

FELIPE AZEVEDO BORGES

APLICAÇÃO DA MEMBRANA DE LÁTEX NATURAL (NRL)
COMO SUPORTE PARA CULTURA DAS CÉLULAS
OSTEOGÊNICAS MC3T3-E1 PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA
GUIADA (GBR)

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano
Co-orientadora: Profa. Dra. Karina Alves de Toledo

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

B732a Borges, Felipe Azevedo
Aplicação da membrana de látex natural (NRL) como suporte para cultura das células osteogênicas MC3T3-E1 para regeneração óssea guiada (GBR) : / Felipe Azevedo Borges. – Araraquara : [s.n], 2015
80 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano

Coorientador: Karina Alves de Toledo

1. Látex . 2. Porosidade. 3. Seringueira. 4. Biocompatibilidade.
5. Regeneração óssea guiada . I. Título.

DADOS CURRICULARES

1. Formação acadêmica

Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas. Trabalho de conclusão de curso: “Liberação do extrato de *Casearia sylvestris* Sw. usando membrana de látex natural como carreador”, no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras de Assis-UNESP. Orientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano.

Mestrado em Biotecnologia. Dissertação: “Aplicação da membrana de látex natural (NRL) para cultura de células osteogênicas”, no curso de pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química – UNESP. Orientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano.

2. Bolsas recebidas

Bolsa FAPESP de Iniciação Científica (concluída) (Processo 1208007-1)

Bolsa CAPES de Mestrado (em andamento)

3. Trabalhos publicados em periódicos indexados

HERCULANO, R. D.; BRUNELLO, C. A.; MARTINS, M.; MELO, J. P.; BORGES, F. A.; CHIAVACCI, L.; GRAEFF, C. F. O. Novel solid state nitric oxide sensor using siloxane-poly(oxypropylene) (PPO). **Materials Sciences and Applications**, v. 4, n. 11, p. 683-688, 2013.

BORGES, F. A.; BOLOGNESI, L. F. C.; TRECCO, A.; DRAGO, B. C.; ARRUDA, L. B.; LISBOA-FILHO, P. N.; MIRANDA, M. C. R.; PERRI, E. G.; GRAEFF, C. F. O.; SANTOS, A. G.; HERCULANO, R. D. Natural rubber latex: study of a novel carrier for *Casearia sylvestris* Swartz delivery. **ISRN Polymer Science**, v. 2014, 2014. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2014/241297>

MURBACH, H. D.; OGAWA, G. J.; BORGES, F. A.; CINMAN, J. L. F.; DRAGO, B.C.; MIRANDA, M. C. R.; LOPES, R.; MAZALLI, A.; SILVA, R. G.; BARROS, N. R.; HERCULANO, R.D. Ciprofloxacin release using natural rubber latex membranes as carrier. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, 2014. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2014/157952>

TRECCO, A.; BORGES, F. A.; CHIN, C. M.; PERRI, E. G.; SANTOS, A. G.; HERCULANO, R. D. Liberação de componentes do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando membranas de látex natural como suporte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 89-95, 2014.

AIELO, P. B.; BORGES, F. A.; ROMEIRA, K. M.; MIRANDA, M. C. R.; ARRUDA, L. B.; LISBOA-FILHO, P. N.; DRAGO, B. C.; HERCULANO, R. D. Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. **Materials Research**, v. 17, n.1, p. 146-152, 2014.

4. Trabalhos publicados em periódicos não indexados

BORGES, F. A.; TRECCO, A.; MIRANDA, M. C. R.; BARROS, N. R.; PERRI, E. G.; SANTOS, A. G.; HERCULANO, R. D. *Casearia sylvestris* Swartz extract release using natural rubber latex biomembranes as carrier. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 12, p. 1420-1430, 2014.

BOLOGNESI, L. F. C.; BORGES, F. A.; SANTOS, A. G.; HERCULANO, R. D. Natural latex films as carrier for *Casearia sylvestris* Swartz extract associated with ciprofloxacin. **American Chemical Science Journal**, v. 5, n. 1, p. 17-25, 2015.

5. Trabalhos apresentados em congressos internacionais

Aielo, PB; Borges, FA; Miranda, MCR; Herculano, RD. Characterization and evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as scaffold. 2014. 8th Congresso Latino Americano de Engenharia de Órgão Artificiais, Biomateriais e Engenharia de Tecidos (COLAOB).

Herculano, RD; Brunello, CA; Melo-Jr, JP; Martins, M; Borges, FA; Miranda, MCR; Chiavacci, LA; Graeff, CFO. Development of a novel solid state nitric oxide sensor using siloxane-poly(oxypropylene) (PPO) as matrix. 2014. 8th Congresso Latino Americano de Engenharia de Órgão Artificiais, Biomateriais e Engenharia de Tecidos (COLAOB).

Miranda, MCR; Borges, FA; Barros, NR; Mendonça, RJ; Herculano, RD; Cilli, EM. Study of controlled release of peptide $\alpha 1$ hylina using natural rubber latex biomembrane as scaffold. 2014. 8th Congresso Latino Americano de Engenharia de Órgão Artificiais, Biomateriais e Engenharia de Tecidos (COLAOB).

Borges, FA; Giuliano, CB; Miranda, MCR; Toledo, KA; Herculano, RD. Citotoxicity evaluation of micro-/nano- maghemite particles in mc3t3-e1. 2014. 8th Congresso Latino Americano de Engenharia de Órgão Artificiais, Biomateriais e Engenharia de Tecidos (COLAOB).

6. Trabalhos apresentados em congressos nacionais

Romeira, KM; Borges, FA; Barros, NR; Cinman, JLF; Silva, RG; Herculano, RD. Evaluation of physical/chemical and mechanical properties of natural latex biomembranes with vegetable extract, 2014. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica.

Carvalho, FA; Braga, EE; Borges, FA; Herculano, RD; Santos, AG. Caracterização físico-química de membranas de látex natural incorporadas com extrato e fração de *Casearia sylvestris* Sw. 2014. XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.

Garms, BC; Marcelino, MY; Borges, FA; Fuoco, NL; Herculano, RD; Paes, JTR. Avaliação da resistência mecânica da membrana de látex natural com e sem

polilisina como suporte para crescimento celular. 2013. 16º ENBM (Encontro Nacional de Biomedicina).

Borges, FA; Romeira, KM; Bolognesi, LFC; Santos, AG; Pierri, EG; Herculano, RD. Influência da temperatura na liberação de fenóis totais de *C. sylvestris* usando biomembrana de látex natural como carreador. 2013. 12º CBPOL (Congresso Brasileiro de Polímeros).

Bolognesi, LFC; Santos, AG; Pierri, EG; Borges, FA; Sato, NC; Herculano, RD. Caracterização da liberação sustentada do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz associado à ciprofloxacina empregando películas de látex natural como carreador. 2013. 12º CBPOL (Congresso Brasileiro de Polímeros).

Miranda, KM; Pereira, GS; Drago, BC; Borges, FA; Bolognesi, LFC; Herculano, RD. Análise fitoquímica do extrato de *Striphnodendron* sp. empregando membrana de látex natural. 2013. III Congresso Farmacêutico da UNESP.

Bolognesi, LFC; Miranda, KM; Santos, AG; Pierri, EG; Borges, FA; Herculano, RD. Characterization of the sustained release for de *C. sylvestris* Swartz extract associated with ciprofloxacin employing natural latex films as a carrier. 2013. III Congresso Farmacêutico da UNESP.

Borges, FA; Bolognesi, LFC; Miranda, KM; Pierri, EG; Santos, AG; Herculano, RD. Identificação de fenóis totais da liberação de *Casearia sylvestris* em diferentes temperaturas usando biomembrana de látex natural como carreador. 2013. III Congresso Farmacêutico da UNESP

Romeira, KM; Borges, FA; Drago, BC; Bolognesi, LFC; Herculano, RD. Phytochemical analysis of *Stryphnodendron* sp. extract incorporated in natural rubber latex (nrl). 2013. XII Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais (SBPMat).

Borges, FA; Bolognesi, LFC; Romeira, KM; Pierri, EG; Santos, AG; Herculano, RD. Temperature influence in the extract release of *Casearia sylvestris* using NRL biomembrane. 2013. XII Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais (SBPMat).

Bolognesi, LFC; Herculano, RD; Santos, AG; Pierri, EG; Borges, FA; Sato, NC; Romeira, KM. Characterization of the sustained release for the *C. sylvestris* Swartz extract associated with ciprofloxacin employing natural latex films as a carrier. 2013. XII Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais (SBPMat).

Romeira, KM; Borges, FA; Drago, BC; da Silva, RMG; Herculano, RD. Avaliação da liberação do extrato de *Sstryphnodendron* sp. Empregando membrana de látex natural como carreador para tratamento de dermatites. 2012. VI Simpósio Ibero-Americano de Plantas Medicinais.

Borges, FA; Trecco, A; Romeira, KM; dos Santos, AG; Chin, CM; Pierri, EG; Herculano, RD. Liberação do extrato de *Casearia sylvestris* Sw. Utilizando biomembrana de látex natural como carreador. 2012. VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais.

Borges, FA; Trecco, A; Lofredo, AV; Aiello, PB; Chin, CM; Santos, AG; Pierri, EG; Herculano, RD. *Casearia sylvestris* Swartz release using natural rubber latex biomembranes as carrier. 2012. XI Encontro da Sociedade Brasileira de Polímeros e Materiais (SBPMat).

Borges, FA; Schimidt, RS; Trecco, A; Silva, RMG; Herculano, RD. Evaluation of potassium diclofenac release using natural rubber hancornia speciosa biomembranes as carrier. 2012. XI Encontro da Sociedade Brasileira de Polímeros e Materiais (SBPMat).

Borges, FA; Trecco, A; Chin, CM; dos Santos, AG; Herculano, RD. Liberação do extrato de *Casearia sylvestris* Sw. usando biomembrana de látex natural como carreador. 2012. XXIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP.

Trecco, A; Borges, FA; Chin, CM; Santos, AG; Herculano, RD. Avaliação da liberação carregada do extrato de *Casearia sylvestris* por biomembranas de látex natural em diferentes pHs. 2012. XXIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP.

Borges, FA; Herculano, RD. Liberação sustentada do extrato de *Casearia sylvestris* Sw. empregando biomembranas de látex como suporte. 2012. Farmácia e Cosméticos: Inovações biotecnológicas na farmacologia e biotecnologia.

Trecco, A; Borges, FA; Santos, AG; Chin, CM; Pierri, EG; Herculano, RD. Avaliação da liberação carregada do extrato de *Casearia sylvestris* por biomembranas de látex natural em diferentes pHs. 2012. Jornada Farmacêutica da UNESP.

Borges, FA; Herculano, RD. Análise da incorporação e liberação do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando biomembrana de látex como suporte. 2012. Semana Científica da Biologia.

Borges, FA; Trecco, A; dos Santos, AG; Chin, CM; Pierri, EG; Herculano, RD. Liberação do extrato de *Casearia sylvestris* Sw. utilizando biomembrana de látex natural como carreador. 2012. Jornada Farmacêutica da UNESP.

Borges, FA; Trecco, A; Loffredo, AV; Aiello, PB; Chin, CM; Santos, AG; Pierri, EG; Herculano, RD. *Casearia sylvestris* Swartz release using natural latex biomembrane as carrier. 2012. XX Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais.

Ogawa, GJ; Baggio, LO; Sericaku, HF; Sato, NC; Aiello, PB; Borges, FA; Trecco, A; Lofredo, AV; Drago, BC; Herculano, RD. Avaliação da liberação controlada do ciprofloxacino empregando biomembranas de látex natural como carreador. 2012. XX Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais.

Aiello, PB; Borges, FA; Trecco, A; Lofredo, AV; Herculano, RD. Evaluation of diclofenac sodium release using natural rubber latex membrane as carrier for treatment of tendinitis. 2012. XX Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais.

Loffredo, AV; Aiello, PB; Trecco, A; Borges, FA; Herculano, RD. A evaluation of the biodegradation of NRL membrane using simulated body fluid. 2012. XX Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais.

7. Estágios extracurriculares e outras atividades profissionais

Monitoria no XXIV CIC – Congresso de Iniciação Científica da UNESP

Avaliador no evento XI EEBBA (Encontro de Engenharia Biotecnológica e Biociências de Assis)

8. Prêmios/Menção Honrosa

Prêmio de melhor painel da área (Biomateriais metálicos, materiais nanoestruturados, recobrimentos, biomemética e microencapsulamento), 8th Congresso Latino Americano de Engenharia de Órgão Artificiais, Biomateriais e Engenharia de Tecidos (COLAOB).

Menção honrosa na área de Química de Produtos Naturais, XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.

Menção honrosa no XIII Prêmio Carlos Roberto de Iniciação Científica, 16º ENBM (Encontro Nacional de Biomedicina).

1º Lugar em Apresentação de Painel, Biotec Júnior da UNESP Assis.

9. Artigos submetidos

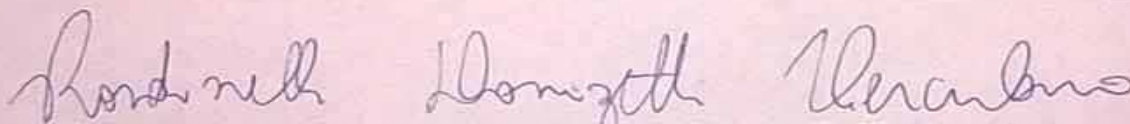
Borges, FA; Siguematsu, PR; Herculano, RD; Santos, C. Novel sustained-release of *Stryphnodendron obovatum* leaves extract using natural rubber latex as carrier. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.

FELIPE AZEVEDO BORGES


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

Araraquara, 27 de fevereiro de 2015.


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO (Orientador)
Faculdade de Ciências e Letras / UNESP / Assis – SP.



Prof.^a Dr.^a PATRÍCIA TARGON CAMPANA
Escolas de Artes e Humanidades / USP / São Paulo – SP.



Prof. Dr. RICARDO JOSÉ DE MENDONÇA
Universidade do Triângulo Mineiro / UFTM / Uberaba – MG.

**À minha família, em
especial minha avó
Maria Olinda, a quem
dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano por todo suporte, possibilidade de crescimento e à minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Karina Alves de Toledo, não só pela disposição em me orientar neste trabalho, mas também aos conhecimentos transmitidos, dúvidas tiradas, conselhos, dicas, debates, etc, em fim, todo o aprendizado.

À CAPES e à PROAP, pelo apoio financeiro.

Aos técnicos da UNESP campus de Assis José Gilberto Milani, Maria Amabile Sanches e Allan Chiea de Souza pelo apoio técnico e amizade. Ao Rodrigo Ferreira Silva da USP de Ribeirão, pela técnica de MEV-EDS e pela paciência e tempo em me explicar e mostrar a técnica. Ao Prof. Dr. Eutimio Gustavo Fernández Núñez pelas conversas, dúvidas tiradas e disposição para ajudar.

Aos meus pais Fátima e Antônio, minha tia Ana Lúcia e minha avó Maria Olinda, pelo suporte, apoio e compreensão quanto à minha distância. À Mayte, minha amiga e irmã de coração, e toda sua família.

Aos companheiros da república Balaio de Gato, em Araraquara, pela amizade, ajuda, torcida e comemorações, e por cuidar do Together durante minha ausência. Aos companheiros de república em Assis e aos amigos, que embora agora longe, não ficaram distantes.

Aos amigos dentro e fora do laboratório, Bruna, Karoline, Monica, Natalia, Bruno, Matheus e Natan.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.

RESUMO

O látex natural (NRL) extraído da árvore seringueira *Hevea brasiliensis* é um sistema coloidal composto pelo polímero *cis*-1,4-poliisopreno. Quando centrifugado ocorre a separação das proteínas relacionadas às reações alérgicas, porém permanecem as proteínas relacionadas à atividade angiogênica que este material tem apresentado. Suas aplicações biológicas têm crescido devido à atividade angiogênica e por apresentar baixo custo e fácil processamento. Dentre suas aplicações pode-se citar a liberação de compostos ativos (fármacos, extratos, nanopartículas, entre outros), uso como emplasto (acelerando a cicatrização de úlceras crônicas), prótese vascular, etc. Também tem sido utilizada como barreira mecânica na regeneração óssea guiada (GBR), mostrando-se eficiente e acelerando a cicatrização óssea. Desta forma, este trabalho se baseou em testar a citotoxicidade das membranas de látex natural; produzir membranas com diferentes porosidades; avaliar a adesão de pré-osteoblastos; testar a mineralização celular na membrana com maior porosidade. A citotoxicidade foi avaliada segundo a norma técnica ISO 10993-5 (pelo teste de extração do material); as membranas foram elaboradas segundo a técnica de separação de fases induzida termicamente (TIPS) a fim de proporcionar porosidade nas membranas e caracterizadas por microscópio eletrônico de varredura com energia dispersiva de raio-X (MEV-EDS), espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR) e resistência a tração; a adesão e morfologia celular da célula MC3T3-E1 subclone 14 foi avaliada pelo MEV e microscopia óptica; a mineralização foi avaliada por MTT, MEV-EDS, FTIR-ATR, vermelho de alizarina S, von Kossa e fosfatase alcalina. A membrana foi tóxica para o extrato na concentração de 100%, porém nas concentrações abaixo de 80% já não apresentava toxicidade. Todas as membranas continham irregularidades em sua superfície, apresentando porosidade apenas as produzidas a -10°C e -20°C, sendo esta última com poros maiores e a testada na mineralização. Por FTIR-ATR não apresentou alteração nos grupos funcionais do látex devido ao processamento, e a resistência mecânica mostrou um comportamento típico de um elastômero (com alongamento superior a 1000% e módulo de Young baixo), porém com diferenças na tensão de ruptura (valores inferiores para as membranas polimerizadas abaixo de 0°C). O MEV-EDS mostrou adesão celular e produção de matriz extracelular (MEC) em todas as membranas. A mineralização na membrana produzida a -20°C foi confirmada por todas as técnicas. Os resultados indicam que membrana de látex natural permite adesão, proliferação e mineralização celular, sendo viável seu uso como suporte celular no uso em regeneração óssea guiada.

Palavras-chave: Membrana de látex natural. Separação de fases induzida termicamente (TIPS). MC3T3. Biomaterial. Mineralização. Regeneração óssea guiada (GBR). Biocompatibilidade. *Hevea brasiliensis*. Suporte celular. Bioengenharia tecidual. Medicina regenerativa.

ABSTRACT

The natural rubber latex (NRL) extracted from the rubber tree *Hevea brasiliensis* is a colloidal system composed of *cis*-1,4-polyisoprene polymer. The centrifugation separates the proteins related to allergic reactions, preserving the proteins related to angiogenic activity presented by this material. Their biological applications have grown due to the angiogenic activity and due to its low cost and easy handling. Among its applications, one can mention the release of active compounds (drugs, extracts, nanoparticles, etc.), use as a wound dressing (accelerating the healing of chronic ulcers), vascular prosthesis, etc. It has also been used as a mechanical barrier in guided bone regeneration (GBR), being efficient and accelerating bone healing. Thus, this work aimed a cytotoxicity test of natural rubber latex membrane; producing membranes with different porosities; and assess the adherence of pre-osteoblasts; a mineralization test in the membrane with higher porosity. Cytotoxicity was tested according to the standard ISO 10993-5; the membranes were produced by thermally induced phase separation (TIPS) to provide porosity in the membranes and characterized by scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray (SEM-EDS), infrared spectroscopy (FTIR-ATR) and tensile strength; cell adhesion and morphology of MC3T3-E1 cell subclone 14 was evaluated by SEM-EDS and optical microscopy; mineralization was assessed by MTT, SEM-EDS, FTIR-ATR, alizarin red S, von Kossa staining, and alkaline phosphatase. The membrane was toxic to extract at concentration of 100%, but at concentration lower than 80% no longer showed toxicity. All membranes presented irregularities on its surface, with porosity only in those produced at -10°C to -20°C, the latter with higher pores and was tested for mineralization. FTIR-ATR showed no change in the functional groups due to processing and the tensile test showed a typical behavior of an elastomer (with elongation higher than 1000% and low Young modulus), but showed differences in the ultimate tensile (lower values for the polymeric membranes below 0°C). The SEM-EDS showed cell adhesion and extracellular matrix (ECM) production in all membranes. The mineralization in the membrane produced at -20°C has been proven by all techniques. The natural rubber latex membrane has been proven to support cell adhesion, proliferation and mineralization being able to be used as scaffold in guided bone regeneration.

Keywords: Natural rubber latex. Thermally induced phase separation. MC3T3. Biomaterial. Mineralization. Guided bone regeneration. Biocompatibility. *Hevea brasiliensis*. Scaffold. Tissue bioengineering. Regenerative medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do isômero <i>cis</i> (a) e <i>trans</i> (b), do 1,4-poliisopreno.	16
Figura 2 - Cultura da seringueira (a), extração do látex natural (b).	17
Figura 3 - Teste de angiogênese em CAM (a,b).	18
Figura 4 - Aplicação da NRL para GBR em calvária de coelho.	20
Figura 5 - Máquina universal de ensaio EMIC DL2000.	30
Figura 6 - Aparelho de FTIR Bruker Tensor 27 com o acessório de ATR.	31
Figura 7 - Câmara de Neubauer, aumento de 40x (a) e célula inviável corada com azul de tripan, aumento de 100x (b).	32
Figura 8 - Aparelho Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate.	34
Figura 9 - Placa de 24 poços com membrana de látex a -20°C (e m amarelo) e vazia (em vermelho).	35
Figura 10 - Micro centrífuga refrigerada NT805, da Novatecnica.	36
Figura 11 - FTIR das membranas nas diferentes temperaturas de polimerização: parte superior da membrana (a), parte inferior da membrana (b).	38
Figura 12 - Espectro de FTIR da membrana de látex.	40
Figura 13 - Teste de resistência mecânica: curva tensão versus deformação específica (a), parte linear referente ao módulo de Young (b).	41
Figura 14 - Micrografia de MO da NRL sob aumento de 40x..	44
Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura para diferentes temperaturas de polimerização.	45
Figura 16 - MEV das membranas submetidas à temperatura de -10°C (a,b) e -20°C (c,d).	48
Figura 17 - Microplaca de 96 poços para o teste de citotoxicidade; notar que o controle positivo e a extração a 100% apresentam pouca coloração, devido à baixa quantidade de cristais de formazan.	51
Figura 18 - Citotoxicidade pelo método de MTT demonstrada pela absorbância (a), viabilidade celular em relação ao controle positivo (b); o primeiro número da legenda se refere ao tempo de extração em horas, o segundo ao tempo de contato em horas durante a cultura.	52
Figura 19 - Microscopia óptica do plaqueamento na membrana -20°C.	53

Figura 20 - Microscopia óptica do segundo dia de cultura na membrana -20°C. Aumento de 100x.	54
Figura 21 - Microscopia óptica das células após 21 dias de cultura na membrana de -20°C: antes da fixação (a,b), após a fixação (c). Aumento de 100x.	55
Figura 22 - Microscopia óptica da cultura por 21 dias sem a membrana. Aumento de 100x.	55
Figura 23 - Detecção da mineralização após 21 dias de cultura na membrana a -20°C: von Kossa (a), vermelho de alizarina S (b).	56
Figura 24 - Detecção da mineralização após 21 dias sem membrana: von Kossa (a), vermelho de alizarina S (b).	57
Figura 25 - Representação do teste para quantificação da fosfatase alcalina.	58
Figura 26 - Microscopia óptica do MTT: célula + NRL (a) e célula (b). Aumento de 100x.	59
Figura 27 - FTIR-ATR da mineralização.	60
Figura 28 - Micrografia (MEV-EDS) da adesão celular e produção de MEC na superfície da NRL.	61
Figura 29 - Gráficos de EDS da NRL.	64
Figura 30 - Micrografia da NRL a 0°C. MEV (a,b), e MO (c aumento de 40x, d aumento de 100x).	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características do látex natural utilizado.	29
Tabela 2 - Parâmetros da resistência mecânica.	43
Tabela 3 - Quantificação da mineralização pela absorbância do vermelho de alizarina S após 21 dias de cultura.	57
Tabela 4 - Quantificação da enzima fosfatase alcalina após 21 dias de cultura.	58
Tabela 5 - Proporção Ca/P por MEV-EDS das culturas celulares nas membranas a diferentes temperaturas.	65

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	Látex	16
1.1.1	Aplicações biológicas	17
1.1.2	Látex na regeneração óssea	19
1.1.3	Manipulação do látex	21
1.2	Tecido ósseo	22
1.2.1	Porosidade dos materiais para regeneração óssea	23
1.2.2	Modelos celulares de estudo <i>in vitro</i> da biologia celular óssea	25
2.	OBJETIVOS	28
3.	METODOLOGIA	29
3.1	Obtenção do látex	29
3.2	Elaboração das membranas	29
3.3	Caracterização das membranas	30
3.3.1	Resistencia mecânica	30
3.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
3.3.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)	31
3.4	Cultura celular	32
3.4.1	Citotoxicidade	33
3.4.1.1	Citotoxicidade por metabolismo de MTT	33
3.4.2	Cultura de células na membrana	34
3.4.2.1	Formação da matriz mineralizada	35
3.4.2.1.1	Vermelho de Alizarina S	35
3.4.2.1.2	Von Kossa	36
3.4.2.1.3	Fosfatase alcalina (ALP)	36
3.4.2.1.4	Quantificação celular por MTT	37
3.4.2.1.5	FTIR-ATR	37
3.4.2.2	Morfologia celular	37
3.5	Métodos estatísticos	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Caracterização da membrana	38
4.1.1.	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)	38
4.1.2.	Resistencia mecânica	40
4.1.3.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
4.2	Cultura celular	50
4.2.1	Citotoxicidade	50
4.2.2	Cultura de células na membrana	53
4.2.2.1	Formação da matriz mineralizada	53
4.2.2.1.1	Coloração de von Kossa e vermelho de alizarina S	56
4.2.2.1.2	Fosfatase alcalina (ALP)	57
4.2.2.1.3	Metabolismo de MTT	58
4.2.2.1.4	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)	60
4.2.2.2	Morfologia celular	61
5.	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

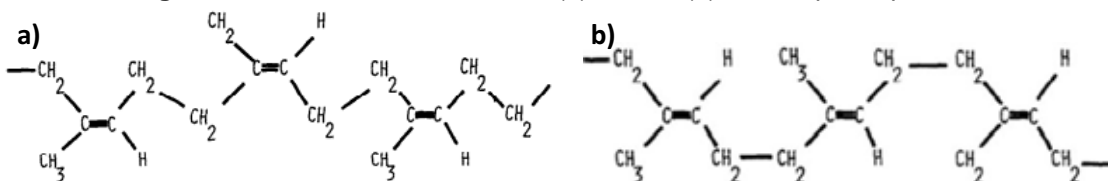
1.1 Látex

O látex natural (NRL) é um sistema coloidal formado por aproximadamente 50% de água, 4-5% da massa em proteínas, lipídios e carboidratos e 30-45% de massa em borracha (o hidrocarboneto *cis*-1,4-poliisopreno), variando com a estação do ano e idade.¹ As partículas de borracha estão circundadas por moléculas (orgânicas e inorgânicas) carregadas negativamente de proteínas fosfolipídicas, que lhe conferem estabilidade coloidal e que não são removidas por centrifugação.²

São conhecidas 14 proteínas do látex relacionadas à reação alérgica, dentre as principais, a Hev-b1 é encontrada principalmente nas partículas grandes de látex enquanto a Hev-b3 está presente nas menores.³ Porém há vários métodos para torná-lo imune, sendo a centrifugação o melhor modo, pois as relacionadas à angiogênese permanecem.⁴

O látex é extraído de diversas plantas e apresenta isomerismo (Figura 1), o que altera suas propriedades. O isômero *trans*, extraído da *Palaquium gutta*, produz ligações cruzadas mais eficiente, formando uma massa dura e inflexível (apresenta estrutura cristalina alfa, beta ou amorfa) sendo utilizado em endodontia.^{5,6} A *Achras sapota*, produz ambos isômeros em seu látex.⁷ A *Hevea brasiliensis* produz o isômero *cis* que apresenta cadeias longas e flexíveis, não estando próximas umas das outras o suficiente para produzir tantas ligações cruzadas, assim as moléculas podem se deslizar melhor uma sobre as outras; seu produto quando polimerizado é elástico, hidrofóbico, isolante elétrico e térmico.⁸ A vulcanização com enxofre torna-o mais flexível, porém menos elástico.

