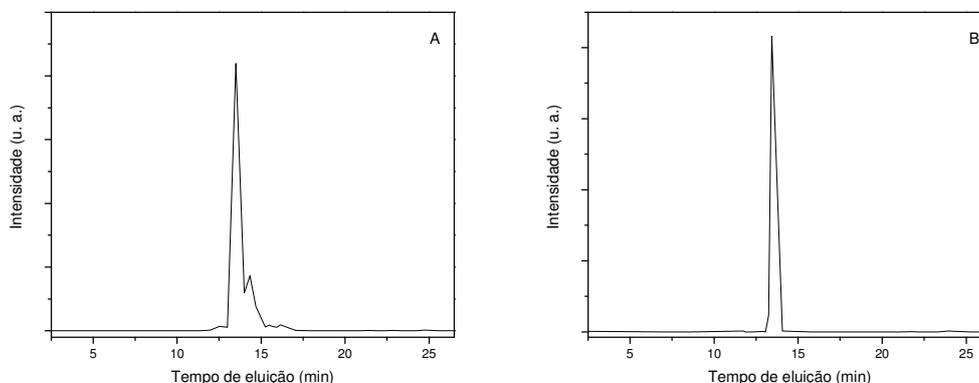
A síntese do peptídeo OGP marcado com 5,6-carboxifluoresceína foi desenvolvida pela metodologia da fase sólida (SPFS) em 1g de resina Fmoc-Gly-Wang (grau de substituição de $0,55 \text{ mmol.g}^{-1}$) em seringa de polipropileno de 10 mL, equipada com um filtro de polietileno poroso acoplada a um sistema a vácuo com frasco coletor de resíduos. Após os acoplamentos dos resíduos de aminoácidos, a massa de total de peptidil-resina foi de 1,73 g, cuja massa foi dividida em duas partes, e uma delas (968 mg) foi utilizada para acoplar a carboxifluoresceína (CF). Decorrido o acoplamento da CF foi realizado o processo de clivagem de uma fração da peptidil-resina marcada, e em seguida a extração do peptídeo, OGP-CF, em sistema de seringa de polipropileno de 10 mL, equipada com um filtro de polietileno poroso acoplada a um sistema a vácuo com frasco coletor para o peptídeo extraído. O extrato bruto do peptídeo foi liofilizado e o valor da massa obtida OGP-CF foi de 87 mg.

O peptídeo assim obtido foi submetido à análise qualitativa em HPLC; o perfil cromatográfico do extrato bruto do OGP-CF está apresentado na Figura 13A. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos na análise do OGP-CF, foi definida a condição relativa à concentração de solvente para purificação do peptídeo em escala semi-preparativa. O cromatograma obtido após o processo de purificação está representado na Figura 13B.

O perfil cromatográfico do OGP-CF puro apresentou um pico único em relação ao cromatograma observado a partir da análise do extrato bruto. O parâmetro tempo de retenção do OGP-CF purificado foi mantido em relação ao pico correspondente ao OGP-CF bruto.

O rendimento da purificação foi calculado através de uma relação com a massa do peptídeo em seu estado bruto. Os valores de rendimento da purificação e a pureza relativa do peptídeo OGP-CF foram 33,3% e 95% respectivamente.

Figura 13 - Cromatogramas obtidos em escala analítica do peptídeo OGP-CF (A – bruto; B – purificado).



O valor de rendimento da purificação e o valor da massa do OGP-CF (29 mg), embora baixos, é coerente com o processo de purificação de peptídeos. Os resultados de pureza relativa do peptídeo indicam que os métodos desenvolvidos com essa finalidade foram satisfatórios. A identidade do peptídeo OGP-CF foi confirmada por determinação da correspondente massa molecular, $1882,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, determinada pela técnica ES-MS positivo [ES $m/z = 1882 \text{ (M)}$ e $942 \text{ (M}+2\text{H)}^{+2}$], respectivamente.

3.3 Determinação da liberação do peptídeo nos compósitos

A liberação do peptídeo OGP-CF dos respectivos compósitos, foi avaliada por espectroscopia de fluorescência, sendo inicialmente traçado o espectro de fluorescência do peptídeo livre (Figura 14A), a fim de determinar o comprimento de onda máximo de emissão, sendo fixado o monocromador de excitação a 492 nm (obtido por espectrofotometria UV-Vis). Fixando os comprimentos de onda de excitação a 492 nm e de emissão a 520 nm, foi obtida uma curva padrão de fluorescência do OGP-CF, a 37°C (Figura 14B) para auxiliar na quantificação do peptídeo liberado dos respectivos compósitos, empregando a metodologia descrita no item 2.3.2.1. A liberação *in vitro* do peptídeo OGP-CF da membrana CB foi, portanto, monitorada por espectroscopia de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 492 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) a 37°C por um período de 72 h em circuito fechado com fluxo contínuo em solução PBS (pH 7,2). A Figura 15 mostra que a quantidade de peptídeo OGP-CF foi

liberada gradualmente em até 10 h, sendo a quantidade liberada equivalente a 60% do valor teórico incorporado à membrana de CB; a partir deste período a concentração do peptídeo liberado manteve-se constante.

Figura 14 – **A:** Espectro de fluorescência do peptídeo OGP-CF. **B:** curva padrão OGP-CF, mostrando a equação da reta e o coeficiente de correlação.

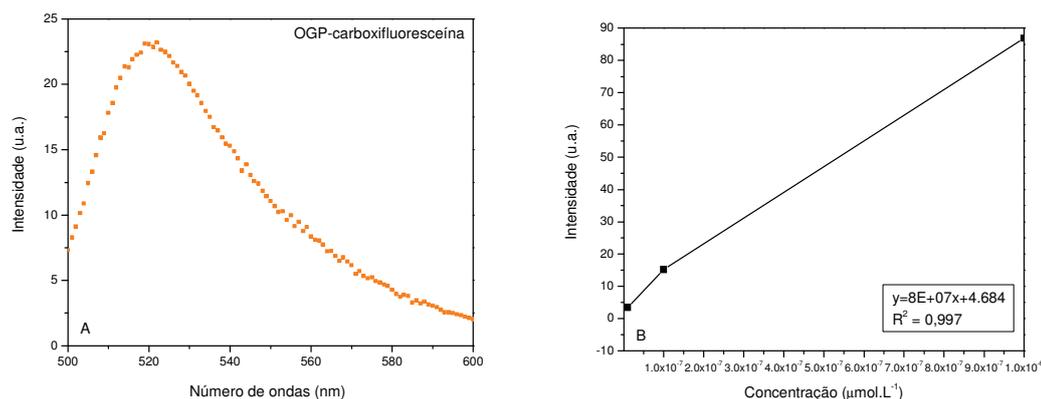
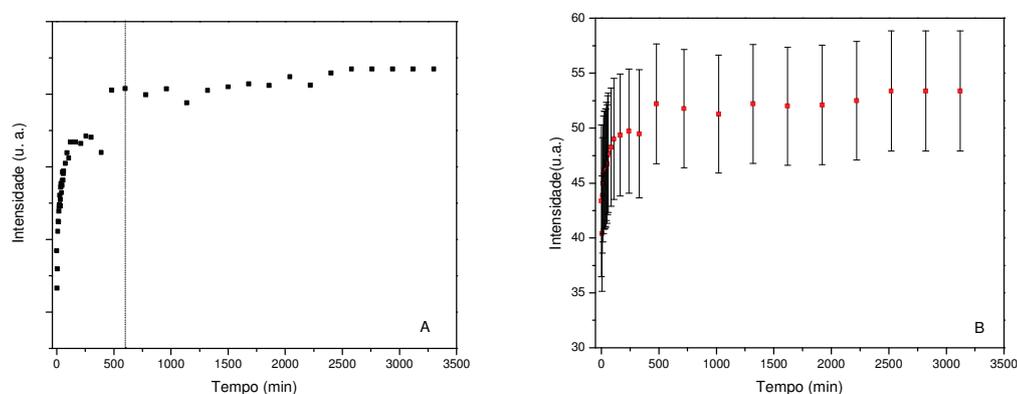


Figura 15 – Curva de liberação do peptídeo OGP-CF adsorvido na membrana CB; em A, a reta pontilhada indicando a liberação máxima (600 min) deste peptídeo no sistema; em B, curva de liberação com valores das médias e as barras indicando erro padrão para experimento em triplicata.



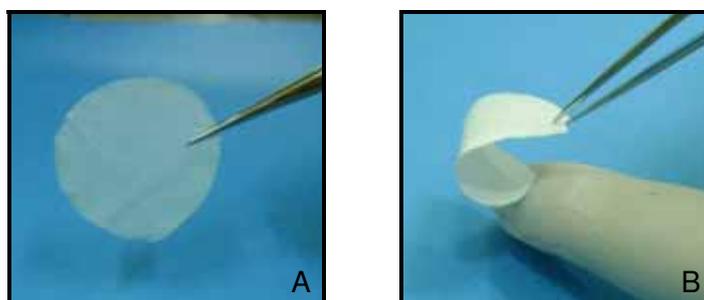
Desta forma, sugere-se que a quantidade do peptídeo incorporado à membrana de CB foi de cerca de 60% da solução utilizada para a imersão da amostra, e que 100% da quantidade incorporada, foi liberada para o sistema após 10 h. Em estudos de incorporação de antibióticos, Wei et al.(2011) sugerem que a estrutura fibrilar nanométrica tridimensional característica da CB, pode atribuir este comportamento de liberação a este polímero.

Os demais compósitos também apresentaram comportamento semelhante, exibindo liberação máxima em um período de 10 h.

3.4 Caracterização dos compósitos

A Figura 16 mostra dois compósitos, CB-COL e (CB-COL)-HA, após o processamento de secagem em estufa a 37°C sob a forma de membranas.

Figura 16 – Compósitos após a secagem em estufa. A: membrana CB-COL e B: membrana (CB-COL)-HA.

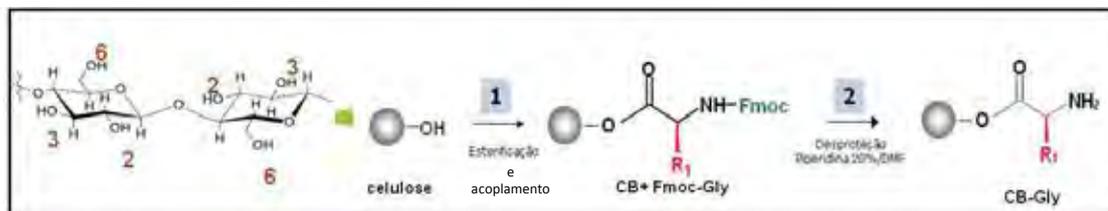


Na caracterização dos compósitos contendo peptídeos adsorvidos, foram utilizadas somente as amostras com OGP [10-14], obtidas antes e após a esterilização com radiação gama, pois o tipo do peptídeo adsorvido não interfere na maioria das técnicas de caracterização empregadas. Exceção se faz com a taxa de intumescimento e ângulo de contato que, o tipo de peptídeo e conseqüentemente sua seqüência exerce influencia no resultado final e na sua compreensão.

3.4.1. Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis) nas amostras CB/Fmoc-Gly

O valor obtido na análise quantitativa utilizada para determinar teor de Fmoc-Gly esterificado aos grupos OH da CB, nas amostras CB-COL, foi em média $0,0010 \pm 0,0004 \text{ mmol.g}^{-1}$. O grau de incorporação foi mensurado em três regiões diferentes de cada amostra, sendo utilizadas três amostras por análise. O comprimento de onda utilizado foi 290 nm. A Figura 17 ilustra um esquema da reação de esterificação entre os grupos hidroxilas da CB e os grupos carboxílicos do aminoácido protegido Fmoc-Gly.

Figura 17 – Reação de esterificação esquemática entre os grupos OH da CB com os grupos COOH do Fmoc-Gly (passo 1). Obtenção da CB modificada e pronta para acoplamento do colágeno (passo 2).



3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)

3.4.2.1 Membrana de celulose bacteriana

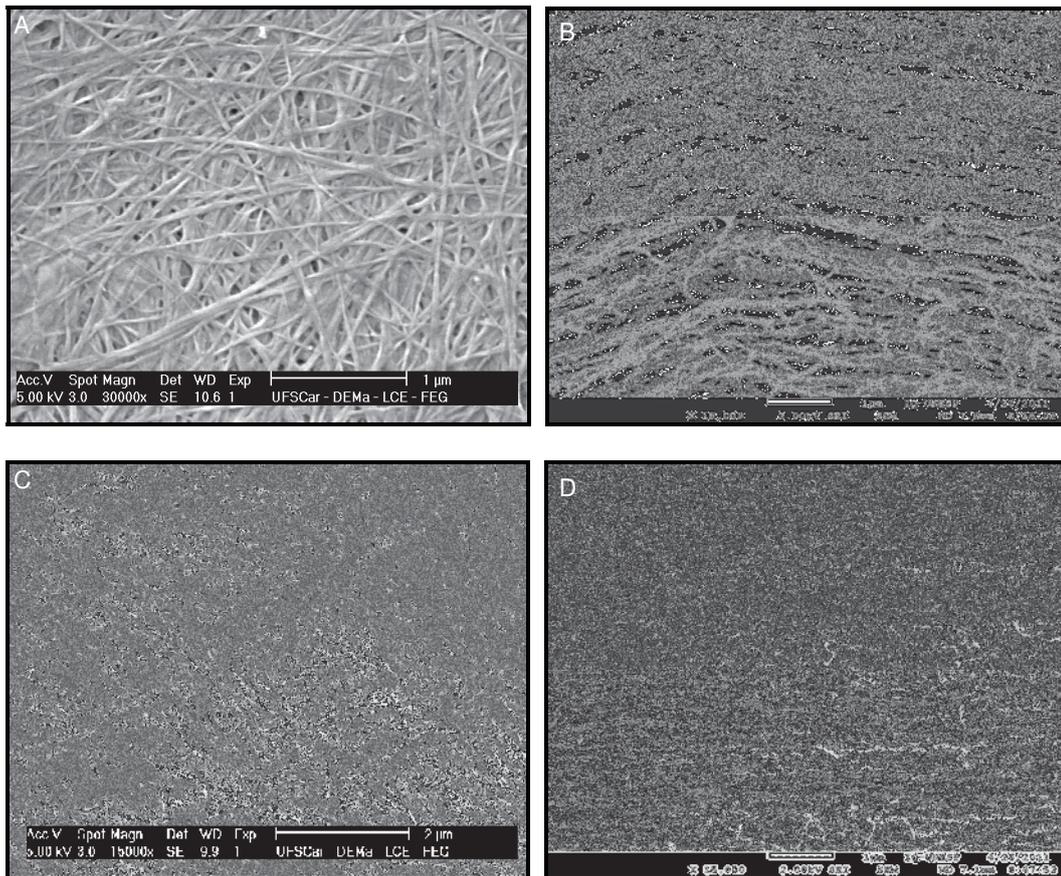
A Figura 18A mostra uma micrografia típica da membrana de CB seca, a qual se observa um agregado de cadeias de celulose numa estrutura ultrafina formada por nanofibras longas e contínuas (sistema nanométrico). A análise do tamanho das fibras realizado com o programa ImageJ, revelou que a amostra de CB apresentou fibras na ordem de 11 a 56 nm em espessura (média de 27 nm). A micrografia de MEV da superfície da membrana CB OGP [10-14] mostrou que a metodologia empregada para a incorporação do peptídeo não altera a morfologia de superfície das membranas após funcionalização (Figura 18C). As Figuras 18B e 18D mostram a micrografia em seção transversal das amostras CB e CB OGP [10-14], respectivamente; nessas imagens foi possível observar que a celulose é sintetizada em camadas de redes de nanofibrilas.

3.4.2.2 Compósito celulose bacteriana – colágeno (CB-COL)

A micrografia da superfície do compósito CB-COL (Figura 19A) revelou que o colágeno preencheu e recobriu de forma homogênea toda estrutura nanométrica da CB (Figura 18A). A metodologia empregada para obtenção da membrana CB-COL permitiu desenvolver uma membrana com superfície mais compactada, com o preenchimento dos poros. Esta é uma característica importante para uma membrana a ser empregada como barreira mecânica em regeneração óssea guiada (ROG), pois poderá favorecer ainda mais a função de oclusão celular, impedindo a

infiltração de células mesenquimais indiferenciadas e de fibroblastos, bem como, a invaginação de tecido conjuntivo ao defeito ósseo com mais eficácia.

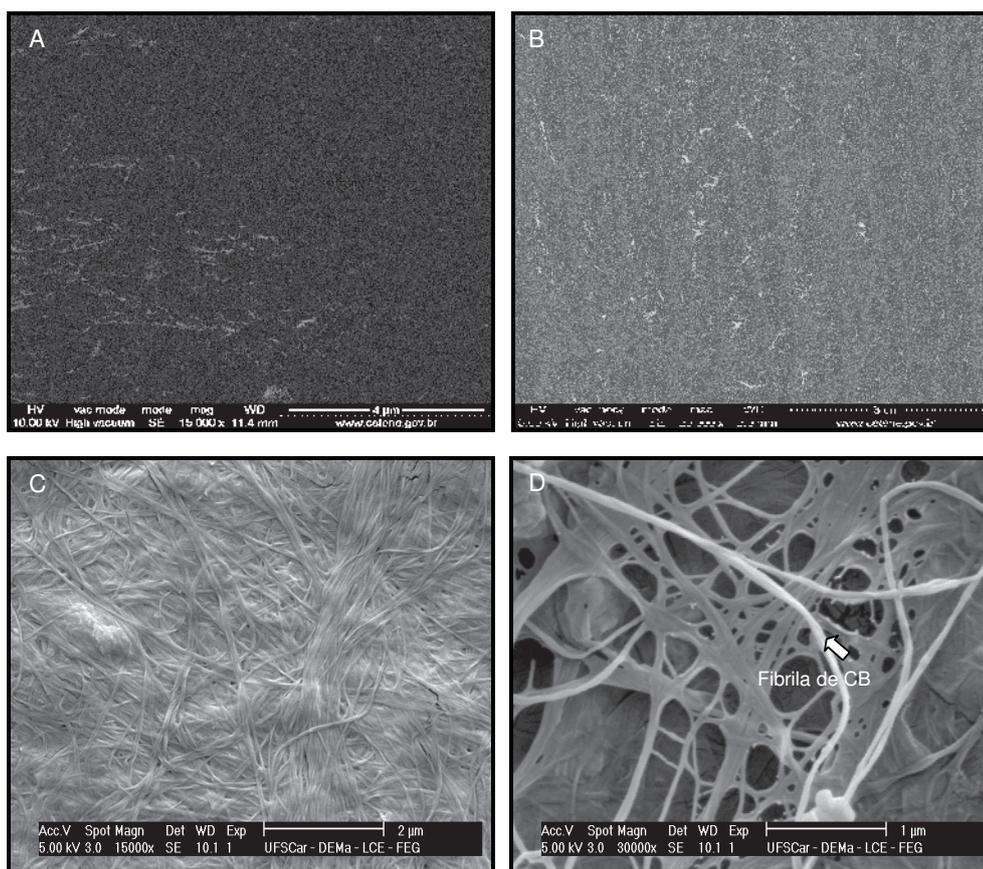
Figura 18 - Micrografia de MEV das membranas de CB e CB OGP [10-14]: A: superfície da CB e B: seção transversal da CB; C: superfície da CB OGP [10-14] e D: seção transversal da CB OGP [10-14].



Na seção transversal (Figura 19B) pode-se observar que as fibras de CB recobertas com colágeno se orientaram em camadas. A micrografia de MEV da superfície da membrana CB-COL OGP [10-14] mostrou que a metodologia empregada para a incorporação dos peptídeos alterou algumas regiões da superfície da respectiva membrana, conferindo regiões porosas à superfície, mas em sua totalidade a superfície da membrana CB-COL OGP [10-14] apresentou uma morfologia mais compacta como observado no composto CB-COL. Sugere-se que as regiões porosas formadas foi devido ao composto CB-COL ter ficado imerso na

solução peptídica por 72 h, favorecendo a formação destas regiões (Figura 19C e 19D).

Figura 19 - Micrografias de MEV mostrando a superfície da membrana do compósito CB-COL (A), seção transversal do compósito CB-COL (B), superfície da membrana do compósito CB-COL OGP [10-14] (C) e regiões com porosidade da superfície da membrana do compósito CB-COL OGP [10-14] (D).



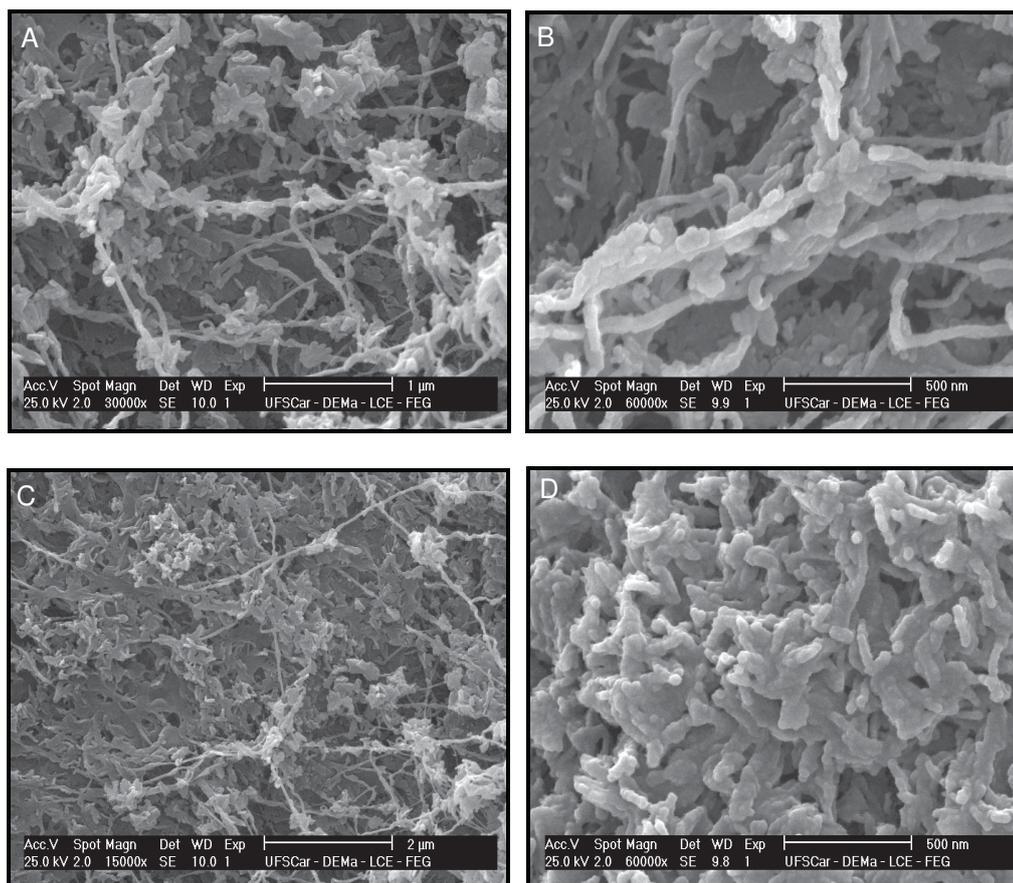
3.4.2.2 Compósito celulose bacteriana – hidroxiapatita (CB-HA)

A Figura 20 mostra a formação do compósito de CB-HA. As micrografias de MEV da superfície desta amostra seca revelaram cristais de HA de ordem nanométrica recobrendo as fibras da CB de forma homogênea e se observou também poros distribuídos regularmente na superfície da membrana. Típicos cristais de apatita nanométricos foram observados em forma globular e em bastonetes (“rods”) característicos de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) (MOREJON-ALONSO et al., 2008; SHI et al., 2009) ou carbonato-apatita (KAFLAK;

KOŁODZIEJSKI, 2008) (Figuras 20A e 20B). Estes cristais cresceram mais lateralmente ao redor das nanofibrilas. A substituição dos íons PO_4^{3-} por íons CO_3^{2-} resultou na diminuição do tamanho do cristal e também alterou a morfologia do cristal, de forma de agulha para “*rods*” e em seguida para forma globular (KAFLAK; KOŁODZIEJSKI, 2008). Nesta amostra CB-HA a morfologia dos cristais observados correspondem tanto para uma CDHA quanto para uma carbonato-apatita.

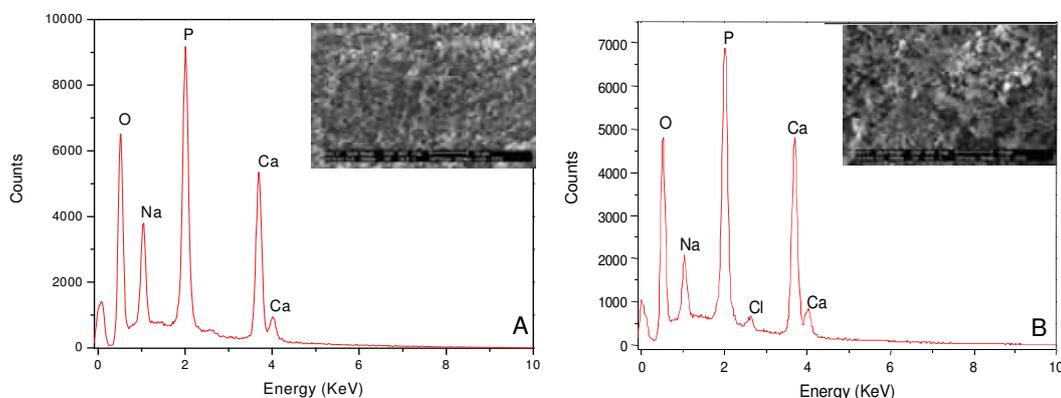
A mesma morfologia globular para os cristais de apatita foi observada no compósito CB-HA OGP [10-14] como pode ser observado nas Figuras 20C e 20D. Estes resultados comprovaram que a metodologia de incorporação dos peptídeos também não alterou a morfologia dos cristais de apatita.

Figura 20. Micrografias de MEV mostrando em A e B superfície da membrana do compósito CB-HA nos aumentos de 30.000x e 60.000x respectivamente, e em C e D micrografias de MEV superfície da membrana do compósito CB-HA OGP [10-14] nos aumentos de 15.000x e 60.000x respectivamente.



Os dados do EDS mostraram que as razões molares Ca/P qualitativamente mensuradas estão de acordo com a morfologia dos cristais de HA observados para as amostras CB-HA e CB-HA OGP [10-14]. Para o compósito CB-HA foi obtido uma razão molar Ca/P entre 1,50-1,53 com uma média de 1,50, dados estes referente à CDHA (Figura 21 A). No compósito CB-HA OGP [10-14] foi observado uma razão molar Ca/P entre 1,27-1,37 dados estes referentes ao octafosfato de cálcio (OCP) - $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$, cuja razão molar Ca/P foi de 1,33, ou ainda, esta razão molar Ca/P pode ser referente a uma carbonato-apatita (TSENG et al., 2007) (Figura 21B). Esta diminuição na razão molar Ca/P pode ser devido ao início da dissolução dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , ou ainda, a substituição dos íons Ca^{2+} por Na^+ , ou a substituição de íons PO_4^{3-} por CO_3^{2-} ; esta substituição reflete-se no mesmo percentual de perda para o conteúdo de Ca durante o processo de incorporação dos peptídeos. Apesar destas análises de EDS serem qualitativas pode-se sugerir que a incorporação altera a razão molar Ca/P, mas não a morfologia dos cristais.

Figura 21 - Espectro de EDS para CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B). Aumento 2.000x.

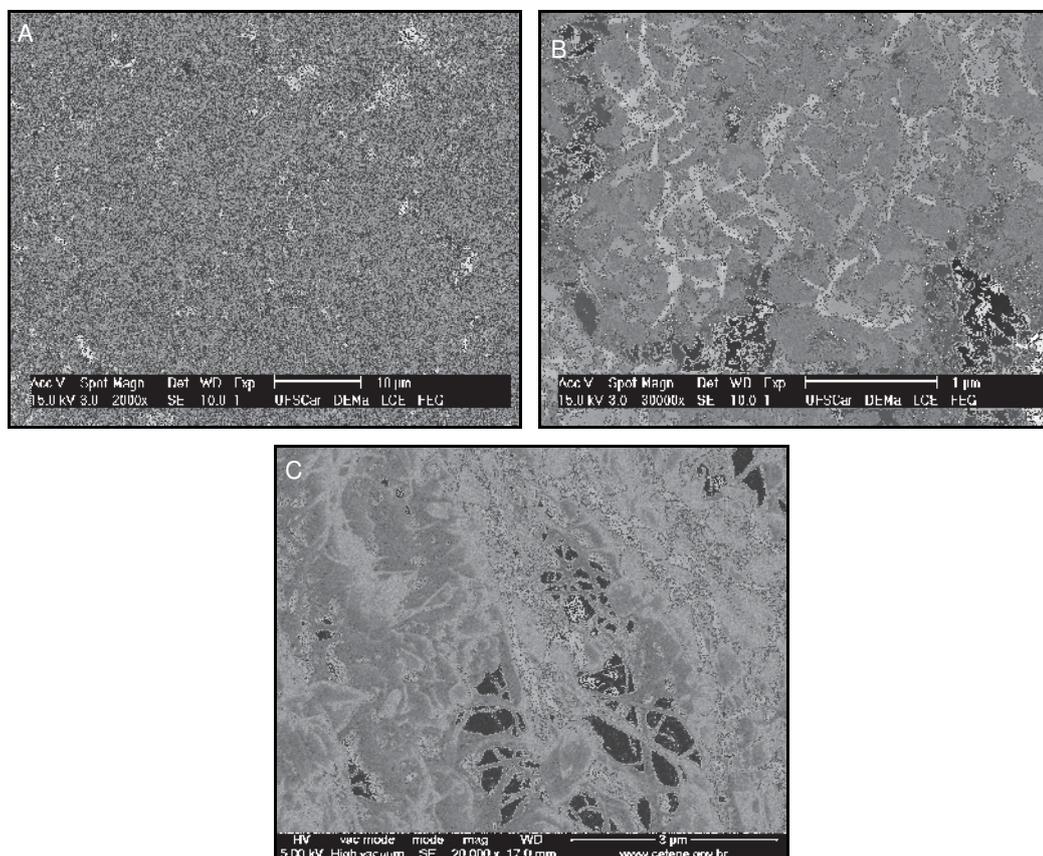


3.4.2.3 Compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL

Nas Figuras 22 e 23 estão representadas as micrografias de MEV da superfície dos compósitos (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP [10-14].

A Figura 22 revela que a superfície da membrana foi recoberta com nanocristais de HA, sendo que o colágeno e os cristais de HA preencheram e recobriram de forma homogênea toda estrutura nanométrica porosa da CB.

Figura 22 - Micrografias de MEV mostrando em (A) e (B) a superfície da membrana do composto (CB-COL)-HA, e em (C), imagem de MEV em seção transversal do composto (CB-COL)-HA.

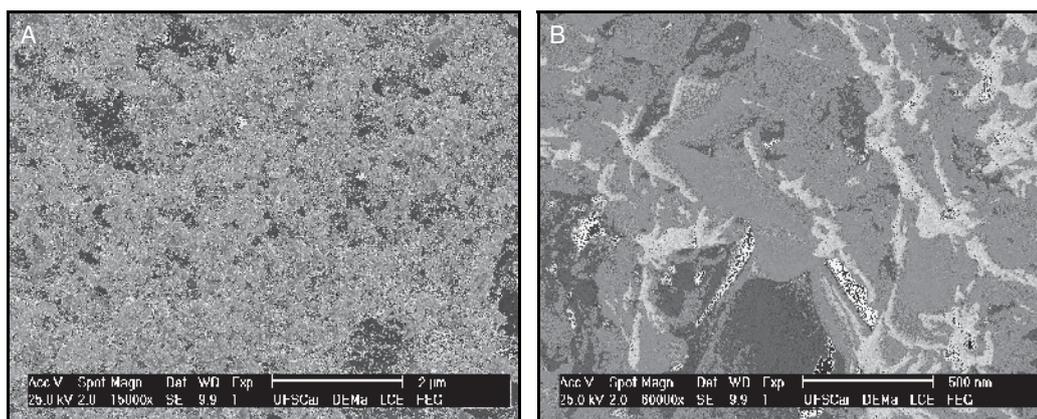


As partículas de HA aparecem em forma de esferas uniformes recobrendo toda a superfície da CB (Figura 22A). Estas esferas são compostas de cristalitos de HA com morfologia tipo agulha ou lamelar (Figura 22B), característicos da fase fosfato de octacálcio (OCP) (HUTCHENS et al., 2006; HONDA et al., 2007; NGE; SUGIYAMA, 2007), porém apresentam-se de forma mais arredondada do que um cristal de OCP puro. Estes aspectos morfológicos indicam que as moléculas de apatita estão fornecendo sítios de nucleação secundária para formação de apatita adicional, formando assim partículas interconectadas (HUTCHENS et al., 2006). Como já descrito, a substituição dos íons PO_4^{3-} por íons CO_3^{2-} resultou na redução no tamanho do cristal e também na alteração da morfologia do cristal, de agulha para “rods” e posteriormente para forma globular (KAFLAK; KOLODZIEJSKI, 2008), corroborando a morfologia dos cristais de HA observados no interior do composto, que apresentaram em forma globular similar a CDHA ou carbonato-apatita (Figura

22C). Além disso, a presença de polímeros funcionalizados com peptídeos promoveu a nucleação e crescimento de fase inorgânica nanocristalina similar à apatita óssea e com morfologia dos cristais de carbonato-apatita de forma de placas alongadas (HU et al., 2009). Desta forma, observou-se que a maioria dos cristais formados é da fase carbonato-apatita para o compósito (CB-COL)-HA.

Verificou-se na Figura 23 que a incorporação dos peptídeos ao compósito (CB-COL)-HA alterou a morfologia dos aglomerados esféricos dos cristais de apatita observados em menor aumento na Figura 23A. No compósito (CB-COL)-HA OGP [10-14] foram observados aglomerados de cristais de apatita tipo bastões (“rods”), corroborando aos dados discutidos acima, os quais sugerem que a presença de peptídeos promove a nucleação e crescimento de fase inorgânica nanocristalina similar à apatita óssea e com morfologia dos cristais de carbonato-apatita de forma de placas alongadas (HU et al., 2009). Entretanto, em maior aumento (Figura 23B) observa-se que os cristais de apatita são compostos por cristalitos com morfologia tipo agulha ou lamelar, similares aos observados no compósito (CB-COL)-HA, e também observa-se presença de cristais de apatita tipo bastonetes. Neste caso, a imersão do compósito (CB-COL)-HA em solução peptídica por 72 h favoreceu a formação destes tipos de cristais de apatita.

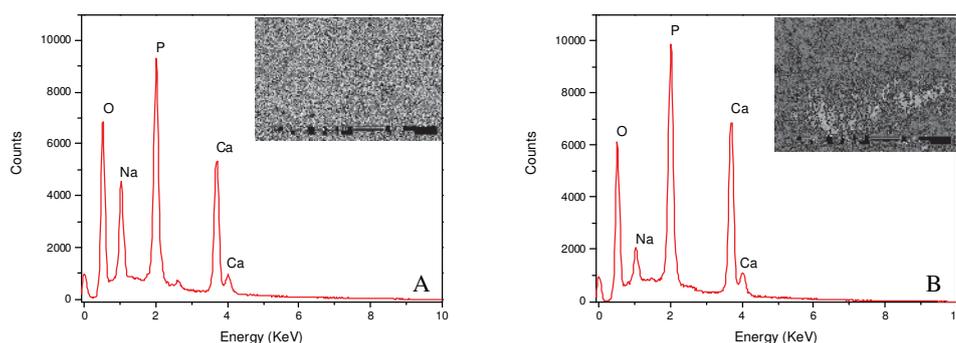
Figura 23. Micrografias de MEV mostrando em A (15.000x) e B (60.000x) a superfície da membrana do compósito (CB-COL)-HA OGP [10-14].



Apesar dos dados de EDS serem qualitativos, pode-se verificar para (CB-COL)-HA uma razão molar Ca/P igual a 1,36, próximo ao fosfato de octacálcio (OCP), cuja razão molar Ca/P é 1,33; ou ainda, pode ser uma fase de transição do

OCP para fosfato de cálcio amorfo (Figura 24A). Porém, Tseng et al. (2007) observaram valores de razão molar Ca/P, para dentina de rato até cinco meses, similar ao que foi observado neste estudo. Os autores concluíram que a razão molar Ca/P, com valor abaixo de uma CDHA, pode ser justificada devido à substituição de íons PO_4^{3-} por CO_3^{2-} e esta substituição refletiu na mesma porcentagem de perda para o conteúdo de Ca, o que levou a uma diminuição na razão molar Ca/P, justificando mais uma vez a presença de carbonato-apatita nesta amostra. Na amostra (CB-COL)-HA OGP [10-14] a razão molar Ca/P observada foi similar ao compósito (CB-COL)-HA; os valores mensurados foram entre 1,29 – 1,40 com uma média de 1,36, dados referentes a uma apatita em transição da fase OCP (Figura 24B).

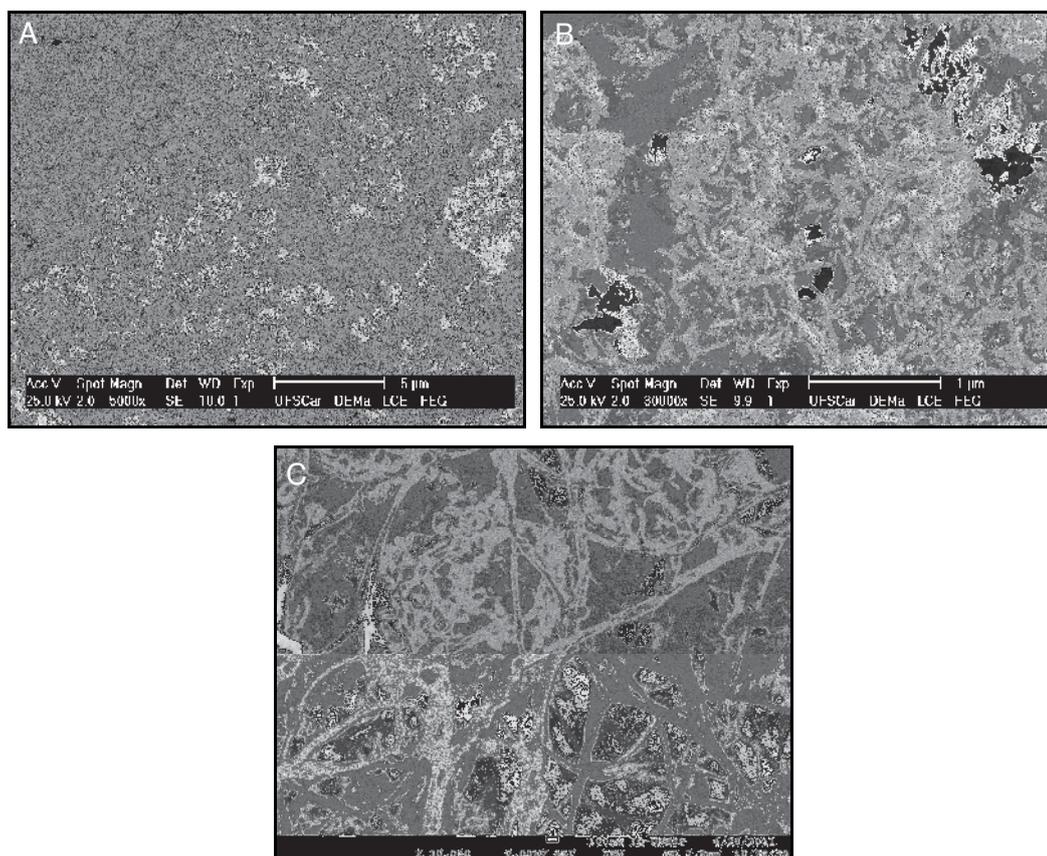
Figura 24 - Espectro de EDS para as amostras (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B). Aumento 2.000x.



Nas Figuras 25 e 26 a seguir, estão representadas as micrografias dos compósitos (CB-HA)-COL e (CB-HA)-COL OGP [10-14]. A Figura 25A mostrou a formação do compósito (CB-HA)-COL, com deposição de cristais de HA sobre as fibras de CB com morfologia diferente aos cristais de HA observados no compósito (CB-COL)-HA. Também foi possível observar o colágeno preenchendo os espaços criados pela deposição de HA do sistema, mostrando que a superfície da membrana foi recoberta de forma heterogênea pelo colágeno. Em um maior aumento observou-se que as esferas do compósito (CB-HA)-COL são compostas de cristalitos de HA com morfologia tipo “rods” e lamelar (Figuras 25B). Em uma imagem em seção transversal pôde-se observar aglomerados de cristais de apatita tipo placas alongadas (Figura 25C), corroborando aos dados discutidos anteriormente, os quais

sugerem que a presença de proteína promoveu a nucleação e crescimento de fase inorgânica nanocrystalina similar à apatita óssea e com morfologia dos cristais de carbonato-apatita de forma de placas alongadas. Além disso, na superfície do material, o colágeno do compósito (CB-HA)-COL favoreceu a nucleação e crescimento dos cristais de HA da fase OCP para CDHA em forma de “rods” hexagonais. Contrastando com o compósito precursor CB-HA, que não apresentou cristais com morfologia em forma lamelar, sugere-se que, com a adição de colágeno, os íons de cálcio e fosfatos ainda livres no sistema, podem ser induzidos a iniciarem uma nova formação e nucleação de cristais de apatita, sendo esta fase OCP amorfo.

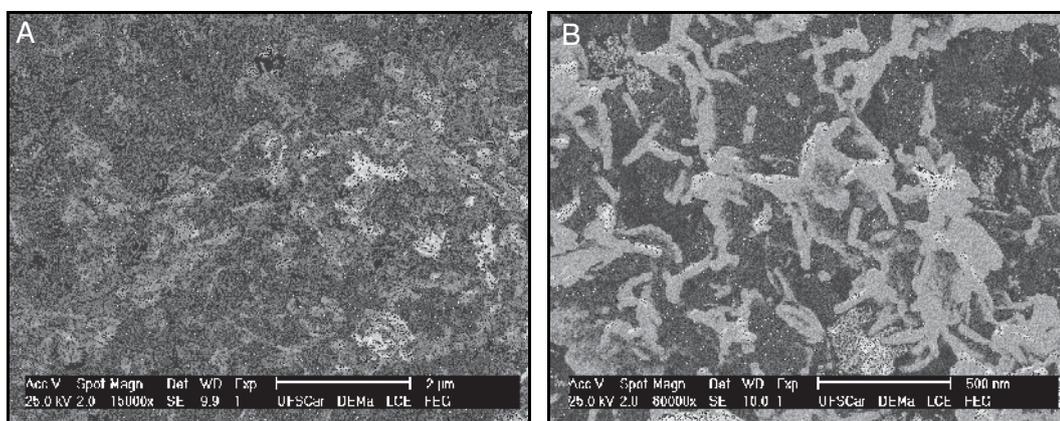
Figura 25 - Micrografias de MEV mostrando em (A) e (B) a superfície da membrana do compósito (CB-HA)-COL, e em (C), imagem de MEV em seção transversal do compósito (CB-HA)-COL.



A Figura 26 revelou que a incorporação dos peptídeos ao compósito (CB-HA)-COL alterou a morfologia dos aglomerados esféricos dos cristais de apatita, os quais apareceram mais densos como observado no compósito (CB-COL)-HA.

As micrografias em maior aumento revelaram que os cristais de apatita são compostos de cristalitos com morfologia tipo “rods” ou lamelar similares aos observados no compósito (CB-HA)-COL. Neste compósito foi possível observar também que a presença de peptídeo promoveu a nucleação e crescimento de fase inorgânica nanocristalina em forma de placas alongadas. Desta forma, a imersão do compósito (CB-HA)-COL em solução peptídica por 72 h promoveu a nucleação dos cristais de HA.

Figura 26 - Micrografias de MEV mostrando em A e B a superfície da membrana do compósito (CB-HA)-COL OGP [10-14].



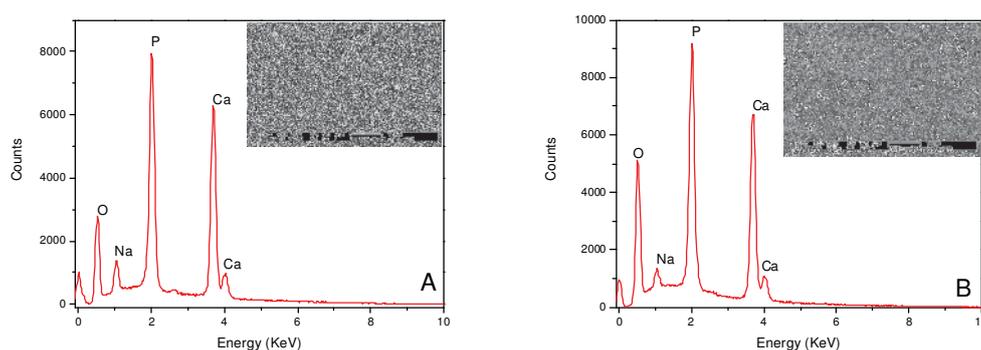
Estudos prévios têm constatado que grupos funcionais, tais como, hidroxilas, fosfatos e carboxílicos propiciam a nucleação de fases de apatitas (HARTGERINK et al., 2001; NGE; SUGIYAMA, 2007; WAN et al., 2007). Materiais com repetitivos padrões de grupos aniônicos e concentrados catiônicos promoveram a orientação de nucleação de cristais *in vivo* (HARTGERINK et al., 2001). Desta forma, a estrutura molecular da celulose bacteriana pode ter contribuído para deposição homogênea dos cristais de apatita. Os grupos hidroxilas da celulose têm dipolo negativo forte, os quais promovem a ligação dos cátions Ca^{2+} livres da solução de CaCl_2 e formam ligações coordenadas, e assim os íons PO_4^{3-} ligam-se ao cálcio associado a CB formando o núcleo inicial para formar as fases precursoras de apatita (HONG et al., 2006; HUTCHENS et al., 2006). Além disso, a CB é altamente porosa, embora estes poros sejam relativamente pequenos, de ordem nanométrica, permitem que os íons entrem livremente dentro da matriz favorecendo a formação de cristais de HA no interior de sua estrutura tridimensional.

Camadas de cristais de apatita mais uniformes foram observadas nos compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL sem peptídeos, as quais foram formadas por núcleos esféricos de cristais de apatita, sugerindo que a presença do colágeno, que contém inúmeros grupos carboxílicos, favoreça a nucleação e crescimento dos cristais. Neste caso, um número grande de núcleos cresceu competitivamente no compósito (CB-HA)-COL em relação ao compósito CB-HA.

Desta forma, as imagens revelaram que a funcionalização da celulose bacteriana favorece uma maior precipitação de apatita, ou ainda promove a formação da fase precursora de HA, o OCP, e ainda, a composição da superfície, estrutura e o meio afetam diretamente o processo de formação da apatita.

Na amostra (CB-HA)-COL o EDS revelou uma razão molar Ca/P entre 1,42 - 1,5 com uma média de 1,40, dados estes referentes à CDHA, cuja razão molar Ca/P situa-se entre 1,4 - 1,5 (Figura 27A). Para a amostra (CB-HA)-COL OGP [10-14] a razão molar Ca/P foi entre 1,40 - 1,42 (Figura 27B) com uma média de 1,41, ou seja, similar aos dados apresentados para o compósito (CB-HA)-COL. Ambos os valores para razão molar Ca/P foram similares, dados estes que confirmam a MEV que não houve alteração na fase de apatita precipitada nos dois compósitos, mesmo após a incorporação dos peptídeos.

Figura 27 - Espectro de EDS para as amostras (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B). Aumento 2.000x.

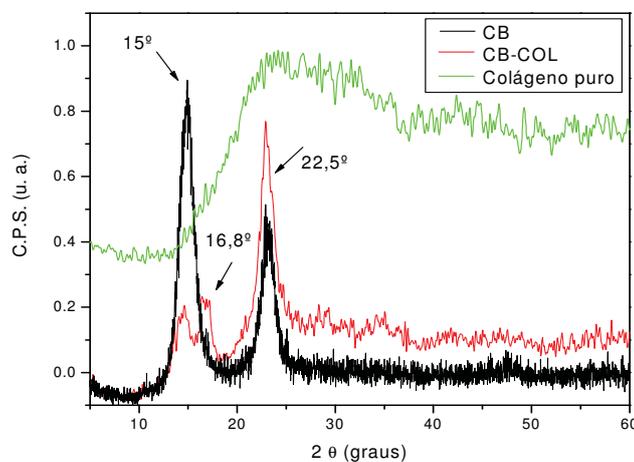


3.4.3 Difratometria de raios-X (DRX)

3.4.3.1 Compósito celulose bacteriana – COL (CB-COL)

Os difratogramas de raios-X das membranas de CB e de CB-COL e do colágeno tipo I estão representados na Figura 28. Os picos para CB foram identificados como celulose nativa (PDF#50-2241 ICDD, PDF-2, *International Centre for Diffraction Data, Power Diffraction File-2*) e os picos característicos observados em $2\theta = 15^\circ$ e $22,5^\circ$ foram atribuídos as fases da celulose, 1α e 1β , respectivamente ($100_{1\alpha}$, $110_{1\beta}$ e $010_{1\beta}$ planos em 15° e $110_{1\alpha}$ e $200_{1\beta}$ em $22,5^\circ$) (BARUD et al., 2008). As fases cristalinas típicas da CB foram também observadas nas membranas de CB-COL. Os picos da difração em $2\theta = 15^\circ$ e $22,5^\circ$ são característicos da celulose. O padrão de DRX para o colágeno resultou em um halo em torno de $2\theta = 15^\circ - 35^\circ$, o qual é típico padrão de DRX de colágeno puro; mostrando ser um polímero bastante amorfo (ZHANG et al., 2004). Nota-se que o padrão de CB-COL não se trata de uma simples mistura de CB e COL, pois no padrão do DRX do compósito CB-COL observou-se o aparecimento de um novo pico ao redor $16,8^\circ$, sugerindo que a incorporação do colágeno afetou a cristalinidade da CB principalmente na região $2\theta = 15^\circ$; além disso, houve uma diminuição na intensidade dos picos da CB. Esta diminuição também pode estar relacionada à presença do colágeno inserido à estrutura de CB.

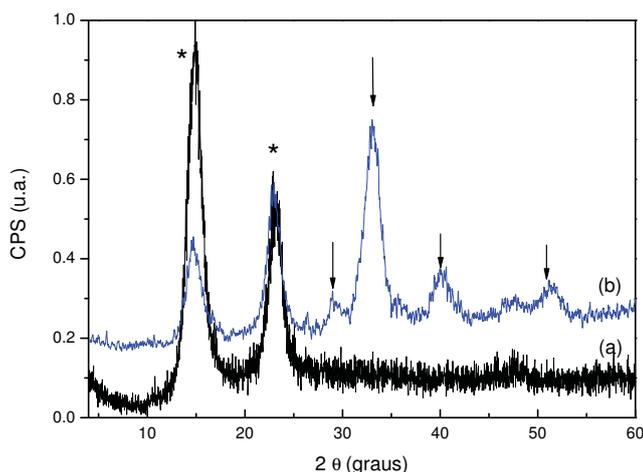
Figura 28 - Padrões de difração de DRX da CB, colágeno puro, CB-COL com os respectivos picos assinalados.



3.4.3.2 Compósito celulose bacteriana – hidroxiapatita (CB-HA)

A Figura 29 mostra os padrões de difração de raios-X (DRX) das membranas de CB e de CB-HA. Como no compósito CB-COL, as fases cristalinas típicas da CB foram também observadas no compósito CB-HA. Os picos da difração em $2\theta = 15^\circ$ e $22,5^\circ$ são atribuídos à celulose, fases 1α e 1β . Os dados do DRX revelaram fases de HA e CDHA no compósito CB-HA (fichas cristalográficas utilizadas ICDD – PDF-2: 55-0592 para HA e 46-0905 para CDHA), porém com os picos sobrepostos. Os picos assinalados com setas em $2\theta = 29^\circ$, 32° , $39,5^\circ$ e $51,2^\circ$ é referente à fase HA. Estes picos mostram que a HA depositada sobre a estrutura da CB é uma HA semicristalina. As sobreposições e o alargamento dos picos das fases de apatita indicam uma baixa cristalinidade, e os padrões de DRX observados para HA nestas amostras são muito similares ao padrão de DRX de apatitas de tecido ósseo, mostrando baixa cristalinidade (DANILCHENKO et al., 2004). Outro aspecto observado refere-se à cristalinidade da CB, que segundo (HUTCHENS et al., 2006) a diminuição na intensidade dos picos da CB é devido à deposição de HA sobre as nanofibras da CB que promoveu o rompimento das ligações de hidrogênio.

Figura 29 - Padrões de difração de DRX para as amostras CB (a) e CB-HA (b) com respectivos picos de difração assinalados; seta: picos referentes à CDHA e a HA e asterisco: picos referentes à CB.

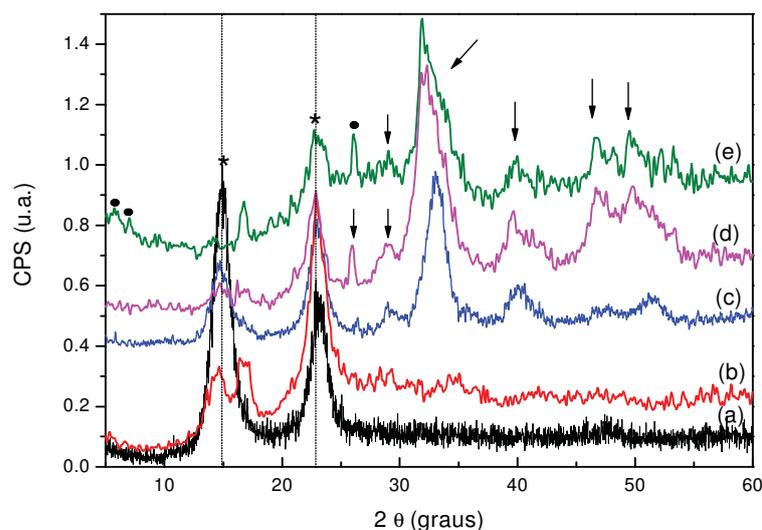


3.4.3.3 Compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL

A Figura 30 mostra os padrões de DRX para os compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL.

Para o compósito (CB-COL)-HA foram observadas as fases de HA e CDHA. As fichas cristalográficas utilizadas foram da base de dados ICDD-PDF-2, 55-0592 para HA e 46-0905 para CDHA. Contudo, os picos para estas fases também ficaram sobrepostos nos picos assinalados com setas em $2\theta = 29^\circ, 33^\circ, 39,5^\circ$; como no compósito CB-HA. Porém, os picos assinalados em $2\theta = 26^\circ, 32^\circ, 46,2^\circ$ e $49,5^\circ$ predominou a fase CDHA.

Figura 30 - Padrões de difração de DRX para as amostras CB (a), CB-COL (b), CB-HA (c), (CB-COL)-HA (d) e (CB-HA)-COL (e). Os picos de difração assinalados por seta: são picos referentes à CDHA e a HA, e os picos assinalados por asterisco: são picos referentes à CB; e os picos referentes ao OCP estão assinalados por ponto cheio (●).



No compósito (CB-HA)-COL foram observadas a presença das fases CDHA e OCP. As fichas cristalográficas utilizadas foram da base de dados ICDD-PDF-2, 46-0905 para CDHA e 44-0778 para OCP. Os picos referentes a estas duas fases CDHA e OCP também apareceram sobrepostos nos picos assinalados em $2\theta = 26^\circ, 39,5^\circ$, porém, a fase predominante no compósito foi CDHA. Na região em torno $2\theta = 32^\circ$ há indicativo da presença de CDHA e os picos em $2\theta = 4,9^\circ, 9,5^\circ$ e 26°

indicaram a presença de OCP no compósito (CB-HA)-COL. O caráter amorfo dos cristais revelou que a formação dos cristais de OCP foi precedida pela precipitação de ACP (TSENG et al., 2006). Entretanto, o alargamento dos picos de difração relacionados à HA pode sugerir que os cristais precipitados foram pequenos e de baixa cristalinidade. Sugere-se então que a fase inorgânica da (CB-COL)-HA e da (CB-HA)-COL mineralizada foi uma HA de baixa cristalinidade, similar a apatitas de tecido ósseo (DANILCHENKO et al., 2004) como descrito anteriormente para o padrão observado em CB-HA, dados estes que também corroboram a morfologia dos cristais observados para ambos os compósitos. A proporção da intensidade dos picos da membrana (CB-HA)-COL pode estar relacionada pelo fato do colágeno estar recobrando os cristais de HA previamente depositados sobre a estrutura da CB.

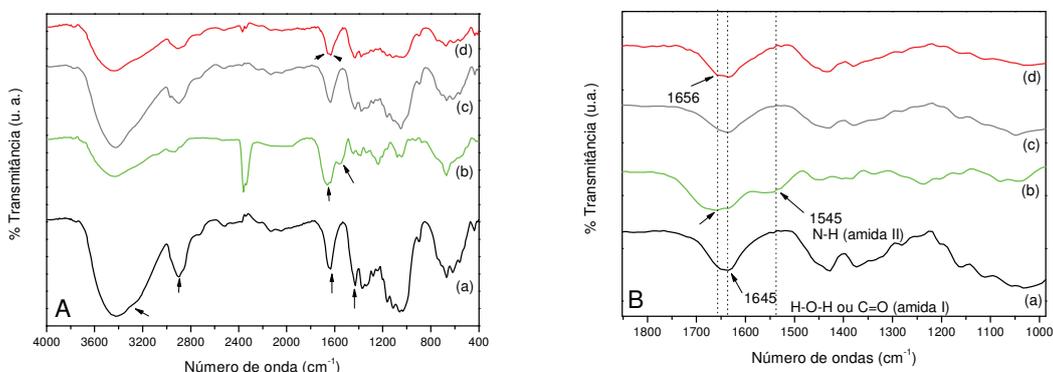
Os picos assinalados, em ambos os compósitos, em $2\theta = 16^\circ$ e $22,8^\circ$ são referentes à CB, os quais apareceram um pouco deslocados em relação aos dados de DRX da CB pura onde os picos são assinalados em $2\theta = 15^\circ$ e $22,5^\circ$, respectivamente. Os picos referentes à CB foram recobertos nestes compósitos. Na amostra (CB-COL)-HA a diminuição da intensidade dos picos é bastante evidente, pois está relacionada à incorporação do colágeno e a deposição de HA sobre as nanofibras da CB. Em osso natural, os nano-cristais de HA e o colágeno fazem uma sobreposição de quatro picos no alcance de $2\theta = 32^\circ$ a 35° (LIAO et al., 2004). Na amostra (CB-HA)-COL a menor intensidade dos picos característicos da celulose nativa, pode estar relacionado com a presença do colágeno na estrutura da CB conferindo um caráter amorfo ao compósito, ou ainda uma possível mudança no plano de cristalinidade da CB pela incorporação do colágeno ($2\theta = 16,8^\circ$)

3.4.4 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

3.4.4.1 Compósito celulose bacteriana – COL (CB-COL)

A Figura 31 apresenta espectros de infravermelho para as amostras CB, colágeno puro liofilizado, celulose bacteriana modificada com glicina e CB-COL.