Figura 1 - Estrutura do isômero *cis* (a) e *trans* (b), do 1,4-poliisopreno.



Fonte: Goodman; Schilder; Aldrich (1974, p. 957).⁵

A maior produtora de látex é a *H. brasiliensis* (seringueira) (Figura 2). É uma árvore tropical da família Euforbiácea amplamente cultivada no sudoeste asiático, porém é nativa da região amazônica, no Brasil.⁹

Figura 2 - Cultura da seringueira (a), extração do látex natural (b).



Fonte: IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná.⁹

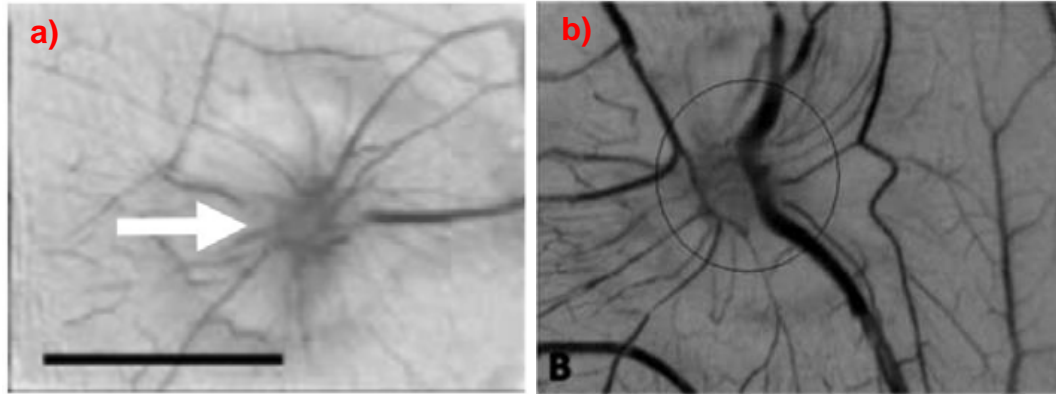
1.1.1 Aplicações biológicas

A biocompatibilidade é fundamental para aplicação em seres vivos. Desta forma, a elaboração da membrana (elaborada a partir do látex natural centrifugado) ocorre por técnicas diferentes das usadas na indústria de borracha na fabricação de luvas, tubos e outros produtos. O látex de seringueira é centrifugado a fim de reduzir a quantidade de proteínas e sua polimerização ocorre sem aditivos. Esta técnica foi utilizada por Mrué et al.⁴ na regeneração de úlceras dérmicas em orelhas de coelhos, observando uma organização do tecido cicatrizado (sem tecido fibroso), sem reações alérgicas, permitindo adesão celular e formação de matriz extracelular (MEC), acelerando a cicatrização e apresentando propriedades neoangiogênica a partir do primeiro dia.

A atividade neoangiogênica é devido à presença de proteínas no látex natural. Ferreira et al.¹ e Mendonça et al.¹⁰ estudaram a influência do látex e de seu soro na atividade neoangiogênica em modelo de membrana corialantóide de embrião de galinha (CAM), sendo que o soro também apresentou atividade, porém quando desnaturado por calor ou por proteinase K a atividade neoangiogênica era perdida (Figura 3). A vascularização é importante para a cicatrização, uma vez que provê nutrientes e oxigenação ao tecido que está se regenerando. Uma teoria para a

aceleração da cicatrização é o estímulo da fase inflamatória natural por estresse oxidativo, aumentando o recrutamento de células inflamatória que auxiliam no debridamento.¹¹

Figura 3 - Teste de angiogênese em CAM (a,b).



Fonte: Ferreira et al.¹ (a) e Mendonça et al.¹⁰ (b).

Devido a esses resultados positivos a membrana tem sido estudada no tratamento e regeneração de diversas lesões, geralmente relatando a angiogênese e aceleração da cicatrização. Seu emprego na regeneração óssea será discutido posteriormente.

Em afecções auditivas a membrana foi utilizada para revestimento da cavidade aberta em timpanomastoidectomia, sendo que a remoção do curativo tampão foi mais rápida, sem desconforto e sangramento, além de propiciar epitelização mais precoce.¹² Na timpanoplastia apresentou melhora na capacidade auditiva, e embora não houve diferença na velocidade de cicatrização quando comparado ao silicone, apresentou aumento na vascularização; assim como na miringoplastia, que apresentou fechamento da perfuração timpânica em 90% dos casos, mesmo em pacientes com cirurgias anteriores ou tamanho da perfuração amplo.^{13,14}

Úlceras são feridas de difícil cicatrização, podendo durar anos. A utilização da membrana na cicatrização de úlceras de pressão, diabética e venosa apresentam os mesmos resultados, como facilidade na exsudação, debridamento, não sendo aderente à ferida, propiciando troca fácil e indolor, obtendo o início da formação de tecido granular por volta do 15º dia.¹⁵⁻¹⁷

Sua utilização em herniorrafia também se mostrou satisfatória para hérnias: diafragmática (cão), perineal (cão), iatrogênica da parede abdominal (rato) e umbilical (bovino leiteiro), permitindo a oclusão da hérnia deixando uma base tecidual para a reparação.¹⁸⁻²¹ Porém, na herniorrafia inguinal de cães ocorreu seu incistamento, não sendo recomendada.²² A mesma divergência ocorre na peritoniotomia, em ratos não foi vantajoso, ocorrendo evisceração.²³

Também foi utilizada na regeneração de pericárdio, prótese vascular (com superior propriedades mecânicas e integração tecidual além das anastomoses), neovascularização da retina a partir da fração angiogênica do látex, aumento da bexiga de coelhos (promovendo regeneração epitelial e muscular, sem vazamento urinário).²⁴⁻²⁷

Além da regeneração tecidual, o látex natural pode ser utilizado como sensor de óxido nítrico (sendo reutilizável e funcional por até 40 dias exposto ao ar), emprego de nanopartículas de prata para o tratamento de células de carcinoma de pulmão e de nanopartículas de ouro para inibir o crescimento de promastigotas de *Leishmania brasiliensis*, em cultura de fibroblastos em filmes associados com PAH (polialilamina hidrocloreada) e PEI (polietilenoimina).²⁸⁻³¹

Aplicações recentes mostram seu uso como carreador para liberação de proteína (albumina do soro bovino, BSA), extrato de plantas (*Stryphnodendron* sp. e *C. sylvestris*), fármaco (metronidazol) e de nicotina (na forma de *patches* e utilizando diferentes plastificantes).³²⁻³⁹

Látex de outras plantas também foram investigadas, sendo que *Synadenium umbellatum* apresentou atividade angiogênica, *Hancornia speciosa* apresentou atividade anti-inflamatória e angiogênica, *Carica candamarcensis* apresenta proteinases com atividade cicatrizante, e *Ficus carica* apresentou atividade anti-angiogênica e anti-proliferativa.⁴⁰⁻⁴³

1.1.2 Látex na regeneração óssea

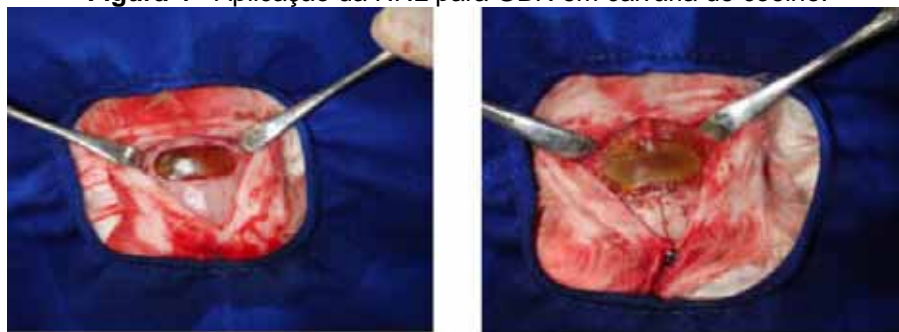
Este biomaterial baseado no látex natural (NRL) tem se mostrado promissor na regeneração óssea, embora sua utilização seja recente. Podendo ser empregado tanto como barreira para evitar a infiltração de celular quanto liberação de compostos ativos ou suporte celular.

Balabanian et al.⁴⁴ utilizaram grânulos de látex natural como implante em alvéolos de ratos observando uma redução da espessura da cápsula de tecido conectivo e o aumento da área ocupada por osso maturo. Sendo que aos 7 dias já haviam osteoblastos ativos e veias. De forma que o látex acelerou a formação óssea, não demonstrando inflamação ou reação de corpo estranho.

Ciapetti et al.⁴⁵ testaram a compatibilidade de duas membranas de látex para regeneração tecidual guiada em periodontologia, sendo que a membrana de látex lixiviada apresentou maior compatibilidade que a membrana de látex a partir de luva cirúrgica, provavelmente devido aos agentes antibacterianos desta.

Ereno et al.⁴⁶ também utilizaram como uma barreira oclusiva para regeneração óssea guiada (GBR) em calvária de coelhos, porém na forma de membrana. A membrana proporcionou uma ossificação intramembranosa das bordas para o centro, confirmando a formação de hidroxiapatita por EPR (ressonância paramagnética eletrônica, do inglês *Electron Paramagnetic Resonance*), sendo que em 120 dias havia tecido duro e o material permaneceu intacto. Embora uma membrana biodegradável evite a necessidade de uma cirurgia para remoção, Dupoirieux et al.⁴⁷ obtiveram que a membrana de e-PTFE (politetrafluoretileno expandido) não reabsorvível exibiu resultados favoráveis e Schliephake et al.⁴⁸ e von Arx et al.⁴⁹ apresentaram problemas na durabilidade e respostas adversas com materiais reabsorvíveis. Herculano⁵⁰ também utilizou para GBR de tíbias e calvárias de coelho.

Figura 4 - Aplicação da NRL para GBR em calvária de coelho.



Fonte: Herculano⁵⁰.

A proteína morfogenética óssea (BMP) também tem grande influência na regeneração óssea.⁵¹ Herculano et al.^{32,50} realizaram a liberação de BSA, uma

proteína com peso molecular semelhante à BMP, controlando a liberação e a porosidade das membranas para aplicação em GBR.

1.1.3 Manipulação do látex

O látex natural é um material versátil e manipulável, sendo que seu processamento permite alteração de várias propriedades. Este material é um elastômero, isso significa que sua T_g (temperatura de transição vítrea, é a temperatura em que abaixo dela, o material apresenta uma estrutura rígida, comportando-se como o vidro, sendo quebradiço e com alto módulo de Young) está abaixo da temperatura ambiente, além de apresentar ligações cruzadas e baixo módulo de elasticidade (módulo de Young).⁵² Ereno et al.⁴⁶ obtiveram um módulo de elasticidade de 1,85 MPa para membranas de látex. Já Neves-Junior et al.⁵³ encontraram valores diferentes para próteses vasculares, sendo que quanto maior a espessura maior o módulo de Young, podendo esticar até 800%, considerado um material anisotrópico.

Este polímero é considerado um material resistente, sendo estável até 300°C, porém sua estabilidade pode ser alterada com a adição de outros polímeros (como quitosana) e aditivos (vulcanizantes e compatibilizantes).^{46,50} A adição de quitosana mostra uma maior degradação da blenda e diminuição da hidrofobicidade do látex.⁵⁴ A adição do compatibilizante MA (anidrido maleico) e do vulcanizante DCP (peróxido dicumil) aumentam a estabilidade da blenda e da propriedade dielétrica.^{8,55}

A porosidade é importante para a regeneração óssea, podendo ser controlada por uma separação de fase induzida termicamente (TIPS, do inglês *Thermally Induced Phase Separation*). Herculano et al.³² obtiveram maior liberação de BSA para membranas polimerizadas à temperatura ambiente, sendo que a membrana também apresentou uma superfície mais rugosa; assim como também foi obtida uma maior liberação de metronidazol com membranas polimerizadas a -100°C, de forma que foi possível controlar o tamanho e densidade da porosidade pela temperatura.³⁵

Embora algumas proteínas do látex estejam relacionadas às reações alérgicas, outras estão relacionadas com sua propriedade angiogênica. A remoção das proteínas pode ocorrer de diversas formas, como por exemplo por degradação enzimática, adição de uréia, degradação térmica ou por centrifugação, sendo esta última a mais apropriada, por manter as proteínas relacionadas à atividade

angiogênica.^{1,4} Sua preservação é feita tradicionalmente com amônia para ajustar para um pH básico ou com adição de quitosana.⁵⁶⁻⁵⁸

O látex pode ser aplicado na forma de membrana, próteses ou grânulos.^{4,25,44}

A principal característica do látex é sua elasticidade, que é influenciada pela forma de elaboração do material. Neves-Junior et al.⁵⁹ elaboraram prótese vasculares com diferentes espessuras e camadas, sendo que quanto maior a espessura, maior a resistência à tração, e após a primeira deformação a rede polimérica se estabilizava, mostrando uma memória de deformação.⁵³ A viscosidade e a velocidade de retirada do molde também influenciam na espessura de cada camada, de forma que quanto maior a viscosidade e velocidade, maior a espessura da camada (principalmente na parte inferior), já o molde para fabricação influenciava apenas na primeira camada.⁵⁹

Quando a membrana foi submetida à desnaturação, apresentou maior elasticidade, maior alongamento até o rompimento, porém tornou-se menos adesiva; fator que pode ser controlado com a adição de plastificantes ou outros polímeros. Pichayakorn et al.⁵⁶ adicionaram os polímeros HPMC (hidroxipropilmetilcelulose), MC (metil celulose), SMC (carboximetilcelulose de sódio), PVA (polivinil álcool) que se mostraram os melhores polímeros para adicionar ao látex, porém foi difícil a remoção do PVA do molde e o MC e SMC formaram bolhas, mas todos os materiais testados apresentaram aumento da adesividade da membrana. Dentre os plastificantes, todos aumentaram a elasticidade e flexibilidade. No geral tanto os polímeros quanto os plastificantes tornaram o látex mais hidrofílico com superfície mais lisa. Porém a adesividade do material depende de sua aplicação,^{17,37,38,56} de forma que Sanguansap et al.⁶⁰ reduziram a adesividade do látex com a adição de PMMA (polimetilmetacrilato).

1.2 Tecido ósseo⁶¹

O tecido ósseo serve como suporte, proteção e reservatório de cálcio e fosfato. Ele é composto por células e matriz extracelular. A parte celular é composta por: osteócitos (derivados dos osteoblastos) são células achatadas encontrados no interior da matriz óssea em lacunas com somente uma célula, que se comunicam através de prolongamentos para trocar pequenas moléculas, responsáveis pela

manutenção da matriz óssea, liberação de fator de crescimento e osteocalcina; osteoblastos, localizados nas superfícies (interna e externa) do osso, são células basófilas, achatadas ou cuboides (quando em atividade), são responsáveis por sintetizar matriz orgânica (colágeno tipo I, glicoproteínas, osteocalcina, osteopontina, osteonectina, fosfatase alcalina, proteoglicanos, fatores de regulação do crescimento) e fosfato de cálcio; e osteoclastos, são células grandes e multinucleadas derivadas da medula óssea relacionadas com a reabsorção óssea, onde na zona clara (região de adesão com a matriz extracelular) cria-se um microambiente ácido e com enzimas hidrolases para reabsorção da matriz óssea.

A porção inorgânica da matriz óssea é composta principalmente por íons de fosfato e cálcio, apresentando a estrutura da hidroxiapatita. A parte orgânica é formada 95% de fibras colágenas (colágeno tipo I e pequenas quantidades de proteoglicanos e glicoproteínas). Essa combinação proporciona dureza e resistência ao tecido ósseo.

A parte externa do osso é constituído pelo periósteo e a interna pelo endósteo. O periósteo apresenta células osteoprogenitoras responsáveis pelo crescimento e reparação de fraturas e o endósteo apresenta células osteogênicas. Macroscopicamente é formado por osso compacto (sem cavidades visíveis) e osso esponjoso (várias cavidades intercomunicantes), porém apresentando a mesma configuração histológica).

1.2.1 Porosidade dos materiais para regeneração óssea

Para uso em implante ósseo o biomaterial deve apresentar interporosidade, porosidade, tamanho do poro e interconectividade entre os poros apropriados para seu uso. Dentre esses fatores, o que mais se destaca para a regeneração óssea é tamanho dos poros. Porém há muita divergência na literatura. Pamula et al.⁶² acharam que quanto maior o tamanho dos poros (40-600 μm) e interconectividade, maior o número de osteoblastos humanos MG63, porém a diferença desapareceu entre todas porosidades após 15 dias de cultura. Murphy et al.⁶³ mostraram que à medida que diminui o tamanho dos poros aumenta a área de contato da superfície do suporte (*scaffold*) porém encontrou como melhor infiltração celular poros de 325 μm . Já para Roosa et al.⁶⁴ a porosidade entre 300-800 μm da policaprolactona teve

uma influência limitada na regeneração óssea em 8 semanas. A conflitância no tamanho ideal dos poros também pode ser devido às diferenças entre os polímeros utilizados.

Karageorgiou et al.⁶⁵ resumiram que poros menores que 100 µm não são suficientes para transporte e migração e induzem a formação de cartilagem endocondral antes que a osteogênese ocorra, também devido ao baixo fornecimento de oxigênio; já poros maiores que 300 µm levam diretamente à osteogênese devido à maior vascularização e aporte de oxigênio. Uma grande área de superfície favorece a vascularização, permitindo o fluxo de nutrientes e dos produtos gerados pela célula.⁶⁶ No entanto quanto maior o tamanho dos poros, o crescimento de células ósseas compete com a invasão de células fibrovascular.⁶²

Kuboki et al.⁵¹ demonstraram que a formação de osso é dependente da geometria e tamanho dos poros, de forma que a ossificação pode ocorrer ossificação direta ou precedido por formação de cartilagem. Porém, Gauthier et al.⁶⁷ não detectaram diferença na porosidade em BCP (fosfato de cálcio bifásico) com 40 ou 50% de porosidade, mas obteve que a porosidade de 500 µm foi mais eficiente que tamanhos menores, indicando que o tamanho dos poros é o fator determinante.

Quanto à penetração de células no interior do *scaffold*, Pamula et al.⁶² não obtiveram diferença no sétimo ou quinto dia em *scaffolds* de PLG (poli(L-lactídeo-co-glicolídeo)), tanto em relação ao tamanho dos poros nem quanto à interconectividade, no entanto Roose et al.⁶⁸ notaram maior quantidade no interior conforme maior o tamanho dos poros em hidroxiapatita.

A densidade celular também afeta a osteogênese em biomateriais. Para Kim et al.⁶⁹ a menor densidade celular (3000 células/cm²) utilizada resultou em uma rápida taxa de proliferação, porém os maiores níveis de mineralização ocorreram em densidades maiores (149000 células/cm²).

A importância de materiais bioreabsorvíveis advém do fato de não precisar de uma cirurgia para sua remoção. Porém, segundo Al Salamah et al.⁷⁰ a membrana não reabsorvível de e-PTFE demonstrou maior quantidade de formação óssea que a reabsorvível Guidor[®].

A oxigenação é fundamental para a viabilidade das células em um suporte (*scaffold*) 3D. Volkmer et al.⁷¹ demonstraram que o uso de um biorreator permitia um aumento da oxigenação no interior do material, aumentando a viabilidade celular.

1.2.2 Modelos celulares de estudo *in vitro* da biologia celular óssea

A cultura de células ósseas permitiu o estudo *in vitro* da osteogênese, entendimento de doenças ósseas assim como a citocompatibilidade com novos biomateriais.⁷²

Geralmente os osteoblastos são utilizados para estudar o metabolismo ósseo e interações entre as células e biomateriais. Estas células podem ser obtidas de diversas fontes animais, como bovino, ovino, coelho, mas os mais comuns são ratos, camundongos e humano (pois já possuem genoma, metabolismo, forma de cultura e ampla literatura já estabelecidos para comparação). Os protocolos de obtenção incluem diversos tecidos, os principais são mandíbula, vertebra, ossos longos (fêmur e tíbia), crista ilíaca e calvária, podendo ser extraídos por digestão enzimática ou por explante.⁷³

A fim de evitar diferenças interespecíficas o ideal seria a utilização de células primárias humanas, devido à sua melhor semelhança com o tecido que o biomaterial irá interagir. Porém células primárias apresentam baixa disponibilidade e são necessárias várias subculturas para obter a quantidade suficiente de células.⁷⁴ Além de que células humanas apresentam acessibilidade limitada, variação relacionada com o doador (idade, sexo e local de extração).⁷²

Devido à vantagem de fácil obtenção e manutenção, quantidade ilimitada, homogeneidade e estabilidade fenotípica a cultura de células clonais (malignas, transformadas ou não transformadas) é frequentemente utilizada.⁷²

Kartsogiannis et al.⁷⁵ compilaram uma variedade de osteoblastos imortalizados utilizados, agrupando entre origem maligna (osteosarcoma), transformados e não-transformados. Dentre as de osteosarcoma podemos citar as de origem espontânea de humanos (SaOs, OHS-4, TE-85, MG-63, KPDXM, TPXM, e CAL-72) e de ratos (ROS 17/2 e 17/2.8) e as induzidas de ratos (UMR-106), porém sua proliferação não apresenta inibição por contato. As linhagens osteoblásticas de rato RCT (1 e 3), camundongo KS4 e humana hOB (linhagem osteoblástica de humano adulto) e hFOB (linhagem osteoblástica de feto humano) são osteoblastos imortalizados por transfecção com retrovírus recombinante. Nas linhagens imortais não transformadas há a UMR-201 e CRP de rato e MC3T3-E1 de camundongo.

Segundo Czekanska et al.⁷² o modelo mais apropriado a ser utilizado seria a linhagem de células primárias MC3T3-E1, pois estas células seriam usadas mais frequentemente para o estudo das mutações nos genes relacionados com a osteogênese e desenvolvimento ósseo. Siggelkow et al.⁷⁶ observaram similaridade tempo-dependente na expressão de RNAm de fosfatase alcalina e procolágeno-I entre pHOB (cultivo primário de osteoblastos humanos) e MC3T3-E1, além do efeito estimulante do ascorbato. Sudo et al.⁷⁷ observaram formação de fibras colágenas semelhantes às fibras colágenas ósseas, formação de camadas parecias com o periósteo, o deposito mineral exibindo os mesmos padrões da hidroxiapatita nano-orientada. Wang et al.⁷⁸ observaram produção de RNAm para sialoproteína óssea, osteocalcina e paratormônio (marcadores dos estágios da formação óssea).

A linhagem MC3T3-E1 foi primeiramente isolada por Kodama et al.⁷⁹ É uma linhagem clonal não transformada estabelecida a partir do explante da calvária de camundongo (do inglês “*mouse calvaria*”, a qual a abreviatura corresponde ao termo “MC” do nome da linhagem) C57BL/6 recém-nascido (com 24 horas de vida). O termo “3T3” corresponde ao planejamento da cultura, no qual a cada três dias as células eram transferidas a 3×10^5 células/garrafa (em 5 mL de meio de cultura novo em garrafas de 25 cm²). A passagem E1 era a que apresentava maior valor de fosfatase alcalina.

Leis et al.⁸⁰ observaram que haviam diferenças nas linhagens de MC3T3-E1, atribuindo isso aos diferentes estágios de desenvolvimento dos osteoblastos. Wang et al.⁷⁸ isolaram 52 subclones, dos quais os subclones 4, 8, 14 e 26 mineralizavam *in vitro* sob influência de ácido ascórbico e *in vivo* (com exceção do 8) e os 17, 20, 24, 30 e 35 não, porém nenhum apresentava diferenças no DNA ou produção de colágeno. O subclone 17 foi classificado como um desenvolvimento intermediário, pois mineralizava *in vivo* e não *in vitro*.

A linhagem MC3T3-E1 também pode ser utilizada com o modelo de senescências celular. Yan et al.⁸¹ observaram que com o aumento da passagem celular a mineralização reduzia, porém sem afetar a viabilidade ou morfologia, devendo ser evitadas acima de 30 passagens. Peterson et al.⁸² observaram que em baixas (20 a 40) e altas passagens (40 a 60) não havia diferença na magnitude da atividade proliferativa e tempo de duplicação, porém em passagens muito altas (60 a 95) havia diminuição da atividade proliferativa com aumento do tempo de

duplicação, com alteração na distribuição do ciclo celular e aumento do tamanho celular, não sendo influência causada pela matriz extracelular.

Jarrahay et al.⁸³ observaram que a expressão de genes relacionados à indução óssea foi inferior em suportes para crescimento 3D em relação à 2D, porém a expressão e liberação de fatores de crescimento endotelial foi superior, estimulando a migração de células endoteliais; sendo que em fraturas ósseas é necessária uma vascularização da região para aumentar o aporte de oxigênio e nutrição para a regeneração óssea. De forma que na utilização *in vivo*, Gibon et al.⁸⁴ constataram que as células MC3T3-E1 subclone 14, são capazes de migrar para o defeito ósseo quando injetadas na corrente sanguínea de camundongos, diferenciando em osteoblastos maduros e acelerar a regeneração óssea.

Para a diferenciação osteoblástica e desenvolvimento da matriz mineralizada extra celular, estas células passam por três estágios temporais: fase proliferativa, seguida por formação e maturação da matriz extra celular e por fim a mineralização.⁸⁵ Porém, diversos autores têm descrito uma variedade de meios de cultura para osteoblastos, dentre eles podem ser encontrados principalmente o DMEM, DMEM/F12 e α -MEM. Sendo que os resultados podem variar conforme a composição.⁷⁴ Embora seja reportado o uso de dexametasona e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ para modificar a mineralização, para a mineralização é fundamental o acréscimo de ácido ascórbico e β -glicerofosfato.^{78,85-87}

2. OBJETIVOS

Avaliar a citotoxicidade da membrana de látex natural (NRL) segundo a norma ISO 10993-5 (teste com o extrato do material);

Elaborar membranas de NRL pela técnica de separação de fase induzida termicamente (TIPS) nas temperaturas de -80°C, -20°C, -10°C, 0°C, temperatura ambiente (RT), +40 e +60°C, analisando-as por espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaio mecânico de tração;

Avaliar qual temperatura de polimerização apresenta porosidade;

Testar a mineralização das células MC3T3-E1 subclone 14 sobre a membrana que apresentar maior tamanho de poro, avaliando por microscopia óptica, MTT, FTIR-ATR, vermelho de alizarina S, von Kossa, fosfatase alcalina e MEV-EDS (energia dispersiva de Raio-X);

Avaliar a morfologia celular aderidas na superfície das membranas produzidas por TIPS através do MEV-EDS.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção do látex

O látex natural utilizado neste trabalho consistiu em uma mistura de diferentes clones (RRIM 600 e PB 235). O látex foi obtido pela BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA, Guarantã e centrifugado a 60%. A centrifugação é empregada para reduzir algumas proteínas contidas no látex natural que causam reações alérgicas.⁴

Tabela 1 - Características do látex natural utilizado.

Requisitos	Valores
Sólidos totais	61
Borracha seca (DRC)	60
Diferença entre sólidos totais e borracha seca	1,00
NH ₃	0,71
pH	10,20
Viscosidade	30 seg
Estabilidade mecânica	515
VFA	0,0136
Cor	Normal
Odor	Normal

Fonte: BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA.

3.2 Elaboração das membranas

As membranas foram elaboradas pelo método de deposição simples (*casting*). Consistiu na deposição de 2 mL de látex sobre uma placa de Petri (60 x 15 mm). Para medir a espessura foi utilizado um micrômetro.

A variação na porosidade das membranas foi obtida pela variação da temperatura de polimerização pelo método de separação de fase termicamente induzida (TIPS). Desta forma as membranas foram preparadas sob diferentes temperaturas: -80°C, -20°C, -10°C, 0°C, +10°C, temperatura ambiente (RT, definida neste trabalho como $\pm 25^\circ\text{C}$), +40°C e +60°C.

3.3 Caracterização das membranas

3.3.1 Resistência mecânica

O ensaio de resistência mecânica mede as alterações dimensionais da amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata com moldes retangulares de 26 x 35 mm, utilizando a máquina universal de ensaios (EMIC DL2000, Figura 5). Foi utilizada uma célula de carga de 50 kgf, a uma velocidade de 500 mm/min (ASTM D412), à temperatura ambiente, até a ruptura.⁸⁸ A partir do gráfico da deformação específica *versus* tensão obteve-se a tensão de cisalhamento e porcentagem de alongamento. O módulo de Young (E) é uma medida da elasticidade do material e foi calculada a partir da região linear da deformação elástica, a partir da Equação 1,

$$E = (F/A)/(\Delta L)$$

Equação 1

onde F é a força aplicada, A é a área da seção transversal da amostra e ΔL é a variação do comprimento.

Neste experimento foi realizado o ensaio destrutivo (até a ruptura) de tração para obter o módulo de Young, sendo este a razão entre a tensão aplicada e a deformação do material, sendo constante independente das dimensões do material. Quanto maior o módulo de Young, maior é sua resistência à deformação.

Figura 5 - Máquina universal de ensaio EMIC DL2000.



Fonte: Autoria própria.

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas. Um feixe fino de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra; parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de BSE (imagem de elétrons retroespalhados), nesta interação a amostra emite elétrons produzindo a chamada imagem de ES (elétrons secundários). Esta técnica foi importante para observar a presença/distribuição/tamanho dos poros, presença/morfologia/mineralização celular. Esta análise foi realizada no equipamento de MEV Zeiss® EVO 50 acoplado com o acessório de energia dispersiva de raio-X (EDS), sob 20 kV e ângulo de 35°.

3.3.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

O FTIR (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), estuda a vibração dos átomos quando recebem um feixe de radiação infravermelha (IR). Quando o feixe de IR passa pela amostra, a partir da radiação incidente, obtêm-se os picos em um espectro de absorção, que correspondem à frequência de vibração de parte da molécula da amostra (aumenta a amplitude das vibrações ao redor das ligações covalentes). Para que uma molécula apresente absorção no infravermelho, ela precisa que o momento dipolar sofra uma variação durante a vibração.

As amostras foram medidas usando o aparelho Bruker Tensor 27 (Figura 6) no intervalo de 4000-500 cm^{-1} , com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

Figura 6 - Aparelho de FTIR Bruker Tensor 27 com o acessório de ATR.

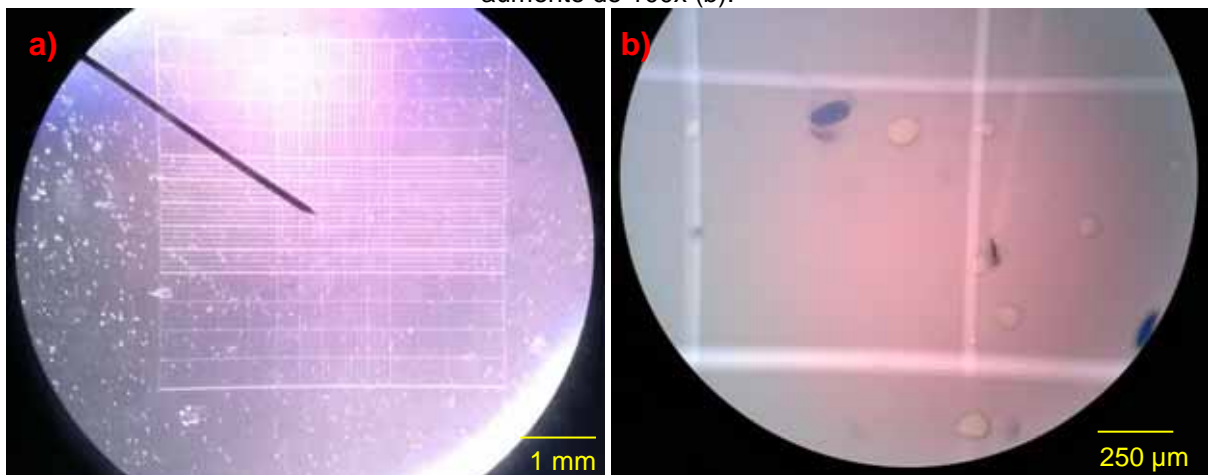


Fonte: Autoria própria.

3.4 Cultura celular

A linhagem MC3T3-E1 subclone 14 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. Para expansão as células são mantidas em garrafas de cultura (de 25 e 75 cm².) em Meio Mínimo Essencial Alfa (α -MEM, modificado com ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos da LGCBio, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal da Gibco[®], New York, EUA), 2 mM de L-glutamina e 1% de antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina e 0,25 μ g/mL de fungizona, da Gibco[®], New York, EUA), a 37°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂. As trocas de meio ocorreram três vezes por semana. Ao atingirem confluência de 80-90%, as células foram dissociadas com TrypLeTM (Gibco[®], New York, EUA) e expandidas em outras garrafas na concentração de 10⁴ células/cm². A contagem das células foi feita em microscópio óptico em câmara de Neubauer (Figura 7) com 10 μ L de azul de tripan e 10 μ L de suspensão celular.

Figura 7 - Câmara de Neubauer, aumento de 40x (a) e célula inviável corada com azul de tripan, aumento de 100x (b).



Fonte: Autoria própria.

Para os experimentos de mineralização, as células serão cultivadas com meio de mineralização na constituição acima mencionada suplementado com 50 μ g/mL de ácido ascórbico e 10 mM de β -glicerofosfato (ambos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); tais condições favorecem a diferenciação osteoblástica *in vitro*, mineralização da matriz extracelular e formação de multicamadas celulares.

3.4.1 Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade celular foi realizado com as recomendações da norma técnica ISO 10993-5.⁸⁹ Neste ensaio foi avaliado a citotoxicidade do extrato da membrana de látex natural. Amostras de membranas de látex natural foram imersas no meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino.⁹⁰ A proporção da área da superfície da amostra para o volume de meio foi de 6 cm²/mL, de acordo com a norma (para espessura ≤ 0,5 mm). A extração foi realizada durante 24 e 72 horas, em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, sem agitação.

O teste foi realizado em triplicata sendo que as réplicas foram feitas no mesmo dia. Em placas de 96 poços foram adicionadas 2x10⁴ células/cm², permanecendo por 24 horas para adesão. Os extratos de 24 e 72 horas foram adicionados nas concentrações de 100, 90, 80, 70, 60 e 50% (v/v), utilizando para as diluições o meio de cultura contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (o qual permaneceu na estufa o mesmo período de tempo de cada extração). O extrato e suas diluições permaneceram em contato com as células durante 24 e 72 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Como controle positivo utilizou-se o extrato de luvas de látex⁹⁰ e como controle negativo utilizou-se o poliestireno da placa de cultura. A citotoxicidade foi avaliada pela técnica de MTT.

3.4.1.1 Citotoxicidade por metabolismo de MTT

Consiste na avaliação colorimétrica pela quantificação da redução metabólica, por células saudáveis, do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium), por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica associadas ao NADPH e ao NADH, resultando em cristais de formazan (de cor azul-púrpura).⁹¹ DMSO é utilizado para sua remoção de dentro das células e solubilização, permitindo sua quantificação por espectroscopia.

Após o teste, o meio de cultura foi removido e foi adicionado meio de cultura novo (sem soro nem vermelho fenol) com 10% v/v de MTT (5 mg/mL em PBS) e incubado por 4h a 37°C a 5% de CO₂. Em seguida, o meio é descartado e é adicionado DMSO (dimetilsulfóxido) para dissolver os cristais, no mesmo volume do

meio de cultura utilizado. O volume de 100 μL das amostras foram coletados e transferidos para placa de 96 poços e a densidade óptica (DO) foi medida no espectrofotômetro Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate (Figura 8) a 570 nm. A viabilidade foi calculada em relação ao controle negativo.

Figura 8 - Aparelho Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate.



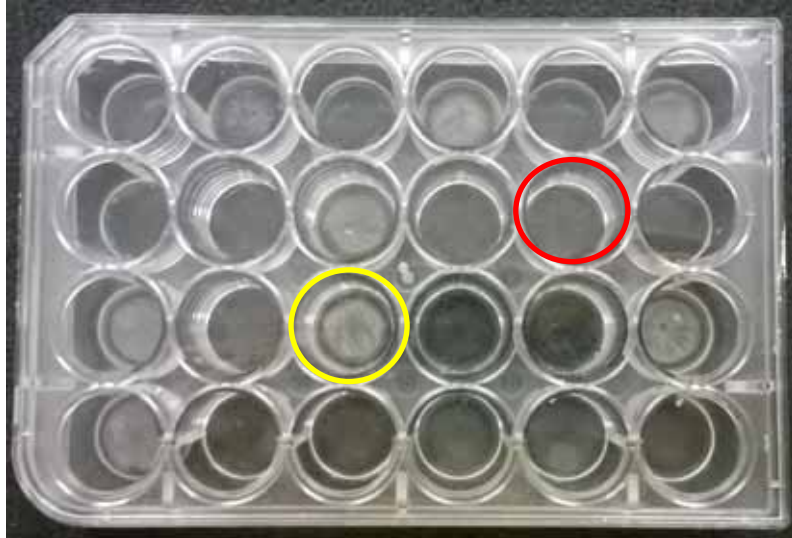
Fonte: Autoria própria.

3.4.2 Cultura de células na membrana

Em placas de 24 poços, foram adicionados 20 μL de látex natural e polimerizados nas temperaturas estabelecidas por 24 horas e posteriormente secas em estufa a 60°C por 3 dias (Figura 9).

As membranas foram esterilizadas por luz ultravioleta por 20 minutos e pré-incubadas com meio de cultura completo. As células foram semeadas a 2×10^4 células/cm² diretamente sobre a superfície da membrana e cultivadas com o meio de mineralização descrito anteriormente (seção 3.4).

Figura 9 - Placa de 24 poços com membrana de látex a -20°C (e m amarelo) e vazia (em vermelho).



Fonte: Autoria própria.

3.4.2.1 Formação da matriz mineralizada

Este teste foi realizado com as membranas polimerizadas a -20°C por apresentarem poros de maior dimensão. A cultura foi mantida por 21 dias para a mineralização.

3.4.2.1.1 Vermelho de Alizarina S

O corante de vermelho de alizarina S é um indicador de Ca^{2+} por ligar-se a estes íons. Os poços foram lavados com três vezes com solução salina tamponada de fosfato aquecida a 37°C . Em seguida foram fixados com formalina 10% a temperatura ambiente por duas horas, o excesso foi retirado e seco a temperatura ambiente. Posteriormente foram coradas com vermelho alizarina S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 2% (pH 4,1) a temperatura ambiente por 15 minutos, o excesso foi retirado com água bidestilada e secas a temperatura ambiente.

A quantificação da coloração foi avaliada em triplicata pelo método colorimétrico proposto por Gregory et al.⁹² modificado por Pereira⁹³. Nos poços fixados e corados adicionou-se 280 μL de ácido acético 10% (v/v) e agitado levemente por 30 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo foi transferido para

microtubos, aquecido a 85°C por 10 minutos e depois mantidos em gelo por 5 minutos. Posteriormente foram centrifugados a 13000 g (micro centrífuga refrigerada NT805, da Novatecnica, Figura 10) por 20 minutos, e 100 µL do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços e foi adicionado 40 µL de hidróxido de amônia 10% para neutralizar. A absorbância foi lida no leitor ELISA no comprimento de onda de 405 nm.

Figura 10 - Micro centrífuga refrigerada NT805, da Novatecnica.



Fonte: Autoria própria.

3.4.2.1.2 Von Kossa

A camada celular foi fixada com formalina 10% a temperatura ambiente por duas horas. Posteriormente foi incubada com corante de nitrato de prata 2% (m/v) por 10 minutos no escuro. O excesso foi removido com água destilada e exposto à luz intensa por uma hora. Na coloração por von Kossa, os cátions de prata reagem com fosfatos e carbonatos, conferindo uma coloração escura ao serem reduzidos sob exposição à luz.^{94,95}

3.4.2.1.3 Fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da ALP foi medida em triplicata através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato.

Para isso, o meio de cultura de cada poço foi removido, lavado com PBS, preenchidos com 2 mL de água destilada e submetidos a 5 ciclos de choques de térmicos (-20°C por 20 minutos, seguido de 15 minutos a 37°C). Ao final dos 5

ciclos, análise foi realizada conforme as instruções do kit comercial de fosfatase alcalina (referência 40, Labtest, Minas Gerais, Brasil). A atividade de ALP foi calculada a partir da medida da amostra padrão.

3.4.2.1.4 Quantificação celular por MTT

A quantificação foi feita pela técnica de MTT descrita anteriormente no item 3.4.1.1.

3.4.2.1.5 FTIR-ATR

A técnica foi utilizada conforme descrito anteriormente no item 3.3.3.

3.4.2.2 Morfologia celular

As amostras foram lavadas gentilmente com PBS (pH 7,2), fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% (v/v, em PBS) por uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e duas vezes em 100%) e secas a temperatura ambiente. As análises foram realizadas pelo MEV-EDS conforme descrito no item 3.3.2. A proporção cálcio/fosfato (Ca/P) foi estimada usando a análise de EDS, determinada através da integral das intensidades dos picos.

3.5 Métodos estatísticos

As comparações entre os grupos foram analisadas no programa OriginPro 8.5.0 SR1 (da OriginLab) pelo teste t de Student (2 grupos) ou ANOVA (One-Way) (quando mais de 2 grupos) seguido pelo teste Tukey quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

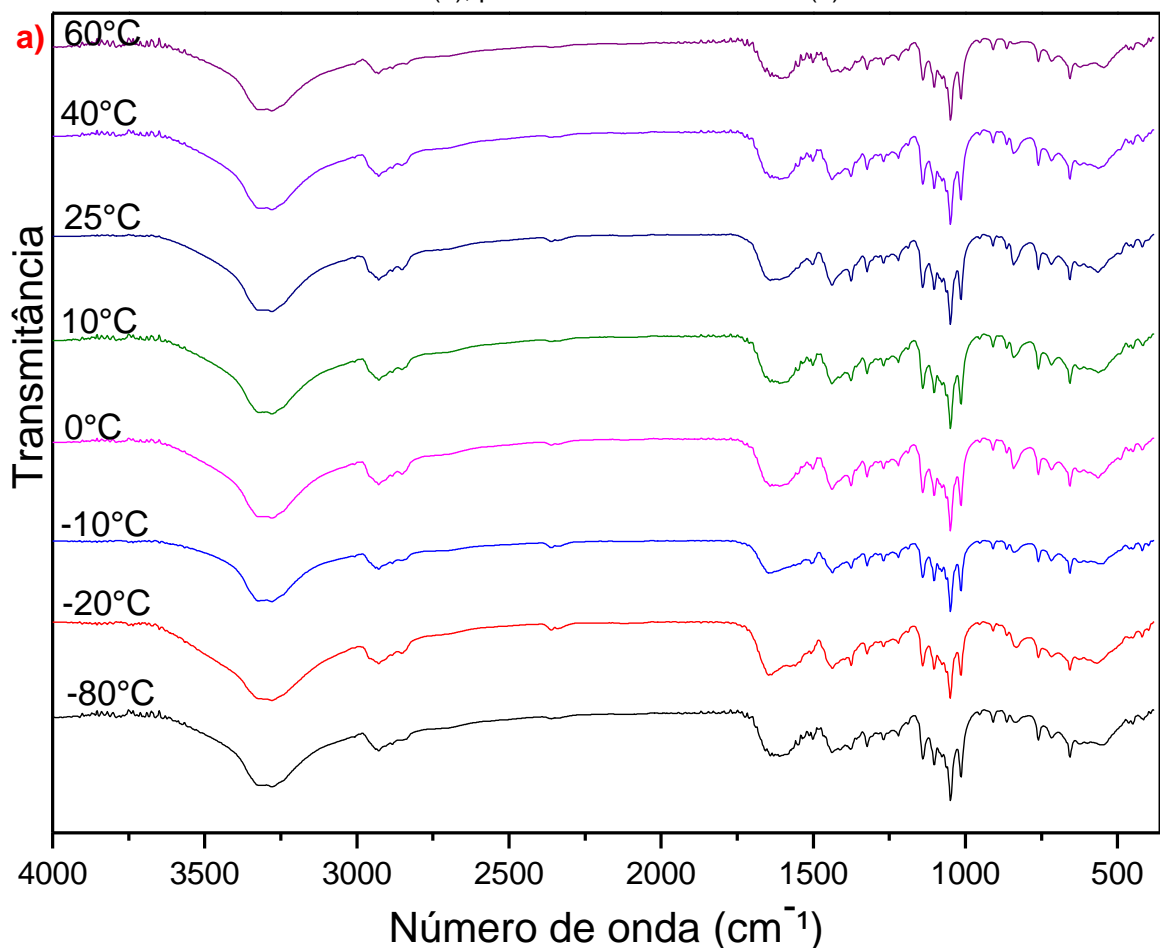
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

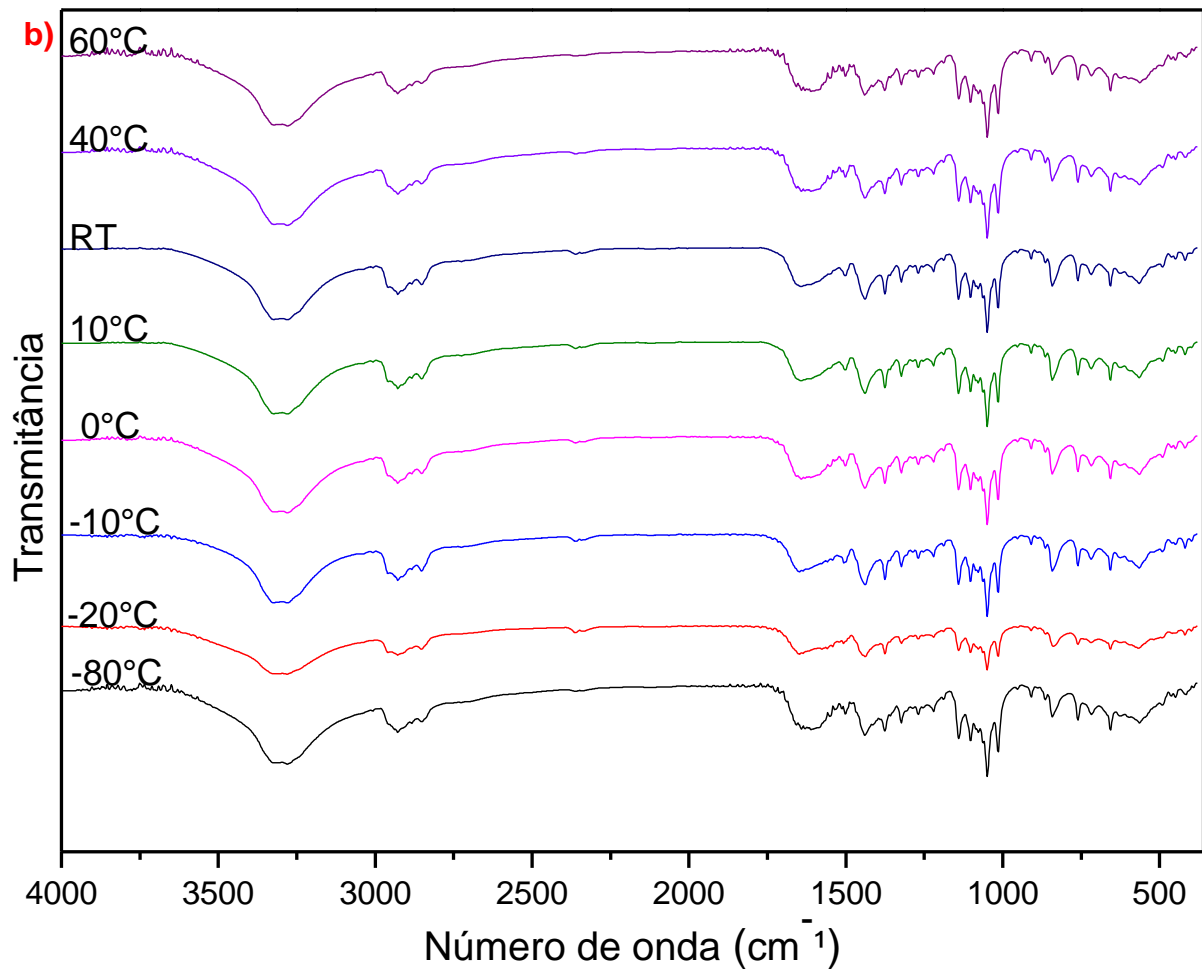
4.1 Caracterização da membrana

4.1.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho permite analisar os grupos funcionais do material, uma vez que estes absorvem em certos números de onda. Na Figura 11 pode-se observar a comparação dos espectros de FTIR das membranas elaboradas sob diferentes temperaturas.

Figura 11 - FTIR das membranas nas diferentes temperaturas de polimerização: parte superior da membrana (a), parte inferior da membrana (b).