Figura 31 - A: espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras: CB (a), colágeno puro (b), CB-glicina (c) e do composto CB-COL (d). **B:** espectro na região de 1800 – 1000 cm^{-1} mostrando as bandas da região de 1645 e 1545 cm^{-1} em maior detalhe.



As principais atribuições que caracterizam a celulose são: $\sim 3450\text{cm}^{-1}$ - estiramento OH; $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ - estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico CH_2 ; 2700 cm^{-1} - estiramento simétrico CH_2 ; 1645 cm^{-1} - deformação OH; 1432 cm^{-1} - deformação CH_2 ; $\sim 1370\text{ cm}^{-1}$ - deformação CH_3 ; $\sim 1332\text{ cm}^{-1}$ - deformação OH e na região de $1320 - 1030\text{ cm}^{-1}$ deformação CO. As principais bandas vibracionais relacionadas a proteínas estão representadas na Tabela 8.

A banda na região de $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ foi observada em todas as amostras, mas esta banda apresentou-se em menor intensidade para as amostras CB-Gly e CB-COL. Isto sugere a interação de glicina, nas amostras CB-Gly e CB-COL com as hidroxilas não esterificadas da celulose, indicando prováveis ligações de hidrogênio entre a CB e a glicina. Foi observado também um decréscimo na intensidade desta banda para o composto CB-COL, sugerindo que também houve interação do colágeno com grupos (OH) do sistema CB-Gly, que ainda estavam disponíveis após processo de reticulação com EDC. Nas amostras CB-Gly observou-se que a intensidade banda $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ diminui consideravelmente em relação à amostra CB, sugerindo a interação da glicina com a CB; e no espectro CB-COL houve um decréscimo na intensidade desta banda quando comparado ao sistema CB-Gly, o que sugere uma maior interação do colágeno com o sistema CB-Gly, empregado na obtenção da CB-COL.

Tabela 8 - Frequência das principais de celulose e de proteínas.

Número de onda (cm ⁻¹)		Vibração
Celulose	Proteína	
~3500	~3500	estiramento O-H
	3330-3280 (m)	estiramento N-H (amida)
2960 – 2850	2960 - 2850	estiramento C-H de grupos CH ₂ e CH ₃
1660-1650 (s)	1660-1650 (s)	deformação H-O-H de água adsorvida / estiramento C=O (amida I)
	1550-1540 (s)	deformação N-H (amida II)
1430		deformação de CH ₂ ou deformação no plano OH
	1425-1390 (w)	estiramento simétrico COO ⁻
1330		deformação C-H (CH ₃) ou deformação no plano OH
	1420 e 1300-1200	aparecem duas bandas de deformação, devido ao acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e a deformação de C-O
~1168		estiramento assimétrico nas ligações C-O-C
1040		estiramento simétrico de álcool primário C-O
~890		ligações β-glicosídicas entre unidades de glicose

O colágeno puro apresentou as bandas típicas para proteínas em torno de 1656 e 1547 cm⁻¹, referentes a estiramento C=O amida I e deformação N-H para amida II, respectivamente.

Nos espectros de CB, CB-Gly e CB-COL observaram-se uma banda típica em 1645 cm⁻¹ correspondente ao estiramento C=O de amida I. Esta banda foi observada com menor intensidade no espectro de CB-COL, e, apresentou um deslocamento para o vermelho de 11 cm⁻¹ (1656 cm⁻¹), confirmando a presença de colágeno. As bandas observadas ao redor de 1420 e 1320-1210 cm⁻¹ correspondente à deformação C-O de ácidos carboxílicos ou a estiramento simétrico de COO⁻ de aminoácidos livres estão presentes nos três sistemas contendo CB. Observou-se que a intensidade desta banda diminuiu com a presença de glicina e de colágeno, sugerindo a formação do sistema CB-Gly e do compósito CB-COL.

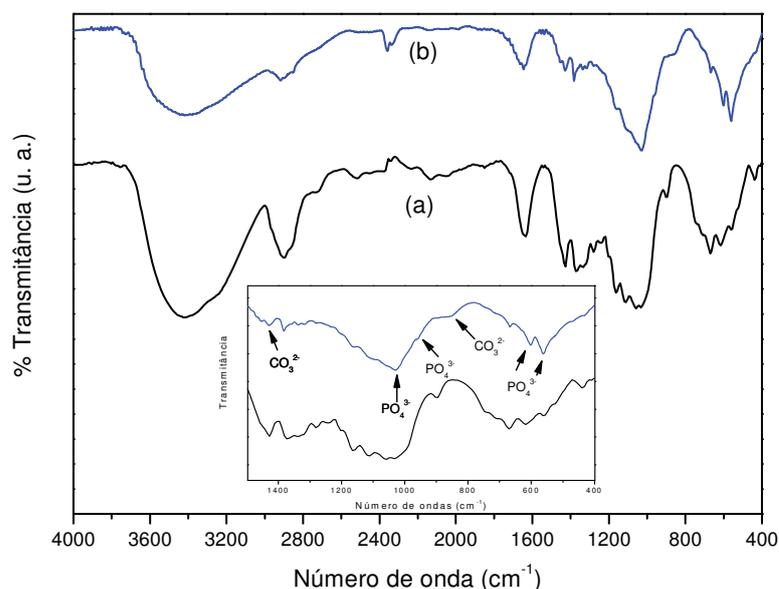
3.4.4.2 Compósito celulose bacteriana – hidroxiapatita (CB-HA)

A análise por FT-IR, as membranas de CB-HA apresentaram um espectro com bandas de fosfato típicas com estrutura de apatita (Figura 32). Bandas intensas foram observadas em 1093, 1020, 962, 570-600 cm⁻¹ correspondentes ao estiramento dos íons (PO₄³⁻) (HUTCHENS et al., 2006; CROMME et al., 2007; WAN et al., 2007). As bandas com intensidade baixa localizadas ao redor de 1428 e 838 cm⁻¹ correspondem ao estiramento de íons (CO₃²⁻) (HUTCHENS et al., 2006). A

presença destas bandas não está totalmente compreendida, pois o grupo carbonato aparece na solução durante a precipitação da fase mineral mesmo quando se usa uma solução livre de carbonato (SONG et al., 2007).

A banda de baixa intensidade em torno de $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ (estiramento OH) observado no espectro da CB sofreu um decréscimo na intensidade no espectro do compósito CB-HA, sugerindo possível interação dos cristais de HA com os grupos hidroxilas da celulose. No espectro CB-HA pode-se observar que a diminuição da intensidade desta banda pode estar diretamente relacionada a ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas e as fases de apatita. A ligação química entre HA e a CB estabilizou o compósito podendo manter uma integridade mecânica necessária para substituição óssea (HUTCHENS et al., 2006). Outras atribuições para celulose bacteriana estão representadas na Tabela 8.

Figura 32 - Espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras CB (a) e do compósito CB-HA (b).

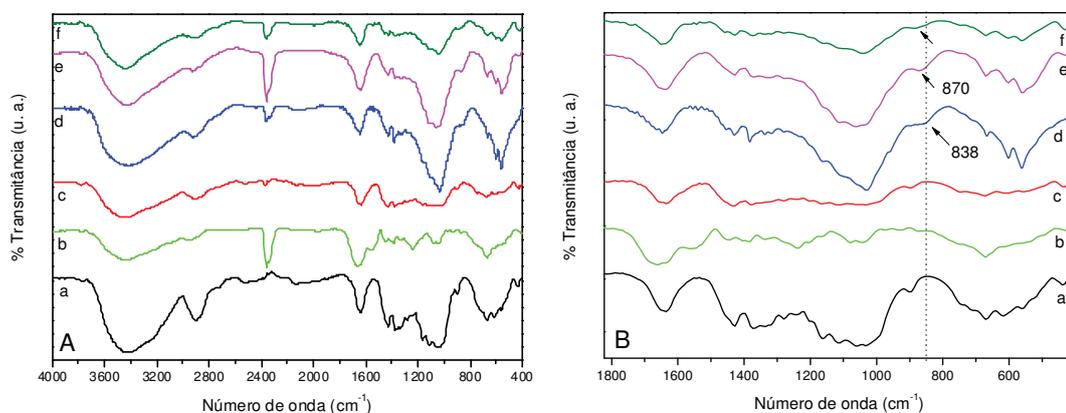


3.4.4.3 Compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL

Comparativamente, a Figura 33 mostra os espectros de FT-IR de todas as membranas. As bandas de infravermelho típicas de fosfato (PO_4^{3-}) associadas à estrutura de apatita apareceram em torno de $1093, 1020, 570\text{--}600\text{ cm}^{-1}$, as quais são atribuídas ao estiramento dos íons (PO_4^{3-}) (HONG et al., 2006; HUTCHENS et al.,

2006; CROMME et al., 2007; WAN et al., 2007) como observado para o compósito CB-HA, que apresentou bandas mais intensas nesta região. O espectro do compósito (CB-COL)-HA apresentou as bandas mais alargadas do que os espectros de CB-HA e (CB-HA)-COL, sugerindo a presença de HA com baixa cristalinidade (CROMME et al., 2007), resultados estes que corroboram aos dados do DRX e MEV/EDS. As bandas fracas localizadas em 1428 e 870 cm^{-1} que correspondem ao estiramento de íons CO_3^{2-} também foram observadas nos espectros (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, porém a banda em 870 cm^{-1} apresentou-se um pouco mais intensa para o compósito (CB-COL)-HA, sugerindo que neste compósito pode haver uma proporção maior de carbonato-apatita. No entanto, esta banda em 870 cm^{-1} apresentou um deslocamento para o vermelho de 32 cm^{-1} em relação à banda observada no espectro de CB-HA (838 cm^{-1}), podendo sugerir que houve interações de natureza eletrostática entre os íons CO_3^{2-} e as moléculas de colágeno.

Figura 33 - A: espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras: (a) CB, (b) COL, (c) CB-COL, (d) CB-HA, (e) (CB-COL)-HA, e (f) (CB-HA)-COL. **B:** espectro na região de 1800 – 400 cm^{-1} mostrando as bandas da região de 870 e 838 cm^{-1} em maior detalhe.



A banda na região de 3500 cm^{-1} apresentou-se, no espectro dos compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, com maior intensidade do que para o compósito CB-COL, sugerindo que este aumento pode estar relacionado aos grupos OH da hidroxiapatita precipitada sobre os respectivos sistemas. Com relação ao compósito (CB-HA)-COL a banda nesta região apresentou-se também menos intensa do que no sistema CB-HA, sugerindo que quando o colágeno é incorporado interage com os grupos OH dos cristais de HA deixando esses grupos menos disponíveis.

A banda na região de 2900 cm^{-1} atribuída ao estiramento CH_2 apresentou-se menos intensa para a amostra (CB-COL)-HA quando comparado a amostra CB-COL, podendo sugerir que o estiramento CH_2 é menor devido à interação dos cristais de hidroxiapatita na amostra. No sistema (CB-HA)-COL esta banda também se apresentou com menor intensidade em relação ao compósito CB-HA, sugerindo que o colágeno incorporado ao sistema interagiu com os grupos OH presentes nas fibras de celulose, assim como com as hidroxilas dos cristais de hidroxiapatita.

3.4.5 Espectroscopia de espalhamento Raman

De acordo com os resultados observados para análises de FT-IR dos compósitos contendo colágeno, observou-se que a região espectral atribuída para a banda amida I referente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ das proteínas sobrepõem-se à banda referente à deformação H-O-H de água adsorvida na celulose. Entretanto, para melhor caracterizar esta região sobreposta realizou-se para as amostras, CB, CB-COL, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com ou sem peptídeo adsorvido, espectroscopia de espalhamento Raman. Nesta técnica, o modo vibracional inelástico a ela conferido, faz com que seja possível observar regiões de modo vibracionais característicos de cada molécula diferentemente das observadas nos espectros de FT-IR, ou seja, a espectroscopia Raman é uma técnica complementar ao FT-IR.

A Figura 34 representa as regiões espectrais para espectro de espalhamento Raman do compósito CB e CB OGP [10-14]. Típicos picos espectrais atribuídos para celulose foram observados em torno de $380, 437, 461, 521\text{ cm}^{-1}$ que se referem aos modos vibracionais de flexão para $\delta(\text{CCC}), \delta(\text{CCO}), \delta(\text{COC}), \delta(\text{CO})$ e de torção para $\tau(\text{COH})$. Em 1096 e 1125 cm^{-1} observa-se os modos vibracionais referentes às $\delta(\text{CH}_2), \delta(\text{HCC}), \delta(\text{HOC}), \delta(\text{COH})$ e aos estiramentos $\nu(\text{CC})$ e $\nu(\text{CO})$ e em 1380 cm^{-1} para deformação HCC, HCO e HOC (WILEY; ATALLA, 1987), cujos picos foram também observados nos espectros de espalhamento Raman das outras amostras analisadas, CB-COL, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL (Figura 35). Nesses espectros Raman, as regiões atribuídas para celulose foram característicos ao comportamento vibracional de celulose I cristalina relacionada à celulose bacteriana (SCHENZEL et al., 2005). Além disso, nos espectros das amostras contendo colágeno ou peptídeo

adsorvido observou-se a presença da banda característica ao estiramento C=O em torno de $1600 - 1620 \text{ cm}^{-1}$ atribuído a amida I (SOCRATES, 2001), confirmando a presença tanto do colágeno incorporado aos compósitos quanto do peptídeo adsorvido nas respectivas amostras (Figuras 34 e 35).

A banda na região de $3400-3200 \text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída tanto para grupos OH da celulose quanto para estiramento N–H de ligações amida II. Nos espectros observados verificou-se um aumento na intensidade desta região espectral para as amostras CB-COL, CB OGP [10-14] e CB-COL OGP [10-14] em comparação a CB pura. Este aumento em intensidade pode ser sugerido pela incorporação do colágeno às fibras de CB devido à presença de grupos N–H tanto do colágeno quanto do peptídeo. Além disso, foi observado que o pico a $\sim 2890 \text{ cm}^{-1}$ (estiramento CH de CH_2) também revelou um aumento nas amostras contendo principalmente o peptídeo, rico em glicina, que contribui efetivamente com o aumento de grupos CH_2 , e conseqüentemente o aumento de intensidade do pico a este comprimento de onda.

Figura 34 – Espectros do espalhamento Raman das amostras CB e CB OGP [10-14]. Abaixo estão representados os espectros na região de $1800 - 100 \text{ cm}^{-1}$ mostrando as bandas da região de 1602 a 1625 cm^{-1} em maior detalhe.

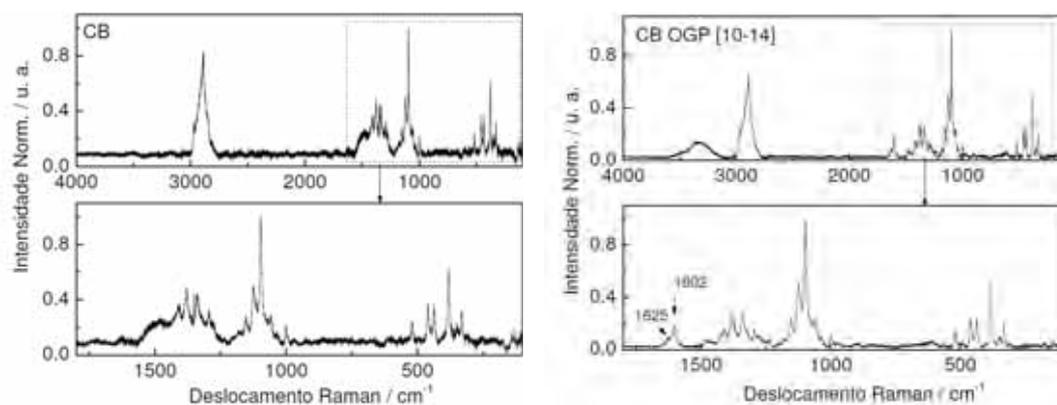
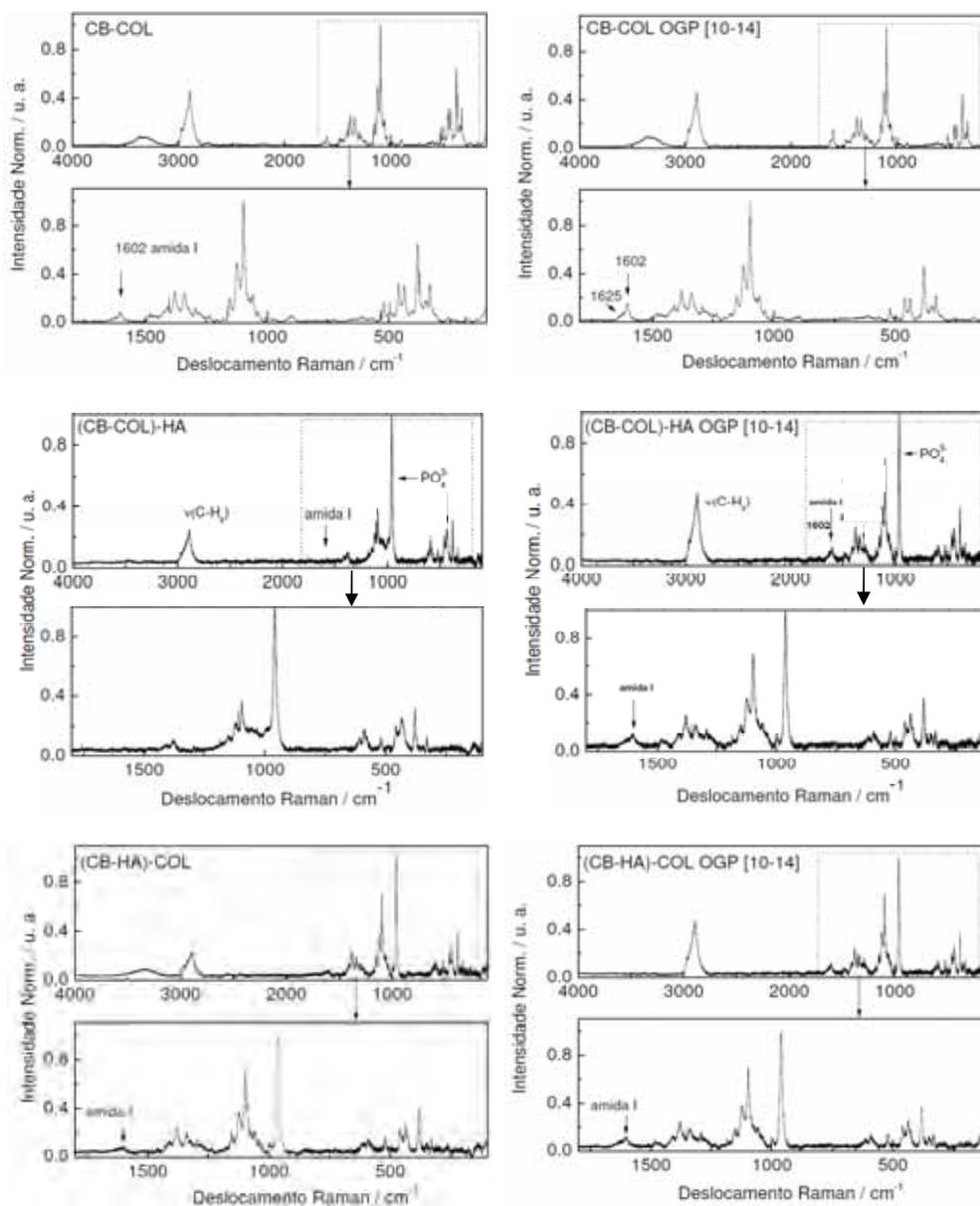


Figura 35 – Espectros do espalhamento Raman das amostras CB-COL, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, com ou sem OGP [10-14]. Espectros na região de 1800 – 100 cm^{-1} mostrando as bandas da região de 1602 – 1625 cm^{-1} para amida I e de 961 – 954 cm^{-1} para íons PO_4^{3-} em maior detalhe.



Para as amostras contendo fases de apatita, observou-se nos espectros Raman (Figura 35), picos característicos para o modo de flexão $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ na região de 591-588 e 613 cm^{-1} de baixa intensidade. As intensidades relativas desses picos estão relacionadas à cristalinidade do cristal, pois quanto mais organizado estiver o cristal de apatita maior será sua intensidade; desta forma, os resultados observados

nesses espectros corroboram aos dados de MEV/EDS, DRX e FT-IR das respectivas amostras, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL (ANTONAKOS et al., 2007; LI et al., 2007). Na região de 961 – 954 foi observado um pico com alta intensidade referente ao modo vibracional ν_1 PO_4^{3-} para ambas as amostras (ANTONAKOS et al., 2007; LI et al., 2007).

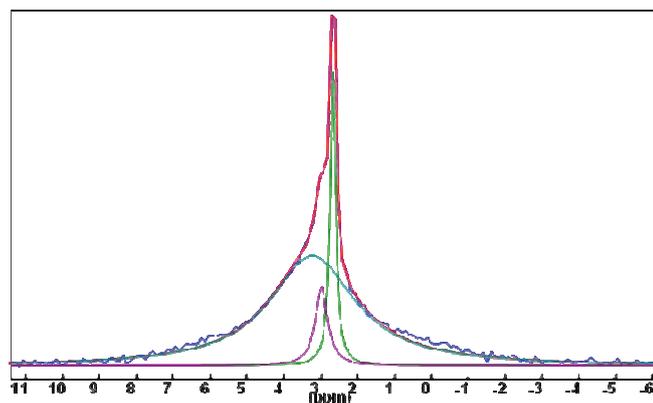
Desta forma, o emprego de ambas as técnicas de espectroscopia permitiu solucionar o problema de separação e identificação de sobreposição de bandas e assim, determinar a presença estrutural de cada molécula. Desta forma, com emprego da espectroscopia Raman foi possível comprovar a presença tanto do colágeno incorporado aos compósitos quanto do peptídeo adsorvido, mesmo em baixas concentrações, nas respectivas amostras.

3.4.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido dos núcleos ^{31}P das amostras CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL

A Figura 36 mostra o espectro de RMN-MAS do ^{31}P medido para a amostra CB-HA, onde se observa a presença de três (3) sítios de fósforo, os quais são categorizados dentro de dois grupos PO_4^{3-} e HPO_4^{2-} (TSENG et al., 2006). O primeiro sítio, centrado em 3,2 ppm, apresentou maior concentração (77%) de grupos fosfatos, cujo pico pode ser atribuído a fase cristalina de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), dado este, que corrobora aos resultados observados no MEV/EDS, DRX e FT-IR. De acordo com Tseng et al. (2006), a presença de CDHA pode ser relacionada a uma fase de apatita presente na transição da fase fosfato de octacálcio (OCP) para fase HA, a qual está atribuída ao grupo PO_4^{3-} da HA. Estudos prévios mostraram que a HA e o OCP possuem similaridade estrutural, levando a hipótese de que o OCP é a fase precursora tanto de apatita biológica (BROWN, 1966) quanto de HA sintéticas (AOBA et al., 1998; BODIER-HOULLE et al., 1998). No entanto, esta fase de transição observada por Tseng et al. (2006) não deixa de ser uma CDHA. Legeros (1991) afirmou que a transformação de fosfato de cálcio amorfo (ACP), fosfato de dicálcio dihidratado (DCPD – brushita), fosfato de dicálcio (DCP – monetita), ou OCP para HA em soluções contendo íons Ca^{2+} ou somente P_i resultaram na formação de CDHA, com a incorporação de HPO_4^{2-} . Contudo, no presente trabalho utilizou-se uma solução de Na_2HPO_4 , ou seja,

forneceu-se o íon HPO_4^{2-} durante o processo de precipitação, o que favoreceu a formação de CDHA.

Figura 36 - Espectro de RMN-MAS do ^{31}P para amostra CB-HA e sua respectiva deconvolução.



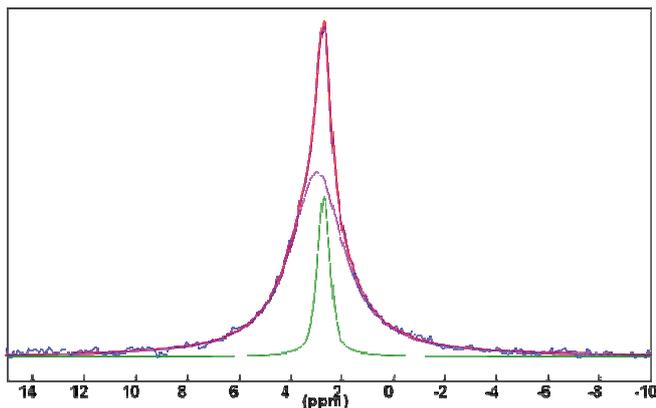
Os picos observados em 2,9 e 2,7 ppm estão relacionados a fase cristalina da HA. Segundo a literatura, a presença de íons carbonato presentes na HA, caracteriza uma fase de apatita impura, denominada carbonato-apatita tipo B ou carbonato-apatita, o que pode resultar no deslocamento químico do ^{31}P da HA (PANDA et al., 2003). Tseng et al. (2007), analisaram dentina de rato e revelaram com os dados de RMN para ^{31}P que este sinal em $3,2 \pm 0,3$ ppm é referente a uma apatita deficiente em OH, cujos íons OH^- podem estar substituídos por ânions como carbonato, gerando uma carbonato-apatita tipo A (LEGEROS, 1991). Desta forma, o pico observado em 2,9 ppm é atribuído a carbonato-apatita, e o pico em 2,7 ppm a HA.

A partir desse conjunto de dados observou-se que o compósito CB-HA apresentou uma composição química uniforme, onde a sua preparação levou a formação de um compósito cuja fase inorgânica é constituída de 77% de CDHA distribuída entre as fibrilas de CB.

Os dados de RMN-MAS do ^{31}P dos compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL elucidaram que tipo de fase de apatita foi precipitado nos respectivos compósitos. A Figura 37 mostra o espectro de RMN-MAS do ^{31}P medido para a amostra (CB-COL)-HA, onde se observou a presença de um pico assimétrico. A partir da deconvolução do espectro foi possível obter 2 sítios de grupos fosfatos. O primeiro centrado em 2,9 ppm, o qual apresentou maior concentração (84%) e está relacionado a uma

carbonato-apatita, como descrito anteriormente (HAYAKAWA; OSAKA, 2000; PANDA et al., 2003; HONG et al., 2006; TSENG et al., 2007; SZCZEŚNIAK et al., 2008), e o segundo em 2,7 ppm está relacionado à fase cristalina da HA.

Figura 37 - Espectro de RMN-MAS do ^{31}P para amostra (CB-COL)-HA e sua respectiva deconvolução.

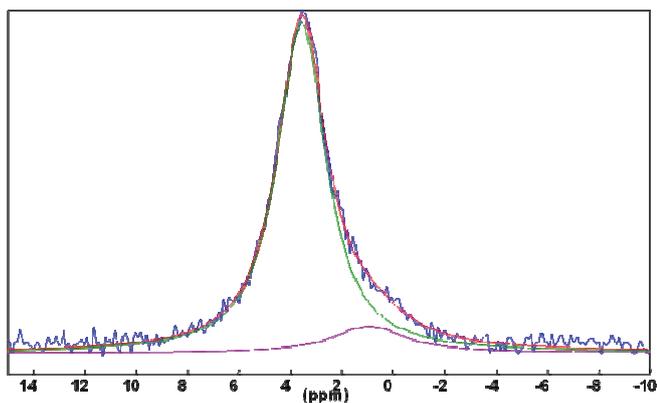


Nas carbonato-apatitas tipo B, a substituição dos íons PO_4^{3-} por CO_3^{2-} influencia simultaneamente a presença de outros cátions, ou seja, a substituição de os íons Ca^{2+} por Na^+ . Estas substituições ocorrem por precipitação direta ou por hidrólise de ACP, brushita, monetita, ou OCP em solução contendo carbonato. A substituição por carbonato promove os seguintes efeitos: diminuição no tamanho do cristal, mudança na morfologia do cristal, maior solubilidade (LEGEROS, 1991) e diminuição da razão molar Ca/P (HONG et al., 2006). No processo de precipitação de HA deste trabalho utilizou-se soluções de CaCl_2 e de Na_2HPO_4 , não contendo íons carbonatos em sua composição, mas o método favoreceu a incorporação do mesmo à estrutura da apatita. Além disso, a presença de colágeno na amostra pode estar favorecendo uma maior formação desta fase de apatita com relação à amostra CB-HA, pois segundo a literatura a presença de aminoácidos favorece a transformação de OCP em HA (TSENG et al., 2008) ou favorece a precipitação de fase inorgânica. Isto devido às interações tanto de resíduos de aminoácidos ácidos quanto básicos com os componentes catiônicos ou aniônicos, respectivamente, da superfície mineral (DUER, 2010).

Os dados observados de RMN-MAS do ^{31}P nesta amostra corroboram aos resultados de MEV/EDS, DRX e FTIR apresentados para a mesma. Desta forma, observou-se que a fase inorgânica precipitada neste compósito, (CB-COL)-HA, apresentou uma morfologia uniforme, principalmente no interior do compósito, onde sua preparação levou a formação de uma fase inorgânica constituída de 84% de carbonato-apatita distribuída entre e a rede de fibrilas do compósito CB-COL.

A Figura 38 mostra o espectro de RMN-MAS do ^{31}P para a amostra (CB-HA)-COL, a qual mostrou a presença de um pico largo assimétrico indicando que esta amostra apresentou uma baixa cristalinidade. A partir da deconvolução do espectro foi possível obter apenas dois (2) sítios de grupos fosfatos. O primeiro centrado em 3,5 ppm, o qual apresentou maior concentração (89,5%); este apresenta uma largura de linha que cobriu a região de deslocamento químico do grupo fosfato das fases CDHA e OCP que está na faixa de 3,2 – 3,7 ppm. Portanto, este pico pode estar sobreposto devido a baixa cristalinidade das fases cristalinas de CDHA e de OCP, que possuem valores de deslocamento químico próximos, 3,5 e 3,2 ppm, respectivamente.

Figura 38 - Espectro de RMN-MAS do ^{31}P para amostra (CB-HA)-COL e sua respectiva deconvolução.



Esta baixa cristalinidade corrobora aos resultados do MEV/EDS, DRX e FT-IR. Na literatura, os picos observados para a fase OCP puro foram mensurados em quatro (4) sítios assinalados em -0,2, 2,0, 3,3 e 3,7 ppm, sendo os picos em 3,3 e 3,7 ppm atribuídos aos grupos PO_4^{3-} , e os em -0,2 e 2 ppm atribuídos aos grupos HPO_4^{2-} (TSENG et al., 2004). Para um OCP impuro ou amorfo o sinal tem sido

mensurado em $3,4 \pm 0,3$ ppm (ROTHWELL et al., 1980); e para CDHA o pico tem sido mensurado em 3,2 ppm (TSENG et al., 2006). Contudo, estes resultados revelaram que não há presença de OCP puro e HA estequiométrica, e sim, a presença de OCP amorfo e CDHA, resultados que podem confirmar as hipóteses estudadas previamente que mostraram que o OCP é a fase precursora tanto de apatita biológica quanto de HA sintéticas (BROWN, 1966; AOBA ET AL., 1998; BODIER-HOULLE et al., 1998). Esta transição de fases se dá primeiro pela precipitação de ACP e posteriormente se transforma em OCP, cuja fase é subsequentemente hidrolisada em apatita. Além disso, a presença de colágeno pode favorecer a transformação de OCP em HA, ou então, pode mudar a cinética da reação e ocorrer o processo de precipitação de fase OCP pela presença do aminoácido aspartato (TSENG et al., 2008). Outras hipóteses estudadas, na literatura, são que tanto resíduos de aminoácidos ácidos quanto básicos são igualmente importantes na interação com os componentes catiônicos ou aniônicos, respectivamente, da fase inorgânica do tecido ósseo (DUER, 2010). Essas hipóteses podem justificar a presença de OCP neste compósito não observado para o compósito CB-HA.

O pico observado em 0,9 ppm pode estar relacionado a presença de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ amorfo (brushita). A brushita é a forma hidratada da monetita (CaHPO_4) muito similar ao OCP. No entanto, os cristais de fosfato de cálcio presentes tanto no OCP quanto na monetita são semelhantes estruturalmente, e há especulações que a formação de uma mistura intra-cristalina de OCP e monetita pode ocorrer pela precipitação direta ou pela hidrólise do OCP. As reações de hidrólises dos íons PO_4^{3-} e HPO_4^{2-} são o ponto chave para reação química da fase OCP para HA (TSENG et al., 2006).

A partir desses resultados observou-se que o compósito (CB-HA)-COL apresentou uma morfologia relativamente uniforme e similar ao compósito CB-HA, a única diferença observada foi que o colágeno favorece tanto o crescimento desses cristais quanto a formação de uma fase inorgânica mais amorfa, onde a sua preparação levou a formação de um compósito cuja fase inorgânica foi constituída de 89,5% de CDHA distribuída entre as fibrilas de CB.

A Tabela 9 resume os valores dos descolamentos químicos do ^{31}P , suas respectivas fases inorgânicas, morfologia dos cristais e razão molar Ca/P para as amostras CB-HA, (CB-HA)-COL e (CB-COL)-HA.

Tabela 9 - Principais valores para os descolamentos químicos do ^{31}P , razões molares Ca/P e morfologia dos cristais das referidas fases inorgânicas das amostras CB-HA, (CB-HA)-COL e (CB-COL)-HA.

Amostra	$\delta_{\text{iso}}^{31}\text{P}$ (ppm)	fase de apatita	morfologia	Ca/P
CB-HA	3,2	CDHA	<i>rods</i>	1,5-1,53
(CB-HA)-COL	3,5	CDHA	<i>rods</i>	1,42-1,50
(CB-COL)-HA	2,9	carbonato-apatita	globular	1,36

3.4.7 Análise termogravimétrica (TG) das amostras CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL

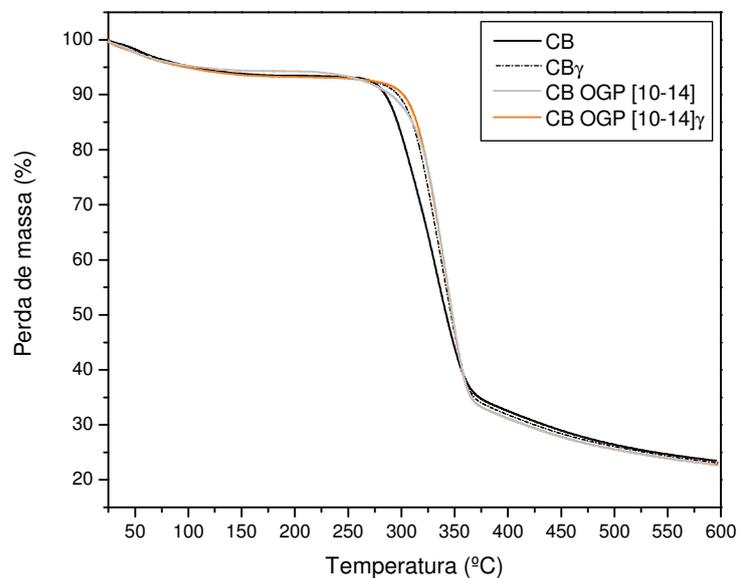
As análises termogravimétricas para todas as amostras com ou sem adsorção do peptídeo OGP [10-14] tanto antes quanto após a esterilização com radiação gama 20 kGy (γ), em geral, revelaram que no intervalo de temperatura próximo a 40°C-250°C ocorreu uma pequena perda de massa, em torno de 8-10%, devido à perda de água superficial (Figuras 39 a 43) (WAN et al., 2007; BARUD et al., 2008).

Um evento importante de perda de massa foi observado para todas as amostras numa faixa que variou de 267°C a 308°C (temperatura de decomposição: T_{onset}) dependendo da amostra, conforme mostrado na Tabela 10. Este evento está relacionado à decomposição da CB, cuja decomposição inclui processos de degradação e decomposição das unidades glicosídicas deste polímero seguido da formação de resíduos carbonáceos, que correspondem em torno de 23% do resíduo final, encontrados nas amostras de CB e CBy (ROMAN; WINTER, 2004; BARUD et al., 2007; BARUD et al., 2008). A porcentagem residual em 600°C para as amostras CB OGP [10-14] e CB OGP [10-14] γ também foi em torno de 23% (Figura 39). Além disso, foi possível observar que adsorção do peptídeo aumentou ligeiramente a estabilidade térmica da CB, bem como, o emprego da radiação gama (20 kGy) para esterilização.

Tabela 10 - Temperatura T_{onset} dos compósitos desenvolvidos antes e após a esterilização, relacionados à decomposição da CB.

Amostra	T_{onset} (°C)	
	sem esterilização	após esterilização
CB	289	308
CB OGP [10-14]	315	315
CB-COL	267	268
CB-COL OGP [10-14]	267	273
CB-HA	306	308
CB-HA OGP [10-14]	302	303
(CB-COL)-HA	302	300
(CB-COL)-HA OGP [10-14]	303	300
(CB-HA)-COL	267	270
(CB-HA)-COL OGP [10-14]	285	287

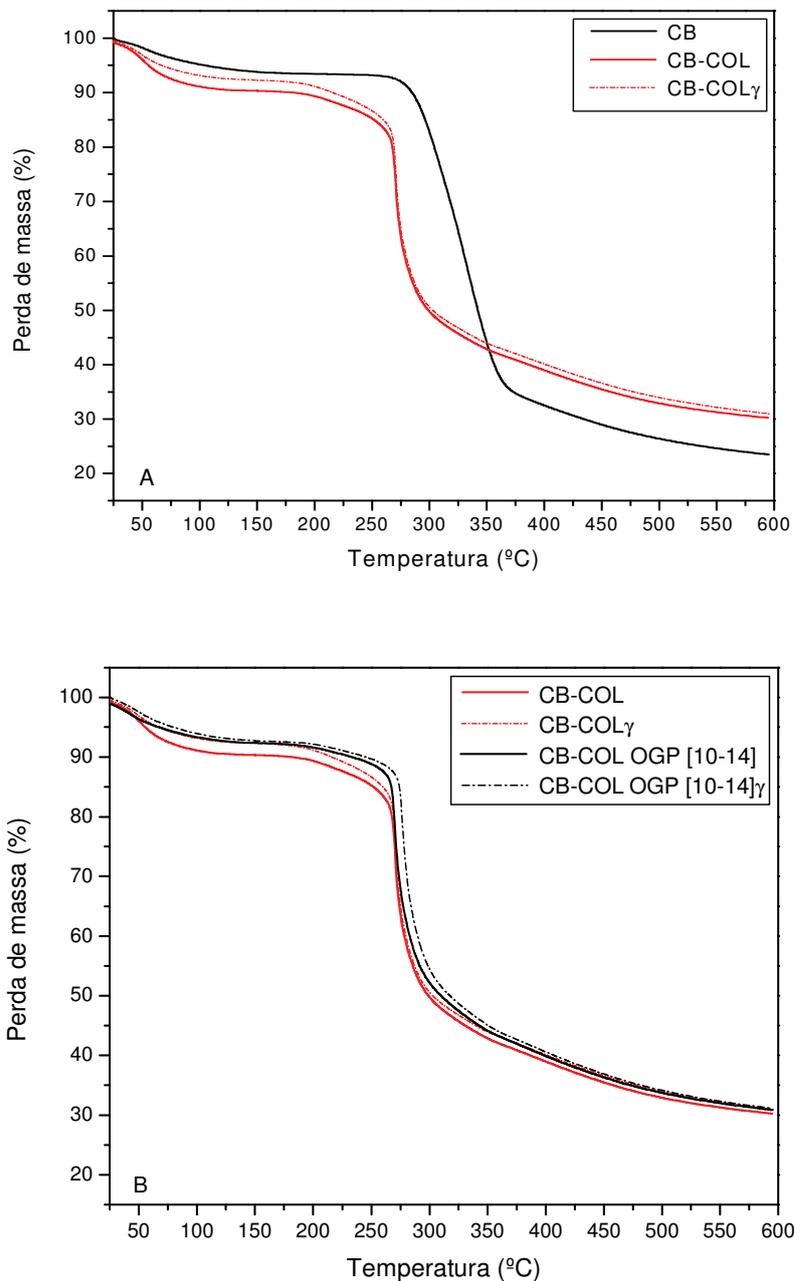
Figura 39 - Curvas termogravimétricas para as amostras CB e CB OGP [10-14], antes a após esterilização com radiação gama (γ).



As curvas de TG para as amostras CB-COL e CB-COL γ estão apresentadas na Figura 40A. O evento relacionado à degradação da celulose ao redor de 300 °C, nas amostras CB-COL foi observado em torno de 268 °C, CB-COL (T_{onset} 267 °C) e CB-COL γ (T_{onset} 268 °C). Porém, antes deste importante evento de perda de massa, pôde-se observar um pequeno evento de perda de massa em torno de 200 °C nestas amostras; estes eventos podem estar associados tanto com o processo de degradação da celulose, quanto à degradação das moléculas de colágeno (ROVERI et al., 2003; BARUD et al., 2007; BARUD et al., 2008). As T_{onset} observadas nas curvas TG para o compósito CB-COL revelaram que a estabilidade térmica da CB diminuiu com a incorporação do colágeno; os valores T_{onset} observados para CB-COL e CB-COL γ diminuíram 22 °C e 40 °C, respectivamente, quando comparado aos valores observados para as amostras CB e CB γ , respectivamente. Além disso, a esterilização aumentou ligeiramente a estabilidade térmica da membrana de celulose, mas a radiação gama não promoveu alterações nas temperaturas características para o compósito CB-COL. Este comportamento pode estar associado com a quebra de ligações de hidrogênio e com a redução da cristalinidade da CB pela incorporação do colágeno. Desta forma, a baixa cristalinidade leva a diminuição nos valores T_{onset} (GAO et al., 2010), corroborando aos dados do DRX. Na Figura 40B, o evento importante de perda de massa foi também observado em torno 268 °C, devido à decomposição do compósito. As T_{onset} para a amostra CB-COL OGP [10-14] e para CB-COL OGP [10-14] γ variou em 6 °C, o que está dentro do erro da análise. Deste modo, a incorporação dos peptídeos ao compósito não alterou a temperatura de decomposição do compósito CB-COL e nem alterou a T_{onset} após a radiação gama. Estes resultados permitiram inferir que a radiação gama é um tratamento adequado para esterilização, uma vez que não alterou a estabilidade térmica dos compósitos CB-COL e CB-COL OGP [10-14].

A porcentagem residual em 600 °C para as amostras CB-COL e CB-COL OGP [10-14] antes e após a esterilização foi ao redor de 31%. Desta forma, com esta análise pôde-se confirmar que o conteúdo de colágeno incorporado a CB foi padronizado, com valor ao redor de 8%, quando descontando a porcentagem residual da CB pura (23%).

Figura 40 - Curvas termogravimétricas para as amostras CB, CB-COL e CB-COL γ (A); curvas termogravimétricas para as amostras dos compósitos CB-COL, CB-COL γ , CB-COL OGP [10-14] e CB-COL OGP [10-14] γ (B).



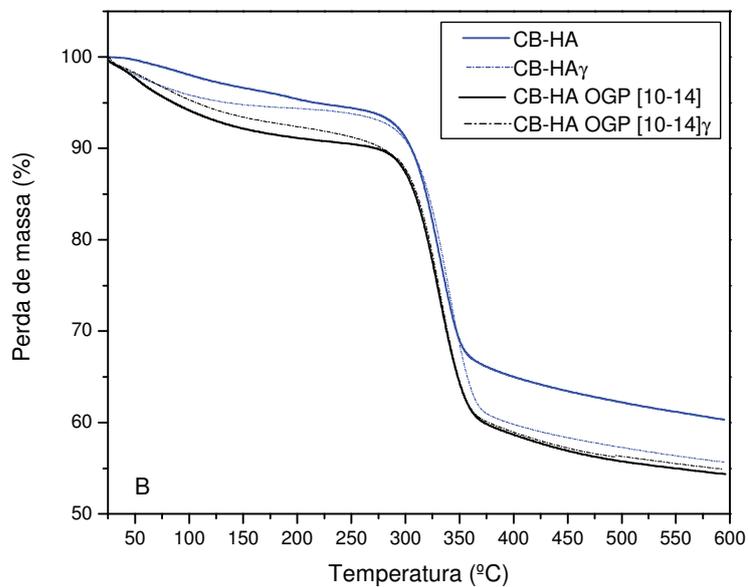
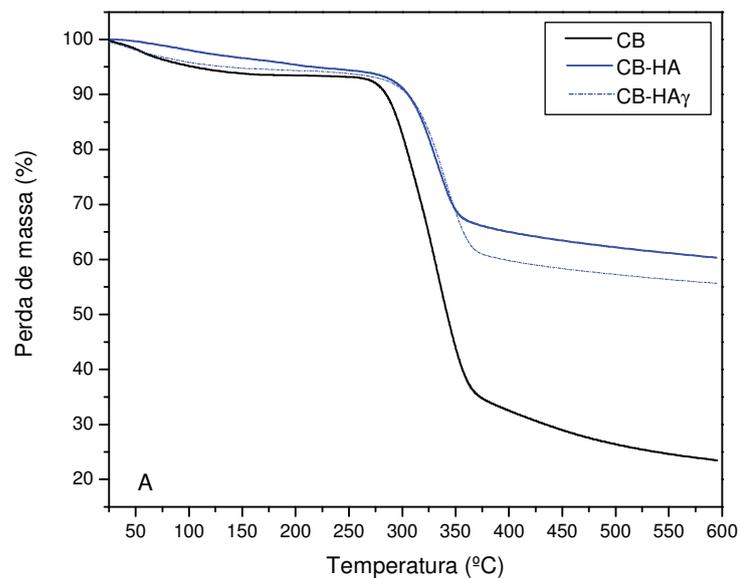
Com relação à incorporação da fase mineral à CB pura, a apatita precipitada na CB promoveu um ligeiro aumento na temperatura de decomposição *onset* (T_{onset}) em 17°C, significando um aumento na estabilidade térmica da CB (Figura 41A). Porém, não há diferença significativa entre as T_{onset} do compósito CB-HA e CB-HA γ , portanto a radiação não alterou as temperaturas característica do compósito CB-HA (Figura 41A), além disso, os valores para T_{onset} da CB γ e CB-HA γ foram iguais (Tabela 10).

Para os compósitos CB-HA e CB-HA γ foram observados massas residuais em torno de 55-60%, significando que o conteúdo de HA no compósito foi em torno de 32-37%.

Segundo Szczesniak et al. (2008), geralmente a estabilidade térmica é aumentada com a adição de uma fase mineral à fase orgânica, e esse comportamento pode ser analisado em função da temperatura de decomposição *onset* (T_{onset}), a qual caracteriza a estabilidade térmica dos materiais; comportamento este que pôde ser comprovado neste estudo. Desta forma, os compósitos CB-HA apresentaram estabilidade térmica adequada para o processo de esterilização com radiação gama.

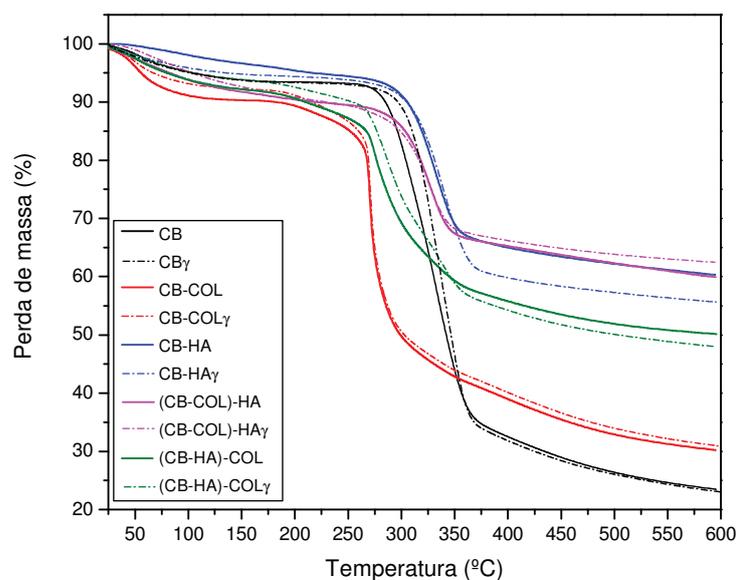
Com a incorporação dos peptídeos ao compósito observou-se um pequeno decréscimo na temperatura de decomposição *onset* em 5°C nas amostras CB-HA, revelando uma ligeira perda na estabilidade térmica do compósito. Porém, não há diferença significativa entre as T_{onset} do compósito CB-HA OGP [10-14] e CB-HA OGP [10-14] γ (Tabela 10), portanto observou-se que a radiação gama também não alterou as temperaturas característica do compósito CB-HA com os peptídeos. Para os compósitos CB-HA OGP [10-14] e CB-HA OGP [10-14] γ foram observadas massas residuais em torno de 55%, significando que o conteúdo de HA no compósito foi em torno de 32%, massa similar ao compósito CB-HA sem peptídeo. Este resultado demonstrou que o compósito imerso em solução por 72 h para incorporação dos peptídeos não leva a perda de cristais de HA durante o processo.

Figura 41 - Curvas termogravimétricas das amostras CB, CB-HA e CB-HA γ (A); curvas termogravimétrica para as amostras dos compostos CB-HA, CB-HA γ , CB-HA OGP [10-14] e CB-HA OGP [10-14] γ (B).



A Figura 42 representa comparativamente as curvas TG para todos os compósitos antes e após a esterilização. Comparando-se com a temperatura de decomposição do compósito precursor CB-COL (T_{onset} 267°C), observou-se que a incorporação da apatita promoveu um aumento de 35°C na temperatura de decomposição do compósito (CB-COL)-HA (Tabela 10). Este aumento na estabilidade do compósito (CB-COL)-HA pode estar relacionado à formação de novas das ligações de hidrogênio com a precipitação da fase mineral (SZCZESNIAK et al., 2008), e também há uma barreira dificultando a entrada dos gases. Os valores de T_{onset} para (CB-COL)-HA e para (CB-COL)-HA γ foram similares; além disso, a decomposição deste compósito ocorreu em dois eventos, ao contrário do compósito precursor CB-COL, que apresentou uma sequência de eventos em sua curva TG (Figura 40). Este comportamento sugere que a incorporação de apatita tornou-o mais estável devido a apatita gerar uma barreira dificultando a entrada dos gases, uma vez que as T_{onset} aumentaram em torno de 35°C para (CB-COL)-HA e para (CB-COL)-HA γ (Tabela 10). Os compósitos (CB-COL)-HA também apresentaram estabilidade térmica adequada para o processo de esterilização com radiação gama.

Figura 42 - Curvas termogravimétricas das amostras CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL antes e após a esterilização com radiação gama 20 (kGy).



No compósito (CB-HA)-COL foram também observados uma sequência de eventos de perda de massa como no compósito CB-COL (Figura 42); além daquele evento inicial de perda de água superficial, outros dois eventos sucederam-se, um em torno de 187°C e outro em torno de 270°C. Estes eventos podem estar associados ao processo de degradação moléculas de colágeno em 187°C e a degradação da celulose em 270°C (ROVERI et al., 2003; BARUD et al., 2007; BARUD et al., 2008). O compósito (CB-HA)-COL apresentou um padrão de curva TG similar ao compósito CB-COL, sendo que independente da metodologia empregada para incorporar o colágeno aos compósitos, as mesmas não influenciaram na estabilidade térmica dos compósitos contendo colágeno. Além disso, observou-se que os valores das *T_{onset}* do compósito (CB-HA)-COL antes e após a esterilização diminuíram consideravelmente em torno de 40°C em relação ao compósito precursor CB-HA (CB-HA *T_{onset}* 306°C; CB-HAγ *T_{onset}* 308°C (vide Tabela 10). Estes resultados revelaram que a incorporação do colágeno por alterar a cristalinidade do compósito CB-HA como observado nos dados de DRX, promoveu esta variação na temperatura de decomposição do compósito (CB-HA)-COL comparado ao compósito CB-HA. A radiação gama também se apresentou como metodologia adequada para esterilização do compósito (CB-HA)-COL.

Comparado aos outros compósitos desenvolvidos, o compósito (CB-HA)-COL, apresentou estabilidade térmica similar ao compósito CB-COL.

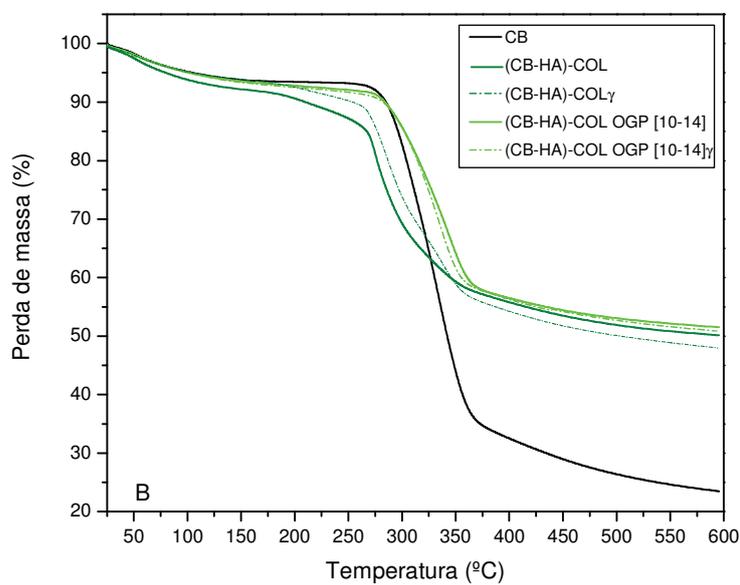
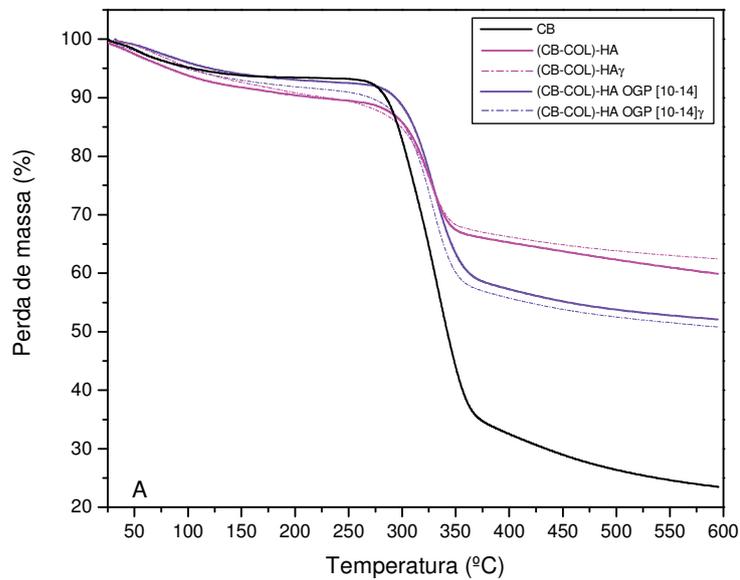
A massa residual total observada para os compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL foi em torno de 60% e 51%, respectivamente (Figuras 43A e 43B). Entretanto, considerando que em torno de 20% destas massas residuais totais sejam da CB pura como observado anteriormente, restam em média 40% de massa residual para (CB-COL)-HA e 31% de massa residual para (CB-HA)-COL. Dessa forma, dos 40% de massa residual do compósito (CB-COL)-HA, em torno de 8% são da massa residual do colágeno como observado acima; portanto neste compósito a fase inorgânica foi de aproximadamente 32%, valor correspondente a fase mineral precipitada no compósito CB-HA, mostrando que a metodologia empregada para precipitação de HA foi reprodutível independente da matriz utilizada, seja ela CB ou CB-COL. Em relação ao compósito (CB-HA)-COL, após análise sistemática da porcentagem residual da fase inorgânica do compósito precursor observou-se que esta fase pode variar entre 32-37%, e a média de massa residual para apatita neste compósito foi de 31%; é importante mencionar a dificuldade em se verificar a

porcentagem de massa residual final tanto do colágeno quanto da fase inorgânica utilizando esta metodologia na incorporação do colágeno. Desta forma, duas hipóteses podem ser discutidas: 1. se houve uma dissolução dos cristais de HA quando o colágeno foi incorporado e a quantidade real de colágeno incorporado a ser mensurado ficou comprometida ; 2. se a quantidade de colágeno incorporado ao sistema foi realmente pequena em torno de pelo menos 1% e a fase inorgânica precipitada foi em torno de 30%. Levando em consideração a hipótese 2, observou-se que a porcentagem de apatita incorporada é similar para todos os compósitos que contém esta fase inorgânica independente da metodologia de precipitação. Por outro lado, a porcentagem de colágeno no compósito CB-COL foi maior se comparado ao compósito (CB-HA)-COL, sugerindo que a metodologia para incorporação de colágeno à CB pura foi mais eficiente do que ao compósito CB-HA.

Para os compósitos (CB-COL)-HA OGP [10-14] e (CB-HA)-COL OGP [10-14] foram observados valores para T_{onset} em 303°C e 285°C, respectivamente. Estes compósitos após a esterilização apresentaram valores para T_{onset} em 300°C e 287°C, ou seja, a radiação gama também não interferiu nas temperaturas características dos mesmos (Figura 43). Além disso, o processo de adsorção do peptídeo OGP [10-14] ao compósito (CB-COL)-HA também não alterou os valores para temperatura de decomposição deste compósito, como observados para os compósitos CB-COL e CB-HA. Entretanto, o processo de adsorção do peptídeo OGP [10-14] ao compósito (CB-HA)-COL favoreceu um aumento na estabilidade térmica em torno de 18°C tanto antes quanto após a esterilização, como observado na Figura 43B; sugerindo que estes compósitos imersos em solução peptídica obtiveram a formação ou uma maior estabilidade de ligações de hidrogênio entre a apatita e o colágeno, assim promovendo este acréscimo na estabilidade térmica ao compósito.

A análise dos resultados para T_{onset} de todos compósitos desenvolvidos neste trabalho mostrou que, na maioria das amostras, a maior variação na T_{onset} está relacionada com as mudanças estruturais da CB pura pela incorporação de colágeno ou apatita e não pela adição posterior de apatita ou colágeno aos compósitos precursores, e ainda, que o emprego da radiação gama para esterilização das amostras não interferiu na estabilidade térmica das mesmas.