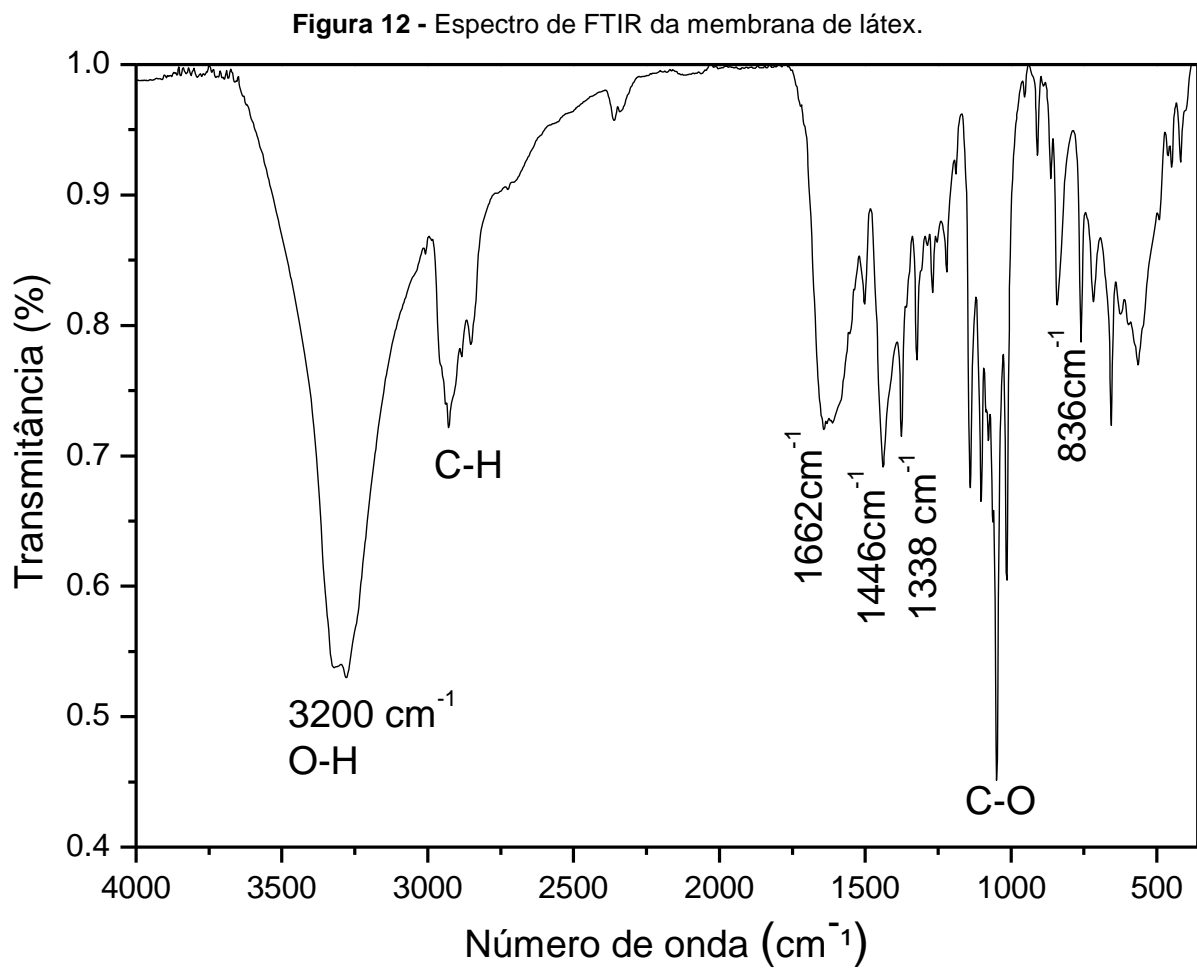


Fonte: Autoria própria.

As diferentes temperaturas aplicadas não causaram diferença na absorbância dos grupos funcionais relacionados ao isopreno, porém pode-se observar uma ligeira alteração nas bandas de absorção que podem estar relacionadas às proteínas (1542 cm^{-1}), o que poderia causar uma alteração na estrutura de sua parte proteica. Ferreira et al.¹ também obtiveram diferenças no espectro de FTIR das amostras tratadas entre 25 a 95°C , porém a atividade angiogênica foi maior para o tratamento de 85°C .

A partir do FTIR (Figura 12) pode-se observar as principais bandas de absorção do látex: entre $2960\text{-}2852 \text{ cm}^{-1}$ (estiramento simétrico CH_2 e assimétrico CH_3), 1446 cm^{-1} e 1375 cm^{-1} (deformação de CH_2 e CH_3), 835 cm^{-1} (dobramento fora do plano de $=\text{C-H}$), 1662 cm^{-1} (alongamento C=C).^{56,96,97} Também pode-se observar as vibrações de proteínas e fosfolípidios que estabilizam as moléculas de borracha

em 3537 cm^{-1} (estiramento de OH e NH), 1542 cm^{-1} (flexão de NH) e entre $1130 - 1010\text{ cm}^{-1}$ indicam compostos com oxigênio (C-O e -O-O-).^{2,56}



Fonte: Autoria própria.

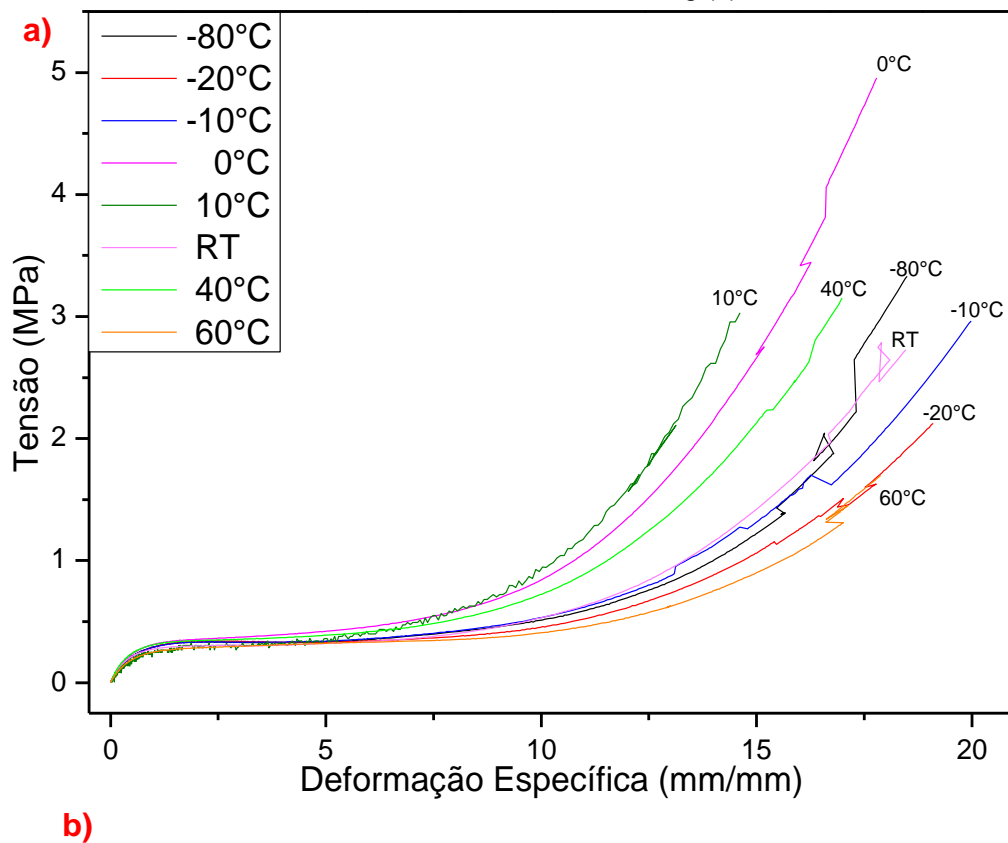
4.1.2. Resistencia mecânica

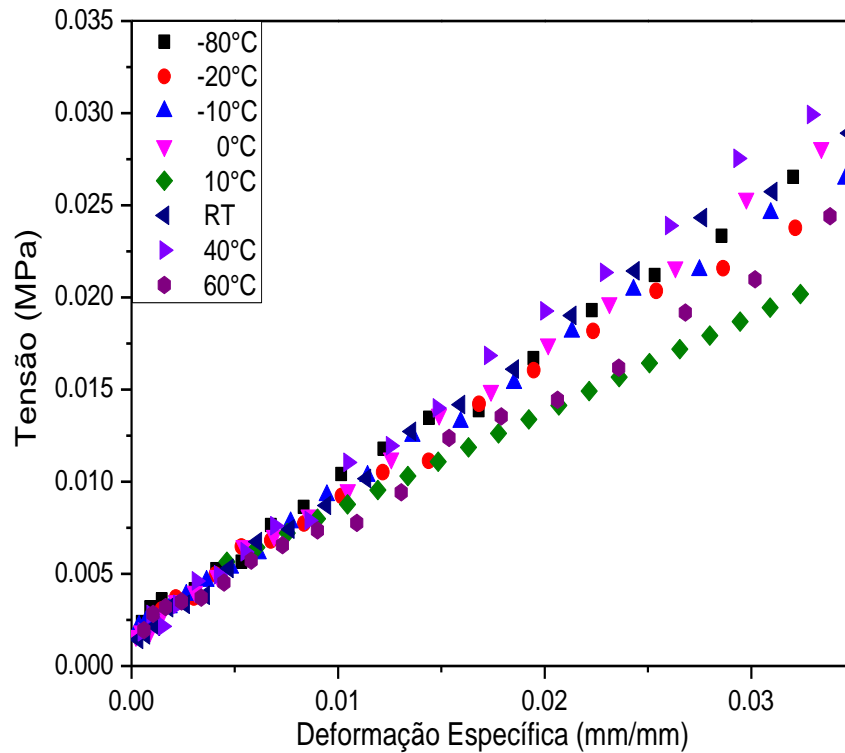
As diferentes temperaturas empregadas na fabricação das membranas, podem levar a mudanças nas suas propriedades mecânicas. O teste mecânico permite determinar a tensão de ruptura, módulo de elasticidade e a porcentagem de

alongamento. Desta forma, as membranas também foram caracterizadas quanto ao comportamento mecânico por tração à ruptura, que pode ser observado na Figura 13. Nota-se que as membranas tendem a apresentar comportamentos mecânicos diferentes conforme o tratamento térmico, porém foi detectada diferenças estatísticas apenas entre alguns tratamentos (Tabela 2).

Os resultados obtidos estão dentro do esperado e reportado na literatura. Para membranas de látex natural vulcanizadas (o que aumenta a rigidez do material) encontram-se valores entre 1,3 a 1,9 MPa para o módulo de Young, deformação entre 400 a 1300% e tensão de ruptura entre 0,8 a 6 MPa.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Figura 13 - Teste de resistência mecânica: curva tensão versus deformação específica (a), parte linear referente ao módulo de Young (b).





Fonte: Autoria própria.

É possível observar que a membrana apresenta três regiões com comportamentos mecânicos diferentes: inicialmente apresenta um comportamento elástico, onde pode ser observado na Figura 13.b, em que a tensão é diretamente proporcional ao alongamento, nesta fase ao remover a tensão o material retorna ao seu tamanho original (até aproximadamente 100% de alongamento); a próxima fase ocorre alongamento sem grandes alterações na tensão (empescoçamento), ocorrendo a deformação plástica, onde se removida a tensão, o material retorna apenas parte do seu tamanho devido à deformação permanente; posteriormente ocorre o que é chamado de cristalização induzida pela tensão (devido à deformação, as cadeias se alinham paralelamente na direção da aplicação da tensão), em que ocorre pouca variação da deformação e grande aumento da tensão, até a falha da amostra (a partir de aproximadamente 400% de deformação).⁵³

A partir da Tabela 2 observam-se as comparações da deformação específica, tensão de ruptura e o módulo de Young. A partir de 0°C, com o aumento da temperatura nota-se uma tendência de rigidez do material, e abaixo há uma tendência à fragilidade, devido aos valores da tensão de ruptura. Porém o processamento não altera significativamente a deformação específica do material nem sua elasticidade.

Tabela 2 - Parâmetros da resistência mecânica.

Temperatura	Deformação específica (mm/mm)	Tensão de ruptura (MPa)	Módulo de Young (MPa)
-80°C	17,23 ± 0,83 ^{ab*}	1,98 ± 0,79 ^{ab*}	0,75 ± 0,16 ^{abc*}
-20°C	17,14 ± 1,39 ^{ab}	1,61 ± 0,29 ^{ab}	0,71 ± 0,03 ^{abc}
-10°C	16,52 ± 2,45 ^{ab}	1,90 ± 0,73 ^{ab}	0,70 ± 0,09 ^{ac}
0°C	16,03 ± 1,36 ^{ab}	3,31 ± 0,98 ^c	0,88 ± 0,08 ^{bc}
10°C	14,16 ± 0,62 ^a	2,66 ± 0,36 ^{ac}	0,55 ± 0,02 ^{ad}
RT	17,81 ± 0,87 ^b	2,40 ± 0,56 ^{ac}	0,81 ± 0,10 ^{bc}
40°C	15,53 ± 1,11 ^{ab}	2,39 ± 0,47 ^{ac}	0,83 ± 0,05 ^c
60°C	16,01 ± 2,28 ^{ab}	1,15 ± 0,46 ^b	0,63 ± 0,09 ^{bd}

*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$).

Fonte: Autoria própria.

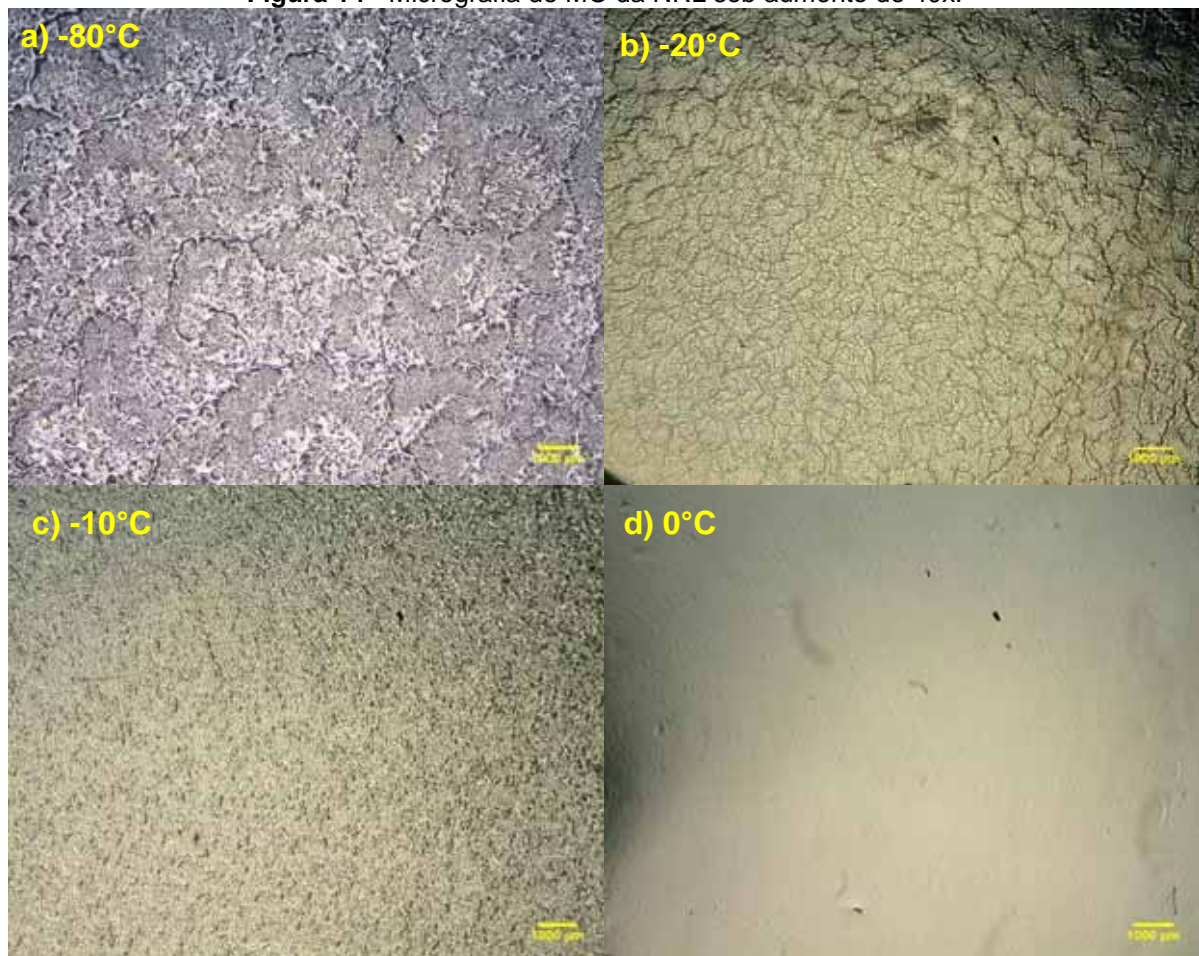
A partir da Figura 14 é possível observar que conforme diminui a temperatura surgem mais fissuras e regiões ricas em látex, enquanto ao utilizar temperaturas acima de 0°C, a superfície torna-se mais lisa e menos segmentada. Um resultado semelhante foi obtido com tintas de látex, onde um congelamento lento causa mais alterações que um congelamento rápido, por propiciar o crescimento dos cristais de gelo, enquanto um congelamento rápido forma cristais de gelo pequenos, o que preserva a sua estabilidade da solução.¹⁰¹ Yokoyama et al.¹⁰² observou que o aumento da quantidade de ciclos de congelamento do poli(vinil álcool) modificou a estrutura devido à separação de fases.

A polimerização do látex é influenciada por diversos fatores, como umidade, velocidade de congelamento/secagem e temperatura. Durante o congelamento, ocorre a separação de fases, formando cristais de água e regiões mais concentradas de látex nas regiões não congeladas, em que as moléculas de látex chegam a menor distância entre si, ocorrendo sua agregação, coagulação e a formação de fissuras vistas na Figura 14.⁵⁶ Essas fissuras podem funcionar como falhas no material, deixando-o menos resistente e rompendo a uma tensão inferior. A partir de 0°C, todas as membranas possuíram a mesma morfologia no microscópio óptico (MO), sendo representada apenas pela de 0°C.

Até onde pôde-se averiguar na literatura, os trabalhos abordam sobre a cristalinidade após o processamento do látex natural em borracha. Neste trabalho, o látex foi submetido às diferentes temperaturas, durante seu processamento (forma líquida), porém Chen et al.¹⁰³ observaram por SAXS (Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo, do inglês *Small Angle X-Ray Scattering*), que a estrutura cristalina se

mantêm mesmo após a formação do filme de látex a diferentes velocidades, variando a temperatura (55°C, 45°C, 35°C, 25°C e 14°C) e umidade; o aumento da velocidade de evaporação (com aumento da temperatura ou redução da umidade do ar) resulta em uma estrutura cristalina menos definida. Diversos trabalhos sobre látex natural analisaram a cristalinidade induzida mecânica e termicamente, demonstrando que a maior taxa e velocidade de cristalização é entre -22°C a -25°C.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ O modelo teórico de Negahban¹⁰⁵ corroborou os dados experimentais de Wood e Bekkedahl¹⁰⁶, em que a cristalinidade em função do tempo foi maior entre -22°C e -27°C reduzindo com o aumento ou diminuição da temperatura. Segundo Che et al.¹⁰⁷, a taxa de cristalização devido à tensão a -50°C é reduzida, devido à proximidade da temperatura de transição vítrea, o que reduz a mobilidade das cadeias.

Figura 14 - Micrografia de MO da NRL sob aumento de 40x.

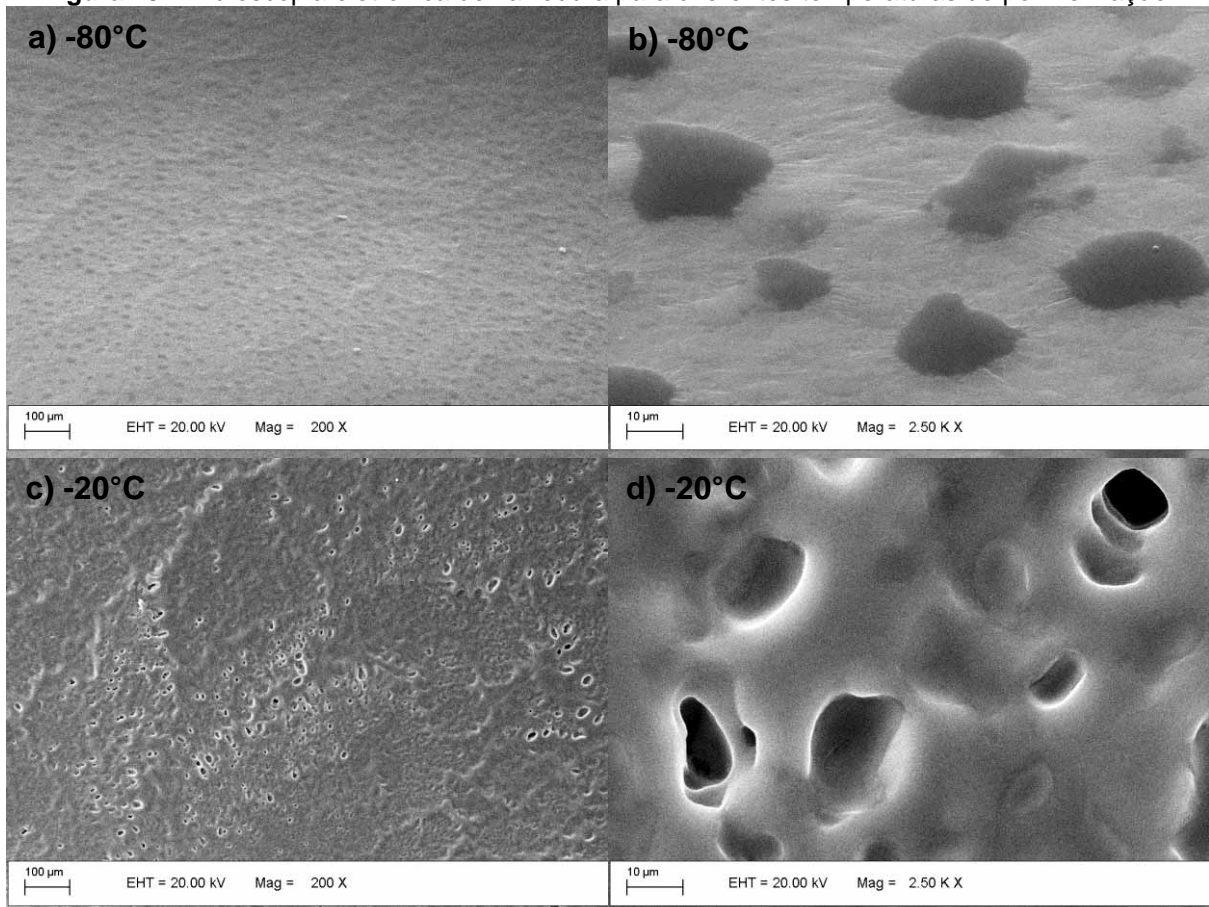


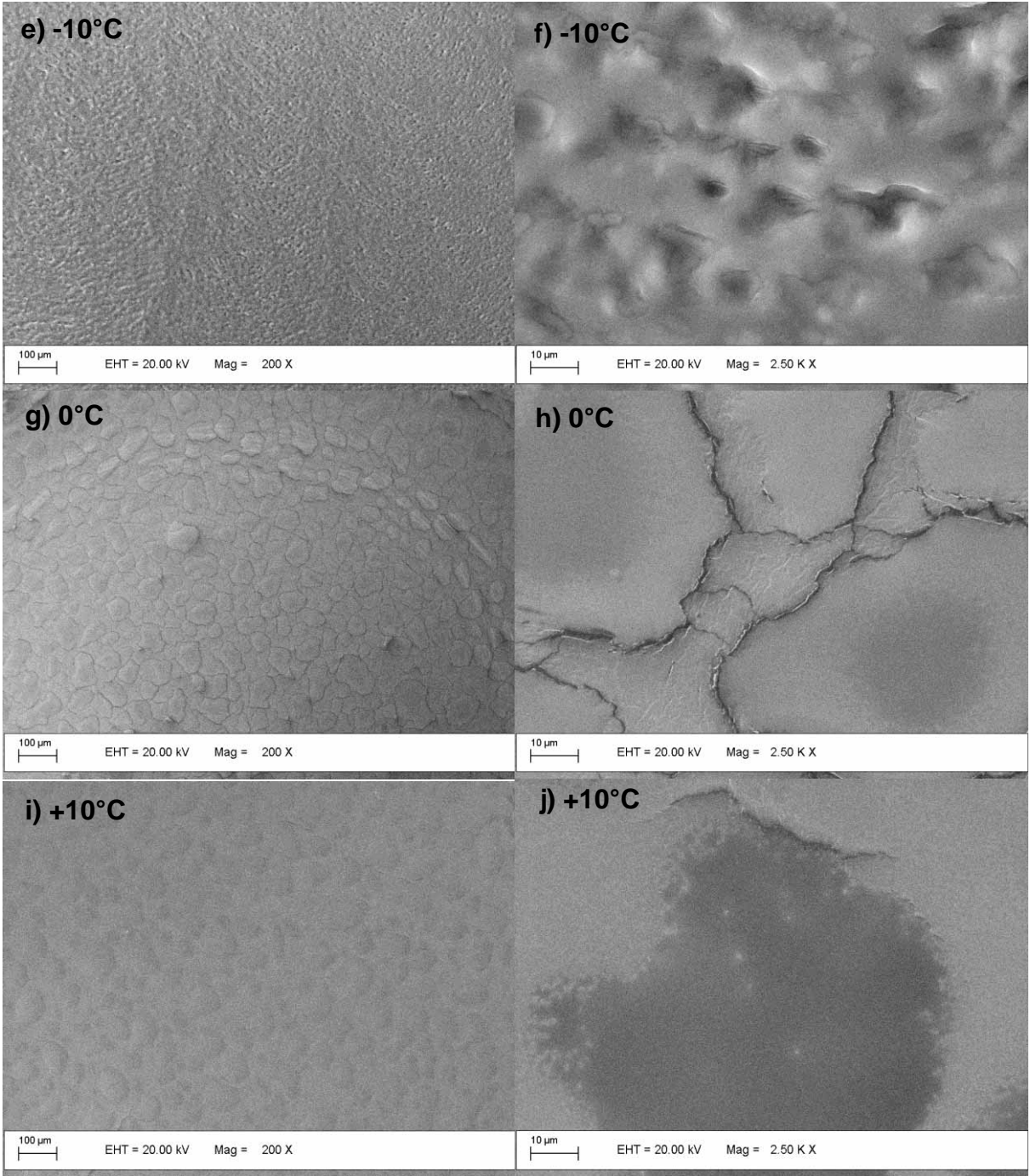
Fonte: Autoria própria.