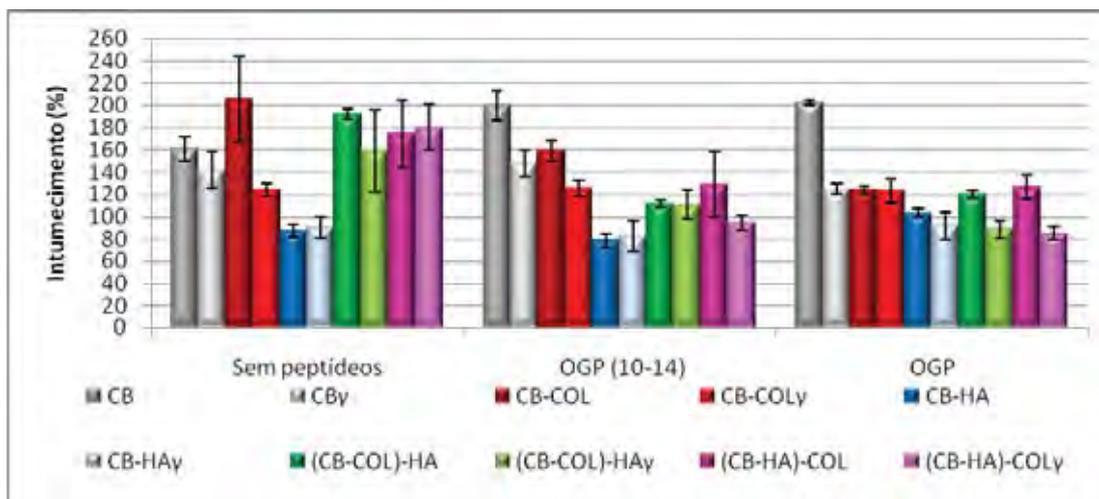
Figura 43 - A: curvas termogravimétricas das amostras CB, (CB-COL)-HA, (CB-COL)-HA γ , (CB-COL)-HA OGP [10-14] e (CB-COL)-HA OGP [10-14] γ . **B:** curvas termogravimétricas das amostras CB, (CB-HA)-COL, (CB-HA)-COL γ , (CB-HA)-COL OGP [10-14] e (CB-HA)-COL OGP [10-14] γ .



3.4.8 Taxa de intumescimento e Ângulo de contato

Os resultados de porcentagem de água absorvida em todas as amostras antes e após a esterilização com radiação gama 20 kGy estão representados na Figura 44. Depois de 4 h, a taxa de intumescimento para as seguintes membranas, CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, foi 160%, 206%, 87%, 192% e 126% respectivamente. Os resultados mostraram que com a adição de colágeno aumenta consideravelmente a porcentagem de intumescimento das amostras sem esterilização, provavelmente devido ao aumento de cargas relacionadas aos grupos aminos livres e carboxílicos do colágeno; e a diminuição de intumescimento observada no compósito CB-HA pode estar relacionada ao um maior preenchimento dos poros no interior deste compósito pela deposição de HA.

Figura 44 - Porcentagem de intumescimento dos compósitos antes e após a esterilização com radiação gama 20 kGy. Barras verticais mostram o erro padrão.



As medidas de ângulo de contato para as amostras CB, CB OGP e CB OGP [10-14], revelaram que as superfícies destas amostras apresentaram-se levemente mais hidrofóbicas após a esterilização, cujos valores estão apresentados na Tabela 11. Os resultados mensurados nesta análise mostraram que a radiação gama alterou as interações intermoleculares, sugerindo que esta ação física reduziu a quantidade de grupos OH superficiais da CB, tornando a superfície deste compósito um pouco mais hidrofóbica. Dados estes corroboram as taxas de intumescimento

descritas acima, onde as amostras CB γ e CB OGP [10-14] γ tiveram menor porcentagem de intumescimento do que as amostras de CB e CB OGP [10-14], ou seja, também se apresentaram mais hidrofóbicas. Contudo, a amostra CB OGP após a esterilização não apresentou um aumento significativo do seu ângulo de contato em relação à amostra CB OGP sem esterilização, dado este que não corroborou aos resultados da taxa de intumescimento (Figura 44).

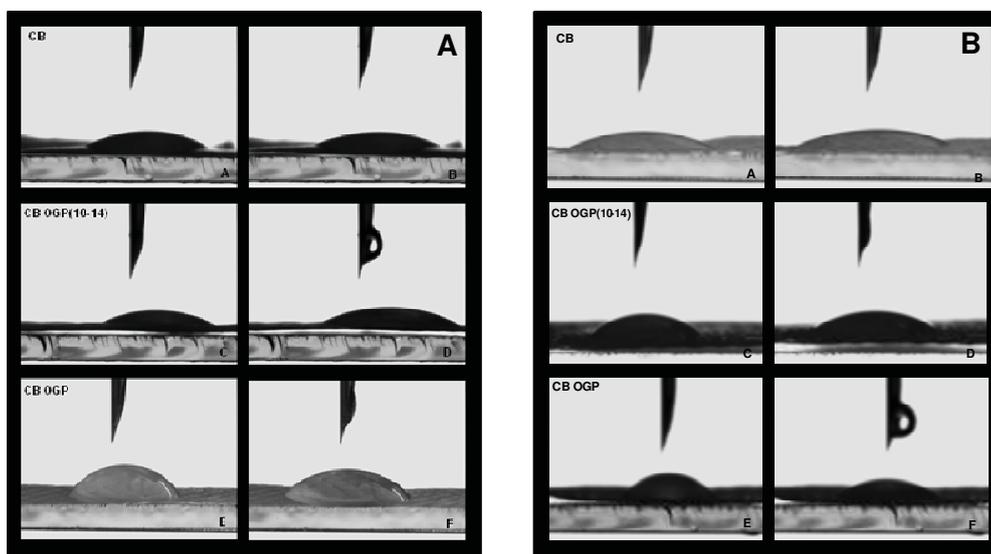
Tabela 11 - Valores mensurados para o ângulo de contato para as amostras CB, CB-COL, CB-HA (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, com adição de OGP e OGP [10-14].

Amostras	Sem esterilização		Após esterilização	
	T=0s	T=10s	T=0s	T=10s
CB	22,0 ± 1,8	15,7 ± 0,5	31,1 ± 0,4	25,8 ± 2,5
CB OGP	29,8 ± 1,8	28,4 ± 2,6	34,0 ± 0,8	24,9 ± 0,8
CB OGP [10-14]	24,9 ± 1,8	13,5 ± 0,6	40,6 ± 1,3	31,0 ± 1,7
CB-COL	105,7 ± 2,5	101,0 ± 1,4	114,3 ± 1,1	103,3 ± 2,2
CB-COL OGP	109,8 ± 2,5	108,4 ± 2,1	114,3 ± 1,1	117,2 ± 1,4
CB-COL OGP [10-14]	87,9 ± 1,2	86,0 ± 0,3	89,1 ± 1,2	88,9 ± 2,1
CB-HA	16,7 ± 2,4	0	16,8 ± 1,2	12,7 ± 1,6
CB-HA OGP	24,2 ± 1,2	13,1 ± 2,1	29,1 ± 1,3	19,7 ± 1,4
CB-HA OGP [10-14]	23,7 ± 1,6	15,7 ± 0,6	23,9 ± 0,2	15,9 ± 1,0
(CB-COL)-HA	46,1 ± 2,8	31,2 ± 0,7	59,1 ± 1,6	37,8 ± 1,2
(CB-COL)-HA OGP	53,5 ± 0,5	36,8 ± 2,1	64,2 ± 1,9	46,5 ± 1,1
(CB-COL)-HA OGP [10-14]	51,4 ± 2,1	35,2 ± 2,1	78,5 ± 1,1	57,6 ± 0,9
(CB-HA)-COL	40,8 ± 0,7	21,2 ± 1,5	54,6 ± 1,1	37,3 ± 1,5
(CB-HA)-COL OGP	37,5 ± 0,6	29,5 ± 1,0	48,4 ± 1,2	33,0 ± 1,7
(CB-HA)-COL OGP [10-14]	44,9 ± 2,5	28,4 ± 2,7	47,6 ± 2,0	31,6 ± 2,0

Cada valor é a média de 03 determinações e com respectivo erro padrão.

Além disso, a adsorção dos peptídeos OGP e OGP [10-14] tornou a superfície da CB mais hidrofóbica, principalmente com a adição do peptídeo OGP, tanto antes quanto após a esterilização (Figura 45). No entanto, os resultados de porcentagem de intumescimento revelaram que a adsorção dos peptídeos a CB somente tornou menos hidrofílica após a esterilização, revelando que no interior dessas amostras com peptídeos houve uma redução de grupos OH disponíveis após a esterilização. Hipótese que pode explicar as diferenças de resultados entre ângulo de contato e taxa de intumescimento encontrado para a amostra CB OGP γ .

Figura 45 - A) Amostras do grupo da CB antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: CB T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB OGP T=0s e T=10s, respectivamente. **B)** Amostras do grupo da CB antes da esterilização com radiação gama 20 KGy; a e b: CB T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB OGP T=0s e T=10s, respectivamente.



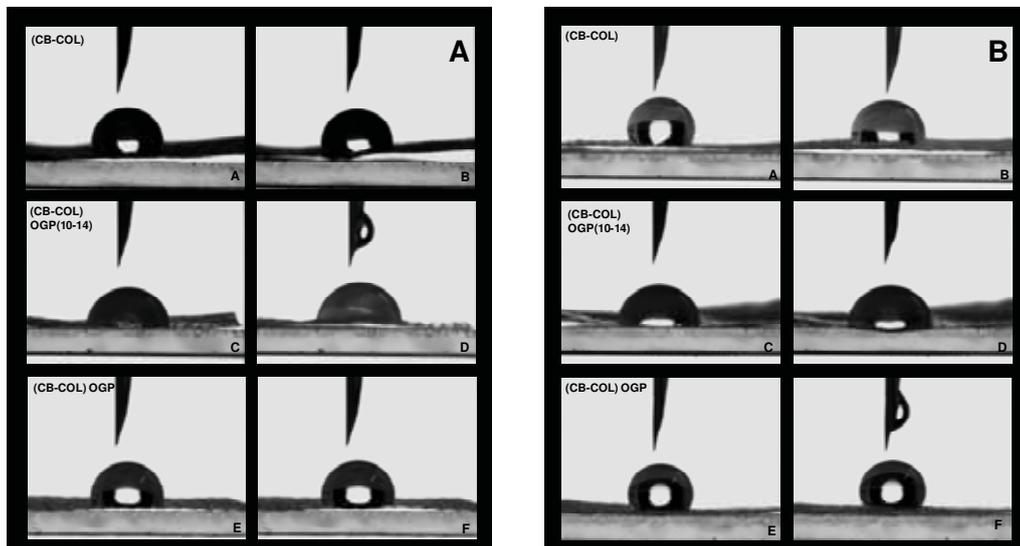
As mensurações para amostras do grupo CB-COL mostraram que a incorporação de colágeno à CB aumentou consideravelmente o ângulo de contato nas amostras deste grupo conferindo-as uma superfície mais hidrofóbica em relação às amostras do grupo CB, principalmente após a esterilização (Tabela 11).

A redução da hidrofiliabilidade da superfície das amostras pode ser devido à redução de grupos hidroxilas, carboxílicos e aminos livres pela ação da radiação gama, sugerindo que ocorreu reticulação das fibrilas de colágeno com o emprego da radiação reduzindo os grupos carboxílicos e aminos disponíveis nas amostras. Estudos prévios relataram que quanto mais eficaz for a reticulação das fibrilas de colágeno, menor é a taxa de intumescimento do material (PARK et al., 2002; CHARULATHA; RAJARAM, 2003), ou seja, o material é menos hidrofílico. Desta forma, ocorre uma alteração na distribuição de cargas na molécula de colágeno, influenciando na propriedade hidrofílica do material. Dados estes que corroboram aos observados pela análise de porcentagem de intumescimento apresentados na Figura 44. Assim, observou-se que a redução de grupos OH, carboxílicos e aminos livres foi uniforme, pois ocorreu tanto na superfície quanto no interior do compósito,

revelando que a reticulação do colágeno foi eficaz empregando tanto o agente químico (EDC) quanto o agente físico (radiação gama).

A adsorção dos peptídeos promoveu alterações na amostra, ou seja, o peptídeo OGP [10-14] conferiu um perfil de superfície mais hidrofílico à amostra CB-COL, e o peptídeo OGP promoveu um perfil mais hidrofóbico (vide Tabela 11 e Figura 46).

Figura 46 - A) Amostras do grupo da CB-COL antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: CB-COL T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB-COL OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB-COL OGP T=0s e T=10s, respectivamente. **B)** Amostras do grupo da CB-COL antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: CB-COL T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB-COL OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB-COL OGP T=0s e T=10s, respectivamente.



Na análise de taxa de intumescimento observou-se que a incorporação de fases de HA a CB ou ao compósito CB-COL proporcionou a estas amostras, mesmo com a adsorção dos peptídeos, maior hidroflicidade na superfície das mesmas. Já os resultados observados de porcentagem de intumescimento, revelaram que a propriedade hidrofílica com a incorporação de HA a estes materiais, CB e CB-COL, diminuem consideravelmente, de 160% para 87% em CB → CB-HA e de 206% para 192% em CB-COL → (CB-COL)-HA (Figura 44). Mais uma vez, levanta-se a hipótese de que esta redução de absorção de água pode estar relacionada à estrutura tridimensional da rede de fibrilas da CB após a incorporação da fase inorgânica ou ainda pela disposição de grupos OH disponíveis no interior da

amostra. De acordo com Song et al. (2007), a adição de HA à matriz de colágeno reduz significativamente a taxa de intumescimento dos compósitos, principalmente com porcentagem de HA superior a 40%, devido ao um maior preenchimento interno dos poros no compósito. As curvas de análise termogravimétrica (TG), revelaram valores da fase inorgânica similar a este valor para os compósitos CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL. Portanto, estes valores para taxa de intumescimento correspondem aos resultados da literatura. Contudo, sugerimos que o aumento da hidrofobicidade superficial das amostras está mais relacionado à energia de superfície do material, e a taxa de intumescimento à disposição de grupos funcionais como OH, NH³⁺, COO⁻ e estrutura intermolecular da fase inorgânica ligada aos polímeros CB e/ou colágeno, do que à composição química. Pois nas amostras do grupo CB-HA, observou-se que estas amostras apresentaram uma maior hidrofobicidade de superfície, principalmente para a membrana CB-HA sem esterilização que após 10 s observou-se que o ângulo de contato foi a 0°, ou seja, superfície extremamente hidrofóbica, porém após a esterilização este ângulo teve um ligeiro aumento para um ângulo em torno de 12,7 graus (Tabela 11). No entanto, os peptídeos conferiram a estas superfícies um aumento da hidrofobicidade, porém estas superfícies ainda continuaram mais hidrofóbicas em relação às outras membranas (Tabela 11 e Figura 47).

Apesar da superfície das amostras (CB-COL)-HA serem mais hidrofóbicas com relação à das amostras do grupo CB-COL, os peptídeos tanto o OGP quanto o OGP [10-14] favoreceram um caráter menos hidrofóbico as amostras desse compósito. Ao contrário do que foi observada para o compósito CB-COL, a amostra (CB-COL)-HA contendo OGP [10-14] apresentou-se mais hidrofóbica em relação à amostra contendo OGP (Tabela 11 e Figura 48). Estes resultados corroboram aos resultados observados para porcentagem de intumescimento para ambos os compósitos, CB-COL e (CB-COL)-HA, contendo os referidos peptídeos, mesmo após a esterilização. No entanto, sugere-se que esta diferença de comportamento de hidrofobicidade dos peptídeos adsorvidos em cada membrana está diretamente relacionada à composição do material.

Figura 47 - A) Amostras do grupo da CB-HA antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: CB-HA T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB-HA OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB-HA OGP T=0s e T=10s, respectivamente. **B)** Amostras do grupo da CB-HA antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: CB-HA T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: CB-HA OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: CB-HA OGP T=0s e T=10s, respectivamente.

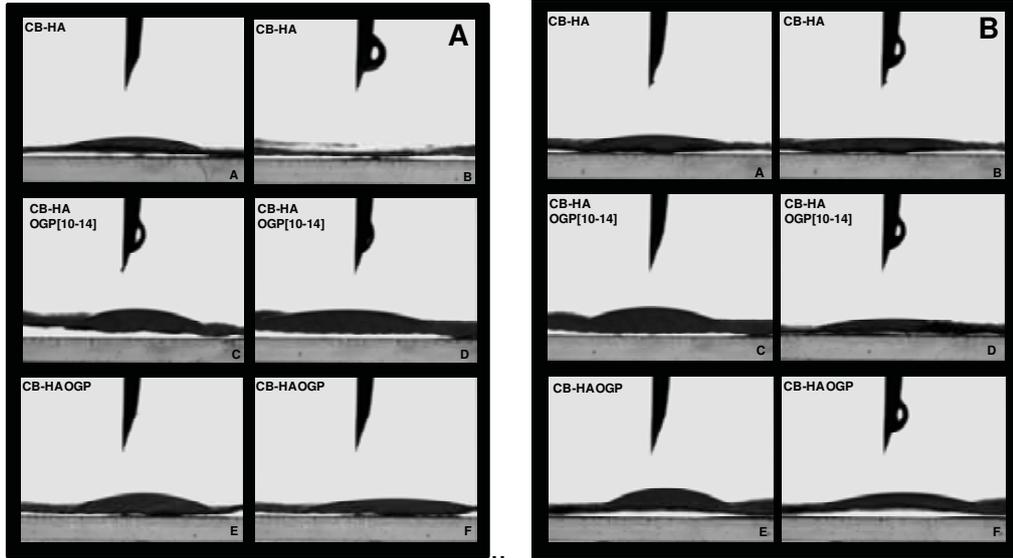
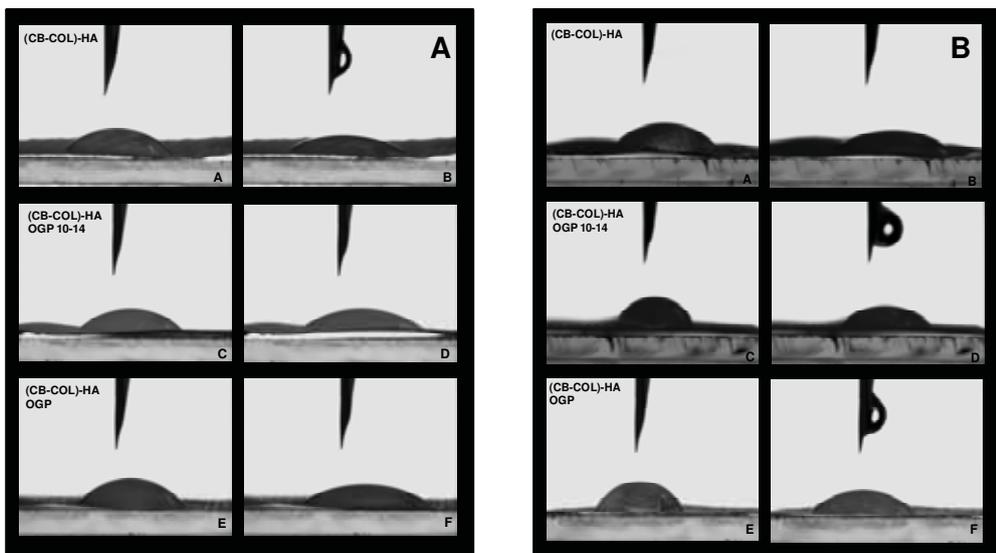
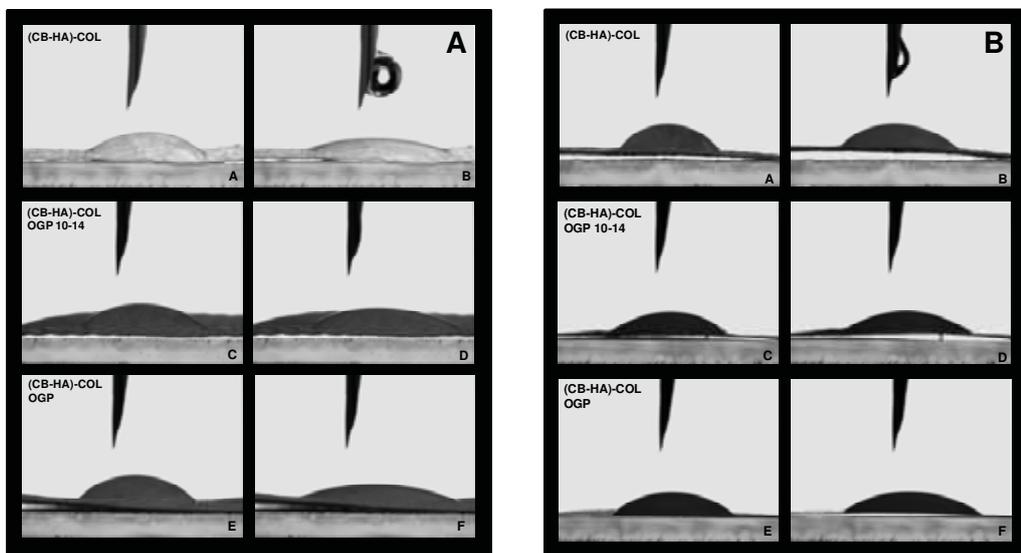


Figura 48 - A) Amostras do grupo da (CB-COL)-HA antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: (CB-COL)-HA T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: (CB-COL)-HA OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: (CB-COL)-HA OGP T=0s e T=10s, respectivamente. **B)** Amostras do grupo da (CB-COL)-HA antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: (CB-COL)-HA T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: (CB-COL)-HA OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: (CB-COL)-HA OGP T=0s e T=10s, respectivamente.



Os ângulos de contato mensurados para as amostras do grupo (CB-HA)-COL mostrou que após a esterilização as amostras apresentaram-se menos hidrofílicas, sugerindo que ocorreu a reticulação das fibrilas de colágeno e/ou diminuição de grupos OH, como discutido anteriormente (Figura 49).

Figura 49 - A) Amostras do grupo da (CB-HA)-COL antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: (CB-HA)-COL T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: (CB-HA)-COL OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: (CB-HA)-COL OGP T=0s e T=10s, respectivamente. **B)** Amostras do grupo da (CB-HA)-COL antes da esterilização com radiação gama 20 kGy; a e b: (CB-HA)-COL T=0s e T=10s, respectivamente; c e d: (CB-HA)-COL OGP [10-14] T=0s e T=10s, respectivamente; e e f: (CB-HA)-COL OGP T=0s e T=10s, respectivamente.



Em geral, estas amostras apresentaram superfícies mais hidrofílicas comparadas às amostras (CB-COL)-HA. Apesar dessas amostras teoricamente terem os mesmos constituintes em sua composição, a principal fase inorgânica para (CB-HA)-COL é CDHA e para (CB-COL)-HA é carbonato-apatita, ou seja, a CDHA possui mais grupos OH em sua composição do que a carbonato-hidroxiapatita e este fator corrobora com os valores observados. Além disso, no compósito (CB-COL)-HA o colágeno está ligado à CB, e no compósito (CB-HA)-COL, o colágeno, recobre as fibrilas de CB com CDHA. Esses dois fatores podem influenciar tanto na energia de superfície quanto na taxa de intumescimento. No entanto, a adição do colágeno ao compósito CB-HA tornou a superfície menos hidrofílica, resultado que confirma os dados observados para taxa de intumescimento.

Para este compósito, (CB-HA)-COL, a adsorção dos peptídeos OGP promoveu uma superfície mais hidrofílica comparada à amostra (CB-HA)-COL, mesmo após a esterilização, contradizendo os resultados observados para taxa de intumescimento (Figura 44). Esta amostra foi a única que, com adição de ambos os peptídeos, OGP e OGP [10-14] e após a esterilização, a superfície tornou-se mais hidrofílica.

Em geral, os peptídeos conferiram uma superfície mais hidrofóbica para a maioria das amostras, exceto para (CB-HA)-COL, e para CB-COL, cuja superfície se apresentou mais hidrofílica com a adsorção de OGP e OGP [10-14], respectivamente. Além disso, o ângulo de contato ou propriedade hidrofóbica aumentou e a taxa de intumescimento dos materiais diminuiu após o emprego da radiação gama a 20 kGy.

3.4.9 Ensaio mecânico de resistência à tração

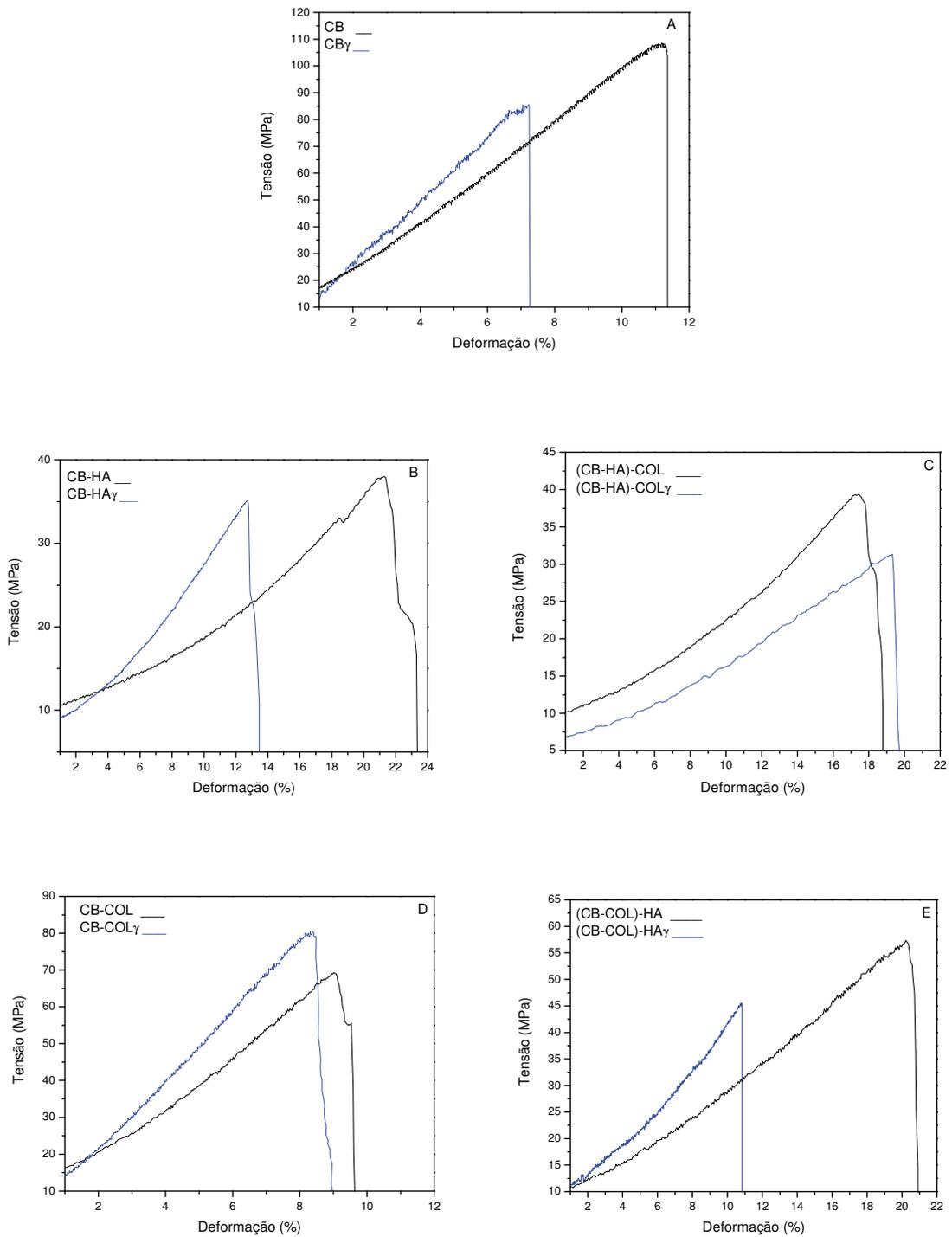
A Figura 50 mostra as curvas típicas para tensão-deformação para cada tipo de membrana antes e após a esterilização. As amostras CB, CB-HA, CB-COL, (CB-HA)-COL e (CB-COL)-HA foram testados com uma média de espessura de 0,04, 0,15, 0,06, 0,16, 0,11 mm, respectivamente. Todas as amostras tanto antes quanto após a esterilização apresentaram um padrão de tensão-deformação similar, ou seja, a tensão aumenta linearmente (elasticamente) com relação à deformação, apresentando um padrão de resistência à tração na ruptura. Os resultados revelaram que a incorporação tanto de colágeno quanto de HA à CB diminui a resistência à tração e o módulo de elasticidade, porém aumentou a elongação à ruptura. Além disso, quando a HA é incorporada as amostras CB e CB-COL, em geral, aumenta o valor de elongação à ruptura.

De acordo com esses dados de resistência a tração e com as curvas tensão-deformação (Figura 50), verificou-se que quanto menor o módulo de elasticidade maior a deformação a ruptura, sendo que o compósito (CB-HA)-COL foi o que apresentou maior deformação a ruptura, principalmente após a esterilização.

Além disso, observou-se que o aumento da elongação a ruptura promoveu diminuição na resistência à tração para todas as amostras após a esterilização, exceto para o compósito (CB-HA)-COL, o qual apresentou módulo de elasticidade

com valores próximos tanto antes quanto após a esterilização (0,18 e 0,16 GPa respectivamente).

Figura 50 - Típicas curvas de tensão-deformação das membranas CB (A), CB-HA (B), (CB-HA)-COL (C), CB-COL (D) e (CB-COL)-HA (E) antes e após a esterilização sob carga de tração.



Os valores das médias e erro padrão de resistência à tração (MPa) e alongação de ruptura (%) obtidos por meio do ensaio estático de tração estão expostos na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores mensurados no ensaio de resistência à tração para as amostras CB, CB-HA, (CB-HA)-COL, CB-COL e (CB-COL)-HA antes e após a esterilização com radiação gama (20 kGy).

Amostra	Resistência à tração (MPa)	Deformação (%)	Módulo de elasticidade (GPa)
CB	95,1 ± 4,6	11,8 ± 0,5	0,9 ± 0,03
CB γ	83,5 ± 6,0	7,8 ± 0,8	1,13 ± 0,1
CB-HA	38,2 ± 1,4	23,0 ± 2,2	0,19 ± 0,03
CB-HA γ	35,8 ± 1,8	13,9 ± 0,4	0,27 ± 0,02
(CB-HA)-COL	39,6 ± 0,7	23,8 ± 2,3	0,18 ± 0,01
(CB-HA)-COL γ	32,5 ± 2,0	24,8 ± 6,8	0,16 ± 0,01
CB-COL	76,7 ± 4,9	14,5 ± 2,8	0,63 ± 0,11
CB-COL γ	84,6 ± 4,8	10,1 ± 1,1	0,88 ± 0,08
(CB-COL)-HA	57,7 ± 1,8	21,6 ± 2,6	0,23 ± 0,03
(CB-COL)-HA γ	45,0 ± 4,0	10,8 ± 1,7	0,45 ± 0,07

Cada valor é a média de 5 determinações e com respectivo erro padrão

Os valores para módulo de elasticidade desses compósitos ainda estão longe do valor de referência para o módulo de elasticidade do tecido ósseo, 7 a 20 GPa (HENCH, 1991). Porém, estes compósitos quando comparados aos da literatura apresentaram valores extremamente superiores para resistência à tração, módulo de elasticidade e para deformação a ruptura. Song et al. (2007) obtiveram dois tipos de membranas para regeneração óssea de nanocompósitos de colágeno-hidroxiapatita com 20% e 40% de HA, os quais apresentaram valores para resistência à tração de 1,55 e 2,37 MPa, respectivamente; os valores para o módulo de elasticidade foram 42 e 83 MPa, respectivamente e as porcentagens de deformação foram de 5,7 e 4,1%, respectivamente. De acordo com Teng et al. (2008), os valores obtidos para seu compósito de colágeno-HA foram 4,8 MPa para resistência à tração, 178,6 MPa para módulo de elasticidade e 4,1% para deformação a ruptura.

Coïc et al. (2010) estudaram a resistência mecânica a tração para três membranas comerciais para regeneração óssea guiada e observaram que as medidas para resistência à tração, módulo de elasticidade e deformação a ruptura diminuíram após serem umedecidas, e obtiveram os seguintes valores para membranas úmidas: 1. Biomend Extend[®] (Zimmer[™]): resistência à tração 4 MPa,

módulo de elasticidade 20 MPa e deformação a ruptura 25%; 2. TBR[®] (Neomem[™]): resistência à tração 1,6 MPa, módulo de elasticidade 10 MPa e deformação a ruptura 26%. Os ensaios para membrana Bio-Gide[®] (Geistlich[™]) foram realizados somente para membrana seca e os resultados obtidos foram, resistência à tração 15 MPa, módulo de elasticidade 105 MPa e deformação a ruptura 31,5%.

Baseados nestes dados da literatura, conclui-se que a CB serviu como uma excelente matriz para incorporação do colágeno e da hidroxiapatita, principalmente em relação a quantidade de colágeno; contudo, neste trabalho foram obtidos compósitos com valores superiores principalmente para módulo de elasticidade, o qual foi em GPa, excelentes valores para resistência à tração mesmo com a presença de HA, além disso, o mínimo valor para deformação a ruptura foi quase três vezes superior mesmo após a esterilização.

Outro resultado importante foi que esses testes mecânicos revelaram que os novos compósitos desenvolvidos neste trabalho apresentaram grandes avanços nas propriedades mecânicas quando se utilizou colágeno e HA para confecção de membranas para regeneração óssea.

3.5 Análises in vitro

3.5.1 Morfologia celular

Ao final dos períodos de 01, 03 e 07 dias, as células cultivadas sobre as membranas CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA, (CB-HA)-COL e com os respectivos peptídeos, OGP e OGP [10-14] adsorvidos foram submetidas ao protocolo de fluorescência direta para avaliação da adesão e morfologia celular. A epifluorescência das culturas marcadas com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde) revelou que, em um (1) dia, as células crescidas sobre as membranas CB e CB OGP [10-14] estavam aderidas e exibiam morfologia predominantemente arredondada (Figura 51A e C), enquanto que aquelas cultivadas sobre a membrana CB OGP apresentaram-se mais espraídas e em maior número em comparação às membranas CB e CB OGP [10-14] (Figura 51B). Aos terceiro dia, as células cultivadas sobre CB, CB OGP e CB OGP [10-14] apresentaram-se em estágios mais avançados de espraiamento (Figura 51D-F). Ao sétimo dia, notou-se confluência da cultura, com áreas de multicamadas, em quase toda a extensão das membranas de CB, CB OGP e CB OGP [10-14] (Figura 51G-I).

As células cultivadas sobre a membrana CB-COL no primeiro dia, apresentaram aderidas e exibiram morfologia arredondada (Figura 52A). Observou-se um menor espraiamento celular e um reduzido número de células sobre as membranas CB-COL e CB-COL OGP [10-14] (Figura 52A e C) em relação à membrana CB-COL OGP (Figura 52B). Aos três dias, as células cultivadas sobre as membranas CB-COL, CB-COL OGP e CB-COL OGP [10-14] apresentaram-se espraídas (Figura 52D-F), porém com uma tendência a um maior número de células sobre a membrana CB-COL OGP (Figura 52E) e também em relação às membranas do grupo CB. Aos 07 dias, as culturas sobre as membranas CB-COL, CB-COL OGP e CB-COL OGP [10-14] exibiram confluência celular, com a presença de áreas de multicamadas (Figura 52G-I), contudo observou-se uma maior população celular na membrana CB-COL OGP (Figura 52H).

Figura 51 - Epifluorescência de células osteoblásticas cultivadas sobre membranas de CB (A, D e G), CB OGP (B, E e H) e CB OGP [10-14] (C, F e I), em 01 (A-C), 03 (D-F) e 07 (G-I) dias. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alex Flúor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação do DNA por DAPI), o núcleo celular. Barra para A-I = 100 μ m.

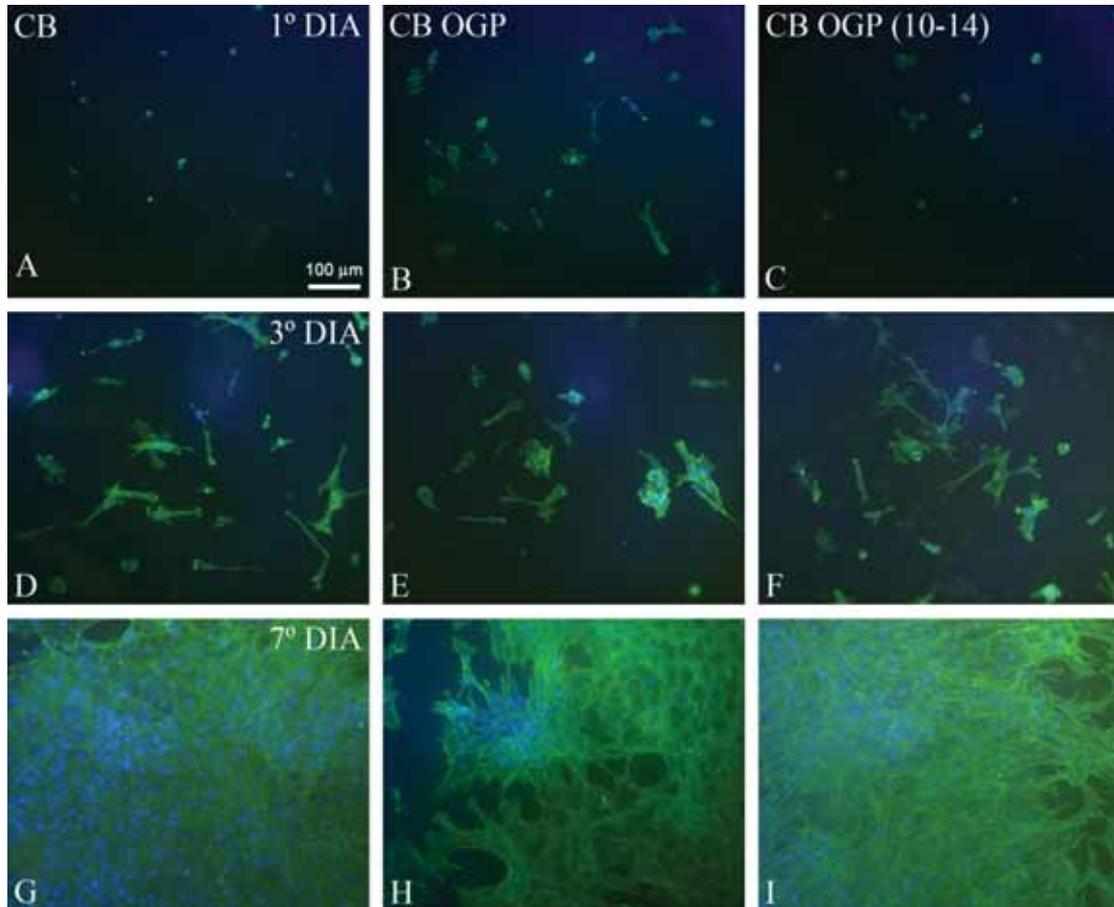
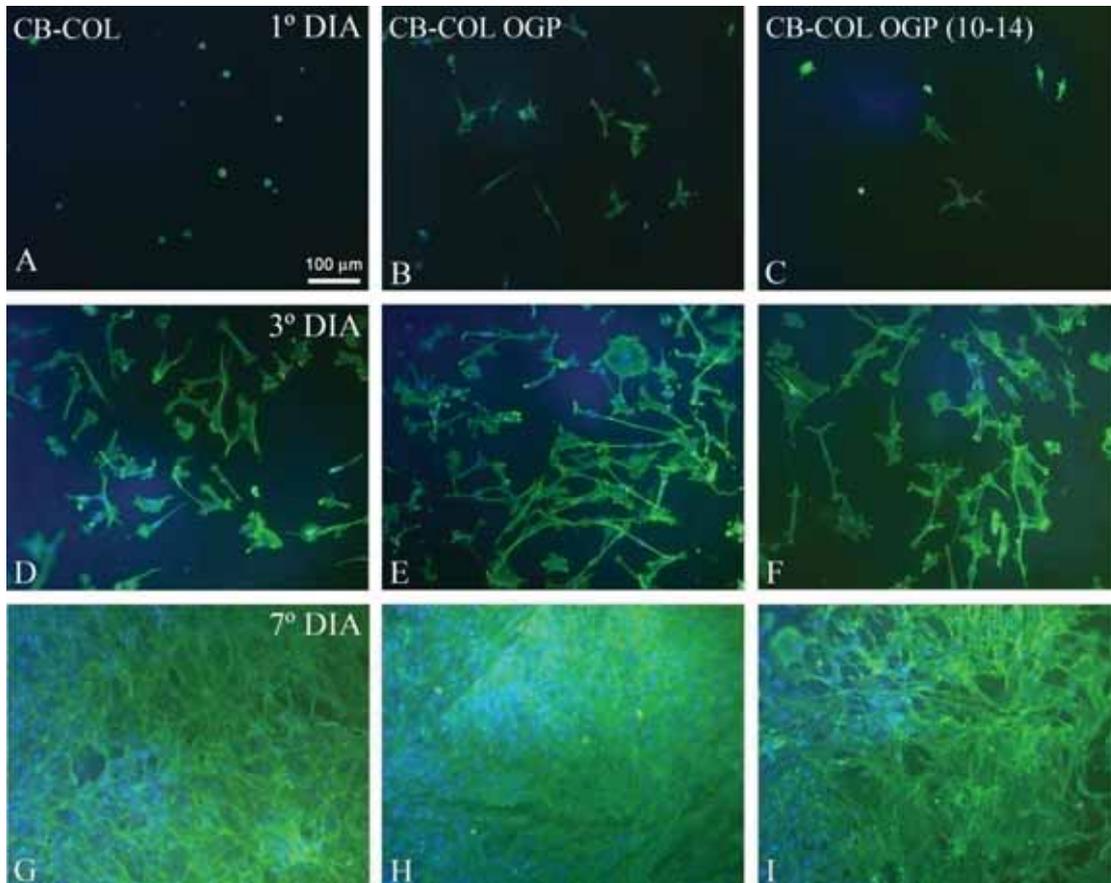


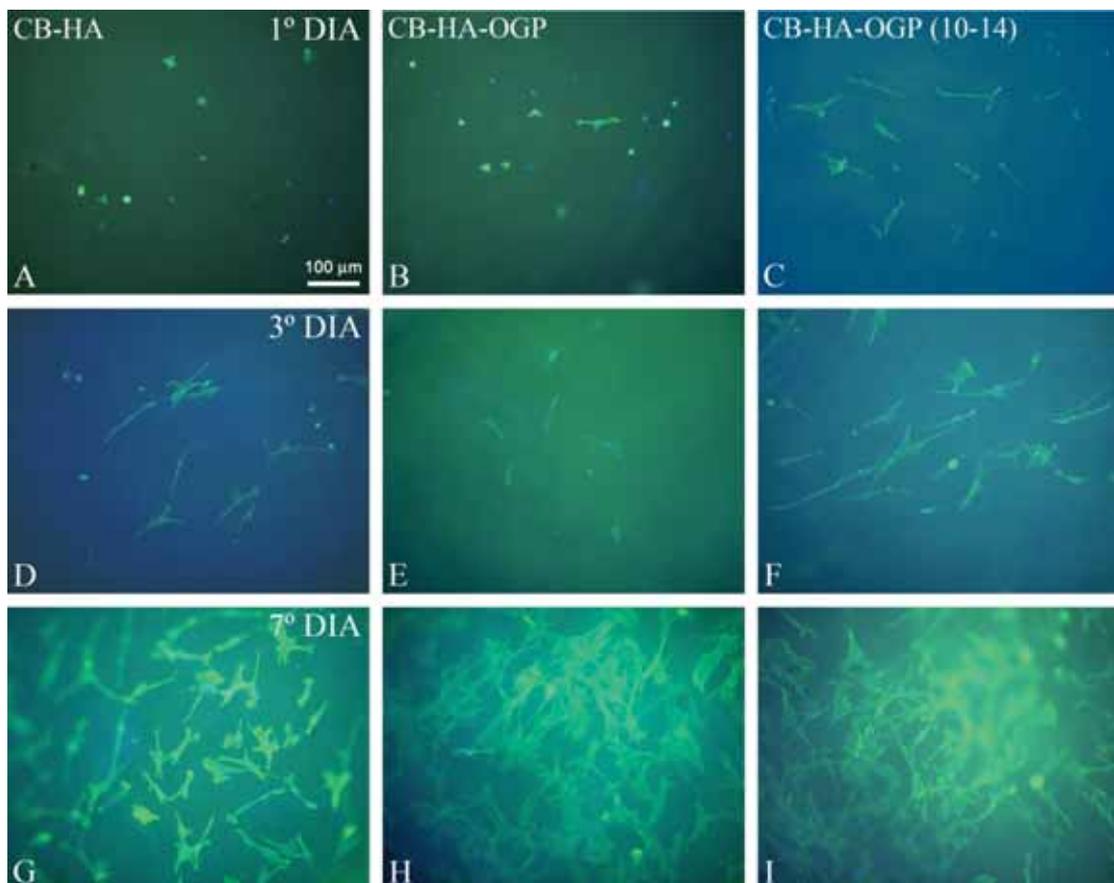
Figura 52 - Epifluorescência de células osteoblásticas cultivadas sobre membranas de CB-COL (A, D e G), CB-COL OGP (B, E e H) e CB-COL OGP [10-14] (C, F e I), em 01 (A-C), 03 (D-F) e 07 (G-I) dias. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alex Flúor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação do DNA por DAPI), o núcleo celular. Barra para A-I = 100 μ m.



Nas membranas CB-HA e CB-HA OGP, em um dia, as células cultivadas sobre elas exibiram morfologia predominantemente arredondada (Figura 53A e B), enquanto aquelas crescidas sobre a membrana CB-HA OGP [10-14] apresentaram-se aderidas e espreiadas (Figura 53C). As células cultivadas sobre as membranas CB-HA, CB-HA OGP e CB-HA OGP [10-14], ao terceiro dia apresentaram-se espreiadas (Figura 53D-F). Sobre a membrana CB-HA OGP um reduzido número de células sobre esta membrana foi observado com relação às outras do mesmo grupo. (Figura 53E). No entanto, ao sétimo dia, as células cultivadas sobre as membranas CB-HA OGP e CB-HA OGP [10-14] apresentaram-se agrupadas e em sub confluência celular, ou seja, em estágios de morfologia similares (Figura 53H e I); porém nesse período, um menor número de células foi observado em culturas crescidas sobre as membranas CB-HA em comparação às culturas crescidas sobre

CB-HA OGP e CB-HA OGP [10-14] (Figura 53G). Além disso, ao sétimo dia, as culturas crescidas sobre este grupo de membranas, CB-HA, apresentaram um número reduzido de células em relação às membranas dos grupos, CB, CB-COL, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, principalmente em relação às membranas contendo peptídeos adsorvidos; exceto para a membrana (CB-HA)-COL que apresentou padrão semelhante de morfologia celular para as culturas crescidas na membrana de CB-HA.

Figura 53 - Epifluorescência de células osteoblásticas cultivadas sobre membranas de CB-HA (A, D e G), CB-HA OGP (B, E e H) e CB-HA OGP [10-14] (C, F e I), em 01 (A-C), 03 (D-F) e 07 (G-I) dias. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alex Fluór 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação do DNA por DAPI), o núcleo celular. Barra para A-I = 100 μ m.



As células cultivadas sobre as membranas (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP, no primeiro dia, mostraram-se aderidas e algumas células já exibiam morfologia espalhada (Figura 54A e B). No entanto, as células crescidas sobre a membrana (CB-COL)-HA OGP [10-14] exibiam aspectos mais avançados de espalhamento em relação aos observados em células cultivadas sobre (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP (Figura 54C). Em três dias, as células crescidas sobre as três membranas apresentaram-se espalhadas (Figura 54D-F); porém, observou-se um reduzido número de células crescidas sobre (CB-COL)-HA OGP em comparação ao observado em (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (Figura 54E), este padrão morfológico observado para estas amostras foi similar ao observado para o grupo das membranas CB-HA no mesmo período (Figura 53D-F). No período de 07 dias, notou-se o início da confluência celular em culturas crescidas (CB-COL)-HA (Figura 54G), enquanto culturas crescidas sobre (CB-COL)-HA OGP e (CB-COL)-HA OGP [10-14] mostraram-se confluentes e com áreas de multicamadas (Figura 54H e J). Com estes resultados, pode-se verificar que as amostras CB-COL OGP e (CB-COL)-HA OGP apresentaram qualitativamente padrões de morfologia celular similares ao sétimo dia; além disso, as culturas crescidas sobre estas duas membranas mostraram-se mais confluentes e com áreas de multicamadas do que as outras membranas no mesmo período.

A epifluorescência para a membrana (CB-HA)-COL, em 01 dia, revelou que as células crescidas sobre esta membrana estavam aderidas e redondas (Figura 55A), em relação às aquelas cultivadas sobre as membranas (CB-HA)-COL OGP e (CB-HA)-COL OGP [10-14] que exibiram maior espalhamento celular e número de células (Figura 55B e C). No período de 3 dias, as células cultivadas sobre as três membranas apresentavam-se espalhadas (Figura 55D-F). Ao sétimo dia, notou-se um reduzido número de células crescidas sobre a membrana (CB-HA)-COL como discutido anteriormente (Figura 55G); enquanto sobre as membranas (CB-HA)-COL OGP e (CB-HA)-COL OGP [10-14] as culturas estavam confluentes e com áreas de multicamadas (Figura 55H e I).

Figura 54 - Epifluorescência de células osteoblásticas cultivadas sobre membranas de (CB-COL)-HA (A, D e G), (CB-COL)-HA OGP (B, E e H) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (C, F e I), em 01 (A-C), 03 (D-F) e 07 (G-I) dias. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alex Flúor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação do DNA por DAPI), o núcleo celular. Barra para A-I = 100 μ m.

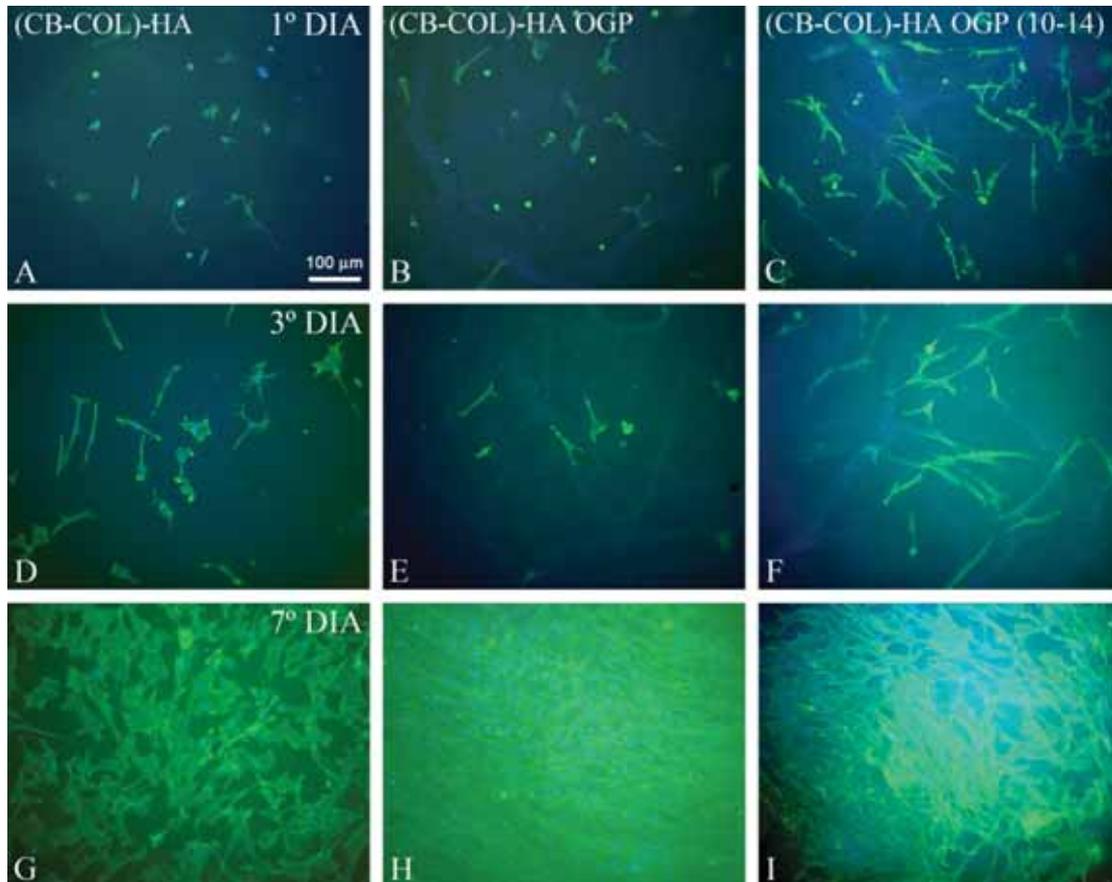
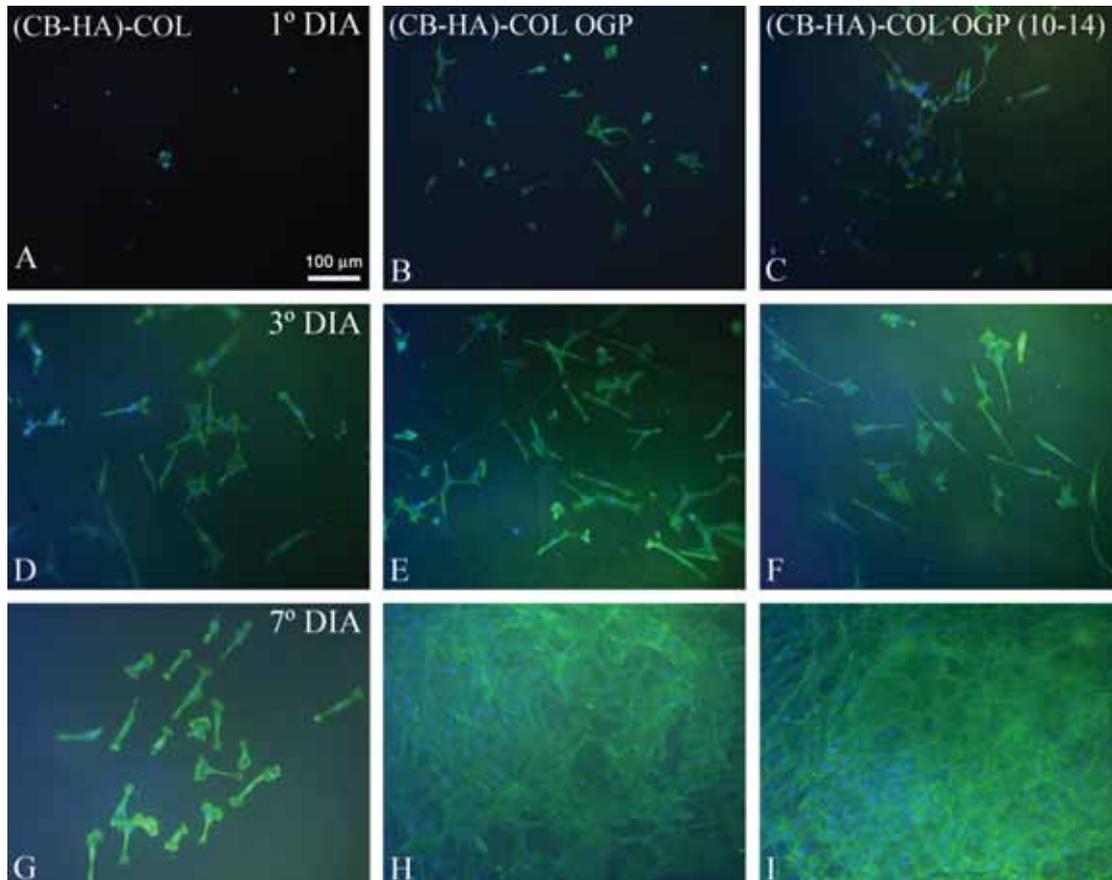


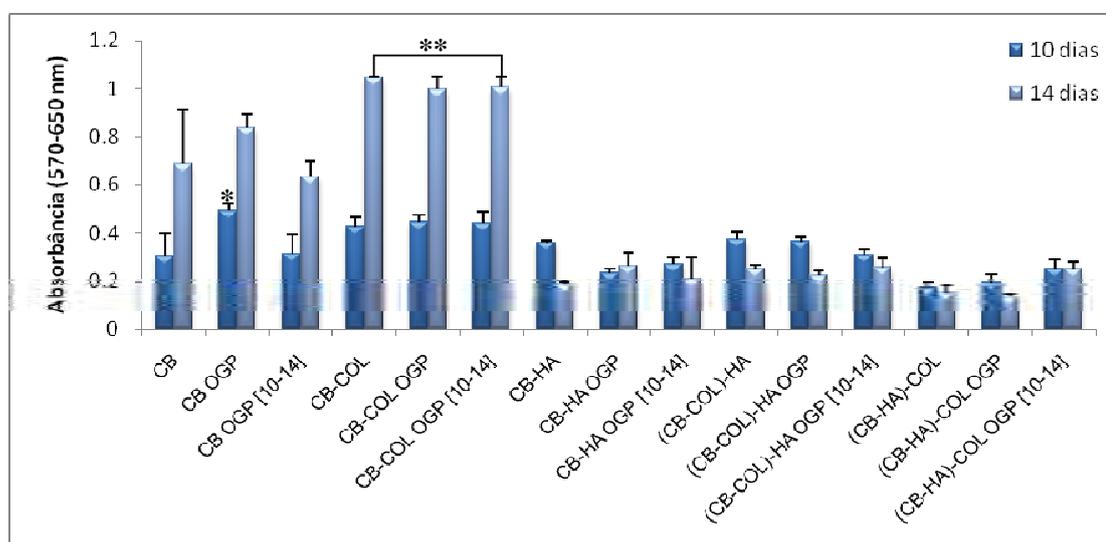
Figura 55 - Epifluorescência de células osteoblásticas cultivadas sobre membranas de (CB-HA)-COL (A, D e G), (CB-HA)-COL OGP (B, E e H) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (C, F e I), em 01 (A-C), 03 (D-F) e 07 (G-I) dias. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alex Flúor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação do DNA por DAPI), o núcleo celular. Barra para A-I = 100 μ m.



3.5.2 Proliferação e viabilidade celular

Os valores obtidos no ensaio de MTT para proliferação e viabilidade celular para as respectivas membranas estão representados na Figura 56 e Tabela 13, suas respectivas médias e desvio padrão.

Figura 56 - Proliferação de células osteoblásticas derivadas de calvária de rato cultivadas sobre membranas de CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com ou sem peptídeos OGP e OGP [10-14] adsorvidos, avaliada aos 10 e 14 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. (*) significância estatística quando comparado CB entre as todas as membranas estudadas ($p < 0,01$) para o período de 10 dias; (**) significância estatística entre as membranas em 14 dias ($p < 0,01$).