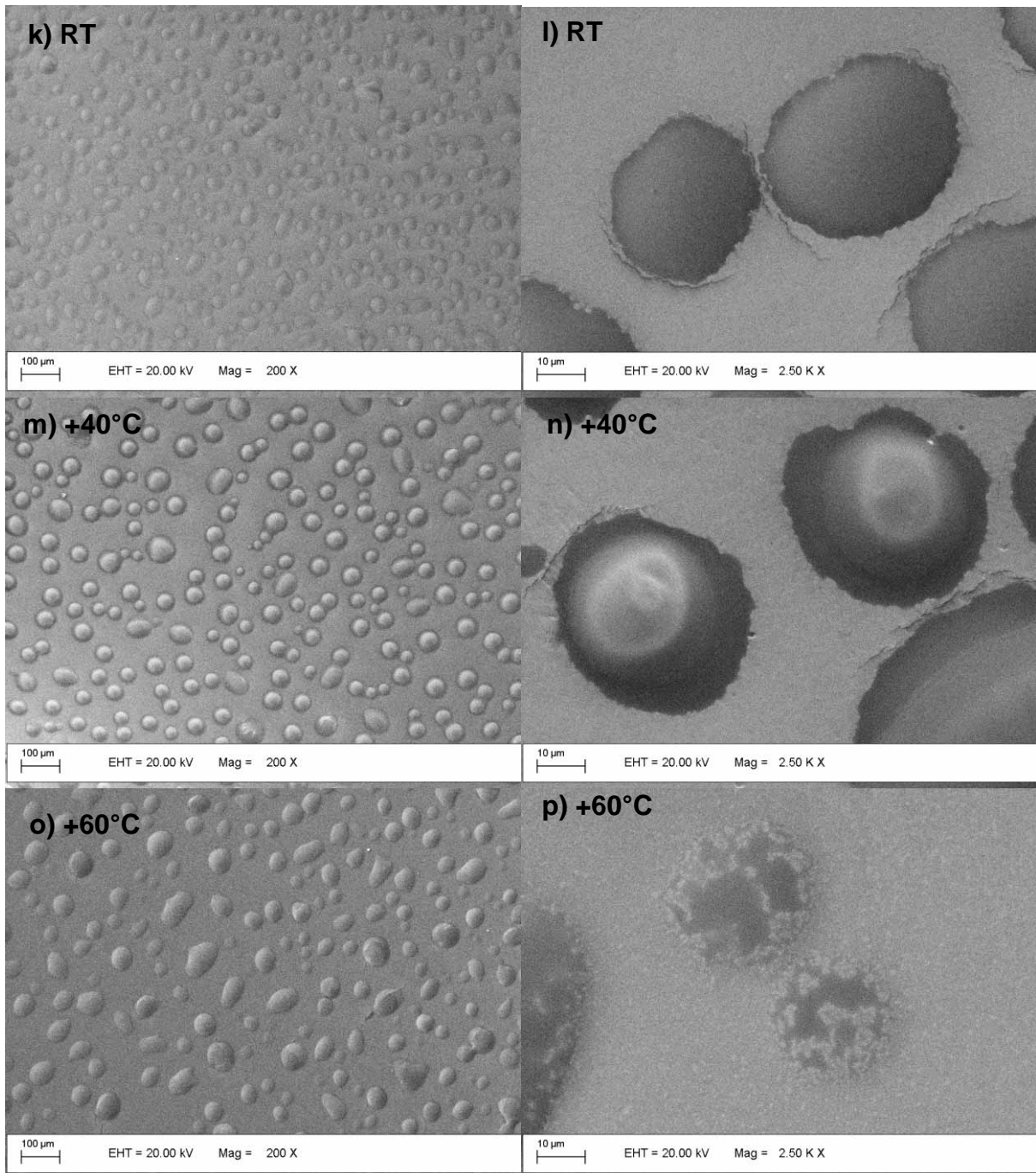
4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para visualizar o efeito da técnica TIPS sobre a superfície do material e poder mensurar o tamanho dos poros, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV), o qual incide um feixe de elétrons na superfície da amostra, gerando elétrons secundários que são detectados e convertidos em imagem. A Figura 15 mostra que todas as membranas apresentam irregularidades em suas superfícies, e a Figura 16 as que apresentaram porosidade (-10°C e -20°C).

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura para diferentes temperaturas de polimerização.



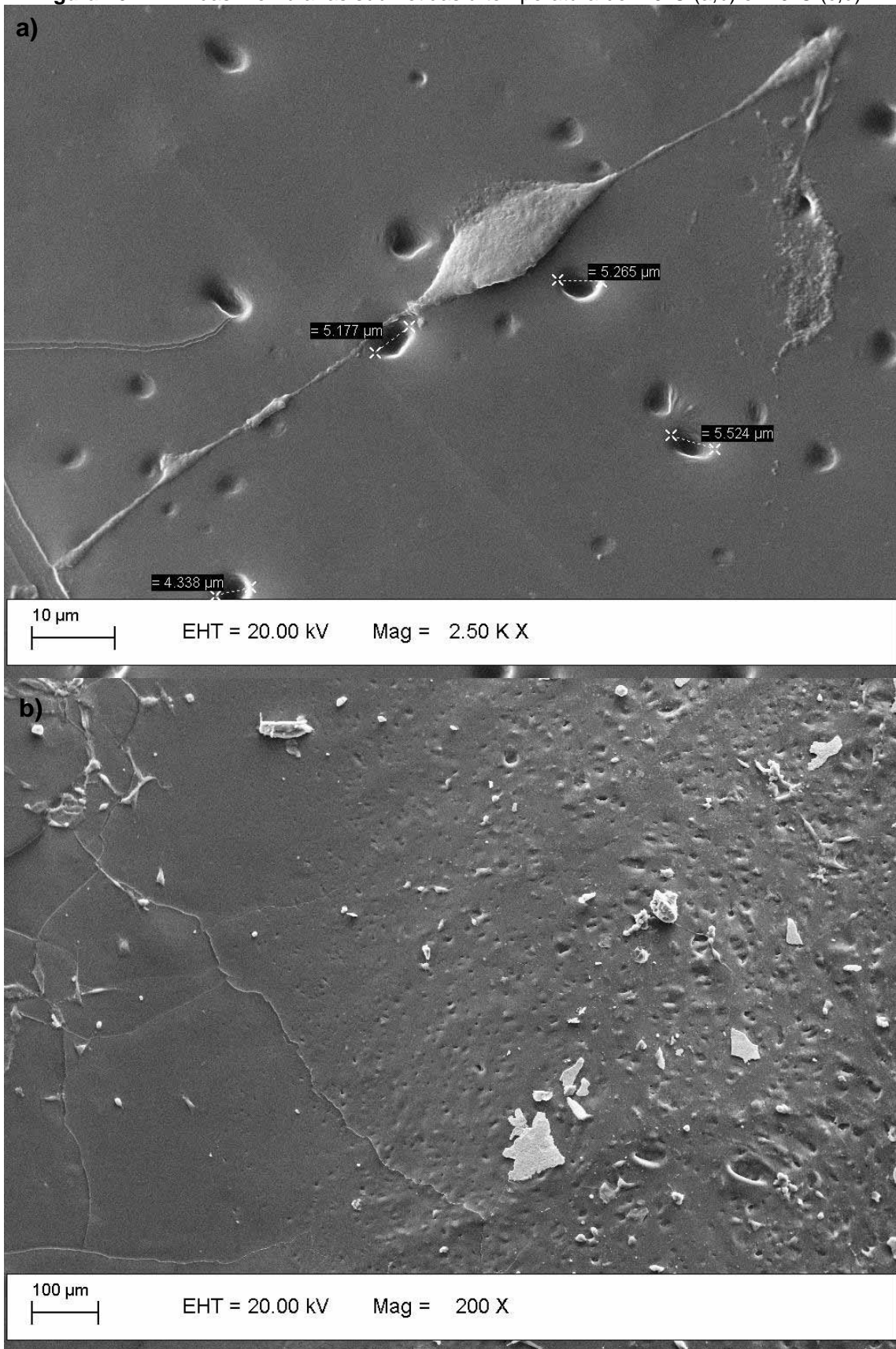


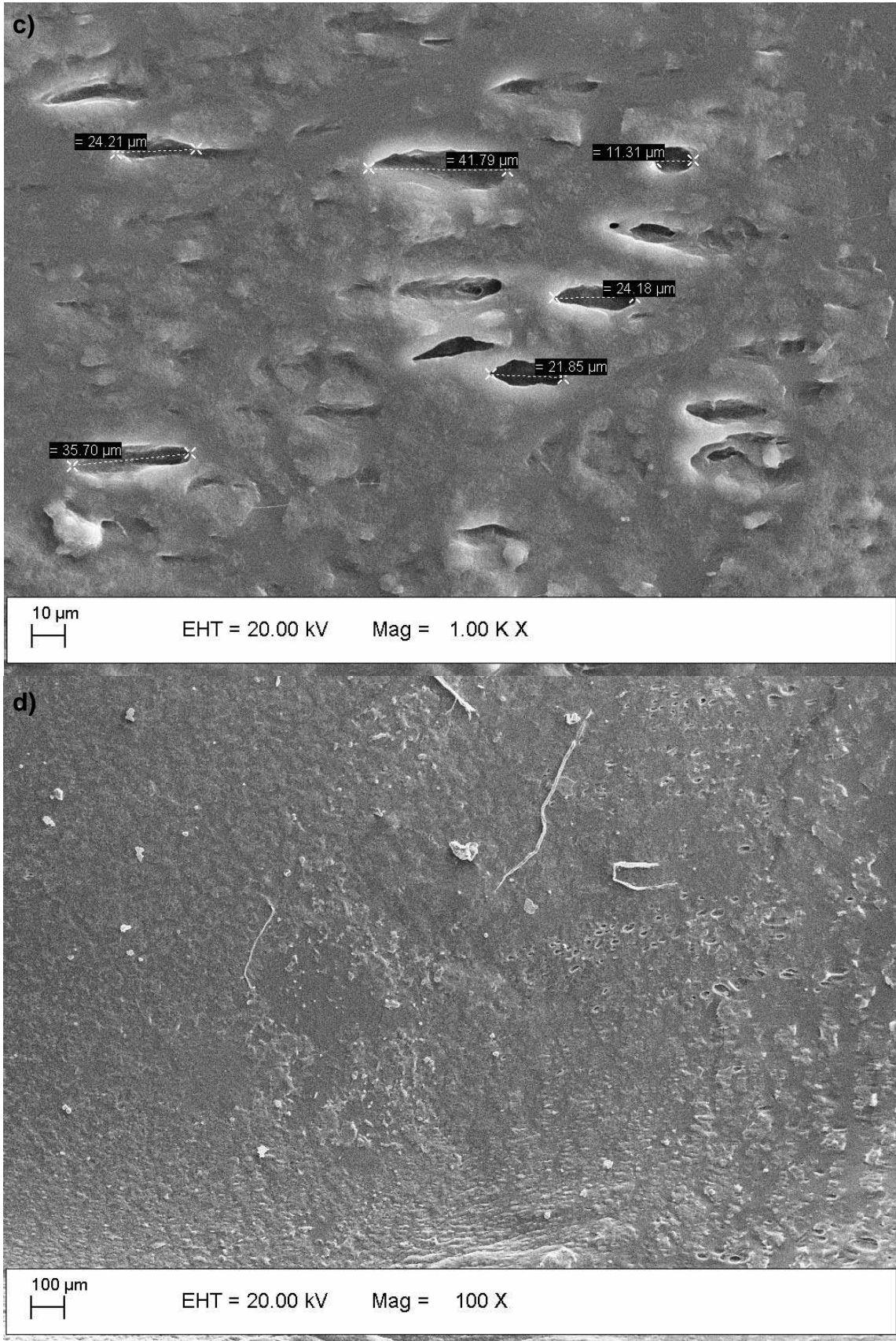


Fonte: Autoria própria.

As membranas submetidas à temperatura de -10°C e -20°C (Figura 16) apresentam porosidade entre $4,33\text{-}5,52\ \mu\text{m}$ e $11,31\text{-}41,79\ \mu\text{m}$ respectivamente, sendo que as membranas têm valores bem inferiores ou próximos ao mínimo ($40\ \mu\text{m}$) encontrado Pamula et al.⁶² ou aos $100\ \mu\text{m}$ para que ocorra transporte de nutrientes e oxigênio.⁶⁵

Figura 16 - MEV das membranas submetidas à temperatura de -10°C (a,b) e -20°C (c,d).





Fonte: Autoria própria.

Porém a porosidade não condiz com a literatura, que pode ser devido ao uso das soluções utilizadas para incorporar BSA e metronidazol, o que aumenta a quantidade de água, reduzindo a concentração e viscosidade da solução.^{32,35,108}. Santos et al.¹⁰⁹ também produziu porosidade em membranas de látex aplicando baixas temperaturas, porém a técnica utilizada tenha sido por *spin-coating*, observando maior quantidade de poros e com uma distribuição mais regular (com aproximadamente 30 μm) para a temperatura próxima à de fusão da água (-1°C), não observando porosidade para membranas sem tratamento térmico.

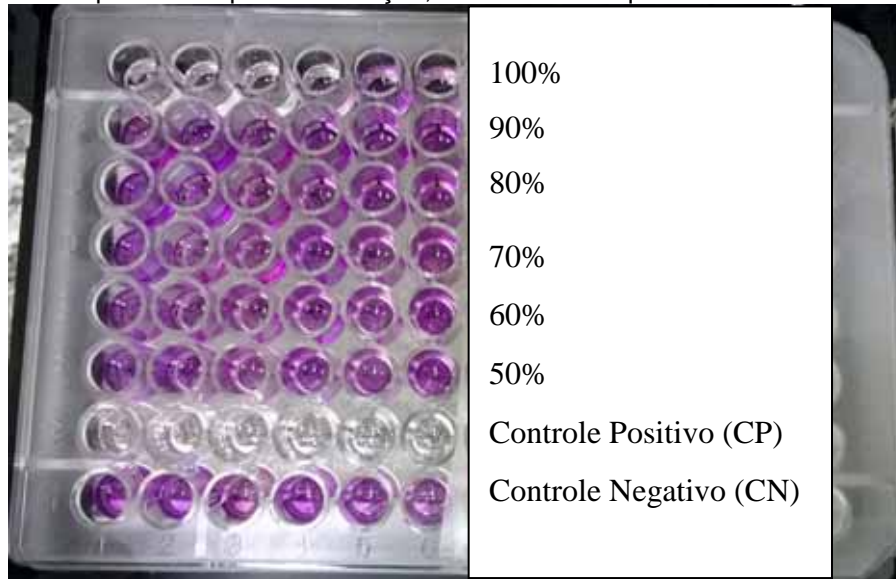
A porosidade também pode explicar a menor resistência mecânica das membranas, uma vez que reduzem a densidade de ligações. Guann et al.¹⁰⁸ também obteve uma redução na tensão de ruptura com o aumento da porosidade no elastômero PEEUU (poli(éter-éster-uretano)uréia) , porém neste trabalho para a concentração de 10%, quanto menor a temperatura menor o tamanho dos poros.

4.2 Cultura celular

4.2.1 Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado conforme as normas das ISO 10993-5 pela técnica de MTT (Figura 17), utilizando o extrato do material.⁸⁹ Os gráficos são mostrados em absorbância (Figura 18.a) e em porcentagem da viabilidade (Figura 18.b) em relação ao controle negativo (CN, poliestireno da placa de cultura). É possível observar em ambos os gráficos que o controle positivo (CP, luva de látex) mostrou-se tóxico, assim como para as extrações em alta concentração, sendo que a partir de 70% a viabilidade não é reduzida.

Figura 17 - Microplaca de 96 poços para o teste de citotoxicidade; notar que o controle positivo e a extração a 100% apresentam pouca coloração, devido à baixa quantidade de cristais de formazan.

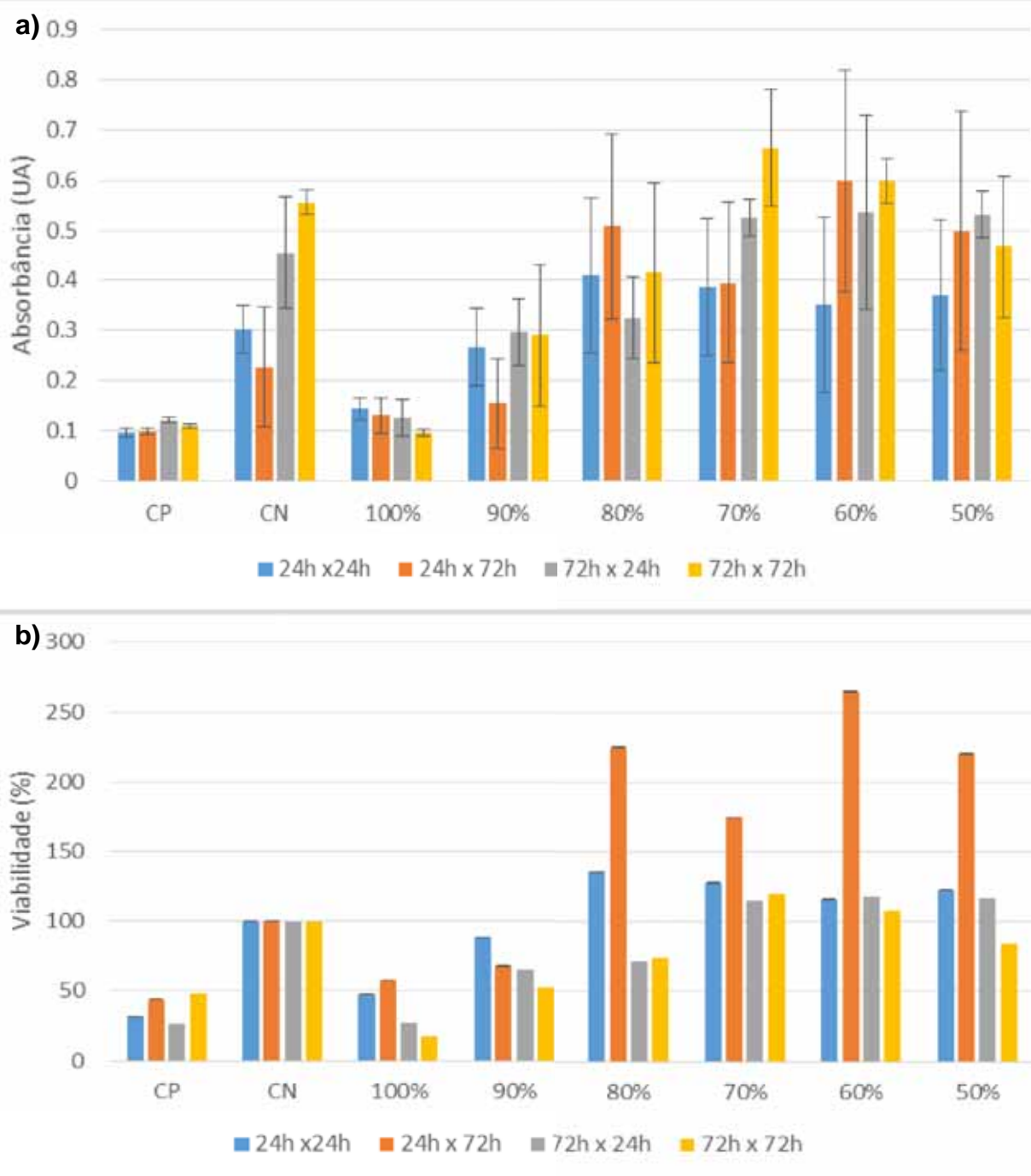


Fonte: Autoria própria.

Na Figura 18 o primeiro valor é referente ao tempo de extração (24 ou 72 horas) e o segundo valor é referente ao tempo de contato com as células. Nota-se que ambos os fatores podem influenciar a citotoxicidade, sendo para altas concentrações, o tempo de extração menor tende a apresentar menos toxicidade (Figura 18.b). Com o aumento do tempo de contato com as células, nota-se uma recuperação da viabilidade da cultura submetida à extração por 24 horas, e inclusive um aumento da viabilidade para as concentrações do extrato de 80 a 50%. Resultado semelhante foi observado por Floriano et al.¹¹⁰, que observou que membranas de látex sem amônia eram menos citotóxicas, também observando aumento da viabilidade quando usado os clones RRIM600 e IAN873.

O látex natural também pode ser modificado para permitir o crescimento celular e reduzir a toxicidade. Kanjanathaworn et al.¹¹¹ ao recobrir o látex natural com a mistura de poli(metil metacrilato) e quitosana, observou uma redução na toxicidade e Davi et al.³¹ ao usar poli(hidrocloro de alanina) no látex observou um aumento na proliferação em relação ao controle.

Figura 18 - Citotoxicidade pelo método de MTT demonstrada pela absorbância (a), viabilidade celular em relação ao controle positivo (b); o primeiro número da legenda se refere ao tempo de extração em horas, o segundo ao tempo de contato em horas durante a cultura.



Fonte: Autoria própria.

O solvente de extração usado para realizar o teste foi o meio de cultura com adição de soro. Segundo Baek et al.⁹⁰ este meio permite extrair os componentes polares e apolares, sendo mais eficiente que a água destilada, solução salina e o uso apenas do meio de cultura. É possível observar que o extrato bruto do látex natural é citotóxico, porém isso não é observado para concentrações menores que

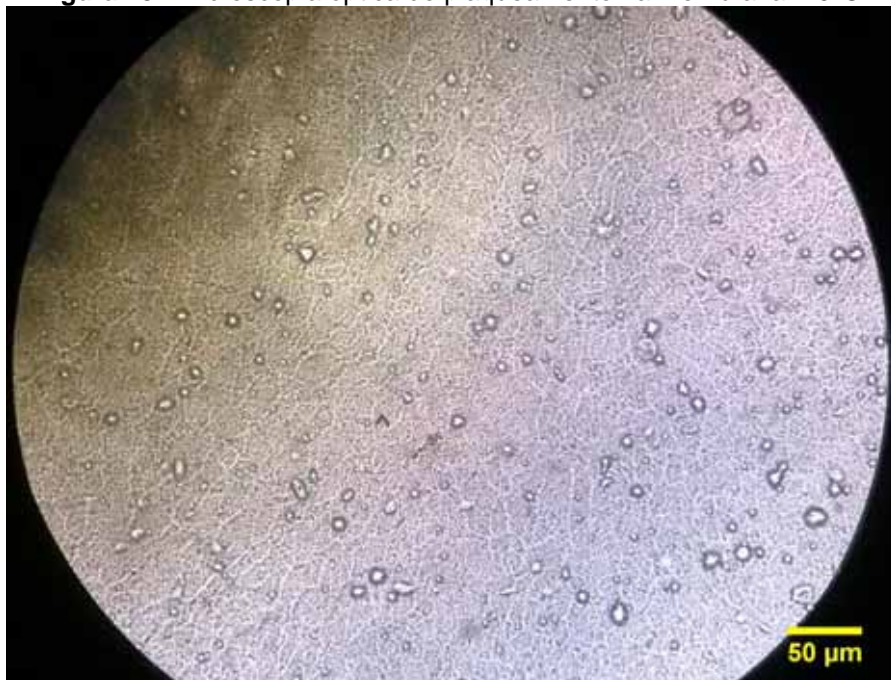
80%. A comparação com os resultados de Baek et al.⁹⁰ leva a crer que a centrifugação de fato torna o látex mais biocompatível, uma vez que mesmo a diluição de 3,13% do extrato de lúvas de látex causou uma viabilidade inferior a 10%. Davi et al.³¹ observou que mesmo com uma solução de látex a 2,5 $\mu\text{L/L}$, não houve crescimento de fibroblastos.

4.2.2 Cultura de células na membrana

4.2.2.1 Formação da matriz mineralizada

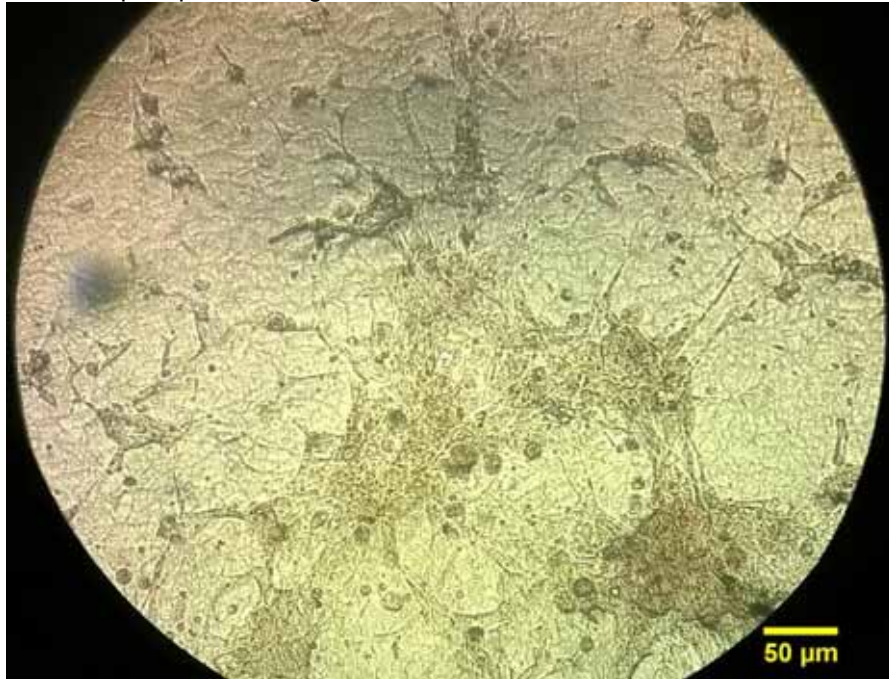
As células foram depositadas na densidade de 2×10^4 células/ cm^2 em placa de 24 poços e cultivadas com meio para mineralização (meio de expansão, suplementado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico e 10 mM de β -glicerofosfato). A partir da Figura 19 é possível observar o primeiro dia de plaqueamento (sobre membrana polimerizada a -20°C), em que as células ainda se encontram arredondadas, sendo que com um dia de cultura (Figura 20), é possível observar adesão e formação de colônias. Também é possível notar as fissuras na membrana de látex.

Figura 19 - Microscopia óptica do plaqueamento na membrana -20°C .



Fonte: Autoria própria.

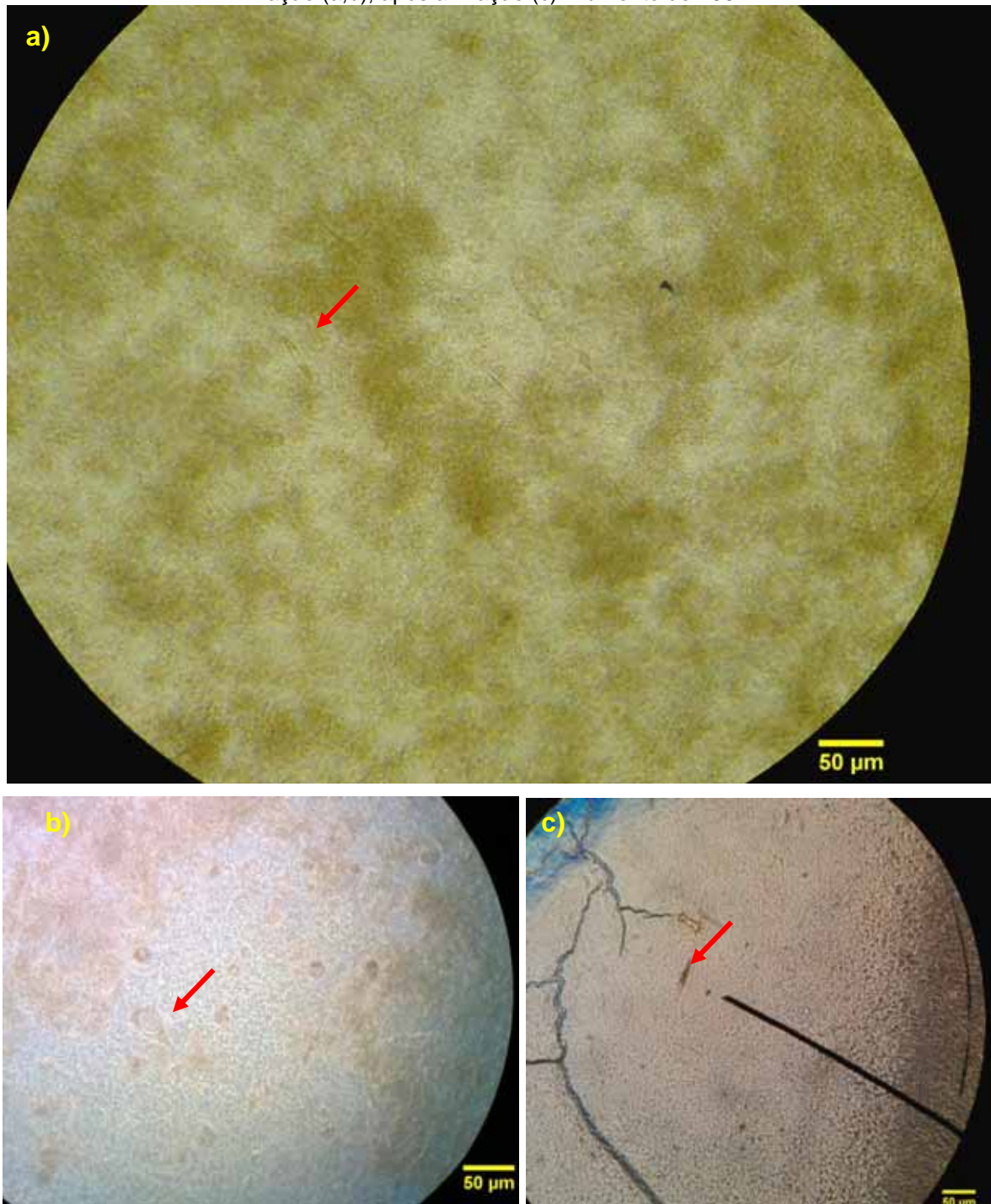
Figura 20 - Microscopia óptica do segundo dia de cultura na membrana -20°C. Aumento de 100x.



Fonte: Autoria própria.

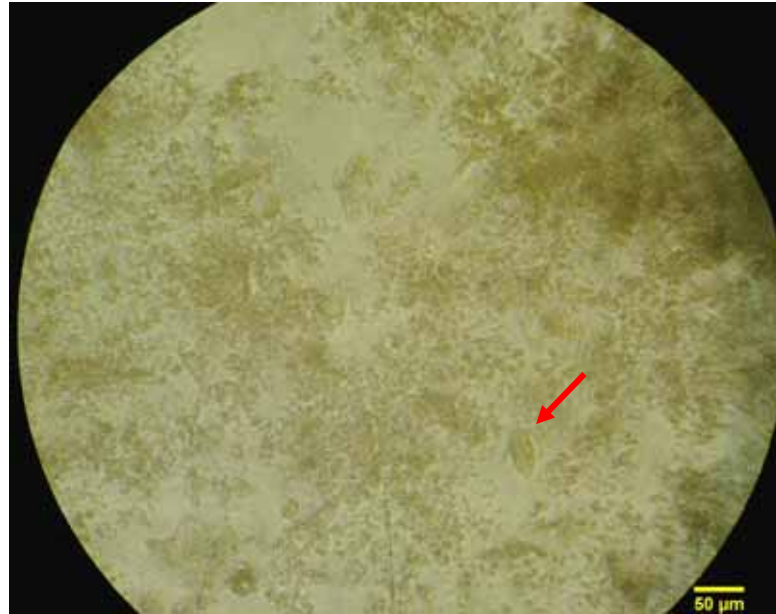
Após 21 dias de cultura não é mais possível observar as fissuras da membrana de látex e que torna-se difícil observar as células devido a deposição de matriz pelas células. Nas Figuras 21 e 22, as células são identificadas pela seta vermelha.

Figura 21 - Microscopia óptica das células após 21 dias de cultura na membrana de -20°C : antes da fixação (a,b), após a fixação (c). Aumento de 100x.



Fonte: Autoria própria.

Figura 22 - Microscopia óptica da cultura por 21 dias sem a membrana. Aumento de 100x.



Fonte: Autoria própria.

4.2.2.1.1 Coloração de von Kossa e vermelho de alizarina S

A detecção da matriz mineralizada pelas células (Figuras 23 e 24) foi realizada pelo método de von Kossa para detecção de fosfato e carbonato e por vermelho de alizarina S para detecção do cálcio, sendo possível observar que houve deposição de ECM por toda a área do poço de cultura.

Figura 23 - Detecção da mineralização após 21 dias de cultura na membrana a -20°C: von Kossa (a), vermelho de alizarina S (b).



Fonte: Autoria própria.

Figura 24 - Detecção da mineralização após 21 dias sem membrana: von Kossa (a), vermelho de alizarina S (b).



Fonte: Autoria própria.

A extração do corante para quantificação não demonstrou diferença estatística significativa entre a cultura com a membrana de látex a -20°C e a cultura sem a membrana (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantificação da mineralização pela absorbância do vermelho de alizarina S após 21 dias de cultura.

Cultura por 21 dias	Absorbância (UA)
Membrana -20°C	$0,13 \pm 0,01^{a*}$
Sem membrana	$0,16 \pm 0,02^a$

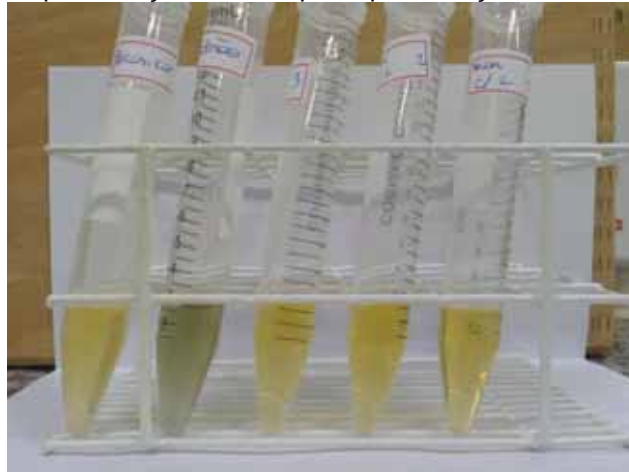
*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$).

Fonte: Autoria própria.

4.2.2.1.2 Fosfatase alcalina (ALP)

Durante o crescimento e diferenciação celular a célula passa por quatro estágio: proliferação, produção de MEC, maturação da matriz e posteriormente apoptose.¹¹² A enzima fosfatase alcalina é um dos indicadores da diferenciação osteoblástica, e é responsável por liberar fosfato para a mineralização.¹¹³ A Figura 25 exemplifica o método colorimétrico de detecção. A partir dos resultados, obteve-se que a atividade da enzima foi superior com o uso da membrana de látex (Tabela 4).

Figura 25 - Representação do teste para quantificação da fosfatase alcalina.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 - Quantificação da enzima fosfatase alcalina após 21 dias de cultura.

Cultura por 21 dias	Concentração (U/L)
Membrana -20°C	2,74 ± 0,42 ^a
Sem membrana	1,21 ± 0,44 ^b

*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$).

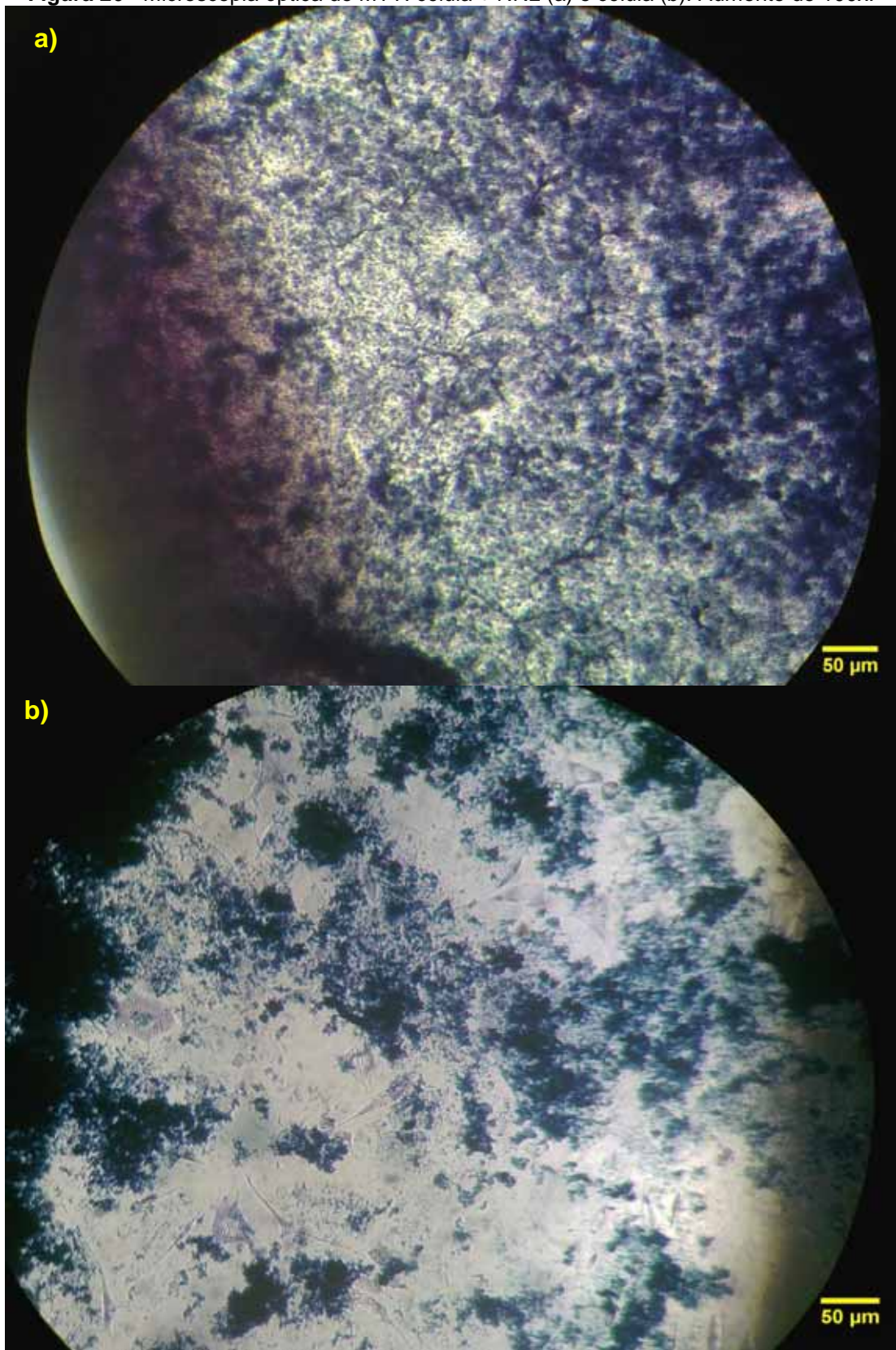
Fonte: Autoria própria.

Embora não houve diferença na mineralização quando comparado a absorvância do vermelho de alizarina, as células sobre a membrana obtiveram maiores valores para a atividade da enzima fosfatase alcalina. Essa falta de correlação também foi observada por Liporaci-Jr¹¹⁴.

4.2.2.1.3 Metabolismo de MTT

É possível verificar na Figura 26 a viabilidade celular, a partir da redução do MTT pela enzima desidrogenase mitocondrial de células viáveis em cristais de formazan.⁹¹ Porém sua quantificação não foi possível, pois a matriz produzida pelas células interagiu com o MTT, como pode ser observado na Figura 26.

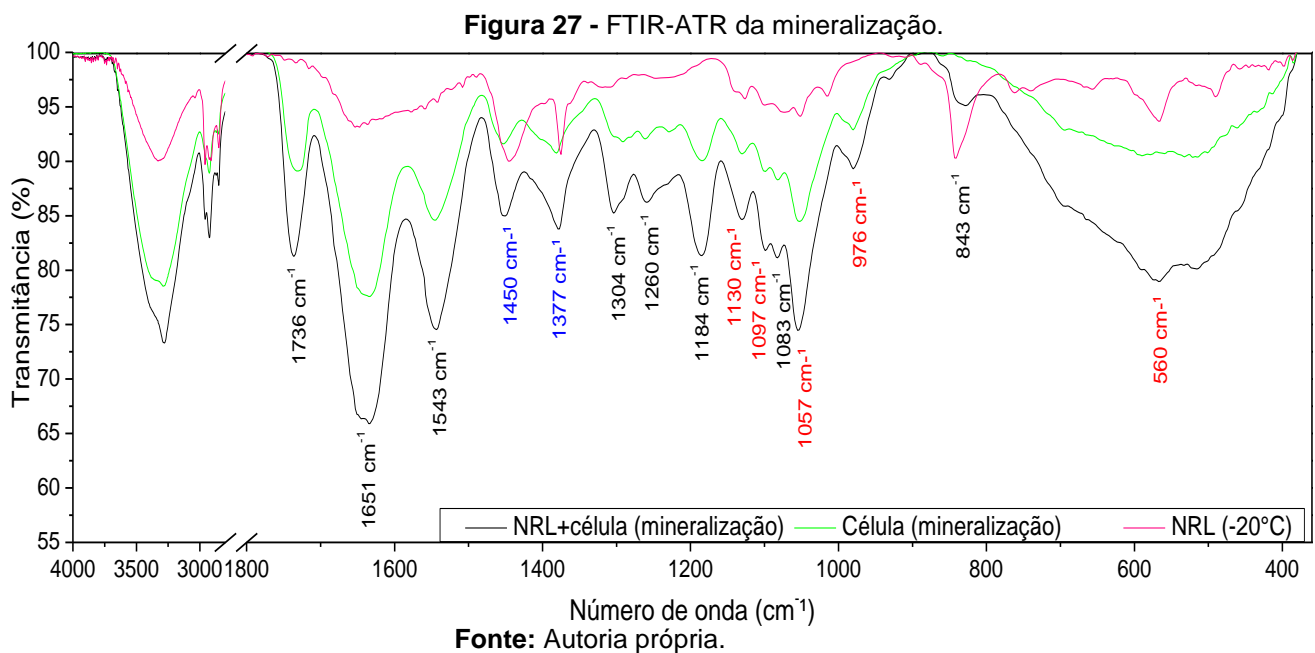
Figura 26 - Microscopia óptica do MTT: célula + NRL (a) e célula (b). Aumento de 100x.



Fonte: Autoria própria.

4.2.2.1.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A mineralização também foi avaliada pela técnica de FTIR-ATR (Figura 27) aos 21 dias de cultura celular, onde estão presentes os espectros da membrana polimerizada a -20°C (em amarelo), apenas da cultura celular sob mineralização (em verde) e da cultura sob mineralização sobre a membrana (em preto).

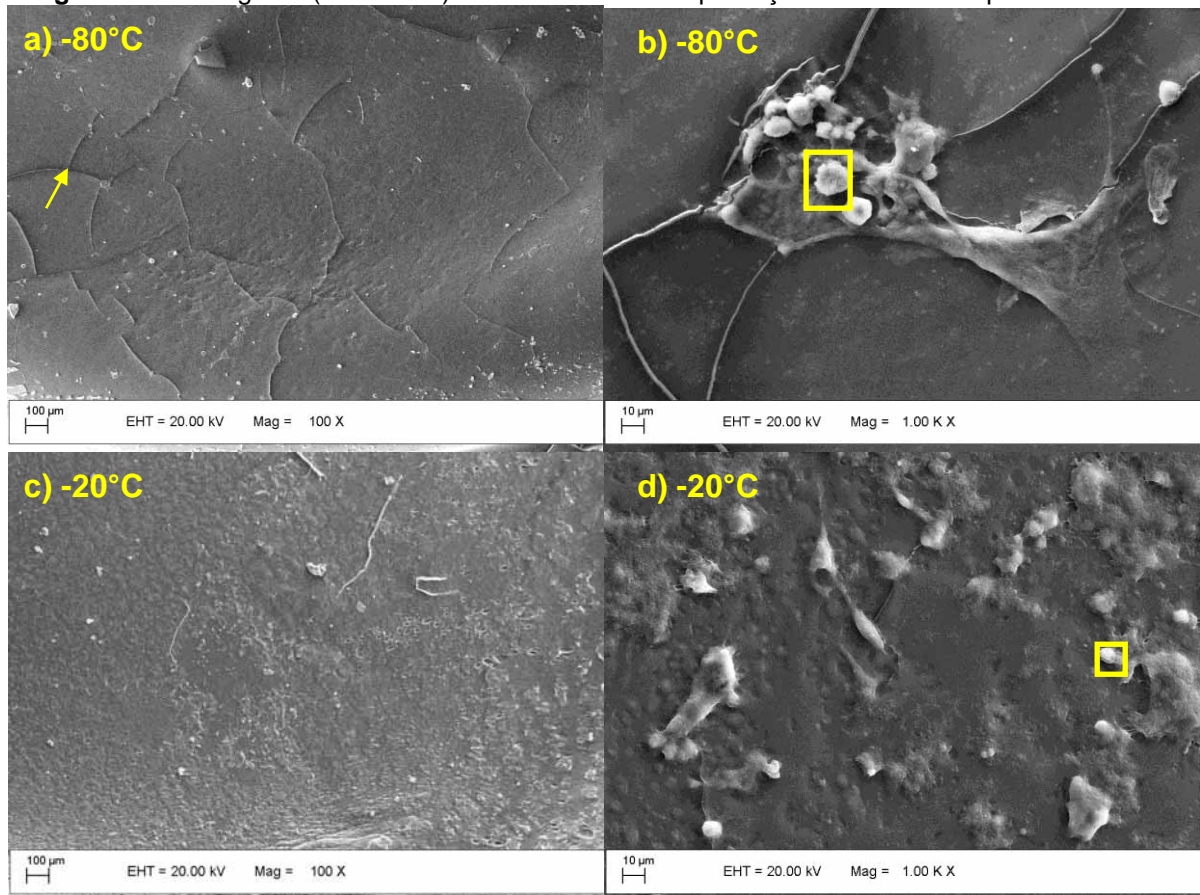


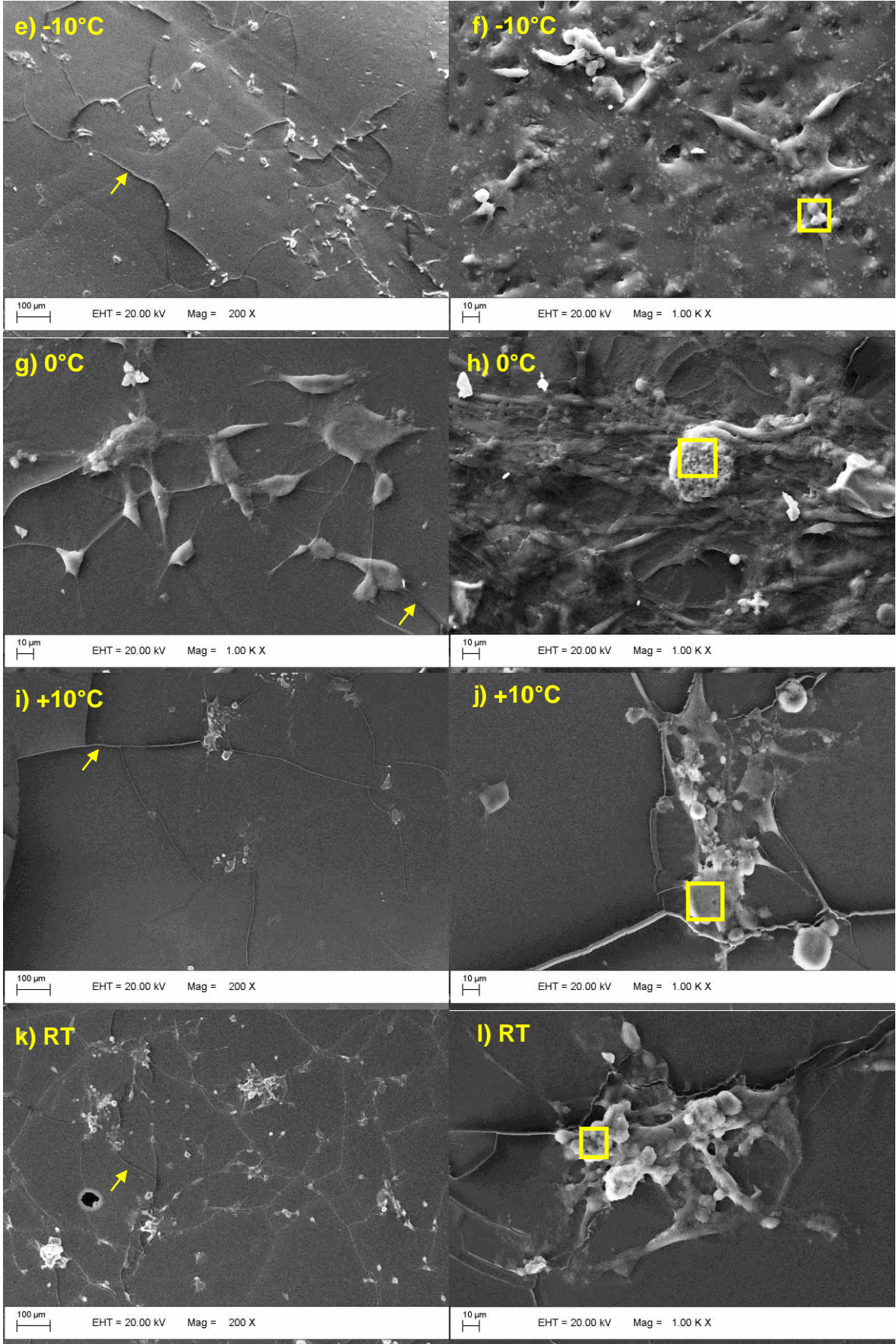
Como pode ser observado, as análises foram feitas sem a remoção do material orgânico, principalmente devido às absorvâncias em 1651 , 1543 e 1260 cm^{-1} , correspondentes à amida primária, secundária e terciária, respectivamente. As bandas de absorvância relacionadas ao fosfato em: 560 cm^{-1} está relacionada ao vibracional $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ (deformação assimétrica em O-P-O), 976 cm^{-1} está relacionada ao $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (estiramento simétrico) e em 1057 , 1097 e 1130 cm^{-1} estão relacionadas ao $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ (estiramento assimétrico em P-O). As bandas de absorção em 1450 e 1377 cm^{-1} podem estar relacionadas ao carbonato CO_3^{2-} ou à deformação em C-H.¹¹⁵⁻¹¹⁷

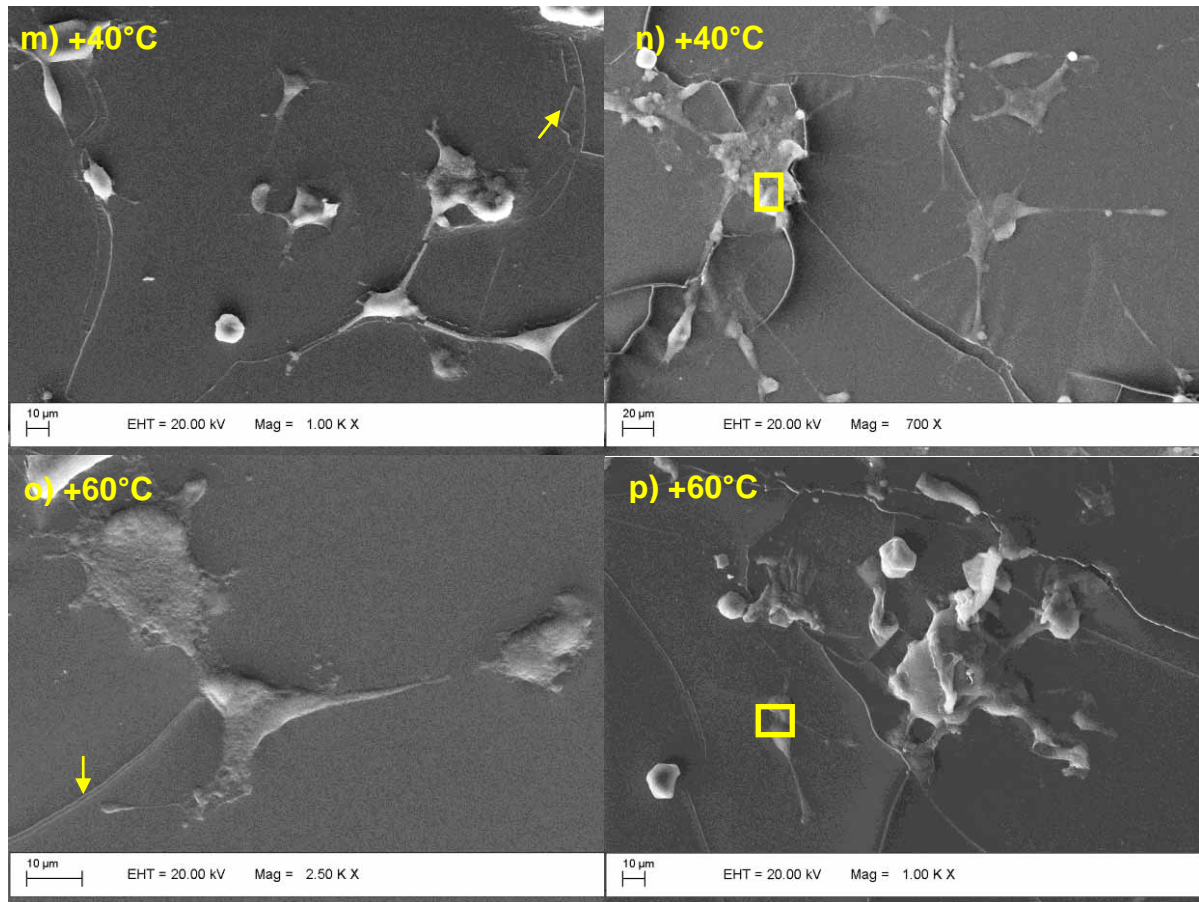
4.2.2.2 Morfologia celular

O MEV gera imagens topográficas da superfície das amostras, podendo obter a morfologia celular quando em contato com a superfície, fornecendo informações da adesão da célula sobre o material. Com o acessório de EDS também é possível obter informações sobre a formação de MEC a partir da análise composicional, como pode ser observado na Figura 28, onde as regiões delimitadas são as áreas de realização do EDS e as setas indicam fraturas na membrana.