A membrana de CB apresentou taxa de proliferação celular similar quando comparado as outras membranas ($p > 0,05$) não apresentando diferença estatisticamente significativa, exceto para a membrana CB OGP que apresentou uma aumento na proliferação celular em 10 dias ($p = 0,008$).

Uma análise entre as membranas do grupo CB, a membrana CB OGP favoreceu uma maior proliferação celular estatisticamente significativa ($p < 0,01$) com valor similar a proliferação celular promovida pela membrana CB OGP [10-14] em 14 dias de cultura celular ($p = 0,16$). Aos 14 dias, as membranas CB e CB OGP [10-14] apresentaram proliferação celular estatisticamente similar ($p = 1,0$) e o peptídeo OGP favoreceu uma melhor proliferação celular nesse período para a membrana de CB.

Tabela 13 – Valores mensurados para MTT das culturas de células osteoblásticas derivadas de calvária de rato cultivadas sobre membranas de CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com ou sem peptídeos OGP e OGP [10-14] adsorvidos, avaliada em 10 e 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (letras diferentes indicam diferença estatísticas entre os grupos e tempos ($p < 0,05$)).

Membranas	Tempo (dias)					
	10			14		
	M	DP		M	DP	
CB	0,30	0,09	ABCa	0,68	0,23	Bab
CB OGP	0,49	0,03	DEb	0,84	0,05	Ca
CB OGP [10-14]	0,31	0,08	ABCa	0,64	0,07	Bab
CB-HA	0,36	0,04	BCDa	0,19	0,00	Aab
CB-HA OGP	0,23	0,03	ABb	0,26	0,05	Aa
CB-HA OGP [10-14]	0,27	0,05	ABa	0,21	0,04	Ab
CB-COL	0,43	0,01	CDa	1,05	0,01	Db
CB-COL OGP	0,44	0,02	CDa	1,00	0,06	Da
CB-COL OGP [10-14]	0,44	0,03	CDa	1,01	0,09	Da
(CB-COL)-HA	0,37	0,03	BCDa	0,25	0,01	Aab
(CB-COL)-HA OGP	0,37	0,02	BCDa	0,22	0,02	Ab
(CB-COL)-HA OGP [10-14]	0,31	0,02	ABCa	0,25	0,04	Aa
(CB-HA)-COL	0,17	0,02	Aa	0,15	0,03	Aa
(CB-HA)-COL OGP	0,19	0,03	Aa	0,13	0,01	Aa
(CB-HA)-COL OGP [10-14]	0,25	0,04	ABa	0,25	0,03	Aa

Conjunto de letras maiúsculas indica diferença entre os grupos num mesmo período e as letras minúsculas indicam diferença do mesmo grupo em função do tempo.

Nos compósitos CB-COL, ao 10^o e 14^o dias, a diferença da taxa proliferação celular entre as membranas deste grupo foi estatisticamente não significante em ambos os períodos ($p=1,0$), isto é, para o compósito CB-COL os peptídeos OGP e OGP [10-14] não favoreceram uma maior proliferação celular para células osteoblásticas derivadas de calvária de rato. Contudo, aos 10^o dia, os valores para MTT destas membranas foram estatisticamente maior em comparação as membranas do grupo (CB-HA)-COL com e sem peptídeo e para membrana CB-HA OGP ($p<0,01$). Em 14 dias, as membranas CB-COL com e sem peptídeo promoveram uma melhor proliferação celular em relação aos outros ($p<0,01$).

Nos dois períodos de análise 10 e 14 dias, entre os grupos contendo fase inorgânica em sua composição, observou-se uma tendência de uma menor taxa proliferativa das culturas crescidas sobre essas membranas.

As membranas CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP apresentaram uma maior proliferação celular em relação as membranas (CB-HA)-COL e (CB-HA)-COL OGP em 10 dias ($p<0,01$), porém a taxa proliferativa foi estatisticamente similar as outras membranas para o mesmo período de análise; em 14 dias, a taxa de

proliferação celular não foi estatisticamente significativa entre as membranas contendo apatita, mesmo com adsorção dos peptídeos ($p>0,05$).

Para tanto, quando realizada a comparação dessas membranas dentro de cada respectivo grupo, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, observou-se estatisticamente que as membranas CB-HA demonstraram uma taxa de proliferação maior do que as CB-HA com peptídeos; no grupo (CB-COL)-HA, a membrana (CB-COL)-HA OGP [10-14] favoreceu uma menor taxa de proliferação, porém no grupo (CB-HA)-COL o peptídeo OGP [10-14] que promoveu uma maior proliferação celular em relação as outras membranas do mesmo grupo no período de 10 dias. Em 14 dias todas essas membranas apresentaram comportamento de proliferação celular semelhantes ($p>0,05$).

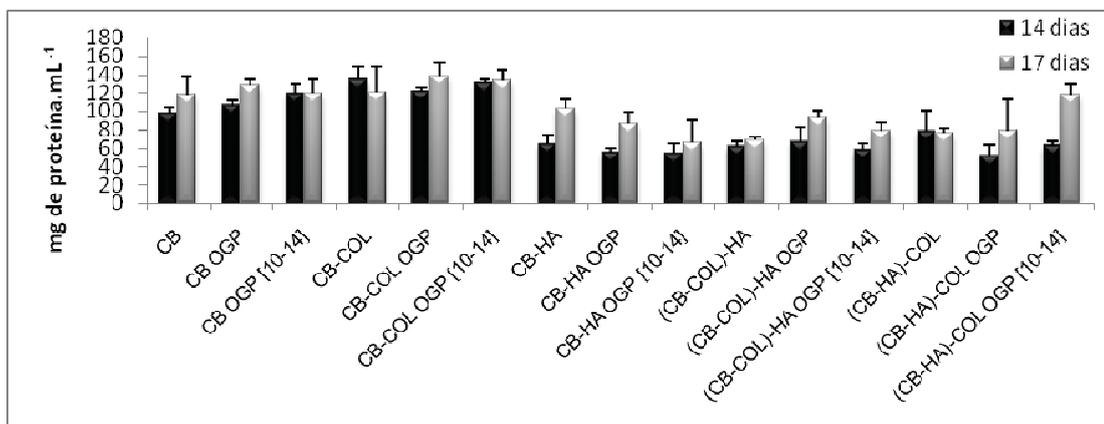
Portanto, os peptídeos OGP e OGP [10-14] em geral apresentaram uma maior ação proliferativa estatisticamente significativa entre os grupos das amostras ($p>0,05$) nos dois períodos, 10 e 14 dias para as membranas de CB, em que o peptídeo OGP favoreceu uma maior taxa proliferativa, e no grupo (CB-HA)-COL o peptídeo OGP [10-14] que promoveu uma maior proliferação celular. Estes resultados mostram que a ação sinérgica e antagônica destes peptídeos esteve diretamente relacionada ao tipo de membrana os quais foram adsorvidos.

3.5.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

3.5.3.1 Medida do conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi determinado pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), nos períodos experimentais 14 e 17 dias. Os resultados demonstraram que a síntese de proteína total foi maior para as culturas crescidas sobre as membranas dos grupos CB e CB-COL em 10 e 14 dias (Figura 57).

Figura 57 – Conteúdo de proteína total (mg de proteína.mL⁻¹) de células osteoblásticas derivadas de calvária de rato cultivadas sobre membranas de CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, com ou sem os peptídeos OGP e OGP [10-14] adsorvidos, avaliada aos 14 e 17 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.



3.5.3.2 Medida da atividade da ALP

A fosfatase alcalina é uma enzima presente na membrana de osteoblastos maduros atuando como um marcador precoce de diferenciação osteoblástica (KARSENTY, 1998). A ação enzimática da ALP, em pH alcalino, hidrolisa grupos fosfatos presente em moléculas orgânicas, fosfodiésteres ou de pirofosfato (potente inibidor da mineralização) entre outras moléculas, liberando assim íons fosfatos necessários ao processo de mineralização (CIANCAGLINI et al., 2006). No entanto, esta enzima é crucial para a iniciação do processo de mineralização da matriz óssea, mas não para progressão e manutenção desse processo (BELLOWS et al., 1991).

Na análise de atividade de ALP observou-se uma maior atividade desta enzima para os grupos das membranas CB-COL e (CB-COL)-HA em 14 e 17 dias, respectivamente (Figura 58 e Tabela 14). Dentro do grupo CB-COL, as membranas com os peptídeos OGP e OGP [10-14] promoveram uma maior atividade do que para a membrana CB-COL, e a atividade na CB-COL OGP foi superior em relação a todas membranas estudadas ($p < 0,001$; ver Anexo 3) em 14 dias. Porém aos 17 dias, as culturas crescidas sobre a membrana CB-COL OGP apresentaram menor atividade da ALP estatisticamente significativa em relação as membranas CB-COL e

CB-COL OGP [10-14] ($p < 0,001$), sugerindo que as culturas crescidas sobre as membranas CB-COL OGP estão em fase de progressão de diferenciação celular e mineralização da matriz; fato este que também pode ser atribuído para as membranas do grupo CB, CB e CB OGP, pois com os dados mensurados para mineralização da matriz, verificou-se que ocorreu uma maior deposição de cálcio nessas respectivas membranas.

A membrana CB-COL apresentou atividade da ALP estatisticamente igual nos dois períodos de análise ($p > 0,05$), além disso, outras membranas obtiveram o mesmo padrão de atividade da ALP observado para CB-COL, em 14 dias; tais como, CB-COL OGP [10-14], (CB-COL)-HA, (CB-COL)-HA OGP, (CB-COL)-HA OGP [10-14], (CB-HA)-COL OGP e (CB-HA)-COL OGP [10-14].

No grupo das membranas (CB-COL)-HA, a atividade da ALP foi maior aos 17 dias nas 03 membranas, com uma tendência maior da atividade para as membranas com peptídeo OGP, porém não estatisticamente significativa ($p = 0,45$ e $p = 0,82$, respectivamente) (Figura 58 e Tabela 14).

Figura 58 – Atividade de ALP (μmol timolftaleína/h/mg de proteína) de células osteoblásticas derivadas de calvária de rato cultivadas sobre membranas de CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, com ou sem os peptídeos OGP e OGP [10-14] adsorvidos, avaliada aos 14 e 17 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($p < 0,05$).

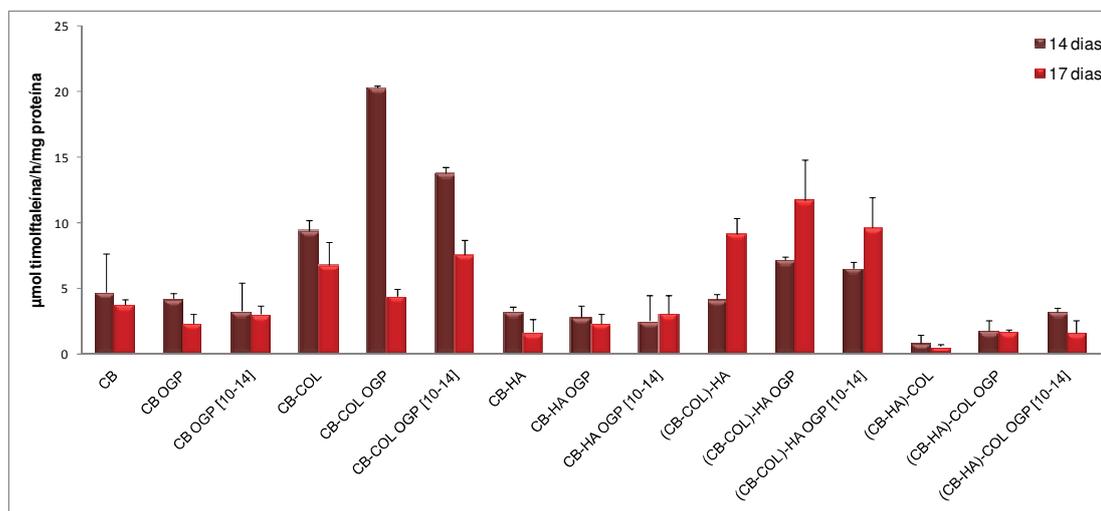


Tabela 14 – Valores mensurados para atividade da ALP das culturas de células osteoblásticas derivadas de calvária de rato cultivadas sobre membranas de CB, CB-COL, CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com ou sem peptídeos OGP e OGP [10-14] adsorvidos, avaliada em 14 e 17 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (letras diferentes indicam diferença estatísticas entre os grupos e tempos ($p < 0,05$)).

Membranas	Tempo (dias)			
	14		17	
	M	DP	M	DP
CB	4.752	2.882 Ba	3.743	0.434 Ca
CB OGP	4.208	0.408 Ba	2.350	0.712 Ba
CB OGP [10-14]	3.249	2.178 ABa	3.012	0.669 CBa
CB-HA	3.262	0.746 ABa	1.671	1.718 ABa
CB-HA OGP	2.823	0.199 ABa	2.345	0.547 CBa
CB-HA OGP [10-14]	2.540	0.430 ABa	3.056	1.147 CBa
CB-COL	9.430	0.317 Ca	6.804	0.984 Da
CB-COL OGP	20.278	0.871 Db	4.427	0.743 Ca
CB-COL OGP [10-14]	13.794	1.921 Eb	7.558	1.411 Da
(CB-COL)-HA	4.195	0.345 Ba	9.163	1.235 Eb
(CB-COL)-HA OGP	7.161	0.232 Ca	11.750	3.042 Eb
(CB-COL)-HA OGP [10-14]	6.575	0.410 Ca	9.618	2.356 Ea
(CB-HA)-COL	0.850	0.623 Aa	0.549	0.190 Aa
(CB-HA)-COL OGP	1.772	0.780 ABa	1.695	0.124 ABa
(CB-HA)-COL OGP [10-14]	3.193	0.323 ABa	1.653	0.896 ABa

Conjunto de letras maiúsculas indica diferença entre os grupos num mesmo período e as letras minúsculas indicam diferença do mesmo grupo em relação ao tempo.

Comparando as membranas com OGP entre si, aos 14 dias, a atividade de ALP da cultura crescida na membrana CB-COL OGP com descrito acima foi maior que para as outras membranas, e em 17 dias a atividade de ALP foi maior para a membrana (CB-COL)-HA, e estatisticamente significativa entre as membranas do mesmo grupo (Tabela 14). Sendo que, para as membranas com OGP [10-14], quando comparadas entre si, a atividade de ALP foi maior para a membrana CB-COL OGP [10-14] ($p < 0,001$) em 14 dias, porém aos 17 dias, as membranas (CB-COL)-HA OGP [10-14] promoveram uma maior de atividade de ALP, porém estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação as outras membranas com OGP [10-14]. No entanto, os valores mensurados para atividade de ALP para estas duas membranas foram similar aos mensurados para as membranas (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP no mesmo período de análise.

Os resultados obtidos neste ensaio de atividade de ALP sugerem que as membranas dos grupos CB-COL e (CB-COL)-HA favoreçam o processo de

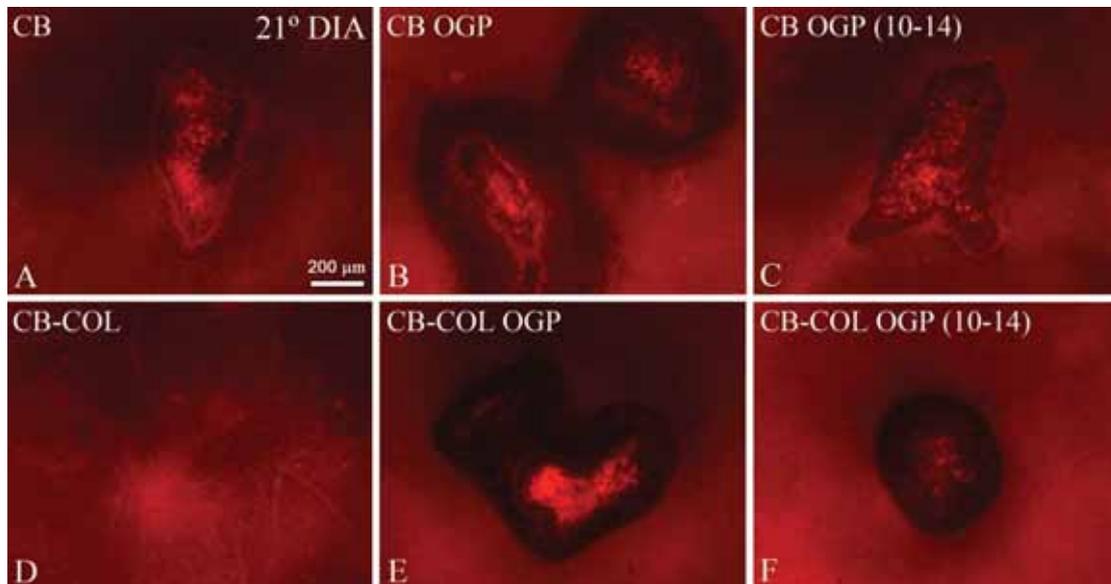
mineralização, apesar da presença de HA nos compósitos (CB-COL)-HA ter atrasado em 3 dias a atividade de ALP em relação ao compósito CB-COL; porém não podemos descartar a hipótese de que os grupos que apresentaram baixos valores de atividade enzimática podem estar num estágio mais avançado de mineralização das culturas celulares; ou ainda, que esses baixos valores nas membranas dos grupos CB-HA e (CB-HA)-COL estatisticamente similares ($p > 0,05$) podem estar relacionados ao atraso observado na adesão e proliferação celular. Desta forma, o pico de atividade de ALP das culturas crescidas sobre elas provavelmente ocorra em períodos superiores a 17 dias.

Estes resultados sugerem que as membranas contendo o peptídeo OGP podem favorecer o processo de mineralização, porém esta indução em menor tempo está diretamente relacionada ao tipo de carreador empregado.

3.5.4 Formação de matriz mineralizada

Aos 21 dias, as culturas foram coradas com vermelho de Alizarina para detecção de matriz calcificada. Por epifluorescência, notou-se a formação de nódulos de mineralização sobre as membranas CB e CB-COL. Maior número de nódulos foi observado em culturas crescidas sobre membranas em que peptídeo OGP estava adsorvido. Na membrana CB-COL não se observou formações nodulares típicas (Figura 59).

Figura 59 - Formação de matriz mineralizada detectada por vermelho de Alizarina aos 21 dias em culturas de células osteoblásticas. Nódulos de mineralização foram observados sobre as membranas CB (A-C) e CB-COL (E e F). Barra para A-C = 200 μ m.



Análises quantitativas das culturas coradas com vermelho de Alizarina revelaram significativamente maiores valores de absorvância de matriz calcificada sobre as membranas CB e CB OGP ($p < 0,05$) (Figura 60).

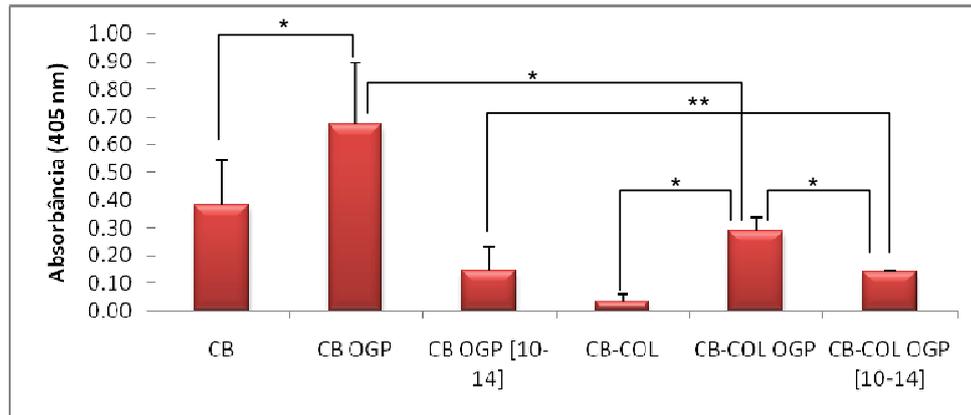
As amostras foram analisadas estatisticamente em grupos (do mesmo material) e depois para as membranas com OGP e para as membranas com OGP [10-14] separadamente.

Para o grupo da CB, observou-se que as membranas CB e CB OGP promoveram significativamente maior formação de nódulos mineralizados das culturas de células osteoblásticas sobre as respectivas membranas, do que sobre a membrana CB OGP [10-14] ($p = 0,03$). No grupo CB-COL, a membrana CB-COL OGP promoveu uma formação de nódulos mineralizados significativamente maior, do que CB-COL OGP [10-14] e CB-COL, porém a membrana CB-COL OGP [10-14] apresentou valores maiores para mineralização do que CB-COL ($p = 0,02$) (Figura 59).

Para as comparações entre as membranas com OGP [10-14] observou-se que não houve diferença significativa entre os valores de absorvância para quantificação de cálcio ($p > 0,05$). Para tanto, as membranas com OGP apresentaram diferença significantes entre si, sendo que a membrana CB foi a que serviu como

melhor carreadora para o peptídeo OGP em meio *in vitro*, pois foi a que apresentou maior quantidade de nódulos mineralizados sobre a superfície da membrana ($p < 0,05$) em relação as membranas CB-COL (Figura 60).

Figura 60 – Mineralização das culturas de células osteoblásticas crescidas sobre as membranas CB e CB-COL em 21 dias, expressadas pelo valor mensurado da absorbância em 405 nm. Os valores estão apresentados como média \pm e desvio padrão (Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$; ** $p > 0,05$).



A baixa quantidade formação de nódulos mineralizados sobre as membranas do grupo CB-COL em relação às membranas do grupo CB, pode sugerir que tenha ocorrido algum efeito sobre a progressão na diferenciação em fenótipo osteoblástico (DE OLIVEIRA et al., 2008). Embora, neste presente estudo, foram detectados valores maiores para a atividade de ALP em culturas crescidas sobre as membranas do grupo CB-COL em 17 dias, a análise quantitativa para a mineralização da matriz revelou um alto potencial osteogênico para as membranas do grupo CB. Outros autores também descrevem a falta de correlação entre a atividade da fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada para culturas primárias osteogênicas tem sido descrito também por outros autores (HOEMANN et al., 2009).

Apesar disto, as análises de epifluorescência e MTT indicaram que os compósitos a base de CB e colágeno não afetaram a adesão e proliferação celular. Estes resultados corroboram ao estudo realizado por Becker et al. (2002), o qual demonstrou que a liga de titânio recoberta por colágeno tipo I não teve efeito sobre proliferação de células osteoblástica. Adicionalmente, uma taxa de crescimento reduzido de células derivadas de calvária de rato foi descrito para culturas crescidas sobre colágeno comparado com aquelas crescidas sobre poliestireno (LYNCH et al., 1995). Outra hipótese para estes achados pode estar relacionada ao protocolo de

esterilização empregado para estas amostras. A radiação gama pode alterar as cadeias polipeptídicas das moléculas de colágeno, desta forma, alterando as propriedades físicas, químicas e biológicas (DZIEDZIC-GOCLAWSKA et al., 2005).

A organização das moléculas de colágeno influencia a morfologia celular, a organização actínica, bem como, a distribuição de subunidades da integrina (Mercier et al., 1996). Desta forma, uma possível alteração na estrutura do colágeno promovida pela radiação gama pode ter afetado a adesão e proliferação celular em culturas crescidas sobre as membranas do grupo CB-COL. Esta hipótese também pode ser levada em consideração para as culturas crescidas sobre os grupos das membranas CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, pois as análises de epifluorescência e MTT indicaram que estes compósitos, mesmo com peptídeo adsorvido a eles, afetaram a adesão e proliferação celular, bem como apresentaram também baixos valores para atividade de ALP para estas culturas. A compreensão desses fenômenos ficou comprometida uma vez que pelo método de detecção de íons cálcio empregado não foi possível detectar a presença de matriz mineralizada sobre as membranas CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL, visto que a HA utilizada em seu recobrimento também foi corada pelo vermelho de Alizarina; desta forma, estes 03 compósitos tanto podem ter adiantado a progressão das culturas crescidas sobre eles quanto ter atrasado. Futuros estudos de expressão gênica das proteínas ósseas poderão ser realizados para os esclarecimentos destes eventos.

Contudo, durante os processos de interações célula/material, as células primeiramente se aderem ao material e se espraiam, sendo que esta primeira fase de interação celular influencia na capacidade proliferativa e de diferenciação celular, e ainda, as células param de ciclar antes de iniciar o processo de diferenciação (ANSELME, 2000). Portanto, era de se esperar que os grupos com baixos valores para MTT (baixa taxa proliferativa) apresentassem os maiores valores de fosfatase alcalina, sendo que, maiores valores da atividade desta enzima favoreceriam o processo de mineralização, ou quando estes valores esivessem baixos poderia indicar uma maior progressão no processo de mineralização da matriz (diferenciação osteoblástica) (LEONE et al., 1997). Porém, durante essas interações osteoblasto/material, a expressão das proteínas foram modificadas segundo as características da superfície do material, tais como: rugosidade, energia de superfície, molhabilidade e composição química (ANSELME, 2000), ou seja, estas

características de superfície podem favorecer o crescimento da cultura celular, mas também promover um efeito deletério nas culturas.

Além disso, estudos *in vitro* prévios realizados com CB demonstraram que as células osteoblásticas foram mais sensíveis nos ensaios de citotoxicidade do que as culturas de células fibroblásticas L929 (CHEN et al., 2009), o que também pode justificar o atraso no espraiamento celular observado para essas culturas sobre estas membranas nos primeiros dias de incubação. É importante mencionar que a diferença na composição química e na topografia das membranas influenciaram diretamente a adesão e a proliferação celular.

O grupo de membranas CB-HA foi o que apresentou menor número de células crescidas sobre as mesmas em relação aos outros grupos, mesmo na presença dos peptídeos, corroborando aos dados mensurados para ângulo de contato, onde estas membranas apresentaram superfícies mais hidrofílicas do que as outras membranas. Um outro fator que pode ter favorecido o atraso dessas culturas pode estar relacionado ao processo dinâmico de troca iônica entre íons cálcio e fosfato entre material/células, o que não ocorreu de forma expressiva em sistemas *in vitro* como *in vivo*. Dessa forma ocorreu um aumento do pH do meio de cultura devido a presença de grande quantidade de íons Ca^{2+} presentes nos compósitos e a ação desta enzima pode ser inibida ou ficar limitada no sistema; uma vez que o pH levou um maior tempo para se restabelecer aos valores de condições ideais para o crescimento celular e da atividade da fosfatase alcalina, sendo que o pH é diretamente dependente da realização das trocas do meio de cultura a cada 2-3 dias. Esta hipótese poderia justificar o atraso na adesão celular nos primeiros dias de incubação e da morfologia esferoidal das células, pois o aumento da concentração de íons Ca^{2+} no meio levou a uma redução da atividade específica da fosfatase alcalina (LEONE et al., 1997).

De acordo com a literatura, membranas de alginato, com íons Ca^{2+} , promoveram uma morfologia celular esferoidal e um atraso no crescimento das culturas celulares de linhagem fibroblástica crescidas sobre estas membranas, sendo que estes resultados foram atribuídos aos altos níveis de íons Ca^{2+} sobre a superfície das membranas (NWE et al., 2010). Anada et al. (2008) relataram que a adesão e estágio inicial de proliferação celular estiveram diretamente relacionados à quantidade do revestimento com OCP sobre HA sintética, ou seja, quanto menor a camada do revestimento menor a taxa de adesão e proliferação celular e o OCP foi

capaz de induzir a diferenciação de células da medula óssea em células osteoblásticas. Além disso, o OCP aumentou a expressão de proteínas ósseas, como colágeno tipo I e ALP. No presente trabalho, foi observado que o grupo das membranas (CB-COL)-HA apresentou uma maior atividade para ALP em relação às outras membranas contendo HA, sendo que no compósito (CB-COL)-HA a principal fase inorgânica é carbonato-apatita e com uma razão molar Ca/P em torno 1,33, razão molar similar a do OCP, o que pode justificar que, a fase mineral incorporada ao compósito favoreceu a atividade a ALP como descrito acima.

Comparando os resultados de morfologia celular com os valores mensurados para ângulo de contato para os grupos das amostras estudadas, pode-se observar que o tipo de linhagem celular empregado, apresentou melhores resultados em superfície mais hidrofóbica, pois este tipo de superfície favoreceu maior adesão e espraiamento celular nos primeiros dias de cultura, resultado este que foi evidenciado, principalmente no grupo das membranas CB-COL, mas não favoreceram a diferenciação em fenótipo osteogênico nos períodos experimentais estudados.

Os resultados dos ensaios *in vitro* demonstraram que cada peptídeo tem uma resposta celular diferente para cada membrana desenvolvida, por exemplo, o OGP apresentou uma melhor atividade, quando adsorvido nos compósitos CB-COL e (CB-COL)-HA, e o OGP [10-14] parece apresentar atividade, quando adsorvido na CB-HA e (CB-HA)-COL. Entretanto, com estas hipóteses levantadas, as células osteoblásticas pareceram preferir um carreador com superfície de hidrofiliidade mediana, ou seja, nem tanto hidrofílico e nem muito hidrofóbico. Esta hipótese pode ser confirmada pelos resultados obtidos por Kalaskar et al. (2008), os quais estudaram a modificação da superfície da celulose vegetal ligando Fmoc-aminoácidos empregando a metodologia de síntese em fase sólida. Estes autores observaram que os aminoácidos aromáticos promoveram maior adesão e espraiamento de fibroblastos em relação às superfícies modificadas com aminoácidos hidrofílicos e alifáticos, cujo ângulo de contato mesurado foi superior a 65°, cujo valor favoreceu a adesão e proliferação celular. Desta forma, a adesão e espraiamento celular é um processo complexo, o qual não é somente dependente da hidrofiliidade de superfície do material, mas também da interação química específica entre moléculas ligadas a superfícies bioativas, e ainda, dependendo das células utilizadas, o efeito do biomaterial sobre a taxa de proliferação e morfologia

celular pode ser bastante diferente.

Segundo a literatura, nos últimos anos, biomateriais de colágeno ou baseado em colágeno têm sido extensivamente usados para regeneração óssea, sendo uma das principais razões em parte, devido ao colágeno representar em torno de 90 % da matriz óssea orgânica; desta forma, a incorporação do colágeno em diferentes substratos pode desenvolver superfícies capazes de melhorar a resposta celular e tecidual, como adesão e crescimento celular e aumento da regulação de genes associados ao osso, incluindo colágeno tipo I, osteopontina e fosfatase alcalina (LEE et al., 2009). Compósitos de CB/colágeno também promoveram maior adesão, espriamento e proliferação celular em relação a CB pura em cultura de células fibroblásticas (3T3) (ZHIJIANG; GUANG, 2011) e ainda, Wiegand et al. (2006) os compósitos CB-colágeno foram capazes de reduzir significativamente a quantidade de proteases (enzimas proteolíticas) e interleucinas e também reduziram consideravelmente a atividade dos radicais livres (oxigênio reativo – ROS). Portanto o compósito CB-COL poderia favorecer a reparação tecidual, principalmente de tecidos moles.

No entanto, neste presente estudo, a incorporação do colágeno a CB promoveu benefícios em termos de propriedades mecânicas, mas não favoreceu o processo de mineralização da matriz, mas, a funcionalização do compósito CB-COL com os peptídeos OGP e OGP [10-14] promoveu a aquisição do fenótipo osteogênico; desta forma os peptídeos, OGP e OGP [10-14], como também outros peptídeos e proteínas devem ser levados em consideração como uma estratégia fundamental para o desenvolvimento dos compósitos a base de CB.

Apesar da menor quantidade de células crescidas sobre as membranas CB-HA, outros estudos *in vitro* na literatura demonstraram que este compósito é biocompatível e promove a adesão, proliferação e diferenciação celular de linhagem de células osteoblásticas de medula óssea humana (hBMSC) (FANG et al., 2009) e de linhagem osteoblástica MC3T3-E1 (ZIMMERMANN et al., 2011).

A maioria dos estudos *in vitro* refere-se à CB e esta tem se destacado na produção de novos materiais, no entanto, ainda são escassos estudos *in vitro* e *in vivo* relacionados a compósitos desenvolvidos a partir de CB.

Backdahl et al. (2006) avaliaram *in vitro* o potencial da CB como *scaffold* com o objetivo de regenerar vasos sanguíneos utilizando células de músculo liso; observaram que a CB promoveu uma excelente adesão, proliferação e migração

celular. Membranas de CB também favorecerem a adesão e proliferação celular de células-tronco adultas removidas da medula óssea de cães (MENDES et al., 2009). Moreira et al. (2009) relataram que a CB não possui potencial genotóxico, porém a CB favoreceu uma ligeira redução na taxa de proliferação celular em culturas de células de fibroblastos de embrião de rato (3T3) e células CHO (células de ovário de *hamster* chinês). Além disso, *scaffolds* de celulose bacteriana microporosos promoveram excelente adesão e proliferação de células osteoprogenitoras (MC3T3-E1) (ZABOROWSKA et al., 2010).

Segundo a literatura, quando os peptídeos OGP ou OGP [10-14] são adicionados ao meio de cultura para diferentes linhagens celulares, como: osteoblástica, fibroblástica e de células mesenquimais, estes peptídeos promovem o aumento da taxa da proliferação celular (BAB et al., 1992; BAB et al., 1993; GREENBERG et al., 1993; BAB; EINHORN, 1994); além disso, em culturas de células mesenquimais ou osteoblásticas, os peptídeos aumentam a atividade da ALP e mineralização da matriz (ROBINSON et al., 1995; BAB; CHOREV, 2002). Embora, no presente estudo, os peptídeos estavam adsorvidos nos materiais e não no meio de cultura, pode-se observar o potencial desses peptídeos como relatado na literatura, ou seja, os mesmos favoreceram a proliferação celular e que principalmente, o peptídeo OGP, favoreceu um aumento na atividade da ALP nos períodos analisados para a membrana CB-COL (14 dias) e mineralização das culturas crescidas nas membranas CB e CB-COL.

No entanto, observou-se que o efeito dos peptídeos, OGP e OGP [10-14], foi dependente do tipo do carreador.

3.5 Análises *in vivo*

3.6.1 Análises radiográfica e histológica

As 220 imagens radiográficas dos referidos espécimes dos grupos experimentais apresentados na Tabela 5 foram analisadas utilizando os programas VinxWin Pro e *Adobe Photoshop 7.0*. Os valores da densidade óssea foram mensurados em pixels da região central dos defeitos ósseos recém reparados ou completamente reparados e depois foram convertidos para mmPb comparando com a densidade da escala de chumbo (0,5 – 3,5 mmPb) radiografadas juntos os espécimes. Os valores mensurados estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Densidade óssea do osso neoformado medida em pixels da região central dos defeitos ósseos dos referidos grupos I, II, III, IV, V e VI da análise experimental *in vivo* segundo os períodos experimentais. Os valores estão apresentados são as médias \pm erro padrão em mmPb referentes a escala padrão de chumbo utilizada nas radiografias.

Grupos	Amostras	Períodos			
		07 dias	15 dias	30 dias	120 dias
I	Controle	0,94 \pm 0,11 Aa	2,06 \pm 0,07 Bb	2,08 \pm 0,02 Ab	2,56 \pm 0,13 Ac
IId	CB	1,39 \pm 0,08 ABa	1,70 \pm 0,12 ABab	2,31 \pm 0,02 ABbc	2,84 \pm 0,32 ABc
Ile	CB OGP[10-14]	1,21 \pm 0,09 ABa	1,99 \pm 0,12 ABab	2,52 \pm 0,21 ABb	3,37 \pm 0,15 Bc
IIId	CB-HA	1,76 \pm 0,11 BCb	2,27 \pm 0,07 Cb	2,93 \pm 0,10 BCbc	3,43 \pm 0,12 Bc
IIle	CB-HA OGP[10-14]	1,65 \pm 0,09 Bb	2,36 \pm 0,13 Cb	3,46 \pm 0,09 Cc	3,32 \pm 0,12 ABc
IVd	CB-COL	0,96 \pm 0,06 Aa	2,05 \pm 0,08 Bb	2,58 \pm 0,13 ABbc	3,09 \pm 0,24 ABc
IVe	CB-COL OGP[10-14]	1,55 \pm 0,05 ABCa	2,12 \pm 0,06 Bab	2,76 \pm 0,11 ABCbc	3,42 \pm 0,08 Bc
Vd	(CB-COL)-HA	1,56 \pm 0,04 ABCa	1,96 \pm 0,10 ABa	2,37 \pm 0,12 ABbc	3,18 \pm 0,16 ABb
Ve	(CB-COL)-HA OGP[10-14]	1,35 \pm 0,10 ABa	2,18 \pm 0,10 Bb	2,49 \pm 0,13 ABbc	2,85 \pm 0,12 ABc
VIId	(CB-HA)-COL	1,59 \pm 0,02 ABCa	2,15 \pm 0,11 Bab	2,56 \pm 0,13 ABb	2,84 \pm 0,17 ABc
VIle	(CB-HA)-COL OGP[10-14]	1,84 \pm 0,11 Ca	2,11 \pm 0,11 Ba	2,33 \pm 0,17 ABb	3,16 \pm 0,18 ABc

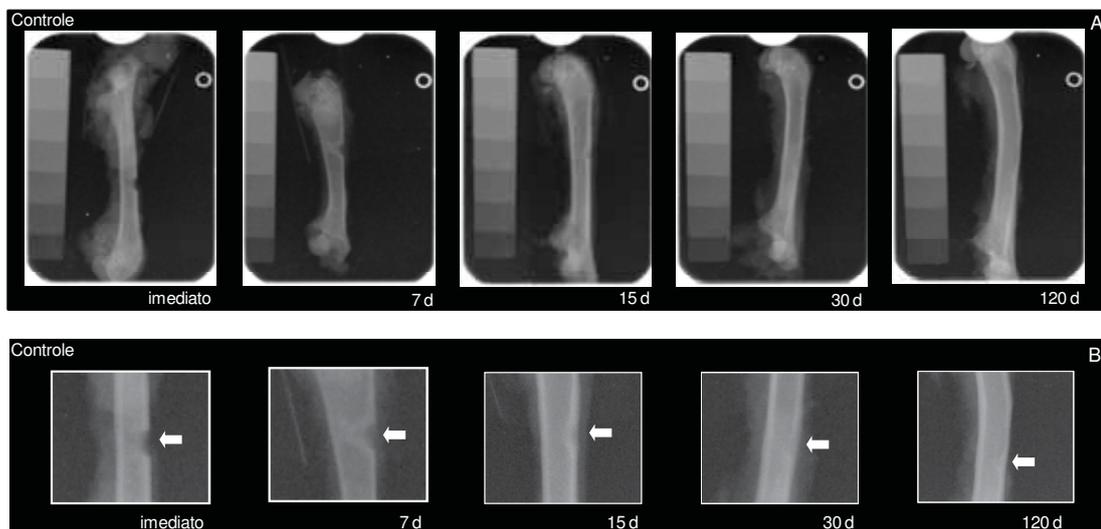
Controle imediato = 0,49 \pm 0,03. Conjunto de letras maiúsculas indica diferença entre os grupos num mesmo período e as letras minúsculas indicam diferença do mesmo grupo em função do tempo.

Grupo I: Controle

A Figura 61 mostra as imagens radiográficas para o grupo controle (I) nos respectivos períodos de análise. Ao sétimo dia, observou-se radiograficamente que

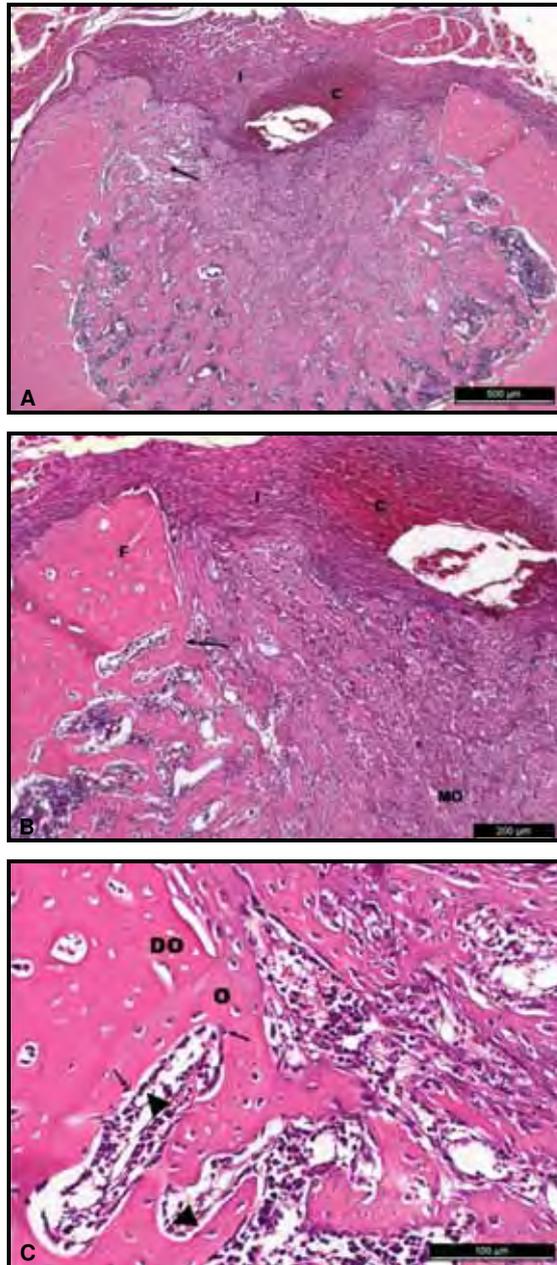
o espaço intramedular está em processo de reparação e ao 15^o dia apresentou-se em processo de reparação quase completo. Os valores de densidade óssea mensurados para o osso neoformado neste grupo nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias foram $0,94 \pm 0,11$, $2,06 \pm 0,07$, $2,08 \pm 0,02$ e $2,56 \pm 0,13$ mmPb, respectivamente. O valor de densidade óssea aumentou mais que duas (2) vezes para o período de 15 em relação ao período de 07 dias, contudo este valor se mantém até aos 30 dias.

Figura 61 - Imagens radiográficas digital do grupo controle (I). A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, em 120 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada.



No período de 07 dias, observou-se histologicamente a presença de tecido conjuntivo fibroso, coágulo sanguíneo no interior do defeito ósseo (Figura 62A) e uma leve reação inflamatória (estatisticamente não significativa; $p > 0,05$). Neste período, observou-se início da reparação óssea adjacente as paredes do defeito ósseo e a cortical óssea interna íntegra dos fêmures, com presença de formação de matriz osteóide em processo de mineralização, sintetizadas por osteoblastos originados das células do mesênquima (ossificação intramembranosa) (Figuras 62B e C). Na medula óssea, também se observou presença de neoformação óssea trabecular principalmente abaixo do defeito ósseo.

Figura 62 – Grupo controle: 07 dias. **A:** infiltrado inflamatório (I) e coágulo sanguíneo (C) no interior do defeito ósseo; neoformação óssea trabecular (seta); **B:** formação de matriz osteóide (seta) adjacente a parede do defeito ósseo (F), medula óssea (mo), infiltrado inflamatório (I) e coágulo sanguíneo; **C:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) e osso jovem (O) adjacente ao defeito ósseo (DO); osteoblastos sendo englobados pela matriz osteóide (setas).



Em 15 dias, observou-se uma neoformação óssea trabecular no interior do defeito ósseo em fase de mineralização (osso primário, ou imaturo) (Figura 63A), osteoblastos ativos adjacentes a estas trabéculas ósseas circundadas por grandes espaços medulares preenchidos por tecido mesenquimal; presença de matriz osteóide adjacente ao perióstio promovendo a reparação da cortical óssea externa (Figuras 63B e C). Além disso, a partir de 15 dias de pós-operatório observou-se ausência de reação inflamatória em todos os espécimes do grupo controle (Figura 63B). Resultados esses que corroboram com as imagens e valores para densidade óssea obtidos para o grupo controle.

Decorrido 30 dias, os defeitos ósseos se apresentaram reparados por tecido ósseo em fase de modelação de osso trabecular a lamelar, denominado osso composto (Figura 64A), no qual as fibras colágenas apresentaram-se de forma desorganizadas com poucas lamelas concêntricas ao redor dos canais de Havers ou ósteons e dos pequenos espaços medulares aprisionados no interior deste tecido ósseo, porém ainda em processo deposição de matriz mineralizada sobre o osso trabecular entrelaçado previamente formado; lamelas intersticiais também foram observadas entre os numerosos vasos sanguíneos e ósteons (Figuras 64B e C). A medula óssea apresentou-se organizada com ausência de trabéculas ósseas. Contudo, este tecido ósseo reparado apresentou-se em menor espessura que o tecido ósseo adjacente. Os defeitos ósseos na região da cortical óssea interna apresentaram-se preenchidos por medula óssea e algumas trabéculas ósseas pequenas com características de osso trabecular maduro (Figura 64B), resultados que corroboram aos dados radiográficos, os quais mostraram que a cortical interna do defeito ósseo ainda não apresenta uma delimitação definida.

Figura 63 – Grupo controle: 15 dias. **A:** neoformação óssea trabecular em fase de mineralização (osso imaturo) (setas) e medula óssea em remodelação (MO); **B:** formação de osso jovem (O) adjacente a parede do defeito ósseo (DO), trabéculas ósseas imaturas (setas), espaços medulares (EM); **C:** em maior aumento, observa-se presença de osteoblastos ativos (cabeça de seta) sintetizando trabéculas ósseas imaturas adjacentes ao defeito ósseo (DO), a qual se apresenta como trabéculas ósseas imaturas (T); osteoblastos sendo englobados pela matriz osteóide (setas).

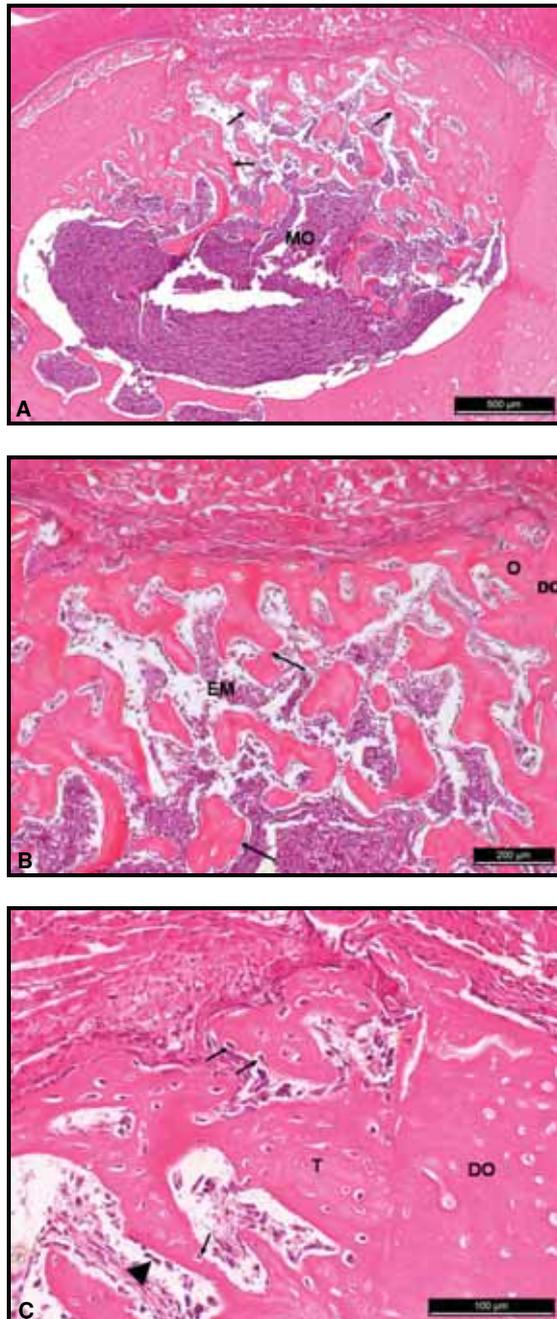
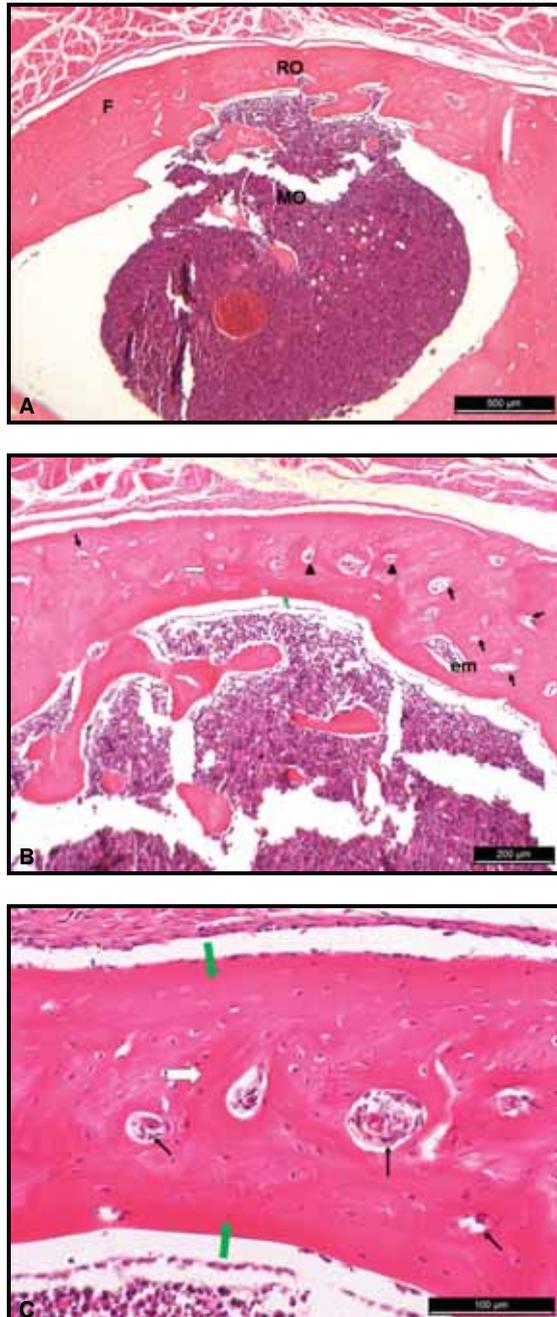
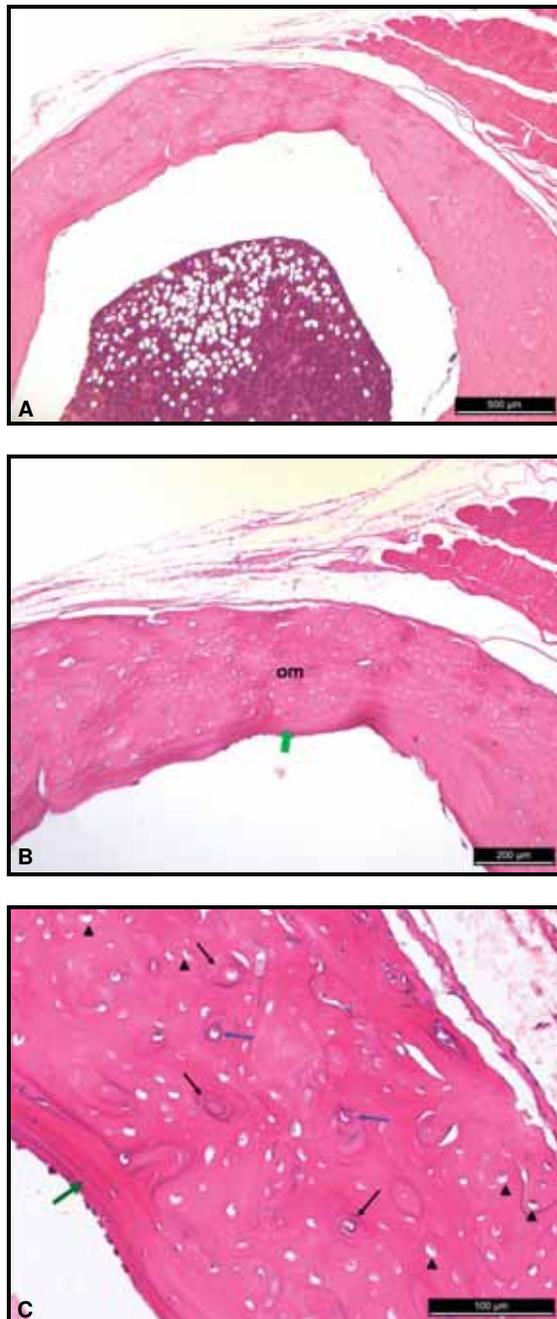


Figura 64 – Grupo controle: 30 dias. **A:** reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), osso fêmur (F) e medula óssea reparada (MO); **B:** inúmeros vasos sanguíneos (setas pretas) e ósteons (cabecças de setas), pequenos espaços medulares (em) aprisionados no interior deste tecido ósseo; lamelas ósseas paralelas (seta verde) e intersticiais (seta branca) **C:** nota-se a presença de lamelas paralelas nas corticais ósseas externas e internas (setas verdes), fibras colágenas desorganizadas no interior do defeito ósseo (seta branca) e vasos sanguíneos (setas pretas).



Aos 120 dias, o tecido ósseo no local defeito apresentou-se com característica de osso maduro (lamelar) (Figura 65A), ou seja, presença lamelas concêntricas, paralelas e intersticiais bem definidas; presença de numerosos osteons e vasos sanguíneos (Figura 65B). As lamelas paralelas foram observadas principalmente na cortical óssea interna reparada (Figura 65C). As imagens radiográficas também revelaram que a cortical óssea está totalmente reparada aos 120 dias de pós-operatório (Figura 61), sendo que o osso neoformado no interior defeito ósseo apresentou uma densidade óssea maior em relação ao período anterior, porém esta densidade óssea ainda apresentou um valor inferior quando comparado a densidade da cortical óssea adjacente ao defeito. O valor mensurado aos 120 dias para o grupo controle foi similar aos valores observados no período de 30 dias para os defeitos tratados com as membranas CB OGP [10-14], CB-COL, (CB-HA)-COL (2,52, 2,58 e 2,56 mmPb, respectivamente); valor significativamente inferior em relação aos valores de densidade óssea apresentada para os grupos tratados no mesmo período ($p < 0,01$).

Figura 65 – Grupo controle: 120 dias. **A:** reparação do defeito ósseo por osso maduro; **B:** Osso maduro com presença de inúmeros vasos sanguíneos e osteons (om) e na cortical óssea interna observa-se lamelas ósseas paralelas (seta verde); **C:** nota-se a presença de lamelas paralelas nas corticais ósseas internas (seta verde), vasos sanguíneos (setas azuis), osteons (setas pretas) e inúmeros osteócitos (cabeças de setas).



Grupo II: Membranas de CB e CB OGP [10-14]

As Figuras 66 e 67 mostram as imagens radiográficas para o grupo II, lado direito (IId) e esquerdo (Ile), respectivamente, nos referidos períodos de análise. Em 07 dias, as membranas CB e CB OGP [10-14] promoveram uma reparação do espaço intramedular e ao 15º dia, este espaço, apresentou-se com característica de normalidade similar ao grupo I. Porém, a densidade do osso neoformado em ambos os defeitos, IId e Ile, apresentou-se maior em comparação ao grupo I ao 7º dia, mas quando comparado ao período de 15 dias, observou-se que o grupo I apresentou uma densidade óssea maior, estatisticamente significativa ($p < 0,01$), em relação à densidade do osso neoformado dos subgrupos IId e Ile. Os valores de densidade óssea mensurados para o osso neoformado no interior dos defeitos para os subgrupos IId e Ile nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias foram para IId: $1,39 \pm 0,08$, $1,70 \pm 0,12$, $2,31 \pm 0,02$ e $2,84 \pm 0,32$ mmPb, respectivamente, e para Ile: $1,21 \pm 0,09$, $1,99 \pm 0,12$, $2,52 \pm 0,21$ e $3,37 \pm 0,15$ mmPb, respectivamente.

Figura 66 - Imagens radiográficas digital do subgrupo IId - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 120 dias observa-se a cortical óssea reparada.