Figura 28 - Micrografia (MEV-EDS) da adesão celular e produção de MEC na superfície da NRL.







Fonte: Autoria própria.

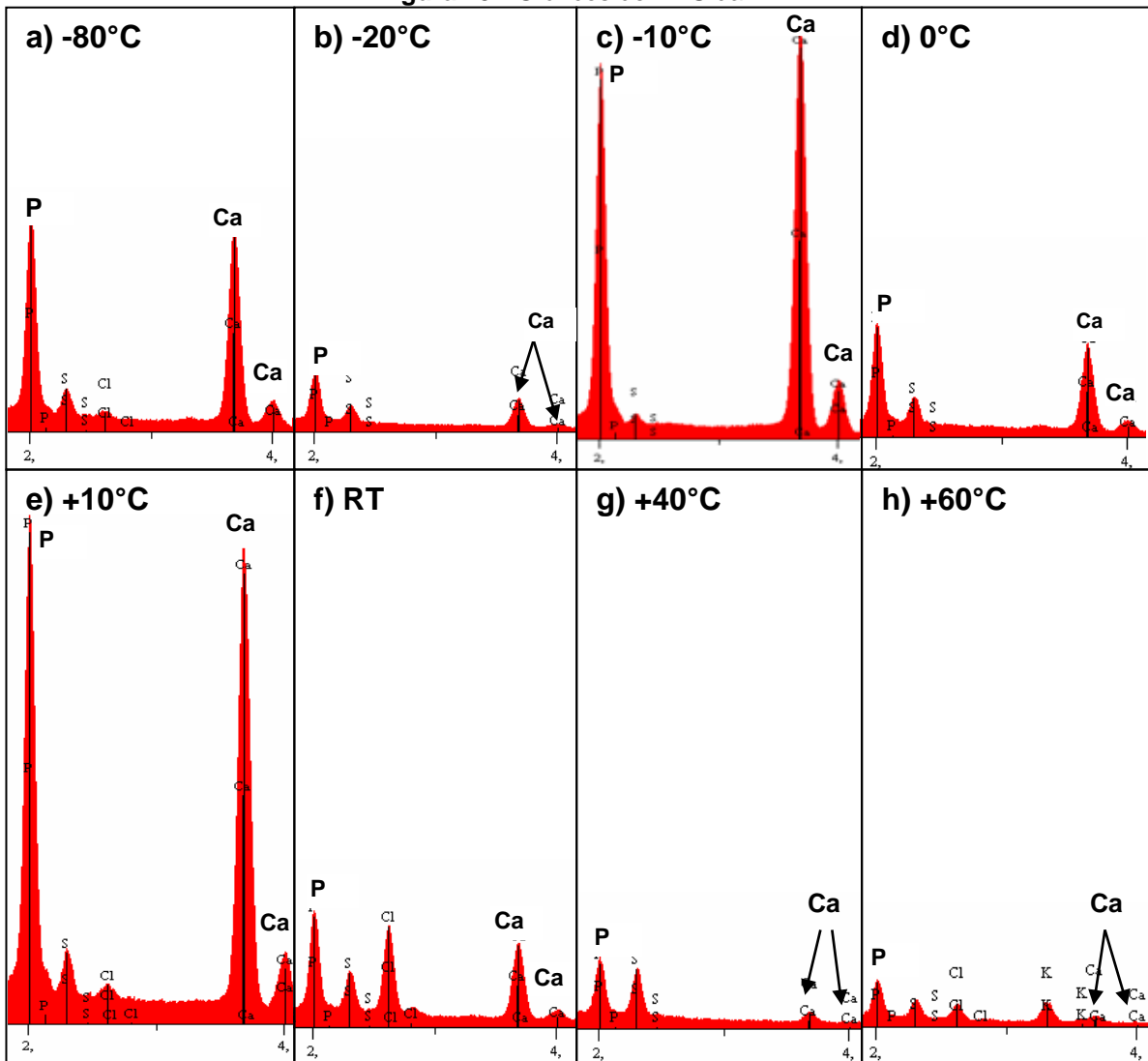
A partir das micrografias do MEV obtidas das células na superfície da membrana é possível observar que as células encontram-se aderidas e espalhadas aleatoriamente na superfície. Trabalhos mostram que é possível alinhar e direcionar o crescimento dessa linhagem celular quando a superfície do material apresenta ranhuras em sua superfície.¹¹⁸⁻¹²⁰

É possível observar uma alteração na superfície das membranas com o tempo em cultura. Comparando as micrografias do MEV antes (Figura 15) e depois (Figura 28), respectivamente da adesão celular, percebe-se que tornaram-se mais lisas, exceto para as membranas tradas abaixo de 0°C. As rachaduras encontradas nas membranas (Figura 28, seta amarela) podem ser devido à desidratação das membranas após a retirada do meio de cultura. A alteração na rugosidade de filmes de látex foi observada por Ho et al.¹²¹ tanto durante a exposição ao ar quanto quando submetida à lixiviação, atribuindo o achatamento da superfície à gravidade e

ao material estar acima de sua Tg; além disso também observou que as rachaduras poderiam ser pela retirada de material antioxidante.

Também fica evidente a produção de MEC a partir do MEV-EDS, porém razão entre Ca/P obtida pela técnica de EDS (Figura 29) fornece diferentes valores conforme a Tabela 5, sendo que somente na membrana produzida a -80°C observou-se a proporção Ca/P próxima ao da hidroxiapatita (1,67).¹¹⁶ Soboyejo et al.¹²² observou a formação de matriz extracelular em células aderidas em superfície de titânio no segundo dia de cultura.

Figura 29 - Gráficos de EDS da NRL.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Proporção Ca/P por MEV-EDS das culturas celulares nas membranas a diferentes temperaturas.

	-80°C	-20°C	-10°C	0°C	+10°C	RT	+40°C	+60°C
Ca/P	1,65	1,11	1,23	1,26	1,26	1,03	0,27	0,27

Fonte: Autoria própria.

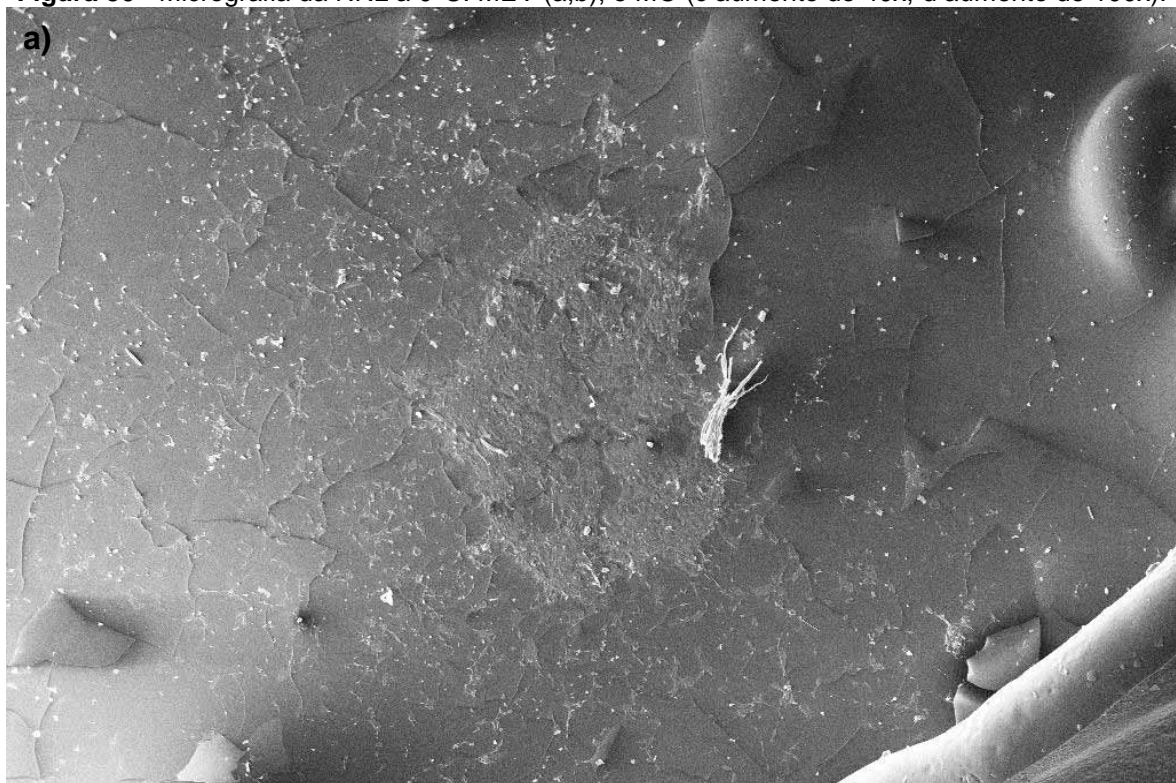
Observam-se células arredondadas (pouca adesão), células com morfologia fusiformes e com poucos filopódios e lamelipódios, e células com uma superfície lisa/plana e espaiadas, com muitos filopódios e lamelipódios e conexões intercelulares. Estas estruturas celulares sugerem excelente adesão das células ao substrato.¹²⁰

Como citado anteriormente, essa linhagem celular é capaz de responder à geometria e topografia de superfície.¹²² As membranas elaboradas na temperatura de -80°C, -20°C e -10°C apresentam uma superfície com mais irregularidades (rugosidade e porosidade). Nota-se que nessas regiões há pouca ou nenhuma adesão celular. Diversos fatores são responsáveis pela adesão celular ao *scaffold*. Segundo a literatura, as células aderem e alongam sem proliferação em superfícies com ranhuras comparáveis ao tamanho celular, porém as células proliferam em ranhuras menores que o tamanho celular.¹²² Os osteoblastos preferem superfícies com nanorugosidades a superfícies com submicro- ou microrugosidade.¹¹⁹

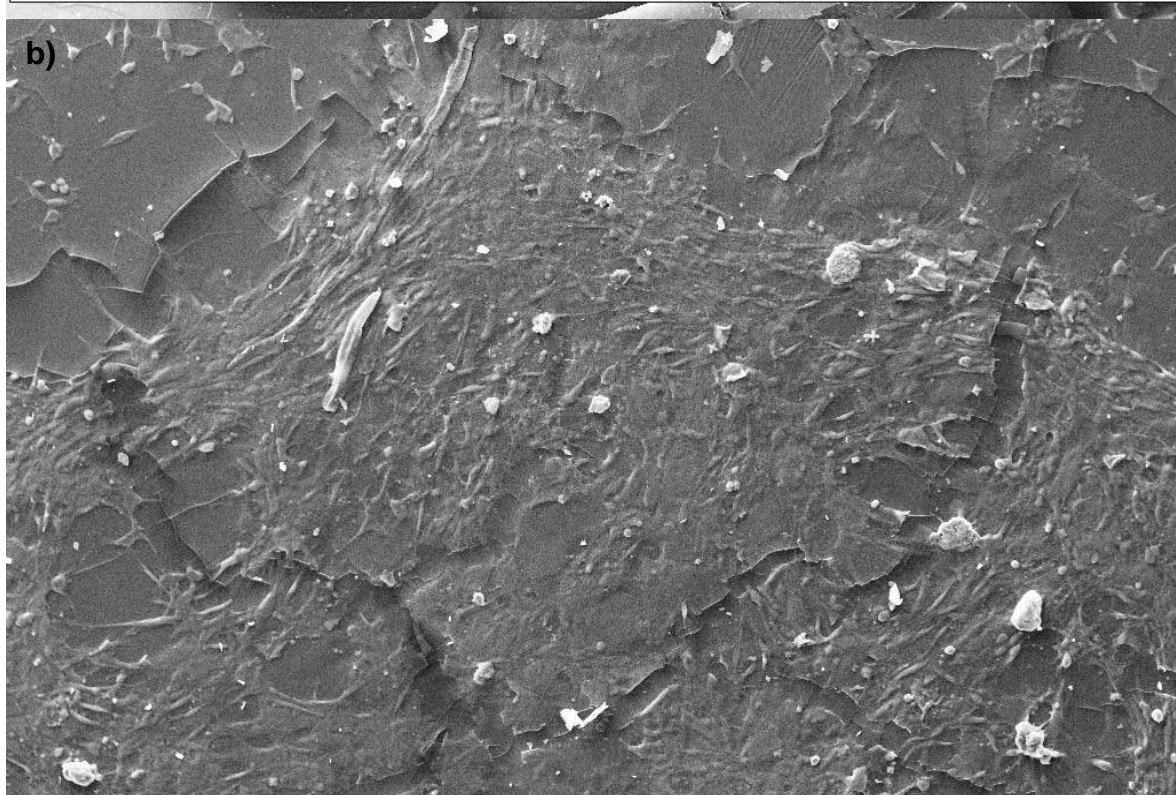
Embora observado nas Figuras 15, 16 e 28, as membranas a -10°C e -20°C apresentam porosidade, devido às dimensões das células (entre 40-50 µm) não foi possível observar a invasão celular nas porosidades.

Embora o escopo do projeto seja relacionado à porosidade, observou-se que a membrana à temperatura de 0°C obteve maior proliferação celular. A partir das micrografias (Figuras 14.d e 15.h) nota-se que é uma das membranas com menos irregularidades em sua superfície, tal fato pode ter favorecido a adesão inicial e maior número de células. Tanto a micrografia do MEV (Figura 30.a,b) quanto a do MO (produzidas antes de fixar as células e da retirada do meio de cultura, Figura 30.c,d) mostram a mesma colônia em que torna-se difícil distinguir os limites celulares devido à confluência.

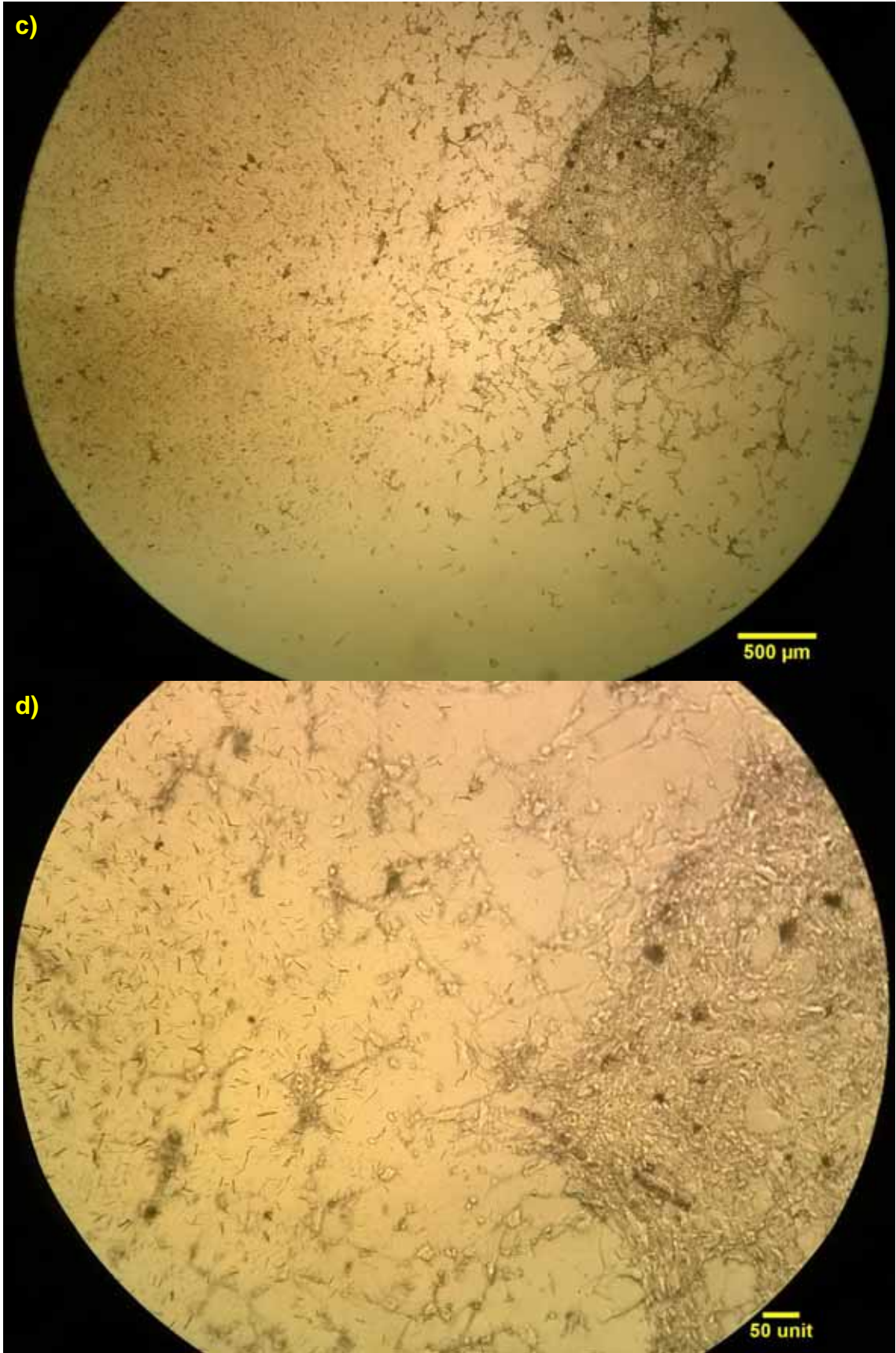
Figura 30 - Micrografia da NRL a 0°C. MEV (a,b), e MO (c aumento de 40x, d aumento de 100x).



200 μm EHT = 20.00 kV Mag = 50 X



100 μm EHT = 20.00 kV Mag = 200 X



Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÃO

O tratamento térmico não alterou quimicamente a membrana de látex segundo o FTIR-ATR, embora exista algumas diferenças nas propriedades mecânicas de algumas amostras.

Na microscopia óptica foram observadas diferenças na morfologia superficial entre -80°C, -20°C, -10°C e 0°C, porém a partir de 0°C todas as membranas foram semelhantes. Pelo MEV, apenas as membranas polimerizadas a -10°C e -20°C apresentaram porosidade, com dimensões de 4,33-5,52 µm e 11,31-41,79 µm, respectivamente. No entanto os tamanhos observados foram inferiores ao necessário para que ocorra infiltração celular e transporte de nutrientes e metabólitos e oxigenação

Apesar o látex ser hidrofóbico, as células foram capazes de aderir e produzir matriz na membrana a tratada a -20°C aos 21 dias de cultura. A mineralização foi analisada por EDS, FTIR-ATR, vermelho de alizarina S e von Kossa. Embora não houvesse diferença estatística na mineralização quando comparada a absorbância do vermelho de alizarina, as células sobre a membrana obtiveram maiores valores para a atividade da enzima fosfatase alcalina. Indicando pelo método MTT também foi possível observar que as células se encontram metabolicamente viáveis.

As micrografias por MEV-EDS mostraram que as células aderiram em todos os tratamentos térmicos, apresentando estruturas de adesão, como filopódios e lamelipódios, sendo que o tratamento a 0°C proporcionou maior quantidade celular, aos sete dias de cultura.

Desta forma fica claro que a porosidade da membrana de látex natural pode ser manipulada pela técnica de TIPS e permite adesão, proliferação e mineralização celular, sendo viável seu uso como suporte celular para o uso em regeneração óssea guiada.

REFERÊNCIAS

- 1 FERREIRA, M.; MENDONCA, R. J.; COUTINHO NETTO, J.; MULATO, M. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 3, p. 564-569, 2009.
- 2 RIPPEL, M. M.; LEE, L. T.; LEITE, C. A. P.; GALEMBECK, F. Skim and cream natural rubber particles: colloidal properties, coalescence and film formation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 268, n. 2, p. 330-340, 2003.
- 3 INTERNATIONAL UNION OF IMMUNOLOGICAL SOCIETIES. **Allergen nomenclature**. Disponível em: <http://www.allergen.org/search.php?allergen_source=latex>. Acesso em: 13 maio 2013.
- 4 MRUE, F.; COUTINHO NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A.; TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v. 7, n. 2, p. 277-283, 2004.
- 5 GOODMAN, A.; SCHILDER, H.; ALDRICH, W. Thermomechanical properties of gutta-percha .2. History and molecular chemistry of gutta-percha. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 37, n. 6, p. 954-961, 1974.
- 6 MACHADO, J. **Obturação com condensação lateral versus obturação termoplástica com onda contínua de calor**. 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.
- 7 ALGER, M. **Polymer science dictionary**. 2nd ed. New York: Springer, 1996. 628 p.
- 8 JOHNS, J.; RAO, V. Thermal stability, morphology, and X-ray diffraction studies of dynamically vulcanized natural rubber/chitosan blends. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 15, p. 4087-4094, 2009.
- 9 INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **O cultivo da seringueira (*Hevea spp.*)**. Londrina. Disponível em: <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/cultsering.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2013.
- 10 MENDONCA, R. J.; MAURICIO, V. B.; TEIXEIRA, L. D. B.; LACHAT, J. J.; COUTINHO NETTO, J. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 5, p. 764-768, 2010.
- 11 ANDRADE, T. A. M.; IYER, A.; DAS, P. K.; FOSS, N. T.; GARCIA, S. B.; COUTINHO NETTO, J.; JORDAO, A. A.; FRADE, M. A. C. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, 2011.

- 12 SOUSA, L. C. A. D.; PIZA, M. R. D. T.; COUTINHO NETTO, J.; RUIZ, D. B.; SCHMIDT, V. B. Biomembrana de látex: novo método para o revestimento da cavidade aberta nas timpanomastoidectomia. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 3, p. 331-336, 2007.
- 13 ARAUJO, M. M.; MASSUDA, E. T.; HYPPOLITO, M. A. Anatomical and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural latex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 566-571, 2012.
- 14 OLIVEIRA, J. A. A. D.; HYPPOLITO, M. A.; COUTINHO NETTO, J.; MRUÉ, F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 5, p. 649-655, 2003.
- 15 FRADE, M. A. C.; VALVERDE, R. V.; ASSIS, R. V. C. de; COUTINHO NETTO, J.; FOSS, N. T. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **International Journal of Dermatology**, v. 40, n. 3, p. 238-240, 2001.
- 16 FRADE, M. A. C.; CURSI, I. B.; ANDRADE, F. F.; COUTINHO NETTO, J.; BARBETTA, F. M.; FOSS, N. T. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 32, n. 4, p. 157-162, 2004.
- 17 FRADE, M. A. C.; ASSIS, R. V. C. de; COUTINHO NETTO, J.; ANDRADE, T. A. M. D.; FOSS, N. T. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 1, p. 45-51, 2012.
- 18 ZIMMERMANN, M.; RAISER, A. G.; BRAGA, F. V. A.; TRINDADE, A. L. B.; LOPES, S. T. A. Membranas de látex natural na herniorrafia diafragmática experimental em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1476-1483, 2008.
- 19 PAULO, N. M.; SILVA, M. A. M.; CONCEIÇÃO, M. Biomembrane of natural latex (*Hevea brasiliensis*) with polylysine 0,1% for the perineal herniorrhaphy in a dog. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 79-82, 2005.
- 20 PAULO, N. M.; LIMA, F. G. D.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. T. D.; FLEURY, L. F. F.; SANT'ANA, F. J. F. D.; BORGES, A. C.; TELLES, T. D. C. Membrana de látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com e sem polilissina a 0,1% e tela de marlex na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 305-310, 2005.
- 21 RABELO, R. E.; SANT'ANA, F. J. F.; PAULO, N. M.; ROMANI, A. F.; SILVA, L. A. F.; VIU, M. A. D. O.; ALVES, C. B.; LIMA, C. R. D. O.; SILVA, O. C. Use of the polilissine 0.1% and poliamide, latex membrane in the surgical correction of recidivating umbilical hernias in dairy cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 6, p. 169-175, 2005.

- 22 SOUSA, L. H. de; CENEVIVA, R.; COUTINHO NETTO, J.; MRUE, F.; SOUSA FILHO, L. H. de; SILVA, O. de. C e. Morphologic evaluation of the use of a latex prosthesis in videolaparoscopic inguinoplasty. an experimental study in dogs. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, p. 84-91, 2011.
- 23 CLAUDIO, R. H. A.; DIOGO FILHO, A.; MAMEDE FILHO, D. O. Peritoneostomy with latex coated polypropylene: experimental study in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 402-408, 2006.
- 24 SADER, S. L.; COUTINHO NETTO, J.; BARBIERI NETO, J.; MAZZETTO, S. A.; ALVES JUNIOR., P.; VANNI, J. C.; SADER, A. A substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 15, n. 4, p. 338-344, 2000 .
- 25 BRANDÃO, M. L.; COUTINHO NETTO, J.; THOMAZINI, J. A.; LCHAT, J. J.; MUGLIA, V. F.; PICCINATO, C. E. Prótese vascular derivada do látex. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 6, n. 2, p. 130-141, 2007.
- 26 SAMPAIO, R. B.; MENDONCA, R. J.; SIMIONI, A. R.; COSTA, R. A.; SIQUEIRA, R. C.; CORREA, V. M.; TEDESCO, A. C.; HADDAD, A.; COUTINHO NETTO, J. C.; JORGE, R. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic-derived fraction: an experimental model. **Current Eye Research**, v. 35, n. 1, p. 56-62, 2010.
- 27 DOMINGOS, A. L. A.; TUCCI JUNIOR, S.; GARCIA, S. B.; BESSA JUNIOR, J. de; COLOGNA, A. J.; MARTINS, A. C. P. Use of a latex biomembrane for bladder augmentation in a rabbit model: biocompatibility, clinical and histological outcomes. **Journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 35, n. 2, p. 217-224, 2009.
- 28 HERCULANO, R. D.; BRUNELLO, C. A.; GRAEFF, C. F. O. Solid state nitric oxide sensor using a latex rubber matrix. **Macromolecular Symposia**, v. 245, p. 529-532, 2006.
- 29 VALODKAR, M.; JADEJA, R. N.; THOUNAOJAM, M. C.; DEVKAR, R. V.; THAKORE, S. In vitro toxicity study of plant latex capped silver nanoparticles in human lung carcinoma cells. **Materials Science & Engineering C:Materials for Biological Applications**, v. 31, n. 8, p. 1723-1728, 2011.
- 30 BARBOZA FILHO, C. G.; CABRERA, F. C.; SANTOS, R. J. dos; SAJA SAEZ, J. A. de; JOB, A. E. The influence of natural rubber/Au nanoparticle membranes on the physiology of *Leishmania brasiliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 152-158, 2012.
- 31 DAVI, C. P.; GALDINO, L. F. M. D.; BORELLI, P.; OLIVEIRA, O. N.; FERREIRA, M. Natural rubber latex LbL films: characterization and growth of fibroblasts. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 3, p. 2137-2147, 2012.
- 32 HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; ERENO, C.; CATANZARO GUIMARAES, S. A.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. de O. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). **Materials Research-Ibero-American Journal of Materials**, v. 12, n. 2, p. 253-256, 2009.

- 33 ROMEIRA, K. M.; DRAGO, B. D. C.; MURBACH, H. D.; AIELO, P. B.; SILVA, R. M. G.; BRUNELLO, C. A.; HERCULANO, R. D. Evaluation of *Stryphnodendron* sp. release using natural rubber latex membrane as carrier. **Journal of Applied Sciences**, v. 12, n. 5, p. 693-697, 2012.
- 34 BORGES, F. A.; BOLOGNESI, L. F. C.; TRECCO, A.; DRAGO, B. C.; ARRUDA, L. B.; LISBOA FILHO, P. N.; PIERRI, E. G.; GRAEFF, C. F. O.; SANTOS, A. G.; MIRANDA, M. C. R.; HERCULANO, R. D. Natural rubber latex: study of a novel carrier for *Casearia sylvestris* Swartz delivery. **ISRN Polymer Science**, v. 2014, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/241297/>>. Acesso em: 30 jan. 2015.
- 35 HERCULANO, R. D.; CATANZARO GUIMARAES, S. A.; BELMONTE, G. C.; DUARTE, M. A. H.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. de; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. de O. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. **Materials Research-Ibero-American Journal of Materials**, v. 13, n. 1, p. 57-61, 2010.
- 36 HERCULANO, R. D.; QUEIROZ, A. A. A. de; KINOSHITA, A.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; GRAEFF, C. F. O. On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes. **Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 31, n. 2, p. 272-275, 2011.
- 37 PICHAYAKORN, W.; SUKSAEREE, J.; BOONME, P.; AMNUAIKIT, T.; TAWEEPRED, W.; RITTHIDEJ, G. C. Deproteinized natural rubber latex/hydroxypropylmethyl cellulose blending polymers for nicotine matrix films. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 25, p. 8442-8452, 2012.
- 38 PICHAYAKORN, W.; SUKSAEREE, J.; BOONME, P.; AMNUAIKIT, T.; TAWEEPRED, W.; RITTHIDEJ, G. C. Nicotine transdermal patches using polymeric natural rubber as the matrix controlling system: effect of polymer and plasticizer blends. **Journal of Membrane Science**, v. 411, p. 81-90, 2012.
- 39 SUKSAEREE, J.; BOONME, P.; TAWEEPRED, W.; RITTHIDEJ, G. C.; PICHAYAKORN, W. Characterization, in vitro release and permeation studies of nicotine transdermal patches prepared from deproteinized natural rubber latex blends. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 90, n. 7, p. 906-914, 2012.
- 40 MELO-REIS, P. R.; ANDRADE, L. S.; SILVA, C. B.; ARAUJO, L. M. M.; PEREIRA, M. S.; MRUE, F.; CHEN-CHEN, L. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.
- 41 MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 530-537, 2011.
- 42 LEMOS, F. O.; FERREIRA, L. A. M.; CARDOSO, V. N.; CASSALI, G. D.; SALAS, C. E.; LOPES, M. T. P. Skin-healing activity and toxicological evaluation of a proteinase fraction from *Cairica candamarcensis*. **European Journal of Dermatology**, v. 21, n. 5, p. 722-730, 2011.

- 43 MOSTAFAIE, A.; MANSOURI, K.; NOROOZNEZHAD, A.-H.; MOHAMMADI-MOTLAGH, H. R. Anti-angiogenic activity of *Ficus carica* latex extract on human umbilical vein endothelial cells. **Yakhteh Medical Journal**, v. 12, n. 4, p. 525-528, 2010.
- 44 BALABANIAN, C. A. C. A.; COUTINHO NETTO, J.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; LACERDA, S. A.; BRENTGANI, L. G. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**, v. 48, n. 4, p. 201-205, 2006.
- 45 CIAPETTI, G.; STEA, S.; PIZZOFERRATO, A.; CHECCHI, L.; PELLICIONI, G. A. A latex membrane, as an alternative device in the GTR technique-preliminary-report on its biocompatibility. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 5, n. 9/10, p. 647-650, 1994.
- 46 ERENO, C.; GUIMARÃES, S. A.; PASETTO, S.; HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; GRAEFF, C. F.; TAVANO, O.; BAFFA, O.; KINOSHITA, A. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95A, n. 3, p. 932-939, 2010.
- 47 DUPOIRIEUX, L.; POURQUIER, D.; PICOT, M. C.; NEVES, M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surger**, v. 30, n. 1, p. 58-62, 2001.
- 48 SCHLIEPHAKE, H.; TAVASSOL, F.; GELINSKY, M.; DARD, M.; SEWING, A.; POMPE, W. Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 1, p. 112-118, 2004.
- 49 von ARX, T.; BROGGINI, N.; JENSEN, S. S.; BORNSTEIN, M. M.; SCHENK, R. K.; BUSER, D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit *calvarium*. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 6, p. 843-853, 2005.
- 50 HERCULANO, R. D. **Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações médicas**. 2009. 151 f. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- 51 KUBOKI, Y.; JIN, Q. M.; TAKITA, H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in bmp-induced osteogenesis and chondrogenesis. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 83A, p. S105-S115, 2001.
- 52 CALLISTER JUNIOR, W. D. **Ciência e engenharia dos materiais: uma introdução**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 724 p.
- 53 NEVES JUNIOR, W. F. P.; GRAEFF, C. F. D. O.; FERREIRA, M.; MULATO, M.; BERNARDES, M. S.; COUTINHO NETTO, J. Elastic properties of natural rubber tubes produced by dip-coating. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, n. 1, p. 702-707, 2006.

- 54 RAO, V.; JOHNS, J. Thermal behavior of chitosan/natural rubber latex blends - TG and DSC analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 92, n. 3, p. 801-806, 2008.
- 55 JOHNS, J.; NAKASON, C. Dielectric properties of natural rubber/chitosan blends: effects of blend ratio and compatibilization. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 357, n. 7, p. 1816-1821, 2011.
- 56 PICHAYAKORN, W.; SUKSAEREE, J.; BOONME, P.; AMNUAIKIT, T.; TAWEEPRED, W.; RITTHIDEJ, G. C. Preparation of deproteinized natural rubber latex and properties of films formed by itself and several adhesive polymer blends. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 41, p. 13393-13404, 2012.
- 57 KOSUGI, K.; SUTTHANGKUL, R.; CHAIKUMPOLLERT, O.; YAMAMOTO, Y.; SAKDAPIPANICH, J.; ISONO, Y.; KAWAHARA, S. Preparation and characterization of natural rubber with soft nanomatrix structure. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 14, p. 1457-1462, 2012.
- 58 LOYKULNANT, S.; KONGKAEW, C.; CHAIKUMPOLLERT, O.; SANGUANTHAMMARONG, P.; UBOL, P. N.; SUCHIVA, K. Study of chitosan and its derivatives as preservatives for field natural rubber latex. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 123, n. 2, p. 913-921, 2012.
- 59 NEVES JUNIOR, W. F. P.; FERREIRA, M.; ALVES, M. C. O.; GRAEFF, C. F. O.; MULATO, M.; COUTINHO NETTO, J.; BERNARDES, M. S. Influence of fabrication process on the final properties of natural-rubber latex tubes for vascular prosthesis. **Brazilian Journal of Physics**, v. 36, n. 2B, p. 586-591, 2006.
- 60 SANGUANSAP, K.; THONGGOOM, R.; TANGBORIBOONRAT, P. Surface modification of natural rubber film by polymerisation of methyl methacrylate in water-based system. **European Polymer Journal**, v. 42, n. 10, p. 2334-2342, 2006.
- 61 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- 62 PAMULA, E.; FILOVA, E.; BACAKOVA, L.; LISA, V.; ADAMCZYK, D. Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: the influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 89A, n. 2, p. 432-443, 2009.
- 63 MURPHY, C. M.; HAUGH, M. G.; O'BRIEN, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 3, p. 461-466, 2010.
- 64 ROOSA, S. M. M.; KEMPPAINEN, J. M.; MOFFITT, E. N.; KREBSBACH, P. H.; HOLLISTER, S. J. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an *in vivo* model. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 92A, n. 1, p. 359-368, 2010.

- 65 KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474-5491, 2005.
- 66 YANG, S. F.; LEONG, K. F.; DU, Z. H.; CHUA, C. K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. part 1. traditional factors. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 6, p. 679-689, 2001.
- 67 GAUTHIER, O.; BOULER, J. M.; AGUADO, E.; PILET, P.; DACULSI, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. **Biomaterials**, v. 19, n. 1/3, p. 133-139, 1998.
- 68 ROSE, F. R.; CYSTER, L. A.; GRANT, D. M.; SCOTCHFORD, C. A.; HOWDLE, S. M.; SHAKESHEFF, K. M. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. **Biomaterials**, v. 25, n. 24, p. 5507-5514, 2004.
- 69 KIM, K.; DEAN, D.; MIKOS, A. G.; FISHER, J. P. Effect of initial cell seeding density on early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells cultured on cross-linked poly(propylene fumarate) disks. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 7, p. 1810-1817, 2009.
- 70 AL SALAMAH, L.; BABAY, N.; ANIL, S.; AL RASHEED, A.; BUKHARY, M. Guided bone regeneration using resorbable and non-resorbable membranes: a histological study in dogs. **Odonto-Stomatologie Tropicale**, v. 35, n. 138, p. 43-50, 2012.
- 71 VOLKMER, E.; DROSSE, I.; OTTO, S.; STANGELMAYER, A.; STENGELE, M.; KALLUKALAM, B. C. Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 8, p. 1331-1340, 2008.
- 72 CZEKANSKA, E. M.; STODDART, M. J.; RICHARDS, R. G.; HAYES, J. S. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. **European Cells & Materials**, v. 24, p. 1-17, 2012.
- 73 DECLERCQ, H.; Van den VREKEN, N.; De MAEYER, E.; VERBEECK, R.; SCHACHT, E.; DE RIDDER, L.; CORNELISSEN, M. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 757-768, 2004.
- 74 COELHO, M. J.; CABRAL, A. T.; FERNANDES, M. H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-mem and in dmem. **Biomaterials**, v. 21, n. 11, p. 1087-1094, 2000.
- 75 KARTSOGIANNIS, V.; NG, K. W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 228, n. 1/2, p. 79-102, 2004.

76 SIGGELKOW, H.; REBENSTORFF, K.; KURRE, W.; NIEDHART, C.; ENGEL, I.; SCHULZ, H.; ATKINSON, M. J.; HUFNER, M. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 22-35, 1999.

77 SUDO, H.; KODAMA, H. A.; AMAGAI, Y.; YAMAMOTO, S.; KASAI, S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. **Journal of Cell Biology**, v. 96, n. 1, p. 191-198, 1983.

78 WANG, D.; CHRISTENSEN, K.; CHAWLA, K.; XIAO, G. Z.; KREBSBACH, P. H.; FRANCESCHI, R. T. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation mineralization potential. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 6, p. 893-903, 1999.

79 KODAMA H, A. Y.; SUDO, H.; KASAI, S.; YAMAMOTO, S. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. **Japanese Journal of Oral Biology**, v. 23, n. 4, p. 899-901, 1981.

80 LEIS, H. J.; HULLA, W.; GRUBER, R.; HUBER, E.; ZACH, D.; GLEISPACH, H.; WINDISCHHOFER, W. Phenotypic heterogeneity of osteoblast-like MC3T3-E1 cells: changes of bradykinin-induced prostaglandin e2 production during osteoblast maturation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 4, p. 541-551, 1997.

81 YAN, X.-Z.; YANG, W.; YANG, F.; KERSTEN-NIESSEN, M.; JANSEN, J. A.; BOTH, S. K. Effects of continuous passaging on mineralization of MC3T3-E1 cells with improved osteogenic culture protocol. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 20, n. 3, p. 198-204, 2014.

82 PETERSON, W.; TACHIKI, K.; YAMAGUCHI, D. Serial passage of MC3T3-E1 cells down-regulates proliferation during osteogenesis *in vitro*. **Cell Proliferation**, v. 37, n. 5, p. 325-336, 2004.

83 JARRAHY, R.; HUANG, W.; RUDKIN, G. H.; LEE, J. M.; ISHIDA, K.; BERRY, M. D.; SUKKARIEH, M.; WU, B. M.; YAMAGUCHI, D. T.; MILLER, T. A. Osteogenic differentiation is inhibited and angiogenic expression is enhanced in MC3T3-E1 cells cultured on three-dimensional scaffolds. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 289, n. 2, p. C408-C414, 2005.

84 GIBON, E.; BATKE, B.; JAWAD, M. U.; FRITTON, K.; RAO, A.; YAO, Z.; BISWAL, S.; GAMBHIR, S. S.; GOODMAN, S. B. MC3T3-E1 osteoprogenitor cells systemically migrate to a bone defect and enhance bone healing. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, n. 9/10, p. 968-973, 2012.

85 CHOI, J. Y.; LEE, B. H.; SONG, K. B.; PARK, R. W.; KIM, I. S.; SOHN, K. Y.; JO, J. S.; RYOO, H. M. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 61, n. 4, p. 609-618, 1996.

- 86 LIAN, J. B.; SHALHOUB, V.; ASLAM, F.; FRENKEL, B.; GREEN, J.; HAMRAH, M.; STEIN, G. S.; STEIN, J. L. Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. **Endocrinology**, v. 138, n. 5, p. 2117-2127, 1997.
- 87 FRANCESCHI, R. T.; IYER, B. S.; CUI, Y. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 9, n. 6, p. 843-854, 1994.
- 88 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **D412-68**: standard test method for vulcanized rubber and thermoplastic elastomers - tension. West Conshohocken, 1968. 11 p.
- 89 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5:2009**: biological evaluation of medical devices - Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, 2009. 34 p.
- 90 BAEK, H. S.; YOO, J. Y.; RAH, D. K.; HAN, D. W.; LEE, D. H.; KWON, O. H.; PARK, J. C. Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of latex gloves. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 4, p. 579-583, 2005.
- 91 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.
- 92 GREGORY, C. A.; GUNN, W. G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D. J. 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.
- 93 PEREIRA, K. K. Y. **Funcionalização de microtopografia de titânio com peptídeo sintético de colágeno I (mendoP-15)**: efeitos sobre o desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro*. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- 94 BONEWALD, L. F.; HARRIS, S. E.; ROSSER, J.; DALLAS, M. R.; DALLAS, S. L.; CAMACHO, N. P.; BOYAN, B.; BOSKEY, A. Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization *in vitro* represents bone formation. **Calcified Tissue International**, v. 72, n. 5, p. 537-547, 2003.
- 95 MELOAN, S. N.; PUCHTLER, H. C. What von Kossa really wrote and a modified reaction for selective demonstration of inorganic phosphates. **Journal of Histotechnology**, v. 8, n. 1, p. 11-13, 1985.
- 96 NALLASAMY, P.; MOHAN, S. Vibrational spectra of *cis*-1,4-polyisoprene. **Journal of Histotechnology**, v. 29, n. 1A, p. 17-26, 2004.

- 97 MARQUES, D. R. **Obtenção e caracterização de blendas poliméricas de poli(ácido láctico-co-glicólico) e poli(isopreno) para aplicação como biomaterial.** 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalurgia e de Materiais) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- 98 CABRERA, F. C.; AGOSTINI, D. L. S.; SANTOS, R. J. dos; TEIXEIRA, S. R.; RODRIGUEZ-PEREZ, M. A.; JOB, A. E. Characterization of natural rubber/gold nanoparticles SERS-active substrate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, n. 1, p. 186-192, 2013.
- 99 DALL'ANTONIA, A. C.; MARTINS, M. A.; MORENO, R. M. B.; MATTOSO, L. H. C.; GONCALVES, P. S.; JOB, A. E. Mechanical and thermal characterization of compounds of natural rubber of the clones: GT 1, IAN 873, PB 235 and RRIM 600. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 1, p. 63-71, 2009.
- 100 OLIVEIRA, F. A.; ALVES, N.; GIACOMETTI, J. A.; CONSTANTINO, C. J. L.; MATTOSO, L. H. C.; MAN, A. M. O. A.; JOB, A. E. Study of the thermomechanical and electrical properties of conducting composites containing natural rubber and carbon black. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, n. 2, p. 1001-1006, 2007.
- 101 ZHAO, C. L.; PORZIO, S.; SMITH, A.; GE, H. Y.; DAVIS, H. T.; SCRIVEN, L. E. Direct observation of freeze-thaw instability of latex coatings via high pressure freezing and cryogenic SEM. **Journal of Coatings Technology and Research**, v. 3, n. 2, p. 109-115, 2006.
- 102 YOKOYAMA, F.; MASADA, I.; SHIMAMURA, K.; IKAWA, T.; MONOBE, K. Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl-alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting. **Colloid and Polymer Science**, v. 264, n. 7, p. 595-601, 1986.
- 103 CHEN, X.; FISCHER, S.; MEN, Y. Temperature and relative humidity dependency of film formation of polymeric latex dispersions. **Langmuir**, v. 27, n. 21, p. 12807-12814, 2011.
- 104 RUSSELL, E. W. The crystallization of vulcanized natural rubber at low temperatures. **Transactions of the Faraday Society**, v. 47, n. 5, p. 539-552, 1951.
- 105 NEGAHBAN, M. Modeling the thermomechanical effects of crystallization in natural rubber: II. Elementary thermodynamic properties. **International Journal of Solids and Structures**, v. 37, n. 20, p. 2791-2809, 2000.
- 106 WOOD, L. A.; BEKKEDAHL, N. Crystallization of unvulcanized rubber at different temperatures. **Journal of Applied Physics**, v. 17, n. 5, p. 362-375, 1946.

107 CHE, J.; BURGER, C.; TOKI, S.; RONG, L.; HSIAO, B. S.; AMNUAYPORN SRI, S.; SAKDAPIPANICH, J. Crystal and crystallites structure of natural rubber and peroxide-vulcanized natural rubber by a two-dimensional wide-angle X-ray diffraction simulation method. II. Strain-induced crystallization versus temperature-induced crystallization. **Macromolecules**, v. 46, n. 24, p. 9712-9721, 2013.

108 GUAN, J. J.; FUJIMOTO, K. L.; SACKS, M. S.; WAGNER, W. R. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3961-3971, 2005.

109 SANTOS, T. C.; FERREIRA, M.; GRAEFF, C. F. O.; COUTINHO NETO, J.; MULATO, M. Estudo da porosidade em biomembranas de látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*). In: IBERIAN LATIN AMERICAN AND CARIBBEAN REGIONAL CONGRESS OF MEDICAL PHYSICS, 3.; BRAZILIAN CONGRESS OF MEDICAL PHYSICS, 9., 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings**... Rio de Janeiro: [s.n.], 2004. p. 70.

110 FLORIANO, J. F.; MOTA, L. S. L. S. da; FURTADO, E. L.; ROSSETTO, V. J. V.; GRAEFF, C. F. O. Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 2, p. 461-470, 2014.

111 KANJANATHAWORN, N.; POLPANICH, D.; JANGPATARAPONGSA, K.; TANGBORIBOONRAT, P. Reduction of cytotoxicity of natural rubber latex film by coating with PMMA-chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 1, p. 52-58, 2013.

112 STEIN, G. S.; LIAN, J. B.; van WIJNEN, A. J.; STEIN, J. L.; MONTECINO, M.; JAVED, A.; ZAIDI, S. K.; YOUNG, D. W.; CHOI, J. Y.; POCKWINSE, S. M. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. **Oncogene**, v. 23, n. 24, p. 4315-4329, 2004.

113 LORCH, I. J. Alkaline phosphatase and the mechanism of ossification. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 31B, n. 1, p. 94-99, 1949.

114 LIPORACI JUNIOR, J. L. J. **Avaliação da biocompatibilidade in vitro e da resposta óssea a três composições químicas da cerâmica de vidro fluorcanasite implantadas em fêmur de coelhos**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

115 ADDISON, W. N.; NELEA, V.; CHICATUN, F.; CHIEN, Y. C.; TRAN-KHANH, N.; BUSCHMANN, M. D.; NAZHAT, S. N.; KAARTINEN, M. T.; VALI, H.; TECKLENBURG, M. M.; FRANCESCHI, R. T.; MCKEE, M. D. Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: an ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone. **Bone**, v. 71, p. 244-256, 2015.

116 QUERIDO, W.; ABRACADO, L. G.; ROSSI, A. L.; CAMPOS, A. P. C.; ROSSI, A. M.; SAN GIL, R. A. S.; BOROJEVIC, R.; BALDUINO, A.; FARINA, M. Ultrastructural and mineral phase characterization of the bone-like matrix assembled in F-OST osteoblast cultures. **Calcified Tissue International**, v. 89, n. 5, p. 358-371, 2011.

117 BERZINA-CIMDINA, L.; BORODAJENKO, N. Research of calcium phosphates using Fourier transform infrared spectroscopy. In: THEOPHANIDES, T. (Ed.). **Infrared spectroscopy: materials science, engineering and technology**. Rijeka: InTech 2012. Chap 6, p. 123-149.

118 LINEZ-BATAILLON, P.; MONCHAU, F.; BIGERELLE, M.; HILDEBRAND, H. F. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. **Biomolecular Engineering**, v. 19, n. 2/6, p. 133-141, 2002.

119 VANDROVCOVA, M.; BACAKOVA, L. Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. **Physiological Research**, v. 60, n. 3, p. 403-417, 2011.

120 COMPANHONI, M. V. P. **Produção e caracterização de zircônio nanocristalino e suas ligas processados por deformação plástica severa e aplicação como biomaterial**. 2012. 207 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2012.

121 HO, C. C.; KHEW, M. C. Low glass transition temperature (T_g) rubber latex film formation studied by atomic force microscopy. **Langmuir**, v. 16, n. 6, p. 2436-2449, 2000.

122 SOBOYEJO, W. O.; NEMETSKI, B.; ALLAMEH, S.; MARCANTONIO, N.; MERCER, C.; RICCI, J. Interactions between MC3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 1, p. 56-72, 2002.