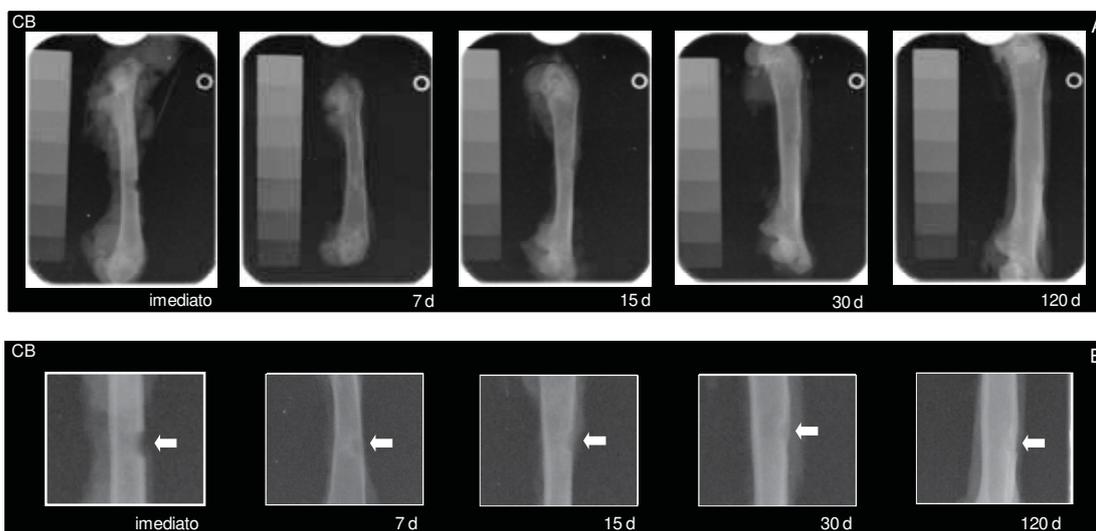
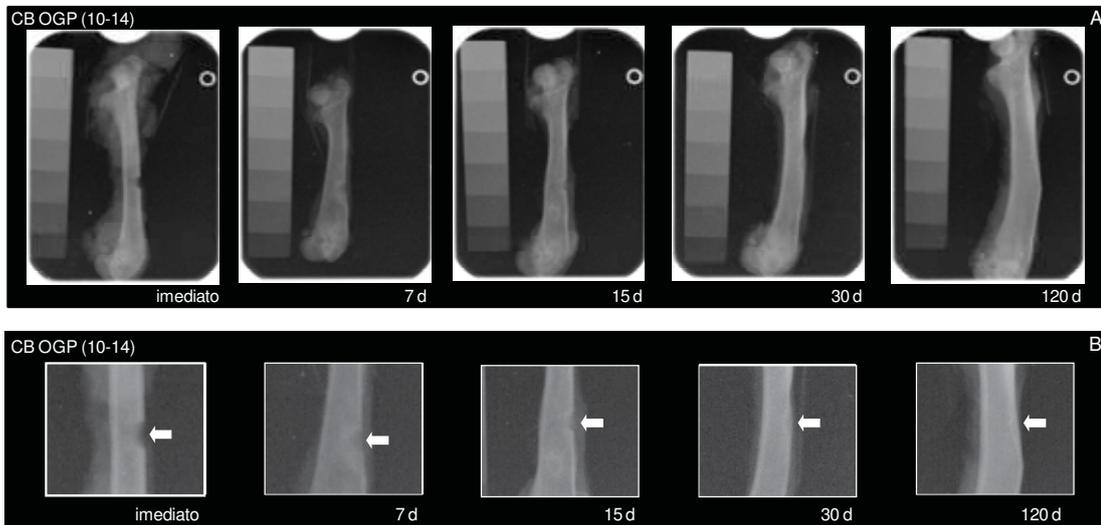


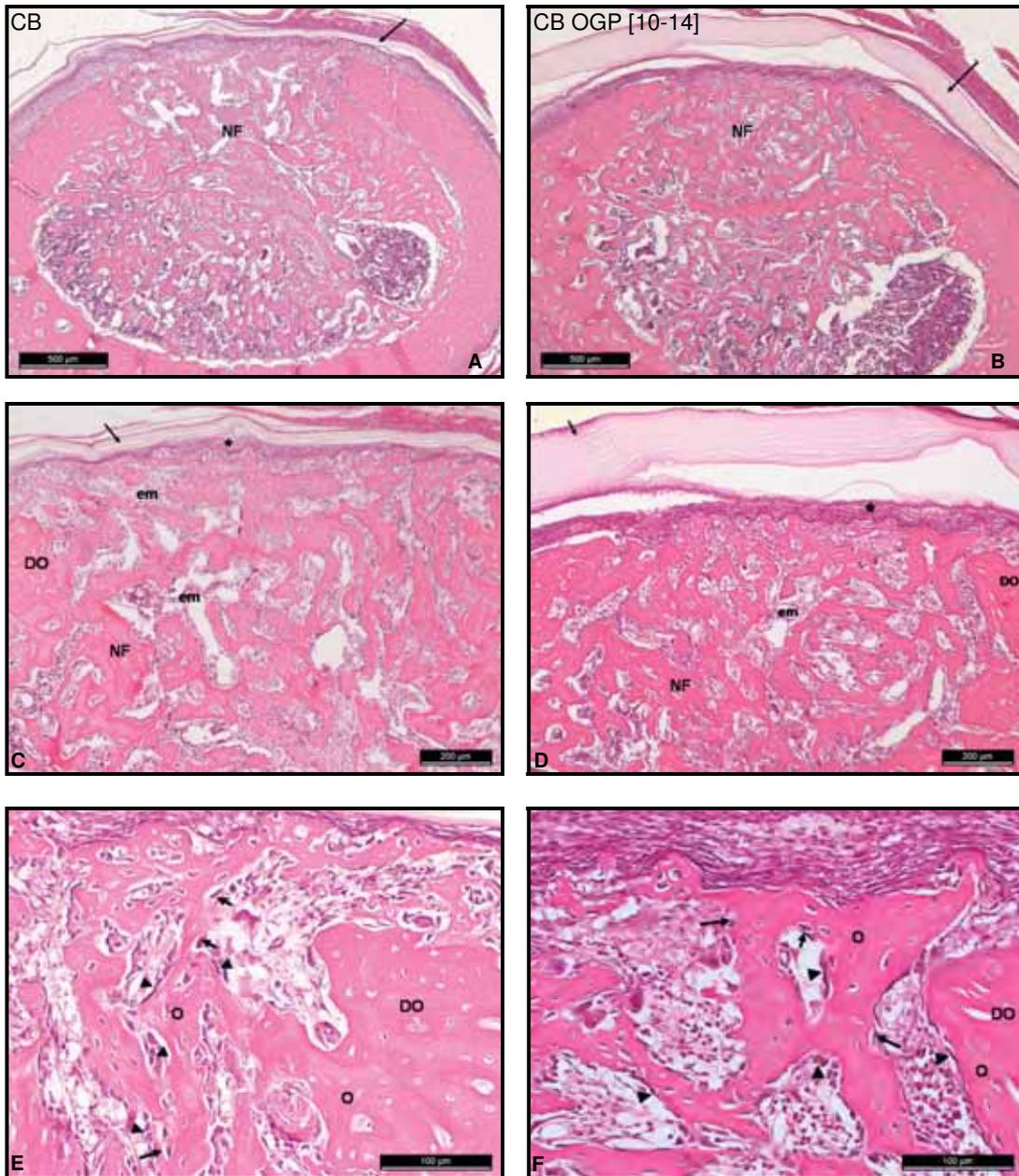
Figura 67 - Imagens radiográficas digital do subgrupo IId - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 30 dias observa-se a cortical óssea interna totalmente reparada e em 120 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada.



No grupo II, período de 07 dias, os resultados histológicos revelaram presença de neoformação óssea trabecular no interior dos defeitos ósseos para os dois subgrupos, IId e IId, com osteoblastos ativos adjacentes a estas trabéculas ósseas circundadas por grandes espaços medulares preenchidos por tecido mesenquimal; no entanto, histologicamente os defeitos ósseos tratados tanto com a membrana CB quanto com a membrana CB OGP [10-14] não apresentaram diferenças em relação a neoformação de trabéculas ósseas, isto é, estágio de mineralização similar (Figuras 68A-D), cujos aspectos histológicos observados, para este período, corroboram aos valores mensurados para densidade óssea nos dois subgrupos (IId 1,39 mmPb e IId 1,21 mmPb; $p=1,0$), as duas membranas favoreceram o mesmo padrão de neoformação óssea neste período. Com relação ao grupo controle, a neoformação óssea observada neste período se apresentou em estágio mais avançado nos dois subgrupos. Além disso, observou-se a presença de matriz osteóide adjacente a membrana e a parede do defeito ósseo (Figuras 68E e F); na medula óssea, também se observou uma presença de neoformação óssea trabecular preenchendo praticamente todo espaço do canal medular (Figuras 68A e B). Uma leve reação inflamatória foi observada neste período para os subgrupos, IId

e IIe; não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos ($p > 0,05$).

Figura 68 – Grupo II: 07 dias. **A e B**: neoformação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos (NF) e observa-se também a presença das membranas CB (A) e CB OGP [10-14] (B) (setas pretas); **C e D**: neoformação óssea trabecular imatura (NF) adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e no canal medular, espaços medulares (em), infiltrado inflamatório (asterisco) e respectivas membranas (seta); **E e F**: observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) e osso jovem (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e trabéculas ósseas; osteoblastos sendo englobados pela matriz osteóide (setas).

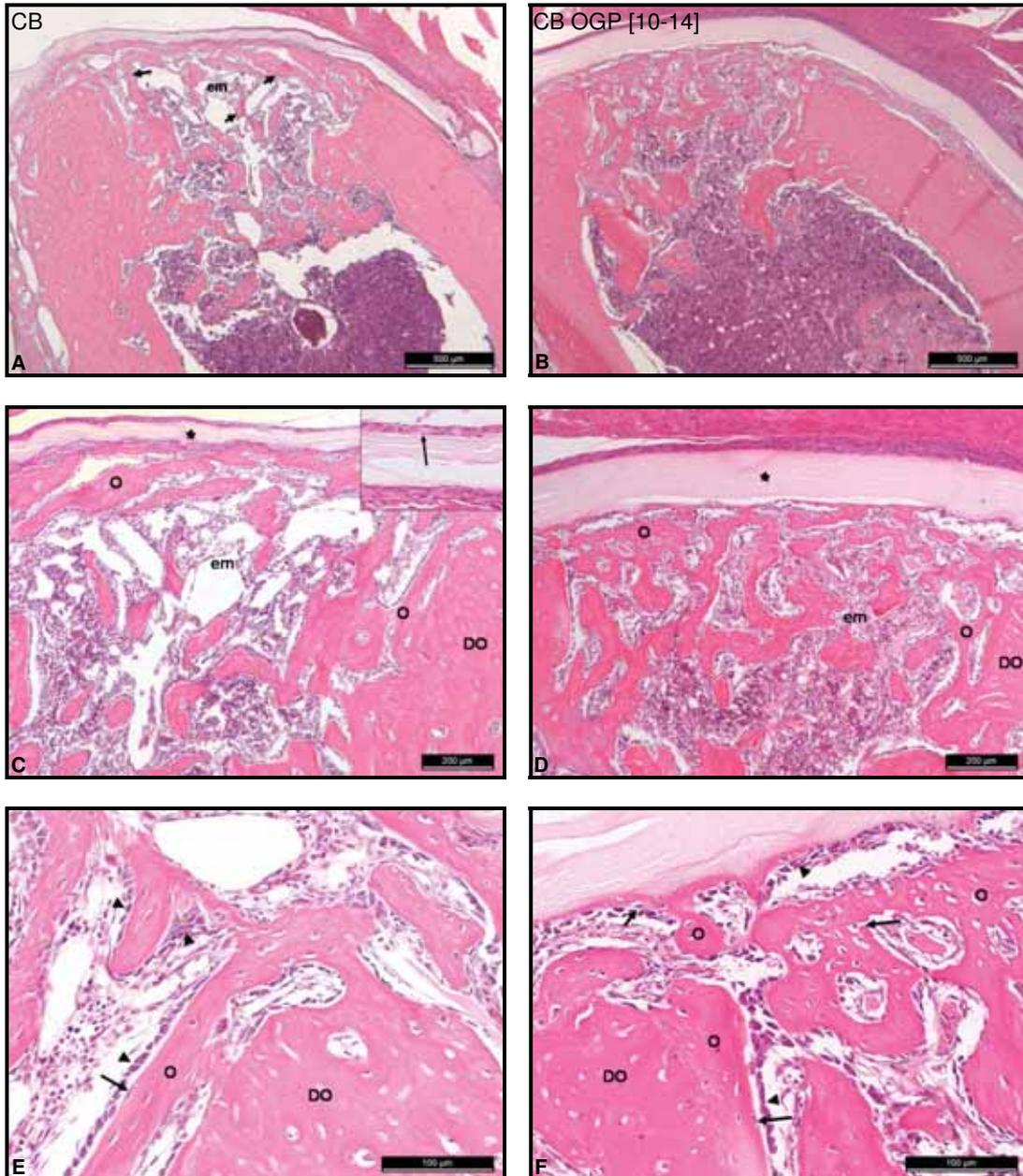


Em 15 dias, observou-se uma remodelação óssea intensa do osso trabecular neoformado no interior do defeito ósseo e principalmente o da medula óssea (Figuras 69A e B). Nas Figuras, 69C e D, observou-se que a remodelação óssea foi maior no defeito ósseo tratado com a membrana CB do em relação ao defeito tratado com a membrana CB OGP [10-14], sugerindo que o peptídeo promoveu uma maior estabilidade no processo de modelação e remodelação óssea, pois se observou que neste subgrupo, IJe, as trabéculas ósseas formadas apresentaram-se aparentemente mais espessas do que as do subgrupo IId; apesar do subgrupo IJe apresentar um valor para densidade óssea ligeiramente maior que do subgrupo IId a diferença entre estes valores não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$); porém, sugere-se que há uma tendência das trabéculas ósseas observadas no subgrupo IJe, apesar de imaturas, estarem mais mineralizadas do que as observadas no subgrupo IId, devido as imagens observadas para o subgrupo IJe. O valor da densidade do osso neoformado para o subgrupo IJe continuou maior em relação à membrana CB sem o peptídeo até aos 120 dias embora esta diferença ser somente estatisticamente significativa aos 120 dias ($p < 0,01$).

Apesar dos valores mensurados para densidade óssea serem maiores para o grupo I em relação ao grupo II aos 15 dias de pós-operatório, no grupo II, observou-se que a cortical óssea interna do defeito ósseo tanto do subgrupo IId quanto do IJe apresentou-se em formação onde se pode observar uma linha mais radiopaca delimitando o defeito ósseo principalmente para membrana CB OGP [10-14]. Ao contrário do grupo controle, que se observou esta delimitação somente aos 120 dias.

Ainda neste período de 15 dias, observou-se que as trabéculas ósseas dos dois subgrupos, IId e IJe, estão circundadas por grandes espaços medulares e apresentando osteoblastos ativos adjacentes a estas trabéculas ósseas (Figuras 69C-F); além disso, presença de formação de matriz osteóide em processo de mineralização adjacentes a membrana e as paredes dos defeitos ósseos (Figuras 69E e F). O infiltrado inflamatório permaneceu de muito leve a leve em todos os espécimes nos dois subgrupos não se detectou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos ($p < 0,001$), em 15 dias; no entanto observou-se presença de macrófagos adjacentes a membrana CB (Figura 69C, ampliação).

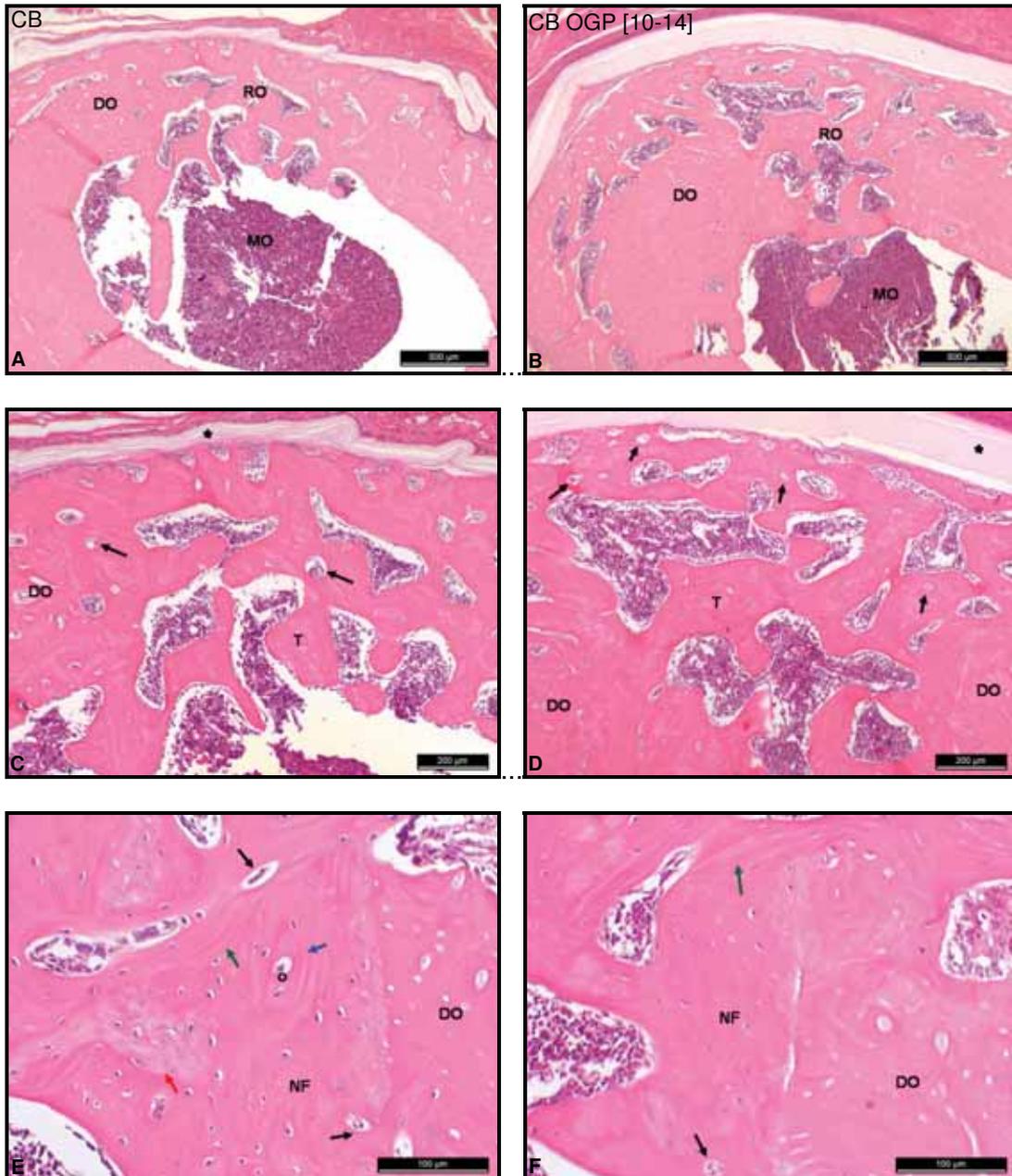
Figura 69 – Grupo II: 15 dias. **A e B:** remodelação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos com presença de grandes espaços medulares (em) e trabéculas ósseas finas (setas) em A, em B espaços medulares menores e trabéculas mais espessas, e observa-se também a presença das membranas CB (A) e CB OGP [10-14] (B); **C e D:** remodelação óssea com grandes espaços medulares (em) em C e menores em D; osso jovem (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e as membranas (asterisco); em C observa-se na ampliação macrófago adjacente a membrana (seta); **E e F:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) e osso jovem (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e trabéculas ósseas imaturas; osteoblastos sendo englobados pela matriz osteóide (setas).



Após os 30 dias de pós-operatório, os defeitos ósseos também se apresentaram reparados por tecido ósseo em fase de modelação de osso trabecular a lamelar, denominado osso composto, como observado no grupo controle, porém com a presença de espaços medulares maiores em relação ao grupo I (Figuras 70A-D). No entanto, o tecido ósseo neoformado nos defeitos ósseos no grupo II apresentou-se mais mineralizado do que o grupo controle, pois os valores mensurados de densidade óssea para os subgrupos IId e IIe foram 2,31 e 2,52 mmPb, respectivamente e para o grupo controle foi de 2,08 mmPb e estas diferenças foram estatisticamente significante ($p < 0,01$). As imagens radiográficas revelaram que a cortical óssea interna estava totalmente reparada aos 30 dias de pós-operatório para o subgrupo IIe (membrana CB OGP [10-14]) onde pode se observar com mais nitidez a cortical óssea interna totalmente reparada (Figura 67); e no subgrupo IId, a cortical óssea interna apresentou-se ainda em formação (Figura 66), ou seja, o peptídeo OGP [10-14] também favoreceu um tecido ósseo mais mineralizado neste período de análise. O tecido ósseo neoformado nos defeitos ósseos de ambos os subgrupos, IId e IIe, também apresentaram fibras colágenas imaturas, não organizadas, com poucas lamelas concêntricas ao redor dos osteons e dos espaços medulares, similar ao grupo controle; lamelas intersticiais também foram observadas entre os numerosos vasos sanguíneos e osteons (Figuras 70E e F). Este tecido ósseo reparado apresentou-se em espessura similar ao tecido ósseo adjacente, ao contrário do que foi observado no grupo controle, resultado este que também pode estar relacionado aos maiores valores para densidade óssea observados para o grupo II em relação ao grupo I. A medula óssea apresentou-se organizada com ausência de trabéculas ósseas.

A densidade do osso neoformado tanto do subgrupo IId quanto do IIe aos 30 dias foram maiores em relação ao período anterior e também ao grupo controle. Neste grupo II, a densidade óssea aumentou de forma crescente até o último período observado. Em geral, os valores mensurados para a densidade dos ossos neoformados nos defeitos tratados tanto com a membrana de CB quanto com a membrana CB OGP [10-14] foram inferiores quando comparados aos outros grupos tratados até aos 30 dias; contudo, aos 120 dias estes valores foram similares ou superiores a outros grupos tratados como mostra a Tabela 15.

Figura 70 – Grupo II: 30 dias. **A e B**: reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), parede do defeito ósseo (DO) e medula óssea reparada (MO); **C e D**: inúmeros vasos sanguíneos (setas pretas), espaços medulares aprisionados no interior das trabéculas ósseas em remodelação (T) e membrana adjacente ao tecido ósseo reparado (asterisco); lamelas ósseas paralelas (seta verde) e fibras colágenas desorganizadas (seta branca); **E**: nota-se a presença de lamelas intersticiais (seta verde) e concêntricas (seta azul) no tecido ósseo neoformado (NF), fibras colágenas imaturas, não organizadas no interior do defeito ósseo (seta vermelha) e vasos sanguíneos (setas pretas); **F**: o tecido ósseo neoformado (NF) apresenta-se mais organizado em relação às fibras colágenas, lamelas intersticiais (seta verde) e vasos sanguíneos (setas pretas).



Aos 120 dias, o tecido ósseo no local defeito apresentou-se com característica de osso maduro nos dois subgrupos, IId e Ile (Figuras 71A-D), embora em menor espessura que o tecido ósseo adjacente ao local reparado; presença de lamelas concêntricas e intersticiais bem definidas, numerosos ósteons e vasos sanguíneos foram observados; porém as lamelas paralelas foram observadas em menor quantidade que o grupo controle (Figuras 71E e F). Contudo, as imagens radiográficas revelaram que para os subgrupos, IId e Ile, a cortical óssea apresentou-se reparada. Porém, observaram-se regiões um pouco mais radiolúcidas no local dos defeitos reparados revelando que o osso neoformado ainda não é um osso completamente compacto.

Apesar de, esses tecidos ósseos neoformados apresentarem características histológicas semelhantes em relação ao grupo controle, o tecido ósseo formado nos subgrupos IId e Ile apresentaram valores para densidade óssea superior ao grupo controle (2,84 e 3,37 mmPb, respectivamente; controle: 2,56 mmPb) ($p < 0,01$); além disso, o peptídeo OGP [10-14] promoveu um tecido ósseo mais mineralizado neste período de análise. Desta forma, observou-se que o peptídeo OGP [10-14] adsorvido na membrana CB promoveu um tecido ósseo mais mineralizado em relação à membrana de CB pura após 15 dias de pós-operatório. As membranas CB e CB OGP [10-14] ainda estavam presentes aos 120 dias de pós-operatório e adjacente a estas membranas observaram-se várias células multinucleadas (Figuras 72A e B, respectivamente). Com os dados estatísticos pode-se avaliar que estas membranas não foram reabsorvíveis ($p > 0,05$), pois não apresentaram diferença estatisticamente significativa de reabsorção entre os períodos de análises (07, 15, 30 e 120 dias).

Figura 71 – Grupo II: 120 dias. **A e B**: reparação do defeito ósseo por osso maduro (OM) e medula óssea reparada (MO); em B ainda observa-se presença de pequenos espaços medulares (cabeças de setas); e observa-se também a presença das membranas CB (A) e CB OGP [10-14] (B) (setas); **C e D**: inúmeros vasos sanguíneos (cabeças de setas), ósteons (setas pretas) e membrana adjacente ao tecido ósseo reparado (asterisco); lamelas ósseas paralelas (seta verde) e concêntricas (seta azul); **E e F**: nota-se a presença de lamelas concêntricas (setas azuis) no tecido ósseo neoformado, vasos sanguíneos (cabeças de setas), ósteons (setas pretas).

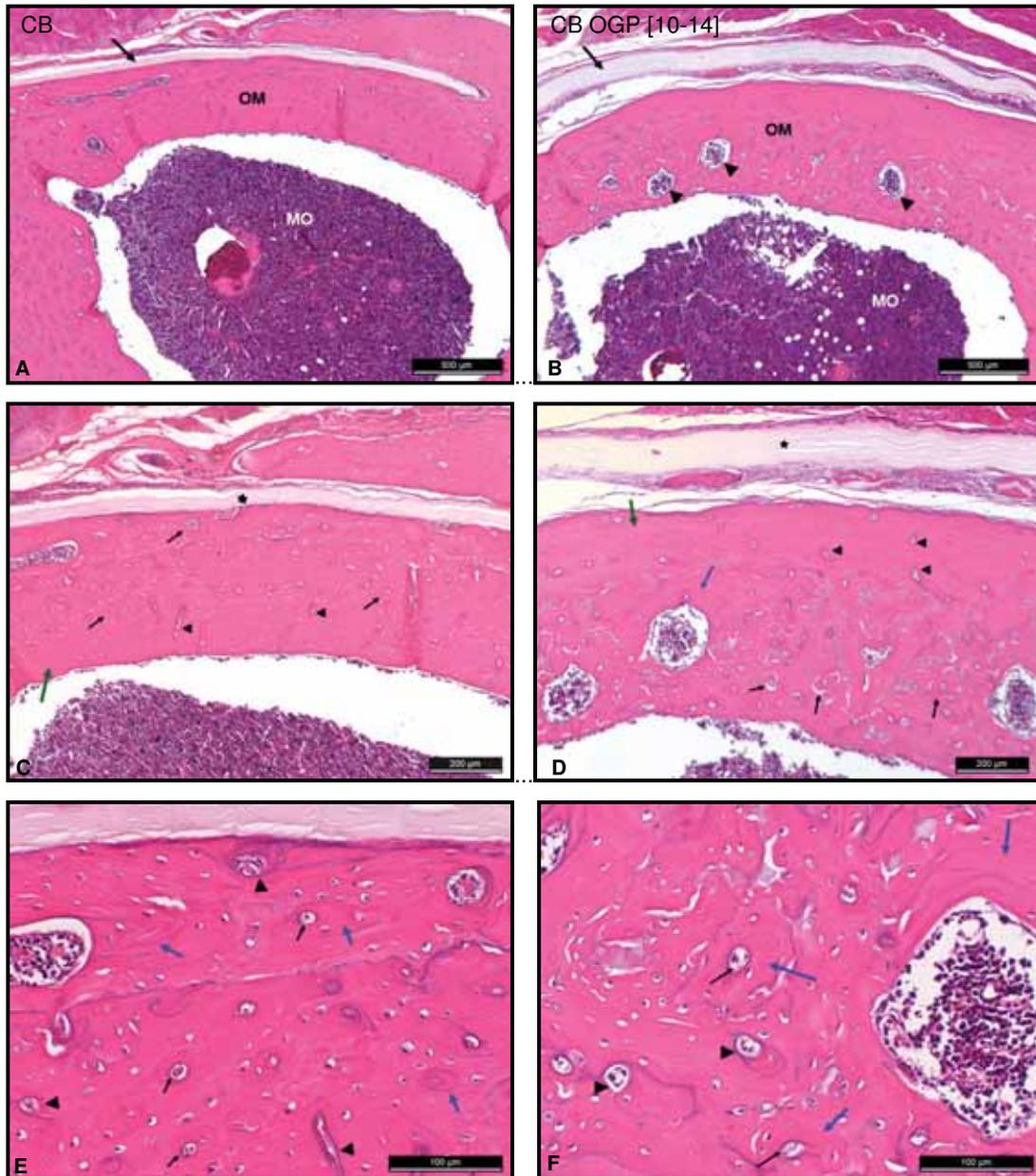
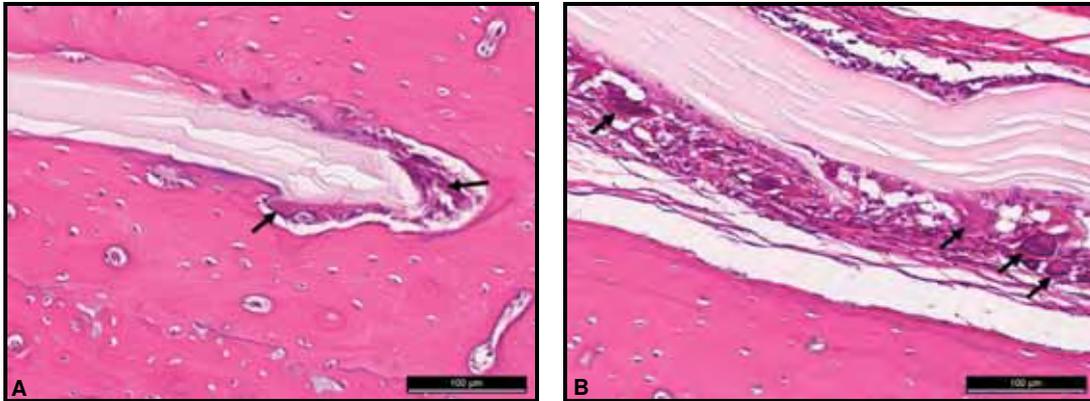


Figura 72 – Grupo II: 120 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas CB (A) e CB OGP [10-14] (B) (setas).



Grupo III: Membranas de CB-HA e CB-HA OGP [10-14]

As Figuras 73 e 74 mostram as imagens radiográficas para o grupo III, lado direito (IIId) e esquerdo (IIIe), respectivamente, nos referidos períodos de análise. Ao sétimo dia, as membranas CB-HA e CB-HA OGP [10-14] promoveram uma reparação do espaço intramedular e também o início da reparação da cortical óssea interna, e ainda, o osso neoformado apresentou-se mais denso em relação aos outros grupos tratados, exceto com relação à membrana (CB-HA)-COL OGP [10-14]. Os valores de densidade óssea mensurados para o osso neoformado no interior dos defeitos para os subgrupos IIId e IIIe nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias foram para IIId: $1,76 \pm 0,11$, $2,27 \pm 0,07$, $2,93 \pm 0,10$ e $3,43 \pm 0,12$ mmPb, respectivamente, e para IIIe: $1,65 \pm 0,09$, $2,36 \pm 0,13$, $3,46 \pm 0,09$ e $3,32 \pm 0,12$ mmPb, respectivamente. Resultados estes que foram confirmados pelos resultados histológicos, onde se pode observar que as membranas CB-HA e CB-HA OGP [10-14] promoveram uma maior neoformação óssea trabecular, em relação aos outros grupos experimentais I, II, IV, V e o subgrupo VIId (Figuras 75A e C), com exceção ao subgrupo VIe (Figuras 75B e D) que apresentou uma neoformação óssea trabecular semelhante ao grupo III. Estes resultados corroboram aos valores observados para densidade óssea em 07 dias como mostrado na Tabela 15.

Figura 73 - Imagens radiográficas digital do subgrupo III d - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 15 dias observa-se a cortical óssea interna em reparação e em 120 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada.

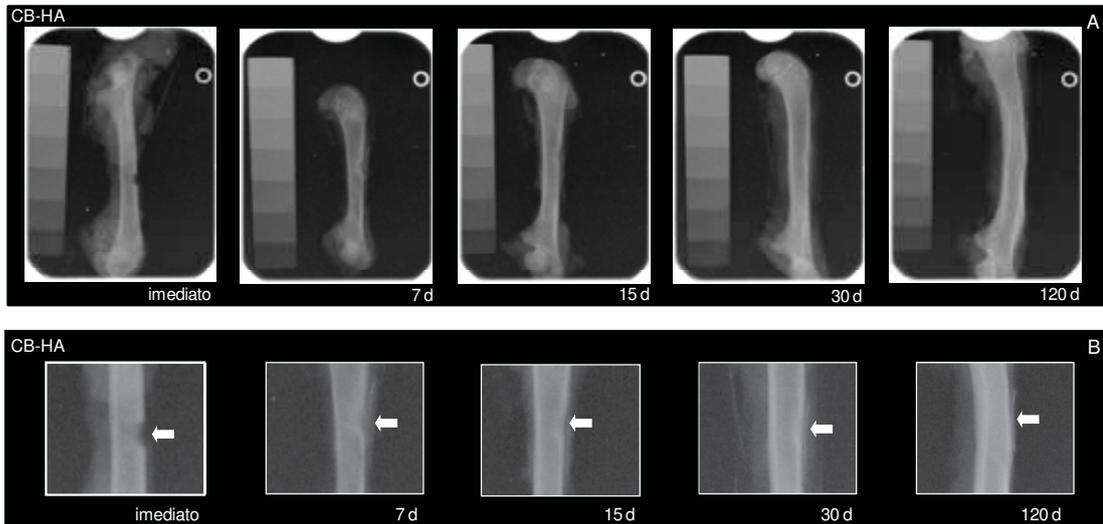
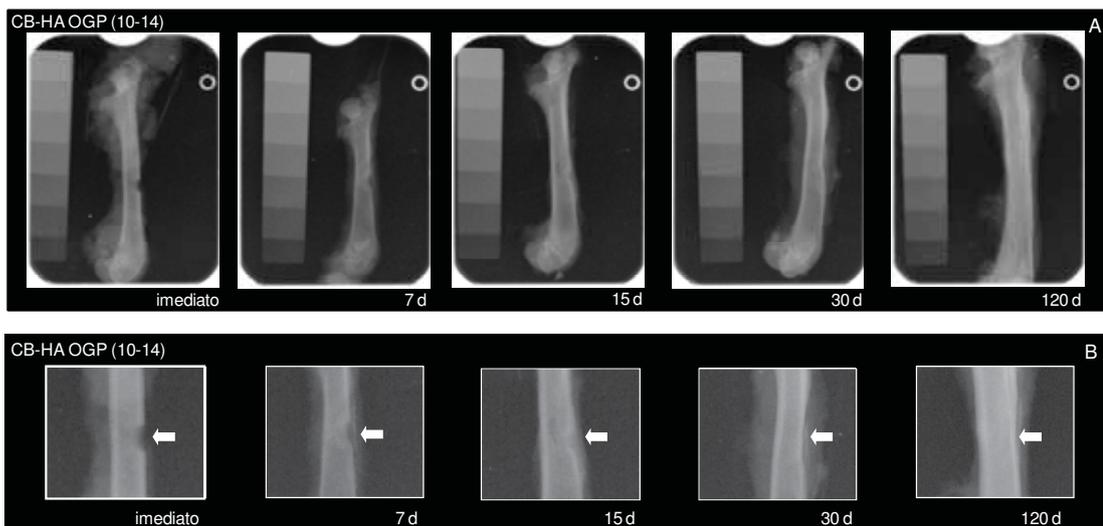
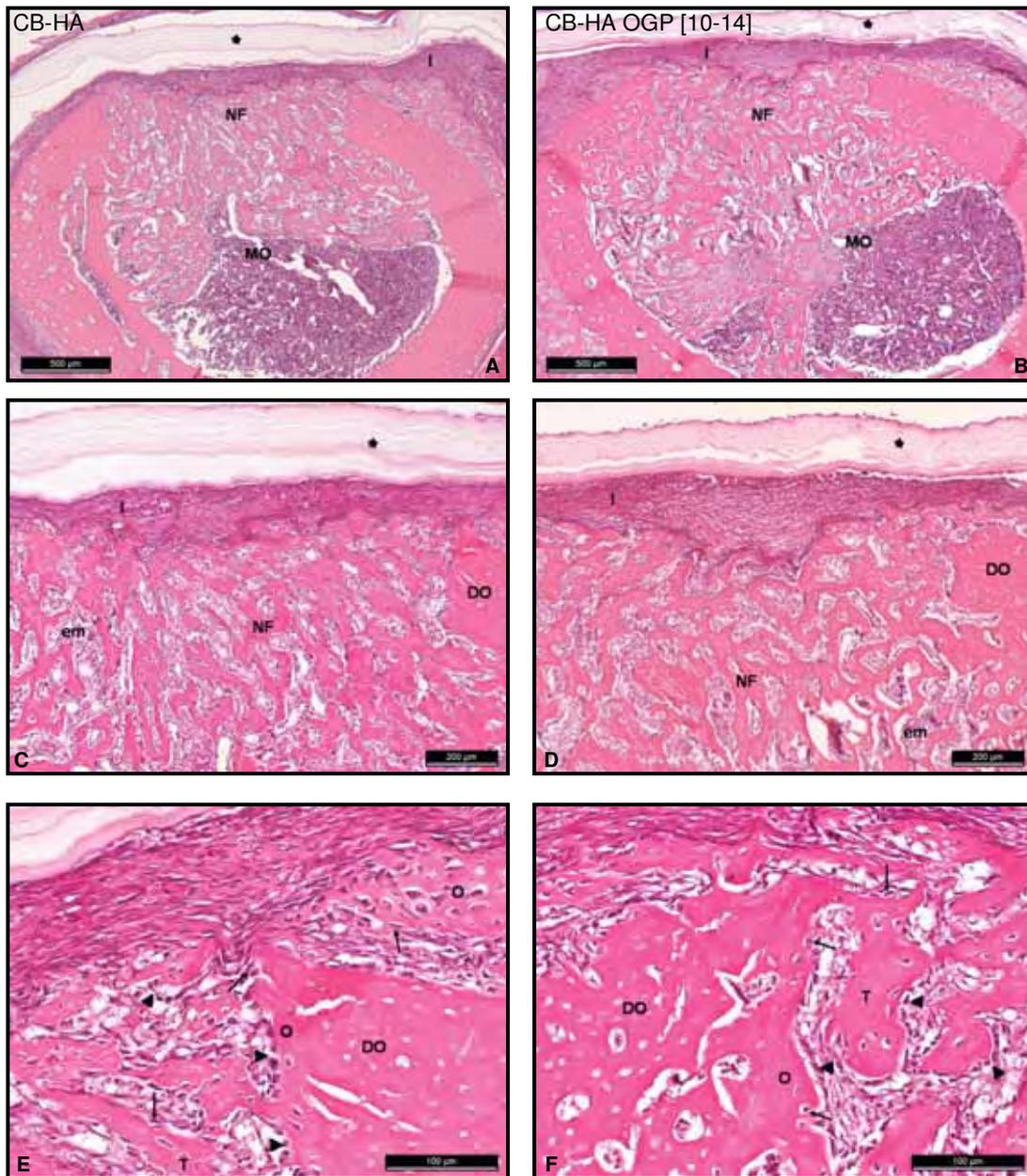


Figura 74 - Imagens radiográficas digital do subgrupo III e - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 15 dias observa-se a cortical óssea interna totalmente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada.



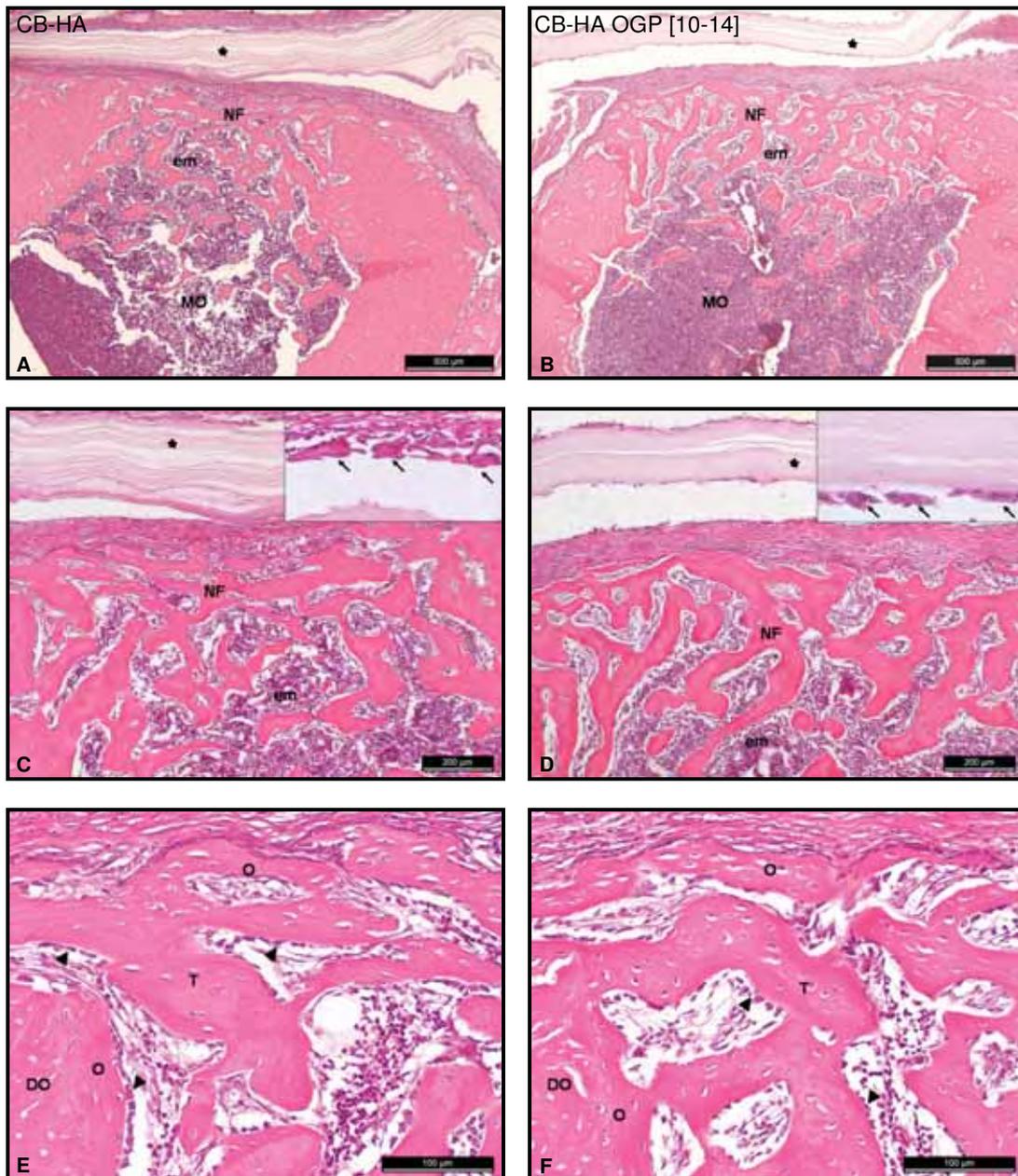
As trabéculas ósseas imaturas observadas no interior dos defeitos ósseos em reparação nos subgrupos III_d e III_e, aparecem circundadas por tecido mesenquimal e osteoblastos ativos adjacentes a estas trabéculas; no entanto, histologicamente os defeitos ósseos tratados tanto com a membrana CB-HA quanto com a membrana CB-HA OGP [10-14] também não apresentaram diferenças em relação a neoformação de trabéculas ósseas (Figuras 75A-D), como também observado para as membranas do grupo II. Somente com os valores mensurados para a densidade óssea pode-se sugerir que a membrana CB-HA favoreceu o início de mineralização do osso primário mais cedo do que a membrana CB-HA OGP [10-14] (III_d: 1,76 mmPb e III_e: 1,65 mmPb, $p < 0,01$). Com relação ao grupo controle, a neoformação óssea observada neste período se apresentou em estágio mais avançado nos dois subgrupos, III_d e III_e; comportamento similar ao observado para grupo II. Neste subgrupos, III_d e III_e, observou-se matriz osteóide adjacente ao tecido conjuntivo denso entre a membrana e o defeito ósseo e também adjacente as paredes dos defeitos ósseos (Figuras 75E e F). O canal medular se apresentou preenchido parcialmente com osso trabecular imaturo, principalmente abaixo do defeito ósseo (Figuras 75A e B). Infiltrado inflamatório moderado adjacente as membranas foi observado nos dois subgrupos, III_d e III_e. Entre os dois respectivos subgrupos não foi observado diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), porém, comparado aos grupos controle e II foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Figura 75 – Grupo III: 07 dias. **A e B:** neoformação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos (NF) e observa-se também a presença das membranas CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B) (asterisco) e infiltrado inflamatório (I); **C e D:** neoformação óssea trabecular imatura (NF) adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e no canal medular, medianos espaços medulares (em), infiltrado inflamatório (I) e respectivas membranas (asterisco); **E e F:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) e osso jovem (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e trabéculas ósseas imaturas (T); osteoblastos sendo englobados pela matriz osteóide (setas).



No período de 15 dias, observou-se nas imagens radiográficas espaço intramedular com característica de normalidade, e a cortical óssea interna apresentou-se como uma linha mais radiopaca delimitando o defeito ósseo principalmente para membrana CB-HA OGP [10-14]. Histologicamente, os defeitos ósseos apresentaram reparados por osso trabecular, e se observou uma remodelação óssea intensa do osso trabecular neoformado no interior do defeito ósseo e principalmente na medula óssea, nos subgrupos IIIId e IIIe (Figuras 76A-D). As trabéculas ósseas apresentaram-se aparentemente mais espessas e mineralizadas e conseqüentemente, com menos células em suas trabéculas (Figuras 76E e F). Nas Figuras, 76C e D, pode-se observar que a remodelação óssea foi similar tanto nos defeitos ósseos tratados com a membrana CB-HA quanto dos defeitos tratados com a membrana CB-HA OGP [10-14], porém com os dados mensurados para densidade óssea (IIIId: 2,27 mmPb e IIIe: 2,36 mmPb; $p = 1,0$) apesar de esta diferença não ser estatisticamente significativa, pode-se sugerir que os defeitos ósseos tratados com a membrana CB-HA OGP [10-14] tem uma ligeira tendência em promover uma mineralização mais rápida dessas trabéculas ósseas imaturas, além de neoformação da cortical óssea interna mais rapidamente, diferente para a membrana CB-HA. Ainda neste período, observou-se que as trabéculas ósseas nos subgrupos, IIIId e IIIe, estavam circundadas por grandes espaços medulares e apresentando osteoblastos menos ativos adjacentes a estas trabéculas ósseas (Figuras 76C-F) com relação aos outros grupos. Matriz osteóide também foi observada em processo de mineralização adjacentes a membrana e as paredes dos defeitos ósseos em 15 dias (Figuras 76E e F). O infiltrado inflamatório neste período apresentou-se com intensidade muito leve em todos os espécimes nos dois subgrupos ($p > 0,05$); em 15 dias; no entanto observou-se presença de alguns macrófagos adjacentes as membranas CB-HA e CB-HA OGP [10-14] (Figura 76C e D, ampliação).

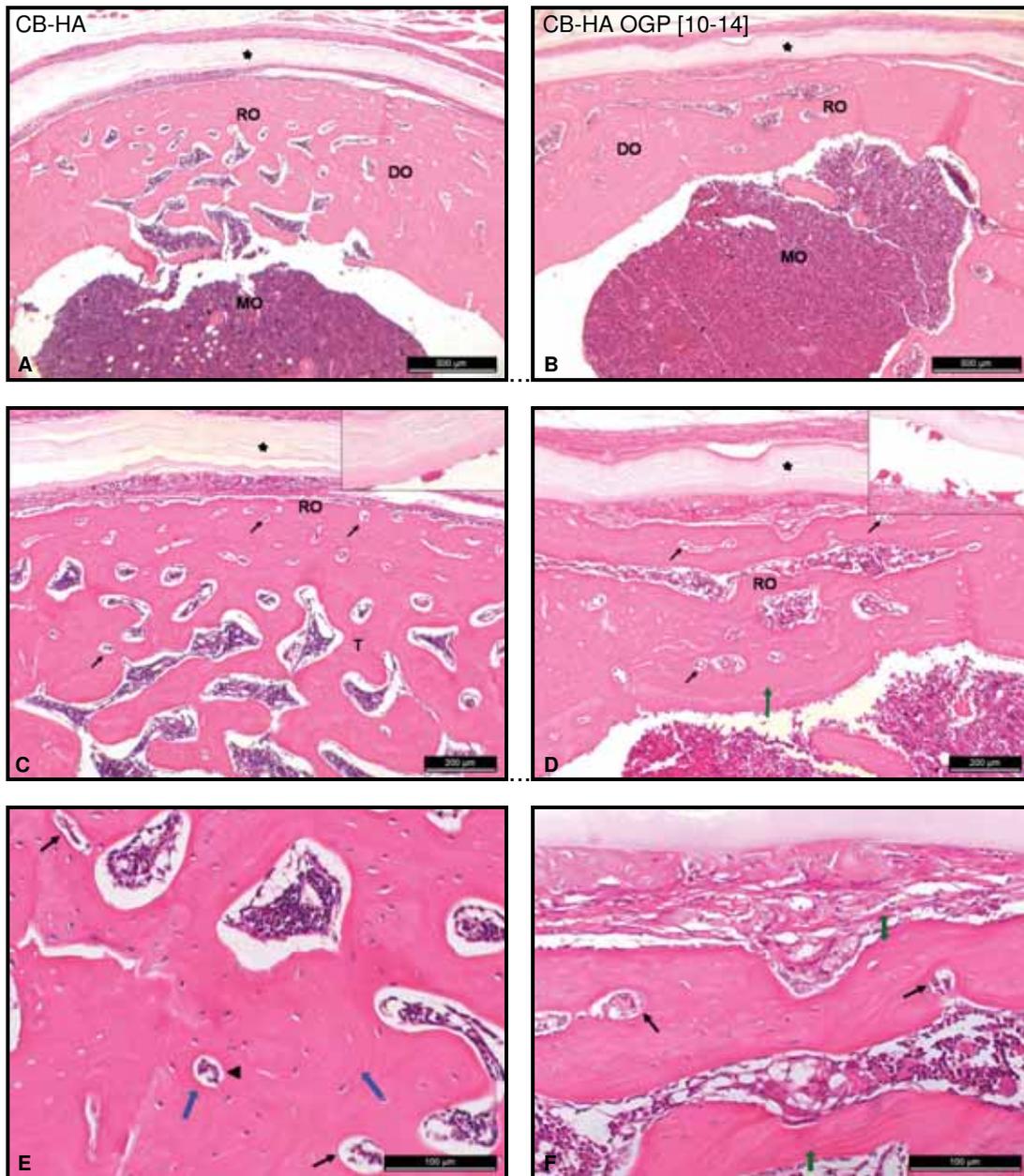
Figura 76 – Grupo III: 15 dias. **A e B:** remodelação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos com presença de medianos espaços medulares (em) e também da medula óssea (MO), e observa-se a presença das membranas CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** remodelação óssea com medianos espaços medulares (em); em C e em D observa-se na ampliação macrófagos (setas) adjacente as respectivas membranas (asterisco); **E e F:** observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) e osso jovem (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e trabéculas ósseas imaturas (T).



Em 30 dias, as imagens radiográficas revelaram que a cortical óssea está totalmente reparada com características de osso compacto aos 30 dias de pós-operatório para o subgrupo IIIe (membrana CB-HA OGP [10-14]), e no subgrupo IIIId, a cortical óssea ainda apresentou-se em neoformação, mas pode se observar com mais nitidez a delimitação da cortical óssea interna. Comportamento similar observado para o subgrupo IIe no mesmo período, ou seja, a membrana CB-HA favoreceu o mesmo processo de reparo que a membrana CB OGP [10-14], mas com densidade do osso neoformado diferentes. Por meio da análise histológica, pode-se observar que os defeitos ósseos se apresentaram reparados por tecido ósseo em fase de modelação de osso trabecular a lamelar (osso composto), porém mais organizado do que os grupos I e II (Figuras 77A-D). No entanto, em estágios mais avançados de organização de deposição de matriz mineralizada, principalmente para o subgrupo IIIe que apresentou, na maior parte, lamelas paralelas característica de osso cortical maduro (Figura 77F), cujas imagens radiográficas para subgrupo IIIe confirmaram que o osso neoformado neste subgrupo apresentou-se mais íntegro e radiopaco do que o subgrupo IIIId (Figuras 73 e 74).

Os tecidos ósseos reparados apresentaram-se em menor espessura ao tecido ósseo adjacente para o subgrupo IIIe, mostrando que este grupo apresentou-se num estágio mais avançado de remodelação óssea do osso neoformado, pois confrontando com os valores mensurados para a densidade óssea revelou-se que as membranas CB-HA OGP [10-14] promoveram padrão de reparação óssea em 30 dias estatisticamente significante similar aos valores observados para os outros grupos tratados em 120 dias ($p < 0,01$) (vide Tabela 15). Ainda neste período, observou-se que a medula óssea apresentou-se organizada com ausência de trabéculas ósseas, e também se observou ausência de reação inflamatória adjacente as membranas nos dois subgrupos, IIIId e IIIe, porém se observou a presença de algumas células multinucleadas adjacentes a essas membranas.

Figura 77 – Grupo III: 30 dias. **A e B**: reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), parede do defeito ósseo (DO) e medula óssea reparada (MO), e observa-se a presença das membranas CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B) (asterisco); **C**: inúmeros vasos sanguíneos (setas pretas), espaços medulares aprisionados no interior das trabéculas ósseas em remodelação (T) e membrana adjacente ao tecido ósseo (asterisco); **D**: lamelas paralelas na região da cortical óssea interna (seta verde), presença de vasos sanguíneos (setas pretas) e espaços medulares no interior do tecido ósseo reparado (RO) e membrana adjacente ao tecido ósseo (asterisco); células multinucleadas são observadas adjacentes as membranas CB-HA (C) e CB-HA OGP [10-14] (D) (ampliação); **E**: nota-se a presença de lamelas concêntricas (seta azul) no tecido ósseo neoformado, vasos sanguíneos (setas pretas) e ósteon (cabeça de seta); **F**: o tecido ósseo reparado apresenta-se mais organizado em relação às fibras colágenas, lamelas paralelas (setas verde) e vasos sanguíneos (setas pretas).



Neste grupo III, a densidade óssea também aumentou de forma crescente até o último período observado. Em geral, os valores mensurados para a densidade dos ossos neoformados nos defeitos tratados tanto com a membrana de CB-HA quanto com a membrana CB-HA OGP [10-14] foram maiores quando comparados aos outros grupos tratados até aos 30 dias; além disso, aos 120 dias estes valores já são similares aos outros grupos tratados, como por exemplo, subgrupo IIe e IVe como mostra a Tabela 15.

Aos 120 dias, a cortical óssea apresentou-se reparada para o subgrupo IIIId. A cortical óssea da região do defeito de ambos os subgrupos IIIId e IIIe apresentaram-se íntegras e similares as corticais adjacentes ao defeito ósseo. As Figuras 78A - D, mostram que o tecido ósseo no local defeito apresentou-se com característica de osso maduro nos subgrupos, IIIId e IIIe; presença de lamelas concêntricas, intersticiais e paralelas bem definidas, numerosos ósteons e vasos sanguíneos (Figuras 78E e F); as lamelas paralelas apresentaram-se em maior quantidade na região da cortical óssea interna para os subgrupos IIIId e IIIe.

Embora apresentem características histológicas semelhantes, o subgrupo IIIe apresentou maiores espaços medulares no tecido ósseo reparado em relação ao subgrupo IIIId; o que pode justificar o valor de densidade óssea mensurado para o subgrupo IIIe que se manteve em relação ao valor mensurado no período de 30 dias. Neste período de 120 dias, observou-se que o peptídeo OGP [10-14] não promoveu um tecido ósseo mais mineralizado do que a membrana CB-HA, contudo o peptídeo favoreceu um padrão de reparação óssea eficiente em apenas 30 dias de pós-operatório. As membranas CB-HA e CB-HA OGP [10-14] também foram observadas aos 120 dias de pós-operatório; e adjacente a estas membranas observou-se infiltrado inflamatório muito leve em ambos os subgrupos IIIId e IIIe, e também a presença de células multinucleadas adjacentes a essas membranas (Figuras 79A e B). Com os dados estatísticos pode-se avaliar que estas membranas não são reabsorvíveis ($p > 0,05$), pois não apresentaram diferença estatisticamente significativa de reabsorção da CB entre os períodos de análises de 07 a 120 dias, sendo que a diferença estatística significativa observada esteve relacionada à reabsorção dos cristais de apatita.

Figura 78 – Grupo III: 120 dias. **A e B**: reparação do defeito ósseo por osso maduro (OM) e medula óssea reparada (MO); em B ainda observa-se presença de espaços medulares (cabeças de setas); e observa-se também a presença das membranas CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D**: inúmeros vasos sanguíneos (setas), ósteons (cabeças de setas) e membrana (asterisco) adjacente ao tecido ósseo reparado (RO); **E e F**: nota-se a presença de lamelas paralelas (setas verdes) e concêntricas (setas azuis) no tecido ósseo reparado, vasos sanguíneos (setas pretas), ósteons (cabeças de setas).

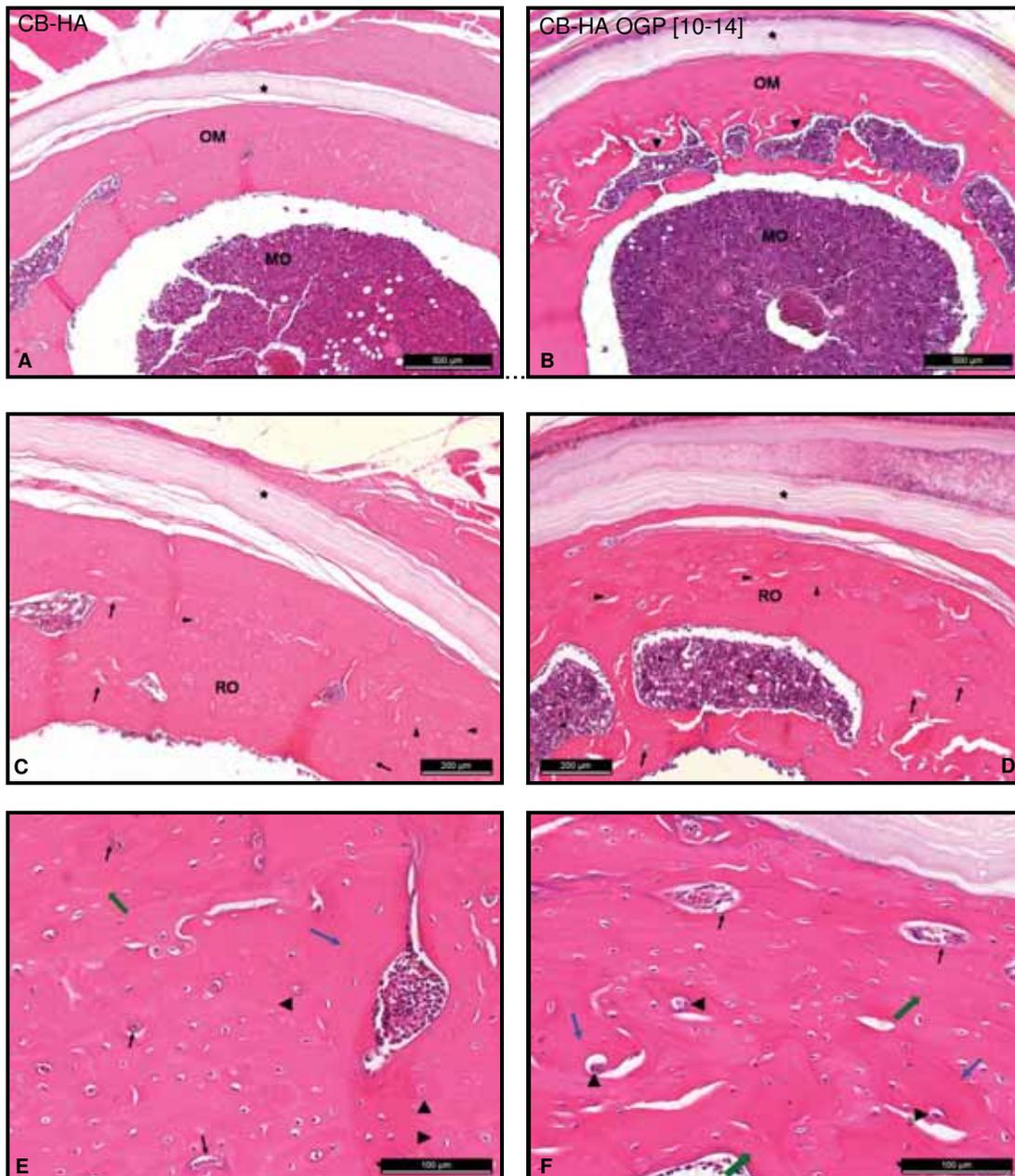
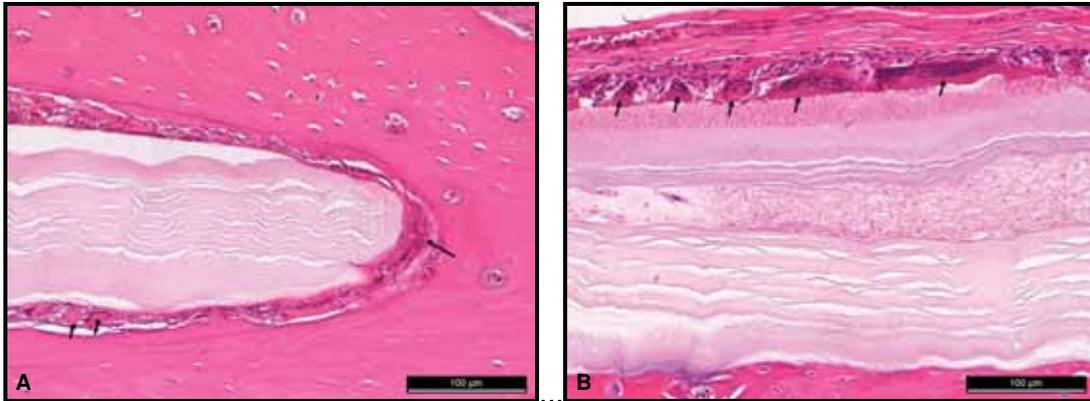


Figura 79 – Grupo III: 120 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas CB-HA (A) e CB-HA OGP [10-14] (B) (setas).



Grupo IV: Membranas de CB-COL e CB-COL OGP [10-14]

As imagens radiográficas para o grupo IV, lado direito (IVd) e esquerdo (IVe), respectivamente, nos referidos períodos de análise estão mostradas nas Figuras 80 e 81. Ao 7º dia, ambas as membranas, CB-COL e CB-COL OGP [10-14], promoveram uma reparação do espaço intramedular e também início da reparação da cortical óssea. Porém, o osso neoformado apresentou-se menos denso em relação aos outros grupos tratados, apesar da densidade óssea ter sido similar ao grupo controle. A diferença entre o subgrupo IVd e o grupo I foi que a membrana CB-COL favoreceu a neoformação óssea mais rapidamente independente da qualidade do tecido ósseo neoformado. Os valores de densidade óssea mensurados para o osso neoformado no interior dos defeitos para os subgrupos IVd e IVe nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias foram para IVd: $0,96 \pm 0,06$, $2,05 \pm 0,08$, $2,58 \pm 0,13$ e $3,09 \pm 0,24$ mmPb, respectivamente, e para IVe: $1,55 \pm 0,05$, $2,12 \pm 0,06$, $2,76 \pm 0,11$ e $3,42 \pm 0,08$ mmPb, respectivamente.

Figura 80 - Imagens radiográficas digital do subgrupo IVd – A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 15 dias observa-se a cortical óssea interna reparada e em 120 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada.

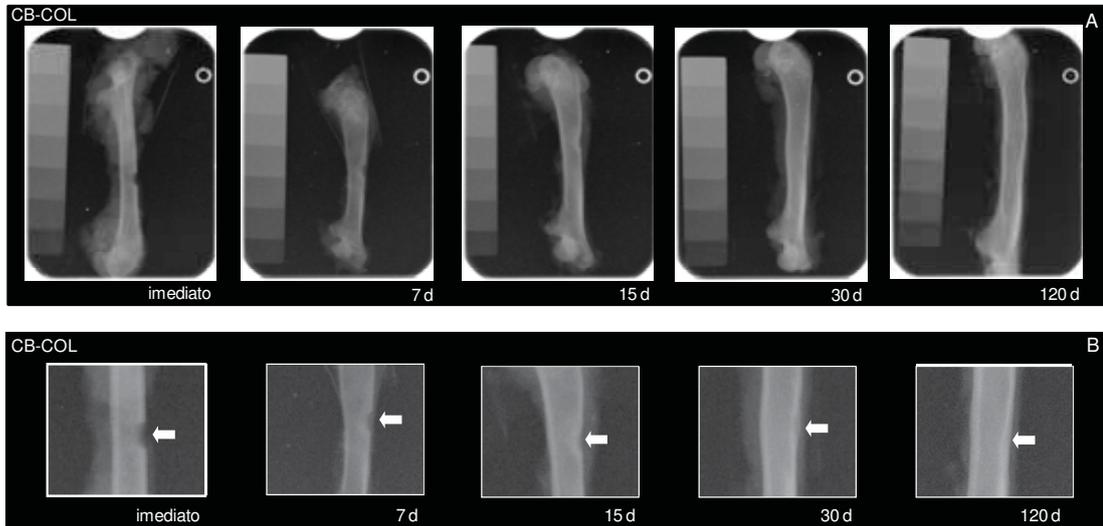
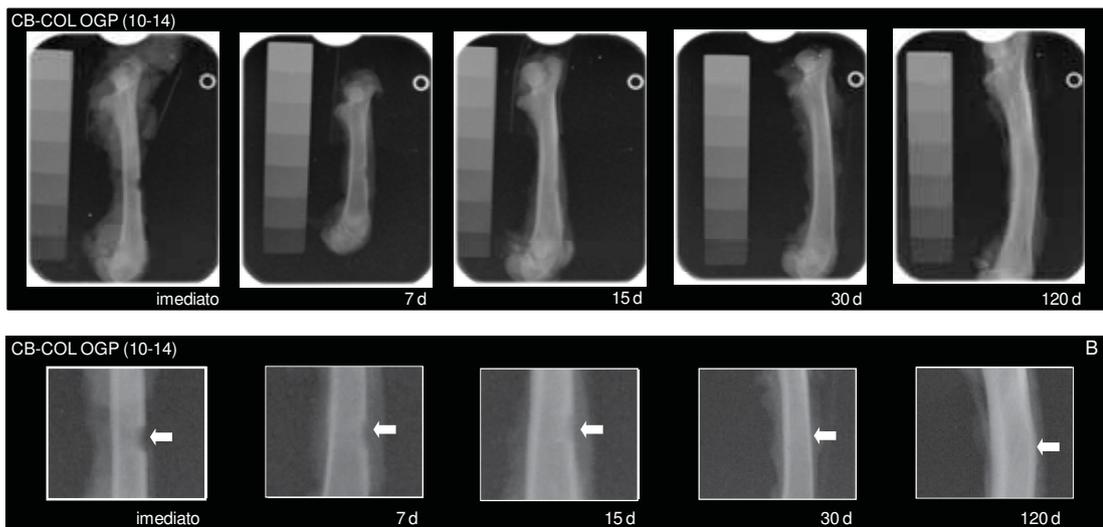


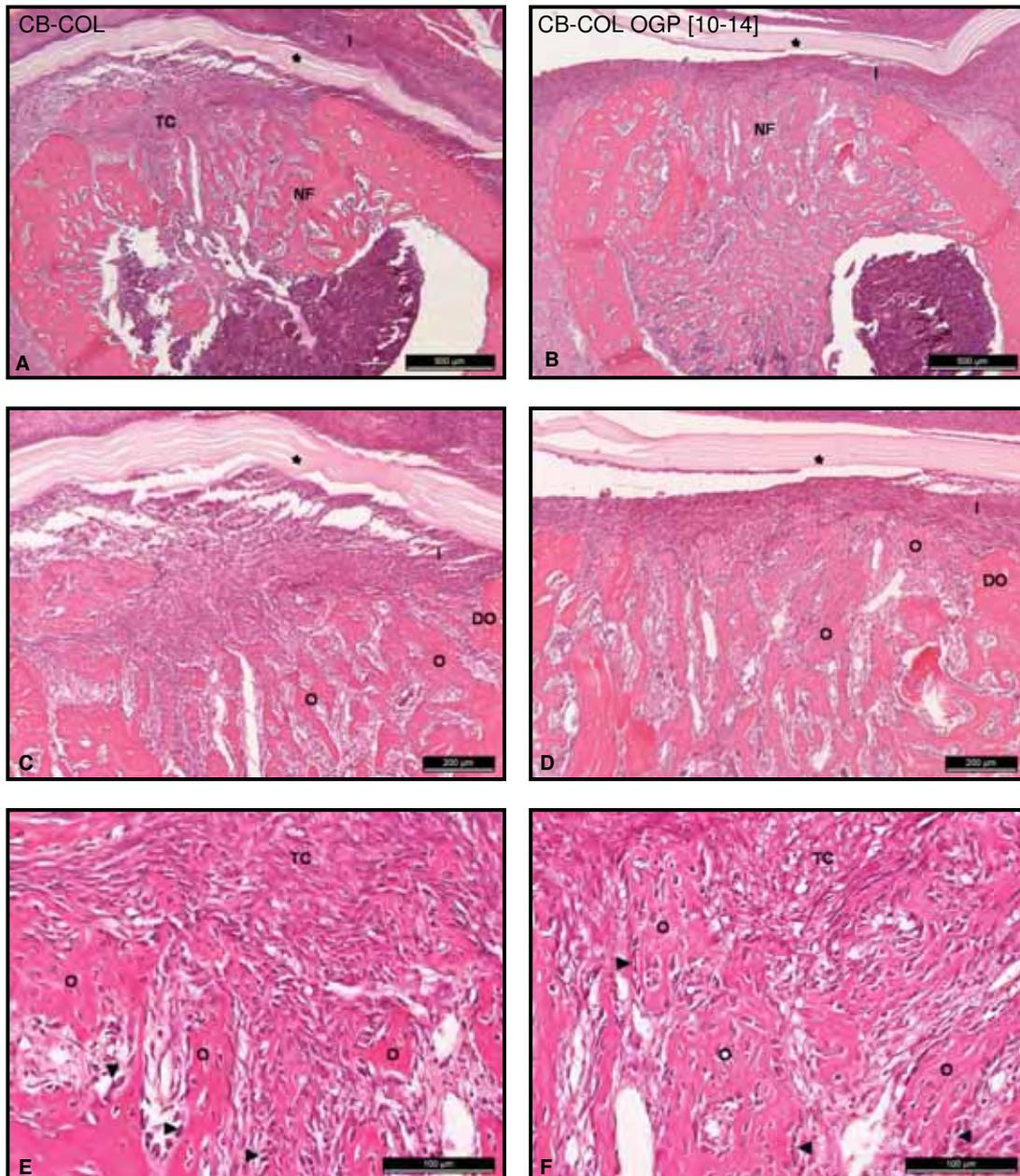
Figura 81 - Imagens radiográficas digital do subgrupo IVe - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 7 dias observa-se a cortical óssea interna praticamente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada.



Os resultados histológicos corroboram aos dados radiográficos observados para as membranas CB-COL e CB-COL OGP [10-14], grupo IV. As Figuras 82A - D mostram o início de neoformação óssea trabecular para os subgrupos, IVd e IVe. Os defeitos ósseos tratados com a membrana CB-COL OGP [10-14] promoveram uma neoformação óssea mais eficaz do que com a membrana CB-COL, porém com uma neoformação óssea trabecular inferior ao grupo III. Resultados estes que corroboram aos valores mensurados para densidade óssea observados neste período de análise para os respectivos subgrupos IVd 0,96 mmPb e IVe 1,55 mmPb (outros valores vide Tabela 15). Comportamento semelhante foi observado para o grupo VI, que aos 07 dias o peptídeo também favoreceu uma neoformação óssea mais rápida e com uma densidade óssea similar a da membrana (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL (Tabela 15), ou seja, a membrana CB-COL OGP [10-14] apresentou a mesma eficácia nos primeiros sete dias de pós-operatório comparado a essas respectivas membranas. No interior dos defeitos ósseos pode-se observar, principalmente no subgrupo IVd, presença predominante de matriz osteóide (Figura 82E) adjacente ao tecido conjuntivo denso entre a membrana e o defeito ósseo e também adjacente as paredes dos defeitos ósseos (Figuras 82E e F). As trabéculas ósseas imaturas observadas no interior dos defeitos ósseos em reparação em ambos os subgrupos IVd e IVe, apareceram circundadas por uma grande quantidade de tecido mesenquimal e osteoblastos ativos adjacentes aos diversos pontos de matriz osteóide (Figuras 82E e F). A medula óssea apresentou-se com presença de neoformação óssea trabecular imatura preenchendo parcialmente o espaço do canal medular, principalmente abaixo dos defeitos ósseos (Figuras 82A e B). Infiltrado inflamatório de intensidade de leve a moderado foi observado adjacente as membranas para ambos os subgrupos, IVd e IVe ($p > 0,05$), porém foi significativamente diferente quando comparado aos grupos controle e I ($p < 0,001$).

Neste grupo IV, a densidade óssea também aumentou de forma crescente até o último período observado para as membranas, CB-COL e CB-COL OGP [10-14].

Figura 82 – Grupo IV: 07 dias. **A e B**: neoformação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos (NF); em A observa-se maior presença de tecido conjuntivo (TC) no interior do defeito ósseo; observa-se também a presença das membranas CB-COL (A) e CB-COL OGP [10-14] (B) (asterisco) e infiltrado inflamatório (I); **C e D**: neoformação óssea trabecular imatura, adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e do canal medular presença de neoformação óssea trabecular (O); infiltrado inflamatório (I) e respectivas membranas (asterisco); **E e F**: observa-se em presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) e neoformação óssea trabecular (O), a qual não apresenta-se mineralizada; presença de tecido conjuntivo denso (TC).

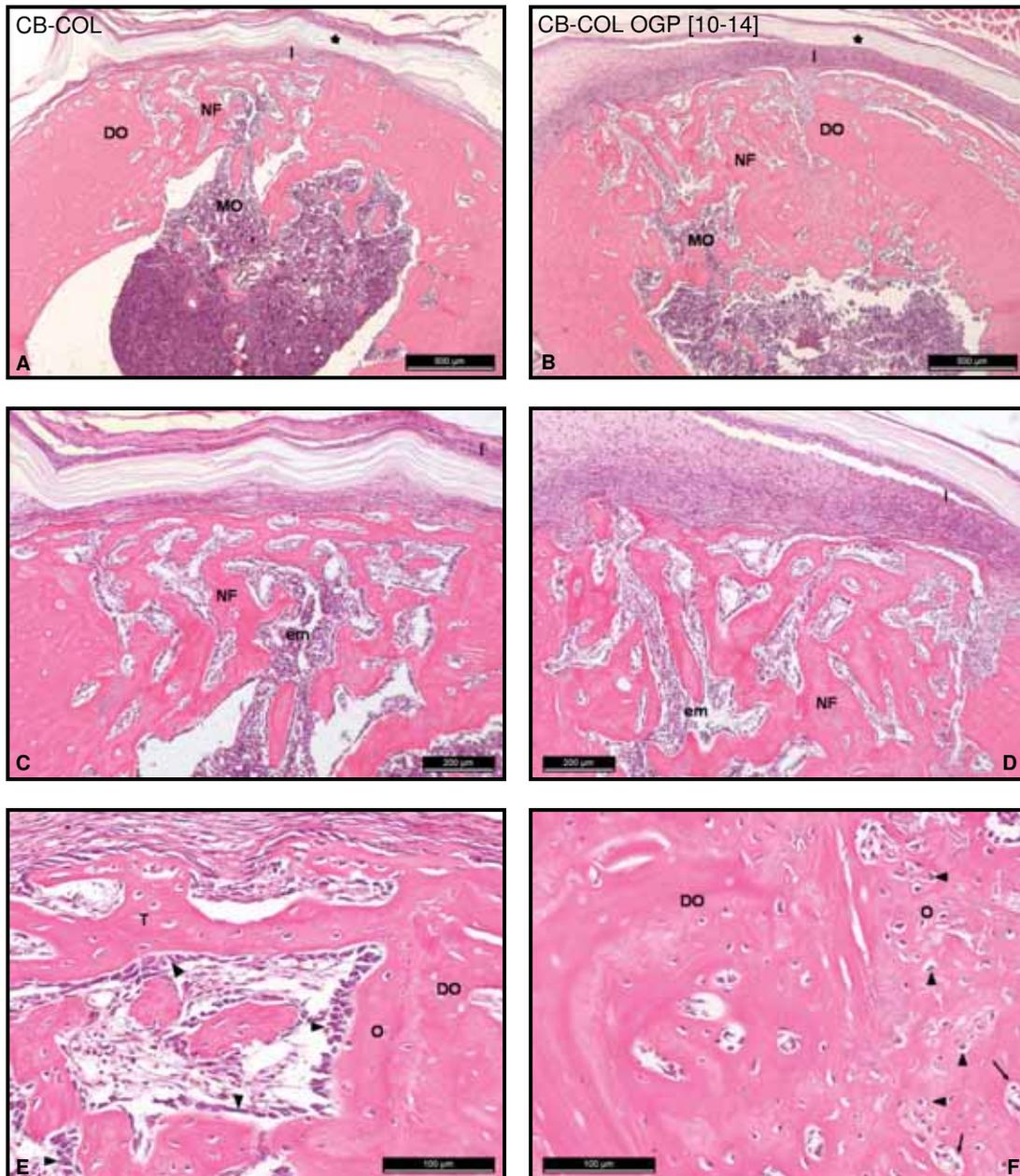


No período de 15 dias, observou-se o espaço intramedular com característica de normalidade, e a cortical óssea interna apresentou-se como uma linha mais radiopaca e reparada em ambos os subgrupos, IVd e IVe (Figuras 80 e 81). Histologicamente, os defeitos ósseos apresentaram-se reparados por osso trabecular com trabéculas ósseas mais espessas do que observado no período anterior. Contudo, os cortes histológicos revelaram que as corticais ósseas interna dos subgrupos não estavam reparadas no centro do defeito ósseo. Além disso, uma remodelação óssea intensa do osso trabecular neoformado foi observada no interior do defeito ósseo e principalmente na medula óssea (Figuras 83A-D). As trabéculas ósseas apresentaram-se mais espessas e aparentemente mais mineralizadas em ambos os subgrupos IVd e IVe (Figuras 83E e F), com densidade óssea superior quando comparado ao grupo II, porém em menor densidade óssea quando comparado ao grupo III. Nas Figuras, 83C e D, pode-se observar que a remodelação óssea foi similar tanto nos defeitos ósseos tratados com a membrana CB-COL quanto dos defeitos tratados com a membrana CB-COL OGP [10-14], corroborando aos dados mensurados para densidade óssea foram estatisticamente similares (IVd: 2,05 mmPb e IVe: 2,12 mmPb; $p > 0,05$).

Com esses resultados observados sugeriu-se que o colágeno favoreceu uma maior deposição de matriz osteóide e posterior mineralização desta após 15 dias de pós-operatório, sendo que a presença do peptídeo apresentou uma leve tendência na aceleração da mineralização óssea neste período comparado a membrana CB-COL, mas não estatisticamente significativa. De acordo com os outros grupos, II e III, também se observou que o peptídeo OGP [10-14] favoreceu a neoformação da cortical óssea interna mais rapidamente, diferente para as membranas sem o peptídeo.

Ainda em 15 dias, observou-se que as trabéculas ósseas dos subgrupos, IVd e IVe, estavam circundadas por grandes espaços medulares e apresentando osteoblastos ativos adjacentes a estas trabéculas ósseas (Figuras 83C-F). Matriz osteóide também foi observada em processo de mineralização adjacentes ao tecido conjuntivo denso entre a membrana e o defeito ósseo em reparação, e adjacente as paredes dos defeitos ósseos (Figuras 83E e F). O infiltrado inflamatório neste período apresentou-se com intensidade leve nos dois subgrupos ($p > 0,05$); no grupo IV, observou-se ausência macrófagos adjacentes as membranas CB-COL e CB-COL OGP [10-14].

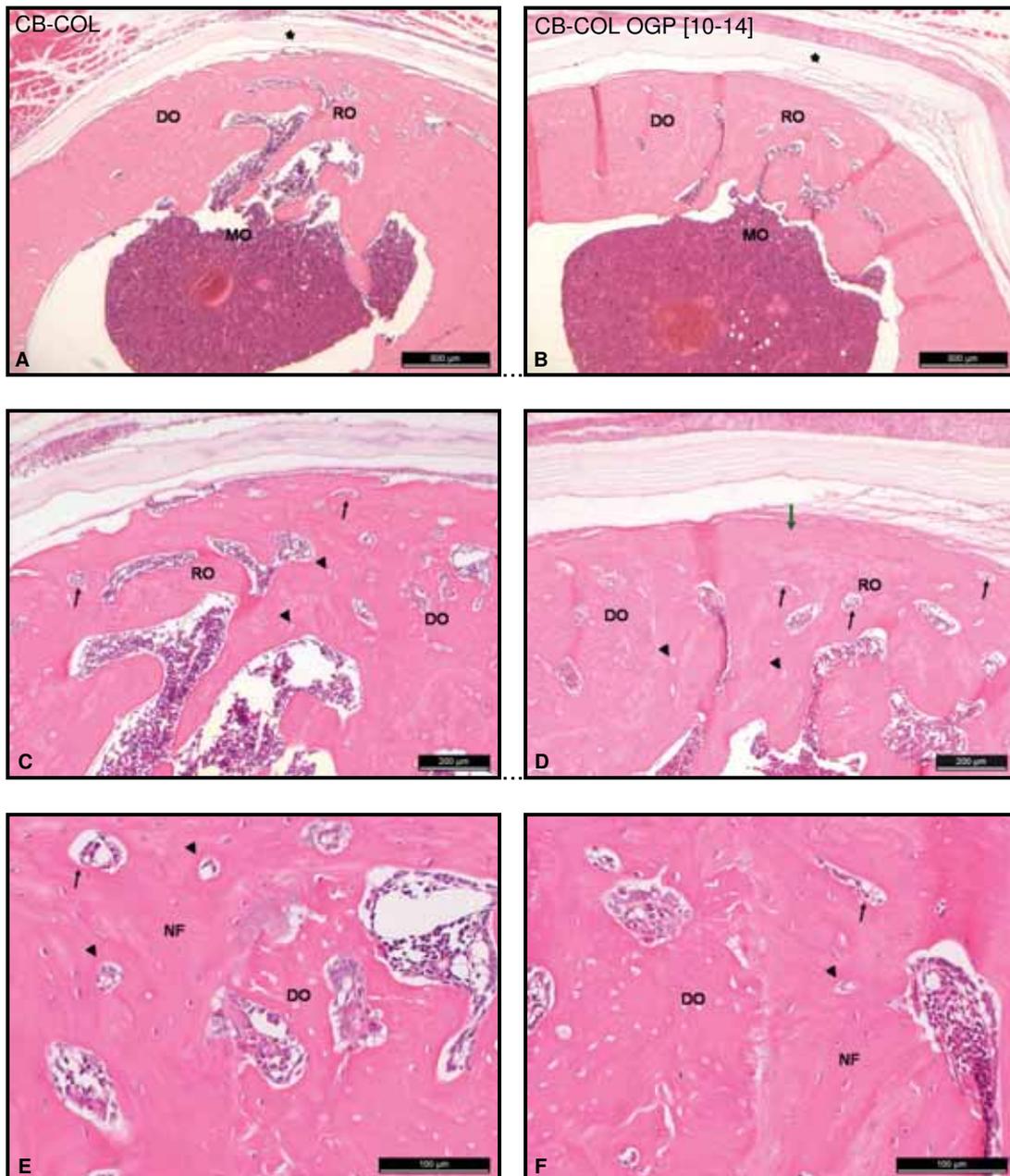
Figura 83 – Grupo IV: 15 dias. **A e B**: remodelação óssea das trabéculas imaturas (NF) no interior dos defeitos ósseos e também da medula óssea (MO), e observa-se a presença das membranas CB-COL (A) e CB-COL OGP [10-14] (B) (asterisco) e infiltrado inflamatório (I); **C e D**: remodelação óssea das trabéculas ósseas neoformadas (NF) com medianos espaços medular (em), e infiltrado inflamatório (I); **E**: observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) e neoformação óssea (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e trabéculas ósseas imaturas (T); **F**: observa-se osteoblastos englobados (cabeças de setas) pela matriz osteóide e osso neoformado (O) adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e início de formação dos vasos sanguíneos (setas).



As imagens radiográficas revelaram que a cortical óssea está totalmente reparada aos 30 dias de pós-operatório para o subgrupo IVe (membrana CB-COL OGP [10-14]), e no subgrupo IVd, a cortical óssea ainda apresentou-se em neoformação, mas pode-se observar com mais nitidez a cortical óssea interna totalmente reparada. Comportamento similar observado para os subgrupos IJe e IIIId no mesmo período, ou seja, a membrana CB-COL favoreceu o mesmo processo de reparo que a membrana CB OGP [10-14] e CB-HA, mas com densidade do osso neoformado diferente. Os cortes histológicos para este período revelaram que os defeitos ósseos também se apresentaram reparados por tecido ósseo em fase de modelação de osso trabecular a lamelar (osso composto), como observado nos grupos I, II e III (Figuras 84A-D). No entanto, em estágios avançados de organização de deposição de matriz mineralizada como observado no grupo III; o subgrupo IVe apresentou, na maioria dos espécimes, lamelas paralelas principalmente na região da cortical óssea externa, cuja característica histológica refere-se a osso cortical maduro (Figura 84F).

O tecido ósseo neoformado dos subgrupos, IVd e IVe, apresentaram fibras colágenas de forma mais organizadas, do que os grupos I e II, com lamelas concêntricas em volta dos ósteons e dos espaços medulares; lamelas intersticiais também foram observadas entre os numerosos vasos sanguíneos e dos ósteons (Figuras 84E e F); e o padrão de reparação foi similar ao grupo II e III, apesar desses tecidos ósseos neoformados no grupo IV apresentarem densidade óssea com valor inferior ao grupo III e na membrana CB-COL com peptídeo foi superior ao grupo II para CB-COL OGP [10-14] (Tabela 15). Ainda neste período, observou-se que a medula óssea apresentou-se organizada com ausência de trabéculas ósseas e ausência de reação inflamatória adjacente as membranas dos subgrupos IVd e IVe, porém se observou a presença de algumas células multinucleadas adjacentes a essas membranas.

Figura 84 – Grupo IV: 30 dias. **A e B**: reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), parede do defeito ósseo (DO) e medula óssea reparada (MO), e observa-se a presença das membranas CB-COL (A) e CB-COL OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D**: presença de vasos sanguíneos (setas pretas) e osteons (cabeças de setas) e espaços medulares no interior do tecido ósseo reparado (RO); em D, observam-se lamelas paralelas na região da cortical óssea externa (seta verde); **E e F**: nota-se formação de lamelas concêntricas envolvendo os osteons (cabeça de seta) no tecido ósseo neoformado (NF) e vasos sanguíneos (seta preta).



Aos 120 dias, a cortical óssea apresentou-se mais radiopaca para o subgrupo IVe. A cortical óssea da região do defeito de ambos os subgrupos IVd e IVe apresentaram-se íntegras e similares às corticais adjacentes ao defeito ósseo, embora a região de reparação do defeito do subgrupo IVd ter apresentado com uma intensidade de radiopacidade um pouco menor (Figuras 80 e 81), diferença esta confirmada pelos valores de densidade do osso neoformado que foi de 3,09 mmPb para subgrupo IVd e de 3,42 mmPb para o subgrupo IVe. As análises histológicas confirmaram os dados obtidos com as imagens radiográficas, sendo que se observou que o tecido ósseo no local defeito apresentou-se com característica de osso maduro nos dois subgrupos, IVd e IVe (Figuras 85A-D); presença de lamelas concêntricas, intersticiais e paralelas bem definidas, numerosos ósteons e vasos sanguíneos (Figuras 85E e F); as lamelas paralelas apresentaram-se em maior quantidade na região das corticais ósseas externa e interna para os subgrupos IVd e IVe. Embora apresentem características histológicas semelhantes, o subgrupo IVd apresentou aparentemente maiores espaços medulares no tecido ósseo reparado em relação ao subgrupo IVe, corroborando aos valores mensurados para densidade óssea em 120 dias que se apresentou maior para subgrupo IVe (3,42 mmPB) do que para o subgrupo IVd (3,09 mmPb). Desta forma, a membrana CB-COL OGP [10-14] aos 120 dias apresentou padrão similar de reparação e densidade óssea em relação às membranas CB-HA e CB OGP [10-14].

As membranas CB-COL e CB-COL OGP [10-14] também foram observadas aos 120 dias de pós-operatório; e adjacente a estas membranas observou-se ausência de infiltrado inflamatório nos dois subgrupos IVd e IVe, e também observou-se presença de células multinucleadas adjacentes a essas membranas (Figuras 86A e B). Com os dados estatísticos pode-se avaliar que estas membranas também não são reabsorvíveis ($p > 0,05$), pois não apresentaram diferença estatisticamente significativa de reabsorção entre os períodos de análises de 07 a 120 dias.

Figura 85 – Grupo IV: 120 dias. **A e B:** reparação do defeito ósseo por osso maduro (OM) e medula óssea reparada (MO); em A ainda observa-se presença de espaços medulares (cabeças de setas); observa-se também a presença das membranas CB-COL (A) e CB-COL OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** vasos sanguíneos (setas pretas), ósteons (cabeças de setas) no tecido ósseo reparado (OM) e presença de lamelas paralelas na região da cortical óssea externa em C e interna em D (seta verde); **E e F:** presença de lamelas concêntricas (setas azuis) em torno dos ósteons (cabeças de setas) no tecido ósseo reparado e vasos sanguíneos (setas pretas); em E, observa-se lamelas paralelas (seta verde) e intersticiais (asterisco).

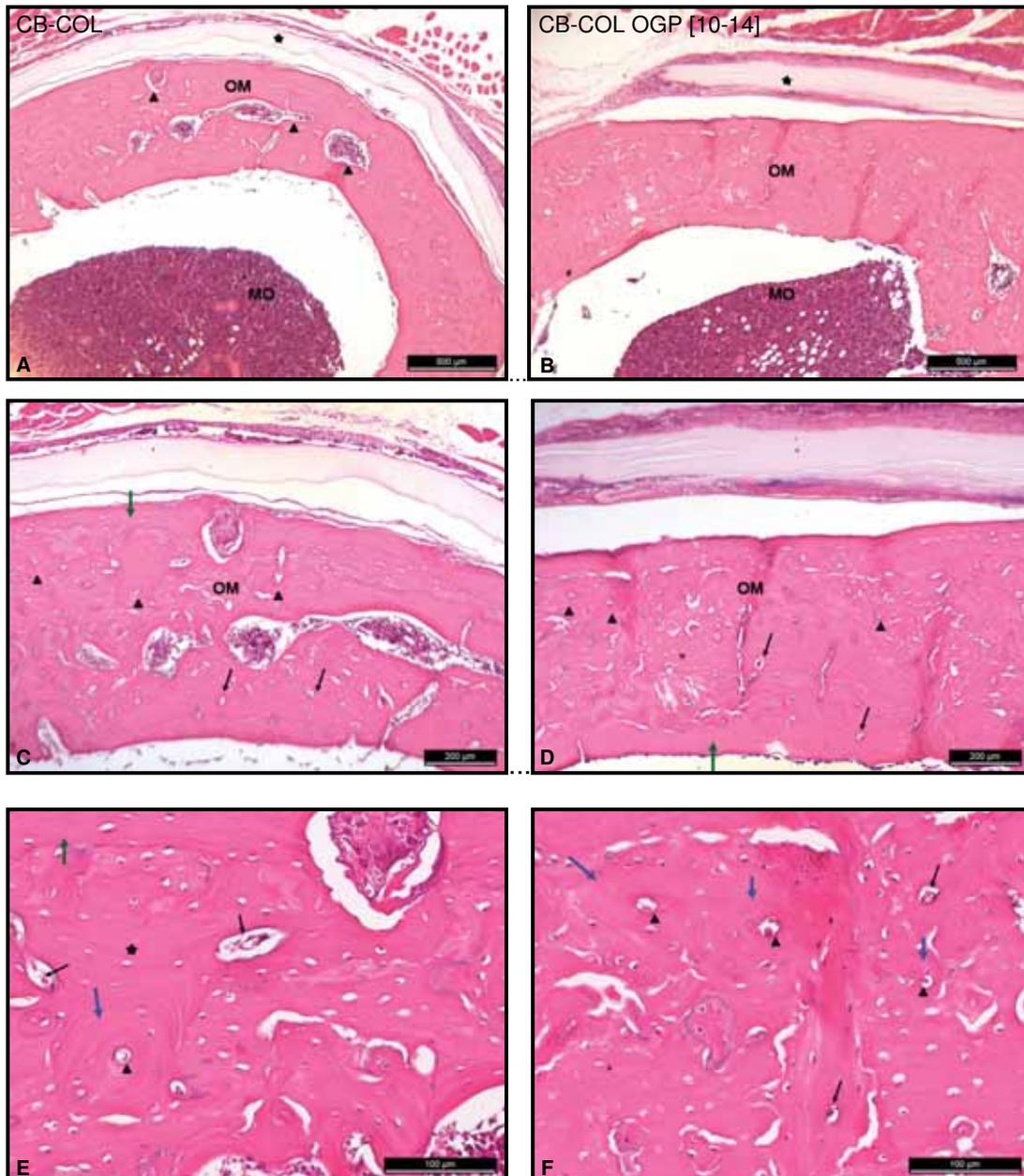
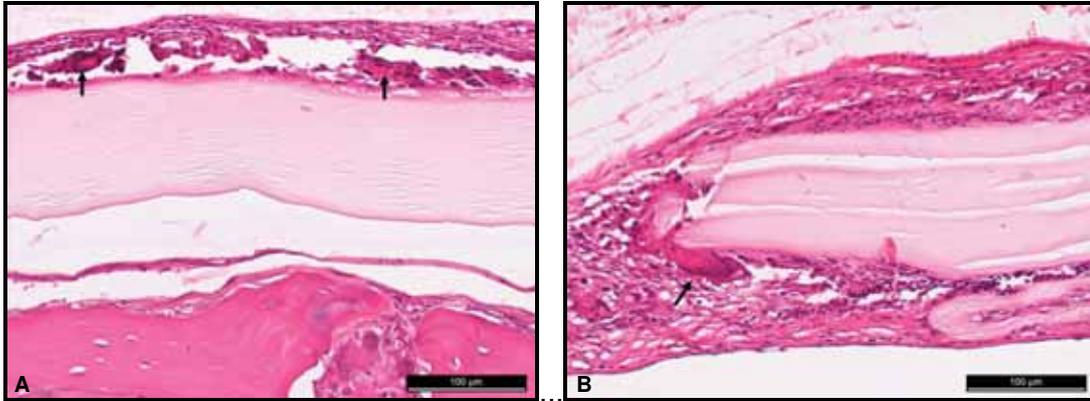


Figura 86 – Grupo IV: 120 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas CB-COL (A) e CB-COL OGP [10-14] (B) (setas).



Grupo V: Membranas de (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP [10-14]

As imagens radiográficas para o grupo V, lado direito (Vd) e esquerdo (Ve), respectivamente, nos referidos períodos de análise estão apresentadas nas Figuras 87 e 88. Ambas as membranas, (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP [10-14], em sete dias promoveram uma reparação do espaço intramedular e também reparação da cortical óssea interna, a qual apareceu delimitada e praticamente reparada em para os subgrupos Vd e Ve. Os valores mensurados de densidade para o osso neoformado no interior dos defeitos para os subgrupos Vd e Ve nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias foram para Vd: $1,56 \pm 0,04$, $1,96 \pm 0,10$, $2,37 \pm 0,12$ e $3,18 \pm 0,16$ mmPb, respectivamente, e para Ve: $1,35 \pm 0,10$, $2,18 \pm 0,10$, $2,49 \pm 0,13$ e $2,85 \pm 0,12$ mmPb, respectivamente.

Figura 87 - Imagens radiográficas digital do subgrupo Vd - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 7 dias observa-se a cortical óssea interna praticamente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada.

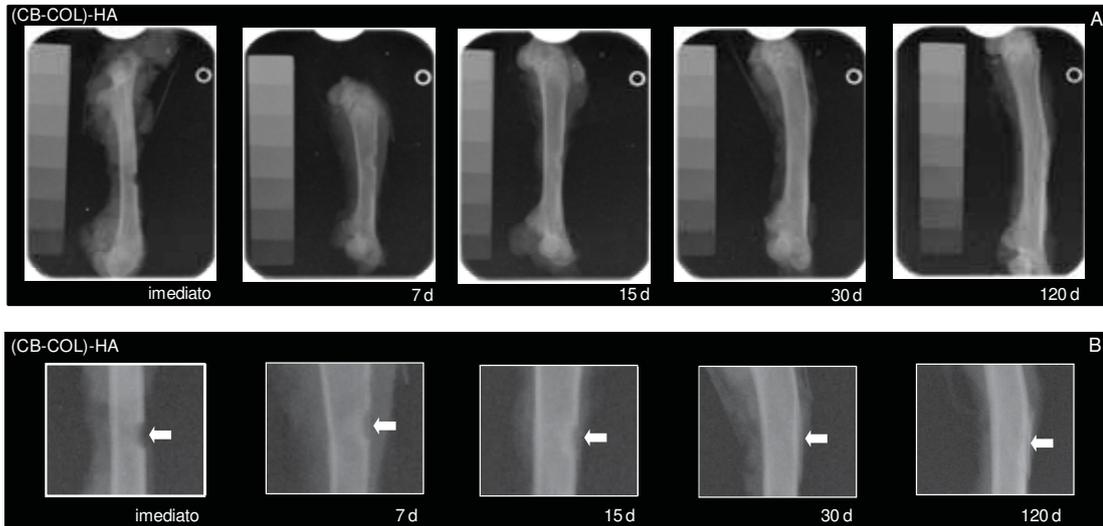
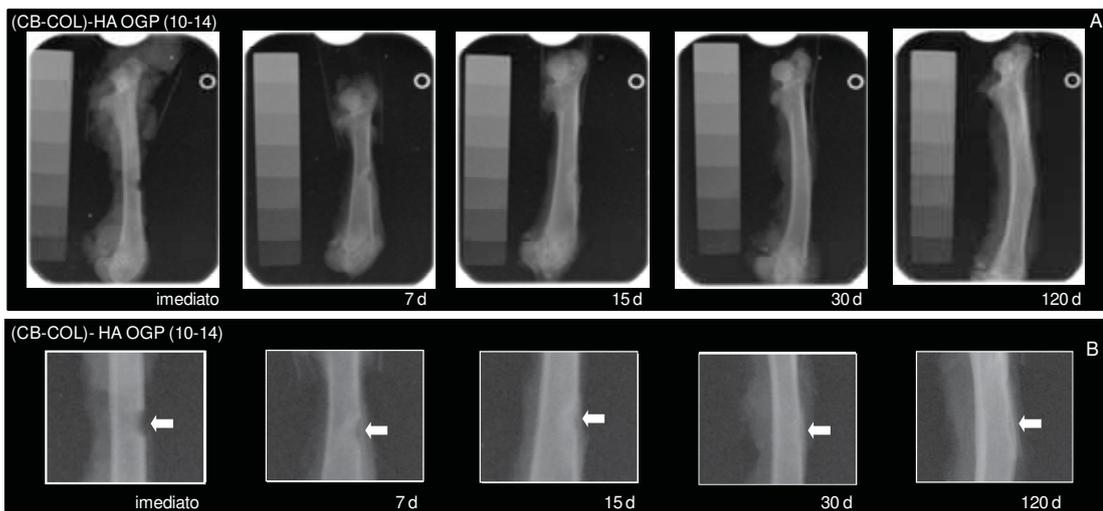


Figura 88 - Imagens radiográficas digital do subgrupo Ve - A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 7 dias observa-se a cortical óssea interna praticamente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada.

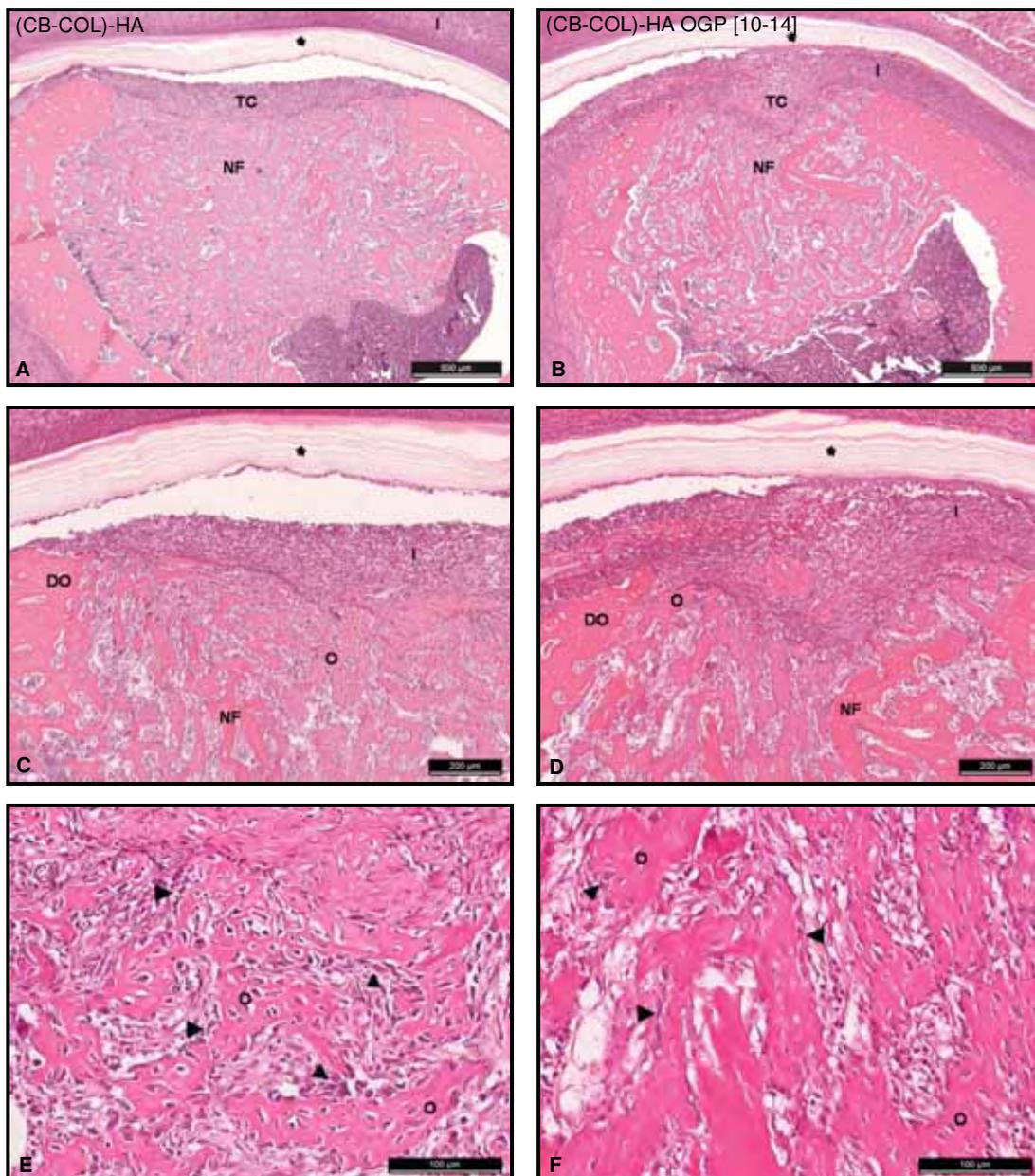


As Figuras 89A - D mostram os defeitos ósseos em início de neoformação óssea trabecular para as membranas (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP [10-14],

grupo V no período de 07 dias. Os defeitos ósseos tratados com as respectivas membranas apresentaram reparação óssea similar aos grupos II e III ao sétimo dia, com presença de osteoblastos ativos adjacentes a estas trabéculas ósseas imaturas circundadas por grandes espaços medulares preenchidos por tecido mesenquimal, bem como, pode-se observar, principalmente no subgrupo Vd, presença predominante de matriz osteóide (Figura 89E) adjacente ao tecido conjuntivo denso entre a membrana e o defeito ósseo e também adjacente as paredes dos defeitos ósseos (Figuras 89E e F). Apesar de histologicamente os defeitos ósseos tratados tanto com a membrana (CB-COL)-HA quanto com a membrana (CB-COL)-HA OGP [10-14] não apresentaram diferenças em relação à neoformação de trabéculas ósseas, porém a densidade óssea mensurada para o subgrupo Vd, 1,56 mmPb, foi estatisticamente superior ao valor mensurado para o subgrupo Ve 1,35 mmPb ($p < 0,05$), mostraram que a membrana sem o peptídeo favoreceu o início da mineralização do osso primário mais cedo; porém ambas as membranas, (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP [10-14] promoveram uma neoformação óssea mais eficaz do que com as membranas do grupo II, do subgrupo IVd e do grupo controle, em 07 dias, quando comparados aos valores mensurados para densidade óssea (vide Tabela 15). Radiograficamente foi observado reparação da cortical óssea interna, a qual apareceu delimitada e praticamente reparada em para os subgrupos Vd e Ve; contudo os cortes histológicos revelaram que o centro do defeito ósseo não estava reparado semelhante ao observado no grupo IV. Além disso, a incorporação de hidroxiapatita ao compósito CB-COL promoveu um aumento considerável na neoformação óssea inicial (Figura 89A) com uma densidade óssea superior comparado ao defeito ósseo tratado com a membrana CB-COL (IVd: 0,96 mmPb e Vd: 1,56 mmPb), porém este compósito (CB-COL)-HA apresentou uma neoformação óssea inicial com densidade óssea inferior ao compósito CB-HA (IIIId: 1,76 mmPb). Contudo, o peptídeo adsorvido a este compósito (CB-COL)-HA, favoreceu um atraso na mineralização das trabéculas ósseas neoformadas quando comparado as membranas CB-COL OGP [10-14] e (CB-COL)-HA, apresentando uma densidade óssea similar ao valor mensurado para a densidade óssea dos defeitos ósseos tratados com a membrana de CB. A medula óssea apresentou-se com uma neoformação óssea trabecular imatura preenchendo praticamente todo o espaço do canal medular (Figuras 89A e B). Infiltrado inflamatório de intensidade moderada foi observado adjacente as membranas para ambos os subgrupos, Vd e Ve ($p > 0,05$),

porém apresentou significância estatística quando comparado aos grupos controle e I.

Figura 89 – Grupo V: 07 dias. **A e B:** neoformação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos (NF); observa-se presença de tecido conjuntivo (TC) no interior do defeito ósseo e presença das membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (asterisco) e infiltrado inflamatório (I); **C e D:** neoformação óssea trabecular imatura (NF); adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e do canal medular presença de neoformação óssea trabecular (O); infiltrado inflamatório (I) e respectivas membranas (asterisco); **E e F:** observa-se presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) e neoformação óssea trabecular (O), a qual não apresenta-se mineralizada.



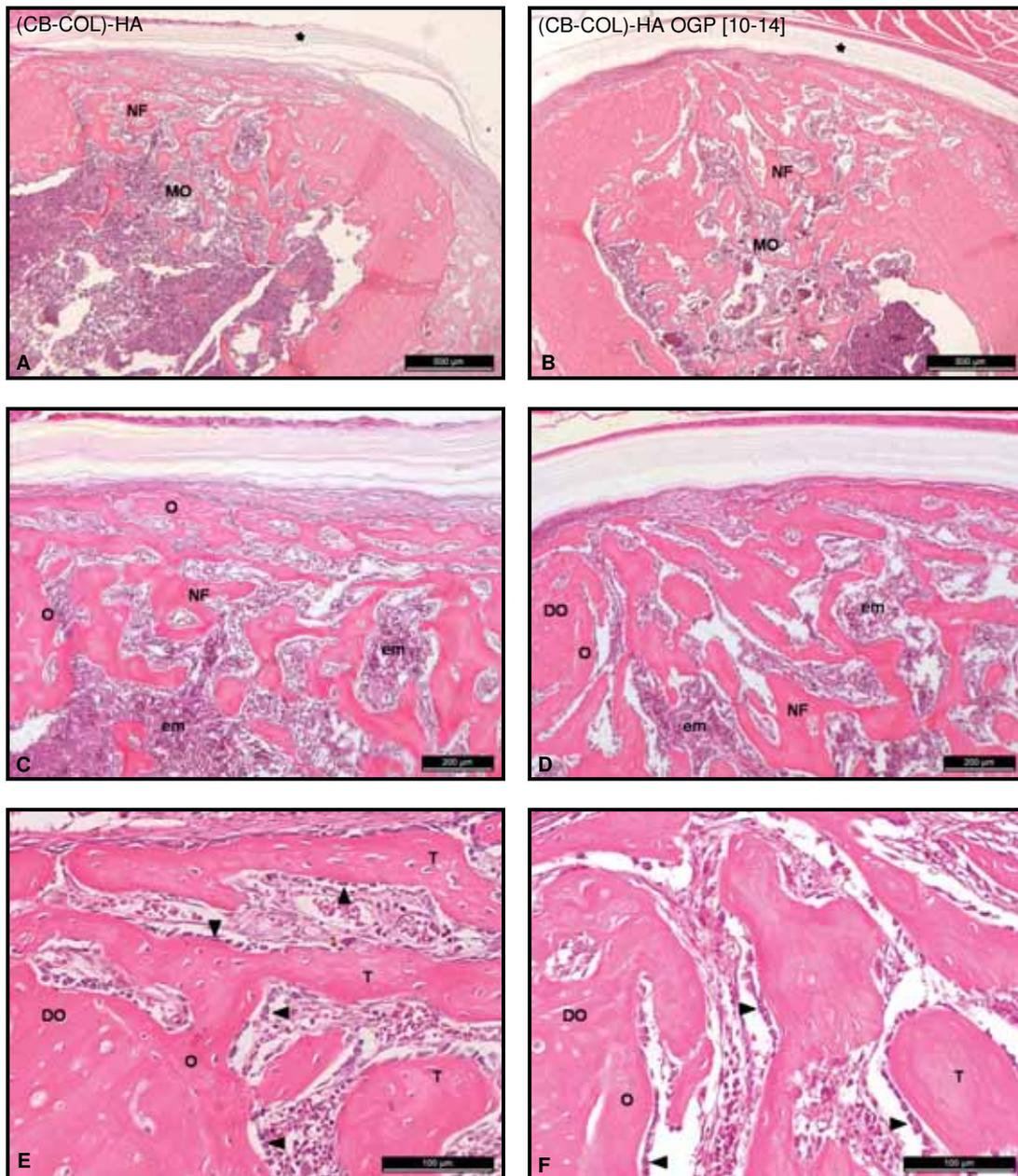
No período de 15 dias, os defeitos ósseos apresentaram-se reparados por osso trabecular imaturo (Figuras 90A-D). As trabéculas ósseas apresentaram-se mais espessas e aparentemente mais mineralizadas nos subgrupos Vd e Ve (Figuras 90E e F) do que observado no período anterior; com densidade óssea superior principalmente em relação a membrana (CB-COL)-HA OGP [10-14] quando comparado ao grupo II, porém o grupo V apresentou menor densidade óssea quando comparado ao grupo III e similar, quando comparado aos grupos I, IV e VI (Tabela 15). Nas Figuras, 90C e D, pode-se observar que a remodelação óssea foi maior no defeito ósseo tratado com a membrana (CB-COL)-HA do que em relação ao defeito tratado com a membrana (CB-COL)-HA OGP [10-14], sugerindo que o peptídeo promoveu uma maior estabilidade no processo de modelação e remodelação óssea também para este grupo como ao observado para o grupo II, isto é, as trabéculas ósseas formadas apresentaram-se aparentemente mais espessas do que as do subgrupo Vd; dados estes que corroboram aos dados observados para densidade óssea (Vd 1,96 mmPb e Ve 2,18 mmPb; $p < 0,01$), ou seja, as trabéculas ósseas observadas no subgrupo Ve, apesar de imaturas, apresentaram mais mineralizadas do que as observadas no subgrupo Vd. Com esses resultados observados sugeriu-se que a hidroxiapatita incorporado ao compósito CB-COL não favoreceu uma maior deposição de matriz osteóide e posterior mineralização, sendo que somente com a adsorção do peptídeo foi possível manter um padrão de neoformação e mineralização óssea semelhantes aos defeitos tratados com as membranas CB-COL OGP [10-14], (CB-HA)-COL e (CB-HA)-COL OGP [10-14] apresentando praticamente a mesma eficácia aos 15 dias de pós-operatório comparado a essas respectivas membranas, onde se observou também que o espaço intramedular apresentou-se reparado, e a cortical óssea interna apresentou-se como uma linha mais radiopaca e reparada nos dois subgrupos, Vd e Ve, como observado também para o grupo IV; porém padrão de reparação inferior aos das membranas CB-HA e CB-HA OGP [10-14].

Neste grupo V, a partir do 15º dia, a densidade óssea também aumentou de forma crescente até o último período observado para as membranas, (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP [10-14]. Além disso, as imagens radiográficas também revelaram que peptídeo OGP [10-14] favoreceu a neoformação da cortical óssea interna mais rapidamente, diferente para as membranas sem o peptídeo para os grupos II e III, porém, neste grupo V, a membrana (CB-COL)-HA também favoreceu

a neoformação da cortical óssea interna, embora a densidade óssea do osso neoformado tenha sido menor do que a membrana com peptídeo (Tabela 15). No entanto, os cortes histológicos revelaram que as corticais ósseas internas não estavam reparadas no centro dos defeitos ósseos desses grupos (II, II e V) como observado em 07 dias para o grupo V.

Ainda neste período, observou-se que as trabéculas ósseas dos subgrupos, Vd e Ve, também estavam circundadas por grandes espaços medulares e apresentavam osteoblastos ativos adjacentes a estas trabéculas ósseas (Figuras 90C-F). Matriz osteóide também foi observada em processo de mineralização adjacentes ao tecido conjuntivo denso entre a membrana e o defeito ósseo em reparação, e adjacente as paredes dos defeitos ósseos (Figuras 90E e F). A partir dos 15 dias de pós-operatório observou-se ausência de infiltrado inflamatório em todos os espécimes do grupo V.

Figura 90 – Grupo V: 15 dias. **A e B**: remodelação óssea das trabéculas imaturas (NF) no interior dos defeitos ósseos e também da medula óssea (MO), e observa-se a presença das membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (asterisco) em A, observa-se trabéculas ósseas mais finas do que em B; **C e D**: remodelação óssea das trabéculas ósseas neoformadas (NF) com grandes espaços medular (em), osso jovem (O) adjacente a parede do defeito ósseo (DO); **E e F**: observa-se em maior aumento presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas), osso jovem (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e as trabéculas ósseas imaturas (T).



As imagens radiográficas revelaram que a cortical óssea foi totalmente reparada aos 30 dias de pós-operatório para ambos os subgrupos Vd e Ve, mostrando que a membrana (CB-COL)-HA promoveu o mesmo padrão de reparação do defeito ósseo, mas com uma densidade óssea com valor menor do que com a membrana (CB-COL)-HA OGP [10-14] (Figuras 87 e 88). Comportamento semelhante observado também para os subgrupos IIIe e IVe, mas com valores de densidade do osso neoformado diferentes. As análises histológicas mostraram que os defeitos ósseos também se apresentaram reparados por tecido ósseo em fase de modelação de osso trabecular a lamelar (osso composto), como observado nos grupos I, II, III e IV (Figuras 91A-D). No entanto, em estágios de organização de deposição de matriz mineralizada como observado no grupo II. O tecido ósseo neoformado nos defeitos ósseos de ambos os subgrupos, Vd e Ve, apresentaram fibras colágenas organizadas de maneira similar aos grupos I e II, com lamelas concêntricas em volta dos espaços medulares e dos ósteons; lamelas intersticiais também foram observadas entre os numerosos vasos sanguíneos e poucos ósteons, porém mais evidentes do que nos grupos I e II (Figuras 91E e F). Além do padrão histológico desses tecidos ósseos neoformados no grupo V serem similar ao grupo II, a densidade óssea mensurada para os subgrupos Vd (2,37 mmPb) e Ve (2,49 mmPb) apresentaram densidade óssea com valor semelhantes aos dos subgrupos IIId (2,31 mmPb) e IIe (2,52 mmPb), respectivamente. A medula óssea apresentou-se organizada com ausência de trabéculas ósseas aos 30 dias. Células multinucleadas adjacentes as membranas foram observadas neste período (Figuras 92A e B).

Figura 91 – Grupo V: 30 dias. **A e B**: reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), parede do defeito ósseo (DO) e medula óssea reparada (MO), e observa-se a presença das membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D**: presença de vasos sanguíneos (setas pretas), ósteons (cabeças de setas) e espaços medulares no interior do tecido ósseo reparado (RO); **E**: formação de lamelas concêntricas (seta azul) envolvendo os espaços medulares no tecido ósseo neoformado e lamelas intersticiais bem definidas (setas vermelhas); **F**: nota-se formação de lamelas concêntricas (seta azul) envolvendo os ósteons (cabeça de seta) no tecido ósseo neoformado e vasos sanguíneos (seta preta) e também lamelas intersticiais bem definidas (setas vermelhas).

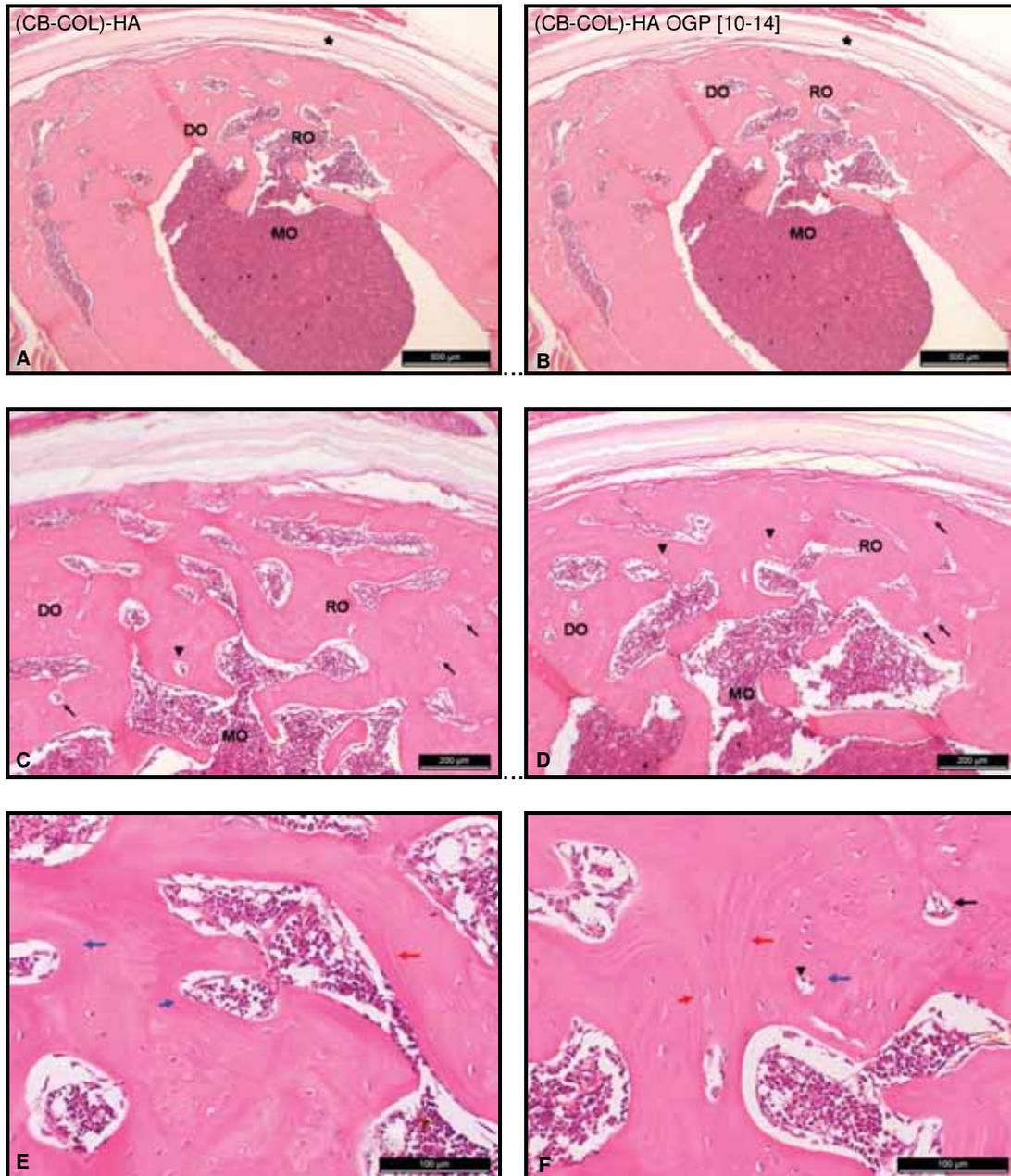
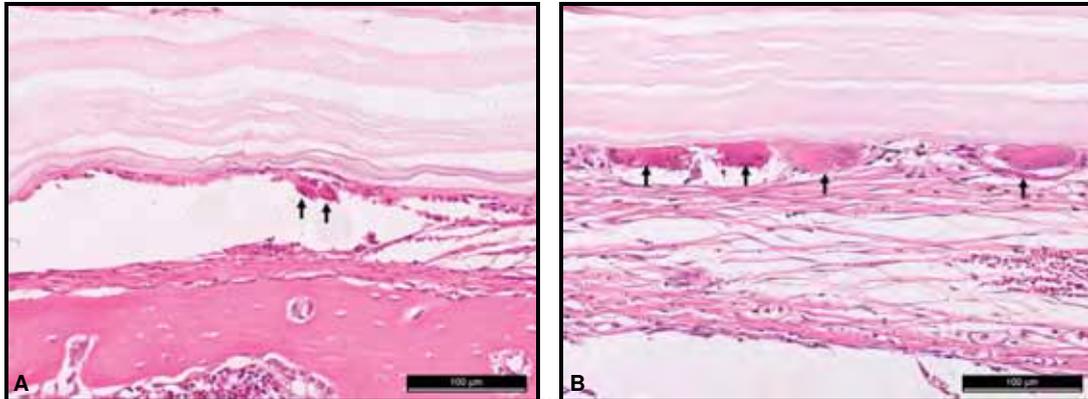


Figura 92 – Grupo V: 30 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (setas).



No período de 120 dias, a cortical óssea apresentou-se reparada para os subgrupos Vd e Ve, cuja região dos defeitos apresentou-se íntegra, mas com lacunas radiolúcidas principalmente para o subgrupo Ve, o que pode ter favorecido o valor de densidade óssea ser menor neste período (2,85 mmPb) em comparação ao subgrupo Vd (3,18 mmPB). Histologicamente, o tecido ósseo no local defeito apresentou-se com característica de osso maduro nos dois subgrupos, Vd e Ve (Figuras 93A-D); no entanto, em menor espessura do que o tecido ósseo adjacente os defeitos ósseos reparados; presença de lamelas concêntricas, intersticiais e paralelas bem definidas, numerosos ósteons e vasos sanguíneos (Figuras 93E e F); as lamelas paralelas apresentaram-se na maioria dos espécimes em maior expressão na região das corticais ósseas externa para os subgrupos Vd e Ve. Embora apresentarem características histológicas semelhantes, o subgrupo Ve apresentou aparentemente maiores espaços medulares no tecido ósseo reparado em relação ao subgrupo Vd, corroborando aos valores mensurados para densidade óssea em 120 dias. Desta forma, a membrana (CB-COL)-HA OGP [10-14] aos 120 dias não apresentou padrão similar de reparação e densidade óssea em relação às membranas contendo OGP [10-14] dos outros grupos tratados. As membranas (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP [10-14] também foram observadas aos 120 dias; e adjacente a estas membranas observou-se presença de células multinucleadas adjacentes a essas membranas (Figuras 94A e B). Com os dados estatísticos pode-se avaliar que estas membranas também não são reabsorvíveis ($p > 0,05$), pois não

apresentaram diferença estatisticamente significante de reabsorção entre os períodos de análises de 07 a 120 dias.

Figura 93 – Grupo V: 120 dias. **A e B**: reparação do defeito ósseo por osso maduro (OM) e medula óssea reparada (MO); em B observa-se presença de espaços medulares no interior do osso reparado; presença das membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D**: lamelas concêntricas em torno dos ósteons (setas pretas) no tecido ósseo reparado (OM) e presença de lamelas paralelas na região da cortical óssea interna (C e D), e adjacente aos espaços medulares no interior do osso reparado (D) (setas verdes); **E e F**: presença de lamelas concêntricas (setas azuis) em torno dos ósteons (setas pretas) e lamelas paralelas (seta verde); em E, vasos sanguíneos (cabeças de setas).

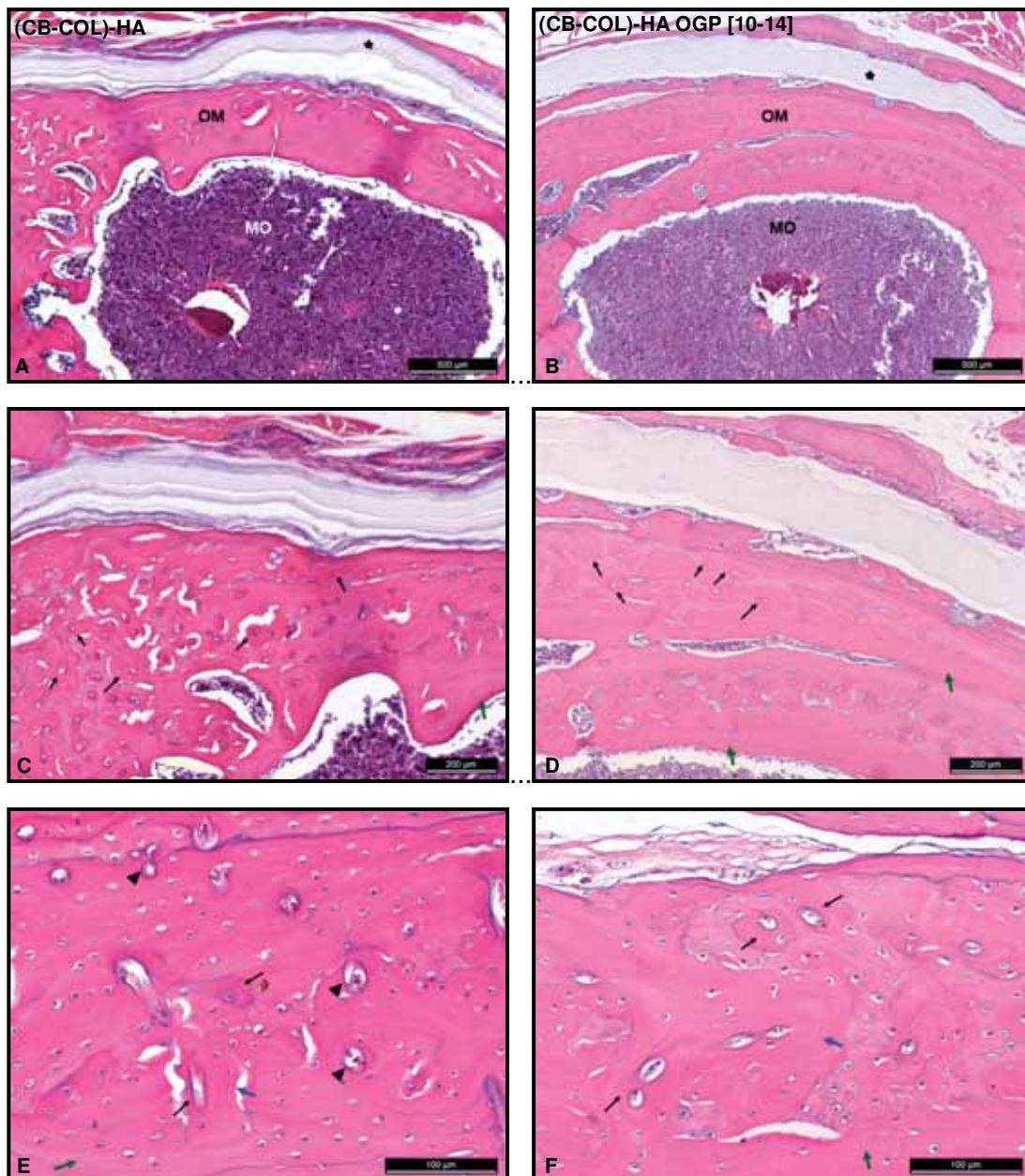
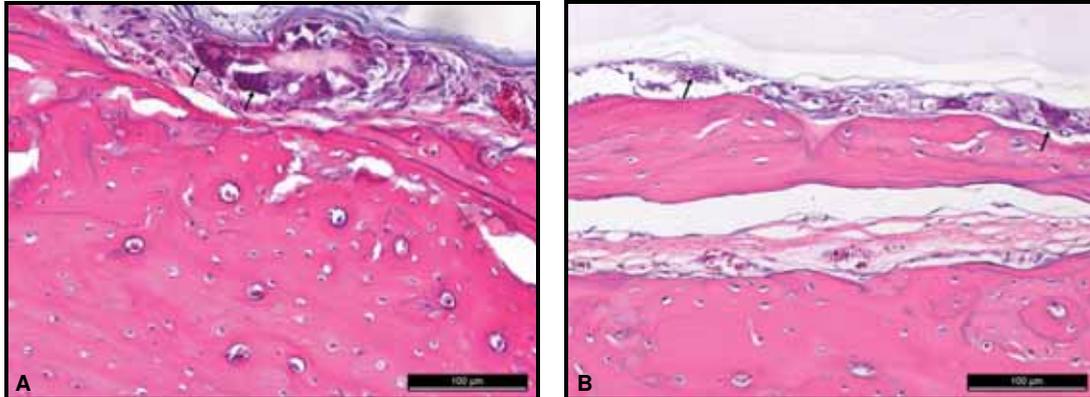


Figura 94 – Grupo V: 120 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas (CB-COL)-HA (A) e (CB-COL)-HA OGP [10-14] (B) (setas).



Grupo VI: Membranas de (CB-HA)-COL e (CB-HA)-COL OGP [10-14]

As Figuras 95 e 96 mostram as imagens radiográficas para o grupo VI, lado direito (VId) e esquerdo (Vle), respectivamente, nos referidos períodos de análise. Ao sétimo dia, ambas as membranas, (CB-HA)-COL e (CB-HA)-COL OGP [10-14], promoveram uma reparação do espaço intramedular e também reparação da cortical óssea interna, porém cortical óssea interna apareceu em estágio mais avançado de reparação para o subgrupo VId; imagens semelhantes as dos subgrupos IVe e Vd e Ve descritas anteriormente. Os valores de densidade óssea mensurados para o osso neoformado no interior dos defeitos para os subgrupos VId e Vle nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias foram para VId: $1,59 \pm 0,02$, $2,15 \pm 0,11$, $2,56 \pm 0,13$ e $2,84 \pm 0,17$ mmPb, respectivamente, e para Vle: $1,84 \pm 0,11$, $2,11 \pm 0,11$, $2,33 \pm 0,17$ e $3,16 \pm 0,18$ mmPb, respectivamente.

No entanto, os cortes histológicos demonstraram que não ocorreu a reparação no centro dos defeitos ósseos, como observado também para os grupos descritos acima (Figuras 97A e B).

No grupo VI, ao sétimo dia, foi observado histologicamente a presença de neoformação óssea trabecular no interior dos defeitos ósseos para ambos os subgrupos, VId e Vle, com osteoblastos ativos adjacentes a trabéculas ósseas imaturas circundadas por grandes espaços medulares preenchidos por tecido mesenquimal (Figuras 97A-D).

Figura 95 - Imagens radiográficas digital do subgrupo VI d – A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 7 dias observa-se a cortical óssea interna praticamente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada.

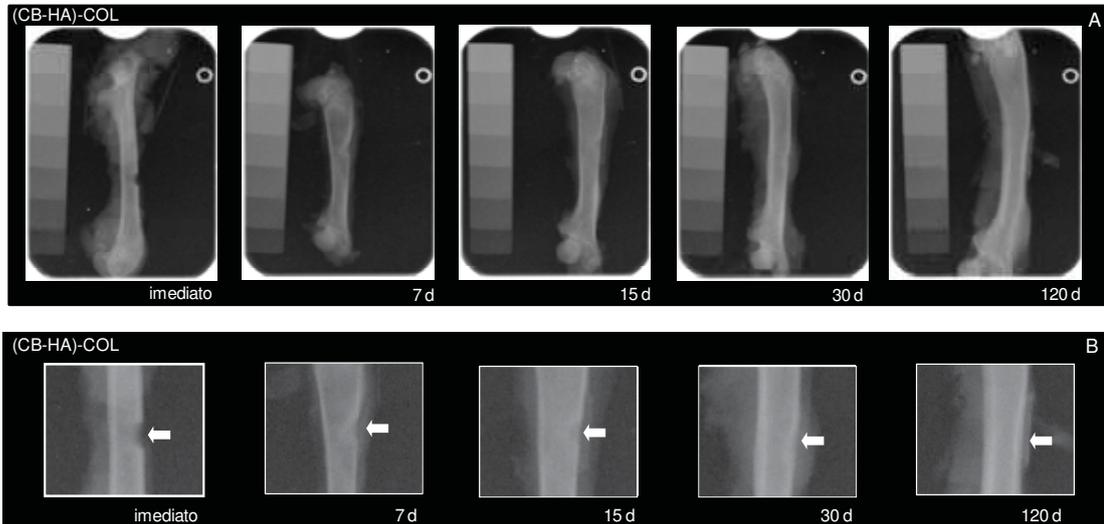
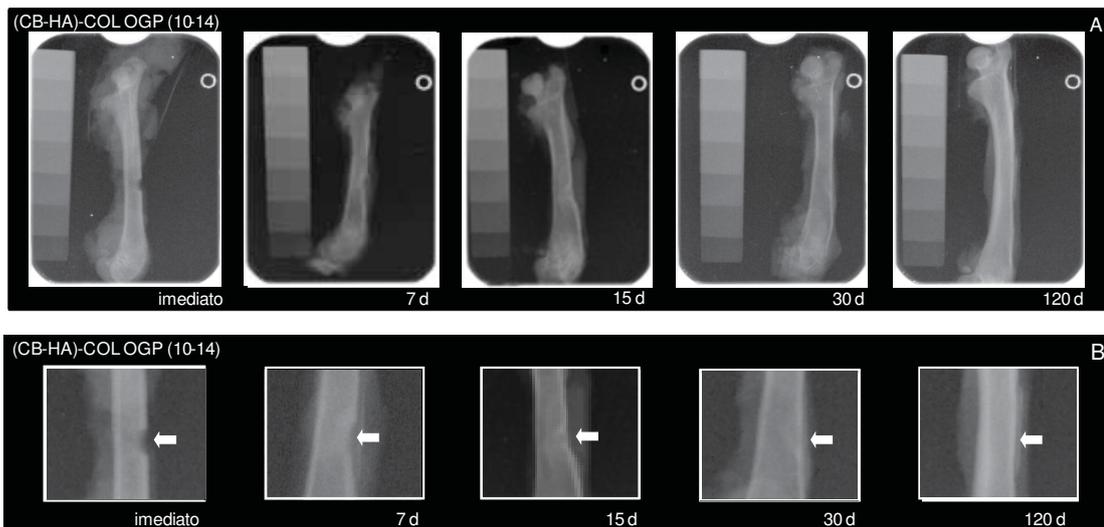


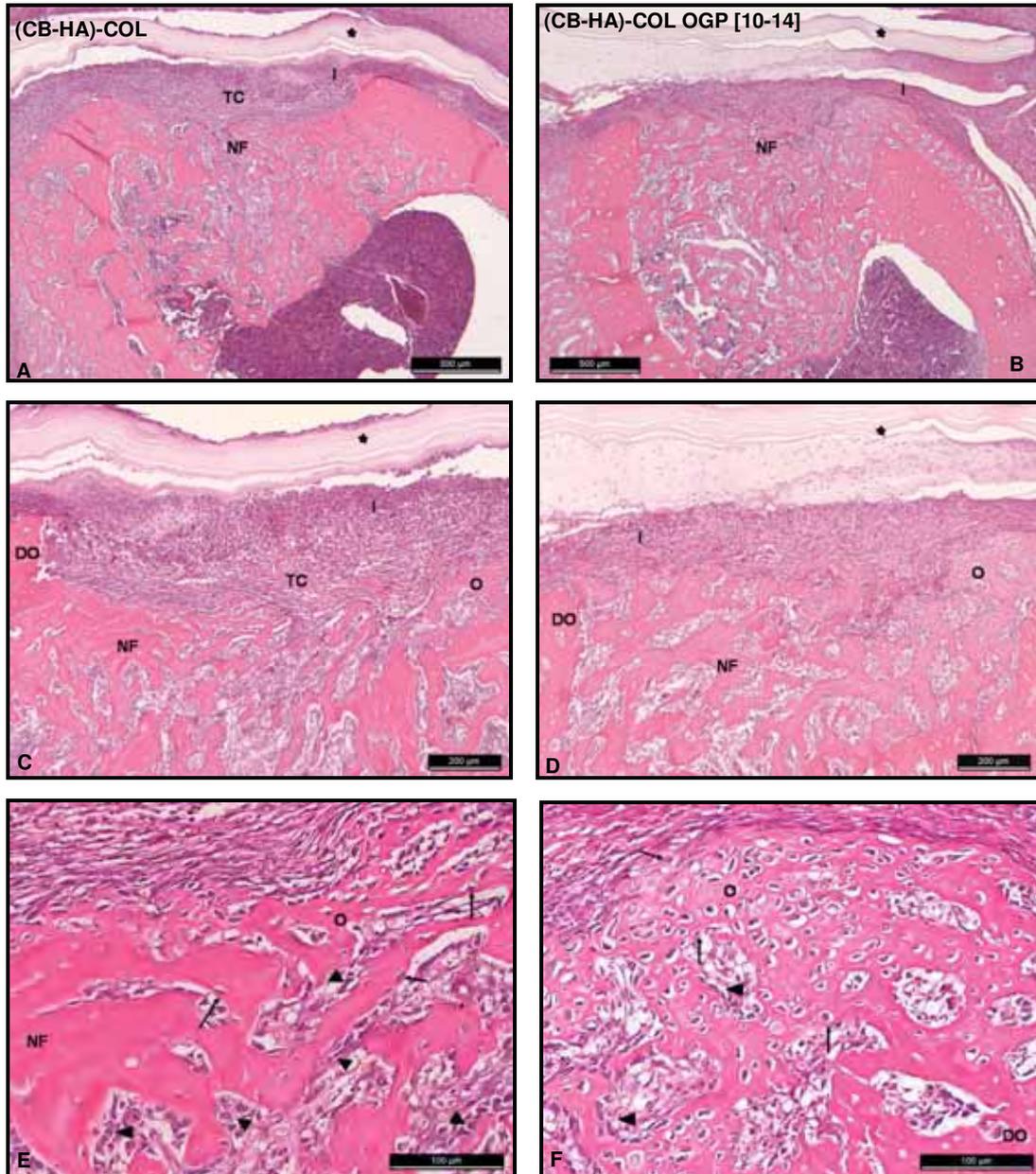
Figura 96 - Imagens radiográficas digital do subgrupo VI e – A) Imagens radiográficas mostrando o defeito ósseo imediato e nos períodos de 07, 15, 30 e 120 dias, respectivamente; B) Ampliação das respectivas imagens na região do defeito ósseo; as setas brancas indicam o defeito ósseo, e em 7 dias observa-se a cortical óssea interna praticamente reparada e em 30 dias observa-se a cortical óssea totalmente reparada.



Os defeitos ósseos tratados com as respectivas membranas apresentaram reparação óssea similar aos grupos II, III e V. Embora, o subgrupo VI d apresentar

trabéculas ósseas aparentemente mais espessas, em 07 dias de pós-operatório, em relação ao subgrupo VIe, apresentou valor para densidade óssea inferior do que os defeitos tratados com a membrana (CB-HA)-COL OGP [10-14] (VIId: 1,59 mmPb e VIe: 1,84 mmPb); além disso, a membrana (CB-HA)-COL OGP [10-14] foi a que apresentou um valor maior para densidade óssea neste período de análise ($p < 0,01$). Ainda no subgrupo VIe, pode-se observar, presença predominante de matriz osteóide adjacente as paredes dos defeitos ósseos formando trabéculas ósseas imaturas (Figura 97F). Os resultados observados, neste período, para o grupo VI sugerem que a membrana (CB-HA)-COL OGP [10-14] favoreceu o início de mineralização do osso primário mais cedo do que a membrana (CB-HA)-COL. Apesar do peptídeo OGP [10-14] também favorecer início de mineralização do osso primário mais precocemente para o compósito CB-COL (subgrupo VIe), a neoformação óssea observada para a membrana (CB-HA)-COL OGP [10-14] se apresentou em estágio superior de mineralização, ou seja, a presença de hidroxiapatita na membrana pode ter sido o fator responsável por promover uma maior mineralização destas trabéculas ósseas. No entanto, a incorporação de colágeno ao compósito CB-HA promoveu um aumento considerável na neoformação óssea inicial somente quando o peptídeo foi adsorvido ao compósito (CB-HA)-COL (Figura 97A) com maior densidade óssea (1,84 mmPB) comparado aos defeitos ósseos tratados com as membranas CB-HA e CB-HA OGP [10-14] (IIIId: 1,76 mmPb e IIIId: 1,65 mmPb, respectivamente); e o compósito (CB-COL)-HA promoveu uma neoformação óssea inicial com valores de densidade óssea próximos aos defeitos tratados com as membranas CB-COL OGP [10-14] e (CB-COL)-HA, ou seja, a membrana (CB-HA)-COL apresentou a mesma eficácia nos primeiros sete dias de pós-operatório comparado a essas respectivas membranas (vide Tabela 15). A medula óssea apresentou-se com presença de neoformação óssea trabecular imatura preenchendo parcialmente o espaço do canal medular (Figuras 97A e B). Infiltrado inflamatório de intensidade moderada foi observado adjacente as membranas para ambos os subgrupos, VIId e VIe ($p > 0,05$), no entanto, apresentou significância estatística quando comparado aos grupos controle e I. Neste grupo VI, a densidade óssea também aumentou de forma crescente até o último período observado para as membranas, (CB-HA)-COL e (CB-HA)-COL OGP [10-14].

Figura 97 – Grupo VI: 07 dias. **A e B**: neoformação óssea trabecular imatura no interior dos defeitos ósseos (NF); observa-se presença de tecido conjuntivo (TC) no interior do defeito ósseo em A, e presença das membranas (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B) (asterisco) e infiltrado inflamatório (I); **C e D**: neoformação óssea trabecular imatura (NF); osso jovem (O) adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e ao canal medular; infiltrado inflamatório (I) e respectivas membranas (asterisco); **E e F**: observa-se em presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) e neoformação óssea trabecular (O), a qual não apresenta-se mineralizada, e osteoblastos sendo englobados pela matriz (setas).

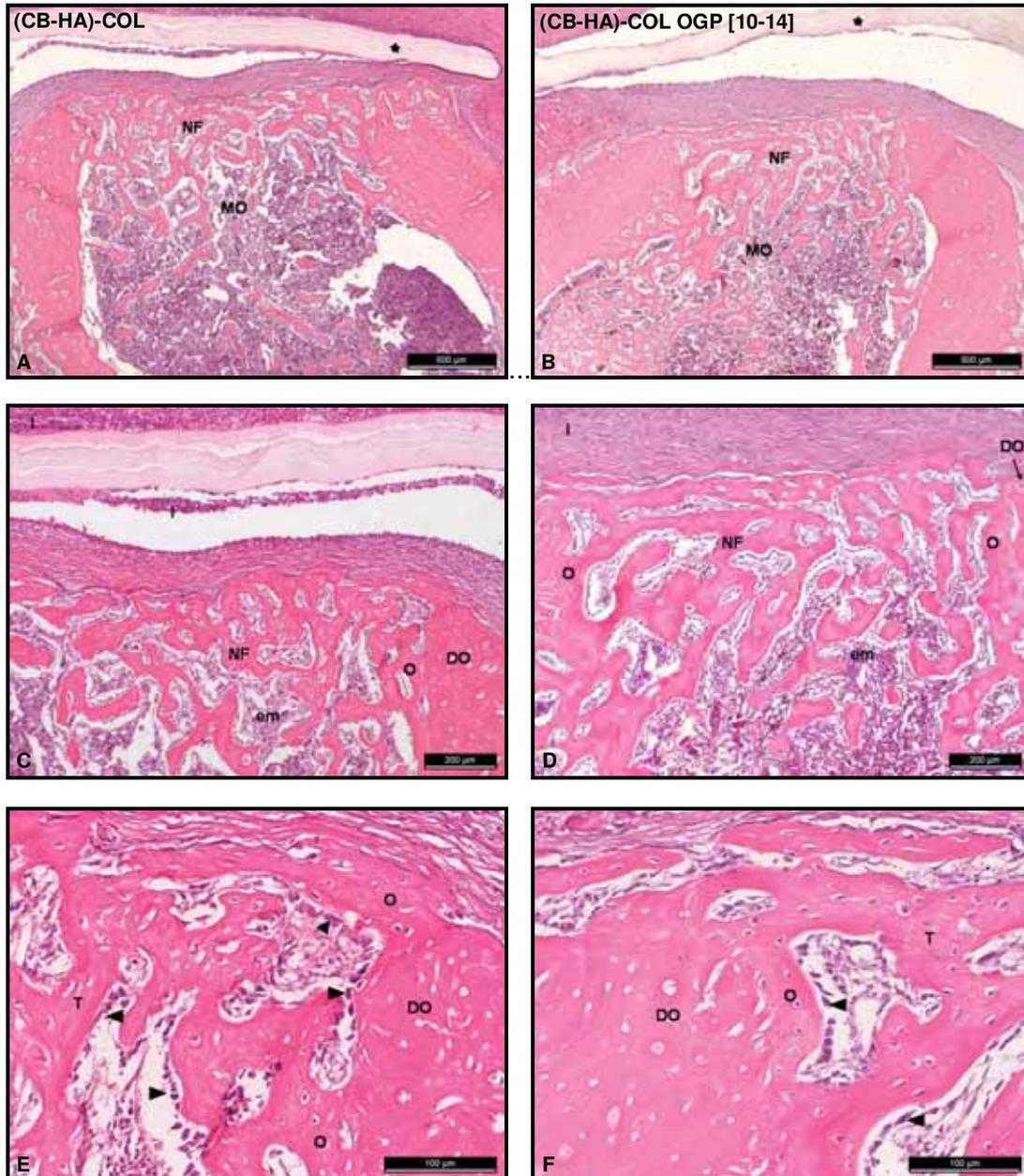


Ao 15º dia, o valor da densidade óssea na região central do defeito em reparação para ambas as membranas (CB-HA)-COL e (CB-HA)-COL OGP [10-14] foi similar, além disso, esses valores também foram próximos aos observados para as membranas, CB-COL, CB-COL OGP [10-14] e (CB-COL)-HA OGP [10-14]. De acordo com os resultados descritos acima, ressalta-se mais uma vez que estes quatro tipos de membranas apresentaram praticamente a mesma eficácia nos 15 dias de pós-operatório. As imagens radiográficas referidas ao período de 15 dias mostraram que o espaço intramedular também se apresentou reparado, e a cortical óssea interna apresentou-se ainda em formação, porém praticamente reparada nos dois subgrupos, VIId e VIe, como observado também para os grupos IV e V.

No entanto, os cortes histológicos da região central da reparação óssea mostraram que os defeitos ósseos apresentaram-se reparados por osso trabecular imaturo; como descrito anteriormente, analisando as imagens radiográficas, sugeriu-se também que a cortical óssea interna somente não se apresentou reparada na região central do defeito ósseo (Figuras 98A-D); nas Figuras, 98C e D, observou-se que a remodelação óssea foi similar em ambos os subgrupos, VIId e VIe, e mostrou-se uma remodelação intensa na medula óssea (Figuras 98A e B). As trabéculas ósseas apresentaram-se aparentemente mais espessas e mais mineralizadas nos subgrupos VIId e VIe (Figuras 98E e F) do que observado no período anterior; com densidade óssea próxima quando comparado aos subgrupos IVd, IVe e Ve, porém em menor densidade óssea quando comparado ao grupo III e maior quando comparado ao grupo II, e subgrupo Vd.

As trabéculas ósseas destes subgrupos, VIId e VIe, estavam circundadas por grandes espaços medulares e apresentavam osteoblastos ativos adjacentes a estas trabéculas ósseas (Figuras 98C-F); além disso, presença de formação de matriz osteóide em processo de mineralização adjacentes a membrana e as paredes dos defeitos ósseos (Figuras 98E e F). Com esses resultados histológicos observados sugeriu-se que o colágeno incorporado ao compósito CB-HA não favoreceu uma maior deposição de matriz osteóide e posterior mineralização, sendo que somente com a adsorção do peptídeo foi possível manter um padrão de neoformação e mineralização óssea mais eficaz somente em sete dias de pós-operatório.

Figura 98 – Grupo VI: 15 dias. **A e B:** remodelação óssea das trabéculas imaturas (NF) no interior dos defeitos ósseos e também da medula óssea (MO), e observa-se a presença das membranas (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D:** remodelação óssea das trabéculas ósseas neoformadas (NF) com grandes espaços medular (em), osso jovem (O) adjacente a parede do defeito ósseo (DO) e infiltrado inflamatório (I); **E e F:** presença de osteoblastos ativos (cabeças de setas) e osso jovem (O) adjacente ao defeito ósseo (DO) e as trabéculas ósseas imaturas (T).

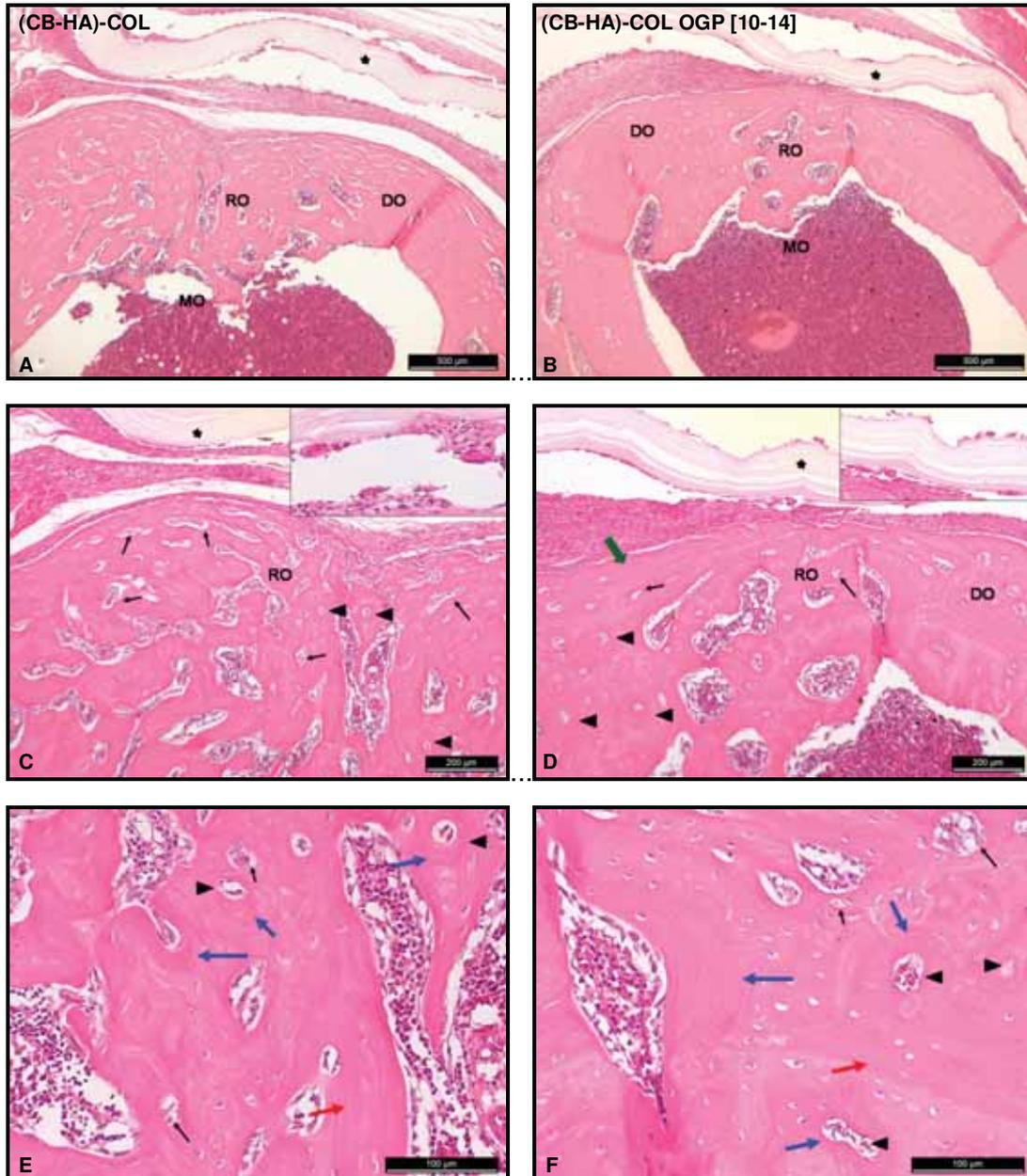


Entretanto, com os resultados observados pelas imagens radiográficas sugeriu-se que a presença de colágeno nos compósitos favoreceu uma reparação da cortical óssea interna independentemente da presença do peptídeo OGP [10-14], mas os compósitos ou membranas sem colágeno na composição, o peptídeo esteve relacionado na promoção da neoformação da cortical óssea interna mais rapidamente, diferente para as membranas sem o peptídeo como CB e CB-HA.

O infiltrado inflamatório permaneceu com intensidade leve em todos os espécimes nos dois subgrupos ($p > 0,05$).

Aos 30 dias, as imagens radiográficas revelaram que a cortical óssea também se mostrou totalmente reparada para ambos os subgrupos VI_d e VI_e, mostrando que a membrana (CB-HA)-COL promoveu o mesmo padrão de reparação do defeito ósseo e com uma densidade óssea com valor maior do que com a membrana (CB-HA)-COL OGP [10-14] (Figuras 95 e 96). Histologicamente os defeitos ósseos também se apresentaram reparados por tecido ósseo em fase de modelação de osso trabecular a lamelar (osso composto), como observado nos grupos I, II, III, IV e V (Figuras 99A-D). No entanto, em estágios de organização de deposição de matriz mineralizada como observado nos grupos II e V. O tecido ósseo neoformado nos defeitos ósseos de ambos os subgrupos, VI_d e VI_e, apresentaram fibras colágenas organizadas de maneira similar aos grupos II, IV e V, com lamelas concêntricas em volta dos espaços medulares e dos ósteons; lamelas intersticiais também foram observadas entre os numerosos vasos sanguíneos e de ósteons, porém mais evidentes no subgrupo VI_e (Figuras 99E e F). No subgrupo VI_e, predominou-se lamelas paralelas na maioria dos espécimes principalmente na região da cortical óssea externa (Figura 99D). Confrontando com os valores mensurados para a densidade óssea revelou-se que as membranas (CB-HA)-COL e (CB-HA)-COL OGP [10-14] promoveu um padrão de reparação óssea similar em 30 dias próximo aos valores observados para os subgrupos tratados II_d, II_e, IV_d, V_d e V_e, e inferior aos subgrupos VI_d e VI_e e ao grupo III (Tabela 15). Ainda neste período, observou-se que a medula óssea apresentou-se organizada com ausência de trabéculas ósseas, e também se observou ausência de reação inflamatória adjacente as membranas nos subgrupos IV_d e IV_e e presença de algumas células multinucleadas adjacentes a essas membranas (Figuras 99C e D, ampliação).

Figura 99 – Grupo VI: 30 dias. **A e B**: reparação do defeito ósseo por osso composto (RO), parede do defeito ósseo (DO) e medula óssea reparada (MO), e observa-se a presença das membranas (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D**: presença de vasos sanguíneos (setas pretas), osteons (cabeças de setas) e espaços medulares no interior do tecido ósseo reparado (RO); em D, presença de lamelas paralelas na região do cortical óssea externa; **E e F**: formação de lamelas concêntricas (setas azuis) envolvendo os espaços medulares e os osteons (cabeças de setas) no tecido ósseo neoformado e lamelas intersticiais bem definidas (setas vermelhas); vasos sanguíneos (setas pretas).



No período de 120 dias, a cortical óssea apresentou-se reparada para ambos os subgrupos VId e VIe, sendo que as regiões dos defeitos apresentaram-se íntegras sem presença de lacunas radiolúcidas como observado para o grupo V. Os valores para densidade do osso neoformado neste período foram de 2,84 mmPb para o subgrupo VId e de 3,16 mmPb para o subgrupo VIe mostrando que o peptídeo favoreceu uma maior densidade óssea aos 120 dias em comparação ao defeito tratado com a membrana (CB-HA)-COL, porém não estatisticamente significativa ($p > 0,05$). As análises histológicas mostraram que o tecido ósseo no local do defeito apresentou-se com característica de osso maduro nos subgrupos, VId e VIe (Figuras 100A-D); presença de lamelas concêntricas, intersticiais e paralelas bem definidas, numerosos ósteons e vasos sanguíneos (Figuras 100E e F); as lamelas paralelas apresentaram-se na maioria dos espécimes em maior quantidade na região da cortical óssea interna para os dois subgrupos VId e VIe. Embora apresentassem características histológicas semelhantes, aos valores mensurados para densidade óssea apresentou-se ligeiramente maior para subgrupo VIe do que para o subgrupo VId. Desta forma, pode-se sugerir que a membrana (CB-HA)-COL OGP [10-14] aos 120 dias pode favorecer mais o processo de mineralização do que a membrana (CB-HA)-COL.

Contudo, os resultados das imagens radiográficas e análise histológica revelaram que a densidade óssea foi similar para ambos os grupos dos compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL após 30 dias de pós-operatório, mesmo com a adsorção do peptídeo OGP [10-14]. Portanto, a ordem de incorporação do colágeno e da apatita, bem como, a fase de apatita incorporada, carbonato-apatita ou CDHA, não interferem no processo de regeneração do tecido ósseo.

As membranas (CB-COL)-HA e (CB-COL)-HA OGP [10-14] também foram observadas aos 120 dias de pós-operatório; e adjacente a estas membranas observou-se presença de células multinucleadas adjacentes a essas membranas (Figuras 101A e B). Com os dados estatísticos pode-se avaliar que estas membranas também não são reabsorvíveis ($p > 0,05$), pois não apresentaram diferença estatisticamente significativa de reabsorção entre os períodos de análises de 07 a 120 dias. Os valores médios da reabsorção das membranas estão mostrados na Tabela 16.

Figura 100 – Grupo VI: 120 dias. **A e B**: reparação do defeito ósseo por osso maduro (OM) e medula óssea reparada (MO); presença das membranas (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B) (asterisco); **C e D**: lamelas concêntricas e intersticiais bem definidas no osso maduro (OM) e presença de lamelas paralelas na região da cortical óssea interna (C e D) e externa (D) (setas verdes); **E** : presença de lamelas concêntricas (setas azuis) em torno dos ósteons e intersticiais (estrelas); **F**: presença de lamelas concêntricas (setas azuis) em torno dos ósteons e lamelas paralelas (setas verdes) e intersticiais (estrelas).

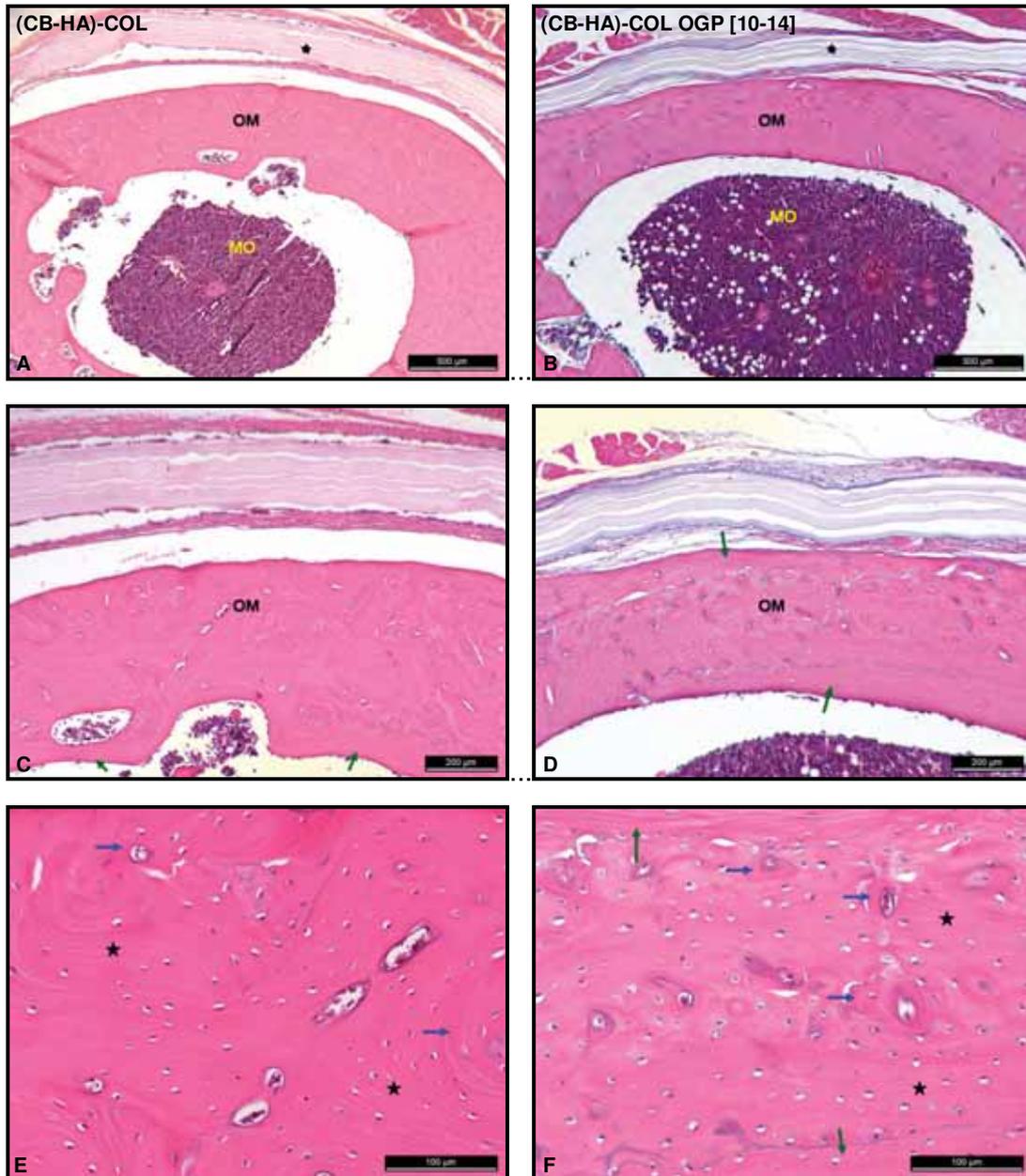


Figura 101 – Grupo VI: 120 dias. Células gigantes multinucleadas adjacentes as membranas (CB-HA)-COL (A) e (CB-HA)-COL OGP [10-14] (B) (setas).

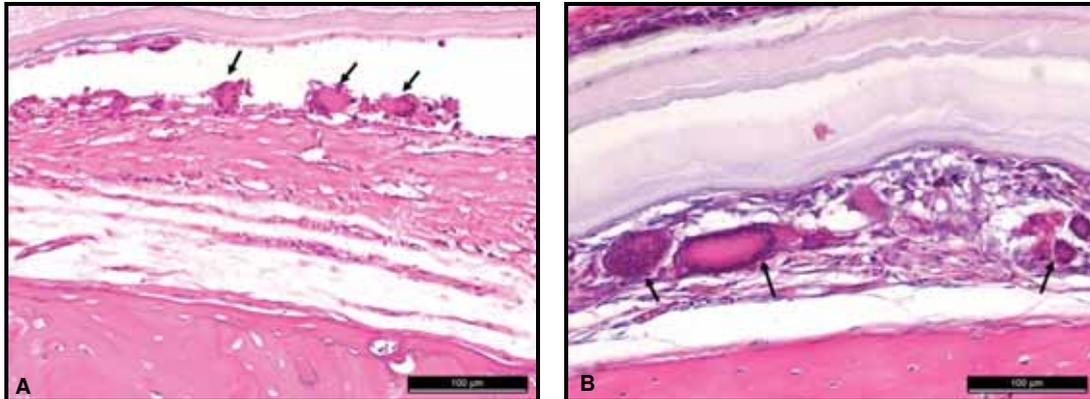


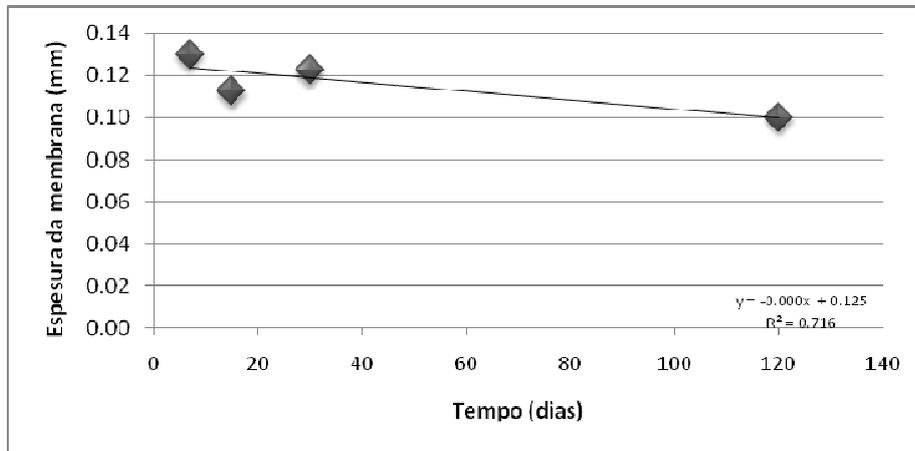
Tabela 16 – Valores mensurados para a espessura das respectivas membranas estudadas nos seguintes períodos de análise 07, 15, 30 e 120 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (letras diferentes indicam diferença estatísticas entre os grupos e tempos ($p < 0,05$)).

Membranas	Tempo (dias)											
	7		15		30		120					
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP				
CB	0.04	0.01	Aa	0.04	0.00	Aa	0.06	0.01	Aa	0.04	0.01	Aa
CB OGP [10-14]	0.13	0.03	BCa	0.11	0.03	BCa	0.12	0.02	BCDa	0.10	0.00	Ba
CB-COL	0.12	0.01	BCa	0.10	0.02	Ba	0.08	0.00	ABa	0.11	0.02	Ba
CB-COL OGP [10-14]	0.09	0.01	Ba	0.10	0.02	Ba	0.12	0.01	BCDa	0.11	0.02	Ba
CB-HA	0.18	0.02	Db	0.15	0.04	Cab	0.13	0.03	CDa	0.14	0.03	BCa
CB-HA OGP [10-14]	0.15	0.01	CDa	0.14	0.01	BCa	0.13	0.01	CDa	0.14	0.01	BCa
(CB-COL)-HA	0.14	0.01	BCDa	0.10	0.01	Ba	0.11	0.01	ABCa	0.11	0.01	Ba
(CB-COL)-HA OGP [10-14]	0.10	0.01	Ba	0.11	0.01	BCa	0.12	0.02	BCDa	0.13	0.02	BCa
(CB-HA)-COL	0.12	0.02	BCa	0.14	0.01	BCa	0.13	0.01	CDa	0.12	0.03	BCa
(CB-HA)-COL OGP [10-14]	0.12	0.01	BCa	0.15	0.02	Ca	0.16	0.01	Da	0.16	0.02	Ca

Conjunto de letras maiúsculas indica diferença entre os grupos num mesmo período e as letras minúsculas indicam diferença do mesmo grupo em função do tempo.

Para tentar compreender melhor o comportamento da reabsorção da membrana de CB foi proposto um modelo de regressão para estimar a reabsorção da membrana em função do tempo de implantação *in vivo* de acordo com o protocolo cirúrgico apresentado (Figura 102). O coeficiente de correlação entre a reabsorção e o tempo foi $r = 0,8465$, podendo-se dizer que há uma correlação forte. Na Figura 102, nota-se uma tendência decrescente em função do tempo, portanto espera-se em um período maior de implantação por intermédio de reação tipo corpo estranho e hidrolíticas a CB possa ser degradada.

Figura 102 – Tendência linear proposta para reabsorção da membrana de CB versus o tempo.



Contudo, para que este modelo de regressão proposto possa ser realmente empregado, o mesmo precisa ser melhor ajustado; desta forma, propõem-se realizar em estudos futuros análises em tempo intermediário a 30 e 120 dias e maior que 120 dias para que enfim possa determinar o tempo de reabsorção da membrana de CB.

Em geral, os resultados das análises radiográficas e histológicas sugerem que o peptídeo OGP [10-14] favoreceu uma reparação óssea mais rápida e com um valor de densidade óssea maior, mas esta eficácia foi diretamente dependente do tipo de carreador utilizado, sendo que a membrana CB-HA OGP [10-14] promoveu uma melhor reparação óssea comparada às outras membranas aos 15 e 30 dias, no entanto em 07 dias a membrana (CB-HA)-COL OGP [10-14] favoreceu um início de neoformação óssea com uma densidade óssea maior que os outros grupos. Além disso, esses resultados comprovaram que a adsorção do peptídeo OGP [10-14] as membranas conferiu a elas a propriedade de osteoindução, e as membranas contendo HA e colágeno foram mais osteocondutivas até os primeiros 15 dias de pós-operatório do que as membranas de CB, e as membranas CB-HA foram mais bioativas. Conseqüentemente, a troca iônica entre os íons cálcio e fosfato dos compósitos e dos fluídos corporais da interface osso/membrana promoveram a deposição de maior fase de cristais de HA as trabéculas ósseas neoformadas.

Quando os biomateriais à base de fosfato de cálcio são implantados em tecido ósseo, o aumento de pH, na interface material-osso, promovido pela liberação dos íons Ca^{2+} , estimula a atividade da fosfatase alcalina (pH ótimo em torno de 8,5 a

10,3) e concomitantemente os osteoblastos ativos são estimulados a sintetizar mais fosfatase alcalina. Dessa maneira, o pH da interface biomaterial/tecido se restabelece gradativamente pela ação dos tampões biológicos e diminuição de mediadores químicos no local produzidos pelos leucócitos e principalmente pela liberação de íons PO_3^{4-} dos tecidos adjacentes pela ação fosfatase alcalina promovendo a nucleação de cristais de HA às fibras colágenas.

Este processo dinâmico não ocorre em sistemas *in vitro*, como descrito anteriormente, a concentração de fosfatase alcalina não é suficiente para equilibrar o pH do meio de cultura, assim a ação desta enzima pode ser inibida ou ficar limitada para liberar íons PO_3^{4-} no sistema. Hipótese, que pode justificar o atraso na adesão celular nos primeiros dias de cultura e as taxas de viabilidade celular e de atividade de fosfatase alcalina das culturas crescidas sobre as membranas contendo HA, principalmente as do grupo do compósito CB-HA. No entanto, as membranas (CB-COL)-HA, (CB-COL)-HA OGP e (CB-COL)-HA OGP [10-14] apresentaram maior adesão e proliferação celular e atividade da fosfatase alcalina em relação às membranas dos grupos CB-HA e (CB-HA)-COL. Apesar do compósito (CB-COL)-HA conter apatita em sua composição, a fase precipitada neste compósito foi carbonato-apatita, a qual a dissolução é mais rápida em relação à hidroxiapatita deficiente em cálcio presente nos compósitos CB-HA e (CB-HA)-COL, o que pode ter favorecido o restabelecimento do pH mais cedo e ainda a quantidade de íons Ca^{2+} neste tipo de apatita é menor. A taxa de dissolução de biocerâmicas está relacionada com razão molar Ca/P, ou seja, quanto maior for a razão molar Ca/P menor a solubilidade. A ordem de solubilidade de alguns fosfatos de cálcio precursores da HA estequiométrica é a seguinte: fosfato de octacálcio (OCP) – Ca/P: 1,33 > β -fosfato de tricálcio (β -TCP) – Ca/P: 1,48 > hidroxiapatita deficiente de cálcio (CDHA) – Ca/P: 1,5 > hidroxiapatita (HA) – Ca/P: 1,67. Essa diferença de dissolução é dependente da composição e das propriedades cristalográficas dos fosfatos de cálcio, sendo que, a HA estequiométrica (Ca/P=1,67) é quase insolúvel em fluidos corporais (LE GUEHENNEC et al., 2004; MISCH, 2006).

Apesar dos defeitos ósseos, do grupo controle, em 30 dias estarem reparados por osso maduro, este osso demonstrou ser menos denso e conseqüentemente menos denso com relação aos grupos tratados com membranas. Esta característica biológica do tecido ósseo neoformado, neste grupo controle, pode ser devido à reparação óssea ser de primeira intenção nestes defeitos do que nos defeitos

ósseos dos grupos tratados por regeneração óssea guiada que a reparação óssea ocorreu por segunda intenção.

Todas as membranas analisadas no estudo *in vivo* apresentaram-se biocompatíveis e não promoveram reação inflamatória após 30 dias, sendo que todas as membranas aos 120 dias mostraram-se com característica de material biotolerável, com fina camada de tecido conjuntivo adjacente as membranas ou inexistente na maioria dos espécimes e com presença de poucas células multinucleadas adjacentes as respectivas membranas. Na literatura, estudos utilizando materiais de CB pura implantados em subcutâneo de ratos (HELENIUS et al., 2006) ou enxertados em artérias de suínos (WIPPERMANN et al., 2009) não apresentaram reações inflamatórias agudas ou de corpo estranho até 90 dias de pós-operatório. Salata et al. (2001) realizaram regeneração óssea guiada em defeitos ósseos mandibulares empregando CB e observaram células gigantes tipo corpo estranho em 30 dias de pós-operatório. Contudo, neste trabalho a maioria das células gigantes de corpo estranho foi observada após 120 dias de pós-operatório. Estudos prévios realizados com *scaffolds* de celulose vegetal revelaram que quando implantados em subcutâneo de ratos também apresentaram reação de corpo estranho em 120 dias (MARTSON et al., 1999). *Scaffolds* de celulose vegetal regenerada com hidroxiapatita quando implantados em defeitos ósseos em fêmur de ratos promoveram uma intensa reação inflamatória em 15 dias e reação de corpo estranho até um ano de pós-operatório, cujos *scaffolds* foram preenchidos por tecido conjuntivo e não promoveram reparação dos defeitos ósseos (EKHOLM et al., 2005).

Este padrão de reação inflamatória crônica pode ser observado em *scaffolds* de colágeno e OCP, no período de 15 dias, onde células gigantes foram observadas adjacentes ao material (KAMAKURA et al., 2006).

O tamanho dos cristais de HA presente nos biomateriais deve ser levando em consideração, pois substâncias com partículas de tamanho que possa ser fagocitado podem estimular a resposta inflamatória devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos durante a fagocitose. Implantes e partículas maiores do que os fagócitos mononucleares não provocam reações inflamatórias acentuadas porque as células não são capazes de fagocitar o implante segundo Oréfice et al., (2006). Os macrófagos são capazes de fagocitar partículas muito pequenas (< 5 μm) enquanto partículas de tamanho maior (> 10 μm) induzem a formação de células gigantes tipo corpo estranho, cuja característica foi observada para as membranas

implantadas nesse estudo; a localização do tecido, tamanho e forma do material são fatores que podem influenciar em reações tipo corpo estranho (ANDERSON et al., 2008), e segundo os dados da caracterização físico-química das membranas contendo HA, os cristais de HA são de ordem nanométrica, sugerindo que o tamanho destas estruturas favorece a atividade macrofítica, levando também a fusão das células para formar células gigantes tipo corpo estranho em períodos longos.

Na literatura, estudos sobre o preparo e caracterização físico-química de compósitos de CB-HA estão bem difundidos, porém há poucos estudos *in vitro* relacionados a estes compósitos (FANG et al., 2009; GRANDE et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2011); além disso, não há relatos na literatura de estudos *in vivo* com compósitos CB-HA. Apesar de ter poucos estudos com compósito a base de CB e colágeno, somente em dois estudos *in vitro* (WIEGAND ET AL., 2006; ZHIJIANG; GUANG, 2011), este compósito apresentou ser promissor. No entanto, tanto estudos *in vitro* quanto *in vivo* relacionados à membrana de CB são bem difundidos na literatura, cujos estudos têm revelado que as membranas de CB são um biomaterial em potencial para aplicações em regeneração tecidual devido a suas excelentes propriedades biológicas (FONTANA et al., 1990; NOVAES JR et al., 1990; MELLO et al., 1997; DOS ANJOS et al., 1998; BATISTA et al., 1999; SIMONPIETRI et al., 2000; KLEMM et al., 2001; KLEMM et al., 2005; HELENIUS et al., 2006; MENDES et al., 2009).

Resultados clínicos promissores foram obtidos utilizando membranas de CB em defeitos periodontais intra-ósseos (NOVAES JR et al., 1990; DOS ANJOS et al., 1998; SIMONPIETRI et al., 2000) ou peri-implantares (NOVAES; NOVAES, 1993) em regeneração óssea guiada. Além disso, a reparação óssea, em defeitos periodontais e formação de tecido mole em locais de recessão gengival, foi efetiva utilizando as membranas de CB, as quais apresentaram resultados similares aos obtidos com membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) (DOS ANJOS et al., 1998). Por outro lado, De Macedo et al. (2004) observaram que os defeitos ósseos tratados com as membranas de CB apresentaram uma formação óssea lamelar incompleta em relação aos defeitos tratados com membranas de e-PTFE, onde se verificou osso lamelar maduro.

Desta forma, os resultados obtidos nas análises radiográficas e histológicas para os compósitos desenvolvidos nesse trabalho são pioneiros, além disso, esses

resultados mostraram que todos compósitos foram compatíveis as estruturas examinadas, bem como, mostraram-se ser materiais em potencial para aplicação em regeneração óssea.

Os resultados obtidos nos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que houve uma limitação em trabalhar com os peptídeos moduladores de fator de crescimento, OGP e OGP [10-14], pois os resultados obtidos *in vitro* tiveram comportamento diferente *in vivo*, dificuldades estas que também são relatadas na literatura (PEI, et al., 2002). O sucesso clínico para aplicação de fatores de crescimento está relacionado a fatores como dose terapêutica ideal para o sistema em estudo e o desenvolvimento de um melhor carreador específico para um determinado fator; e isto foi observado neste trabalho onde as membranas de CB e de CB-COL foram melhores carreadores para os peptídeos *in vitro*. No entanto, *in vivo* os resultados revelaram que a membrana CB-HA OGP [10-14] foi a que favoreceu a reparação com uma densidade óssea considerável em menor tempo. De acordo com a literatura, os peptídeos OGP e OGP [10-14] administrados por via sistêmica com doses terapêuticas diárias aceleram o processo de reparação de defeitos ósseos e fraturas, além de conferir uma massa óssea trabecular maior para estes defeitos reparados e promover mais rapidamente a transição do osso imaturo a lamelar (BAB et al., 1992; SUN; ASHHURST, 1998; BRAGER et al., 2000; CHEN et al., 2000). No entanto, a liberação controlada do peptídeo OGP em *scaffolds* de PLGA foi relatado por Wang et al. (2008), os quais verificaram que os *scaffolds* contendo OGP foram mais eficazes do que o grupo controle, que recebeu doses diárias de OGP por administração via sistêmica; desta forma, revelando que o efeito local do peptídeo foi mais eficiente do que por administração via sistêmica.

A reabsorção de biomateriais está relacionada a vários fatores, como, tamanho de partícula, porosidade, estrutura química (composição e cristalinidade) e pH dos fluídos corporais circundantes ao material (MISCH, 2006). Partículas nanométricas são reabsorvidas mais rapidamente que as partículas micrométricas, devido a ação rápida dos osteoclastos e macrófagos sobre a superfície de partículas de menor tamanho. Materiais cristalinos também alteram a taxa de reabsorção, uma vez que estruturas cristalinas são mais resistentes a reabsorção do que estruturas amorfas ou semi-cristalinas. Além disso, a composição química também é um fator importante, por exemplo, impurezas como carbonato de cálcio presente na apatita promovem reabsorção mais rápida desta fase de apatita do que quando se tem uma

hidroxiapatita estequiométrica, pois as impurezas tornam o cristal mais amorfo. Com a análise estatística observamos que as membranas não foram reabsorvidas até o período de 120 dias, devido à matriz de CB ($p > 0,05$). No entanto, membranas CB-HA revelaram que os cristais de apatita (hidroxiapatita deficiente em cálcio) foram reabsorvidos; houve diferença estatisticamente significativa da degradação das membranas CB-HA entre os períodos de 07 e 120 dias ($p < 0,05$), e o efeito da degradação foi dependente ao período analisado ($p = 0,03$) (Saska et al, 2011). Mello et al. (1997) observou que a reabsorção das membranas de CB, como substituto de dura-máter em cachorros, foi estatisticamente significativa entre os períodos de 30 e 270 dias de pós-operatório, ou seja, superior ao período que foi observado no presente trabalho. Desta forma, sugere-se que a membrana de CB possa ser degradada pelo organismo por ação de células multinucleadas, porém em períodos maiores do que relatado na literatura devido ao fato da própria membrana não favorecer a formação de intensa reação de corpo estranho adjacente às mesmas.

Uma tendência na literatura para tentar resolver o problema da reabsorção da CB *in vivo* é incorporar à membrana, a enzima celulase; cuja enzima é capaz de quebrar as ligações glicosídicas $\beta 1 \rightarrow 4$ da cadeia polimérica, favorecendo a degradação enzimática da celulose (HU; CATCHMARK, 2011b). A celulase de *Trichoderma reesei* incorporada à CB promoveu uma degradação progressiva da CB em SBF, pH 7,4 (HU; CATCHMARK, 2011a).

Contudo, a terapia com peptídeos moduladores de fatores de crescimento ósseo adsorvidos nos biomateriais vem oferecer uma nova abordagem para aplicação cirúrgica a fim de melhorar a reparação óssea tanto em tempo de reparo quanto em qualidade do osso neoformado. Além disso, a principal indicação clínica destas membranas desenvolvidas é para regeneração óssea guiada.

5 CONCLUSÕES

Novos compósitos a base de celulose bacteriana, colágeno tipo I e hidroxiapatita foram desenvolvidos, bem como, conferindo a estes compósitos, propriedade osteoindutiva com a adsorção dos peptídeos OGP e OGP [10-14].

Com as caracterizações físico-químicas destes compósitos concluiu-se que:

- O protocolo desenvolvido para esterificação dos grupos hidroxilas da CB com resíduo de aminoácido Fmoc-Gly foi eficaz para posterior incorporação das moléculas de colágeno, pois padronizou-se a quantidade de colágeno incorporado as matrizes de CB.
- Os resultados indicam que síntese *in situ* da HA em baixa temperatura é uma rota eficaz para obtenção de nanocompósitos CB-HA, (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL com boa homogeneidade.
- Os compósitos (CB-COL)-HA e (CB-HA)-COL mostraram algumas características similares ao osso natural, como fases de composição, tamanho de cristais e cristalinidade de carbonato-apatita e HA deficiente em cálcio, respectivamente.
- Análise térmica revelou que a esterilização por radiação gama (20 kGy) não interferiu na estabilidade térmica dos materiais, portanto é um método eficiente para esterilização desses compósitos. Além disso, foi possível verificar que houve uma padronização do conteúdo incorporado aos compósitos tanto de apatita quanto de colágeno.
- Em geral, os peptídeos conferiram uma superfície mais hidrofóbica para a maioria das amostras, exceto para (CB-HA)-COL, e para CB-COL, cuja superfície se apresentou mais hidrofílica com adsorção de OGP e OGP [10-14], respectivamente.
- Os testes mecânicos revelaram que os novos compósitos desenvolvidos apresentaram grandes avanços nas propriedades mecânicas quando se utilizou colágeno e HA para confecção de membranas para regeneração óssea, pois a CB serviu como uma excelente matriz para incorporação do colágeno e da hidroxiapatita, principalmente em relação à quantidade de colágeno empregada.

- A liberação controlada do peptídeo OGP marcado com 5,6-carboxifluoresceína nas membranas ocorreu dentro 10 h; apesar do curto tempo de liberação, o peptídeo demonstrou uma ação osteoindutiva considerável.
- Nos estudos *in vitro* com cultura primária de células osteogênicas foi possível observar que as membranas do grupo CB e CB-COL promoveram uma maior taxa de proliferação celular, porém os compósitos CB-COL não favoreceram diferenciação celular num fenótipo osteogênico; bem como, os compósitos contendo HA, favoreceram um atraso na adesão, espraiamento e proliferação celular, contudo o compósito (CB-COL)-HA, com e sem peptídeos, apresentaram uma maior atividade de ALP, sugerindo que a carbonato-apatita influenciou numa melhor resposta desta enzima devido à menor quantidade de íons Ca^{2+} no material. Além disso, observou-se que os peptídeos OGP e OGP [10-14] influenciam na proliferação celular e o processo de mineralização dependendo do tipo do carreador. Contudo, estes peptídeos conferiram a estes compósitos e a CB propriedade osteoindutiva.
- No estudo *in vivo* observou-se que todos os compósitos desenvolvidos foram biocompatíveis e que o peptídeo OGP [10-14] promoveu densidade óssea ligeiramente maior para os defeitos ósseos tratados dentro de cada respectivo grupo de membrana. Dentre estes grupos, a membrana CB-HA OGP [10-14] foi que promoveu uma regeneração óssea mais eficiente aos 30 dias de pós-operatório com uma densidade óssea semelhante às outras membranas em 120 dias. Dessa forma, estas membranas desenvolvidas com peptídeo foram eficazes para regeneração óssea guiada para o modelo animal experimental proposto, promovendo a osteocondução e a osteoindução; além dos compósitos contendo HA serem bioativos.
- Com relação à reabsorção das membranas, espera-se que as mesmas se reabsorvam em um tempo superior a 120 dias. Porém, mais estudos precisam ser investigados para se obter uma conclusão mais precisa.

6 PERSPECTIVAS

Como proposta para estudos futuros, pode-se citar:

- Estudo *in vivo* com as membranas contendo peptídeo OGP empregando o mesmo protocolo cirúrgico, utilizado neste estudo, para melhor compreensão dos efeitos osteoindutivos deste peptídeo *in vivo*.
- Realizar um estudo experimental *in vivo* em tempos, intermediário (60 dias) e superior (180 dias) ao estudado neste trabalho, empregando o mesmo protocolo cirúrgico para que o modelo de regressão proposto seja melhor ajustado; desta forma podendo prever realmente em quanto tempo a celulose bacteriana se degradará.
- Encapsulamento dos peptídeos OGP e OGP [10-14] em vesículas poliméricas reabsorvíveis para melhorar a liberação dos mesmos nos sistemas *in vivo* consequentemente controlando a concentração liberada, na tentativa de se conseguir uma dose terapêutica diária ideal para potencializar os efeitos osteoindutores destes peptídeos.

Espera-se com esses estudos obter informações adicionais que permitam uma conclusão mais precisa de qual peptídeo é mais eficaz *in vivo*, além de melhorar a disponibilidade dos mesmos para os eventos osteogênicos.

REFERÊNCIAS

- AMADEI, S. U. et al. Influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- AMORIM, W. L. et al. Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngol**, v. 75, n. 2, p. 200-207, 2009.
- ANADA, T. et al. Dose-dependent osteogenic effect of octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 6, p. 965-978, 2008.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars Immunology**, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.
- ANDRADE, F. K. et al. Improving bacterial cellulose for blood vessel replacement: functionalization with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and an adhesion peptide. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 10, p. 4034-4041, 2010.
- ANJOS, B. dos. et al. Clinical comparison of cellulose and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of class II furcations in mandibular molars with 6-month re-entry. **Journal of Periodontology**, v. 69, n. 4, p. 454-459, 1998.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667-681, 2000.
- ANTONAKOS, A.; LIAROKAPIS, E.; LEVENTOURI, T. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. **Biomaterials**, v. 28, n. 19, p. 3043-3054, 2007.
- AOBA, T. et al. Enamel mineralization and an initial crystalline phase. **Connective Tissue Research**, v. 38, n. 1-4, p. 129-137, 1998.
- AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. Tokyo: JAAS, 1991.
- ASSOIAN, R. K. et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 11, p. 7155-7160, 1983.
- ATALLA, R. H.; VANDERHART, D. L. The role of solid state C-13 NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 15, n. 1, p. 1-19, 1999.
- BAB, I.; CHOREV, M. Osteogenic growth peptide: from concept to drug design. **Biopolymers**, v. 66, n. 1, p. 33-48, 2002.

BAB, I. A.; EINHORN, T. A. Polypeptide factors regulating osteogenesis and bone-marrow repair. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 55, n. 3, p. 358-365, 1994.

BAB, I. et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP) - a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. **Embo Journal**, v. 11, n. 5, p. 1867-1873, 1992.

BAB, I. et al. Role of the n-terminal and c-terminal regions and charge in the mitogenic action of the osteogenic growth peptide (OGP). **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 1178, n. 8, p. 227-227, 1993.

BAB, I. et al. Biosynthesis of osteogenic growth peptide via alternative translational initiation at AUG(85) of histone H4 mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 20, p. 14474-14481, 1999.

BACKDAHL, H. et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141-2149, 2006.

BARUD, H. S. et al. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 815-818, 2007.

BARUD, H. S. et al. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. **Thermochemica Acta**, v. 471, n. 1-2, p. 61-69, 2008.

BATISTA JUNIOR, E. L. et al. Use of bovine-derived anorganic bone associated with guided tissue regeneration in intrabony defects. Six-month evaluation at re-entry. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 9, p. 1000-1007, 1999.

BECKER, D. et al. Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 59, n. 3, p. 516-527, 2002.

BELLOWS, C. G.; AUBIN, J. E.; HEERSCHKE, J. N. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed *in vitro*: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. **Bone and Mineral**, v. 14, n. 1, p. 27-40, 1991.

BIELBY, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury**, v. 38, p. S26-32, 2007, Suppl. 1.

BIO FILL PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS (BRASIL). L. F. X. Farah. **Process for the preparation of cellulose film, cellulose film produced thereby artificial skin graft and its use**. US 4912049, 30 Sept. 1990, 10 June 1986.

BODEN, S. D. et al. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. **Spine**, v. 25, n. 3, p. 376-381, 2000.

BODEN, S. D. et al. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. **Spine**, v. 27, n. 23, p. 2662-2673, 2002.

BODHIBUKKANA, C. et al. Composite membrane of bacterially-derived cellulose and molecularly imprinted polymer for use as a transdermal enantioselective controlled-release system of racemic propranolol. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 1, p. 43-56, 2006.

BODIER-HOULLE, P. et al. First experimental evidence for human dentine crystal formation involving conversion of octacalcium phosphate to hydroxyapatite. **Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography**, v. 54, n. Pt 6 Pt 2, p. 1377-1381, 1998.

BODIN, A.; GUSTAFSSON, L.; GATENHOLM, P. Surface-engineered bacterial cellulose as template for crystallization of calcium phosphate. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 17, n. 4, p. 435-447, 2006.

BODIN, A. et al. Bacterial cellulose as a potential meniscus implant. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, n. 5, p. 406-408, 2007.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. **The Cleft Palate Craniofacial Journal**, v. 32, n. 4, p. 311-317, 1995.

BRAGER, M. A. et al. Osteogenic growth peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has local and systemic effects on fracture healing in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 18, n. 1, p. 133-139, 2000.

BROWN, R. M. Jr.; WILLISON, J. H. M.; RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 12, p. 4565-4569, 1976.

BROWN, W. E. Crystal growth of bone mineral. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 44, p. 205-220, 1966.

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clinical Orthopaedics Related Research**, v. 174, p. 28-42, 1983.

BURSTEIN, F. D. et al. Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction: experience in 150 patients. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 118, n. 2, p. 484-489, 2006.

CANNON, C. Z. et al. Evaluation of dosages and routes of administration of tramadol analgesia in rats using hot-plate and tail-flick tests. **Laboratory Animals**, v. 39, n. 11, p. 342-351, 2010.

- CAPORALI, E. H. et al. Assessment of bovine biomaterials containing bone morphogenetic proteins bound to absorbable hydroxyapatite in rabbit segmental bone defects. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 366-373, 2006.
- CARDOSO, G. B. C. et al. Scaffolds of poly(ϵ -caprolactone) with whiskers of hydroxyapatite. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 18, p. 4990-4993, 2010.
- CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 2000.
- CHARULATHA, V.; RAJARAM, A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. **Biomaterials**, v. 24, n. 5, p. 759-767, 2003.
- CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6565-6578, 2005.
- CHEN, H. et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85, n. 8, p. 1544-1552, 2003.
- CHEN, Y. C. et al. Structure-bioactivity of C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10-14)]. **Journal of Peptide Research**, v. 56, n. 3, p. 147-156, 2000.
- CHEN, Y. M. et al. *In vitro* cytotoxicity of bacterial cellulose scaffolds used for tissue-engineered bone. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 24, p. 137-145, 2009.
- CHEN, Z. X. et al. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. **Regulatory Peptides**, v. 142, n. 1-2, p. 16-23, 2007.
- CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L. Ceramics for medical applications: a picture for the next 20 years. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 7, p. 1245-1255, 2009.
- CHO, T. J.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 3, p. 513-520, 2002.
- CHO, Y. R.; GOSAIN, A. K. Biomaterials in craniofacial reconstruction. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 31, n. 3, p. 377-385, 2004.
- CIANCAGLINI, P. et al. Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 5, p. 603-610, 2006.

CONTANT, S.; LONA, L. L.; CALADO, V. M. A. Predição do comportamento térmico de tubos compósitos através de redes neurais. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 5, p. 295-300, 2004.

COÏC, M. et al. Mechanical properties of collagen membranes used in guided bone regeneration: a comparative study of three models. **Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale**, v. 111, n. 5-6, p. 286-290, 2010.

CROMME, P. et al. Biomimetic mineralisation of apatites on Ca²⁺ activated cellulose templates. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2007.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, n. 3-4, p. 403-411, 2004.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.

CZAJA, W. K. et al. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.

DANILCHENKO, S. N. et al. X-ray diffraction studies of bone apatite under acid demineralization. **Crystal Research and Technology**, v. 39, n. 1, p. 71-77, 2004.

DUER, M. J. The molecular glue binding organic matrix and mineral crystals in biominerals: basic amino acids may be as important as acidic ones. A perspective on the role of basic amino acids in the molecular recognition of hydroxyapatite by statherin using solid state NMR, by M. Ndao, JT Ash, P. Stayton, G. Drobny. **Surface Science**, v. 604, n. 15-16, p. 1237-1238, 2010.

DUSKOVA, M. et al. Guided tissue regeneration, barrier membranes and reconstruction of the cleft maxillary alveolus. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 6, p. 1153-1160, 2006.

DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A. et al. Irradiation as a safety procedure in tissue banking. **Cell and Tissue Banking**, v. 6, n. 3, p. 201-219, 2005.

EICHHORN, S. J. et al. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 1, p. 1-33, 2010.

EKHOLM, E. et al. Hydroxyapatite coating of cellulose sponge does not improve its osteogenic potency in rat bone. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 5, p. 535-544, 2005.

EPPLEY, B. L.; PIETRZAK, W. S.; BLANTON, M. W. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 6, p. 981-989, 2005.

EPSTEIN, N. E. Pros, cons, and costs of INFUSE in spinal surgery. **Surgical Neurology International**, v. 2, p. 10, 2011.

- FANG, B. et al. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells on hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposite scaffolds. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 5, p.1091-1098, 2009.
- FINK, H. et al. Bacterial cellulose modified with xyloglucan bearing the adhesion peptide RGD promotes endothelial cell adhesion and metabolism - a promising modification for vascular grafts. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 5, n. 6, p. 454-463, 2011.
- FONTANA, J. D. et al. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-25, p. 253-264,1990.
- FORTI, F. L. et al. 1,4-Dioxane enhances properties and biocompatibility of polyanionic collagen for tissue engineering applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, p. 1-12, 2011. In Press.
- GABET, Y. et al. Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 65-73, 2004.
- GAO, C. et al. Dynamic interaction between the growing Ca-P minerals and bacterial cellulose nanofibers during early biomineralization process. **Cellulose**, v. 17, n. 2, p. 365-373, 2010.
- GAVISH, H. et al. Human alpha(2)-macroglobulin is an osteogenic growth peptide-binding protein. **Biochemistry**, v. 36, n. 48, p. 14883-14888, 1997.
- GEYER, U. et al. Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16, n. 6, p. 343-347, 1994.
- GLASSMAN, S. D. et al. rhBMP-2 versus iliac crest bone graft for lumbar spine fusion: a randomized, controlled trial in patients over sixty years of age. **Spine**, v. 33, n. 26, p. 2843-2849, 2008.
- GOISSIS, G. et al. Anionic collagen: polymer composites with improved dielectric and rheological properties. **Artificial Organs**, v. 22, n. 3, p. 203-209, 1998.
- GRANDE, C. J. et al. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 5, p. 1605-1615, 2009.
- GREENBERG, Z. et al. Mitogenic action of osteogenic growth peptide (OGP) - role of amino and carboxy-terminal regions and charge. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1178, n. 3, p. 273-280, 1993.
- GREENBERG, Z. et al. Structural and functional-characterization of osteogenic growth peptide from human serum - identity with rat and mouse homologs. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, n. 8, p. 2330-2335, 1995.
- GREENBERG, Z. et al. Isolation of osteogenic growth peptide from osteoblastic MC3T3 E1 cell cultures and demonstration of osteogenic growth peptide binding proteins. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 359-367, 1997.

- GREGORY, C. A. et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77-84, 2004.
- GUREVITCH, O. et al. Osteogenic growth peptide increases blood and bone marrow cellularity and enhances engraftment of bone marrow transplants in mice. **Blood**, v. 88, n. 12, p. 4719-4724, 1996.
- HARTGERINK, J. D.; BENIASH, E.; STUPP, S. I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. **Science**, v. 294, n. 5547, p.1684-1688, 2001.
- HAYAKAWA, S.; OSAKA, A. Biomimetic deposition of calcium phosphates on oxides soaked in a simulated body fluid. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 263, p. 409-415, 2000.
- HELENIUS, G. et al. *In vivo* biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76A, n. 2, p. 431-438, 2006.
- HENCH, L. L. Bioceramics - from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
- HOEMANN, C. D.; EL-GABALAWY, H.; MCKEE, M. D. *In vitro* osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. **Pathologie- Biologie**, v. 57, n. 4, p.318-323, 2009.
- HOLLISTER, S. J. et al. Engineering craniofacial scaffolds. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 8, n. 3, p.162-173, 2005.
- HONDA, Y. et al. Formation of bone-like apatite enhanced by hydrolysis of octacalcium phosphate crystals deposited in collagen matrix. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 80, n. 2, p. 281-289, 2007.
- HONG, L. et al. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**, v. 60, n. 13-14, p. 1710-1713, 2006.
- HU, Y.; CATCHMARK, J. M. *In vitro* biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2835-2845, 2011a.
- HU, Y.; CATCHMARK, J. M. Integration of cellulases into bacterial cellulose: toward bioabsorbable cellulose composites. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 97, n. 1, p. 114-123, 2011b.
- HU, Y. et al. Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation *in vitro*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 64, n. 3, p. 583-590, 2003.
- HU, Y. Y. et al. Self-assembled calcium phosphate nanocomposites using block copolypeptide templates. **Soft Matter**, v. 5, n. 21, p. 4311-4320, 2009.

- HUI, Z. et al. C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide regulates hematopoiesis in early stage. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 101, n. 6, p. 1423-1429, 2007.
- HURZELER, M. B. et al. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. **The International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 27, n. 4, p. 315-320, 1998.
- HUTCHENS, S. A. et al. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4661-4670, 2006.
- HUTCHENS, S. A. et al. A resorbable calcium-deficient hydroxyapatite hydrogel composite for osseous regeneration. **Cellulose**, v. 16, n. 5, p. 887-898, 2009.
- JUNG, H. J. et al. Surface characteristics and fibroblast adhesion behavior of RGD-immobilized biodegradable PLLA films. **Macromolecular Research**, v. 13, n. 5, p. 446-452, 2005.
- JUNG, U. W. et al. The effect of varying the particle size of beta tricalcium phosphate carrier of recombinant human bone morphogenetic protein-4 on bone formation in rat calvarial defects. **Journal of Periodontology**, v. 77, n. 5, p. 765-772, 2006.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C. U. (Ed.). **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- JUODZBALYS, G.; RAUSTIA, A. M.; KUBILIUS, R. A 5-year follow-up study on one-stage implants inserted concomitantly with localized alveolar ridge augmentation. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 34, n. 10, p. 781-789, 2007.
- KAFLAK, A.; KOLODZIEJSKI, W. Kinetics H-1 -> P-31 NMR cross-polarization in bone apatite and its mineral standards. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 335-341, 2008.
- KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.
- KALASKAR, D. M. et al. Controlling cell morphology on amino acid-modified cellulose. **Soft Matter**, v. 4, n. 5, p. 1059-1065, 2008.
- KAMAKURA, S. et al. Octacalcium phosphate combined with collagen orthotopically enhances bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 79, n. 2, p. 210-217, 2006.
- KARSENTY, G. Transcriptional regulation of osteoblast differentiation during development. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. d834-837, 1998.

- KAY, S. A. et al. Guided bone regeneration: integration of a resorbable membrane and a bone graft material. **Practical Periodontics and Aesthetic Dentistry**, v. 9, n. 2, p. 185-194, 1997.
- KIM, T. I. et al. Biomimetic approach to dental implants. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 22, p. 2201-2211, 2008.
- KLEIN, M.; GLATZER, C. Individual CAD/CAM fabricated glass-bioceramic implants in reconstructive surgery of the bony orbital floor. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 2, p. 565-570, 2006.
- KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.
- KLEMM, D. et al. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603, 2001.
- KOKUBO, T. et al. Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 24, n. 6, p. 721-734, 1990.
- KVETON, J. F.; COELHO, D. H. Hydroxyapatite cement in temporal bone surgery: a 10 year experience. **Laryngoscope**, v. 114, n. 1, p. 33-37, 2004.
- LE GUEHENNEC, L.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G. A review of bioceramics and fibrin sealant. **European Cells & Materials**, v. 8, p. 1-10, 2004.
- LEE, J. J. et al. Nanofibrous membrane of collagen-polycaprolactone for cell growth and tissue regeneration. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 9, p. 1927-1935, 2009.
- LEGEROS, R. Z. **Calciun phosphates in oral biology and medicine**. Basel: Karger, 1991.
- LEONE, F. A.; CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M. Effect of calcium ions on rat osseous plate alkaline phosphatase activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 123-127, 1997.
- LI, H. et al. Nanostructural characteristics, mechanical properties, and osteoblast response of spark plasma sintered hydroxyapatite. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 82, n. 2, p. 296-303, 2007.
- LIAO, S. et al. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 26, n. 36, p. 7564-7571, 2005.
- LIAO, S. S. et al. Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: nano-HA/collagen/PLA composite. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 69, n. 2, p. 158-165, 2004.

- LIU, H.; WEBSTER, T. J. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**, v. 28, n.2, p. 354-369, 2006.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LUO, H. L. et al. Preparation and characterization of a novel COL/BC composite for potential tissue engineering scaffolds. **Materials Chemistry and Physics**, v. 110, n. 2-3, p. 193-196, 2008.
- LYNCH, M. P. et al. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. **Experimental Cell Research**, v. 216, n. 1, p. 35-45, 1995.
- MACEDO, N. L. de. et al. Evaluation of two membranes in guided bone tissue regeneration: histological study in rabbits. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 3, n. 8, p. 395-400, 2004.
- MARTSON, M. et al. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An *in vivo* subcutaneous study in the rat. **Biomaterials**, v. 20, n. 21, p. 1989-1995, 1999.
- MARX, R. E.; GARG, A. K. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. **Implant Dentistry**, v. 7, n. 4, p. 267-276, 1998.
- MASSIOT, D. et al. Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 40, p. 70-76, 2002.
- MAYALL, R. C. et al. Tratamento das úlceras tróficas dos membros com um novo substituto de pele. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 80, n. 4, p. 257-283, 1990.
- MELLO, L. R. et al. Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. **Journal of Neurosurgery**, v. 86, n. 1, p. 143-150, 1997.
- MELLO, L. R. et al. Uso de celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 59, n. 2B, p. 372-379, 2001.
- MENDES, P. N. et al. *In vivo* and *in vitro* evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, p. 12, 2009.
- MERCIER, I. et al. Interactions of human skin fibroblasts with monomeric or fibrillar collagens induce different organization of the cytoskeleton. **Experimental Cell Research**, v. 225, n. 2, p. 245-256, 1996.
- MISCH, C. E. **Implantes dentários contemporâneos**. 2. ed. São Paulo: Editora Santos, 2006.

- MIZUNO, M. et al. Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels *in vivo*. **Bone**, v. 20, n. 2, p. 101-117, 1997.
- MOREIRA, S. et al. BC nanofibres: *in vitro* study of genotoxicity and cell proliferation. **Toxicology Letters**, v.189, n. 3, p. 235-241, 2009.
- MOREJON-ALONSO, L.; CARRODEGUAS, R. G.; GARCIA-MENOCAL, J. A. Transformations in CDHA/OCP/beta-TCP scaffold during ageing in simulated body fluid at 36.5 degrees C. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 84, n. 2, p. 386-393, 2008.
- MORSE, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. **Journal of Dental Research**, v. 24, n. 3, p. 143-153, 1945.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. The three-dimensional structure of proteins. In: _____. (Ed.). **Lehninger: principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2005.
- NGE, T. T.; SUGIYAMA, J. Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 81, n. 1, p. 124-134, 2007.
- NOVAES JUNIOR, A. B.; NOVAES, A. B. Bone formation over a TiAl6V4 (IMZ) implant placed into an extraction socket in association with membrane therapy (Gengiflex). **Clinical Oral Implants Research**, v. 4, n. 2, p. 106-110, 1993.
- NOVAES JUNIOR, A. B.; NOVAES, A. B. Immediate implants placed into infected sites: a clinical report. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 10, n. 5, p. 609-613, 1995.
- NOVAES JUNIOR, A. B.; MORAES, N.; NOVAES, A. B. Uso do BioFill como membrana biológica no tratamento de lesão de furca com e sem a utilização de hidroxiapatita porosa. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 47, n. 5, p. 29-32, 1990.
- NWE, N.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. Selection of a biopolymer based on attachment, morphology and proliferation of fibroblast NIH/3T3 cells for the development of a biodegradable tissue regeneration template: Alginate, bacterial cellulose and gelatin. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 457-466, 2010.
- OLIVEIRA, P. T. de; NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 403-413, 2004.
- OLIVEIRA, P. T. de. et al. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, n. 5, p. 633-641, 2003.

- OLIVEIRA, P. T. de. et al. Enhancement of *in vitro* osteogenesis on titanium by chemically produced nanopopography. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 80, n. 3, p. 554-564, 2007.
- OLIVEIRA, P. T. de. et al. Effects of a mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 56, n. 7, p. 629-638, 2008.
- OLIVIER, V.; FAUCHEUX, N.; HARDOUIN, P. Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 18, p. 803-811, 2004.
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomaterais: fundamentos & aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- OZTURK, S. et al. Long-term outcomes of ultra-thin porous polyethylene implants used for reconstruction of orbital floor defects. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 6, p. 973-977, 2005.
- PANDA, R. N. et al. FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 64, n. 2, p. 193-199, 2003.
- PANG, E. K. et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 10, p. 1364-1370, 2004.
- PARK, S. N. et al. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. **Biomaterials**, v. 23, n. 4, p. 1205-1212, 2002.
- PEI, M. et al. Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 294, n. 1, p.149-154, 2002.
- PERCORARO, E. et al. Bacterial cellulose from *Gluconacetobacter xylinum*: preparation, properties and applications. In: BALGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Ed.). **Monomers, polymers composites and renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, 2008. v. 1, cap. 17, p. 369-383.
- REBELLO, C. et al. Bio-fill, um novo substituto de pele: nossa experiência. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 77, n. 6, p. 407-414, 1987.
- REIKERAS, O.; GUNDERSON, R. B. Long-term results of HA coated threaded versus HA coated hemispheric press fit cups: 287 hips followed for 11 to 16 years. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 126, n. 8, p. 503-508, 2006.

ROBINSON, D.; BAB, I.; NEVO, Z. Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 5, p. 690-696, 1995.

RODRIGUES, F. T.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Porcine skin as a source of biodegradable matrices: alkaline treatment and glutaraldehyde crosslinking. **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 92-97, 2010.

ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1671-1677, 2004.

ROTHWELL, W. P.; WAUGH, J. S.; YESINOWSKI, J. P. High-resolution variable-temperature P-31 NMR of solid calcium phosphates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 8, p. 2637-2643, 1980.

ROVERI, N. et al. Biologically inspired growth of hydroxyapatite nanocrystals inside self-assembled collagen fibers. **Materials Science & Engineering C: Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 23, n. 3, p. 441-446, 2003.

SALATA, L. A. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of e-PTFE and alkali-cellulose membranes for guided bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 12, n. 1, p. 62-68, 2001.

SASKA, S. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **International Journal of Biomaterials**, 2011. In Press.

SCHENZEL, K.; FISCHER, S.; BRENDLER, E. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. **Cellulose**, v. 12, n. 3, p. 223-231, 2005.

SEPULVEDA, P. et al. *In vivo* evaluation of hydroxyapatite foams. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 4, p. 587-592, 2002.

SHI, S. K. et al. Biomimetic mineralization synthesis of calcium-deficient carbonate-containing hydroxyapatite in a three-dimensional network of bacterial cellulose. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 285-290, 2009.

SHUQIANG, M. et al. Osteogenic growth peptide incorporated into PLGA scaffolds accelerates healing of segmental long bone defects in rabbits. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 61, n. 12, p. 1558-1560, 2008.

SIMONPIETRI, C. J. et al. Guided tissue regeneration associated with bovine-derived anorganic bone in mandibular class II furcation defects. 6-month results at re-entry. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 6, p. 904-911, 2000.

SINGH, K. et al. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as an adjunct in posterolateral lumbar spine fusion: a prospective CT-scan analysis at one and two years. **Journal of Spinal Disorders & Techniques**, v. 19, n. 6, p. 416-423, 2006.

SOCRATES, G. **Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts**. New York: John Wiley & Sons, 2001.

SONG, J. H.; KIM, H. E.; KIM, H. W. Collagen-apatite nanocomposite membranes for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 83, n. 1, p. 248-257, 2007.

SPREAFICO, A. et al. Osteogenic growth peptide effects on primary human osteoblast cultures: potential relevance for the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 4, p. 1007-1020, 2006.

STEPHEN, M. **Biomineralization: principles and concepts in biorganic materials chemistry**. New York: Oxford University Press, 2005.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D.; RB, M. **Solid phase peptide synthesis**. 2nd ed. New York: Pierce Chemical, 1984.

SUN, Y. Q.; ASHHURST, D. E. Osteogenic growth peptide enhances the rate of fracture healing in rabbits. **Cell Biology International**, v. 22, n. 4, p. 313-319, 1998.

SVENSSON, A. et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 419-431, 2005.

SZCZESNIAK, L.; RACHOCKI, A.; TRITT-GOC, J. Glass transition temperature and thermal decomposition of cellulose powder. **Cellulose**, v. 15, n. 3, p. 445-451, 2008.

TAGUCHI, Y. et al. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. **Biomaterials**, v. 26, n. 31, p. 6158-6166, 2005.

TAKAKUDA, K. et al. Guided bone regeneration with a bioabsorbable composite membrane. **Advances in Science and Technology**, v. 41, p. 213-221, 2003.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504-1508, 2000.

TENG, S. H. et al. Three-layered membranes of collagen/hydroxyapatite and chitosan for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 87, n. 1, p. 132-138, 2008.

THOMAZINI, A. H. A. **Desenvolvimento de estruturas porosas de polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) recobertas com apatitas para substituição e regeneração óssea**. 2009. 141 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

TSENG, Y. H.; MOU, C. Y.; CHAN, J. C. C. Solid-state NMR study of the transformation of octacalcium phosphate to hydroxyapatite: a mechanistic model for central dark line formation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 21, p. 6909-6918, 2006.

TSENG, Y. H. et al. High resolution P-31 NMR study of octacalcium phosphate. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 26, n. 2, p. 99-104, 2004.

TSENG, Y. H. et al. Characterization of the phosphate units in rat dentin by solid-state NMR spectroscopy. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 25, p. 6088-6094, 2007.

TSENG, Y. H. et al. Solid-state P-31 NMR study of the formation of hydroxyapatite in the presence of glutaric acid. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 330-334, 2008.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, v. 38, p. S11-S25, 2007. Suppl 1.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (BRASIL). A. M. M. Gaspar; C. M. Abdalla; S. J. L. Ribeiro; S. Saska; Y. Messaddeq. **Método de utilização da membrana de celulose bacteriana intra articular sobre superfície lesada de patela**. 10 Jun 2011. Depositada.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 698, p. 893-899, 1965.

VALLA, S. et al. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter-xylinum* - complementation of cellulose-negative mutants by the udpg pyrophosphorylase structural gene. **Molecular & General Genetics**, v. 217, n. 1, p. 26-30, 1989.

VANELLA, L. et al. HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. **Bone**, v. 46, n. 1, p. 236-243, 2010.

VEILLETTE, C. J.; MCKEE, M. D. Growth factors-BMPs, DBMs, and buffy coat products: are there any proven differences amongst them? **Injury**, v. 38, p. S38-S48, 2007. Suppl 1.

WAN, Y. Z. et al. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. **Materials Science & Engineering C: Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 27, n. 4, p. 855-864, 2007.

WAN, Y. Z. et al. Preparation and mineralization of three-dimensional carbon nanofibers from bacterial cellulose as potential scaffolds for bone tissue engineering. **Surface & Coatings Technology**, v. 205, n. 8-9, p. 2938-2946, 2011.

WANG, C. Y. et al. Nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactic acid) co-cultured with bone marrow stromal cells for repair of rabbit mandibular defect. **Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research**, v. 12, n. 49, p. 9762-9765, 2008.

WANG, J. et al. Nanocomposite prepared by immobilising gelatin and hydroxyapatite on bacterial cellulose nanofibres. **Micro & Nano Letters**, v. 6, n. 3, p. 133-136, 2011.

WEI, B.; YANG, G.; HONG, F. Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 533-538, 2011.

WIEGAND, C. et al. Protease and ROS activities influenced by a composite of bacterial cellulose and collagen type I *in vitro*. **Cellulose**, v. 13, n. 6, p. 689-696, 2006.

WILEY, J. H.; ATALLA, R. H. Band assignments in the raman spectra of celluloses. **Carbohydrate Research**, v. 160, p. 113-129, 1987.

WIPPERMANN, J. et al. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. **European Journal of Vascular Endovascular Surgery**, v. 37, n. 5, p. 592-596, 2009.

WOUK, A. F. P. F. et al. Membrana biológica (Biofill) - estudo comparativo com outros agentes promotores da cicatrização de pele em suínos: aspectos clínicos, histopatológicos e morfométricos. **Archives of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 31-37, 1998.

YU, H. et al. Effect of porosity and pore size on microstructures and mechanical properties of poly-epsilon-caprolactone- hydroxyapatite composites. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 86B, n. 2, p. 541-547, 2008.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. **Energy and Fuels**, v. 22, n. 1, p. 46-60, 2008.

YUNOKI, S. et al. Novel biomaterial from reinforced salmon collagen gel prepared by fibril formation and cross-linking. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 40-47, 2004.

YUNOKI, S. et al. Effect of collagen fibril formation on bioresorbability of hydroxyapatite/collagen composites. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 11, p. 2179-2183, 2007.

ZABOROWSKA, M. et al. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2540-2547, 2010.

ZHANG, L. J. et al. Hydroxyapatite/collagen composite materials formation in simulated body fluid environment. **Materials Letters**, v. 58, n. 5, p. 719-722, 2004.

ZHIJIANG, C.; GUANG, Y. Bacterial cellulose/collagen composite: characterization and first evaluation of cytocompatibility. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, n. 5, p. 2938-2944, 2011.

ZIMMERMANN, K. A. et al. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. **Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 31, n. 1, p. 43-49, 2011.



Designation: F 981 – 04

Standard Practice for Assessment of Compatibility of Biomaterials for Surgical Implants with Respect to Effect of Materials on Muscle and Bone¹

This standard is issued under the fixed designation F 981; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last approval. A superscript epsilon (ϵ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

1. Scope

1.1 This practice provides a series of experimental protocols for biological assays of tissue reaction to nonabsorbable biomaterials for surgical implants. It assesses the effects of the material on animal tissue in which it is implanted. The experimental protocol is not designed to provide a comprehensive assessment of the systemic toxicity, immune response, carcinogenicity, teratogenicity, or mutagenicity of the material since other standards deal with these issues. It applies only to materials with projected applications in humans where the materials will reside in bone or soft tissue in excess of 30 days and will remain unabsorbed. It is recommended that short-term assays, according to Practice F 763, first be performed. Applications in other organ systems or tissues may be inappropriate and are therefore excluded. Control materials will consist of any one of the metal alloys in Specifications F 67, F 75, F 90, F 136, F 138, or F 562, high purity dense aluminum oxide as described in Specification F 603, ultra high molecular weight polyethylene as stated in Specification F 648 or USP polyethylene negative control.

1.2 This practice is a combination of Practice F 361 – 80 and Practice F 469 – 78. The purpose, basic procedure, and method of evaluation of each type of material are similar; therefore, they have been combined.

1.3 *This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.*

2. Referenced Documents

2.1 ASTM Standards:²

F 67 Specification for Unalloyed Titanium for Surgical

Implant Applications (UNS R50250, UNS R50400, UNS R50550, UNS R50700)

F 75 Specification for Cobalt-28Chromium-6Molybdenum Alloy Castings and Casting Alloy for Surgical Implants (UNS R30075)

F 86 Practice for Surface Preparation and Marking of Metallic Surgical Implants

F 90 Specification for Wrought Cobalt20-Chromium15-Tungsten10-Nickel Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R30605)

F 136 Specification for Wrought Titanium-6Aluminum-4Vanadium ELI (Extra Low Interstitial) Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R56401)

F 138 Specification for Wrought-18Chromium-14Nickel-2.5Molybdenum Stainless Steel Bar and Wire for Surgical Implants (UNS S31673)

F 361 Practice for Assessment of Compatibility of Metallic Materials for Surgical Implants with Respect to Effect of Materials on Tissue³

F 469 Practice for Assessment of Compatibility of Nonporous Polymeric Materials for Surgical Implants with Regard to Effect of Materials on Tissue³

F 562 Specification for Wrought Cobalt-35Nickel-20Chromium-10Molybdenum Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R30035)

F 603 Specification for High-Purity Dense Aluminum Oxide for Surgical Implant Application

F 648 Specification for Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylene Powder and Fabricated Form for Surgical Implants

F 763 Practice for Short-Term Screening of Implant Materials

3. Summary of Practice

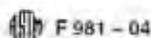
3.1 This practice describes the preparation of implants, the number of implants and test hosts, test sites, exposure schedule, implant sterilization techniques, and methods of implant retrieval and tissue examination of each test site. Histological criteria for evaluating tissue reaction are provided.

¹ This practice is under the jurisdiction of ASTM Committee F04 on Medical and Surgical Materials and Devices and is the direct responsibility of Subcommittee F04.16 on Biocompatibility Test Methods.

Current edition approved May 1, 2004. Published June 2004. Originally approved in 1986. Last previous edition approved in 2003 as F 981 – 99 (2003).

² For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, www.astm.org, or contact ASTM Customer Service at service@astm.org. For *Annual Book of ASTM Standards* volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

³ Withdrawn.



4. Significance and Use

4.1 This practice covers a test protocol for comparing the local tissue response evoked by biomaterials, from which medical implantable devices might ultimately be fabricated, with the local tissue response elicited by control materials currently accepted for the fabrication of surgical devices. The materials may include metals (and metal alloys), dense aluminum oxide, and polyethylene that are standardized on the basis of acceptable long-term well-characterized long-term response. The controls consistently produce cellular reaction and wound healing to a degree that has been found to be acceptable to the host.

5. Test Hosts and Sites

5.1 Rats (acceptable strains such as Fischer 344), New Zealand White rabbits, and other small laboratory animals may be used as test hosts for soft tissue implant response. It is suggested that the rats be age and sex matched. Rabbits or larger animals may be used as test hosts for bone implants. When larger animals such as dogs, goats, or sheep are used, the decision should be based upon special considerations of the particular implant material or study.

5.2 The sacro-spinalis, paralumbar, gluteal muscles, and the femur or tibia can serve as the test site for implants. However, the same site must be used for test and material implants in all the animal species.

5.3 There shall be a minimum of four animals at each sacrifice interval for a total of twelve animals per study. If larger animals are used, in which a greater number of implants can be placed, there shall be at least two animals sacrificed at each time period.

6. Implant Specimens

6.1 *Fabrication*—Each implant shall be made in a cylindrical shape with hemispherical ends (see 6.3 and 6.4 for sizes). If the ends are not hemispherical, this shall be reported. Each implant shall be fabricated, finished, and its surface cleaned in a manner appropriate for its projected application in human subjects in accordance with Practice F 86. If the specimens are porous, the method of preparation of the porous specimens shall be representative of the contemplated human implant application and shall yield a specimen with characteristic pore size, pore volume, and pore interconnection diameter. The choice between using solid core specimens with porous coatings and specimens that are porous throughout shall be a decision of the investigator and shall be reported.

6.2 Reference metallic specimens shall be fabricated in accordance with 6.1 from materials such as the metal alloys in Specifications F 67, F 75, F 90, F 139, or F 562, ceramic in Specification F 603, or polymers such as in Specification F 648 polyethylene or USP Negative Control Plastic. If the test materials are porous, consideration should be given to using porous specimens for reference specimens. Alternatively, non-porous reference specimens may be used.

6.3 *Suggested Sizes and Shapes of Implants for Insertion in Muscle*:

6.3.1 The implants shall be cylindrical in shape and may range from 1 mm to 6 mm in diameter and from 10 mm to 20 mm in length depending upon the relative size of the species under study.

6.3.2 The dimensions used shall be reported in accordance with 8.1.

6.3.3 Depending upon the particular device application, other sample shapes may be used. For instance, an investigator might wish to test the biocompatibility of a new material for screws in the form of a screw. If an alternative specimen shape is used, this should be reported in accordance with 5.1.

6.4 Sizes and Shapes of Implants for Insertion in Bone:

6.4.1 Implant diameters for use in bone shall be approximately equal to the cortex thickness. Implant lengths shall allow them to reside in one cortex and the medulla without excessive protrusion beyond the periosteum.

6.4.2 The dimensions used shall be reported in accordance with 8.1.

6.5 Number of Test and Control Implants:

6.5.1 In each rat, due to size, there may be two implants; one each test and control material implant.

6.5.2 In each rabbit, due to size, there may be six implants; four test materials and two control material implants.

6.5.3 In larger animals, there may be twelve implants; eight test materials and four control material implants.

6.5.4 In rabbits or larger animals, there shall be tested at least sixteen test material implants and eight control material implants at each time period.

6.6 Conditioning:

6.6.1 Remove all surface contaminants with appropriate solvents and rinse all test and control implants in distilled water prior to sterilization. It is recommended that the implant materials be processed and cleaned in the same way the final product will be.

6.6.2 Clean, package, and sterilize all implants in the same way as used for human implantation.

6.6.3 After final preparation and sterilization, handle the test and control implants with great care to ensure that they are not scratched, damaged, or contaminated in any way prior to insertion.

6.6.4 Report all details of conditioning in accordance with 8.1.

6.7 *Implantation Period*—Insert all implants into each animal at the same surgical session for implantation periods of 12, 26, and 52 weeks.

7. Procedure

7.1 Implantation (Muscle):

7.1.1 Place material implants in the paravertebral muscles in such a manner that they are directly in contact with muscle tissue.

7.1.2 Introduce material implants in larger animals by the technique of making an implantation site in the muscle by using a hemostat to separate the muscle fibers. Then insert the implant using plastic-tipped forceps or any tool that is non-abrasive to avoid damage to the implant.

 F 981 - 04

7.1.3 Introduce material implants using sterile technique. Sterile disposable needles or hypodermic tubing and trocar may be used to implant the material implants into the paravertebral muscles along the spine. In rats, insert a negative control implant on one side of the spine and a test material implant on the other side. In rabbits, implant one negative control material on each side of the spine and implant two test materials on each side of the spine. If larger diameter specimens are used, an alternative implantation technique is that described in 7.1.2.

7.2 *Implantation (Femur)*—Expose the lateral cortex of each rabbit femur and drill undersized pilot holes through the lateral cortex using the technique and instrument appropriate for the procedure. Final reaming of the holes should be performed by hand to yield holes which are smaller than the implant specimens by 0.1 mm or less. Into each one of these holes, insert one of the implants by finger pressure. Then close the wound.

Note 1—Caution should be taken to minimize the motion of the implant in the tissue to prevent the effects of motion on the desired result.

7.3 Postoperative Care

7.3.1 All animal studies must be done in a facility approved by a nationally recognized organization and in accordance with all appropriate regulations.

7.3.2 Carefully observe each animal during the period of assay and report any abnormal findings.

7.3.3 Infection or injury of the test implant site may invalidate the results. The decision to replace the animal so that the total number of retrieved implants will be as represented in the schedule shall be dependent upon the design of the study.

7.3.4 If an animal dies prior to the expected date of sacrifice, perform a necropsy in accordance with the procedure in 7.5 to determine the cause of death. Replacement of the animal to the study shall be dependent upon the design of the study. Include the animal in the assay of data if the cause of death is related to the procedure or test material.

7.4 Sacrifice and Implant Retrieval

7.4.1 Euthanize animals by a humane method at the intervals specified in 6.7.

Note 2—The necropsy periods start at 12 weeks because it is assumed that acceptable implant data has been received for earlier periods from short term implant testing according to Practice F 703. If the 90-day sacrifice period has been utilized under Practice F 703, that group need not be repeated under this protocol, and thus, the 12-week group may be eliminated.

7.4.2 At necropsy, record any gross abnormalities of color or consistency observed in the tissue surrounding the implant. Remove each implant with an intact envelope of surrounding tissue. Include in the tissue sample a minimum of a 4-mm thick layer of tissue surrounding the implant. If less than a 4-mm thick layer of tissue is removed, report in accordance with 8.1.

7.5 *Postmortem Observations*—In accordance with standard laboratory practice, perform a necropsy on all animals that are sacrificed for the purposes of the assay or die during the assay period. Establish the status of the health of the experimental animal during the period of the assay. Report as described in Section 8.

7.6 Histological Procedure

7.6.1 *Tissue Sample Preparation*—Prepare appropriate blocks from each implantation site and indicate the orientation of the axis of the femur relative to the axis of the implant (for bone implants). Also indicate the orientation of the implant relative to the axis of rotation of the femoral condyles.

7.6.1.1 Process the excised tissue block containing either a test implant or control implant for histopathological examination and such other studies as are appropriate. Cut the sample midway from end to end into appropriate size and in the appropriate orientation for each study. Transfer, or record, or both, the orientational details noted in 7.6.1 to each part of the sample. Record the gross appearance of the implant and the tissue. If the sample is porous, it is imperative that sectioning procedures be used that maintain the implant within its tissue envelope to allow the evaluation of tissue within the pores. Such procedures may include ground section preparation.

7.6.1.2 If special stains are deemed necessary, prepare additional sections and make appropriate observations.

7.7 *Histopathological Observations*—Compare the amount of tissue reaction adjacent to the test implant to that adjacent to a similar location and orientation on the control implant with respect to thickness of scar, presence of inflammatory or other cell types, presence of particles, and such other indications of interaction of tissue and material as might occur with the actual material under test. A suggested method for the evaluation of tissue response after implantation is Turner, et al. (1)⁴. If a porous sample is being tested, the evaluation of the tissue reaction must include areas within the pores of the test and control samples at similar locations.

7.7.1 Suggested Method for Tissue Response Evaluation

7.7.1.1 A suggested format with tissue response and cell accumulation to be evaluated and a scoring range of 0 to 3 is shown in Table 1.

TABLE 1 Suggested Evaluation Format and Scoring Range

Animal Number	0	1	2	3
Location of Implant (week)				
Sample Description				
Gross Response				
Histopathological				
Score				
Neovasc.				
Degeneration				
Inflammation				
Polymorphonuclear				
Lymphocytes				
Eosinophils				
Plasma Cells				
Macrophages				
Fibrosis				
Dead Cells				
Foreign Body Debris				
Fatty Infiltration				
Relative Size of				
Involved Area in mm				
Histopathologic Severity Rating				

⁴ The cell count numbers in parentheses refer to the list of references at the end of this standard.

 F 981 – 04

7.7.1.2 The scoring system of 0 to 3 is based upon the observation of high power fields (400-500X) and an average of five fields.

Tissue Response/Cell Accumulation	Score
0	0
1-5	0.5
6-10	1
11-20	2
25 or more	3

7.7.1.3 The necrosis and/or degeneration score is determined using the same range of 0 to 3, as follows:

Degree	Score
No reaction	0
Very slight reaction	0.5
Mild reaction	1
Moderate reaction	2
Marked reaction	3

7.7.1.4 An overall rating of test samples may be given using a rating range of 0 to 4, as follows:

Rating	Score
No reaction	0
Very slight reaction	1
Mild reaction	2
Moderate reaction	3
Marked reaction	4

7.7.1.4.1 Pathologists may choose to use the scoring system of comparing the negative control to the test material as an aid in their evaluation. The overall reaction to the test material as compared to the negative control is to be evaluated independently for all time periods.

7.7.2 *Suggested Criteria for Comparing Responses to Test and Control Specimens*—In discussing and reporting the re-

sults of this testing, a test article may be reported as having satisfied the requirements of this test if the response of tissues surrounding the test article is not significantly greater than that for the control specimen.

8. Report

8.1 Report the following information:

8.1.1 All details of implant characterization, fabrication, conditioning (including cleaning, handling, and sterilization techniques employed). For porous implants, a measure of the porosity and pore interconnection diameters shall have been measured and reported.

8.1.2 Procedures for implantation and implant retrieval.

8.1.3 Details of any special procedure (such as unusual or unique diet fed to test animals).

8.1.4 The observations of each control and test implant as well as the gross appearance of the surrounding tissue in which the implants were implanted.

8.1.5 The observation of each histopathological examination including a descriptive pathology narration and the pathologist's evaluation as to the reaction to the test material provided.

9. Keywords

9.1 biocompatibility; bone implant materials; cellular reaction; histology/histopathology; implants—muscle; New Zealand rabbits; orthopaedic medical devices—bone; plastic surgical devices/applications; polyethylene (PE)—surgical implant applications; rabbits; rats; scar; test animals; tissue compatibility; tissue response evaluation

APPENDIX

(Nonmandatory Information)

XI. RATIONALE FOR PRACTICE F981

X1.1 This practice is based on the research techniques utilized by Cohen (2), and by Laing, Ferguson, and Hodge (3, 4) in the early 1960's. These studies involved the implantation of metal cylinders in paravertebral muscle of rabbits. The biological reaction to the cylinders was described as the thickness of the fibrous membrane or capsule formed adjacent to the implant. The thickness of the capsule and the presence of inflammatory cells was used as a measure of the degree of adverse reaction to the test material.

X1.2 As first published in 1972, Practice F 361 was a test for the biological response to metallic materials. The scope had been expanded beyond that of the published reports to include bone as well as muscle as an implant test site. To avoid species specific reactions, the method called for the use of rats and dogs as well as rabbits. Cylindrical test specimens with rounded ends were used to avoid biological reactions associated with sharp corners or other variations in specimen shape.

X1.3 In 1978, Practice F 469 was published as a parallel document for the test of polymeric materials. In that the

methods were essentially the same, the scope of Practice F 361 has been expanded to include the testing of specimens made of metallic, polymeric or ceramic materials, thereby including and superseding Practice F 469.

X1.4 Stainless steel, cobalt chromium, and titanium alloys are used as reference materials since the biological response to these materials has been well characterized by their extensive use in research. The response to these materials is not defined as compatible, but rather the response is used as a reference against which reactions to other materials are compared.

X1.5 This practice is a modification of the original Practice F 361 in that it only involves long term test periods. The short term response to materials is to be evaluated using Practice F 763.

X1.6 This practice was revised in 1987 to allow for alternative specimen dimensions for rats and rabbits for muscle implantation. The original specimen dimensions were intended to be implanted through a needle, which was a change from

 F 981 – 04

Practice F 501 and Practice F 469. The alternate dimensions restore those specified since 1972, which some members felt were more appropriate for some material types.

X1.7 This practice was revised in 1990 to add a ceramic material (Specification F 603) as a reference material when testing ceramics.

X1.8 In 1991, this practice was revised to add the testing of porous materials to the scope of the practice. Previously, the committee had been unable to achieve consensus on the appropriate modifications to the technique to allow the testing of porous materials.

X1.9 This practice is based upon over 50 years of published

experience in the use of these techniques for the evaluation of the response of tissue to implant materials. In revision, there was discussion of the appropriate length of a long term study. Comments received suggested that one or two year studies were excessive. It was the decision of the task force that the one year sacrifice interval would be maintained but that the two year interval for larger animals could be removed.

X1.10 The revision of this document in 1992 removed all reference to the use of the canine for these studies to encourage the use of rats and rabbits when practical. Larger animals such as dogs, goats, and sheep may be utilized when found to be appropriate by the investigator.

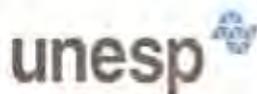
REFERENCES

- (1) Turner, J. E., Lawrence, W. H., and Austin, J., "Subacute Toxicity Testing of Biomaterials using Histopathologic Evaluation of Rabbit Muscle Tissue," *Journal Biomedical Material Research*, Vol. 7, No. 39, 1973.
- (2) Cohen, I., "Assay of Foreign-Body Reaction," *Journal of Bone and Joint Surgery*, No. 41A, 1959, pp. 152-166.
- (3) Ferguson, A. B., Jr., Laing, P. G., and Hodge, E. S., "The Localization of Metal Implants in Living Tissues," *Journal of Bone and Joint Surgery*, No. 42A, 1960, pp. 77-90.
- (4) Laing, P. G., Ferguson, A. B., Jr., and Hodge, E. S., "Tissue Reaction in Rabbit Muscle Exposed to Metallic Implants," *Journal Biomedical Material Research*, No. 1, 1967, pp. 135-149.

ASTM International takes no position respecting the validity of any patent rights asserted in connection with any item mentioned in this standard. Users of this standard are expressly advised that determination of the validity of any such patent rights, and the risk of infringement of such rights, are entirely their own responsibility.

This standard is subject to revision at any time by the responsible technical committee and must be reviewed every five years and if not revised, either reapproved or withdrawn. Your comments are invited either for revision of this standard or for additional standards and should be addressed to ASTM International Headquarters. Your comments will receive careful consideration at a meeting of the responsible technical committee, which you may attend. If you feel that your comments have not received a fair hearing you should make your views known to the ASTM Committee on Standards, at the address shown below.

This standard is copyrighted by ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19028-2899, United States. Individual reprints (single or multiple copies) of this standard may be obtained by contacting ASTM at the above address or at 610-832-4545 (phone), 610-832-4555 (fax), or service@astm.org (e-mail); or through the ASTM website (www.astm.org).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 18/2010

Interessado: SYBELE SASKA

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Projeto: Materiais compósitos orgânicos-inorgânicos com fatores de crescimento OGP e OGP (10-14) para regeneração óssea

Parecer nº 35/2010 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Materiais compósitos orgânicos-inorgânicos com fatores de crescimento OGP e OGP (10-14) para regeneração óssea" estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em março de 2011.

Araraquara, 22 de setembro de 2010.

Prof.ª Dr.ª AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP