

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

MEMBRANAS HÍBRIDAS DO TIPO UREASIL-POLIÉTER
CONTENDO PEPTÍDEO DE CRESCIMENTO ÓSSEO PARA
TÉCNICA DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

JOÃO AUGUSTO OSHIRO JUNIOR

ARARAQUARA - SP

2017

JOÃO AUGUSTO OSHIRO JUNIOR

**MEMBRANAS HÍBRIDAS DO TIPO UREASIL-POLIÉTER
CONTENDO PEPTÍDEO DE CRESCIMENTO ÓSSEO PARA
TÉCNICA DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr. Leila Aparecida Chiavacci
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosemary Adriana
Chierici Marcantonio

ARARAQUARA - SP

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

O183m Oshiro Junior, João Augusto
Membranas híbridas do tipo Ureasil-poliéter contendo peptídeo de crescimento ósseo para técnica de regeneração óssea guiada / João Augusto Oshiro Junior. -- Araraquara, 2017.
129 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Leila Aparecida Chiavacci.
Coorientadora: Rosemary Adriana Chierici Marcantonio.

1. Membranas híbridas. 2. Regeneração óssea guiada. 3. Peptídeo de crescimento osteogênico.
I. Chiavacci, Leila Aparecida, orient. II. Marcantonio, Rosemary Adriana Chierici, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

JOÃO AUGUSTO OSHIRO JUNIOR

Membranas Híbridas do tipo Ureasil- Poliéter Contendo Peptídeo de Crescimento Ósseo
para Técnica de Regeneração Óssea Guiada

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como
requisito para a obtenção do título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 18 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA



LEILA APARECIDA CHIAVACCI




EDUARDO FERREIRA MOLINA



LUIS CARLOS SPOLIDORIO



MARLUS CHORILLI



LUÍS GERALDO VAZ

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha mãe, **Solange Zaccarone Carlos**, por nunca ter desistido de mim, pelo amor incondicional e pelos ensinamentos que levarei por toda a minha vida.

Agradecimentos

A minha família em especial aos meus avós, **Agostinha Zaccarone Garcia** e **Thomaz Carlos Garcia**, pelo incentivo, apoio e amor, além de acreditarem em mim e servirem de exemplo de vida, além de serem grandes exemplos de caráter e sabedoria

A minha esposa, **Mariana Rillo Sato**, pela paciência, pela força, incentivo, pelas palavras amigas e principalmente por ter sido uma das poucas pessoas a acreditar que tudo daria certo!

Agradeço as Família **Chiavacci, Favorin, Pedro e Tucci** que me acolheram como um filho, irmão, primo e amigo.

A **Prof^a. Dr. Leila Aparecida Chiavacci** pela dedicação, paciência, amizade e por todo conhecimento adquirido durante a realização desse trabalho e por ter me dado uma oportunidade de desenvolver o meu potencial, por sempre me aconselhar nas situações adversas e pelos ensinamentos que me serviram de grande valia para meu crescimento pessoal e profissional.

A minha co-orientadora **Prof^a. Dr. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio** pelo apoio e pela parceria em todos os resultados. Obrigada por toda sabedoria transmitida.

Ao Instituto de Química da UNESP/Araraquara, em especial aos professores **Celso V. Santilli e Eduardo Maffud Cilli**, pelo espaço cedido no laboratório para a realização desse trabalho.

A **Prof^a. Dr. Maria Teresa Cuberes Montserrat** pelos sábios ensinamentos, pela paciência e por ter cedido um espaço no laboratório Nanotecnologia e Materiais na Universidade de Castilla-La Mancha, na Espanha para a realização do doutorado sanduíche.

Aos meus colaboradores/amigos que foram fundamentais para a finalização dessa tese, **Cassio Rocha Scardueli, Larissa Mendes, Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira e Paulo Sanches**.

A todos amizades que fiz dentro do laboratório **CMAF** durante a realização desse trabalho e que se tornaram pela força, pessoas muito especiais, agradeço o companheirismo e incentivo.

Agradeço também a **Bruna Galdorfini Chiari-Andréo** e **Eloísa Berbel Manaia**, pelos sábios ensinamentos e pela paciência.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), em especial a técnica de laboratório **Mariluci de Paula Orlando** pela amizade e pela ajuda dada na realização de meus experimentos.

À Seção de Pós-graduação, em especial à **Cláudia, Joyce, Daniela, Flávia** e **Chico** pela atenção e apoio.

A **CAPES** e a **Erasmus Mundus**, pela ajuda financeira na forma de bolsa.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta tese, meu agradecimento.

RESUMO

A técnica de Regeneração Óssea Guiada (ROG) auxilia a restauração do tecido ósseo impedindo a concorrência entre as células do tecido ósseo e as células dos tecidos moles pelo uso de membranas; entretanto, não existe no mercado uma membrana osteoindutora. O peptídeo de crescimento osteogênico (OGP) atua como estimulador hematopoiético, promovendo a diferenciação osteoblástica e é um bom candidato para ser incorporado em membranas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver membranas a partir de materiais híbridos contendo OGP para otimizar a ROG. Para o desenvolvimento das membranas, foram utilizadas misturas de três polímeros, sendo dois à base de polióxido de etileno (POE) de massa molecular 500 e 1900 g mol⁻¹ e um à base de polióxido de propileno (POP) de massa molecular 400 g mol⁻¹. Diferentes métodos de esterilização foram utilizados. A caracterização dos materiais foi realizada pelas técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS), análise mecânica dinâmica (DMA), determinação do pH e microscopia de força atômica (MFA). O OGP foi sintetizado pelo método em fase sólida, purificado por HPLC e caracterizado por espectrometria de massas. Os resultados de esterilização revelaram que a radiação gama a 24 kGy não alterou a estrutura do material, confirmado pelo DSC. A técnica de SAXS revelou a homogeneidade estrutural da matriz, assim como, a nano distância entre os entre os “nós” de silício. Os resultados de DMA mostraram que as membranas não sofreram ruptura, quando submetidas à aplicação de uma elevada intensidade de força (15N). Os resultados de pH permaneceram entre 7,38 e 7,64 durante 48 horas, faixa que não ocasiona efeitos citotóxicos. Os perfis cromatográficos confirmaram o grau de pureza do OGP obtido. O OGP nas membranas foi incorporado na concentração de 66,25x10⁻¹⁰ mol. Os resultados de liberação mostraram que as membranas ureasil-POP400/PEO500 e ureasil-POP400/POE1900 liberaram após 48 horas, 7 e 21% respectivamente. A MFA demonstrou que todos os materiais são mesoporosos, mas o ureasil-POP400/POE1900 com OGP possui poros maiores (2,8 µm). Teste de biocompatibilidade in vitro não mostrou nenhum efeito citotóxico. A Análise Histológica revelou que ureasil-POP400/POE1900 promoveu inflamação local após 30 dias semelhante à membrana comercial de colágeno. A cicatrização do tecido ósseo revelou que a resposta do ureasil-POP400/POE1900 é semelhante a membrana comercial. Os resultados obtidos permitem concluir que as membranas híbridas

contendo o OGP apresentam características que as tornam potenciais candidatas para o tratamento de defeitos ósseos de tamanhos críticos.

Palavras-chaves: Membranas híbridas. Regeneração óssea guiada. Peptídeo de crescimento osteogênico.

ABSTRACT

The Guided Bone Regeneration (GBR) technique helps to restore bone tissue through the principle of cellular selectivity, i.e., excluding the epithelium and connective tissues from the damaged area by the use of membranes; However, there is no osteoinductive membrane on the market. The osteogenic growth peptide (OGP) acts as a hematopoietic stimulator, promoting osteoblastic differentiation and is a good candidate to be incorporated into membranes. Therefore, the objective of this work was to develop membranes from hybrid materials containing OGP to optimize GBR. For development of the membranes, blends of three polymers were used, being two poly oxide ethylene (POE) of molecular weight 500 and 1900 g mol⁻¹ and one based on poly oxide propylene (POP) of molecular mass 400 g Mol⁻¹. Different methods of sterilization were used. The characterization of the materials was performed by differential scanning calorimetry (DSC), small angle x-ray scattering (SAXS), dynamic mechanical analysis (DMA), pH determination and atomic force microscopy (AFM). OGP was synthesized by the solid phase method, purified by HPLC and characterized by mass spectrometry. Sterilization results revealed that gamma radiation at 24 kGy did not change the structure of the material, as confirmed by the DSC. The SAXS technique revealed the structural homogeneity of the matrix, as well as the nano distance between the "nodes" of silicon. The DMA results showed that the membranes were not ruptured when submitted to a high force intensity (15N). The pH results remained between 7.38 and 7.64 for 48 hours, a range that did not cause cytotoxic effects. The chromatographic profiles confirmed the purity of the obtained OGP. The OGP in the membranes was incorporated in the concentration of 66,25x10⁻¹⁰ mol. The release results showed that the ureasil-POP400/PEO500 and ureasil-POP400/POE1900 membranes released after 48 hours, 7 and 21% respectively. AFM showed that all materials are mesoporous, but ureasil-POP400/POE1900 with OGP has larger pores (2.8 μm). In vitro biocompatibility test showed no cytotoxic effect. Histological analysis revealed that ureasil-POP400/POE1900 promoted local inflammation after 30 days similar to commercial collagen membrane. Healing of bone tissue revealed that the ureasil-POP400/POE1900 response is similar to commercial membrane. The results obtained allow conclude that hybrid membranes containing OGP have characteristics that make them potential candidates for the treatment of critically bone defects.

Keywords: Hybrid Membranes. Guided Bone Regeneration. Osteogenic Growth Peptide.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	18
2	Revisão Bibliográfica	22
2.1	Regeneração Óssea Guiada (ROG)	22
2.2	Consolidação óssea.....	24
2.3	Peptídeo de crescimento osteogênico (OGP)	27
2.4	Membranas e scaffolds com moléculas bioativas para a reparação do tecido ósseo	31
2.5	Sistemas de liberação controlada de fármaco a partir de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos a base de sílica como componente inorgânico	35
2.5.1	Aplicações dos materiais híbridos como dispositivos de liberação de fármacos ..	39
2.5.2	Aplicação dos Híbridos como Sistemas Estímulo-Responsivos	40
2.5.3	Aplicação dos Híbridos como Biomaterial.....	41
2.6	Justificativa.....	45
3	Objetivos.....	48
4	Material.....	49
4.1	Matérias Primas	49
4.2	Equipamentos	50
5	Métodos	51
5.1	Obtenções das membranas híbridas do tipo ureasil-poliéter	51
5.2	Esterilização em calor úmido	54
5.3	Esterilização por radiação gama.....	54
5.4	Testes de produtos estéreis	54
5.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	55
5.6	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	55
5.7	Análise mecânica dinâmica (DMA)	56
5.8	Determinação do pH.....	56
5.9	Síntese do peptídeo.....	57
5.9.1	Purificação.....	60
5.9.2	Caracterização por espectrometria de massas	61
5.10	Incorporação do OGP e OGP-CF nas membranas ureasil-poliéter.....	61
5.11	Curva Analítica.....	61
5.12	Liberação do OGP-CF em solução de SBF a partir das membranas ureasil-poliéter	62
5.13	Microscopia de força atômica (MFA)	62
5.14	Avaliação da citotoxicidade in vitro	63
5.14.1	Cultivo celular	63
5.14.2	Contagem celular.....	63
5.14.3	Ensaio de Sulforodamina B	64

5.15 Teste <i>in vivo</i>	65
5.15.1 Confeção dos defeitos ósseos	65
5.15.2 Preparação histológica.....	66
5.15.3 Cortes e coloração histopatológica	67
5.15.4 Análise Histologica.....	67
6. Resultados e Discussões	68
6. Conclusões.....	111
Referências	112
Anexo 1.....	128
Perspectivas	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação ilustrativa da Técnica de Regeneração Óssea Guiada.	19
Figura 2. (A) Processo de cicatrização óssea. (B) Substâncias conhecidas no hematoma inicial. Fonte: Kolar et al., 2010.	27
Figura 3. Fórmula estrutural do peptídeo OGP. Fonte: (POLICASTRO; BECKER, 2015).	28
Figura 4. Possíveis mecanismos de ação do OGP no aumento da formação óssea.	31
Figura 5. Representação de (A) de Classe I, (B) de classe II e (C) Classe III de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos. Os símbolos brancos representam a fase orgânica e os pretos representam a fase inorgânica. Fonte: Adaptado de Benvenuti e colaboradores (2009).	37
Figura 6. Número de publicações encontradas com as palavras "organic-inorganic" e "drug delivery" (ISI: Web of Science, acessado em 17, julho de 2017).	39
Figura 7. Esquema de sistemas a partir de materiais orgânico-inorgânicos estímulos-responsivos para liberação de fármaco.	40
Figura 8. Fórmulas estruturais das moléculas dos materiais ureasil-poliéter os possíveis locais de ligação do fármaco com o substrato biológico (círculos azuis). Fonte: (OSHIRO-JR 2015).	43
Figura 9. Aspectos microscópicos para: membrana de colágeno (GI), membrana ureasil-PPO400 (GII) e membrana ureasil-PEO1900 (GIII) (OSHIRO-JR et al., 2016).	46
Figura 10. Sistema Refluxo.	51
Figura 11. Reações moleculares para obtenção do material híbrido ureasil-poliéter. Fonte: OSHIRO-JR et al., 2015.	53
Figura 12. Linha de SAXS adaptada para avaliação de medidas de intumescimento <i>in situ</i> . (a) Bomba peristáltica; (b) conexão para passagem do meio; (c) porta amostra).	56
Figura 13. Protocolo geral de síntese.	59
Figura 14. Representação esquemática da câmara de Neubauer.	64
Figura 15. Aspectos visuais das membranas híbridas: a) ureasil-POP400; b) ureasil/POE1900; c) ureasil-POE500.	68
Figura 16. Aspectos das membranas ureasil-POP400/POE500 em diferentes proporções: a) 90:10; b) 80:20; c) 70:30; d) 60:40; e) ureasil-POP400/POE1900 proporção 80:20; f) ureasil-PPO400/PEO1900 proporção 50:50.	68
Figura 17. Teste de esterilidade em meio Tioglicolato e meio Sabouraud: controle positivo, amostra e controle negativo.	70
Figura 18. DSC do material ureasil-PEO1900 esterilizados por radiação gama e por autoclave.	71
Figura 19. Distância de correlação entre os “nós” de sílica.	74
Figura 20. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-PPO400, ureasil-PEO500, ureasil-PEO1900 secas.	75
Figura 21. Curvas de SAXS para as membranas com misturas dos materiais ureasil-PPO400/ureasil-PEO500 e ureasil-POP400/ureasil-PEO1900 secas.	76
Figura 22. Curva de SAXS, material ureasil-POP400/POE1900.	76

Figura 23. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400 durante o processo de passagem do tampão fosfato.....	77
Figura 24. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POE500durante o processo de passagem do tampão fosfato.....	78
Figura 25. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POE1900durante o processo de passagem do tampão fosfato.....	78
Figura 26. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400/POE500 (80/20) durante o processo de passagem do tampão fosfato.	79
Figura 27. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400/POE500 (50/50) durante o processo de passagem do tampão fosfato.	79
Figura 28. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400/POE500 (20/80) durante o processo de passagem do tampão fosfato.	80
Figura 29. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400/POE1900 (80/20) durante o processo de passagem do tampão fosfato.	80
Figura 30. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400/POE1900 (50/50) durante o processo de passagem do tampão fosfato.	81
Figura 31. Intumescimento nanoscópico em função do tempo de contato com tampão fosfato.	84
Figura 32. Curvas de deformação em função do aumento da força para as membranas ureasil-PPO400, ureasil-PEO500, ureasil-PEO1900, ureasil-PPO400/PEO1900 (80/20), ureasil-PPO400/PEO500 (50/50) e para a membrana de colágeno comercial (INFUSE®).....	86
Figura 33. Medidas de pH em função do tempo de imersão das membranas ureasil-poliéter na solução de SBF.	88
Figura 34. Perfil cromatográfico do peptídeo OGP bruto e puro.	89
Figura 35. Espectro de massas do peptídeo OGP puro.....	89
Figura 36. Perfil cromatográfico do peptídeo OGP-CF bruto e puro.....	90
Figura 37. Espectro de massas do peptídeo OGP-CF puro.	90
Figura 38. Espectro de fluorescência do OGP-CF.	91
Figura 39. Curva analítica do OGP-CF em água.....	92
Figura 40. Perfil de liberação OGP-CF incorporada nas membranas ureasil-POP400/POE500 e ureasil-PPO400/PEO1900.	93
Figura 41. Imagem topográfica (3D) em modo de contato para Ureasil-PPO400 (A), Ureasil-PEO500 (B) ureasil-PEO1900 (C) e contorno topográfico ao longo da seta na imagem A, B e C (D).....	96
Figura 42. Imagem topográfica em modo de contato para o material ureasil-PPO400/PEO500 na proporção 50/50 sem OGP em diferentes temperaturas.	98
Figura 43. Imagem topográfica em modo de contato para o material ureasil-PPO400/PEO500 na proporção 50/50 com OGP em diferentes temperaturas.	98
Figura 44. Imagem topográfica (3D) em modo de contato para o material ureasil-PPO400/PEO1900 na proporção 50/50 sem OGP em diferentes temperaturas.	99

Figura 45. Imagem topográfica (3D) em modo de contato para o material ureasil-PPO400/PEO1900 na proporção 50/50 com OGP em diferentes temperaturas.	99
Figura 46. Esquema da interação entre osso e a superfície de um biomaterial. Fonte: GITTENS et al., 2011.....	101
Figura 47. Resultados de viabilidade celular pelo ensaio de sulforodamina B.	103
Figura 48. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 7, 15, 30 e 60 dias do procedimento cirúrgico para a membrana comercial (Bio-Gide; Geistlich Pharma AG, Biomaterials) e para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 (80:20) sem OGP, aumento de 100x.	104
Figura 49. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 7 dias do procedimento cirúrgico para a membrana comercial (Bio-Gide; Geistlich Pharma AG, Biomaterials), aumento de 100x.	104
Figura 50. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 15 dias do procedimento cirúrgico para a membrana comercial (Bio-Gide; Geistlich Pharma AG, Biomaterials), aumento de 100x.	105
Figura 51. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 30 dias do procedimento cirúrgico para a membrana comercial (Bio-Gide; Geistlich Pharma AG, Biomaterials), aumento de 100x.	105
Figura 52. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 60 dias do procedimento cirúrgico para a membrana comercial (Bio-Gide; Geistlich Pharma AG, Biomaterials), aumento de 100x.	106
Figura 53. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 7 dias do procedimento cirúrgico para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP, aumento de 100x.....	107
Figura 54. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 15 dias do procedimento cirúrgico para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP, aumento de 100x.....	107
Figura 55. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 30 dias do procedimento cirúrgico para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP, aumento de 100x.....	108
Figura 56. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 60 dias do procedimento cirúrgico para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP, aumento de 100x.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidades de reagentes utilizados na síntese das matrizes híbridas. Fonte:Elaborada pelo autor.....	52
Tabela 2. Condições cromatográficas empregadas na purificação do peptídeo sintetizado. Fonte: Elaborada pelo autor.	60
Tabela 3. Valores de Temperatura de fusão (Tf) e grau de cristalinidade (GC) do material ureasil-PEO1900. Fonte: Elaborada pelo autor.	72
Tabela 4. Posição dos picos no vetor de espalhamento $q_{máx}$ e distância de correlação d entre os grupamentos siloxanos e a região polimérica da matriz para os híbridos ureasil-POP 400, ureasil-PEO500, ureasil-POE 1900, ureasil-POP400(80%)/ureasil-PEO500 (20%), ureasil-POP400(50%)/ureasil-POE500(50%), ureasil-POP400(20%)/ureasil-PEO500 (80%), ureasil-POP400(80%)/ureasil-POE1900(20%) e ureasil-POP400(50%)/ureasil-POE1900(50%). Fonte: Elaborado pelo autor.	83
Tabela 5. Porcentagem de OGP-CF liberada a partir das membranas Ureasil-POP400/POE500 e Ureasil-POP400/PEO1900.....	93
Tabela 6. Valores do coeficiente de determinação (r^2), obtido através do ajuste do perfil de liberação do OGP com diferentes modelos matemáticos.	94
Tabela 7. Valores do expoente "n" para as membranas testadas, considerando o modelo matemático de Peppas.	95
Tabela 8. Rugosidade média (RMS) para as misturas dos materiais híbridos submetidos a diferentes temperaturas.	100
Tabela 9. Pontuação histológica da membrana comercial de colágeno e membrana ureasil-PPO400/PEO1900 (adaptada de PIŞKIN et al., 2009).....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ROT.....	Regeneração óssea tecidual
ROG.....	Regeneração óssea guiada
BMP	Proteína morfogenética óssea
OGP	Peptídeo de crescimento osteogênico
POP	Poli óxido de propileno
POE	Poli óxido de propileno
ALP	Fosfatase alcalina
DDS	Sistemas de liberação de fármacos
SAXS	Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo
DMA	Análise Mecânica Dinâmica
SBF	Simulated Body Fluid
MSC.....	Célula Mesenquimal Diferenciada

1 Introdução

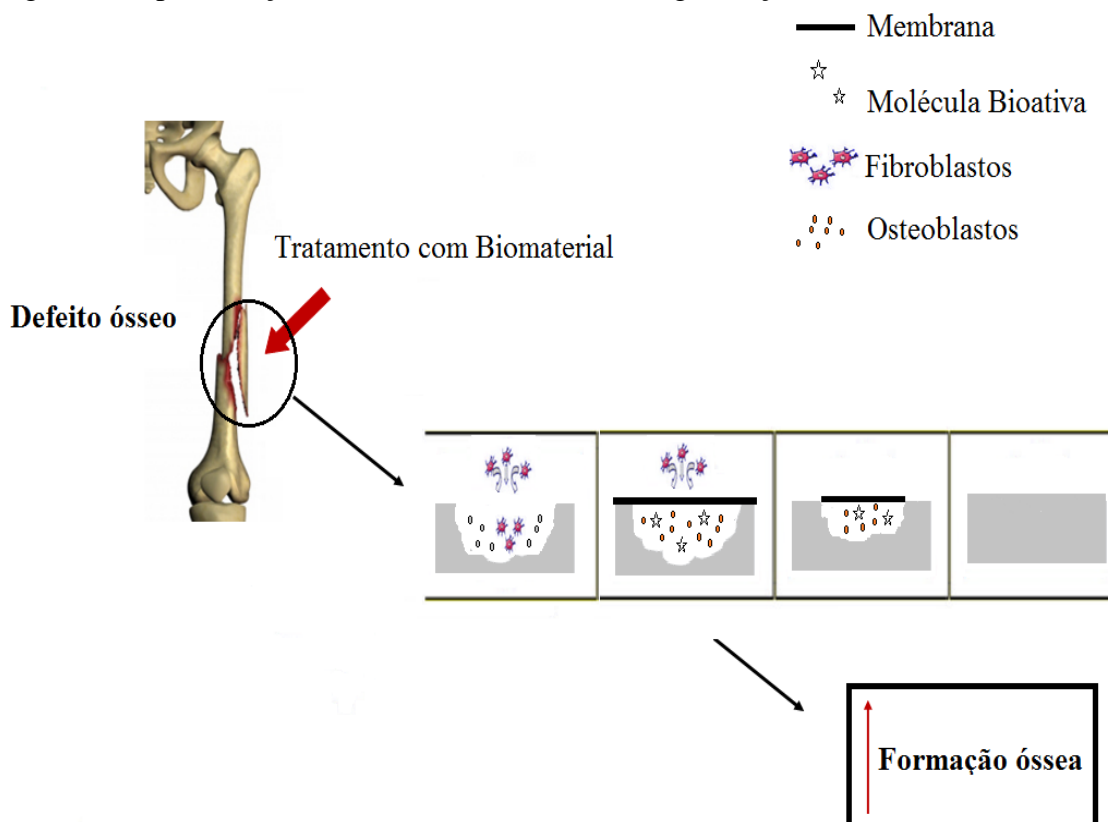
Um grande desafio na prática clínica é o tratamento de defeitos ósseos de tamanhos críticos, definido como a menor ferida intraóssea que o organismo não consegue curar (DIMITRIOU et al., 2011). Estes defeitos podem resultar em consequências como desconfiguração, perda de função e perda do membro (GEIGER, 2003).

A fim de restaurar a forma e a função do tecido, numerosas estratégias clínicas podem ser utilizadas, entretanto a técnica de regeneração óssea guiada (ROG) tem se destacado (AABOE et al., 1995; KENLEY et al., 1993).

Essa técnica se fundamenta no conceito da regeneração óssea tecidual (ROT) e baseia-se na proposição de que o sucesso e a rapidez na cura de uma área lesada dependem da população celular presente naquela região (MELCHER, 1969).

A ROG restaura o tecido ósseo pelo princípio de seletividade celular, ou seja, separa as células do tecido ósseo das do tecido conjuntivo pela colocação de uma membrana de barreira física (DAHLIN et al., 1988; WECHSLER et al., 2008; HERCULANO et al., 2009), conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Representação ilustrativa da Técnica de Regeneração Óssea Guiada.



No mercado existe as membranas não-reabsorvíveis, que não são biodegradáveis e um segundo ato cirúrgico é requerido para sua remoção, fato este que pode comprometer o sucesso do procedimento por perturbar os tecidos neoformados, enquanto que as membranas reabsorvíveis não possuem previsibilidade clínica, podendo ser degradadas antes da total formação óssea (AABOE et al., 1995; DAHLIN et al., 1988; HARDWICK et al., 1995).

Independente da membrana utilizada, esta para ser adequada deve possuir características como: (i) resistência mecânica, para que seja capaz de resistir as pressões exercidas pelo tecido sobrejacente, além de não esfiapar-se ou fragmentar-se quando for cortada para aplicação no local da lesão, (ii) flexibilidade, para poder ser clinicamente manuseável, (iii) biocompatibilidade, (iv) propriedades oclusivas (impedir com que as células migrem de um tecido para outro), (v) integração tecidual, (vi) custo acessível, (vii) capacidade de criação de espaço e (viii) previsibilidade clínica (HARDWICK et al., 1995; TRIPLETT et al., 1996).

Sendo assim, o desafio científico é encontrar um material para o desenvolvimento de uma membrana que, além de possuir as características citadas acima, consiga também permitir a liberação prolongada de fatores bioativos com

capacidade de induzir a formação óssea (KEMPEN et al., 2006; KEMPEN et al., 2008; BLOKUIS et al., 2009), como por exemplo, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP).

A BMP possui capacidade osteogênica, sendo a mais pesquisada. Atualmente, dois produtos estão disponíveis no mercado, a BMP-2 e BMP-7 (MELCHER, 1969; KEMPEN et al., 2006), no entanto, os resultados da administração das BMPs são muitas vezes imprevisíveis, uma vez que sua meia-vida biológica é curta, possuem baixa estabilidade em longo prazo, tratamento com custo elevado, apresentam baixa especificidade do tecido, necessitando de doses altas de administração o que em alguns casos pode ultrapassar a dose potencial de carcinogenicidade (LEE et al., 2007).

As desvantagens do uso da BMP levaram os pesquisadores a buscarem novos fatores de crescimento osteogênico, como o peptídeo de crescimento osteogênico (OGP) que pode modular a expressão dessa proteína e outros fatores de crescimento, que são chave para o processo de regeneração óssea (PIGOSSI et al., 2015; SASKA et al., 2012; STAKLEFF et al., 2009).

A combinação do OGP com membranas capazes de carrear e liberar de forma controlada e prolongada poderia ser uma alternativa a terapia atual com BMP. Além de obter um sistema com a possibilidade de: (a) menor custo, (b) regulador local aumentando a especificidade (fator de crescimento-célula) e (c) manter a concentração desses fatores dentro do intervalo terapêutico durante um período de tempo maior, permitindo que as células osteoprogenitoras migrem para o local alvo e se diferenciem em osteoblastos (KEMPEN et al., 2006, LEE et al., 2007; FASSBENDER et al., 2014), resultando assim, em um grande impacto sobre as terapias atuais de regeneração do tecido ósseo.

Nesse contexto, as pesquisas têm se dedicado ao desenvolvimento de novos materiais que podem, por suas características inerentes ou adquiridas (por meio de mudanças estruturais) interagir com alvos biológicos (SOUZA et al., 2013), otimizando a regeneração óssea.

O uso de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas membranas, sendo que os denominados ureasil-poliéter se destacam devido a interpenetração em nanoescala das fases orgânica e inorgânica, são capazes de reunir propriedades únicas em uma mesma matrix, tais como alta flexibilidade, resistência térmica, resistência mecânica e capacidade de controlar o perfil de liberação de várias substâncias (lipofílicas, hidrofílicas e metais)

(JUDEINSTAIN et al., 1994; MOLINA et al., 2010; OSHIRO-Jr et al., 2014; PAREDES et al., 2014; SANTILLI et al., 2009; SOUZA et al., 2013).

Experimentos *in vivo* com dois materiais ureasil-poliéter (ureasil-PPO400 e ureasil-EO1900) foram realizados com o intuito de avaliar a sua biocompatibilidade. Os resultados revelaram que a membrana ureasil-PEO1900 promove inflamação aguda. Contudo, o tecido enxertado com membrana ureasil-PPO400 apresentou características normais após 15 dias. Estes resultados estão associados ao alto grau de intumescimento do ureasil-PEO1900, uma vez que a expansão deste após o contato com o meio ambiente dentro do organismo pode danificar as células e tecidos, aumentando a resposta imune (OSHIRO-JR et al., 2016).

Assim, considerando suas propriedades únicas e as características contrastantes, o objetivo deste trabalho foi, sintetizar membranas para técnica de regeneração óssea guiada a partir de misturas dos materiais ureasil-poliéter com a finalidade de ajustar o grau de intumescimento e controlar a liberação do peptídeo de crescimento osteogênico, visando avaliar a resposta de neoformação óssea dessas membranas.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Regeneração Óssea Guiada (ROG)

A regeneração de um tecido precisa ser orientada para resultar em uma fisiologia nova e funcional. A técnica de ROG auxilia a restauração do tecido ósseo pelo princípio de impedir a concorrência entre as células do tecido ósseo com as células dos tecidos moles (WESCLER et al., 2008).

O princípio foi descrito primeiramente em 1959 em um tratamento experimental que visava, a partir de uma barreira mecânica, isolar os tecidos em uma cirurgia de fusão espinal (HURLEY et al., 1959). No entanto, este estudo pioneiro não levou imediatamente a uma ampla aplicação clínica da técnica em pacientes. O potencial clínico da ROG só foi reconhecido no início dos anos 1980, quando a equipe de Karring, Nyman e Lindhe avaliaram membranas de barreira em vários estudos experimentais clínicos para a regeneração periodontal (KARRING; NYMAN; LINDLE, 1980).

Alguns anos mais tarde, Dahlin e colaboradores (1988) testaram uma membrana de politetrafluoretileno (e-PTFE) para isolar o tecido conectivo de defeitos criados no tecido ósseo de mandíbulas de ratos, como grupo controle, defeitos sem membrana foram utilizados. Os resultados revelaram que o grupo controle apresentou um menor crescimento ósseo (2.2 mm) quando comparado com os defeitos tratados com a membrana (3.8 mm). Outro fator observado no grupo controle foi a presença de células do tecido mole dentro dos defeitos ósseos. Esses resultados revelam a importância da regeneração do tecido a partir da exclusão de células com o auxílio de uma barreira física (DAHLIN et al., 1988).

No mercado, as membranas de ROG podem ser de politetrafluoretileno expandido (Gore-Tex[®]) classificadas como não-reabsorvíveis ou de ácido polilático (Guidors[®]), colágeno ou polyglatin (Vicryl[®]) classificadas como reabsorvíveis (FUJIHARA et al., 2005).

As membranas não-reabsorvíveis requerem um segundo ato cirúrgico para retirá-las, podendo comprometer o sucesso do procedimento, uma vez que o segundo ato cirúrgico pode perturbar os tecidos neoformados (PEREIRA et al., 2012). Além disso, pode resultar em desconforto ao paciente, aumento do custo e infecção pós-cirúrgica (KIM et al., 2005).

As membranas reabsorvíveis, no entanto, têm a vantagem de eliminar essa segunda fase cirúrgica, assim como o trauma para os tecidos neoformados

(QUINONES; CAFESSE, 1995). Entretanto, apresentam invasão das células dos tecidos moles resultante da degradação da membrana e instabilidade no sítio cirúrgico (não fixação) (FUJIHARA et al., 2005).

As membranas de colágeno apresentam excelente biocompatibilidade e grande afinidade pelas células (osteocondução), contudo, possuem baixa resistência mecânica. As membranas de ácido poliláctico apresentam baixa afinidade pelas células, mas resistência mecânica adequada (KIKUCHI et al., 2004).

Alguns pesquisadores buscam promover a estabilidade tecido/membrana por meio de um adesivo químico, com características de biocompatibilidade, viabilidade na execução da técnica, fácil aplicação e com baixo custo. O etilcianocrilato (Superbonder[®]) vem sendo utilizado para essa finalidade (CZAJA et al., 2007; FAION, 2009). Contudo, um estudo avaliando histologicamente a cicatrização óssea de um defeito com membrana reabsorvível após o uso do adesivo revelou que a reação inflamatória intensificou e ocorreu um retardo no processo de cicatrização óssea em relação ao grupo contendo apenas a membrana sem o adesivo químico (PERREIRA et al., 2012).

A membrana reabsorvível sofre reabsorção no organismo pelo processo de hidrólise e degradação macromolecular, através de enzimas como fosfatase ácida e a colagenase. Posteriormente, são metabolizadas em água e dióxido de carbono, sendo excretadas pelo corpo sem ocasionar nenhum efeito colateral (BRADY et al., 1973).

Apesar das diferenças citadas entre as membranas absorvíveis e não-absorvíveis, estudos demonstraram que não existem diferenças significativas entre ambas em relação à neoformação óssea (SANDBERG et al., 1993; PIATELLI et al., 1996; LUNDGREN et al., 1997). Entretanto, Dupoirieux e colaboradores (2001) demonstraram que as membranas não-reabsorvíveis (Gore-Tex[®]) continuam como referência nos procedimentos de ROG quando comparadas às membranas reabsorvíveis (Vicryl[®]) devido aos seus riscos e benefícios estarem bem estudados e por apresentarem melhores resultados na formação óssea (DUPOIRIEUX et al., 2001). A biocompatibilidade e previsibilidade clínica em mais de 30 anos de uso superam as desvantagens dessas membranas (custo elevado e necessidade de um segundo ato cirúrgico) (TRIPLETT et al., 1996).

Para contornar as desvantagens das membranas absorvíveis e não-reabsorvíveis, pesquisadores vêm buscando desenvolver membranas a partir de novos materiais (WANG et al., 2016), com o intuito destas atuarem como: barreira física, possuir

afinidade pelas células (osteocondução) e como promotora de crescimento ósseo (osteoindução) (PARK et al., 2000; XUE, SHI, 2004; COLILLA et al., 2010; SASKA et al., 2012). Para tal finalidade, é necessário que a membrana seja capaz de incorporar e liberar controladamente substâncias bioativas, capazes de estimular a migração e diferenciação das células mesenquimais, como: Proteína Morfogenética óssea, Fator de Crescimento Fibroblástico, Fator de Crescimento Transformado, Peptídeo de Crescimento Ósseo entre outros (PARK et al., 2006; COLILLA et al., 2010; SASKA et al., 2012).

Outra vantagem do uso desses materiais é a capacidade da manutenção da concentração terapêutica dessas substâncias bioativas, uma vez que quando administradas isoladamente, as BMPs possuem baixa meia vida plasmática (2 - 4 horas), sendo que, para obter sucesso no processo de regeneração óssea elas devem atuar no local por um período de 4 semanas (PARK et al., 2006). Outra desvantagem do uso das BMPs é o seu alto custo, muito em virtude da necessidade de uma alta dose terapêutica ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, INFUSE[®]) para resultar em um efeito clínico superior aos demais materiais encontrados no mercado (EPSTEIN, 2011).

2.2 Consolidação óssea

Após uma lesão no tecido ósseo é desencadeado um processo de reparação denominado de consolidação. A princípio, os primeiros mecanismos são semelhantes ao processo de reparação dos tecidos moles. Contudo, este processo é dividido em três fases: fase inflamatória, fase reparação e fase de remodelação (GRIFFON, 2005).

As fraturas locais interrompem a vascularização dentro do tecido ósseo, superfície endosteal, periosteal, na medula óssea e nos tecidos moles circundantes. Isso resulta na formação de hematoma, devido à ativação da cascata de coagulação e as plaquetas expostas ao ambiente extracelular (LOI et al., 2016). As alterações físico-químicas do microambiente, como baixa tensão de O_2 , diminuição do pH, espécies reativas de O_2 , estruturas de células rompidas, fragmentos dos elementos inertes dos tecidos, proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos e outros fatores são os elementos que levam a ativação da cascata (BALBINO; PEREIRA; RUI, 2005).

O hematoma inicial da fratura e a subsequente reação inflamatória aguda são fatores chave para a cicatrização do tecido ósseo. O impacto causador da fratura não só destrói a arquitetura óssea, mas também perturba vasos sanguíneos no local da lesão e,

consequentemente, leva à formação de um hematoma que contém células imunes, que circulam no sangue periférico e células de medula óssea (GERSTENFELD et al., 2003).

Em um endotélio vascular íntegro ocorre a produção de prostaciclina que atua nos receptores de prostaciclina na plaqueta, resultando em um aumento da adenilato ciclase. Esse aumento inibe a liberação dos mediadores contidos nos grânulos plaquetários ocorrendo a inibição plaquetária. Quando o endotélio vascular sofre uma lesão, o colágeno fica exposto e o fator de Von Willebrand interage com as plaquetas ocasionando a liberação dos mediadores químicos contidos nos grânulos (tromboxanos, ADP, serotonina, fator ativador plaquetário, trombina e outros). Os mediadores trombina, ADP e tromboxanos A₂ ativam os receptores GPIIb/IIIa das plaquetas que interagem com o fibrinogênio unindo-se a outro receptor GPIIb/IIIa de uma nova plaqueta, resultando no início do tampão plaquetário (composto apenas pelas plaquetas) (FELIZZOLA et al., 1996).

Após a formação do tampão plaquetário primário, inicia-se a cascata de coagulação. A cascata de coagulação pode ser dividida em duas vias: via extrínseca e via intrínseca, que levam à conversão de pró-trombina em trombina. A trombina liberada é uma enzima capaz de converter o fibrinogênio que é uma proteína solúvel em fibrina (proteína insolúvel), tornando essa nova rede um tampão mais eficiente contra a hemorragia (VELDMAN; EHRENFORTH, 2003)

Na via extrínseca, as células na superfície do vaso lesado possuem uma proteína denominada fator tecidual (TF), os receptores da TF, o fator VII ativado circulante no sangue irá se ligar para formar o complexo (TF-VII ativado) que é responsável pela ativação do fator X (Fator X ativado). A ativação da trombina catalisa a quebra do fibrinogênio em fibrina, formando assim a rede de fibrina que tampona a saída do sangue para o meio externo. Na via intrínseca a alteração celular ativa a enzima pré-caliceína, que quando entra em contato com o vaso lesionado (carga negativa) é convertido em caliceína que agora é capaz de ativar o fator XII, e este ativa o fator XI que na presença do fator VIII e do cálcio, ativa o fator X que junto com o fator V e o cálcio converte a pró-trombina em trombina (enzima que converte fibrinogênio em fibrina) (SELIGSOHN, 2007).

A rede de fibrina serve como primeira matriz provisória para o influxo de células inflamatórias que são atraídas pelo fator plaquetário, bem como vários sinais libertados a partir de células necróticas, matriz extracelular danificada e macrófagos tissulares locais. As primeiras células inflamatórias que chegam ao local da fratura dentro das

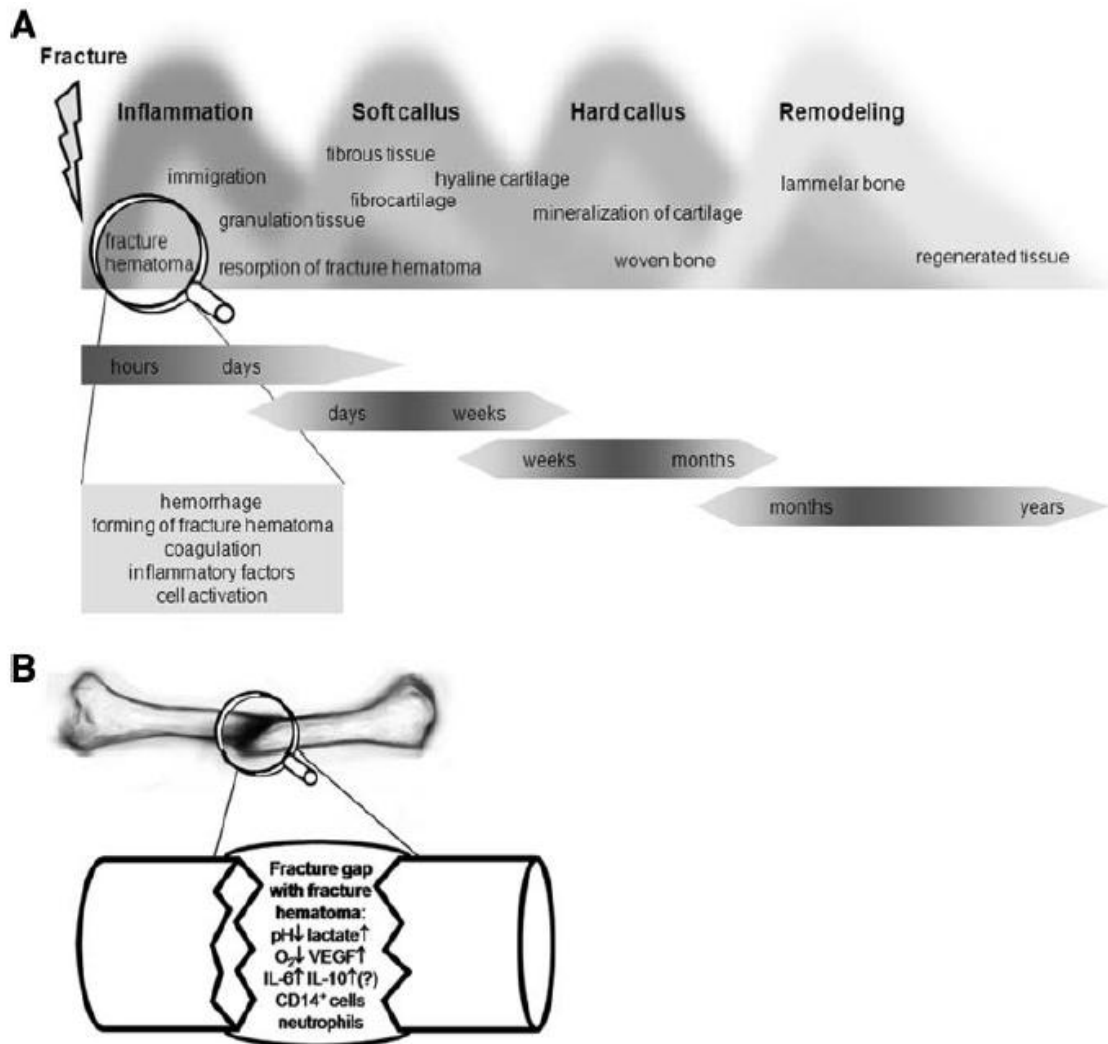
primeiras 24 horas são os neutrófilos (LOI et al., 2016). Os mesmos estímulos pró-inflamatórios que ativam a cascata de coagulação também ativam os neutrófilos, monócitos e macrófagos. Esta fase é denominada de inflamação e é principalmente definida pela invasão de células inflamatórias (KOLAR et al., 2010).

Os macrófagos são fundamentais para a remoção da matriz de fibrina provisória e células necróticas por meio de fagocitose. Além disso, os macrófagos secretam diferentes mediadores quimiotáticos e inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, que iniciam o recrutamento de fibroblastos, células-tronco mesenquimais (MSC) e células osteoprogenitoras (BIELBY; JONES; MCGONAGLE, 2007; WU et al., 2013).

Devido a este ambiente (hipóxico e sem vascularização) a orientação dos sinalizadores emitidos pelos macrófagos orientam a diferenciação das MSC em condroblastos. Os condroblastos e fibroblastos tem a função de sintetizar a nova matrix composta principalmente de colágeno do tipo I. Este tecido, conhecido como calo mole, serve como base para formação óssea, uma vez que possui uma melhor vascularização e as MSC agora se diferenciam em osteoblastos que irão sintetizar o tecido ósseo formando o calo duro, encerrando a fase de reparação. Tipicamente esta formação óssea começa na camada interna do periósteo, a alguma distância a partir do local da lesão, avançando progressivamente em direção ao intervalo da fratura (BIELBY et al., 2007; CLAES et al., 2012; TSIRIDIS et al., 2007).

Finalmente, tanto o tecido imaturo ósseo e matriz de cartilagem subjacente são removidos por osteoclastos, iniciando o processo de remodelação. Este processo de remodelação pode levar vários meses ou anos para ser concluído, mas no final do processo restaura a forma e integridade do osso. A figura 2 esquematiza todas as etapas descrita acima (KOLAR et al., 2010).

Figura 2. (A) Processo de cicatrização óssea. (B) Substâncias conhecidas no hematoma inicial. Fonte: Kolar et al., 2010.



2.3 Peptídeo de crescimento osteogênico (OGP)

Nos últimos anos significantes avanços têm sido realizados na área de biomateriais para regeneração do tecido ósseo, com o objetivo de incorporar e liberar fatores de crescimento, visando tornar esses materiais biologicamente ativos (CHEN et al., 2015; PIGOSSI et al., 2015; MAIA et al., 2014).

Vários fatores de crescimento estão envolvidos na homeostase da regeneração do tecido ósseo. A atividade biológica desses fatores depende de como eles estão acessíveis à célula. Quando combinados às suas proteínas de ligação, regulam as funções das células (diferenciação, migração, proliferação, adesão celular e expressão gênica) (PANSERI et al., 2014). A matrix extracelular tem o papel de armazenar e

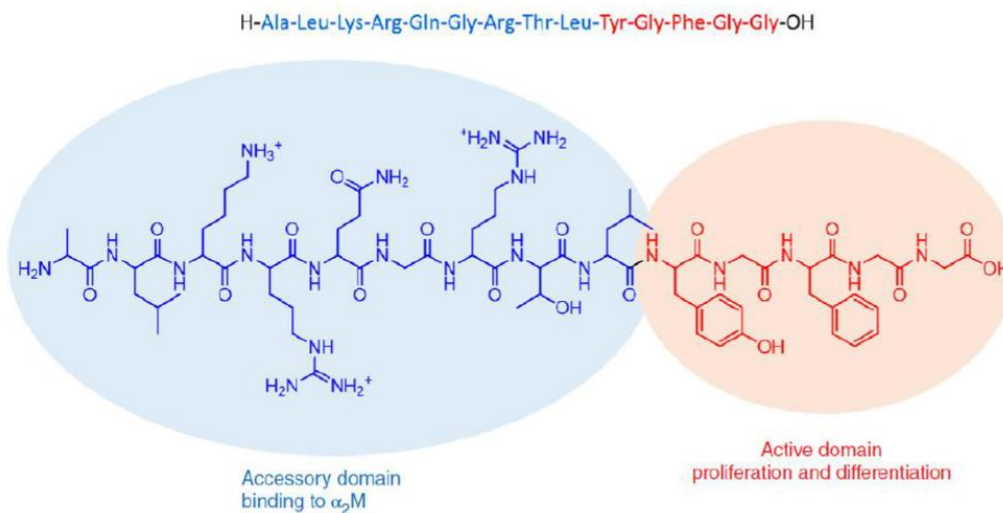
liberar esses fatores que irá controlar o “destino” (diferenciação e proliferação) das células mesenquimais (KIM et al., 2013).

Dentre os diferentes fatores utilizados para regeneração do tecido ósseo, o peptídeo OGP se destaca por possuir diferentes mecanismos de ação, estimulando várias vias para o crescimento ósseo.

Inicialmente foi isolado a partir de um meio de cultura condicionado com osso de rato intramedular formado *in vivo* após a ablação da medula óssea (BAB et al., 1987).

O peptídeo OGP (Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly) (Figura 3) possui a sequência idêntica a C-terminal 89-102 da Histona H4 (AN et al., 2014). As Histonas são proteínas altamente conservadas, cuja síntese é caracteristicamente ligado a replicação do DNA e cuja localização celular é dentro da estrutura da cromatina no núcleo (BAB et al., 1992).

Figura 3. Fórmula estrutural do peptídeo OGP. Fonte: (POLICASTRO; BECKER, 2015).



Na Histona H4 a sequência que precede o terminal N do OGP compreende um potencial local sitio de clivagem quimiotripsina e, então essa atividade do tipo quimiotripsina pode constituir um importante passo no processamento pós-tradução que conduz à produção de OGP (BAB et al., 1992).

Uma análise da estrutura e função do OGP indica que sua atividade está relacionada ao grupo fenólico da tirosina (Tyr 10) e do anel aromático da fenilalanina (Phe 12) (GABARIN et al., 2001). OGP é secretado por culturas de células, como

fibroblastos (NIH 3T3), célula osteogênica (MC3T3 E1) e células osteosarcoma (ROS 17/2.8) (GABARIN et al., 2001).

O OGP tem sido muito utilizado por ser capaz de estimular a expressão da proteína morfogênica óssea (BMP) que é fundamental para o aumento da formação óssea e a densidade do osso trabecular. Essas proteínas se ligam a receptores nas células mesenquimais fazendo com que diferenciem em células osteoprogenitoras (PANSERI et al., 2014; BAB; CHOREV, 2002).

OGP está presente fisiologicamente no soro de mamíferos em concentração micromolar, seu pequeno tamanho e linearidade o tornam susceptível a proteólise (BAB; CHOREV, 2002). Baixas concentrações extraídas de OGP in vivo sugeriu a presença de uma proteína de ligação de circulação para a OGP (OGP-BP). Esta proteína específica ou não fornece a proteção contra as proteólises e atua como um “sistema” que libera baixas concentrações da OGP na circulação (BAB; CHOREV, 2002).

Acredita-se que a proteína de ligação do OGP em maior concentração é a α 2-microglobulina (α 2M) (CHEN et al., 2007). Após se dissociar do complexo, o peptídeo é clivado proteoliticamente, gerando, assim, o OGP pentapéptido C-terminal (10-14), a sua forma ativa (HUI et al., 2007), resultado na porção OGP (10-14), este fragmento interage diretamente com os receptores de membrana (MAIA et al., 2014). Entretanto, o mecanismo de ação do penta-peptídeo não é totalmente conhecido. Assim, diferentes estudos demonstram vários mecanismos de ação do OGP na formação óssea.

Gabarin e colaboradores (2001) demonstraram que o OGP (10-14) ativa as proteínas quinases ativadas por mitógenos (estímulos extracelulares) conhecidas como MAP-quinase.

As MAP-quinases consistem em quatro sub-famílias: ERK1-ERK3 (quinase regulada por sinal extracelular), MAP-quinase JNK (c-Jun N-terminal kinase) (ativadas pelo stress oxidativo), MAP-quinase p38 e ERK5. Essas enzimas regulam diferentes fatores de transcrição que controlam a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. A cascata de fosforilação para formação de osteoblastos depende das ERK1/2 que regulam a proliferação e a atividade do RUNX2 (fator de transcrição relacionado à RUNX2) (um fator de transcrição chave, associado com a diferenciação dos osteoblastos) (SAN MIGUEL et al., 2005). A MAP quinase p38 também regula a diferenciação da célula mesenquimal em osteoblasto (GUICHEUX et al., 2003).

San Miguel e colaboradores (2005) demonstraram que o estímulo da ERK1/2 a partir da OGP (10-14) é dose dependente, sendo que o maior estímulo da ERK1/2 foi

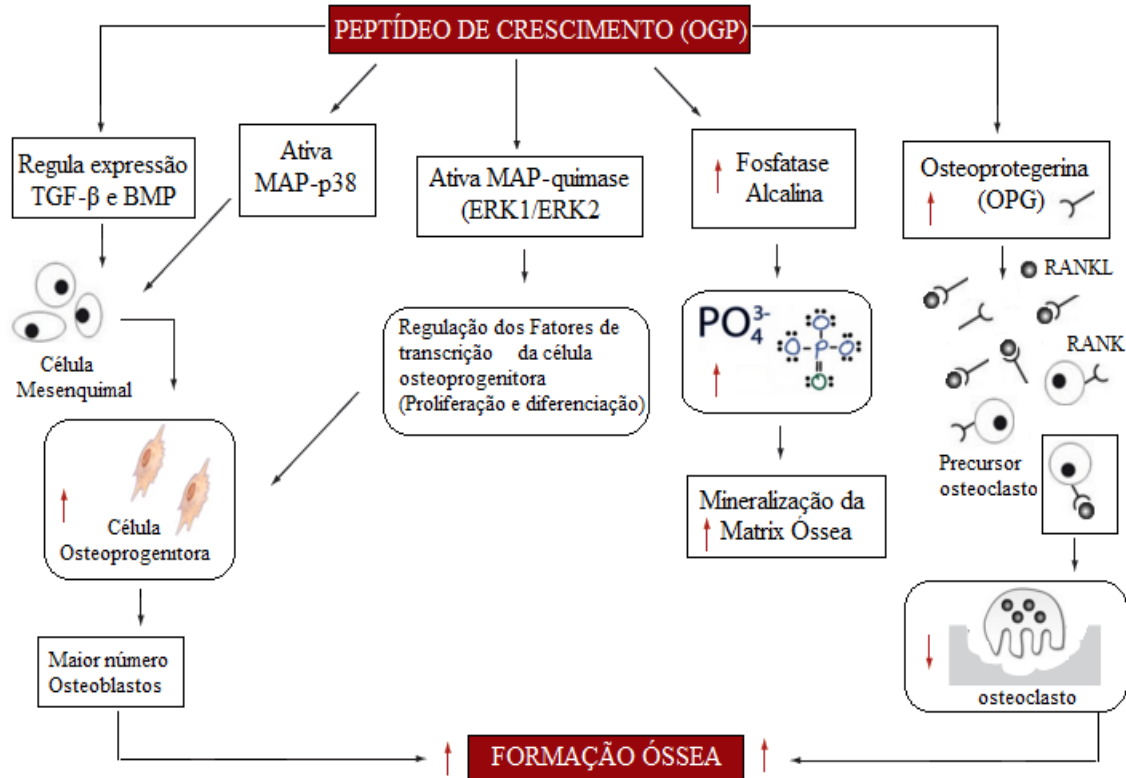
observado na concentração de OGP (10-14) foi 10^{-13} M. Nesta concentração também o OGP exibe um alto estímulo sobre a proliferação das células osteogênicas MC3T3-E1.

OPG regula a expressão de vários fatores de crescimento, tais como Fator de crescimento transformador beta (TGF- β): TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (BRAGER et al., 2000). Esses fatores estimulam o recrutamento, proliferação e a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos e/ou condrócitos (TSIRIDIS et al., 2007).

Estudos in vitro revelaram que a OGP regula a proliferação e a atividade da fosfatase alcalina (ALP) em linhas de células osteoblásticas via mecanismo de feedback auto-regulação (MATTI et al., 2004; CHEN et al., 2015; SPREAFICO et al., 2006). ALP é uma enzima ligada à membrana, presente em osteoblastos maduros, como um marcador precoce de diferenciação osteoblástica (KARSENTY, 1998). Contudo, a principal ação enzimática da ALP é a hidrólise dos íons fosfato (fosfodiéster e pirofosfato), fornecendo-os para o interior das vesículas presente na matrix óssea (CIANCAGLINI et al., 2006).

Outro possível mecanismo de ação da OGP é o aumento na produção da osteoprotegerina (OPG) pelo osteoblasto (SASKA et al., 2012). Essa ação interfere na via RANK/RANKL/OPG (Receptor ativador de fator nuclear- κ B/ligante de RANK/Osteoprotegerina), relacionada à formação de osteoclastos. Provavelmente a OGP age aumentando os níveis de OPG que é um competidor da citocina RANK presente na superfície das células precursoras de osteoclastos. Assim, o RANKL (tem como papel a estimulação e diferenciação da célula) não se liga no RANK, diminuindo o número final de osteoclastos e conseqüentemente aumentando a formação óssea (FALONI; CERRI, 2007). A Figura 4 esquematiza todos esses mecanismos.

Figura 4. Possíveis mecanismos de ação do OGP no aumento da formação óssea.



Assim, o OGP tem sido administrado para auxiliar a cura de defeitos no tecido esquelético, uma vez que grandes defeitos ósseos não cicatrizam espontaneamente, mas a cura pode ser induzida com a ajuda de suportes como: enxertos, cimentos, scaffolds ou por membranas de barreiras que sejam capazes de liberar fatores de crescimento nos sítios lesionados (SUN et al., 1998).

2.4 Membranas e scaffolds com moléculas bioativas para a reparação do tecido ósseo

Comercialmente existe apenas tratamento clínico com proteína morfogênica óssea do tipo 2 (BMP-2) (INFUSE[®]), que consiste na utilização de uma membrana de colágeno hidrofílica e porosa com a superfície que permite o crescimento das células e formação óssea. A superfície da membrana é densa e permanece em contato com o tecido mole, evitando a invasão das células do tecido fibroso para o defeito ósseo (Princípio da ROG). A proteína é adicionada na membrana após a sua solubilização com água destilada e auxílio de uma seringa, e após 15 minutos de contato esta adequada para uso (<http://www.infusebonegraft.com/healthcare-providers/index.htm>).

No entanto, o custo do tratamento utilizando a BMP2 é extremamente elevado, necessita de cuidado na preparação e 15 minutos de espera para a utilização; outra

desvantagem é que a liberação da proteína ocorre de maneira rápida e a BMP tem um tempo de meia vida muito curto.

Essas desvantagens levaram os pesquisadores a buscar novos materiais para o desenvolvimento de membranas e scaffolds que sejam capazes de liberar de forma controlada melhorando a sua distribuição em tecidos específicos e limitando os efeitos secundários, além disso, ter baixo custo, maior facilidade de processamento, maior rapidez na administração, resultando assim, em um grande impacto sobre as terapias de regeneração do tecido ósseo (BAB et al., 1992; CHEN et al., 2000; LAVINI et al., 2010; PIGOSSI et al., 2015; SASKA et al., 2012).

Devido às suas propriedades físico-químicas esses novos materiais permitem o desenvolvimento de diferentes sistemas para regeneração do tecido ósseo, tais como membranas, scaffolds, enxertos sintéticos, cimentos ósseos, lipossomas e micelas. Contudo, nesta seção, abordaremos apenas materiais utilizados para o desenvolvimento de membranas ou membranas scaffolds (objetivo da Tese) para carrear substâncias ativas com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica na formação óssea. Para informações sobre os demais sistemas ver revisão conduzida por Oshiro e colaboradores (OSHIRO et al., 2017).

Lee e colaboradores desenvolveram uma membrana bioativa a base de ácido poli (D, L-lactido-co-glicólico) (PLGA) com peptídeo formador de osso 1 (BFP1), com o objetivo de alcançar uma membrana barreira com características melhoradas. A membrana foi testada in vivo em defeito ósseo de calvaria de ratos de tamanho crítico de 4 mm. Os resultados revelaram que após 8 semanas, o volume ósseo formado nos defeitos com membrana foi estatisticamente maior que o do grupo controle. A semi-quantificação do volume ósseo revelou que a área foi de aproximadamente 20% no grupo com defeito e $57,59 \pm 15,24\%$ no grupo implantado com membrana (LEE et al., 2013).

Pigossi e co-autores prepararam membranas de celulose bacteriana-hidroxiapatita (BC-HA) associadas com OGP e OGP (10-14) na concentração de 10^{-9} mol L⁻¹ para tratar os defeitos ósseos na calvaria de ratos (4 mm de diâmetro). Foi possível concluir que uma alta porcentagem de formação óssea foi observada após 60 dias; no entanto, este efeito foi associado com BC-HA, e a adição de OGP não resultou em maior formação óssea do que o grupo BC-HA (PIGOSSI et al., 2015).

Policastro e colaboradores (2015) estudaram membranas a base de poliéster de ureia (PEU) funcionalizadas com OGP para melhorar a reparação de defeitos ósseos em

ratos. Os autores observaram que após 4 semanas, a PEU-OGP resultou em mineralização da matriz sem resposta inflamatória. Além disso, observou-se a migração de vasos sanguíneos dentro do material, demonstrando a capacidade osteogênica e angiogênica desses materiais (POLICASTRO et al., 2015).

Lopes e colaboradores estudaram o efeito da luz laser em defeitos ósseos (diâmetro = 5 mm) preenchidos com BMP em uma membrana comercial. Os resultados mostraram que a associação destas técnicas melhorou significativamente a formação óssea quando comparada aos defeitos sem terapia a laser (LOPES et al., 2007). Esses resultados revelam uma possibilidade de associação de técnicas para a melhora do quadro clínico.

Dentre as membranas para regeneração óssea, os scaffolds emergiram como membranas de nova geração. Estes biomateriais têm a capacidade de atuar como um molde para as células que o substitui gradualmente por tecidos recém-formados. Além disso, uma das estratégias utilizadas no desenvolvimento desses materiais é a imobilização de moléculas bioativas com capacidade osteoindutiva para obter melhores resultados (BRIEN, 2001; KOLAMBKAR et al., 2011).

Portanto, visando estabelecer um tratamento mais eficaz para defeitos ósseos, Kolambkar et al. relataram o uso de um sistema híbrido baseado em alginato incorporado com BMP-2. Estes autores analisaram *in vitro* a liberação de BMP-2 (500 ng) a partir desse sistema. Os resultados demonstraram que $71,2 \pm 3,8$ ng foram liberados dentro de 21 dias, no entanto, 98,6% de BMP-2 desse total foi liberado com 7 dias. O experimento *in vivo* em defeito segmentar femoral de tamanho crítico (defeitos segmentares bilaterais de 8 mm) de rato foi utilizado para verificar a formação óssea. Os autores observaram que, após 12 semanas, o sistema híbrido com BMP-2 ($37,65 \pm 2,22$ mm³) tinha significativamente mais volume ósseo em relação ao sistema livre ($3,96 \pm 1,40$ mm³) (KOLAMBKAR et al., 2011).

Com o objetivo de melhorar os métodos de conjugação química entre polímero e moléculas bioativas (procedimentos de múltiplas etapas), Ko et al. realizaram um estudo no qual a BMP-2 foi eficientemente imobilizada em scaffolds de PLGA. O sistema foi transplantado para um modelo de defeito ósseo calvarial (diâmetro: 4 mm). Os resultados revelaram que após 8 semanas, o grupo tratado com PLGA-polidopamina-BMP-2 exibiu uma regeneração óssea aumentada (~ 60%) enquanto que, o grupo sem o material foi de ~ 38% (KO et al., 2013).

Alguns desses estudos demonstram a utilização do OGP como parte integrante na engenharia de tecidos, mas mostraram resultados conflitantes. O uso de OGP e OGP (10-14) em membranas de biocelulose não promoveram maior formação de tecido ósseo em relação às membranas controle, apesar da indução de maior expressão de biomarcadores de formação óssea (PIGOSSI et al., 2015). OGP associado com scaffolds baseados em polímero de PEU reticulado mostrou biocompatibilidade e propriedades mecânicas e bioatividade melhoradas (reabsorção e revascularização) quando foram inseridos no dorso de ratos (POLICASTRO et al., 2015). Assim, mais estudos são necessários para identificar os melhores parâmetros de utilização de OGP quando associadas a um biomaterial, tais como: a concentração adequada que deve ser liberada em relação ao tempo e o tipo de material para o scaffolds ou membrana.

Tradicionalmente as membranas são desenvolvidas por métodos que utilizam solventes e é difícil fazer uma membrana de forma padronizada com uma determinada espessura, tamanho e quantidade de poros iguais e forma externa, fatores que também podem contribuir com a quantidade de osso formado, uma vez que influenciam diretamente na liberação da substância ativa e na adesão/penetração das células no material. Assim, encontramos na literatura um trabalho inovador que usa a tecnologia de impressão tridimensional (3D) para a fabricação de membranas para técnica de ROG (SHIN et al., 2014).

Shim et al. investigou uma membrana baseada em impressão 3D e incorporou BMP-2 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Este sistema pode ser utilizado para controlar a liberação de fármaco. Estudos *in vitro* demonstraram que a liberação de BMP-2 atingiu ~ 25,5% em 24 horas e foi mantida durante 28 dias. Para avaliar a formação óssea, a membrana foi testada num modelo de coelho com defeito ósseo na calvaria de tamanho crítico de 8 mm. Os resultados mostraram que após 8 semanas, o volume ósseo formado nos defeitos contendo a membrana-BMP-2 foi de ~ 60%, o que foi estatisticamente superior ao do grupo controle (15,24%) (SHIN et al., 2014).

Este resultado evidencia que o uso de novos materiais e novas técnicas de fabricação podem ser no futuro uma abordagem inovadora para substituir principalmente o uso de enxerto autógeno, que é considerado o padrão “ouro” para defeitos ósseos; contudo, tem muitas desvantagens como necessidade de dois sítios cirúrgicos (receptor e doador), não ter quantidade de tecido ósseo intra oral suficiente pra preenchimento ou para correção dos defeitos, presença de dor crônica, lesões vasculares, entre outros (GEIGER et al., 2003; MISCH, 2002; MOGHADAM et al.,

2001; SUMMERS; EISENTEIN, 1989). Portanto, esses novos sistemas representam uma alternativa que poderá ser usado pelos consumidores/pacientes, resultando em maior quantidade de osso formado em um menor tempo de tratamento e baixo custo, desta forma, beneficiando tanto o cirurgião quanto o paciente.

2.5 Sistemas de liberação controlada de fármaco a partir de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos a base de sílica como componente inorgânico

Para obter sucesso na administração de um fármaco é necessário garantir a efetividade terapêutica, visando minimizar a ocorrência dos efeitos colaterais e não introduzir níveis inaceitáveis de toxicidade (BELTING et al., 2005; PEPPAS et al., 2006). Isto pode ser alcançado pela descoberta de novas substâncias ou modificação no perfil de liberação das substâncias existentes através de novos sistemas.

Estes sistemas destacam-se por apresentar várias vantagens sobre os sistemas convencionais de administração de fármacos (DIMITRIU, 2001), tais como: baixa toxicidade, permanência prolongada do fármaco na corrente sanguínea, administração segura (não oferecem resposta inflamatória local), dose adequada (dose baixa) e a capacidade de incorporar substâncias lipofílicas e hidrofílicas (LOIRA-PASTORIZA et al., 2014; CHAVANPATIL et al., 2006; VENDRUSCOLO et al., 2005).

A utilização de materiais poliméricos tem atraído a atenção para o desenvolvimento de tais sistemas de liberação de fármacos controlada, devido à sua elevada capacidade de processamento e propriedades físico-químicas adaptadas através de síntese (KABANOV et al., 2002; TORCHILIN, 2001).

Assim, uma ampla variedade de polímeros vêm sendo testados em dispositivos de liberação de fármacos (ZHAO et al., 2009; SOPPIMATH et al., 2001; USKOKOVIC et al., 2009; PATTEL, 2007), mas nem sempre as propriedades (mecânicas, físicas, químicas e óticas) destes polímeros permitem o desenvolvimento de dispositivos multifuncionais (implantes subcutâneos, curativos oclusivos e filmes) adequados.

O desenvolvimento da nanotecnologia proporcionou obter polímeros nanoestruturados, que são uma alternativa aos sistemas poliméricos convencionais.

Modificações ao nível nanométrico na estrutura destes materiais oferecem características estruturais, mecânicas e óticas otimizadas, que possibilita a aplicação em diferentes vias e a liberação controlada de fármacos. Desta nova classe de polímeros nanoestruturados, os materiais híbridos orgânicos-inorgânicos se destacam (ESTEVES et al., 2004).

O termo híbrido orgânico-inorgânico começou a ser utilizado nos últimos 35 anos. O desenvolvimento desta área tem aumentado desde os anos 80, especialmente pela preparação de géis inorgânicos, impregnados por polímeros orgânicos (JOSE, PRADO, 2005).

Estes materiais híbridos combinam sinergicamente as características físico-químicas dos seus componentes, o que permite conseguir propriedades únicas, tornando esta classe de materiais excelente para o desenvolvimento de novos sistemas multifuncionais com amplas aplicações (ARIGA et al., 2007; BURKETT et al., 2008; COLILLA et al., 2006; OGOSHI et al., 2005).

A fase orgânica fornece propriedades físicas ou químicas específicas (ópticas, elétricas, reatividade), enquanto que a fase inorgânica aumenta a resistência mecânica, a estabilidade térmica e permite modular o índice de refração, além disso, as propriedades reológicas favorecem o processamento do material final com a possibilidade de variar formatos e tamanhos (PHILIP; SCHIMIDT, 1984; BRENNAN; WIKES, 1991; GIRARD-REYDET et al., 1994).

Os materiais orgânico-inorgânicos são nanocompósitos onde ocorre a interpenetração das duas fases em escala nanométrica (MATEJKA et al., 2004). Quando a fase tem dimensão nanométrica (1-500 nm) exibe uma elevada área superficial, promovendo uma melhor dispersão da matriz polimérica e, por conseguinte, melhora as características físicas do compósito que dependem da homogeneidade do material (ESTEVEVES et al., 2004).

A natureza da interface orgânico-inorgânico é usada para definir três classes de materiais híbridos (SANCHEZ et al., 2005): classe I- são aqueles que apresentam ligações fracas entre as duas fases (Van der Waals, ligações de hidrogênio ou ligações eletrostáticas); classe II- apresentam fortes ligações entre as duas fases (covalentes ou ligações iônicas); Classe III- apresentam uma combinação de interações que ocorrem em ambas as classes I e II.

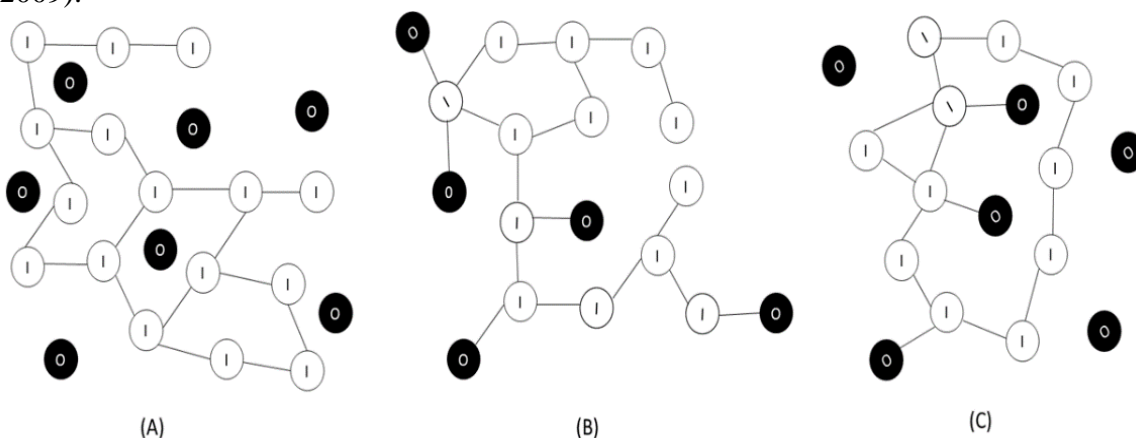
Na classe I, o processo envolve a adição de precursores moleculares orgânicos não-polimerizáveis, que são solúveis no meio no qual é obtido a sílica pura, contudo, não participa diretamente na reação de gelificação (BENVENUTTI et al., 2009). Nos híbridos de Classe II, organossilanos polimerizáveis são utilizados como precursores orgânicos que têm grupo orgânico ligado diretamente ao silício. Materias desta classe apresentam uma maior estabilidade térmica quando comparado com o componente orgânico da classe I (FRANKEN et al., 2002, NASSAR et al., 2007). No entanto, é

possível obter materiais com características de ambas as classes (SCHOTTNER et al., 2001).

A Figura 5 mostra um esquema representativo de diferentes classes de materiais híbridos orgânico-inorgânicos (BENVENUTTI et al., 2009).

A maioria dos materiais híbridos são sintetizados e processados a partir de uma via química chamada de sol-gel. Nesta via, um precursor é polimerizado em uma matriz de macromoléculas orgânicas (PHILIP; SCHMIDT, 1984; BRENNAN; WIKES, 1991; GIRARD-REYDET et al., 1994; CHUJO et al., 1991; CHIANG et al., 2002).

Figura 5. Representação de (A) de Classe I, (B) de classe II e (C) Classe III de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos. Os símbolos brancos representam a fase orgânica e os pretos representam a fase inorgânica. Fonte: Adaptado de Benvenutti e colaboradores (2009).



A maioria dos materiais híbridos são sintetizados e processados a partir de uma via química chamada de sol-gel. Nesta via, um precursor é polimerizado em uma matriz de macromoléculas orgânicas (PHILIP; SCHMIDT, 1984; BRENNAN; WIKES, 1991; GIRARD-REYDET et al., 1994; CHUJO et al., 1991; CHIANG et al., 2002).

O termo sol é utilizado para definir a dispersão de partículas coloidais (tamanho entre 1 e 1000 nm) estabilizada por um fluido, enquanto que o termo gel pode ser reconhecido como um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou cadeias poliméricas (gel de polímero) que imobiliza a fase líquida nos interstícios (BRINKER; SCHERER, 1990).

Este processo baseia-se em: a) a copolimerização de organossilanos funcionais, alcóxidos de metal e macromônômeros, b) encapsulação de compostos orgânicos à base de sílica ou alcóxidos de metal e c) funcionalização de nanopartículas, argilas ou outros compostos com estruturas lamelares, etc.

A utilização do processo sol-gel na preparação destes materiais permite a produção de géis (que podem ser utilizados em máscaras, implantes ou atadura oclusivos), filmes finos, pós e micro-esferas à temperatura ambiente. Vale ressaltar que os materiais híbridos que têm como componente inorgânico a sílica (Si-O-Si) são atraentes para aplicações tecnológicas, principalmente devido à elevada estabilidade relativa da ligação Si-C. Além disso, as redes de Si-O-Si são importantes em termos de transparência, estabilidade térmica e resistência mecânica (GARCÍA et al., 2008; FRANVILLE et al., 2000).

As reações químicas envolvidas em um processo sol-gel convencional, baseadas em derivados de alcóxidos são: hidrólise (etapa 1), em que os grupos OR são substituídos pelos grupos silanóis (Si-OH); subsequentemente, estes grupos silanóis podem reagir uns com os outros (etapa 2), ou com outros grupos OR (etapa 3), através de reações de condensação, formando ligações siloxano, resultando uma rede tridimensional de sílica (BENVENUTTI et al., 1999; BRINKER; SCHERER, 1990).



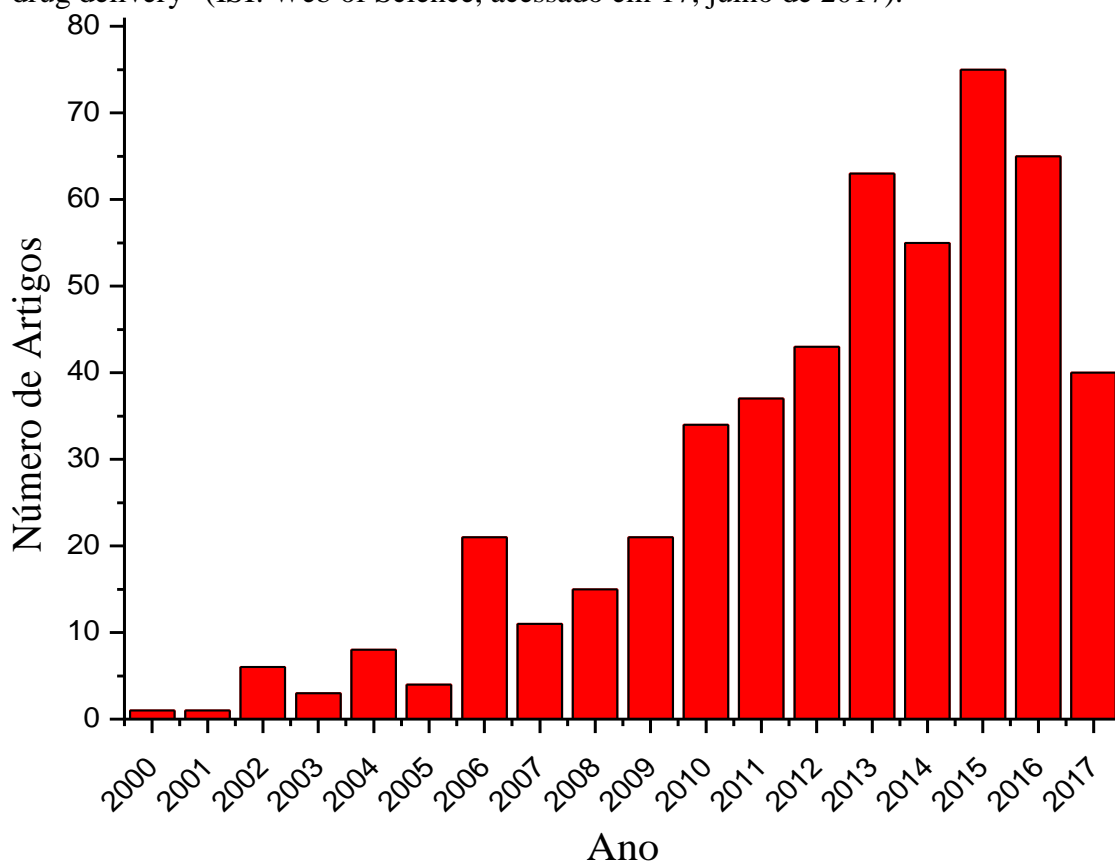
Nestes híbridos ocorre um maior controle dos processos químicos envolvidos durante a reação de gelificação. Isto é devido ao precursor de silício, que apresenta baixa cinética na reação de gelificação (BRINKER; SCHERER, 1990). Assim, é possível modular as propriedades finais dos materiais, como, por exemplo, o tamanho e forma das partículas, volume e distribuição de tamanho de poro (BENVENUTTI et al., 2009). Estes materiais híbridos à base de sílica são sintetizados sob condições moderadas de temperatura e exibem biocompatibilidade (RADINA et al., 2002).

Devido a estas características únicas, os materiais à base de sílica têm aplicações em diversas áreas, tais como, adsorvente de corantes, eletrônica, óptica, mecânica, energia, ambiente, biologia, medicina, por exemplo, membranas e dispositivos de separação, células solares, catalisadores e sensores, transportadores de fármacos, entre outros (MENEZES et al., 2012; MOLINA et al., 2014; ORIAL; WIESNER, 2011; ZHANG et al., 2013; SANCHEZ et al., 2005; LIN et al., 2009).

2.5.1 Aplicações dos materiais híbridos como dispositivos de liberação de fármacos

Devido às vantagens mencionadas acima, os pesquisadores têm estudado os materiais orgânicos-inorgânicos como dispositivos para os sistemas de liberação de fármacos. O número de publicações relacionadas com o termo "Organic-inorganic" e "drug delivery" tem aumento ao longo dos anos, demonstrando o interesse sobre esse tema (Figura 6).

Figura 6. Número de publicações encontradas com as palavras "organic-inorganic" e "drug delivery" (ISI: Web of Science, acessado em 17, julho de 2017).



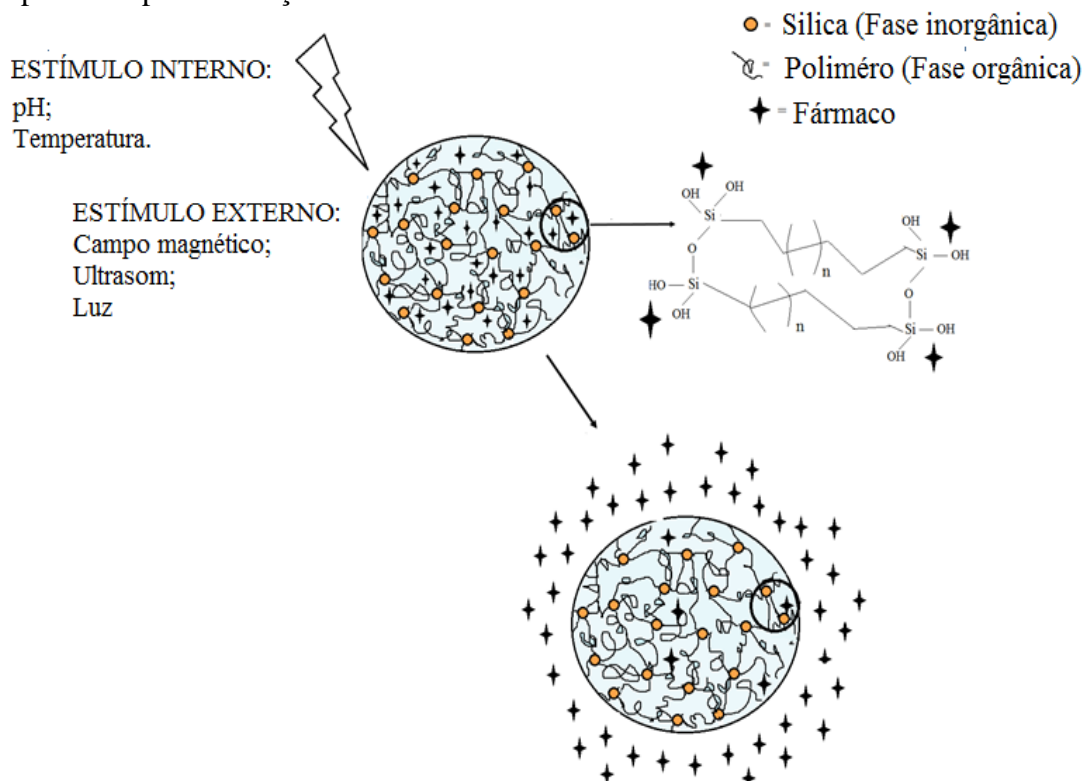
Estes sistemas provaram ser eficazes para a liberação de fármacos, quando comparado com os sistemas tradicionais, por apresentarem vantagens como: (a) capacidade de manter a faixa terapêutica com pouca variação, (b) evitar níveis tóxicos, (c) possibilidade de aumentar as concentrações plasmáticas das substâncias com meia-vida curta, (d) redução do número de doses diárias, o que pode aumentar a adesão do paciente ao tratamento (CHAVANPATIL et al., 2006; VENDRUSCOLO et al., 2005).

2.5.2 Aplicação dos Híbridos como Sistemas Estímulo-Responsivos

Os polímeros exibem temperatura crítica (TCIS). A TCIS é definida como a temperatura acima da qual o polímero sofre uma transição de fase de um estado de completa dissolução em água para um estado insolúvel em água. Assim, os materiais poliméricos sensíveis à temperatura têm atraído a atenção para o desenvolvimento de sistemas com o objetivo de liberar o fármaco após estímulos fisiopatológicos, proporcionando níveis terapêuticos adequados e baixa toxicidade (GAO et al., 2012).

A Figura 7 mostra um esquema de sistemas a partir de materiais orgânico-inorgânicos estímulos-responsivos. A liberação do fármaco neste sistema pode ocorrer por estímulos externos, tais como, campo magnético, ultra-som, luz; ou estímulo interno como pH e temperatura.

Figura 7. Esquema de sistemas a partir de materiais orgânico-inorgânicos estímulos-responsivos para liberação de fármaco.



Gao e colaboradores (2012) prepararam um sistema híbrido termoresponsivo usando álcool polivinílico (PVA) e sílica. O marcador modelo usado para o estudo de liberação foi a Rodamina B (RB). Os resultados de liberação *in vitro* em temperaturas de 20 e 38°C revelaram que o fármaco é liberado lentamente a 20°C, enquanto que a liberação é aumentada a 38°C.

Entre os sistemas que respondem a estímulos, o sistema pH-responsivo é o mais interessante devido ao pH humano variar em vários órgãos e tecidos alvo. Corma e colaboradores (2009) utilizaram um lipossoma encapsulado por um sistema orgânico-inorgânico, que poderia isolar e proteger as moléculas do fármaco (Doxorrubicina). Os ensaios de liberação do fármaco foram realizados em valores de pH entre 2,0 a 12,0, por 48 h. Os autores observaram que este sistema é estável a valores de pH ácido ou neutro e apenas a pH básico ocorre a liberação completa da doxorrubicina. Estes sistemas são interessantes para o tratamento de tumores sólidos, devido ao ambiente de pH extracelular ácido (CORMA et al., 2009).

Materiais orgânicos-inorgânicos contendo nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) foram testados por Molina e colaboradores (2014), visando alcançar um maior controle sobre a liberação do fármaco a partir da aplicação de estímulos de campos magnéticos. O sistema foi composto por PEO (O, O'-bis (2-aminopropil) poli (óxido de propileno) com 3-(isocianatopropil)-triethoxysilane, numa razão molar de 1:2 e o fármaco foi o diclofenaco de sódio. Estes autores avaliaram a liberação destes sistemas com e sem um campo magnético (0,25 t, 220 kHz). Os resultados revelaram um aumento nas taxas liberação do fármaco em função da quantidade do campo magnético aplicado (MOLINA et al., 2014).

2.5.3 Aplicação dos Híbridos como Biomaterial

Materiais formadores de filme representam uma alternativa aos sistemas convencionais (Sistemas Terapêuticos Transdérmicos) porque oferecem a vantagem de tornar o tratamento mais funcional e confortável, uma vez que são transparentes, permitem a visualização da ferida e podem ser removidos facilmente (SCHOEDER et al., 2006; PFISTER, 1997).

A utilização do material orgânico-inorgânico chamado ureasil-poliéter é um dos poucos exemplos interessantes de material formador de filme encontrados na literatura. Souza et al. (2013) foi a primeira pesquisadora a avaliar os materiais ureasil-poliéter como formadores de filme. Neste trabalho foi demonstrado que o material apresenta propriedades semi-oclusivas, assim é capaz de permitir a penetração do vapor de água, possui biocompatibilidade, formação do filme em tempo adequado (maior que 2 minutos e menor que 5 minutos), alto valor de adesão e transparência.

Estas características atendem aos requisitos para esta nova abordagem para sistemas de liberação de fármacos.

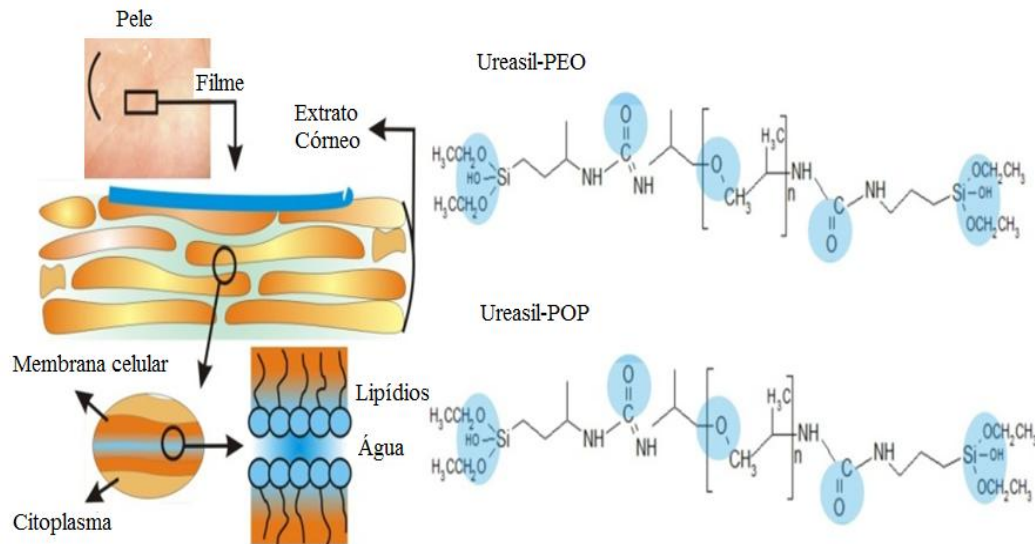
Com o objetivo de melhorar as características dos filmes ureasil-poliéter, Oshiro-Jr et al. (2015) realizaram um estudo com a finalidade de compreender a influência da utilização de um catalisador ácido (ácido clorídrico) e um catalisador básico (fluoreto de amônia) nas reações de hidrólise e condensação, etapa de formação dos filmes poliéter. Os resultados revelam que os catalisadores influenciam na velocidade do mecanismo de formação de filme. O catalisador básico levou à formação de um filme irregular, enquanto o ácido favoreceu a formação dos filmes. Isto se deve ao fato das reações de catálise ácida serem precedidas por protonação rápida dos substituintes OR ou OH ligados ao Si, aumentando a velocidade da reação, resultando em uma tendência para produzir uma rede mais linear, que resulta em filmes mais homogêneos (15 milímetros de largura e 0,5 mm de espessura).

A liberação dos fármacos sulfadiazina de prata e pramoxina foram estudadas nesses filmes e os resultados revelaram que o caráter hidrofílico ou hidrofóbico e o tamanho da cadeia polimérica determinam a taxa de liberação, sendo menor no material hidrofóbico e maior no material hidrofílico e quanto maior o tamanho da cadeia polimérica maior a taxa de liberação (OSHIRO-JR et al., 2014; PAREDES et al., 2014).

Os materiais híbridos orgânico-inorgânicos possuem dois tipos de sítios de ligação eletronegativos, os oxigênios do tipo éter da cadeia polimérica e oxigênios do grupo uréia localizados na interface siloxano-polímero, que podem solvatar moléculas eletropositivas, possuem também um sítio de ligação eletropositivo, ao qual podem se ligar moléculas eletronegativas (grupo NH) do grupamento uréia que liga a parte orgânica do híbrido ao grupo siloxano (LOPES et al., 2012). Essa característica de apresentar diferentes sítios de ligações entre molécula-matriz é importante para incorporação de princípios ativos com diferentes características.

A Figura 8 mostra as fórmulas estruturais das moléculas do material ureasil-poliéter usado nos sistemas formadores de filmes e os possíveis sítios de ligação do fármaco com o substrato biológico.

Figura 8. Fórmulas estruturais das moléculas dos materiais ureasil-poliéter os possíveis locais de ligação do fármaco com o substrato biológico (círculos azuis). Fonte: (OSHIRO-JR 2015).



Outro interessante exemplo de aplicação é a utilização como biomateriais para reparar o corpo humano, estes são chamados de biomateriais de terceira geração. Eles destinam-se a interagir com o ambiente biológico. As suas propriedades de superfície, tais como a topografia, carga superficial, e todos os aspectos relacionados com a sua composição química de superfície, são essenciais para se obter uma resposta positiva quando estes materiais estão em contato com tecido vivo. Isto permite promover a adesão celular, proliferação e diferenciação das células em excelentes condições (VALLET-REGI et al., 2011).

Coliila et al. (2010) estudaram a liberação do alendronato (bisfosfonatos amplamente utilizados nas doenças de tratamento com aumento da reabsorção óssea) incorporados em sistemas orgânicos-inorgânicos, usando Pluronic[®] P123 e Ortossilicato de tetraetilo (TEOS, 98%, Aldrich) como fonte de sílica e compararam com sistemas desenvolvidos a partir de sílica pura. Os resultados revelaram que as taxas de liberação e a incorporação do fármaco foram maiores para os sistemas híbridos (COLIILA et al., 2010).

Estes sistemas podem ser uma alternativa no tratamento de doenças com aumento da reabsorção óssea como tumores, osteoporose e doenças osteolíticas, além de diminuir a incidência de efeitos secundários dos bisfosfonatos, uma vez que eles exibem baixa absorção intestinal e requerem uma dose elevada que pode provocar distúrbios gastrointestinais, insuficiência renal crônica e outros (RUSSEL; ROGERS, 1999).

Outro fármaco usado para o preenchimento ósseo em um biomaterial orgânico-inorgânico foi a gentamicina (XUE; SHI, 2004). A gentamicina é um antibiótico que pode impedir um cenário típico causado por biomateriais utilizados no preenchimento ósseo, a osteomielite, que é a inflamação do osso causada pelo microrganismo piogênico.

Apesar dos resultados serem promissores em todos os casos citados, estágios mais avançados da pesquisa não foram encontrados. Assim, são necessários mais estudos para avaliar a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* desses sistemas, visando estender para estudos clínicos, a fim de beneficiar em um futuro próximo os pacientes.

A discussão feita nos trabalhos de pesquisa apresentados acima demonstra a inovação que os materiais híbridos orgânico-inorgânicos representam para o campo da ciências médicas, que poderia beneficiar inúmeros consumidor/pacientes, devido às suas características físico-químicas que permitem a sua utilização em diferentes formas de administração (lentes, implantes, membranas, formadores de filme, sistemas mucoadesivos, e outros), incorporar e liberar de forma rápida ou prolongada diferentes substâncias ativas (lipofílicas, hidrofílicas ou metal) e biocompatibilidade.

2.6 Justificativa

Neste tópico serão demonstrados os resultados obtidos anteriormente com as membranas ureasil-políeter, com o objetivo de elucidar o porquê dos componentes utilizados neste trabalho, uma vez que este trabalho é uma continuação de estudos iniciais realizados pelo nosso grupo.

Com o intuito de encontrar um material que possa agregar diversas propriedades e assim desenvolver uma membrana com características consideradas ideais, Oshiro e colaboradores (2016) vem estudando os materiais híbridos orgânico-inorgânicos. Experimentos com três tipos de membranas foram conduzido em implantes no tecido subcutâneos de ratos. Os materiais utilizados foram membrana de colágeno (Bio-Gide[®]) (GI); membrana ureasil-POP400 (GII) e membrana ureasil-POE1900 (GIII) (OSHIRO-JUNIOR et al., 2016).

De acordo com a análise histológica:

O material de colágeno (Bio-Gide[®]) representado pelo grupo I mostrou inflamação no período de 3 e 7 dias. Em torno da membrana de colágeno, a infiltração de células polimorfonucleares foi observada até o 3º dia e declinou nos próximos períodos, enquanto linfócitos e macrófagos aumentaram progressivamente até o 7º dia. Nos dias 15 e 30, a organização clássica de tecido de granulação foi observada, ou seja, ocorreu aumento de fibroblastos e deposição de colágeno ao longo dos períodos experimentais. Estas membranas absorvíveis têm sido desenvolvidas e são atualmente utilizadas em grande escala devido à sua biocompatibilidade, e principalmente porque eles não necessitam de um segundo procedimento cirúrgico para sua remoção, sendo absorvido ou incorporado no tecido cicatricial (DEMPSTER et al., 1999). Membranas de colágeno são absorvidos pela atividade enzimática (colagenase) a partir de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares.

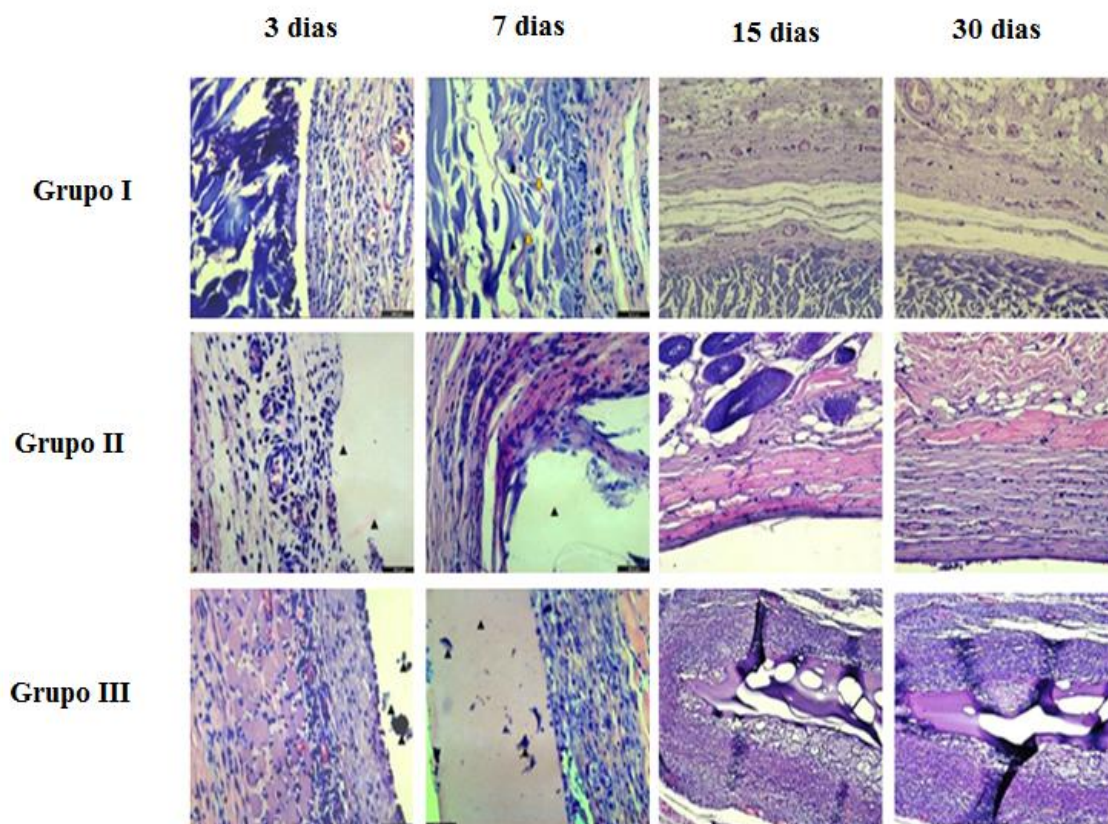
O material ureasil-PPO400 (GII) promoveu inflamação no 3º e 7º dias. Aos 15 dias, grandes quantidades de figuras vasculares e intensa população de células inflamatórias foram detectadas e conseqüentemente houve proliferação de fibroblastos. Houve diferenças significativas nos padrões histopatológicos das células inflamatórias e organização do tecido de granulação ao redor da amostra. Dentro da derme foi observado espaço bem definido ocupado por material amorfo eosinofílico. Envolvendo este espaço, há cápsula fibrosa formada por fibras de colágeno dispostas horizontalmente. Além disso, células fusiformes, leucócitos e novos vasos sanguíneos formados. No dia 30, o material não sofreu absorção e a epiderme mostrou aspectos de

normalidade. A normalidade de aspecto epiderme após 30 dias indicam que esta membrana é um bom candidato para ser usado como membrana biológica para sistema implantável.

A membrana ureasil-POE1900 (grupo III) revelou uma inflamação aguda em todos os períodos avaliados, com grande quantidade de células que caracterizam esta resposta, como: células gigantes, leucócitos e neutrófilos. Depois, a inflamação crônica foi identificada pela presença de células mononucleares (monócitos e linfócitos) no local do implante. A inflamação crônica é menos uniforme do que a inflamação aguda.

Todos os aspectos microscópicos para: membrana de colágeno (GI), membrana ureasil-PPO400 (GII) e membrana ureasil-PEO1900 (GIII) estão demonstrados na figura 9.

Figura 9. Aspectos microscópicos para: membrana de colágeno (GI), membrana ureasil-PPO400 (GII) e membrana ureasil-PEO1900 (GIII) (OSHIRO-JR et al., 2016).



Estes resultados podem estar relacionados com o elevado grau de intumescimento dos materiais ureasil-PEO1900 uma vez que a expansão do material após o contato com o meio pode danificar os tecidos internos, acentuando a resposta imune. Assim, comparando os grupos II e III fica evidenciado que a membrana ureasil-

PPO400 ofereceu resultados promissores uma vez que após 15 dias a epiderme apresenta aspecto normal, cessando a inflamação. As vantagens desse material em relação às membranas comerciais (GI) é sua capacidade de poder incorporar diferentes substâncias ativas, tornando-a capaz de ser osteoindutiva. As diferenças entre os perfis de intumescimento dos materiais GII e GIII foram estudados por Mendes (2012) revelando que para após 24 horas o intumescimento para o material ureasil-PPO400 é de 7%, enquanto que o ureasil-PEO1900 atingiu 180%.

Baseando-se nesses conclui-se que a membrana ureasil-PPO400 possui biocompatibilidade, mas não é a melhor escolha para o desenvolvimento de membrana para técnica de regeneração óssea guiada, uma vez que possui um alto número de grupamentos do tipo ureasil em sua estrutura e cadeias poliméricas curtas, que a tornam muito rígida, dificultando o manuseio. Por outro lado, a membrana ureasil-PEO1900, por possuir cadeias longas, torna a membrana flexível e a natureza hidrofílica da cadeia polimérica leva a um alto grau de intumescimento, causando uma intensa resposta inflamatória.

Sendo assim, membranas híbridas contendo misturas entre os materiais ureasil-PEO1900 e ureasil-POP400 e também misturas dos materiais ureasil-POP400 e ureasil-POP2000, para modular o grau de intumescimento do material, o grau de flexibilidade da membrana (facilidade de manuseio), resistência mecânica a resposta inflamatória do material foram desenvolvidas. Resultados revelaram que com a mistura de dois polímeros (Poli óxido etileno (1900 g mol^{-1}) e Poli óxido propileno ($400 \text{ e } 2000 \text{ g mol}^{-1}$), na proporção de 80% do material ureasil-PPO400 e 20% do ureasil-PPO2000 ou 20% do ureasil-PEO1900, foi possível melhorar as características das membranas puras e alcançar o objetivo proposto (OSHIRO-JUNIOR, 2014; OSHIRO-JR et al., 2017).

Portanto, tendo como base o panorama exposto, espera-se que as misturas dos materiais ureasil-poliéter com a incorporação do OGP, possa oferecer resultado promissores para o tratamento de defeitos ósseos em relação aos materiais convencionais quanto a quantidade de osso formado em relação ao tempo.

3 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi sintetizar membranas para técnica de regeneração óssea guiada a partir de materiais do tipo ureasil-poliéter capazes de controlar a liberação do peptídeo de crescimento osteogênico.

Para alcançar os objetivos as seguintes ações foram realizadas:

- Determinação das condições de síntese dos precursores híbridos;
- Determinação do método de esterilização;
- Análise de possíveis alterações do método de esterilização por DSC;
- Análise do perfil de intumescimento nanoscópico e macroscópico das membranas ureasil-POP400/POE1900 e ureasil-POP400/PEO500;
- Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo;
- Avaliação da resistência mecânica (DMA);
- Determinação do pH;
- Síntese do OGP;
- Incorporação do OGP nas membranas;
- Análise dos perfis de liberação *in vitro* do peptídeo de crescimento osteogênico incorporado nas membranas;
- Avaliação da biocompatibilidade *in vitro*;
- Análise Histológica.

4 Material

4.1 Matérias Primas

- O,O'-Bis(2-aminopropyl)polypropyleneglycol-block-polyethyleneglycol-block-polypropyleneglycol 1900 (POE 1900), Sigma-Aldrich;
- Poly(propylene glycol)bis(2-aminopropyl ether) 400 (POP 400), Sigma Aldrich;
- O,O'-Bis(2-aminopropyl)polypropyleneglycol-block-polyethyleneglycol-block-polypropyleneglycol 500 (POE 500), Sigma-Aldrich;
- Álcool etílico absoluto PA, Qhemis;
- Tetrahidrofurano (THF) PA ACS, Synth;
- 3-(Trithoxysilyl) PropylIsocyanate, 95%, Sigma-Aldrich;
- Solução de HCl 2.0 M;
- Meio de cultura DMEM (Modified Dulbecco's Minimum Media);
- Placa de 96 poços, fundo chato – Corning, NY 14831 USA;
- Saliva Artificial;
- Meio de cultura líquido Tioglicolado (Peptona de caseína, extrato de levedura, glucose, L-cistina, cloreto de sódio, tioglicolato de sódio, resazurinasodica, agar-agar);
- Meio de cultura líquido Agar Sabouraud (Hidrolisado enzimático de tecido animal, hidrolisado enzimático de caseína e dextrose);
- Dimetilformamida (DMF);
- Diclorometano (DCM);
- Solução básica de piperidina 20%;
- Carboxifluoresceína (CF);
- Doxorrubicina;
- Sulforodamina B;
- Ácido acético 1%;
- Tubo Falcon®;
- Ácido trifluoroacético (TFA);
- Microplaca;
- Ácido tricloroacético;
- Câmara de Neubauer;
- Garrafas de cultivo;
- Cadinho de alumínio.

4.2 Equipamentos

- Balança semi-analítica Denver Instrument;
- Agitador magnético IKA;
- Rotaevaporador IKA RV 10 digital;
- Estufa de secagem modelo 515 com controlador termostático, Fanem;
- PHmetro digital PG1800 Gehaka;
- Paquímetro universal, Starrett, 125 MEB – 6/150;
- Autoclave;
- Fluxo laminar, VECO, modelo HLFS18, série FL1918;
- Estufa;
- Leitor de placas, BIO-RAD - Imark;
- Bico de Busen;
- Cromatógrafo Beckman;
- Espectrômetro de massas LCQ FLEET Thermo Scientific;
- Espectrofotômetro de Fluorescência VARIAN modelo Cary Eclipse;
- DMA 2980 da TA-Instruments, microscópio;
- TA (DSC) modelo Q100.

5. Métodos

5.1 Obtenções das membranas híbridas do tipo ureasil-poliéter

Os materiais híbridos do tipo ureasil-poliéter foram sintetizados e processados a partir da rota química denominada sol-gel. Na síntese do precursor utilizou-se um poliéter funcionalizado a base de polióxido de etileno ($\text{NH}_2\text{-POE-NH}_2$) com massas molares de 1900 e 500 gmol^{-1} ou a base polióxido de propileno ($\text{NH}_2\text{-POP-NH}_2$) com massa molar de 400 gmol^{-1} dissolvidos em Tetrahidrofurano (THF). A essa solução foi adicionado um alcóxido modificado, o 3-isocianato propiltrióxido de silano (IsoTrEOS) na razão molar polímero/alcóxido de 1:2. Essa mistura permaneceu sob refluxo a uma temperatura de 60°C por 24 horas (Figura 10) (SANTILLI et al., 2009; CHIAVACCI et al., 2004).

Para promover a formação do precursor híbrido $(\text{EtO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{O})\text{NHCHCH}_3\text{CH}_2\text{-(polyether)-CH}_2\text{CH}_3\text{CHNH}(=\text{O})\text{NHC}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OEt})_3$ (SANTILLI et al., 2009), as quantidades de reagente utilizadas estão descritas na Tabela 1.

Figura 10. Sistema Refluxo.



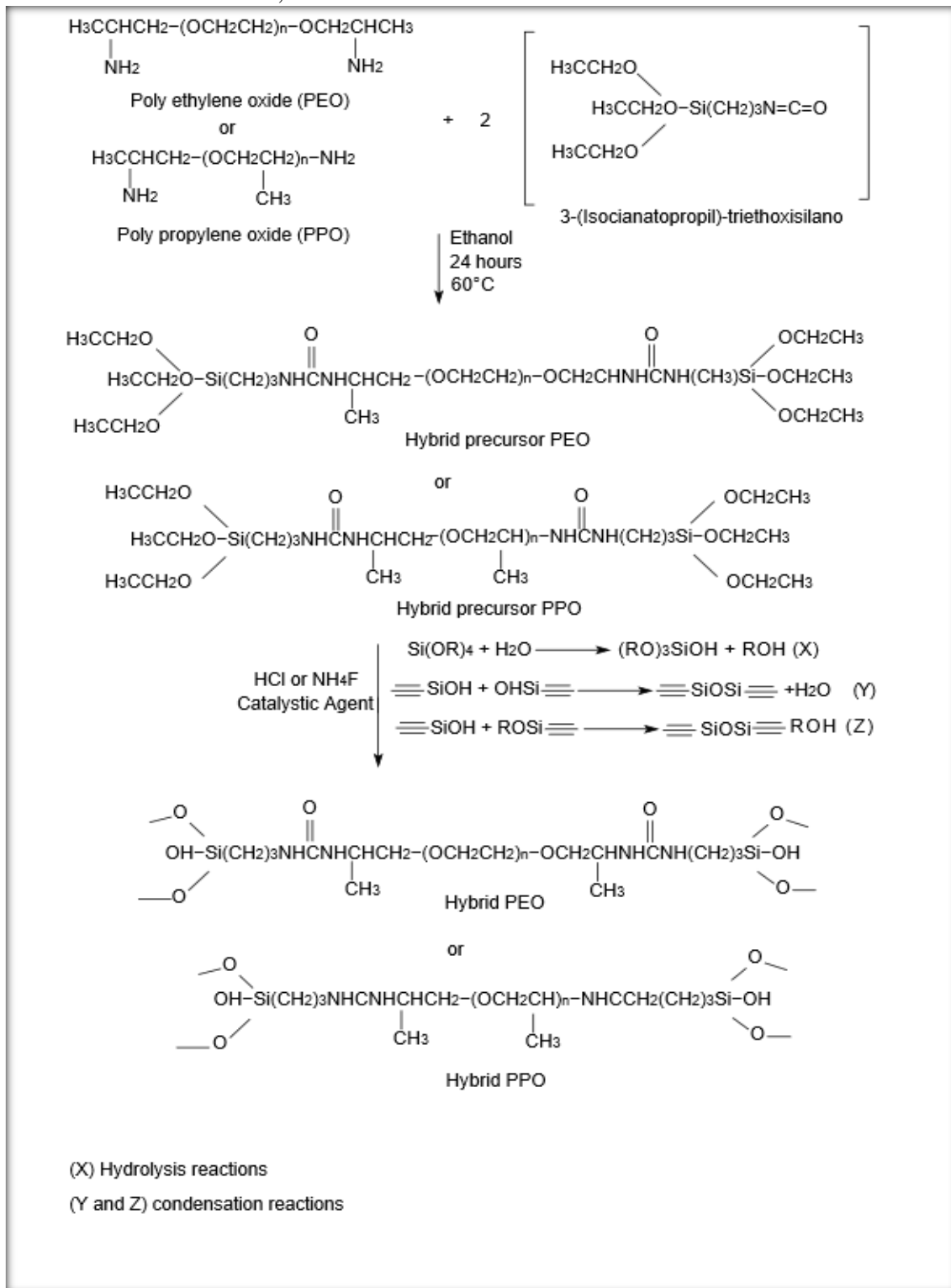
Tabela 1. Quantidades de reagentes utilizados na síntese das matrizes híbridas.

<i>Material</i>	<i>Isotreos</i>	<i>Polímero</i>	<i>THF</i>
Ureasil-POE 1900	6,4 ml	25 g	40 ml
Ureasil-POP 400	34,3 ml	25 g	80 ml
Ureasil-POE 500	19,6 ml	25 g	50 ml

Posteriormente, o solvente foi eliminado sob aquecimento e pressão reduzida (rotaevaporador), obtendo-se assim os precursores híbridos.

Em seguida, esses precursores foram submetidos às reações de hidrólise e condensação promovidas pela adição de 500 μ L de álcool, 25 μ L de água e de um agente catalisador neutro (NH₄F) com concentração de 1M. Com o avanço dessas reações os grupos OH foram progressivamente eliminados, levando a formação de um gel, nos quais as redes inorgânicas e orgânicas são unidas por ligações covalentes (SANTILLI et al., 2009; DALMOUCHE et al., 1999). As membranas foram obtidas pela secagem desse gel à temperatura ambiente em dessecador por 5 dias. A figura 11 apresenta as reações moleculares de todas as etapas acima.

Figura 11. Reações moleculares para obtenção do material híbrido ureasil-poliéter.
 Fonte: OSHIRO-JR et al., 2015.



O molde utilizado após essa etapa é o que garante o formato das membranas. Neste trabalho, optou-se por utilizar uma forma cilíndrica, uma vez que os defeitos ósseos criados na calota craniano dos ratos possuem esse aspecto.

5.2 Esterilização em calor úmido

O princípio do método baseia-se no contato direto de objetos com vapor de água saturado. As condições de realização do método são referenciadas pela Farmacopéia Brasileira - 5ª Ed, consistindo na esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos. As membranas foram embaladas em gases e envolvidas em papel pardo formando envelopes e, para evitar o contato direto com o vapor, os envelopes foram acondicionados em uma caixa metálica utilizada para esterilização de material cirúrgico.

5.3 Esterilização por radiação gama

As membranas híbridas ureasil-poliéter foram esterilizadas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. O Procedimento de esterilização foi realizado em parceria com a Johnson & Johnson, seguindo as normas validativas desta empresa. As amostras foram acondicionadas em envelopes termosensíveis onde foram vedadas e corretamente identificadas para posterior esterilização. O fato de utilizar este envelope como embalagem final, minimiza o efeito de recontaminação devido ao manuseio da amostra. Estas membranas foram esterilizadas por radiação gama com duas potências distintas 34 kGy e 24 kGy. Foram escolhidas duas potências distintas para posterior análise de alterações estruturais, que podem variar de acordo com a carga da radiação utilizada.

5.4 Testes de produtos estéreis

Os testes de produtos estéreis foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Hérica Nunes Salgado do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Fármacos e Medicamentos do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

O objetivo destes testes é comprovar se os produtos estão estéreis após os processos de esterilização (item 4.2 e 4.3).

Primeiramente foram preparados os meios de culturas, Tioglicolato (Fluid Thioglycolate Medium, Merk, Darmstadt – Germany) e Sabouraud (Sabouraud Dextrose Broth, Acumidia, Lansing, Michigan–USA). O meio Tioglicolato é utilizado para promover e determinar o crescimento de bactérias anaeróbias, enquanto que o meio Sabouraud pode ser utilizado para determinar o crescimento de fungos, leveduras e bactérias aeróbicas. Os caldos foram preparados em béquer e transferidos para tubos de ensaios (80 mL) e tampados com algodões, posteriormente foram envoltos com papeis pardo para serem esterilizados em autoclave (15 minutos e Temperatura de 121°C). Os

testes foram realizados pelo método de inoculação direta do produto no meio. Utilizou pinça estéreis sob fluxo de ar e bico de Busen. Após a inoculação os meios de cultura foram incubados, o meio líquido de tioglicolato foi incubado a 35°C e a análise visual foi realizada em 24 e 48h, já o meio líquido sabouraud foi incubado por 7 dias a 25°.

Durante a inoculação realizou-se um controle negativo (sem inoculo) e um positivo para possível comparação dos resultados. O controle positivo para Caldo Tioglicolato foi *Bacillus subtilis* e para o Caldo Sabouraud foi cepa padrão de *cândida albicans*.

5.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Técnica de DSC foi utilizada para analisar se os processos de esterilização por calor úmido e por radiação gama não alteraram a estrutura dos materiais híbridos ureasil-poliéter.

As medidas foram realizadas em colaboração com a Prof. Dr. Celso Valentim Santilli do Laboratório de Físico-Química de Materiais do Instituto de Química da UNESP, utilizando-se um equipamento TA (DSC) modelo Q100, num intervalo de temperatura de -80 °C a 350 °C, com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 73 cm³/min, utilizando cerca de 10 mg de amostra, cortadas de forma circular para que se encaixassem no cadinho de alumínio selado de 40 µL.

5.6 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Medidas “*in situ*” utilizando SAXS foram efetuadas, antes e durante o processo de passagem do meio de liberação tampão fosfato pH 7.2 pelas membranas.

As medidas foram realizadas na linha de SAXS, do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), Campinas, SP. A linha de SAXS 1, a qual é equipada com um conjunto de fendas assimétricas e um monocromador de silício, permitindo a obtenção de um feixe monocromático de $\lambda = 1,608 \text{ \AA}$ e seção transversal de aproximadamente 1,6 mm². Um detector de raios X sensível à posição e um analisador multicanal foram usados para monitorar a intensidade do feixe espalhado, $I(q)$, em função do módulo do vetor de espalhamento. A intensidade espalhada foi normalizada pela espessura e pela atenuação da amostra. As medidas foram realizadas sob temperatura e pressão ambiente. Após a análise das amostras secas foram realizadas adaptações na linha do

SAXS para avaliar o efeito do intumescimento da nanoestruturados materiais. Para isso as medidas *in situ* foram realizadas em um porta amostra fechado com duas janelas de mica e uma bomba peristáltica foi usada para controlar o fluxo do meio mantido a 37°C (Figura 12).

Figura 12. Linha de SAXS adaptada para avaliação de medidas de intumescimento *in situ*. (a) Bomba peristáltica; (b) conexão para passagem do meio; (c) porta amostra).



5.7 Análise mecânica dinâmica (DMA)

A análise mecânica dinâmica foi realizada para determinar a resistência mecânica das membranas quando estas foram submetidas a uma variação de força em sua superfície. As medidas foram realizadas em colaboração com a Prof. Dr. Celso Valentim Santilli do Laboratório de Físico-Química de Materiais do Instituto de Química da UNESP, para as membranas puras (ureasil-PPO400, ureasil-PEO1900 e ureasil-PEO500), para as misturas dessas membranas e para uma membrana comercial de colágeno (INFUSE[®]), utilizando o equipamento DMA 2980 da TA-Instruments, operando a temperatura de 37° com o forno fechado para controlar a temperatura, com rampa de força de 1 N/min até 15 N, modo de carga de compressão e corpos de prova no formato cilíndrico com diâmetro de 6,25 mm e espessura de 0,5 mm.

5.8 Determinação do pH

A avaliação das alterações de pH induzidas pelas membranas foi feita através da imersão destas em uma solução de Simulated Body Fluid (SBF) pH 7,4, com

concentração iônica semelhante ao plasma sanguíneo. As membranas utilizadas tinham 6 mm de diâmetro e $0,3 \text{ mm} \pm 0,1 \text{ mm}$ de espessura, cada amostra foi acondicionada em um béquer contendo 6 ml de SBF. Foi utilizado um pHmetro digital PG1800 Gehaka para realizar as medidas e estas foram realizadas em triplicata a uma temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.9 Síntese do peptídeo

O peptídeo de crescimento osteogénico (OPG) (ALKRQGRTLYGFGG) utilizado neste estudo foi obtido em colaboração com a Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, manualmente pelo método de fase-sólida (SPFS) (Fields and Noble, 1990).

A síntese do peptídeo em fase sólida consiste em utilizar uma resina funcionalizada (matriz polimérica inerte e insolúvel) para o crescimento da cadeia peptídica. A síntese é realizada adicionando um aminoácido de cada vez por meio de um processo cíclico, permitindo sua automação.

O peptídeo OPG (ALKRQGRTLYGFGG) foi sintetizado utilizando a estratégia Fmoc para a proteção do grupo α -amino, sobre a resina Fmoc-Ser(tBu)-Wang, com um grau de substituição de 0,58mmol/g, em escala de 0,2 mmol.

O protocolo de síntese baseou-se de etapas cíclicas de desproteção do grupo Fmoc e acoplamento do novo Fmoc-aminoácido, intercalados por lavagens para eliminação dos reagentes utilizados e subprodutos obtidos.

Na etapa de acoplamento, os reagentes N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC)/ N-hidroxibenzotriazol (HOBt) foram utilizados para ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido acoplante (agentes de acoplamento para facilitar a reação), permaneceu durante duas horas sob agitação, utilizando como solvente 50% de dimetilformamida (DMF) em diclorometano (DCM). Os Fmoc-aminoácidos e reagentes (DIC e HOBt) foram utilizados com um excesso de duas vezes em relação à quantidade de sítios ativos livres na resina (0,4mmol). Após o término deste processo foi realizado uma lavagem com solventes orgânicos (DMF e DCM) com a finalidade de solvatação da resina e eliminação do excesso dos reagentes. O procedimento de lavagem foi repetido 3 vezes.

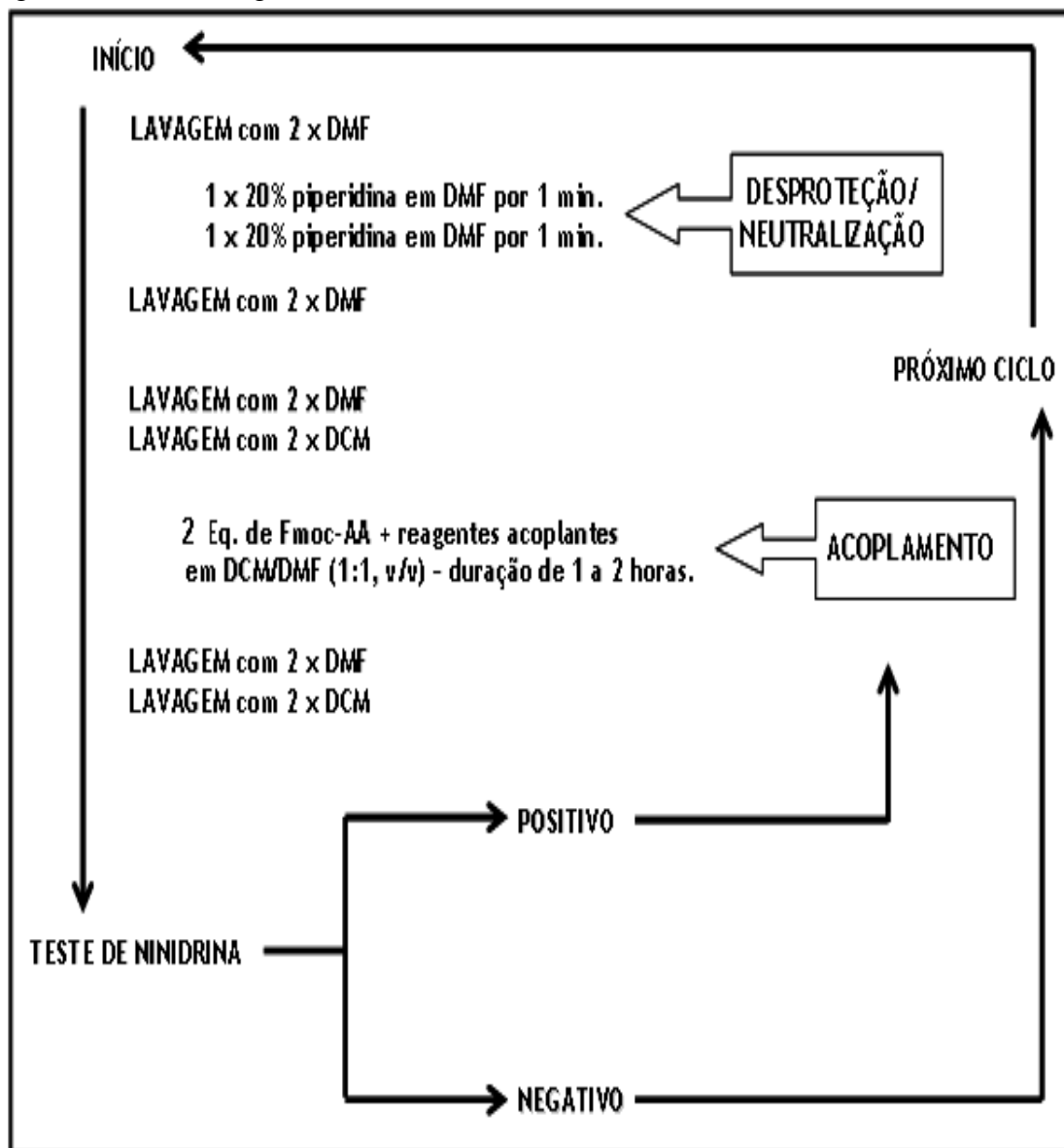
A desproteção do grupo amino após acoplamento foi realizada por meio da reação com uma solução básica de piperidina 20% em DMF durante 20 minutos, etapa

esta realizada 3 vezes. Após essa etapa, o procedimento de lavagem com solventes orgânicos foi repetido.

Depois de cada acoplamento e desproteção foi realizado o teste de Kaiser, também conhecido como ninidrina, onde esta reage com os grupos aminos livres originando um composto de cor azulada em altas temperaturas, evidenciando a desproteção, retirada do grupo Fmoc (resultado positivo), e quando o acoplamento do aminoácido foi efetuado completamente, originou-se um composto de cor amarelada (resultado negativo). Após os acoplamentos dos resíduos de aminoácidos, a massa total de peptídeo-resina foi dividida em duas partes, onde uma delas foi utilizada para o acoplamento da carboxifluoresceína (CF).

A figura 13 mostra esquematicamente todas as etapas da rota de síntese do peptídeo descrita acima.

Figura 13. Protocolo geral de síntese.



Após o término da síntese, foi realizada a etapa de clivagem do peptídeo, com o intuito de retirar o peptídeo da resina e os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos.

Esta etapa foi realizada com uma mistura de ácido trifluoroacético (TFA) (95%)/água (2,5%)/TIS (2,5%) na proporção de 1g de resina para cada 10mL de solução de clivagem, em frasco de acetilação, a temperatura ambiente sob agitação constante por 2 horas.

Após esse período, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado com a finalidade de separá-lo dos subprodutos da clivagem por meio de centrifugação (5 minutos), esse processo foi repetido cinco vezes. Posteriormente, para extrair o peptídeo da resina, foi adicionado no frasco que contém resina e peptídeo uma solução

aquosa contendo 0,045% de TFA, a qual permaneceu por 2 minutos no vortex e 2 minutos no ultrassom para solubilizar, após solubilizado o frasco permaneceu 3 minutos na centrifuga. O sobrenadante resultante (peptídeo bruto) foi coletado em um balão, este procedimento foi repetido 5 vezes.

O sobrenadante resultante foi congelado para ser liofilizado. Uma alíquota do peptídeo bruto foi analisada por cromatografia líquida analítica alta eficiência (CLAE) analítico em um cromatógrafo Shimadzu, com coluna C₁₈ KROMASIL de 15,0 x 0,46 cm, para obtenção do perfil cromatográfico do mesmo.

O acoplamento da carboxifluoresceína (CF) foi necessário para a realização do experimento de liberação *in vitro* por espectroscopia de fluorescência (ver item 4.13). Assim, foi escolhido a molécula de 5,6-carboxifluoresceína (CF, Sigma[®]) para acoplar no término da síntese, utilizando o mesmo procedimento descrito acima para o acoplamento dos aminoácidos.

5.9.1 Purificação

A purificação do peptídeo bruto foi realizada por CLAE semi-preparativo utilizando um cromatógrafo Beckman, com coluna C₁₈PHENOMENEX de dimensão 2,1 x 25 cm. Durante a purificação foram recolhidas frações de 3mL e o grau de pureza das frações foi determinado por CLAE analítico. Os tubos puros foram juntados e liofilizados obtendo-se as frações puras que foram analisadas pelo mesmo método descrito acima. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas empregadas na purificação do peptídeo sintetizado.

Modo	Semi-preparativo	Analítico
Solventes	A: 0,045% TFA em H ₂ O B: 0,036% TFA em ACN	A: 0,045% TFA em H ₂ O B: 0,036% TFA em ACN
Gradiente	5-35% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min
Fluxo	5mL/minuto	1mL/minuto

5.9.2 Caracterização por espectrometria de massas

O espectro de massas foi obtido em um espectrômetro de massas LCQ FLEET ThermoScientific, com injeção direta, em modo de detecção positiva, localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no Departamento de Química Orgânica.

A técnica baseia-se em uma câmara injetora que ioniza positivamente a amostra por um método chamado *eletrospray*, um quadrupolo simples e um detector, todos dentro de um sistema a vácuo. O espectro de massas obtido mostra a razão MM/z , e assim permite calcular as massas moleculares obtidas experimentalmente por meio da equação 1:

$$MM_{\text{pept}} = (MM_{z+z} \cdot MM_{\text{H}^+})/z \quad \text{eq.(1)}$$

Onde: MM_{pept} é a massa molecular do peptídeo analisado;

MM_z é a massa molecular quando o peptídeo está com carga z ($z = 1, 2, 3, \dots$);

z é a quantidade de cargas que contém o peptídeo;

MM_{H^+} é a massa molecular do hidrogênio protonado, de valor 1,008 g/mol.

5.10 Incorporação do OGP e OGP-CF nas membranas ureasil-poliéter

Para a incorporação do OGP e OGP-CF nas membranas, foi preparado uma solução estoque com concentração de $2,65 \times 10^{-5}$ mol/L. Essa concentração foi baseada nos estudos conduzidos por Gabet e colaboradores (2004) e Sun e Ashhurst (1998). No estudo conduzido por Gabet foi injetado $1,4109 \times 10^{-11}$ mol de OGP para 0,250 kg de animal por 6 dias na semana (1 a 4 semanas) totalizando no máximo 24 doses ($33,84 \times 10^{-11}$), enquanto que no estudo de SUN e Ashhurst foi injetado $3,28125 \times 10^{-11}$ mol em 0,250kg de animal (5° dia até o 28° dia) total de 24 doses ($78,72 \times 10^{-11}$).

Assim, na etapa de hidrólise e condensação do precursor híbrido (item 4.1 Obtenção das membranas), a água foi substituída pela solução estoque contendo o OGP ou OGP-CF. Desta forma, cada membrana possuiu uma concentração final de $66,25 \times 10^{-10}$ mol de OGP.

5.11 Curva Analítica

Linearidade é quando os resultados obtidos podem ser proporcionais às concentrações do analito na amostra, em um intervalo específicos. Por meio da curva analítica foi demonstrada a linearidade do método (BRASIL, 2003; USP, 2002).

A partir de uma solução tampão fosfato de OGP-CF contendo 0,4304 $\mu\text{mol/L}$ foram preparadas as diluições, com concentrações que variavam de 0,4304, 0,2152, 0,0538, 0,0269, 0,01345 $\mu\text{mol/L}$ em triplicata. A leitura das amostras foi realizada em um espectrofotômetro de fluorescência VARIAN modelo Cary Eclipse, com λ_{exc} em 492nm e λ_{em} em 520nm (comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, referentes à carboxifluoresceína).

5.12 Liberação do OGP-CF em solução de SBF a partir das membranas ureasil-poliéter

As membranas ureasil-POP400/PEO1900 e ureasil-POP400/POE500 contendo o OGP-CF foram submetidas a testes “in vitro” de dissolução em solução tampão fosfato pH 7,2. O teste foi realizado nas seguintes condições, 15 mL de tampão fosfato pH 7.2 em temperatura de 37 °, sob agitação constante. Para coletar cada uma das alíquotas foi utilizada uma micropipeta, o volume coletado das alíquotas foi de 600 μL sendo repostado logo em seguida. Os espectros foram analisados em um espectrofotômetro de fluorescência VARIAN modelo Cary Eclipse, com λ_{exc} em 492nm e λ_{em} em 520nm (comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, referentes à carboxifluoresceína). O teste foi realizado em triplicata.

5.13 Microscopia de força atômica (MFA)

Esse teste foi realizado durante o estágio de pesquisa no exterior pelo programa Erasmus Mundus na Universidade de Castilla-La Mancha (Espanha) sob orientação da Profa. Dr. Maria Teresa Cuberes Montserrat.

Foi realizada medidas de topografia dos sistemas híbridos ureasil-poliéter com e sem o peptídeo, utilizando a técnica de MFA. A análise foi realizada utilizando o microscópio de força atômica (Bruker, modelo Dimension Icon), sob o modo de contato intermitente. A amostra foi adicionada no microscópio e assim, as imagens topográficas foram observadas empregando uma sonda/cantilever na qual fez o rastreamento da superfície da amostra. O tratamento das imagens topográficas foi realizado utilizando o *software Nanotec WSxM versão 5.0*.

5.14 Avaliação da citotoxicidade in vitro

Os testes de citotoxicidade in vitro foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Christiane Pienna Soares do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

5.14.1 Cultivo celular

A linhagem normal de queratinócitos de pele (Hacat) foi cultivada em garrafas de cultivo contendo meio mínimo essencial de eagle modificado por dulbecco-DMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10mM de L-glutamina, 2,5 µg de anfotericina-B e 10mL da mistura de penicilina-estreptomicina) e mantida em estufa a 5 % de CO₂ e a temperatura de 37 °C, até que a monocamada celular estivesse confluenta (estado onde o tapete celular formado atinge mais de 70 % dentro da garrafa de cultivo). Posteriormente, as células foram lavadas com 5mL de solução de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06g de KH₂PO₄, 0,04g de Na₂HPO₄, 0,35 g de NaHCO₃, 1 g de glicose, H₂O q.s.p. 1000 mL) e acrescentou-se tripsina 3 mL de ATV (Associação de Tripsina (0,2 %) e Versene (0,02 %)). A tripsina permite o desprendimento das células da garrafa de cultivo, por meio da sua propriedade proteolítica sobre as proteínas intercelulares. Após o desprendimento do tapete celular com a tripsina, adicionou-se 3mL do DMEM com soro para neutralizar a ação da tripsina e este volume foi transferido para um tubo de Falcon[®], centrifugado a 1000rpm por 3minutos. Após essa etapa, foi descartado o sobrenadante e sobrou apenas o pelet (agregado celular) que foi ressuspensionado com 10 mL de DMEM mais soro. O volume foi dividido e transferido para duas garrafas de cultivo. Esse procedimento é repetido até que houvesse quantidade de células suficientes para o experimento de Sulforodamina B.

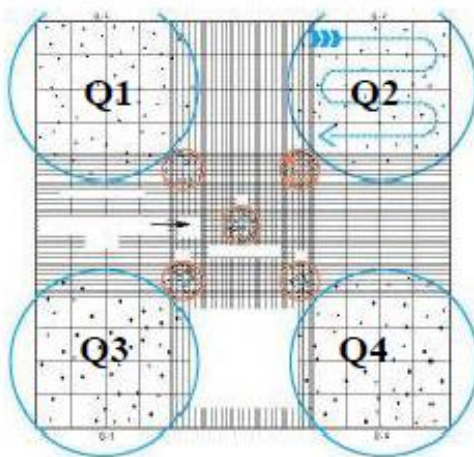
5.14.2 Contagem celular

A contagem celular foi realizada para determinar o número de células a serem inoculadas nos poços da microplaca, procedeu da seguinte forma: Após descartar o sobrenadante do tubo Falcon[®] conforme descrito acima, o pelet foi ressuspensionado com 2mL de DMEM com soro. Foram adicionados µL dessa solução na câmara de newbauer, e levados ao microscópio. Em seguida, foi realizada a contagem das células nos 04 quadrantes da câmara de Neubauer (Figura 14).

Esta medida padronizada possibilita a quantificação da suspensão celular. Para isto deve-se contar as células presentes nos 4 quadrantes (círculos grandes), no sentido

sugerido pela seta para cada quadrante. Em seguida, o número total de células obtido nos 4 quadrantes é dividido por 4 (média) e multiplicado pelo valor da diluição realizada. Ao final, o valor encontrado foi multiplicado por $1 \times 10^4/\text{mL}$ (ordem de grandeza da câmara).

Figura 14. Representação esquemática da câmara de Neubauer.



5.14.3 Ensaio de Sulforodamina B

Para esse ensaio foi utilizada uma suspensão de 8×10^4 células/poço da linhagem Hacat. As células foram inoculadas em placas de 96 cavidades, e após 24 horas de cultivo em DMEM suplementado com soro, este meio foi aspirado e tratado com uma solução de 100 μL de DMEM sem soro (este DMEM permaneceu em contato com as membranas por 48 horas). Após 24 horas de contato, foi adicionado 50 μL de ácido tricloroacético (finalidade de romper as células e fixar as proteínas celulares) e incubado por 1 hora em refrigerador em temperatura de 4°C .

Após este período o meio foi removido e os poços da microplaca foram lavados 4 vezes com 400 μL de água deionizada, e a microplaca foi seca a temperatura ambiente. Uma vez secas, adicionou-se 50 μL da solução de sulforodamina 0,4% (p/v) diluída em 1% de ácido acético (solução para avaliação colorimétrica) e assim permaneceu por 30 minutos em repouso em temperatura ambiente. Após este período, esta solução foi retirada e os poços foram lavados 4 vezes com 400 μL de ácido acético 1% com a finalidade de retirar o excesso de corante, e foi seca a temperatura ambiente. Por fim, foi adicionado 100 μL da solução tampão Tris Base (solução que resolubiliza a sulforodamina B) sendo mantido por 5 minutos em repouso e então foi medida a absorbância a 570 nm em leitor de microplata.

Cada ensaio foi acompanhado de um controle positivo (Doxorrubicina 15µL/mL) e controle negativo por células tratadas apenas com o DMEM sem contato com material.

Foram realizados três experimentos independentes e as concentrações foram testadas em triplicatas. A viabilidade celular dos tratamentos foi expressa em relação ao controle negativo.

A viabilidade celular foi calculada pela equação 2:

$$\text{Células vivas (\%)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Controle Negativo}} \times 100 \quad \text{eq.(2)}$$

5.15 Teste *in vivo*

5.15.1 Confeção dos defeitos ósseos

Neste estudo foram utilizados 24 ratos (*Rattus Norvegicus*), variação albinus, Holtzman, adultos provenientes do Biotério da Faculdade de Botucatu – UNESP. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Processo CEUA nº 17/2012 (Anexo 1)).

Os animais foram mantidos em ambiente controlado com relação aos ciclos de luz, umidade e temperatura com acesso a ração específica e água *ad libitum*. Foram anestesiados por associação de quetamina com xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de quetamina – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 0,04 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda.), respectivamente.

Foram submetidos à tricotomia na região da calota craniana e foi realizada antissepsia do campo cirúrgico com gaze estéril, embebida em solução de povidine, com o animal sendo posicionado em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica. O acesso cirúrgico à calota craniana foi obtido com uma incisão ântero-posterior cutânea e muscular, com aproximadamente 5 mm de extensão, permitindo a exposição do periósteo, utilizando-se cabo para bisturi com lâmina intercambiável nº 15.

Em seguida, os tecidos foram divulsionados com o auxílio de uma tesoura pequena com a extremidade romba e uma pinça de dissecação, até a exposição do periósteo, sendo este incisado e removido com o mesmo tipo de lâmina até a exposição do tecido ósseo.

Foram confeccionados defeitos ósseos circulares, na porção mediana da calvária com 5 mm de diâmetro e aproximadamente 1,5 mm de espessura, dada pela remoção total do tecido ósseo, utilizando uma fresa trefina (Dentoflex, São Paulo, Brasil) com 5 mm de diâmetro externo, montada em contra-ângulo (Anthogyr – Injecta – Diadema, Brasil) com redução de 16:1, acoplado em motor para implante (BML 600 Plus Driller - CK Driller – Brasil), com 1500 rpm, sob irrigação constante com solução salina.

Os materiais foram colocados sobre o defeito ósseo de tal maneira a ultrapassar 1mm a borda do defeito. Em cada animal foi executado uma seleção randomizada do tipo de membrana a ser utilizada para recobrimento do defeito, sendo que em cada animal dois tipos diferentes de membrana foram utilizados. De uma forma geral, todas as membranas foram avaliados em 4 períodos experimentais (7, 15, 30 e 60 dias), com 9 animais em cada período e 6 animais em cada grupo de material implantado.

Os defeitos críticos foram recobertos com as seguintes membranas: GI – (membrana de colágeno), G II – (membrana de siloxano-polioxipropileno 400 g/mol com siloxano-polioxietileno 1900 g/mol, concentração de 80%/20%).

Após os períodos correspondentes os animais foram sacrificados e as peças da região da calvaria foram removidas.

5.15.2 Preparação histológica

Após a eutanásia dos ratos, removeu-se toda a calota craniana e imediatamente todas as peças ósseas foram imersos em solução de formol a 10 %, onde permaneceram pelo período de 48 horas. Após esse período as peças foram descalcificadas em solução de EDTA a 20 %, trocada a cada 48 horas, durante 60 dias. Esse tempo é necessário para que as peças ósseas sofram descalcificação permitindo a realização do corte em micrótomo comum. O teste da agulha foi realizado para verificar se o material inorgânico havia sido removido.

Em seguida, realizou-se os cortes das peças ósseas a fim de prepará-las para o processamento histológico. Os cortes foram feitos no sentido látero-lateral, passando pelo centro (sentido ântero-posterior) do defeito ósseo.

As peças ósseas cortadas foram acondicionadas em cassetes próprios para o processamento histológico, que consistiu em: (a) 1 hora em álcool 90° GI, (b) 5 trocas sucessivas em frascos com álcool absoluto, com intervalos de 30 minutos entre cada uma, (c) 30 minutos em solução (1:1) de álcool absoluto e solvente xilol, (d) 30 minutos em solução de xilol puro (e) 1 hora em outra solução de xilol puro, (f) 1 hora em

parafina líquida em estufa a 61 °C, (g) 2 horas em nova parafina líquida em estufa a 61 °C, (h) Confeção dos blocos em inclusora padrão, com uso de parafina líquida, formas metálicas e placa fria. Como resultado foram obtidos os blocos de parafinas contendo as peças ósseas.

5.15.3 Cortes e coloração histopatológica

Após a confecção dos blocos de parafina, estes foram submetidos aos cortes histológicos em micrótomo semi-automático, com espessura de 6 µm. Estes cortes foram submetidos à solução de etanol 10 °GL e posteriormente à água aquecida à 43 °C, a fim de serem esticados mantendo-se a qualidade necessária. Posteriormente, foram dispostos em lâminas de vidro lapidadas, sendo então encaminhadas a estufas a 61 °C para que ocorresse a adesão dos cortes e dissolução do excesso de parafina.

Após a adesão, foi realizada a coloração histológica, seguindo o protocolo da coloração da Hematoxilina de Harris com adição de Eosina.

Após esses procedimentos as peças ósseas foram recobertas por lamínulas sintéticas e observadas ao microscópio.

5.15.4 Análise Histológica

A análise de descrição histológica foi executada com auxílio de um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany), com objetiva para aumento de 100x. Essa análise foi executada por um avaliador experiente e cego para os grupos experimentais que no ato da análise levou em consideração as reações inflamatórias, bem como as reações de degradação das membranas, características do osso neoformado (estágio de maturação, aspecto da matriz, presença de osteócitos inseridos na matriz), formação e organização do tecido conjuntivo fibroso e aspecto do perióstio.

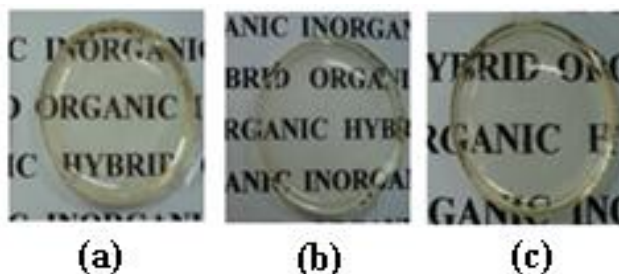
6. Resultados e Discussões

6.1 Obtenção dos materiais híbridos do tipo ureasil-poliéter

A etapa de obtenção dos materiais híbridos deve ser cuidadosamente conduzida, uma vez que fatores ambientais (atmosfera oxidante, temperatura e pressão) podem resultar em quebras das redes reticuladas. Para assegurar que as propriedades adequadas do material foram obtidas o processo sol-gel foi utilizado após a síntese do precursor híbrido e as reações de hidrólise e condensação foram promovidas. Esse método permite controlar todas as etapas da preparação do material como temperatura, pressão e condições ambientais, formando no final um material com uniformidade estrutural e elevada pureza.

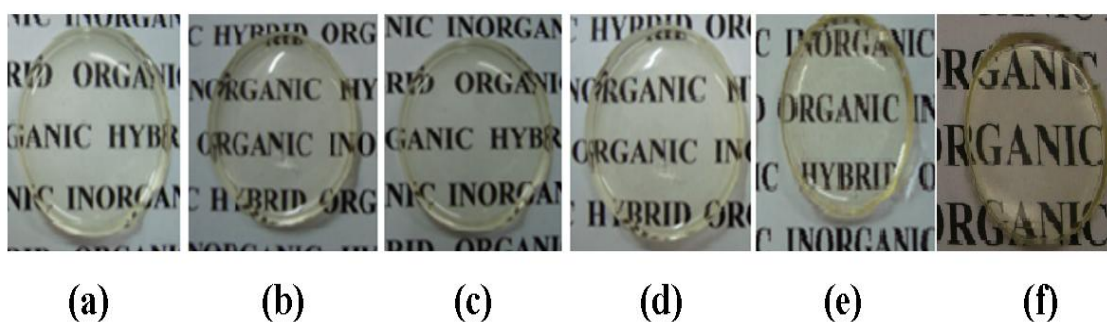
O aspecto visual das membranas preparadas a partir dos precursores híbridos ureasil-POE1900, ureasil-POE500 e ureasil-POP400 estão apresentados na figura 15.

Figura 15. Aspectos visuais das membranas híbridas: a) ureasil-POP400; b) ureasil/POE1900; c) ureasil-POE500.



A figura 16 apresenta os aspectos visuais das membranas preparadas a partir das misturas desses materiais.

Figura 16. Aspectos das membranas ureasil-POP400/POE500 em diferentes proporções: a) 90:10; b) 80:20; c) 70:30; d) 60:40; e) ureasil-POP400/POE1900 proporção 80:20; f) ureasil-PPO400/PEO1900 proporção 50:50.



Essa modificação ocorre antes da etapa de hidrólise e condensação onde foram adicionadas diferentes proporções (massa/massa) dos precursores, resultando em membranas com misturas de ureasil-POP400 e ureasil-POE1900 e membranas com

misturas de ureasil-POP400 e ureasil-POE500. Essas misturas tiveram como objetivo modular o grau de intumescimento a fim de controlar o perfil de liberação do fármaco, além de evitar a ocorrência de traumas nos animais, o que poderia levar a uma resposta inflamatória intensa, conforme demonstrado em trabalho anterior.

Observa-se pelas Figuras 15 e 16 que visualmente as membranas não possuem trincas ou rachaduras, assim, conclui-se que o processo foi realizado de forma adequada.

6.2 Métodos de Esterilização e testes de produtos estéreis

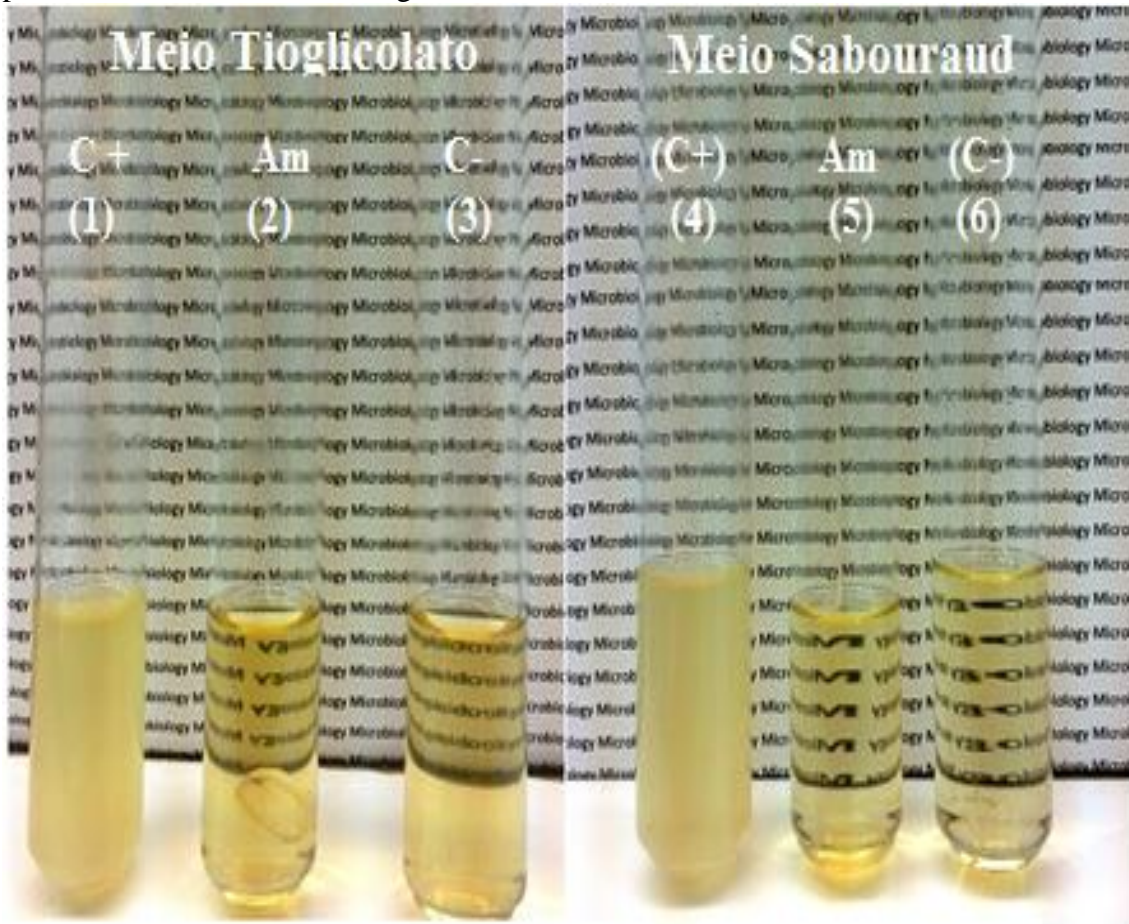
Os métodos de esterilização têm a finalidade de promover completa eliminação ou destruição de todas as formas de microrganismos presentes em um determinado produto. O método selecionado para garantir a esterilidade adequada do produto é determinado pela natureza do material a ser esterilizado e pelas alterações físico-químicas às quais ele está sujeito.

A utilização de calor em ambiente úmido é um dos métodos mais eficazes de destruição de microrganismos. A morte das células microbianas por ação do calor úmido resulta da desnaturação das proteínas e da desestabilização da membrana citoplasmática. A destruição das células ocorre quando estas são sujeitas a temperaturas superiores à temperatura máxima de crescimento dos microrganismos. Enquanto que a esterilização por radiação gama ocorre devido a ação das ondas eletromagnéticas que danifica o DNA dos microrganismos.

Os testes de esterilidade são aplicados à insumos farmacêuticos, medicamentos e à produtos da área da saúde para analisar a ausência de bactérias e fungos garantindo que o método de esterilização é adequado para ser utilizado.

Nos dois meios testados neste trabalho (Tioglicolato e Sabouraud) comprovou-se que os métodos de esterilização utilizados foram efetivos. A Figura 17 apresenta o aspecto visual dos tubos de ensaios contendo os meios. Observa-se que os tubos de ensaio (2 e 5) contendo a membrana ureasil-poliéster está límpido, assim como o tubo de ensaio do teste negativo (3 e 6), diferente do tubo de ensaio contendo o controle teste positivo (1 e 4). Desta forma, conclui-se que os métodos de esterilização utilizados promoveram a completa eliminação ou destruição de todas as formas de microrganismos presentes nos materiais híbridos.

Figura 17. Teste de esterilidade em meio Tioglicolato e meio Sabouraud: controle positivo, amostra e controle negativo.



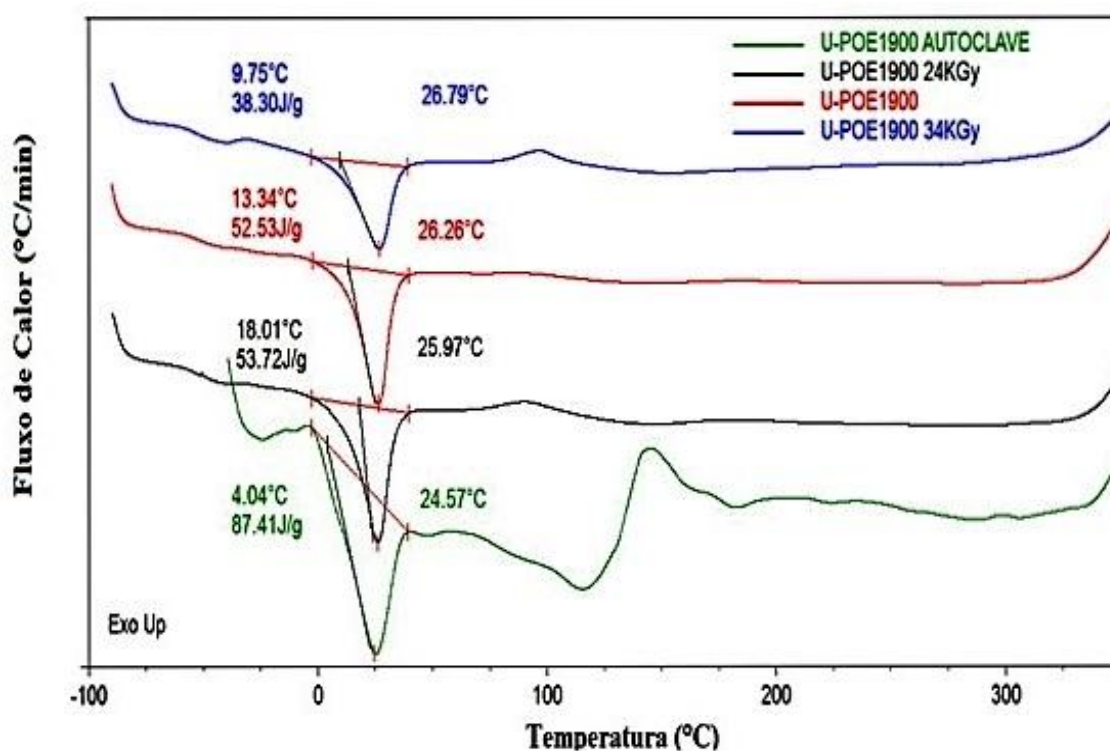
6.3 Calorimetria Exploratória diferencial (DSC)

A Técnica de DSC foi utilizada para avaliar se os processos de esterilização não ocasionaram nenhum efeito estrutural nos materiais híbridos ureasil-poliéter.

Esses materiais híbridos já foram analisados pela técnica de DSC por diferentes trabalhos na literatura (CHIAVACCI et al., 2004; MOLINA et al., 2010; LOPES et al., 2012; PAREDES et al., 2014). Normalmente no material ureasil-PEO1900 são observados três eventos, sendo o primeiro um desvio da linha de base entre -50 e 0°C , característico de uma variação de entropia vinculado a transição vítrea (T_g) do material. O segundo é um pico endotérmico em aproximadamente 25°C que caracteriza a fusão dos domínios cristalinos do material poli óxido etileno 1900. O terceiro é um pico exotérmico alargado em torno de 100°C que caracteriza a evaporação da água ou etanol utilizados nos processos de formação do material.

A Figura 18 mostra as análises térmicas do material ureasil-PEO1900 esterilizados por radiação gama e autoclave. As curvas de DSC das amostras ureasil-PEO1900 sem e após os processos de esterilização revelam a presença de um evento de fusão da fase polimérica cristalina que ocorre entre 24 e 27°C. Observa-se também na região entre 75 a 200°C eventos característicos de evaporação de solventes, como água e etanol, que permanecem no interior da amostra durante as etapas de síntese utilizadas para o desenvolvimento e formação do material.

Figura 18. DSC do material ureasil-PEO1900 esterilizados por radiação gama e por autoclave.



Na amostra submetida ao processo de esterilização por calor úmido esse evento é mais pronunciado, isso pode ser justificado devido ao material possuir alto grau de hidrofilicidade, permitindo com que o vapor de água utilizado no processo de esterilização fique retido no interior do material.

Outra informação relevante é o cálculo do grau de cristalinidade (GC). Nesse material (ureasil-PEO1900) ocorre o aparecimento de regiões ou domínios cristalinos rodeados por uma fase desordenada e amorfa caracterizando a formação de um polímero semi-cristalino (MOLINA et al., 2010). Assim é possível calcular o GC a partir da variação da entalpia de fusão (ΔH_f) e a variação de fusão do poli óxido etileno 1900

crystalino (ΔH_p), sendo este parâmetro encontrado na literatura no valor de $196,8 \text{ J g}^{-1}$ (SILVA et al., 2007). A relação é dada pela seguinte equação 3:

$$GC = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_p} \times 100 \quad \text{eq.(3)}$$

A tabela 3 apresenta os valores da temperatura de fusão (Tf) e os valores do grau de cristalinidade do material ureasil-PEO1900.

Tabela 3. Valores de Temperatura de fusão (Tf) e grau de cristalinidade (GC) do material ureasil-PEO1900.

Material	Tf (°C)	GC (%)
U-POE1900	26.26	26,6
U-POE1900 24 kGy	25.97	27,2
U-POE1900 34 kGy	26.79	19,5
U-POE1900 Calor úmido	24.57	44,4

Observa-se que os valores de temperatura de fusão apresentam-se muito próximos independentemente do tipo de processo de esterilização utilizado. Entretanto, observou-se uma variação no grau de cristalinidade para todos os métodos de esterilização com exceção do método de esterilização por radiação gama a 24 kGy que não ocasionou alteração significativa na fração cristalina para justificar uma mudança estrutural.

O material ureasil-PEO1900 esterilizado com radiação gama a 34 kGy apresentou uma diminuição no valor da fração cristalina em relação ao material sem ser esterilizado, esse fato revela que ocorreu um aumento das estruturas amorfas.

O material ureasil-PEO1900 esterilizado pelo método de calor úmido revelou um aumento no valor da fração cristalina (44%) em relação ao material sem esterilização (26,6%).

Esses resultados revelam que dependendo do método de esterilização utilizado pode-se variar o grau de cristalização e modificar o estado flexível, rígido ou vítreo do material.

O método de esterilização por calor úmido pode ocasionar uma alteração maior na estrutura do material devido a este material (ureasil-PEO) ser capaz de intumescer

após o contato com vapor de água ocasionando uma alteração no estado vítreo (conformação altamente enovelada) para um estado mais relaxado característico do intumescimento (maleável). Tanto o aumento quanto a diminuição do grau de cristalinidade provocada pelos métodos de calor úmido e de radiação gama a 34 kGy podem resultar em alterações das características finais do material, interferindo em fatores como: afinidade pela água, propriedades de incorporação de substâncias e liberação controlada de substâncias.

Assim, esse estudo revelou que apesar de todos os métodos de esterilização utilizados serem capazes de eliminar os microrganismos, apenas o uso da esterilização por radiação gama a 24 kGy mostrou-se adequado, uma vez que não ocasiona mudanças na estrutura do material.

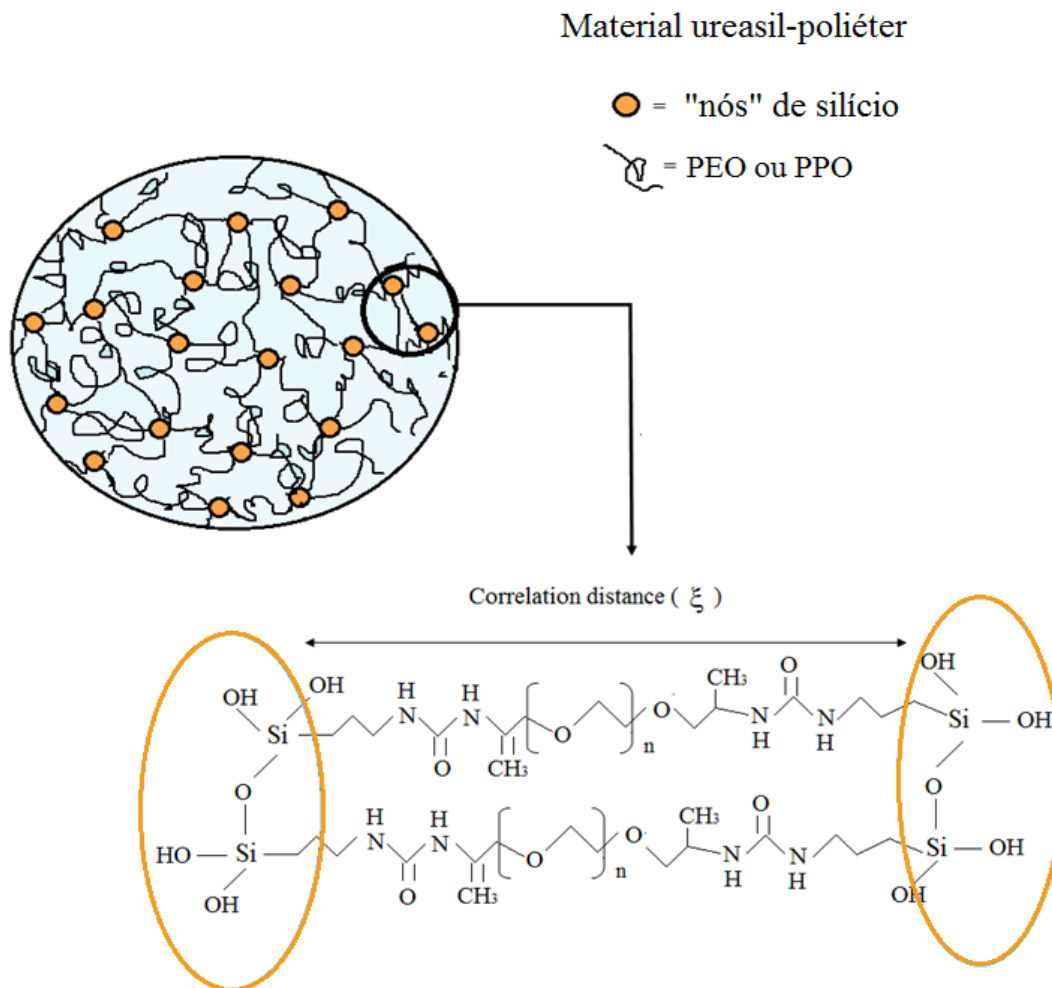
Segundo dados da literatura (MENDES, 2012; LOPES et al., 2012), os materiais ureasil-PPO400 e ureasil-PEO500 não apresentam cristalinidade evidenciando a sua completa natureza amorfa, por esse fato não foram realizados ou discutidos os resultados de DSC desses materiais.

6.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A homogeneidade nanoestrutural e o intumescimento desses materiais na presença de água, saliva e tampão de fosfato foram estudados anteriormente (SANTILLI et al., 2009; OSHIRO-JR et al., 2016). Verificou que a presença de sais e de outros componentes da saliva não alteraram as suas características. Sendo assim, neste trabalho foi utilizado como meio o tampão fosfato, meio que mimetiza o plasma, uma vez que essas membranas serão introduzidas cirurgicamente e este será o meio biológico mais presente.

Os materiais ureasil-poliéter são formados por uma cadeia orgânica polimérica e por uma fase inorgânica contendo ligações Si-O-Si (“nós” de silício). A Figura 19 mostra a estrutura do material e a organização espacial desses “nós” de silício. Desta forma, a técnica de SAXS é utilizada para sua caracterização, uma vez que existe diferença de densidade eletrônica entre os “nós” de silício e a cadeia orgânica.

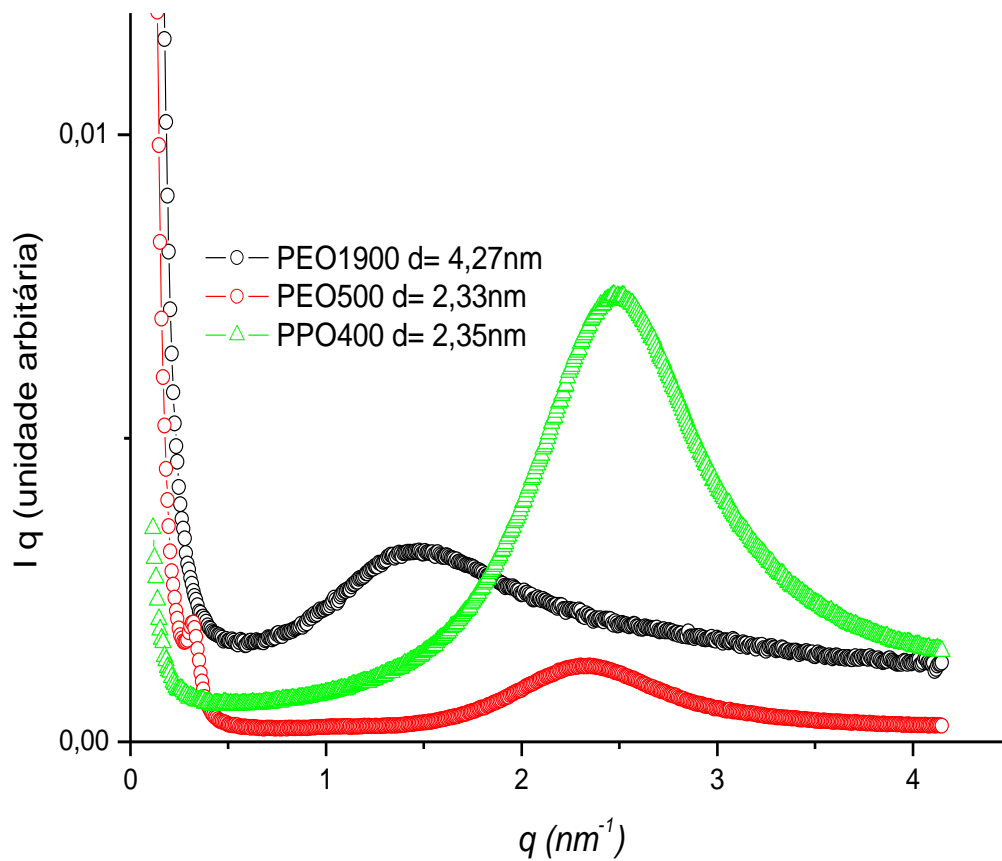
Figura 19. Distância de correlação entre os “nós” de sílica.



Assim, a distância de correlação entre dois “nós” de silício pode ser calculada, utilizando a equação 4: $d = 2\pi/q_{máx}$, onde d é a distância entre os grupos siloxanos e $q_{máx}$ é o valor máximo da posição do pico presente na curva de SAXS, sendo que, quanto menor o valor do $q_{máx}$ maior é a distância entre os domínios inorgânicos do material.

A figura 20 mostra as curvas de SAXS correspondentes às membranas ureasil-PPO400, ureasil-PEO500, ureasil-PEO1900 secas (sem contato com o meio).

Figura 20. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-PPO400, ureasil-PEO500, ureasil-PEO1900 secas.



As curvas de SAXS das membranas ureasil-POP400, ureasil-POE1900 e ureasil-PEO500 apresentam apenas um pico largo, que evidencia a homogeneidade da matriz e a existência de forte correlação espacial entre os espaços regulares chamados de “nós” de silício (Si-O-Si) da rede polimérica (DAHMOUCHE et al., 1999). Pode-se observar que a distância entre os “nós” de silício aumenta conforme maior a massa molecular do polímero utilizado.

A Figura 21 mostra as curvas de SAXS para as misturas desses materiais, os mesmos fatos observados para as amostras puras são observados para as misturas.

A mistura ureasil-POP400/POE1900 apresenta um segundo pico que foi destacado na Figura 20 com um círculo tracejado. Para uma melhor visualização essa parte foi ampliada na Figura 22.

Esse dado sugere que esta região é referente ao material ureasil-POE1900 e que devido a mistura com o material ureasil-POP400 ocorreu um aumento na distância de correlação entre os grupos siloxanos, uma vez que, sua distância no material puro é de 4,30 nm e na mistura é 9,81nm.

Figura 21. Curvas de SAXS para as membranas com misturas dos materiais ureasil-PPO400/ureasil-PEO500 e ureasil-POP400/ureasil-PEO1900 secas.

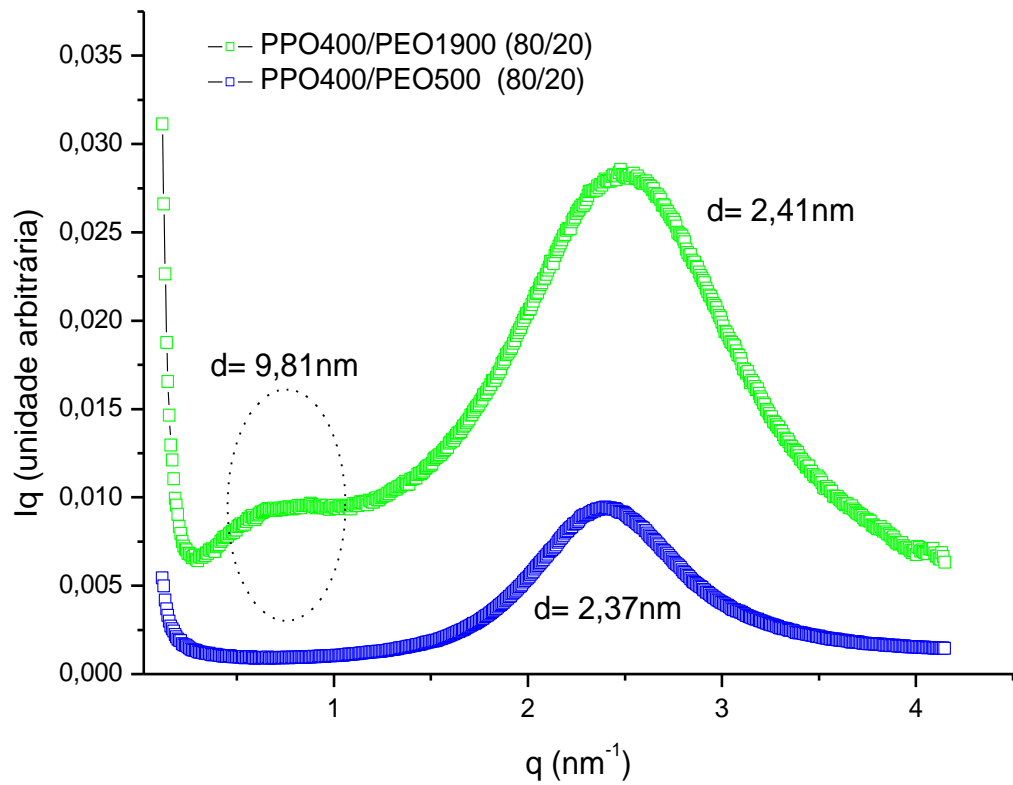
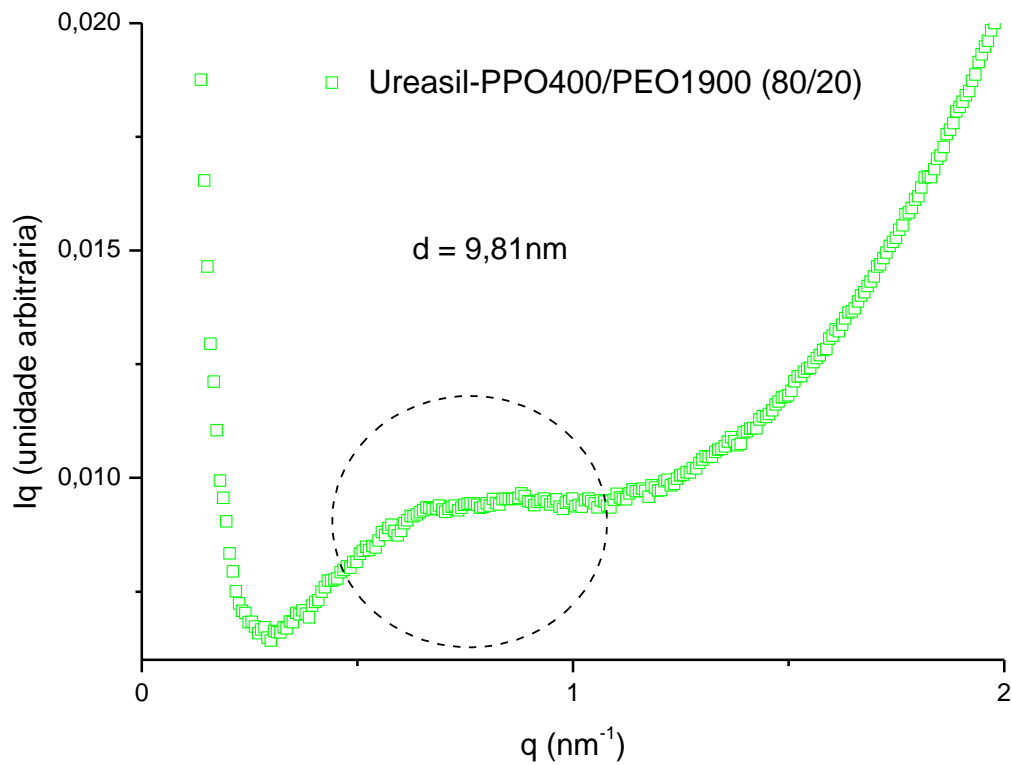


Figura 22. Curva de SAXS, material ureasil-POP400/POE1900.



Foi possível avaliar a evolução temporal das distâncias de correlação entre os grupos siloxanos quando em contato com o tampão. Nesses materiais o meio pode penetrar no material, ocasionando um relaxamento nas cadeias poliméricas, que resulta no afastamento dos grupos siloxanos, aumentando a distância entre “nós” de silício. As curvas nomeadas “secas” correspondem às amostras antes de entrar em contato como o tampão.

As figuras 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30 apresentam os resultados da evolução temporal das curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400, ureasil-PEO500, ureasil-POE1900, ureasil-PPO400/POE500 (80/20), ureasil-PPO400/POE500 (50/50), ureasil-PPO400/POE500 (20/80), ureasil-PPO400/POE1900 (80/20) e ureasil-PPO400/PEO1900 (50/50), respectivamente, em contato com o meio.

Figura 23. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400 durante o processo de passagem do tampão fosfato.

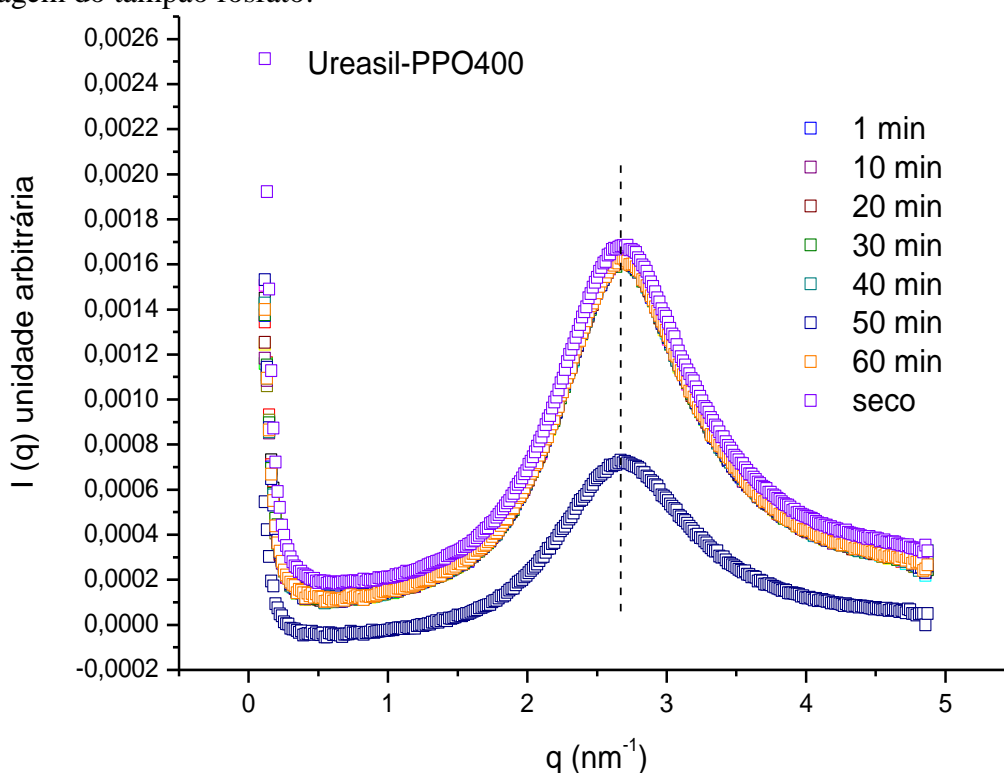


Figura 24. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POE500 durante o processo de passagem do tampão fosfato..

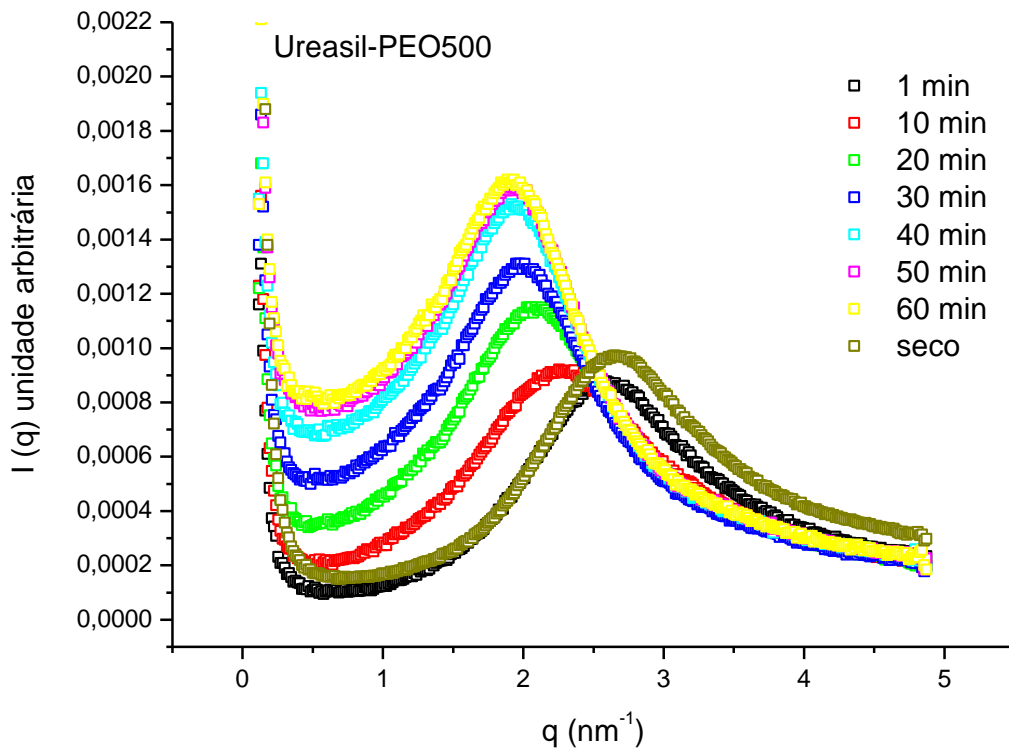


Figura 25. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POE1900 durante o processo de passagem do tampão fosfato.

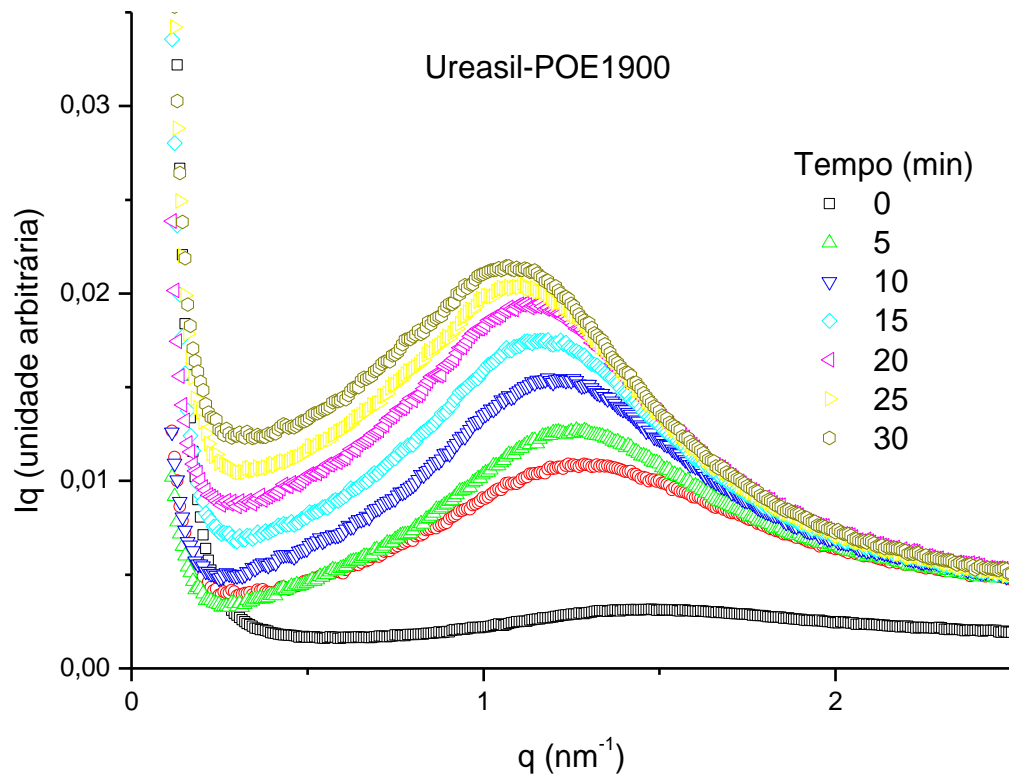


Figura 26. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400/POE500 (80/20) durante o processo de passagem do tampão fosfato.

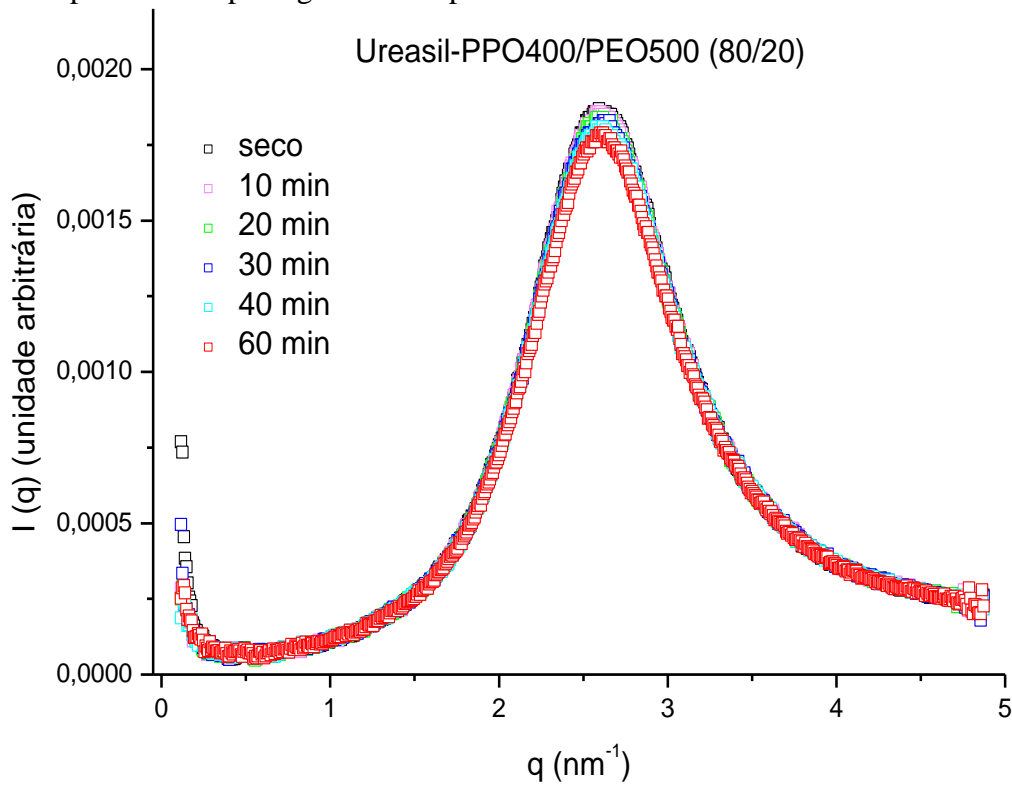


Figura 27. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400/POE500 (50/50) durante o processo de passagem do tampão fosfato.

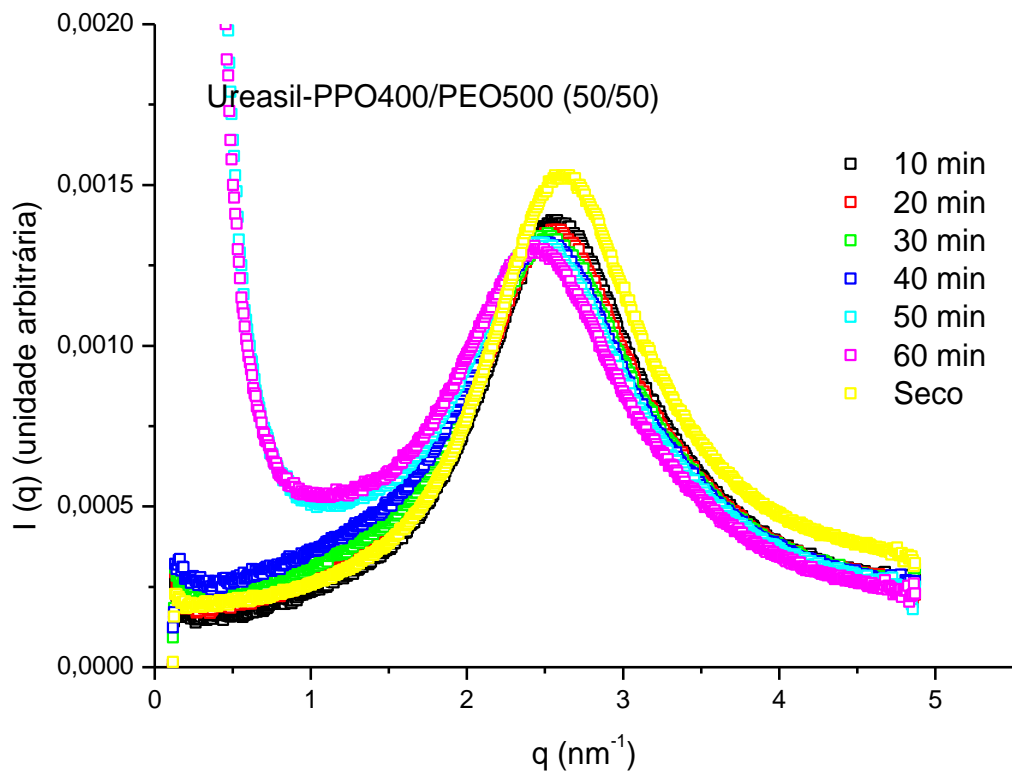


Figura 28. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400/POE500 (20/80) durante o processo de passagem do tampão fosfato.

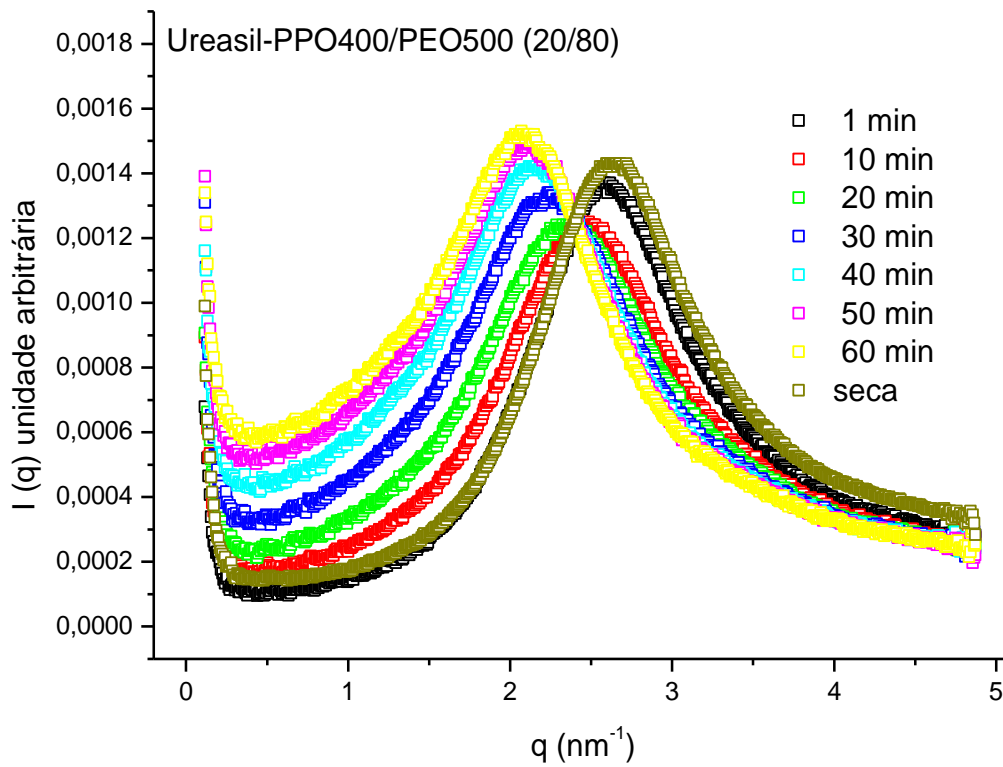


Figura 29. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400/PEO1900 (80/20) durante o processo de passagem do tampão fosfato.

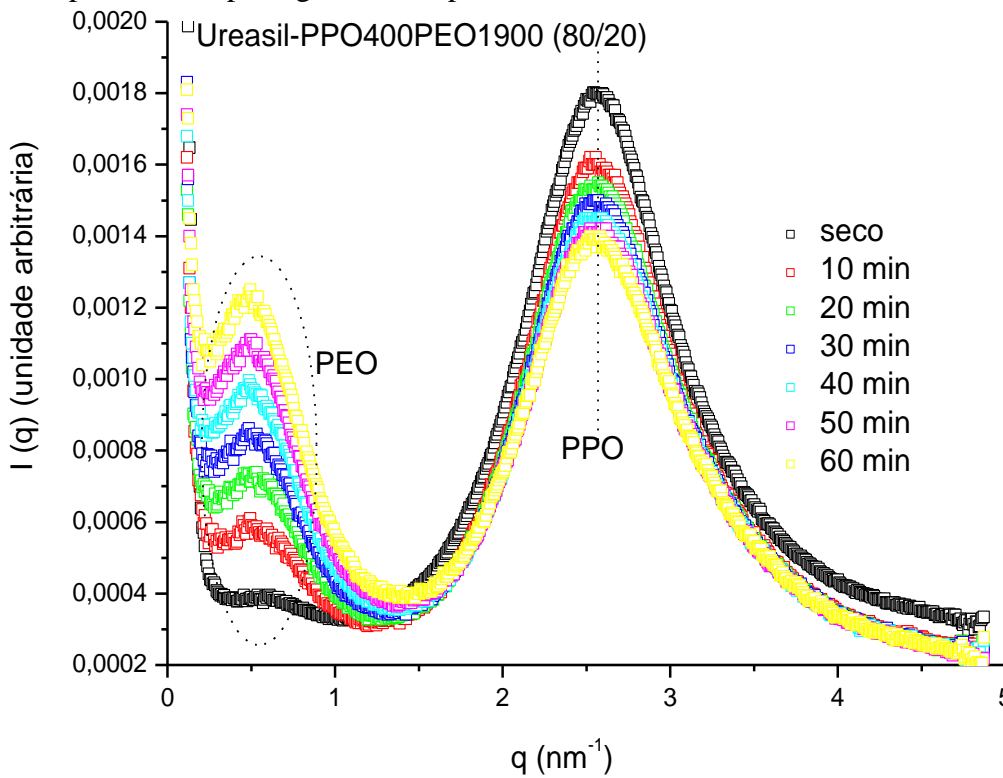
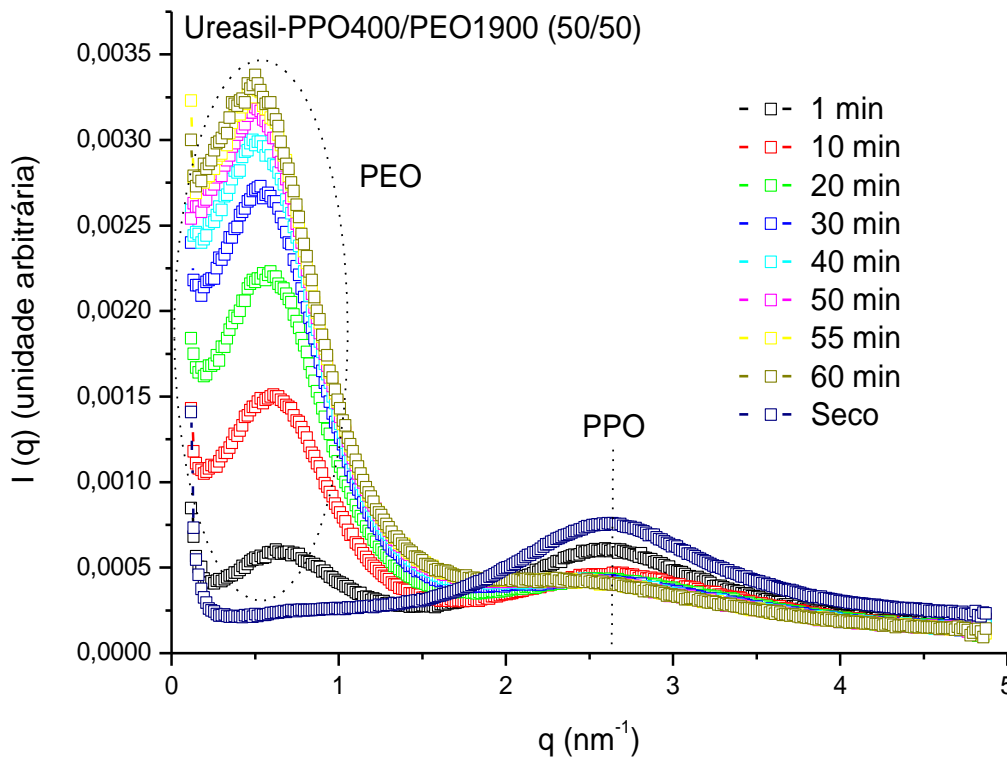


Figura 30. Curvas de SAXS para as membranas ureasil-POP400/POE1900 (50/50) durante o processo de passagem do tampão fosfato.



Podemos observar pela Figura 23 que as curvas para o material ureasil-POP400 não têm seu pico deslocado para baixos valores de $q_{máx}$ durante os 60 minutos que o material ficou em contato com o tampão fosfato. Caso ocorresse a difusão do meio para o material ocorreria um distanciamento entre os grupos siloxanos, resultando em curvas com picos em valores menores de $q_{máx}$. Esse resultado pode ser explicado devido ao caráter hidrofóbico do material ureasil-POP400 e sua baixa massa molar, que dificulta a entrada do tampão fosfato no material.

Observando as Figuras 24 e 25 podemos verificar que, para esses materiais as curvas de SAXS têm o pico deslocado para baixos valores de $q_{máx}$, conforme aumenta o tempo de contato material/meio, indicando que está ocorrendo um relaxamento das cadeias poliméricas e os grupos siloxanos estão se distanciando (processo de intumescimento). Este fato é ocasionado pelo caráter hidrofílico desses materiais e a massa molecular que também tem influência nos resultados, sendo que quanto maior o tamanho da cadeia polimérica, maior é a distância entre os “nós” de sílica.

Quando misturamos o material ureasil-PPO400 (80%) (hidrofóbico) com o material ureasil-POE500 (20%) (hidrofílico, baixa massa molecular) (Figura 26), observamos que as curvas de SAXS não têm o pico deslocado para baixos valores de

$q_{máx}$. A alta concentração do material hidrofóbico (ureasil-PPO400) predomina, e isto indica que nessa mistura não ocorre intumescimento.

Na figura 27 e 28 temos a mesma mistura de material (ureasil-POP400 e material ureasil-POE500), porém a concentração do material ureasil-POE500 é igual (Figura 27) ou superior (Figura 28) a do material ureasil-PPO400. Neste caso foi observado o deslocamento do pico das curvas de SAXS para menores valores de $q_{máx}$. Conforme esperado, a proporção com maior concentração apresentou um maior deslocamento dos “nós” de sílica.

Na Figura 29 e 30 temos a mistura do material ureasil-PPO400 com o material ureasil-PEO1900 (hidrofílico com alta massa molecular), neste caso temos dois picos, um relacionado ao material-POP400 e o segundo relacionado ao material-POE1900, sendo que apenas esse apresenta o deslocamento do pico para baixos valores de $q_{máx}$. A presença do segundo pico pode ser explicada pela diferença do tamanho das cadeias poliméricas, diferente da mistura do material ureasil-POE500 (Figura 25, 26 e 27) onde ocorreu apenas a presença de apenas um pico devido ao tamanho similar das cadeias.

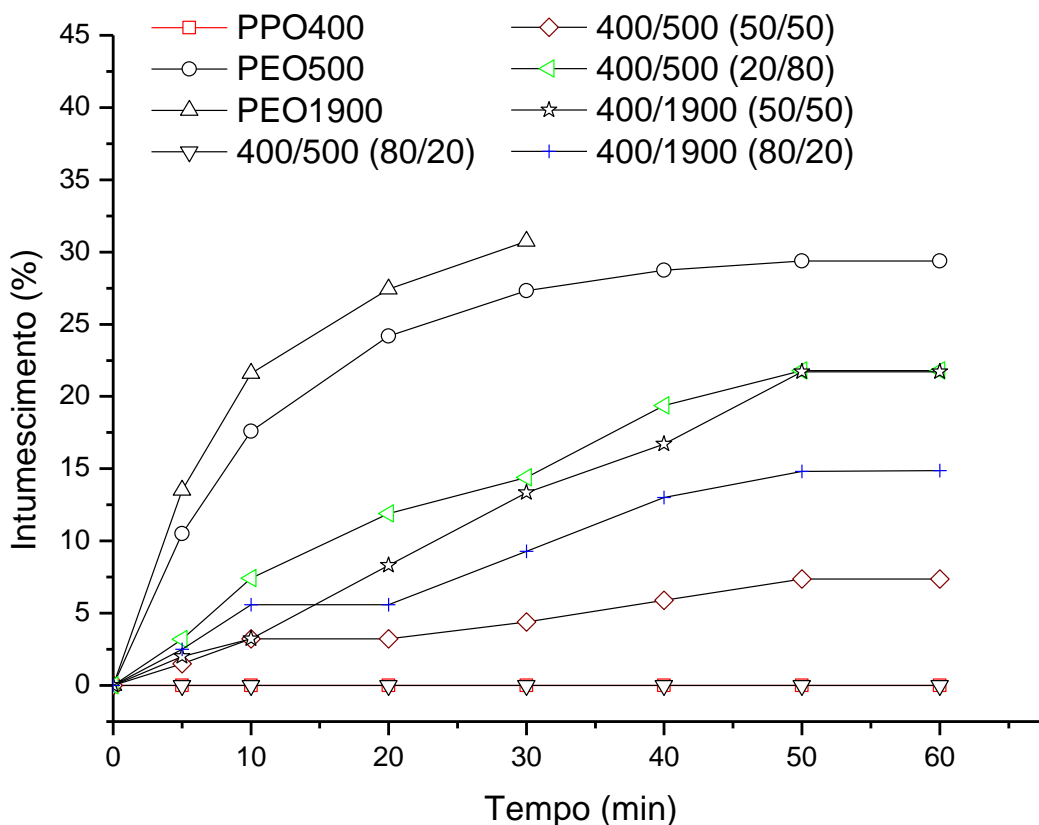
A Tabela 4 apresenta os valores para os parâmetros $q_{máx}$ e d calculados para todos os materiais acima.

Tabela 4. Posição dos picos no vetor de espalhamento $q_{máx}$ e distância de correlação d entre os grupamentos siloxanos e a região polimérica da matriz para os híbridos ureasil-POP 400, ureasil-PEO500, ureasil-POE 1900, ureasil-POP400(80%)/ureasil-PEO500 (20%), ureasil-POP400(50%)/ureasil-POE500(50%), ureasil-POP400(20%)/ureasil-PEO500 (80%), ureasil-POP400(80%)/ureasil-POE1900(20%) e ureasil-POP400(50%)/ureasil-POE1900(50%).

Tempo	POP 400		POE 500		POE 1900		POP 400 (80%) POE 500 (20%)		POP 400 (50%) POE 500 (50%)		POP 400 (20%) POE 500 (80%)		POP 400 (80%) POE 1900 (20%)		POP 400 (50%) POE 1900 (50%)	
	$q_{máx}$	d	$q_{máx}$	d	$q_{máx}$	d	$q_{máx}$	d	$q_{máx}$	d	$q_{máx}$	d	$q_{máx}$	d	$q_{máx}$	d
0'	2,68	2,34	2,69	2,33	1,53	4,10	2,60	2,41	2,62	2,39	2,64	2,37	0,54	11,62	0,60	10,46
10'	2,68	2,34	2,29	2,74	1,20	5,23	2,60	2,41	2,54	2,47	2,46	2,56	0,51	12,31	0,58	10,82
20'	2,68	2,34	2,08	3,01	1,12	5,65	2,60	2,41	2,55	2,47	2,33	2,69	0,51	12,31	0,55	11,41
30'	2,68	2,34	1,96	3,20	1,06	5,92	2,60	2,41	2,51	2,50	2,26	2,77	0,49	12,81	0,50	12,07
40'	2,68	2,34	1,92	3,27			2,60	2,41	2,47	2,54	2,13	2,94	0,47	13,36	0,47	12,56
50'	2,68	2,34	1,90	3,30			2,60	2,41	2,43	2,58	2,07	3,03	0,46	13,65	0,47	13,36
60'	2,68	2,34	1,90	3,30			2,60	2,41	2,43	2,58	2,07	3,03	0,46	13,65	0,47	13,36

A partir do valor da distância de correlação (d) calculada, pode-se analisar a porcentagem de aumento da distância entre os grupos siloxanos após cada tempo de contato com o meio, através da relação: $\Delta d = dt - ds/dt$, onde dt é o valor da distância de correlação em um tempo t de contato com o meio de liberação e ds é o valor da distância de correlação calculado para a amostra seca (antes do contato com o meio de liberação). A figura 31 apresenta esses valores.

Figura 31. Intumescimento nanoscópico em função do tempo de contato com tampão fosfato.



É possível observar que as membranas com o material ureasil-POE1900 e ureasil-PEO500 apresentam um alto grau de expansão em função do tempo, 31% e 30% respectivamente; entretanto, vale ressaltar que o material ureasil-POE1900 ficou 30 minutos enquanto o material ureasil-PEO500 60 minutos, indicando que o material ureasil-POE1900 tem maior capacidade de intumescimento. Este fato conforme mencionado acima está relacionado com o caráter hidrofílico desses materiais, que facilita a entrada e difusão do meio para membrana resultando em um relaxamento das cadeias poliméricas, enquanto que o material ureasil-POP400, por ser altamente hidrofóbico, não apresentou expansão durante o tempo utilizado no experimento (SANTILLI et al., 2009).

A mistura do material ureasil-PPO400/PEO1900 (80/20) apresentou um intumescimento de 14,87% após 60 minutos de experimento. Esse dado será utilizado como referência, para selecionar membranas para estudos posteriores *in vivo*, uma vez que, em estudo anterior (ver justificativa) foi demonstrado que a membrana preparada com esta proporção possui maior biocompatibilidade. No caso da membrana ureasil-PEO1900 os estudos anteriores revelaram que devido ao alto grau de intumescimento ela é capaz de lesionar o tecido provocando um alto grau de inflamação.

A mistura do material ureasil-PPO400/PEO500 (80/20) apresentou o mesmo comportamento da membrana ureasil-PPO400. Assim, provavelmente o perfil de liberação e de biocompatibilidade “*in vivo*” desses materiais serão parecidos com os do material ureasil-PPO400 puro, devido a esse fato, o material foi descartado para esses estudos posteriores.

A mistura ureasil-PPO400/PEO500 (20/80) apresentou um intumescimento de 21,70% em 60 minutos. A mistura ureasil-PPO400/PEO1900 (50/50) revelou intumescimento semelhante de 21,70%. Sendo assim, por apresentarem um grau de expansão superior ao material de referência, os materiais ureasil-PPO400/PEO500 (20/80) e ureasil-PPO400/PEO1900(50/50) foram descartados para os experimentos posteriores.

A mistura de ureasil-PPO400/PEO500 (50/50) revelou um intumescimento de 7,36% após 60 minutos e será utilizada assim como a mistura de referência para os demais experimentos.

O uso da técnica de SAXS permitiu analisar a evolução da distância de correlação dos materiais em contato com o meio, sendo importante para a seleção dos materiais, que serão utilizados para a incorporação do peptídeo para os teste de liberação *in vitro* e a avaliação *in vivo*.

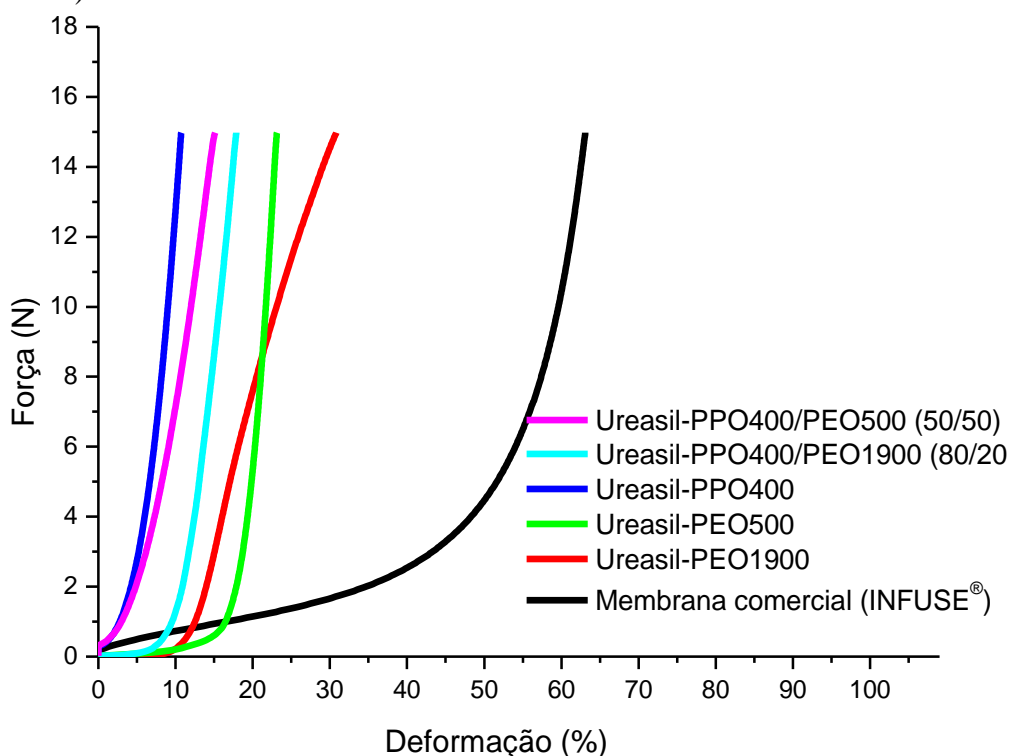
6.5 Análise mecânica dinâmica (DMA)

Uma das características para uma membrana de barreira física ser considerada ideal é possuir resistência mecânica (para que seja capaz de resistir a pressões exercidas pelo tecido subjacente e às forças externas como a mastigação, além de não esfiapar-se ou fragmentar-se quando for cortada para aplicação no local da lesão) e flexibilidade (para ser clinicamente manuseável).

Com o intuito de verificar essas características, a análise da resistência mecânica das membranas ureasil-poliéter foi realizada, a partir de sua deformação quando

submetida a uma força em sua superfície. A figura 32 apresenta as curvas de deformação em função do aumento da força para as membranas ureasil-PPO400, ureasil-PEO500, ureasil-PEO1900, ureasil-PPO400/PEO1900 (80/20), ureasil-PPO400/PEO500 (50/50) e para a membrana de colágeno comercial (INFUSE[®]).

Figura 32. Curvas de deformação em função do aumento da força para as membranas ureasil-PPO400, ureasil-PEO500, ureasil-PEO1900, ureasil-PPO400/PEO1900 (80/20), ureasil-PPO400/PEO500 (50/50) e para a membrana de colágeno comercial (INFUSE[®]).



Observa-se na Figura 32 que mesmo com a aplicação de uma elevada força (15N) sobre as membranas, não ocorreu ruptura ou danos, mesmo para as membranas que sofreram grandes deformações como a membrana comercial (63%) e a membrana de ureasil-PEO1900 pura (30,4%).

A membrana ureasil-PPO400 foi a que obteve a menor deformação (10,7%), a membrana ureasil-PEO500 deformou 23,1%. Para as membranas selecionadas a partir dos experimentos anteriores para sequência do trabalho, foi observado que a mistura ureasil-PPO400/PEO500 (50/50) sofreu uma deformação de 15%, enquanto que para a mistura ureasil-PPO400/PEO1900 (80/20) a deformação foi de 17,8%.

Esses resultados revelam que as misturas sofrem uma diminuição na deformação em relação às membranas puras (ureasil-PEO1900 e ureasil-PEO500), este fato é ocasionado pela suas misturas com o material ureasil-PPO400 que é mais rígido,

portanto é mais resistente à deformação, enquanto que os materiais ureasil-PEO1900 e ureasil-PEO500 são mais flexíveis e menos resistentes a deformação. Este comportamento pode ser explicado pela cadeia polimérica dos materiais. Os materiais com baixa massa molecular como o ureasil-PPO400 possuem em sua estrutura a presença de um número maior de grupamentos siloxano, portanto, um maior número de “nós de silício” que resulta em uma maior rigidez da membrana, dificultando sua deformação. Dessa forma temos um material menos flexível. Por outro lado, a alta massa molecular do material ureasil-PEO1900 confere à membrana menos grupamentos siloxanos e uma capacidade maior de relaxamento, que resulta em maior flexibilidade e maior deformação, resultando em um material mais flexível.

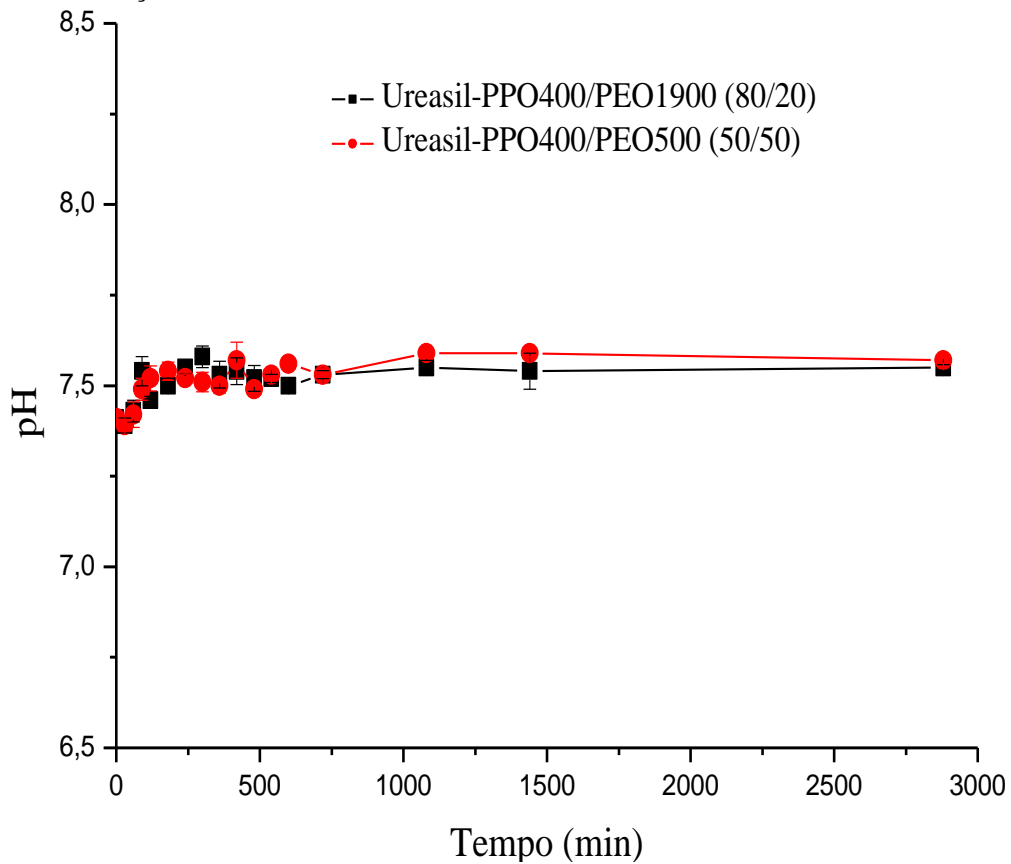
Embora as misturas tenham proporcionado ao material ureasil-PPO400 uma maior flexibilidade, quando comparamos com a membrana comercial observamos que estas possuem uma deformação superior. Apesar de uma menor deformação vale destacar que as membranas apresentaram boa resistência mecânica, uma vez que durante todo o experimento não houve ruptura.

6.6 Determinação do pH

Após o implante da membrana o pH local não pode sofrer uma alteração extrema, uma vez que valores extremos de pH podem ocasionar efeitos citotóxicos. A faixa de pH considerada adequada é $6,0 \leq \text{pH} \leq 8,5$ (DRIESSENS et al., 1997).

Assim as medidas de pH em função do tempo de imersão das membranas ureasil-poliéter na solução de SBF a 37°C foram realizadas. A solução SBF inicialmente possuía pH 7,4 e esse valor foi considerado como o momento 0. As variações dos perfis de pH da solução ocasionados pelas membranas estão demonstradas na figura 33.

Figura 33. Medidas de pH em função do tempo de imersão das membranas ureasil-poliéter na solução de SBF.



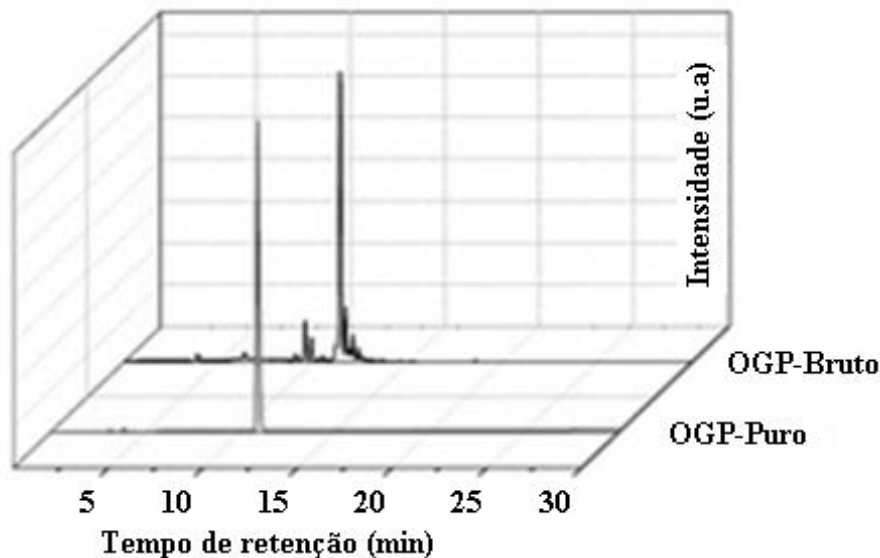
Observa-se pela figura 33 que as membranas ureasil-PPO400/PEO500 (50/50) e ureasil-PPO400/PEO1900 (80/20) apresentaram resultados semelhantes durante todo o período analisado (2 dias), seus valores permaneceram entre 7,38 e 7,64.

Sendo assim, conclui que, as membranas não alteram o pH da solução de SBF a valores diferentes dos considerados aceitáveis para uso clínico.

6.7 Síntese do Peptídeo

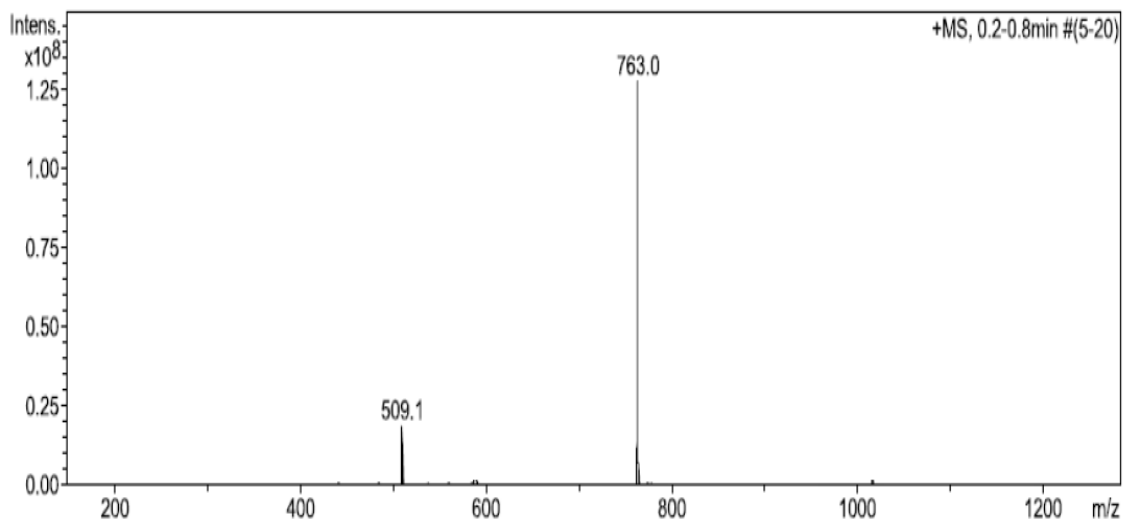
O composto bruto foi purificado por CLAE em modo semi-preparativo, obtendo-se um material com pureza considerável ($\geq 94\%$). O perfil cromatográfico do peptídeo OGP bruto e puro (fração com maior grau de pureza) pode ser observado na figura 34.

Figura 34. Perfil cromatográfico do peptídeo OGP bruto e puro.



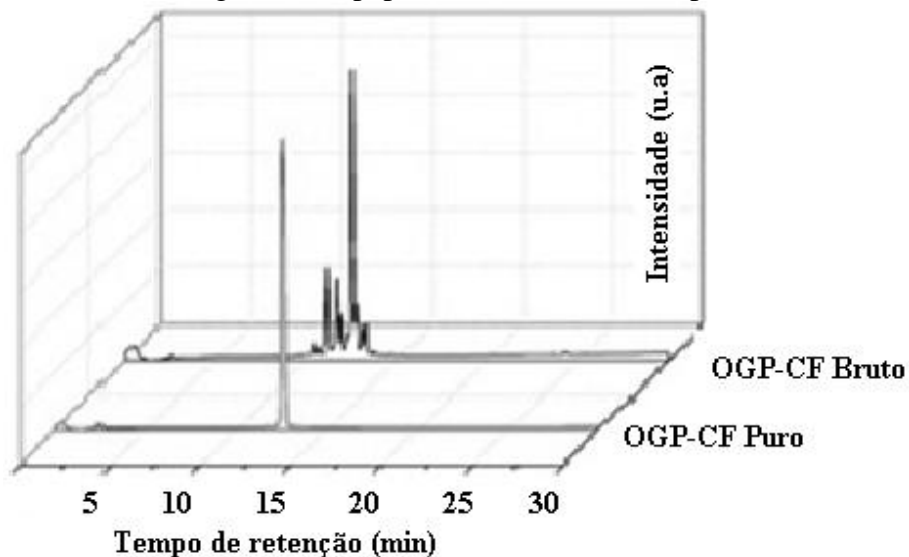
O peptídeo foi analisado por espectrometria de massas. O resultado é mostrado na figura 35, onde a identidade molecular do peptídeo foi confirmada por determinação da correspondente massa molecular, $1.523,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, determinada pela técnica ES-MS positivo [ES $m/z = 763 (M + 2H) + 2 509,1 (M+3H)+3$].

Figura 35. Espectro de massas do peptídeo OGP puro.



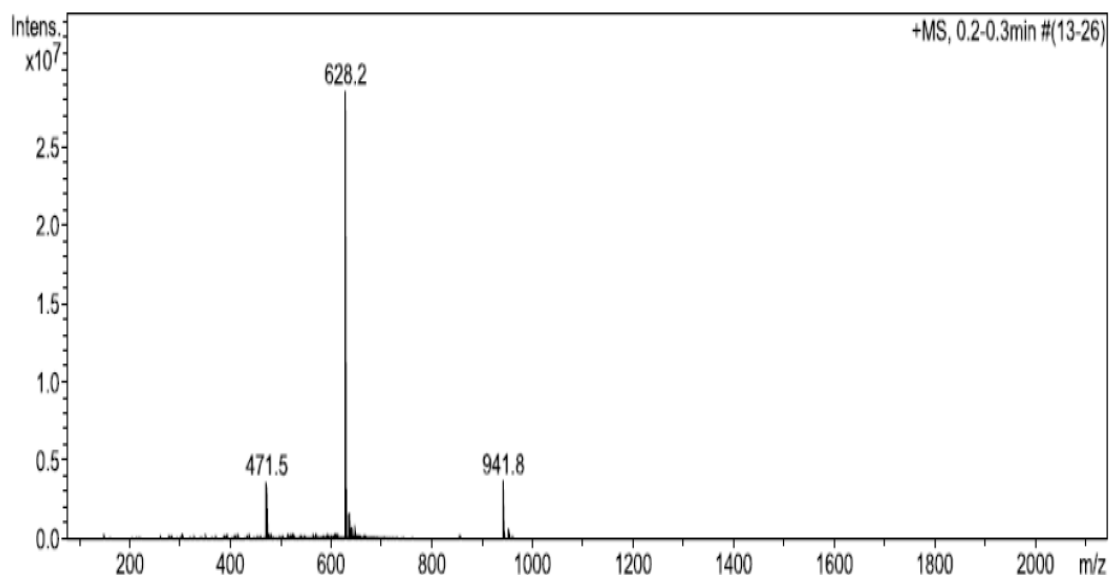
O perfil cromatográfico do peptídeo OGP-CF bruto e puro (fração com maior grau de pureza) pode ser observado na figura 36.

Figura 36. Perfil cromatográfico do peptídeo OGP-CF bruto e puro.



O peptídeo OGP-CF foi analisado por espectrometria de massas. O resultado é mostrado na figura 37, onde a identidade molecular do peptídeo foi confirmada por determinação da correspondente massa molecular, $1.882,50 \text{ g.mol}^{-1}$, determinada pela técnica ES-MS positivo [ES $m/z = 942,8 (M+2H)^{+2}$, $628,2 (M+3H)^{+3}$ e $471,5 (M+4H)^{+4}$].

Figura 37. Espectro de massas do peptídeo OGP-CF puro.



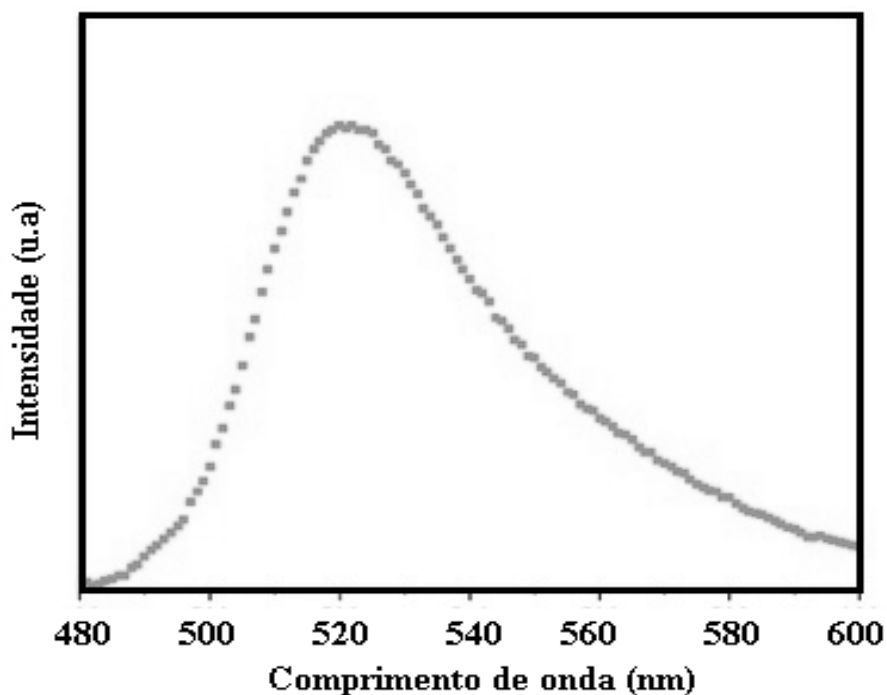
Podemos observar que os perfis cromatográficos dos OGP e OGP-CF puros possuem um único pico em relação aos cromatogramas referentes ao extrato bruto, este

fato confirma que os procedimentos utilizados resultaram na obtenção adequada do material.

6.8 Curva Analítica (Linearidade)

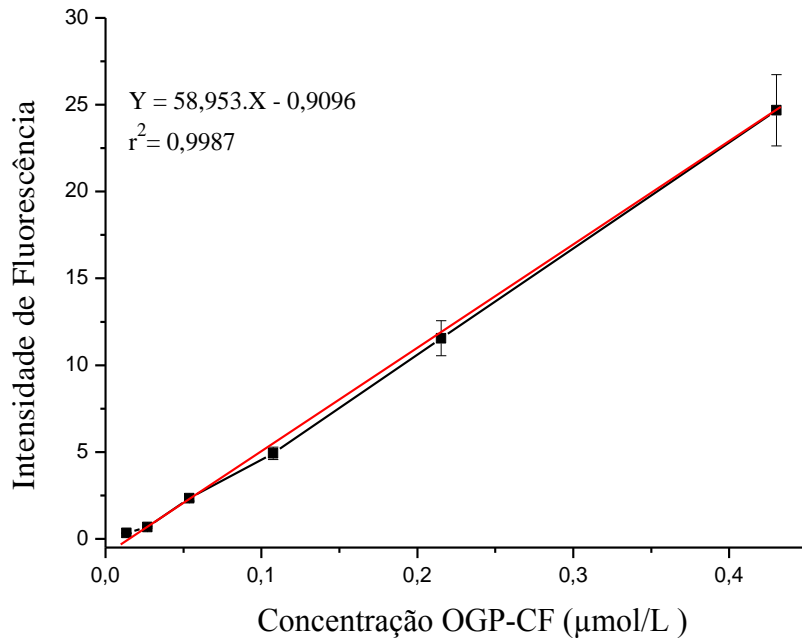
Um espectro de fluorescência do peptídeo OGP-CF foi realizado para verificar o comprimento de onda máximo de emissão (Figura 38). O monocromador de excitação foi fixado em 492 nm (λ máximo de absorção, de acordo com o fabricante) e de emissão em 520 nm. Assim, foi possível obter a linearidade do método de quantificação do OGP-CF, sendo determinada pela construção da curva analítica.

Figura 38. Espectro de fluorescência do OGP-CF.



A regressão linear forneceu a equação de reta: $y = 58,953.X - 0,9096$ e o coeficiente de correlação $r^2 = 0,9987$. A Figura 39 apresenta a curva analítica.

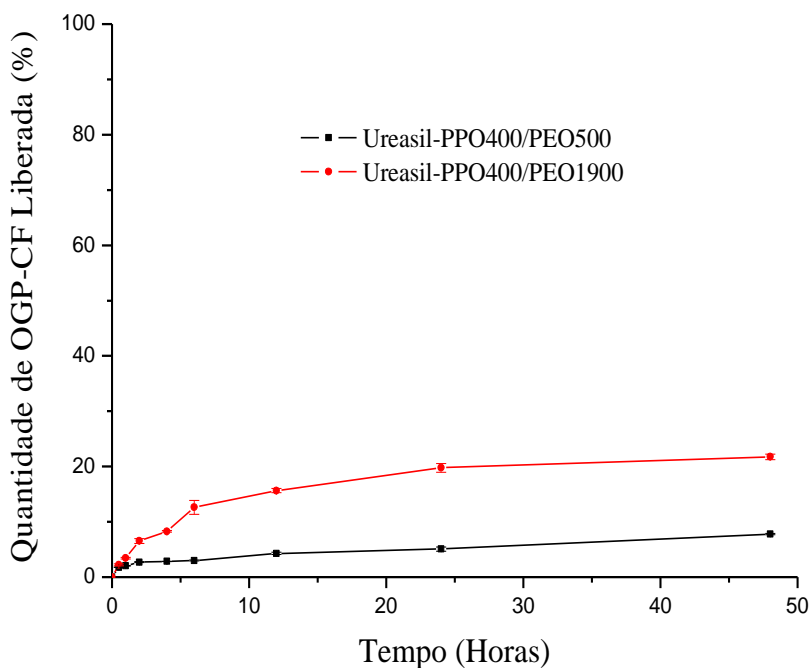
Figura 39. Curva analítica do OGP-CF em água.



6.9 Teste de liberação do OGP-CF a partir das membranas

Os perfis de liberação do OGP-CF a partir das membranas formadas pelas misturas ureasil-POP400/POE1900 (80/20) e ureasil-POP400/PEO500 (50/50) estão apresentados na Figura 40. Observa-se que a membrana ureasil-PPO400/1900 liberou uma maior quantidade de OGP-CF. Este comportamento está de acordo com o observado para o intumescimento desses materiais (discutido no item 5.5 (*Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)*)), ou seja, quanto maior o intumescimento maior a capacidade do meio se difundir e conseqüentemente maior a liberação.

Figura 40. Perfil de liberação OGP-CF incorporada nas membranas ureasil-POP400/POE500 e ureasil-PPO400/PEO1900.



A Tabela 5 relaciona os valores da porcentagem de OGP-CF liberado durante as 48 h a partir das membranas Ureasil-POP400/POE1900 e Ureasil-POP400/PEO500. De acordo com os resultados, a liberação do peptídeo não atinge 100% de liberação em nenhuma membrana testada.

Tabela 5. Porcentagem de OGP-CF liberada a partir das membranas Ureasil-POP400/POE500 e Ureasil-POP400/PEO1900.

Tempo de liberação	% Liberada	
	(U-PPO400/PEO500)	(U-PPO400/PEO1900)
0	0,00	0,00
30min	1,77 (\pm 0,02)	2,23 (\pm 0,18)
1h	2,04 (\pm 0,05)	3,42 (\pm 0,16)
2h	2,70 (\pm 0,08)	6,52 (\pm 0,45)
4h	2,84 (\pm 0,02)	8,27 (\pm 0,13)
6h	3,00 (\pm 0,07)	12,61 (\pm 1,23)
12h	4,28 (\pm 0,20)	15,63 (\pm 0,37)
24h	5,07 (\pm 0,38)	19,76 (\pm 0,78)
48h	7,79 (\pm 0,10)	21,76 (\pm 0,50)

Os resultados de liberação podem ser explicados por dois fatores. O primeiro está relacionado com as características hidrofílicas/hidrofóbicas dos polímeros híbridos e o segundo com o tamanho da cadeia molecular.

As membranas utilizadas neste estudo são baseadas em misturas de um polímero mais hidrofóbico de baixa massa molecular (PPO400) com polímeros mais hidrofílicos, entretanto o material PEO 500 possui menor massa molecular em relação ao material PEO 1900, e este fato resulta em um material com menor capacidade de intumescimento (7,36%) em relação a membrana desenvolvida com o material PEO1900 (14,87%). Além do intumescimento menor, a baixa massa molecular dessa mistura (PPO400 e PEO500) faz com que a membrana possua muitos grupamentos siloxano, conferindo à membrana uma maior rigidez (ver resultados de DMA, item 5.6) e essa rigidez interfere no processo de difusão do princípio bioativo, o que resulta em uma menor taxa de liberação (CARBINATO et al., 2014). Sendo assim, essas membranas precisam de um tempo maior para que o início do processo de liberação aconteça.

O ajuste dos dados de liberação do peptídeo por modelos matemáticos é importante para a elucidação dos mecanismos de transporte envolvidos no controle do processo de liberação do peptídeo a partir do sistema (Em todos os casos foi utilizado o programa SigmaPlot 10.0 para análise dos modelos). A Tabela 6 mostra os modelos matemáticos que foram aplicadas ao perfil de liberação do OGP a partir das misturas ureasil-PPO400/PEO1900 e ureasil-PPO400/PEO500. O critério utilizado para escolher o melhor modelo matemático foi o maior valor do coeficiente estatístico de determinação (r^2) (CARVALHO et al., 2013).

Tabela 6. Valores do coeficiente de determinação (r^2), obtido através do ajuste do perfil de liberação do OGP com diferentes modelos matemáticos.

Modelo de liberação	PPO400/PEO1900	PPO400/PEO500
	80:20 r^2	50:50 r^2
Peppas	0.9567	0.9701
Zero-Order	0.7362	0.8560
Baker	0.9303	0.9127
Higuchi	0.9170	0.9095
First-Order	0.4677	0.3819

De acordo com a tabela 7, observa-se que o modelo que melhor se ajustou as curvas de liberação foi o proposto por Peppas. Para o modelo de Peppas os valores do

expoente "n" é o que determina o mecanismo de transporte do fármaco da matriz para o meio. Quando os valores de "n" são menores do que 0,45, a liberação ocorre por difusão fickiana. Quando os valores de "n" estão entre 0,45 e 0,89, a liberação é regulada pelo transporte anômalo, e finalmente, quando os valores de "n" são maiores que 0,89 a liberação ocorre por transporte do tipo caso II (CARBINATTO et al., 2014).

A tabela 7 mostra os valores "n". Observa-se que o valor do expoente "n" para o material ureasil-PPO400/PEO1900 ficou entre 0,45 e 0,89, assim, o mecanismo de transporte é o transporte anômalo, onde o intumescimento e difusão Fickiana são os mecanismos de transporte para liberar o peptídeo a partir da matriz para o meio. Enquanto que para o material ureasil-PPO400/PEO500 o valor do expoente "n" ficou abaixo de 0,45, assim, o principal mecanismo de transporte do peptídeo da matriz para o meio é a difusão Fickiana.

Tabela 7. Valores do expoente "n" para as membranas testadas, considerando o modelo matemático de Peppas.

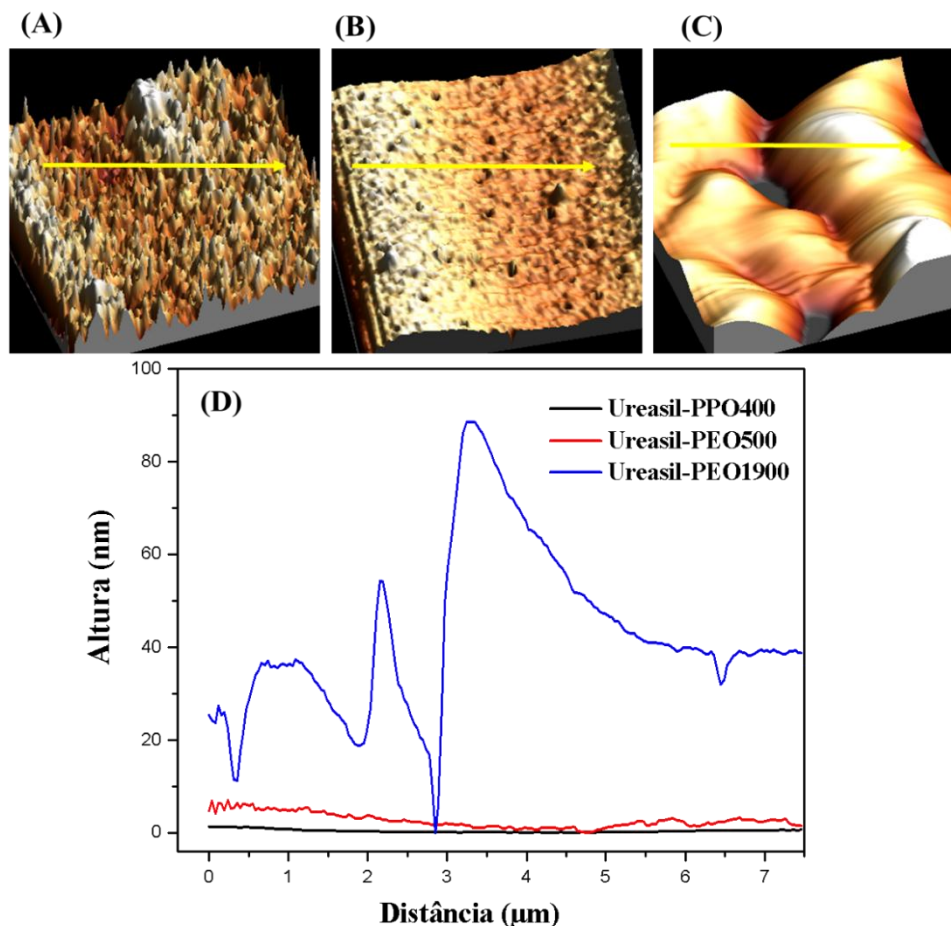
	PPO400/PEO1900	PPO400/PEO500
	80:20	50:50
Exponent "n"	0.463	0.317

6.9 Microscopia de força atômica (MFA)

Os experimentos de MFA foram realizados para uma melhor compreensão da superfície desses materiais uma vez que fatores como poros e rugosidade são fundamentais para que ocorre a homeostasia do tecido ósseo.

A figura 41 mostra os resultados das topografias em modo contato para os materiais ureasil-PPO400 (A), ureasil-PEO500 (B), ureasil-PEO1900 (C) e contorno topográfico ao longo da seta na imagem A, B e C (D).

Figura 41. Imagem topográfica (3D) em modo de contato para Ureasil-PPO400 (A), Ureasil-PEO500 (B) ureasil-PEO1900 (C) e contorno topográfico ao longo da seta na imagem A, B e C (D).



Observa-se na Figura 41 que os materiais ureasil-PPO400 (A) e ureasil-PEO500 (B) tem uma superfície plana com altura máxima na área considerada de 1,34 nm e 7 nm, respectivamente. Contudo, no material ureasil-PEO500 podemos observar a presença de poros distribuidos ao longo de toda a superfície analisada, com uma média de diâmetro de 535 nm. O material ureasil-PEO1900 (C) apresentou uma superfície rugosa com variações na altura máxima na área considerada de 0,2 nm e 90 nm e poros com uma média de diâmetro de 2,2 μm .

Diferentes trabalhos do nosso grupo demonstram que o mecanismo de liberação lenta ou rápida de fármacos nesses materiais está associado ao intumescimento ou não desses materiais que ocorre pelo seu caráter hidrofílico/hidrofóbico e variava conforme o tamanho da cadeia molecular (MOLINA et al., 2010; OSHIRO-Jr et al., 2014; PAREDES et al., 2014; SANTILLI et al., 2009). Os poros revelados nesse trabalho é um novo mecanismo que contribui para a liberação do fármaco, uma vez que facilitam a

penetração do meio dentro do material e conseqüentemente, ocorre uma maior dissolução do fármaco e maior facilidade para sair da matriz.

Outra vantagem dos materiais porosos é sua capacidade de armazenar grandes quantidade de fármacos em relação a outros nanosistemas como, lipossomas, nanoemulsões e micelas (HORCAJADA et al., 2010). Esta capacidade maior contribui com o desenvolvimento de sistemas que diminuem a frequência de administração de fármacos, o que contribui para melhor adesão do paciente ao tratamento (BURGESS, 2006).

Outro fator interessante para nosso trabalho é que materiais porosos promovem melhor crescimento ósseo através do material. Apesar da porosidade diminuir a resistência do material isolada, no tecido temos uma melhor ligação material/tecido, e resulta que *in vivo* a porosidade aumenta a resistência do material (HUBERT et al., 1973; KAWACHI et al., 2000).

A figura 42, 43, 44 e 45 mostra os resultados da topografia em diferentes temperaturas para os materiais ureasil-PPO400/PEO500 sem OGP, ureasil-PPO400/PEO500 com OGP, ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP, ureasil-PPO400/PEO1900 com OGP, respectivamente.

Figura 42. Imagem topográfica em modo de contato para o material ureasil-PPO400/PEO500 na proporção 50/50 sem OGP em diferentes temperaturas.

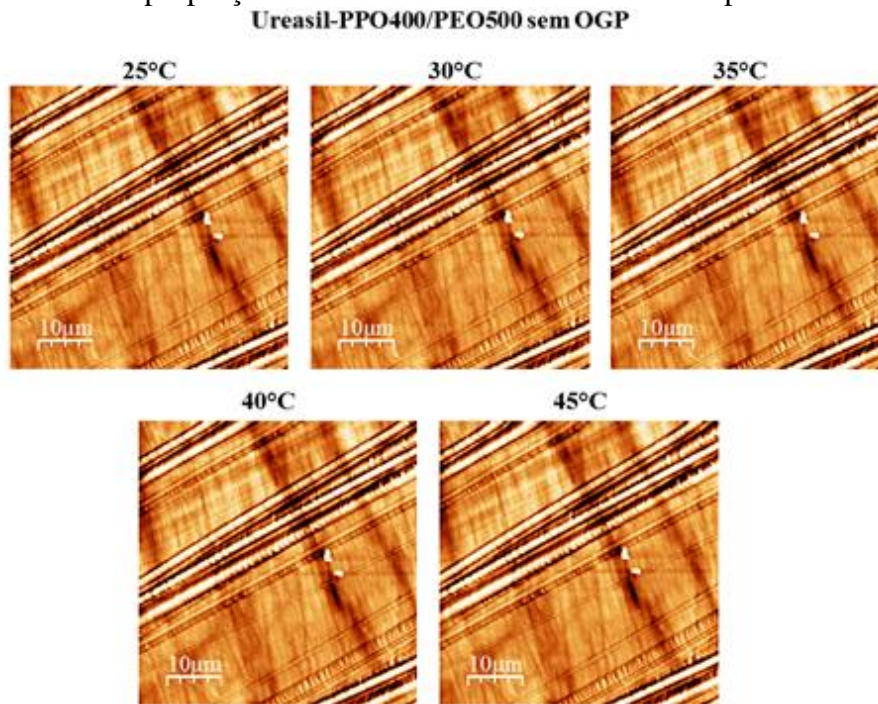


Figura 43. Imagem topográfica em modo de contato para o material ureasil-PPO400/PEO500 na proporção 50/50 com OGP em diferentes temperaturas.

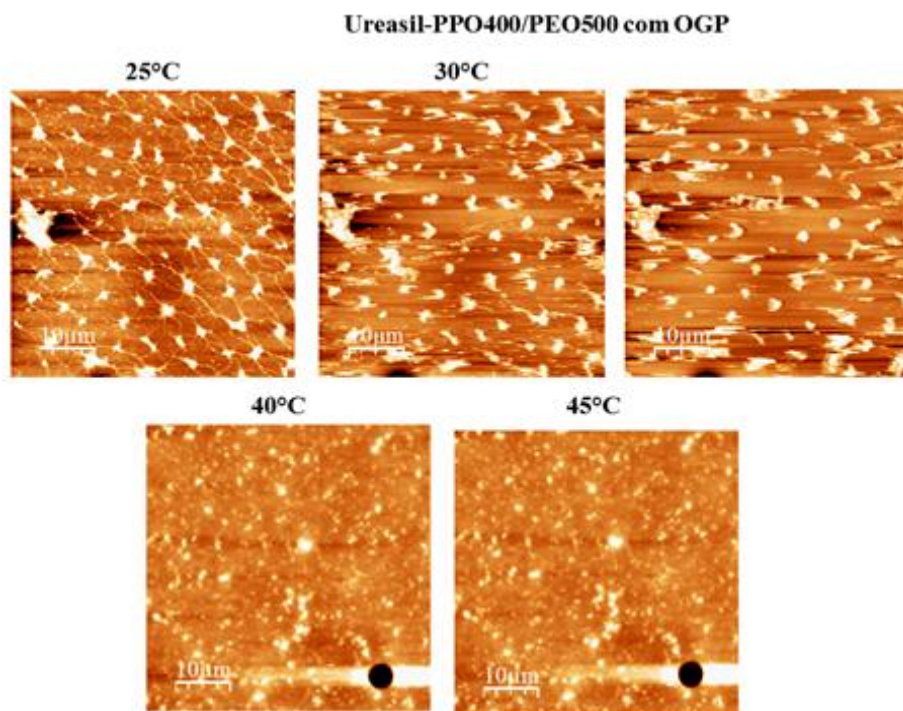


Figura 44. Imagem topográfica (3D) em modo de contato para o material ureasil-PPO400/PEO1900 na proporção 50/50 sem OGP em diferentes temperaturas.

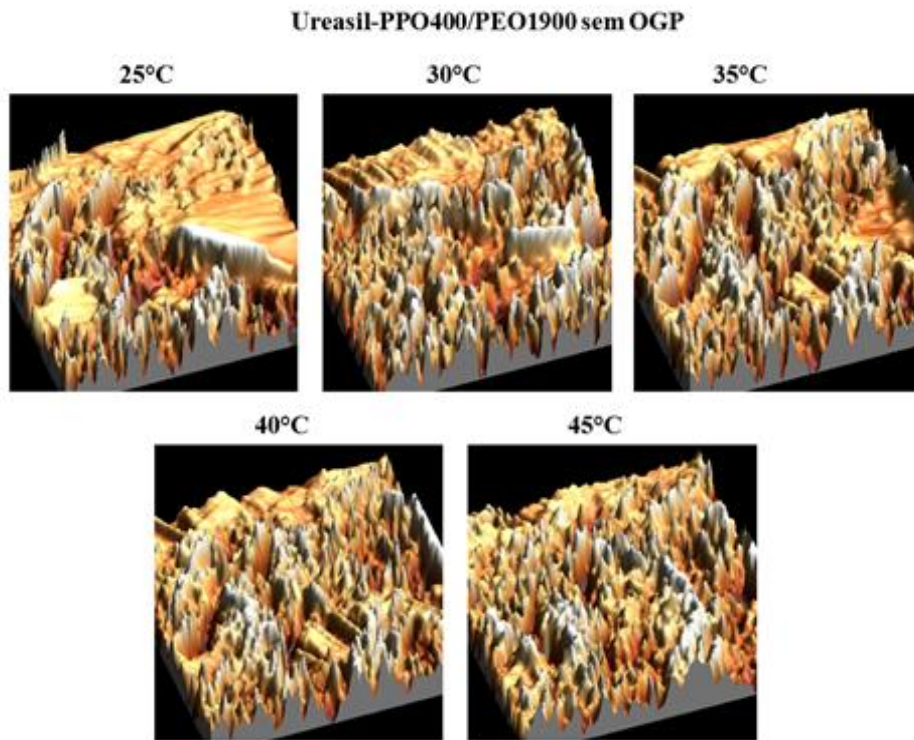
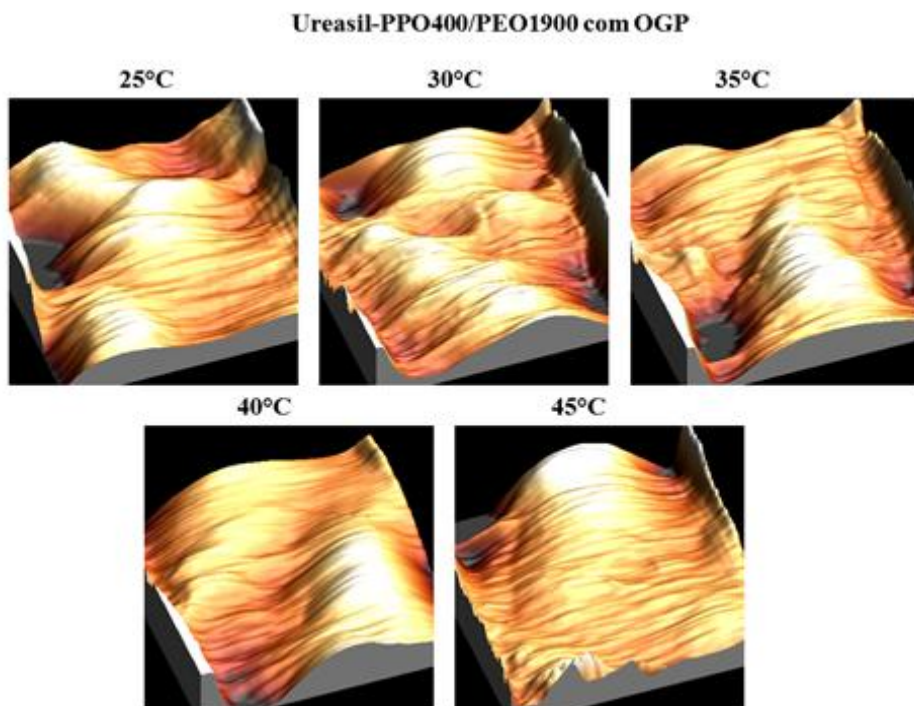


Figura 45. Imagem topográfica (3D) em modo de contato para o material ureasil-PPO400/PEO1900 na proporção 50/50 com OGP em diferentes temperaturas.



A tabela 8 apresenta os valores de rugosidade média para todos os materiais com o aumento da temperaturas.

Tabela 8. Rugosidade média (RMS) para as misturas dos materiais híbridos submetidos a diferentes temperaturas.

<i>Híbrido</i>	<i>RMS (nm)</i> 25 °C	<i>RMS (nm)</i> 30 °C	<i>RMS (nm)</i> 35°C	<i>RMS (nm)</i> 40 °C	<i>RMS (nm)</i> 45 °C
Ureasil-PPO400/PEO500 sem OGP	3,41	3,44	3,46	3,45	3,48
Ureasil-PPO400/PEO500 com OGP	3,31	3,60	4,30	3,75	3,87
Ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP	23,17	20,52	26,57	31,78	31,16
Ureasil-PPO400/PEO1900 com OGP	9,05	7,94	8,66	11,4	12,84

Observa-se que para a mistura dos materiais ureasil-PPO400 e ureasil-PEO500 na proporção 50/50 sem OGP (Figura 42) não ocorreu aumento ou diminuição da rugosidade com o aumento da temperatura. A superfície apresentou poucos poros, com diâmetro de 700 nm. Altura média de 3,41 nm em temperatura de 25 °C e 3,48 nm a 45 °C. Observa-se pelas imagens que esse material possui dois tipos de organização estrutural. A presença desses diferentes domínios podem ser atribuídos ao diferente caráter hidrofílico/hidrofóbico dos materiais.

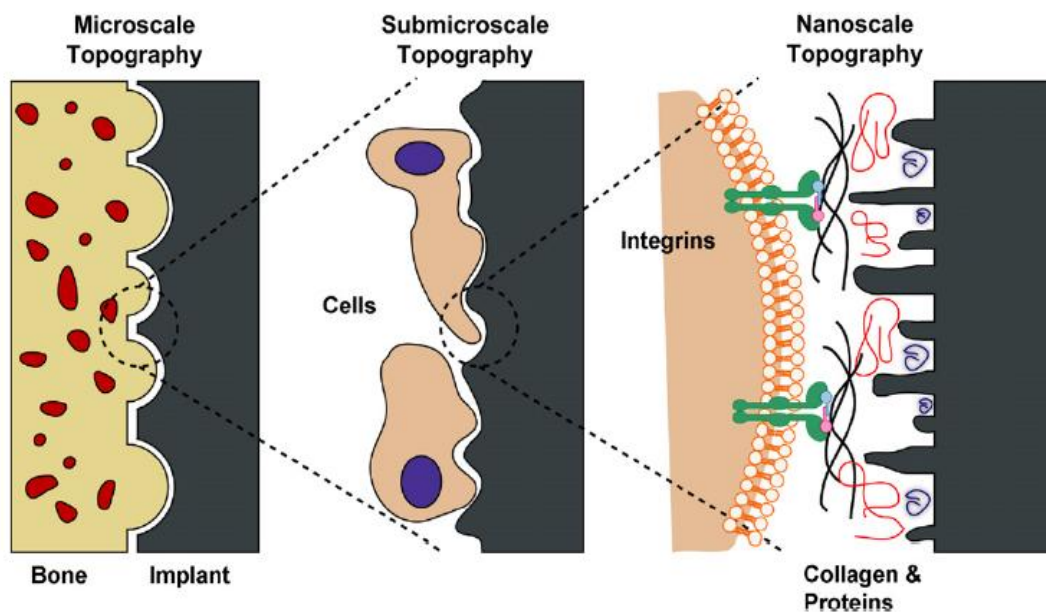
Quando adicionamos o OGP no material (Figura 43) observa-se que não ocorreu alterações significativas quanto a rugosidade média da área analisada. Contudo, as imagens revelam uma nova organização estrutural do material, este fato pode ser atribuído ao OGP que possui caráter hidrofílico e tem preferência em se ligar ao material ureasil-PEO500 que possui um caráter mais hidrofílico em relação ao material ureasil-PPO400. Van den Berg e colaboradores (1994) sugeriram que o material menos rígido tem maior possibilidade de se encontrar na superfície do filme.

Para a mistura dos materiais ureasil-PPO400 e ureasil-PEO1900 (80/20) sem OGP (Figura 44) é possível observar que a rugosidade média é maior em relação a mistura ureasil-PPO400/PEO500 e que após 40 °C houve um aumento na rugosidade do material, este fato pode estar relacionado com a presença do material ureasil-PEO1900

que conforme foi observado na figura 41, este material apresenta uma rugosidade elevada, provavelmente ocorrida pelo maior tamanho de sua cadeia polimérica. Observa-se uma superfície com poucos poros e diâmetro de 2,5 μm . Quando adicionado o OGP (Figura 45) observa-se um aumento no diâmetro médio dos poros (2,8 μm) e diminuição na rugosidade da superfície. Apesar dessa diminuição foi possível observar o mesmo fato para a mistura sem o OGP, ou seja, após 40 °C houve um aumento na rugosidade do material. A diminuição na rugosidade para após a adição do OGP, pode ser devido a este se ligar nos possíveis sítios de ligações da cadeia polimérica tornando o material mais homogêneo. Para os dois materiais fica evidente que a presença do OGP tem modificado a organização dos materiais.

A rugosidade em biomateriais beneficia a adesão de diferentes proteínas e receptores de membranas que pode resultar em maior atração dos osteoblastos para a formação da matrix extracelular sobre todo a superfície do material (Figura 46) (GITTENS et al., 2011). Desta forma, pode-se esperar que nos estudos *in vivo* materiais com valores maiores de rugosidade e com pores maiores como o ureasil-PPO400/PEO1900 tenha melhor desempenho quando comparado com o ureasil-PPO400/PEO500.

Figura 46. Esquema da interação entre osso e a superfície de um biomaterial. Fonte: GITTENS et al., 2011.



6.10 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* estão cada dia mais sendo utilizados, uma vez que estes diminuem a necessidade da utilização de animais de laboratório, são rápidos e baratos. Contudo, nenhum ensaio *in vitro* consegue simular as condições *in vivo* e não podemos extrapolar esses resultados (SANCHEZ et al., 2006).

Entretanto, o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, diz que o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste que deve ser realizado para avaliação da viabilidade celular de qualquer biomaterial, e uma vez comprovada a sua viabilidade, o estudo pode seguir para os ensaios em animais de laboratórios. Souza e colaboradores (2013) avaliou a biocompatibilidade *in vitro* desses materiais híbridos em fibroblastos pelo ensaio de MTT e os resultados confirmaram que os materiais híbridos possuem alta viabilidade celular (SOUZA et al., 2013).

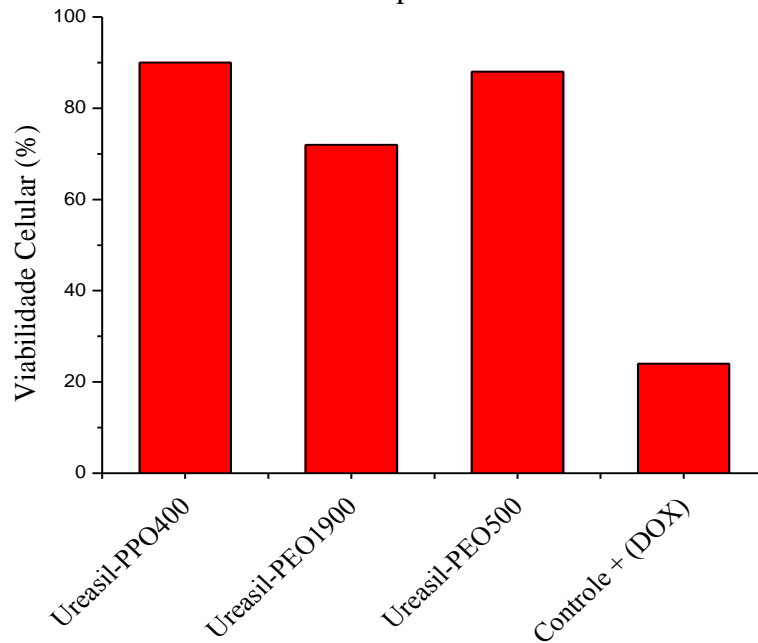
O ensaio por sulforodamina B foi realizado nesse trabalho com a finalidade de demonstrar a biocompatibilidade desses materiais frente a outro tipo de célula de queratinócitos imortalizados (HACAT).

O corante sulforodamina B utilizado para o teste de citotoxicidade baseia-se na coloração das proteínas. Este corante apresenta grupos sulfônicos que liga-se às proteínas das células aderidas na microplaca, e estas por sua vez são precipitadas pelo Ácido Tricloro Acético (TCA – Sigma).

As linhagens HACAT são muito utilizadas para realização de ensaios de citotoxicidade por proporcionar um suprimento ilimitado de células, este fato assegura a elevada reprodutibilidade (SPIELMANN et al., 1998).

A Figura 47 apresenta os resultados de viabilidade celular das membranas ureasil poliéter pelo método de sulforodamina B utilizando as células HaCat.

Figura 47. Resultados de viabilidade celular pelo ensaio de sulforodamina B.



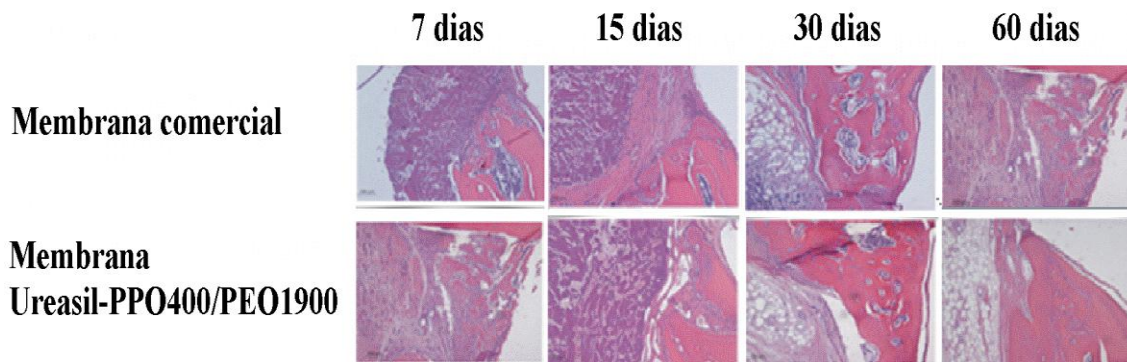
Observa-se que todos os materiais testados não apresentam citotoxicidade, uma vez que o valor mínimo de viabilidade de células foi 75 % para o material ureasil-PEO1900 e o valor máximo foi 90% para o material ureasil-POP400.

Esses resultados revelam que o material não apresenta citotoxicidade celular a célula HACAT, entretanto é importante estudar completamente a resposta de mecanismos celulares, uma vez que técnicas em monocamada como MTT ou Sulforodamina B não simulam as condições *in vivo*.

6.11 Teste *in vivo* –Análise Histológica

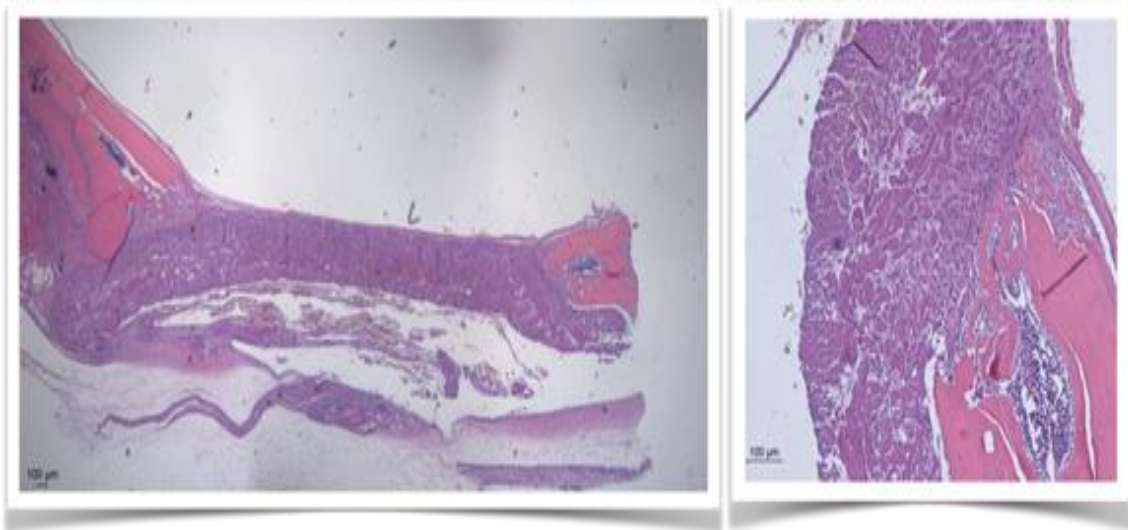
A análise histológica é importante para avaliar o nível de inflamação em torno dos materiais implantados. Os resultados são essenciais para avaliar se o material é biocompatível. A Figura 48 mostra todas as fotomicrografias dos defeitos na calota com 7, 15, 30 e 60 dias de implante.

Figura 48. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 7, 15, 30 e 60 dias do procedimento cirúrgico para a membrana comercial (Bio-Gide; Geistlich Pharma AG, Biomaterials) e para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 (80:20) sem OGP, aumento de 100x.



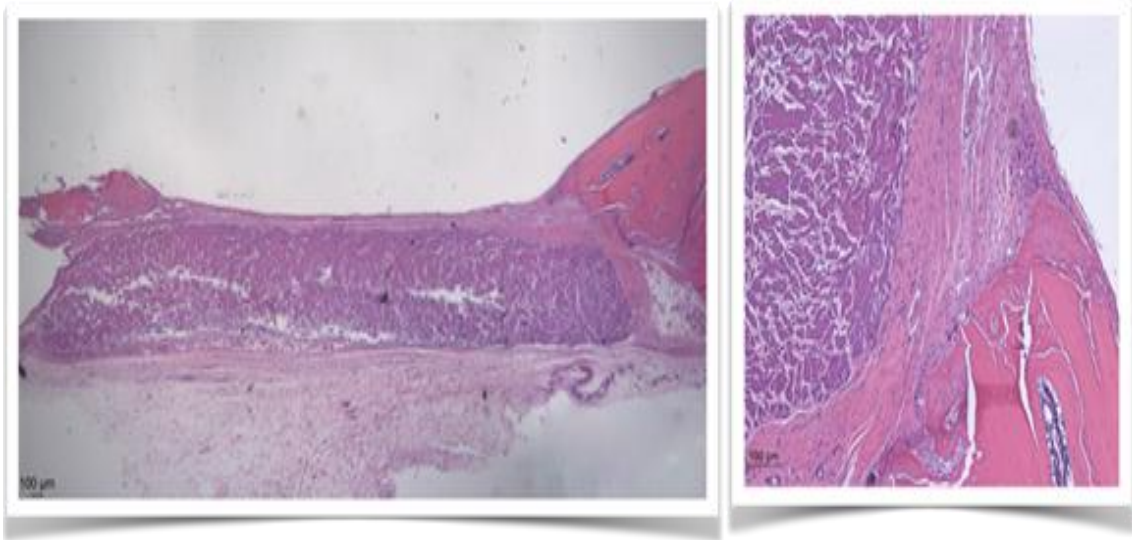
Para a membrana comercial de colágeno, o início da formação óssea nas margens dos defeitos foi observado após 7 dias de implante (Figura 49). A presença de estase sanguínea, tecido conjuntivo desorganizado, membrana em degradação associada à infiltração de células mononucleares e no meio do defeito também foram observadas.

Figura 49. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 7 dias do procedimento cirúrgico para a membrana comercial (Bio-Gide; Geistlich Pharma AG, Biomaterials), aumento de 100x.



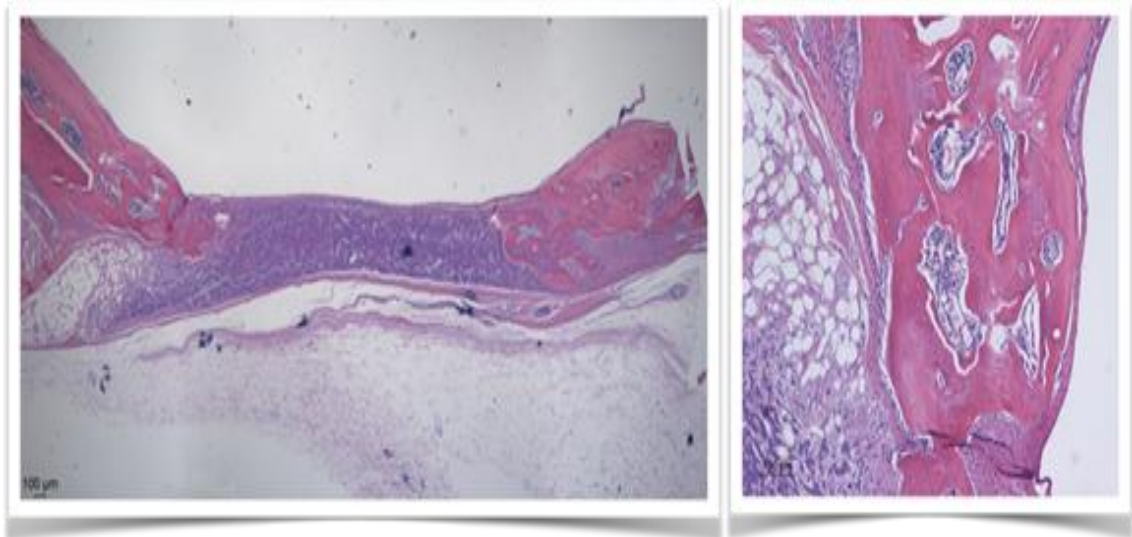
Aos 15 dias (Figura 50), houve um aumento na quantidade de formação óssea na margem do defeito com aspecto do osso no estágio de maturação. O tecido conjuntivo no centro do defeito foi bem organizado e a membrana ainda estava em fase de degradação sem encapsulamento associado com infiltrado inflamatório mononuclear sem estase de sangue.

Figura 50. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 15 dias do procedimento cirúrgico para a membrana comercial (Bio-Gide; Geistlich Pharma AG, Biomaterials), aumento de 100x.



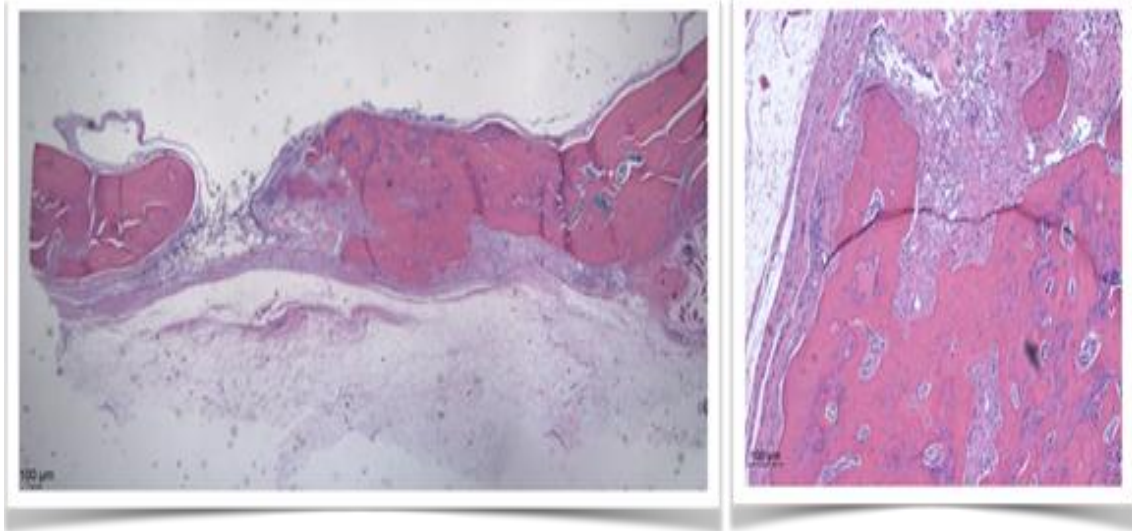
Após 30 dias (Figura 51), observou-se uma evolução, devido ao aumento da quantidade de osso formado na margem do defeito, com presença de osteoblastos no periósteo com aspecto de células ativas na produção da matriz. O tecido conjuntivo estava mais organizado e a membrana apresentou degradação associada ao infiltrado de células mononucleares.

Figura 51. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 30 dias do procedimento cirúrgico para a membrana comercial (Bio-Gide; Geistlich Pharma AG, Biomaterials), aumento de 100x



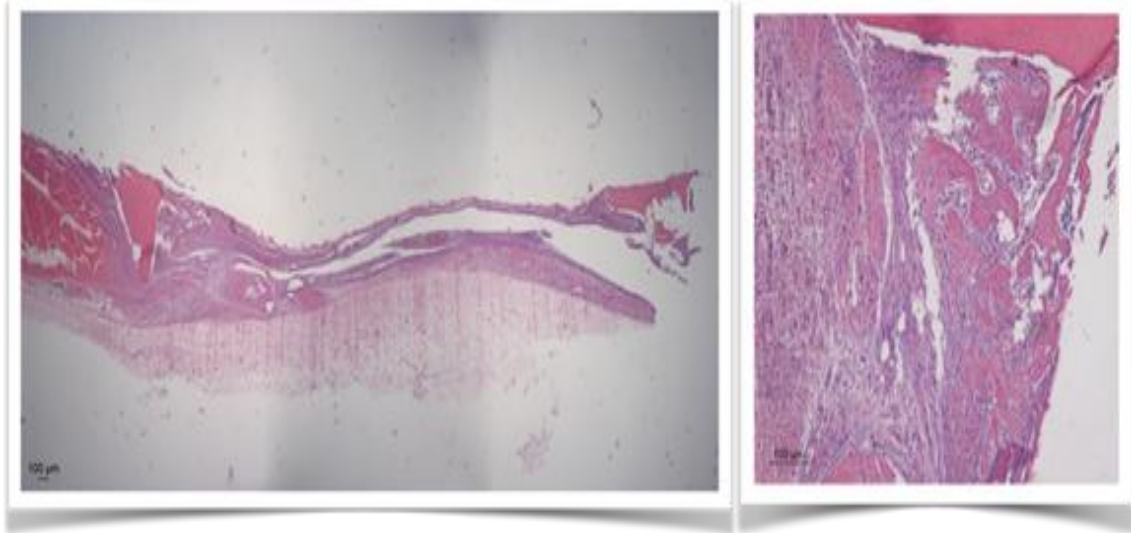
Aos 60 dias (Figura 52), verificou-se uma grande quantidade de osso formado, com estruturas histológicas de osso maduro, como ossos lamelares. Foram observados detritos da membrana e redução do infiltrado inflamatório. No centro do defeito, observou-se a presença de tecido conjuntivo bem organizado.

Figura 52. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 60 dias do procedimento cirúrgico para a membrana comercial (Bio-Gide; Geistlich Pharma AG, Biomaterials), aumento de 100x.



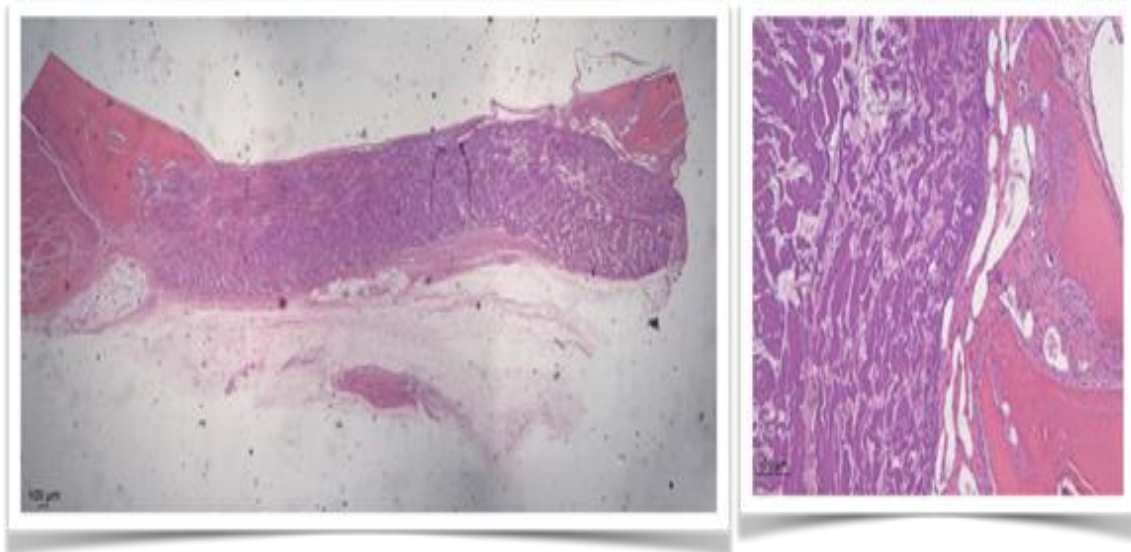
Para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP após 7 dias de implante (Figura 53), foi verificado que a formação de tecido ósseo estava começando nas margens dos defeitos, com a presença de células inflamatórias. A região do defeito central foi ocupada por um tecido conjuntivo desorganizado com presença de estase sanguínea e alta concentração de células inflamatórias.

Figura 53. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 7 dias do procedimento cirúrgico para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP, aumento de 100x.



Aos 15 (Figura 54) dias, houve um aumento na quantidade e organização do tecido ósseo recém formado nas margens dos defeitos. O espaço onde a membrana foi inserida foi preservado, mas um infiltrado inflamatório ao redor da membrana foi observado. No entanto, o tecido conjuntivo foi organizado em torno dele, dando um aspecto de encapsulamento. Ocorreu redução das células inflamatórias e ausência de regiões com estase sanguínea.

Figura 54. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 15 dias do procedimento cirúrgico para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP, aumento de 100x.



Aos 30 (Figura 55) e 60 dias (Figura 56), verificou-se a estabilização do aspecto histológico do defeito, com o início da maturação do osso recém-formado nas margens do defeito e organização do tecido conjuntivo no centro do defeito. As células inflamatórias estavam presentes, mas foram reduzidas, em comparação com o período inicial de cicatrização. A área da membrana estava intacta. No entanto, o tecido conjuntivo formado em torno do mesmo mostrou um aspecto que sugere encapsulamento.

Figura 55. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 30 dias do procedimento cirúrgico para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP, aumento de 100x.

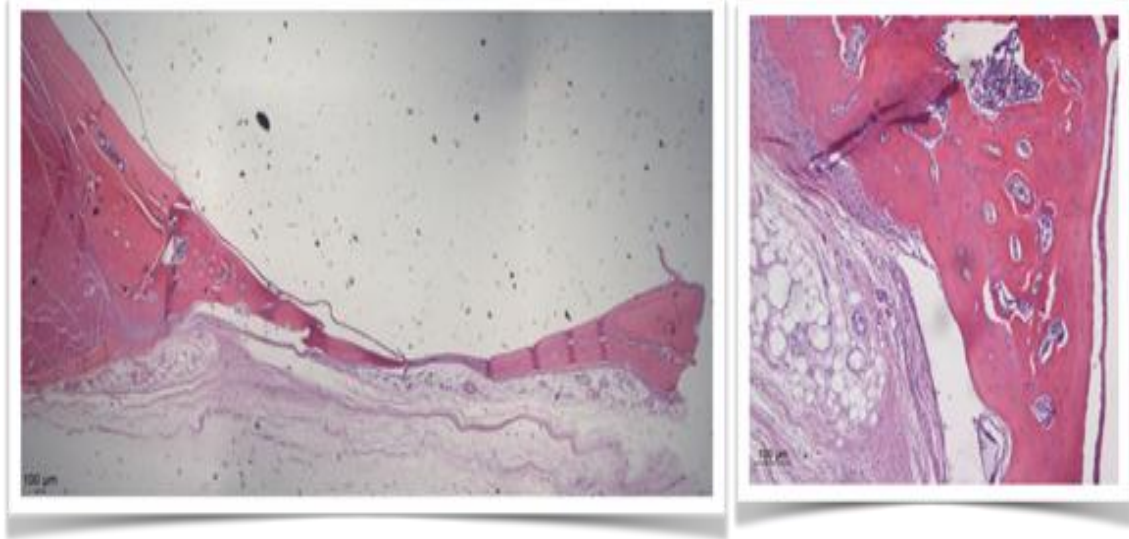
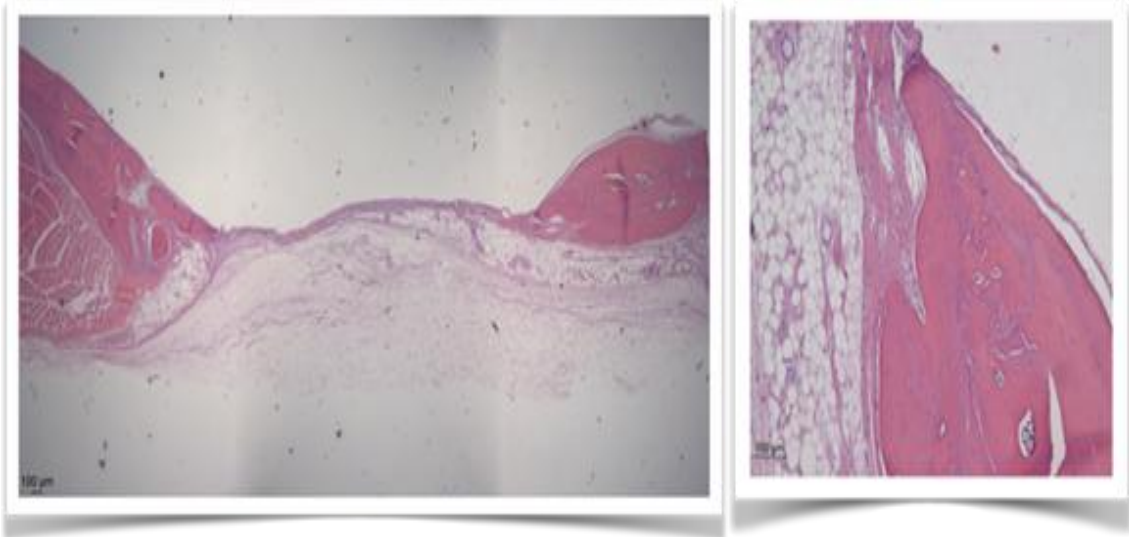


Figura 56. Fotomicrografias dos defeitos ósseos após 60 dias do procedimento cirúrgico para a membrana ureasil-PPO400/PEO1900 sem OGP, aumento de 100x.



Sistema de pontuação histológica adotado por Pişkin e colaboradores foi utilizado para determinar a classificação desses achados histológicos e estão na Tabela 9 (PIŞKIN et al., 2009). Estes resultados revelam que as duas membranas têm os mesmos valores de pontuação para biocompatibilidade (pontuação 1: presença de alguns linfócitos ou macrófagos, ausência de células gigantes do corpo estranho, eosinófilos ou neutrófilos) e mesmo valor do processo do tecido conjuntivo após 30 dias (pontuação 1: presença de células em forma de fuso ou fibroplasia leve). Os resultados de cicatrização dos defeitos ósseos demonstraram que não houve aumento na formação em relação ao tempo, uma vez que, a pontuação 1 indica formação óssea leve (<50%) (PIŞKIN et al., 2009).

Tabela 9. Pontuação histológica da membrana comercial de colágeno e membrana ureasil-PPO400/PEO1900 (adaptada de PIŞKIN et al., 2009).

Tempo (dias)	Membrana comercial			Ureasil-PPO400/PEO1900		
	Osso	Tecido conjuntivo	Inflamação	Osso	Tecido conjuntivo	Inflamação
7	1	1	1	1	3	2
15	1	2	2	1	2	2
30	1	2	2	1	2	2
60	1	1	1	1	1	1

Como observado acima, nos dois grupos houve um início de formação de tecido ósseo nas margens do defeito após 7 dias, com presença de infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo desorganizado no centro do defeito. Durante a evolução, no período de 15 dias, o osso já estava em aspecto de maturação, e o tecido conjuntivo em organização. Nos períodos de 30 e 60 dias observou-se a continuidade do processo de maturação do tecido ósseo neoformado (em maior quantidade), sendo que cada vez mais diminuía-se o infiltrado inflamatório, e à medida que o tempo passava ocorria a degradação da membrana. Os dois grupos foram muito semelhantes no processo de produção óssea tanto em quantidade como em qualidade. Assim, podemos dizer que os metabólitos produzidos pelo material após a sua degradação não interferiram com a regeneração óssea.

Porém, as membranas foram diferentes no aspecto de sua degradação, cada uma se comportou de um modo. Na membrana comercial foi observado que o seu processo de degradação iniciou no período de 7 dias, associado a infiltrado inflamatório

mononuclear sem reação de encapsulamento. Nos períodos de 15 e 30 dias, continuou-se o processo de degradação, e no período de 60 dias não havia mais resquícios da mesma. Enquanto que a membrana Ureasil-PPO400/PEO1900, o processo de degradação também no período de 7 dias, associado a infiltrado inflamatório mononuclear sem reação de encapsulamento. Continuou-se uma degradação avançada no período de 15 dias, e no período de 60 dias foram observados resquícios da membrana.

6. Conclusões

Membranas na concentração de $66,25 \times 10^{-11}$ mol de OGP foram obtidas a partir de misturas de três polímeros, sendo dois à base de polióxido de etileno (POE) de massa molecular 500 e 1900 g mol⁻¹ e um à base de polióxido de propileno (POP) de massa molecular 400 g mol⁻¹. Radiação gama a 24 kGy não ocasionou alteração na estrutura dos materiais. A análise mecânica por DMA revelou que as membranas ureasil-POP400/PEO1900 apresentam maior flexibilidade em relação a ureasil-POP400/PEO500e que nenhuma membrana testada sofreu ruptura quando submetidas a aplicação de uma alta força (15N). Os resultados de pH permaneceram entre 7,38 e 7,64 durante 48 horas, estando estes dentro da faixa adequada para os materiais não apresentarem efeitos citotóxicos. Os resultados de liberação revelaram que as membranas ureasil-POP400/PEO500 e ureasil-POP400/POE1900 liberaram 7 e 21% respectivamente, durante 48 horas. Os resultados *in vivo* demonstraram que a quantidade e a qualidade do tecido ósseo formado nos defeitos ósseos foram semelhantes às membranas comerciais de colágeno.

Assim, podemos concluir que as membranas desenvolvidas a partir das misturas dos materiais ureasil-políeter resultou em membranas com propriedades diferentes quando comparadas com as membranas compostas com os materiais puros. Desta forma, foi possível modificar o perfil de intumescimento, resultando em membranas de baixo custo e alta biocompatibilidade. Além disto, os resultados de liberação controlada e prolongada do OGP demonstra que essas membranas podem ser uma plataforma tecnológica potente para ROG, atuando como membrana de barreira física osteoindutora capaz de melhorar a resposta fisiológica do tecido ósseo e aumentar a formação óssea.

Referências

AABOE, M.; PINHOLT, E.M.; HJORTING-HANSEN, E. Healing of experimentally created defects: a review. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, v. 33, n. 5, p. 312-318, 1995.

ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Coll. Surf. B: Bio.**, v. 16, p. 3-9, 1999.

AN, G.; XUE, Z.; ZHANG, B.; DENG, Q.K.; WANG, Y.S. Expressing osteogenic growth peptide in the rabbit bone mesenchymal stem cells increased alkaline phosphatase activity and enhanced the collagen accumulation. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 18, p. 1618-1624, 2014.

ARIGA, K.; VINU, A.; HILL, J.P.; MORI, T. Coordination chemistry and supramolecular chemistry in mesoporous nanospace. **Coord. Chem. Rev.**, v. 251, n. 21-24, p. 2562-2591, 2007.

BAB, I.; CHOREV, M. Osteogenic growth peptide: from concept to drug design. **Biopolymers**, v. 66, n. 1, p. 33-48, 2002.

BAB, I.; GAZIT, D.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A. Regenerating Bone Marrow Produces a Potent Growth-Promoting Activity to Osteogenic Cells. **Endocrinology**, v.123, n.1, p. 345-52. 1988.

BAB, I.; GAZIT, D.; CHOREV, M.; MUHIRAD, A.; SHTEYER, A.; GREENBERG, Z.; NAMDAR, M.; KAHN, A. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. **EMBO J.**, v. 11, n. 5, p. 1867-1873, 1992.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev Bras Ciênc Farm.**, n. 41, p. 27-51, 2005.

BELTING, M.; SANDGREN, S.; WITTRUP, A. Nuclear delivery of macromolecules: barriers and carriers. **Adv. Drug Delivery Rev.** v. 57, p. 505-527, 2005.

BENVENUTTI, E.V.; MORO, C.C.; COSTA, T.M.H. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Quim. Nova.**, v. 32, n. 7, p. 1926-1933, 2009.

BERG, V. D, R.; De Groot, H.; VAN-DIJK, M. A.; DENLEY, D. R. Atomic force microscopy of thin triblock copolymer films. **Polymer.**, v. 35, n. 26, p. 5778-5781, 1994.

BERMUDEZ, V.D.; CARLOS, L.D.; ALACACER, L. Sol-gel derived urea cross-linked organically modified silicates. Room temperature mid-infrared spectra. **Chem Mater.**, n. 11, p. 569-580, 1999.

BIELBY, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury.** v.38, Suppl. 1, S26–S32, 2007.

BLOKHUIS, T.J. Formulations and delivery vehicles -for bone morphogenetic proteins: latest advances and future directions. **Injury**, v. 40, p. 8-11, 2009.

BRADY, J. Resorption rate, route of elimination, and ultrastructure of the implants of polylactic acid in the abdominal wall of rat. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.7, p.155-166, 1973.

BRAGER, M.A.; PATTERSON, M.J.; CONNOLLY, J.F.; NEVO, Z. Osteogenic Growth Peptide Normally Stimulated by Blood Loss and Marrow Ablation has Local and Systemic Effects on Fracture Healing in Rats. **J Orthopedic Res**, v. 18, p. 133-139, 2000.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em Julho de 2016.

BRENNAN, A. B.; WIKES, G. L. Structure-property behavior of sol-gel derived hybrid materials: effect of a polymeric acid catalyst. **Polymer**, v. 32, p. 733-739, 1991.

BRIEN, F. J. O. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Mater Today**, v. 14, n. 3, p. 88-95, 2001.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G.W. **Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing**. San Diego, Calif, USA: Academic Press, 1990.

BRONICH, T.K.; NEHLS, A.; EISENBERG, A.; KABANOV, V. A. Novel drug delivery systems based on the complexes of block ionomers and surfactants of opposite charge. **Colloids Surf. B**, v.16, p.243–251, 1999.

BURGESS, D. J. Colloids and colloid drug delivery systems. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 3 rd. ed. London: Informa Healthcare, p. 636-647, 2006.

BURKETT, C.M.; UNDERWOOD, L.A.; VOLZER, R.S.; BAUGHMAN, J.A.; EDMISTON, P.L. Organic–inorganic hybrid materials that rapidly swell in non-polar liquids: nanoscale morphology and swelling mechanism. **Chem. Mater.**, v. 20, n. 4, p. 1312-1321, 2008.

CAFFESSE, R.G., GUINARD, EA Treatment of localized gingival recessions. Part II. Coronally repositioned flap with a free gingival graft. **J Periodont.**, v. 49, p.357-361, 1978.

CARBINATTO, F.M.; De CASTRO, A.D.; EVANGELISTA, R.C.; CURY, B.S.F. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. **Asian. J. Pharmacol.**, v. 9, p. 27-34, 2014.

CARVALHO, F.C.; CAMPOS, M.L.; PECCININI, R.G.; GREMIÃO, M.P.D. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as alternative antiretroviral therapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 84, p. 219-227, 2013.

CHAVANPATIL, M.D.; JAIN, P.; CHAUDHARI, S.; SHEAR, R.; VAVIA, P.R. Novel sustained release, swellable and bioadhesive gastro retentive drug delivery system for ofloxacin. **Int. J. PHarm.**, v. 316, n. 1-2, p. 86-92, 2006.

CHEN, C.; KONG, X.; ZHANG, S.; LEE, I. Characterization and in vitro biological evaluation of mineral/osteogenic growth peptide nanocomposites synthesized biomimetically on titanium. **Appl Surf Sci.**, v.334, p. 62–68, 2015.

CHEN, Z.; CHANG, M.; PENG, Y.; ZHAO, L.; ZHAN, Y.; JING, L.; WANG, R. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10–14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. **Regul Pept.**, v. 142, p. 16–23, 2007.

CHEN, Y.C.; BAB, I.; MANSUR, N.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A.; NAMDAR-ATTAR, M.; GAVISH, H.; VIDSON, M.; CHOREV, M. Structure-bioactivity of C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10-14)]. **J Pept Res**, v. 56, n. 3, p. 147-156, 2000.

CHIAVACCI, L. A.; DAHMOUCHE, K.; SILVA, N.J.O.; CARLOS, L.D.; AMARAL, V.S.; DE ZEA BERMUDEZ, V.; PULCINELLI, S.H.; SANTILLI, C.V.; BRIOIS, V.; CRAIEVICH, A.F. Effect of presence of an acid catalyst on structure and properties of iron-doped siloxane-polyoxyethylene nanocomposites prepared by sol-gel. **J. Non-Cryst. Solids.**, v. 345/346, p. 585-590, 2004.

CHIANG, C.L.; MA, C.C. Synthesis, characterization and thermal properties of novel epoxy containing silicon and phosphorus nanocomposites by sol-gel method. **J. Eur. Pol.**, v. 38, p. 2219-2224, 2002.

CHUJO, Y.; IHARA, E.; KUSE, S.; SUZUKI, K.; SAEGUSA, T. Macromolecular engineering on the basis of the polymerization of 2-oxazolines. **Macromol. Chem. Macromol. Symp.**, v. 42-43, p. 303-313, 1991

CIANCAGLINO, P.; SIMAO, A.M.; CAMOLEZI, F.L.; MILLAN, J.L.; PIZAURO, J.M. Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation. **Braz J Med Biol Res.**, n. 39, p. 603-610, 2006.

CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions, **Nat. Rev. Rheumatol.** v. 8, p. 133–143, 2012.

COLILLA, M.; SALINAS, A.J.; VALLET-REGI, M. Amino–Polysiloxane Hybrid Materials for Bone Reconstruction. **Chem. Mater.**, v. 18, n. 24, p. 5676-5683, 2006.

COLLILA, M.; IZQUIERDO-BARBA, I.; VALLET-REGI, M. Phosphorus-containing SBA-15 materials as bisphosphonate carriers for osteoporosis treatment. **Microporous Mesoporous Mater.**, v. 135, p. 51-59, 2010.

CORMA, A.; ARRICA, U.D.M.; FERNANDEZ, E.; ORTEGA, L. Organic–Inorganic Nanospheres with Responsive Molecular Gates for Drug Storage and Release. **Angew. Chem.**, n. 121, p. 6365-6368, 2009.

CZAJA, W. K., YOUNG, D. J., KAWECKI, M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromol.**, v. 8, p. 1-12, 2007.

DAHLIN, C.; LINDE, A.R. GOTTOW, J.; GOTTLow, J. F.; NYMAN, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg.**, n. 81, p. 672-676, 1988.

DAHMOUCHE, K.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H.; CRAIEVICH, A. F. Small-angle x-ray scattering study of sol-gel derived siloxane-PEG and siloxane-PPG hybrid materials. **J. Phys Chem. B**, v. 103, p. 4937-4942, 1999.

DEMPSTER, D.W.; PARISIEN, M.; SILVERNERG, S.J.; LIANG, X.G.; SCHNITZER, M.; SHEN, V. Sobre o mecanismo de preservação do osso canceloso em mulheres pós-menopáusicas com hiperparatireoidismo primário leve. **J. Clin Endocrinol Metabol.**, v. 84, p. 1562-1566, 1999.

DIMITRIOU, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; GIANNOUDIS, P.V. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Med.**, v. 9, p. 66, 2011. Disponível em: < <http://www.infusebonegraft.com/healthcare-providers/index.htm> >, Acesso em: 11/11/2015.

DRIESSENS, F. C. M.; FERNANDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J.A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. **Anal Quím.**, v. 93, p. S38-S43, 1997.

DUPOIREUX, L.; POURQUIER, D.; PICOT, M. C.; NEVES, M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 30, p. 58–62, 2001.

DUMITRIU, S. **Polymeric biomaterials**. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, 2001.

EPSTEIN, N. E. Pros, cons, and costs of INFUSE in spinal surgery. **Surg Neurol Int**, v. 2, p. 10, 2011.

ESTEVEES, A.C.C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Quim. Nova.**, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.

FAION, A. G. O.Etil-2-cianocrilato como selante em coto cecal de *Rattus norvegicus albicans* submetidos a ressecção parcial. 2009. 104 f. Dissertação. (Mestrado em

Medicina)-. Uberlândia: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

FALONI, A.P.S.; CERRI, P.S. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. **Rev Odontol UNESP.**, n. 36, v. 2, p.181-188, 2007.

FARMACOPÉIA brasileira. 5.ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FASSBENDER, M.; MINKWITZ, S.; STROBEL, C.; SCHIMIDMAIER, G.; WILDEMANN, B. Stimulation of bone healing by sustained bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) delivery. **Int J Mol Sci.**, v. 15, p. 8539-5552, 2014.

FAZZI, R.; PACINI, S.; TESTI, R.; AZZARA, A.; GALIMBERTI, S.; TESTI, C.; TROMBI, L.; METELLI, M. R.; PETRINI, M. Carboxy-terminal fragment of osteogenic growth peptide in vitro increases bone marrow cell density in idiopathic myelofibrosis. **Br J Haematol.**, n. 121, p. 76-85, 2003.

FELIZZOLA, L.R.; SOBRINHO, J.R.R.; ZORN, W.G.W.; BELLEN, B.V. O papel do endotélio vascular na fisiologia circulatória. **Cir. Vas. Angiol.**, v. 12, p. 129-136, 1996.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid-phase peptide-synthesis utilizind 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids. **Int J Pept Prot Res.**, n. 35, 1990.

FRANKEN, L.; SANTOS, L.S.; CARAMÃO, E.B.; COSTA, T.M.H.; BENVENUTTI, E.V. Xerogel *p*-anisidinapropilsílica: estudo da estabilidade térmica e da resistência à lixiviação com solventes. **Quim. Nova.**, v. 25, n. 4, p. 563-566, 2002.

FRANVILLE, A.; ZAMBON, D.; MAHIOU, R. Luminescence behavior of sol-gel-derived hybrid materials resulting from covalent grafting of a chromophore unit to different organically modified alkoxyxilanes. **Chem Mater.**, n. 12, p. 428-433, 2000.

FUJIHARA, K.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. **Biomaterials.**, v. 26, p. 4139-4147, 2005.

GABARIN, N.; GAVISH, H.; MUHLRAD, A.; CHEN, Y.; NAMDAR-ATTAR, M.; NISSENSON, R.A.; CHOREV, M.; BAB, I. Mitogenic Gi Protein-MAP Kinase Signaling Cascade in MC3T3-E1 Osteogenic Cells: Activation by C-Terminal Pentapeptide of Osteogenic Growth Peptide [OGP(10±14)] and Attenuation of Activation by Camp. **J Cell Biochem.**, v. 81, p. 594-603, 2001.

GABET, Y.; MULLER, R.; REGEV, E.; SELA, J.; SHTEYER, A.; SALISBURY, K.; CHOREV, M.; BAB, I. Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. **Bone.**, v. 35, p. 65-73, 2004.

GAO, S.F.; CHEN, H.G.; WANG, Z.H.; CUI, Z.J.; ZHANG, Y.H. Preparation, characterisation and controlled drug release from thermosensitive hybrid hydrogels. **Plastics, Rubber and Composites.**, v. 41, n. 1, 2012.

GARCÍA, O.; GARRIDO, L.; SASTRE, R.; COSTELA, A.; GARCÍA-MORENO, I. Synthetic Strategies for Hybrid Materials to Improve Properties for Optoelectronic Applications. **Adv Funct Mater.**, v. 18, n. 14, p. 2017-2025, 2008.

GEIGER, M. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. **Adv Drug Deliver Rev.**, v. 55, n. 12, p. 1613-1629, 2003.

GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **J Cell Biochem.**, New York, v.88, n.5, p.873-884, 2003.

GIRARD-REYDET, E.; LAM, T. M.; PASCAULT, J. P. In situ polymerization of tetraethoxysilane in poly (vinyl acetate). **Macromol. Chem. Phys.**, v. 195, p. 149-158, 1994.

GITTENS, R. A.; McLACHLAN, T.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; CAI, Y.; BERNER, S.; TANNENBAUM, R.; SCHWARTZ, Z.; SANDHAGE, K. H.; BOYAN, B. D. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. **Biomaterials.**, v. 32, n. 13, p. 3395-3403, 2011.

GRIFFON, D. J. Fracture healing. In: Johnson AL, Houlton JE and Vannini R. Switzerland. **AO Principles of Fractures Management in the Dog and Cat.** Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005. p. 73-98.

GONZÁLEZ, B.; COLILLA, M.; VALLET-REGI, M. Time-delayed release of bioencapsulates: a novel controlled delivery concept for bone implant technologies. **Chem. Mater.**, v. 20, n. 15, p. 4826-4834, 2008.

GUICHEUX, J.; LEMONNIER, J.; GHAYOR, C.; SUZUKI, A.; PALMER, G.; CAVERZASIO, J. Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun-NH2-Terminal Kinase by BMP-2 and Their Implication in the Stimulation of Osteoblastic Cell Differentiation. **J Bone Mineral Res.**, v. 18, n. 11, p. 2060-2067, 2003.

HARDWICK, R.; HAYES, B.K.; FLYNN, C. Devices for Dentoalveolar Regeneration: An Up-To-Date Literature Review. **J Periodontol.**, v. 66, p. 495-505, 1995.

HERCULANO, R.D.; SILVA, C.P.; ERENO, C.; GUIMARAES, S.A.C.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C.F.O. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). **Mater Res.**, v. 12, p. 253-256, 2009.

HORCAJADA, P. et al. Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. **Nat Mater.**, v. 9, n. 2, p. 172-178, 2010. ISSN 1476-1122.

HUBERT., S.F.; COOKE, F.W.; KLAWITTER, J.J.; LEONARD, R.B.; SAUER, B.W.; MOYLE, D.D. Attachment of prostheses to the musculoskeletal system by tissue

ingrowth and mechanical interlocking. **J. Biomed. Mater. Res. Symposium.**, v. 4, p. 1-23, 1973.

HUI, Z.; YU, L.; XIOLI, Y.; XIANG, H.; FAN, Z.; NINGBO, H.; ZHIANG, Y.; PING, L.; YANHONG, Z.; QINQJUN, M. C-Terminal Pentapeptide of Osteogenic growthPeptide Regulates Hematopoiesis in Early Stage. **J Cell Biochem.**, v. 101, p. 1423–1429, 2007.

HURLEY, A. L. et al. The role of soft tissues in osteogenesis. **J Bone Joint Surg.**, v. 41, p. 1243-1254, 1959.

International Standard (ISO10993-5), Biological evaluation of medical devices- Part 5: test for in vitro cytotoxicity, Geneva: ISO, 1999.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Quim. Nova.**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.

JUDEINSTEIN, P.; BRIK, M. E.; BAYLE, J. P.; COURTIEU, J.; RAULT, J. Mobility Range in Hybrid Materials MRS. **Proceedings.**, v. 346, p. 937-942, 1994.

KABANOV, A.V.; BATRAKOVA, E.V.; ALAKHOV, V.Y. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **J. Control. Release.**, v. 82, n. 2-3, p. 189-212, 2002.

KABANOV, A.V.; ALAKHOV, V.Y. Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v. 19, n. 1, p. 1-73, 2002.

KANGWON, L.; EDUARDO, A.; DAVID, J.M. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. **J Royal Soc Interface.**, v. 8, p. 153-170, 2011.x

KARRING, T.; NYMAN, S.; LINDHE, J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. **J Clin Periodontol.** v. 7, p. 96-105, 1980.

KARSENTY, G. Transcriptional regulation of osteoblast differentiation during development. **Front Biosci.**, n. 3, p. 834-837, 1998.

KAWACHI, E.Y.; BERTRAN, C.A.; REIS, R.R.; ALVES, O.L. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quím Nova.**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KEMPEM, D.H.; LU, L.; KIM, C.; ZHU, X.; DHERT, W.J.; CURRIER, B.L. Controlled drug release from a novel injectable biodegradable microsphere/scaffold composite based on poly(propylene fumarate). **J Biomed Mater Res Part A.** v. 77, p. 103-111, 2006.

KEMPEN, D.H.; LU, L.; HEFFERAN, T.E.; CREEMERS, L.B.; MARAN, A.; CLASSIC, K.L. Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v. 29, p. 3245-3252, 2008.

KENLEY, R.A.; YIM, K.; ABRAMS, J.; RON, E.; TUREK, T.; MARDEN, L.J.. Biotechnology and bone graft substitutes. **Pharm Res.**,v. 10, n. 10, p. 1393-1401, 1993.

KIKUCHI, M.; KOYAMA, Y.; YAMADA, T.; IMAMURA, Y.; OKADA, T.; SHIRAHAMA, N.; AKITA, K.; TAKAKUDA, K.; TANAKA, J. Development of guided bone regeneration membrane composed of b-tricalcium phosphate and poly (l-lactide-co-glycolide-co-caprolactone) composites. **Biomaterials.**, v. 25, p. 5979-5986, 2004.

KIM, K.; JEONG, L.; PARK, H.; SHIN, S.; PARK, W.; LEE, S.; KIM, T.; PARK, Y.; SEOL, Y.; LEE, Y.; KU, Y.; RHYU, I.; HAN, S.; CHUNG, C. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration., **J Biotechnol.**,v. 120, p. 327-339, 2005.

KIM, M.J.; LEE, B.; YANG, K.; PARK, J.; JEON, S.; UM, S.H.; KIM, D.; IM, S.G.; CHO, S. BMP-2 peptide-functionalized nanopatterned substrates for enhanced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Biomaterials.**, v. 34, p.7236-7246, 2013.

KO, E.; YANG, K.; SHIN, J.; CHO, S. W. Polydopamine-assisted osteoinductive peptide immobilization of polymer scaffolds for enhanced bone regeneration by human adipose-derived stem cells. **Biomacromolecules.**, v. 14, n. 9, p. 3202-3213, 2013.

KOLAMBKAR, M. Y.; DUPONT, K. M.; BOERCKEL, J. D.; HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J.; HUTMACHER, D. W.; GULDBERG, W. E. An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. **Biomaterials**, v. 32, p. 65-74, 2011.

KOLAR, P.; SCHMIDT-BLEEK, K.; SCHELL, H.; GABER, T.; TOBEN, D.; SCHMIDMAIER, G.; PERKA, C.; BUTTGEREIT, F.; DUDA, G.N. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. **Tissue Eng. Part B: Rev.**, v. 16, n. 4, p. 427-434, 2010.

KWON, G. S.; KATAOKA, K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 16, p. 295, 1995.

KYUNG, T.; BRONICH, T. K.; KABANOV, A. V. Micellar formulations for drug delivery based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic pluronic block copolymers. **J. Control. Rel.**, v. 94, p. 411-422, 2002.

LAVINI, F.; DALL'OCA, C.; BARTOLOZZI, P. Bone transport and compression-distraction in the treatment of bone loss of the lower limbs. **Injury.**, v. 41, n. 11, p. 1191-1195, 2010.

- LEE, S. H.; SHIN, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 54, p. 339-359, 2007.
- LEE, Y. J.; LEE, J-H.; CHO, H-J.; KIM, H. K.; YOON, T. T.; SHIN, H. Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration. **Biomaterials**, v. 34, n. 21, 5059-5069, 2013.
- LIN, C.X.; QIAO, S.Z.; YU, C.Z.; ISMADJI, S.; LU, G.Q. Periodic mesoporous silica and organosilica with controlled morphologies as carriers for drug release. **Micropor. Mesopor. Mater.**, v. 117, n.1-2, p. 213-219, 2009.
- LOI, F.; CÓRDOVA, L.A.; PAJARINEN, J.; LIN, T-H.; YAO, Z.; GOODMAN, S.B. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone.**, v. 86, p. 119-130, 2016.
- LOIRA-PASTORIZA, C.; TODOROFF, J.; VANBEVER, R. Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. **Adv Drug Deliv Rev.**, n. 75, p. 81-91, 2014.
- LOPES, C. B.; PACHECOB, M. T. T.; SILVEIRA-Jr, L.; DUARTE, J.; CANGUSSÚC, M. C. T.; PINHEIRO, A. L. B. The effect of the association of NIR laser therapy BMPs, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with wire osteosynthesis: Raman spectroscopy study. **J Photochem Photobiol B: Biology.**, n. 89, v.2-3, 125-130, 2007.
- LOPES, L.; MOLINA, E.; CHIAVACCI, L.A.; SANTILLI, C.V.; BRIOIS, V. e PULCINELLI, S.H. Drug–matrix interaction of sodium diclofenac incorporated into ureasil–poly(ethylene oxide) hybrid materials. **RSC Adv.**, n. 12, p. 4961-5448, 2012.
- LUNDGREN, A.K.; SENNERBY, L.; LUNDGREN, D.; TAYLOR, A.; GOTTLOW, J.; NYMAN, S. Bone augmentation a titanium implants using autologous bone grafts and a bioresorbable barrier. An experimental study in the rabbit tibia. **Clin.Oral.Implants.Res.**, v.8, n.2, p.82-89, 1997
- LUO, J.; LING, Y.; LI, X.; YUAN, B.; YU, F.; XIE, W.; CHEN, X.F. Combining amphiphilic chitosan and bioglass for mediating cellular osteogenic growth peptide gene. **RSC Adv.**, v. 5, p. 79239-79248, 2015.
- MATEJKA, L.; DUKH, O.; KAMISOVÁ, H.; HLAVATÁ, D.R.; SPÍRKOVÁ, M.; BRUS, J. Block-copolymer organic–inorganic networks. Structure, morphology and thermomechanical properties. **Polymer.**, v. 45, p. 3267-3276, 2004.
- MAIA, F.R.; BARBOSA, M.; GOMES, D.B.; VALE, N.; GOMES, P.; GRANJA, P.L.; BARRIAS, C.C. Hydrogel depots for local co-delivery of osteoinductive peptides and mesenchymal stem cells. **J Control Rel.**, n. 189, v. 158–168, 2014.
- MATTI, L.; FAZZI, F.; MOSCATO, S.; SEGNANI, C.; PACINI, S.; GALIMBERTI, S.; D-ALESSANDRO, D.; BERNARDINI, N.; PETRIN, M. Carboxy-Terminal Fragment of Osteogenic Growth Peptide Regulates Myeloid Differentiation Through RhoA. **J Cell Biochem.**, v. 93, n. 1231–1241, 2004.

MELCHER, A. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. **Arch Oral Biol.**, n. 14, p. 1101-1025, 1969.

MENDES, J.F. **Formadores de filmes híbridos orgânicos inorgânicos do tipo ureasil-poliéter para liberação controlada de fármacos.** 2012. 125f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

MENEZES, E.W.; LIMA, E.C.; ROYER, B.; SOUZA, F.B.; SANTOS, B.D.; GREGORIO, J.R.; COSTA, T.M.H.; GUSHIKEM, Y.; BENVENUTTI, E.V. Ionic silica based hybrid material containing the pyridinium group used as an adsorbent for textile dye. **J Colloid Interface Sci.**, n. 378, p. 10-20, 2012.

MISCH, C.E. Implant dentistry. **Dent Today.** 2002, 21:62.

MOGHADAM, H. G; URIST, M. R; SANDOR, G. K, CLOKIE, C. M. Successful mandibular reconstruction using a BMP bioimplant. **J. Craniofac. Surg.**, v. 12, p. 119-127, 2001;.

MOLINA, E.F.; PULCINELLI, S.H.; SANTILLI, C.V.; BLANCHANDIN, S.; BRIOIS, V. Controlled Cisplatin Delivery from Ureasil-PEO1900 Hybrid Matrix. **J. Phys Chem. B.**, v. 114, p. 3461-3466, 2010.

MOLINA, E.F.; JESUS, C.R.N.; CHIAVACCI, L.A.; PULCINELLI, S.H.; BRIOIS, V.; SANTILLI, C.V. Ureasil-polyether hybrid blend with tuneable hydrophilic/hydrophobic features based on U-PEO1900 and U-PPO400mixtures. **J Sol-Gel Sci Technol.**, n. 70, p. 317-328, 2014.

MOLINA, E.F.; PARREIRA, R.L.T.; FARIA, E.H.; CARVALHO-PEREIRA, H.W.; CARAMORI, G.F.; COIMBRA, D.F.; NASSAR, E.J.; CIUFFI, K.J. Ureasil-Poly(ethylene oxide) Hybrid Matrix for Selective Adsorption and Separation of Dyes from Water. **Langmuir.**, n. 30, v. 3857-3868, 2014.

NASSAR, E. J.; ÁVILA, L. R.; PEREIRA, P. F. S.; NASSOR, E. C. O.; CESTARI, A.; CIUFFI, K. J. CALEFI, P. S. Fenilsilicatodopado com Eu III obtido pelo método sol-gel. **Quim. Nova.**, v. 30, n. 7, p. 1567-1572, 2007.

NING, W.; WANG, L. S.; TAN, D. C. W.; MOOCHHALA, S. M.; YANG, Y. Y. Mathematical modeling and in vitro study of controlled drug release via a highly swellable and dissoluble polymer matrix: polyethylene oxide with high molecular weights. **J. Control. Rel.**, v. 102, p. 569-581, 2005.

NORI, A., KOPECEK, J. Intracellular targeting of polymer-bound drugs for cancer chemotherapy. **Adv Drug Deliv.**, v. 57, n. 4, p. 609-636, 2005.

OGOSHI, T.; CHUJO, Y.; Organic-inorganic polymer hybrids prepared by the sol-gel method. **Composite Interface.**, v. 11, p. 539, 2005.

ORIALI, M.C.; WIESNER, U. Block copolymer based composition and morphology control in nanostructured hybrid materials for energy conversion and storage: solar cells, batteries, and fuel cells. **Chem Soc Rev.**, n. 40, p. 520-535, 2011.

OSHIRO JUNIOR, J.A. Desenvolvimento de Membranas com capacidade de liberação controlada de fármacos a partir de materiais orgânico-inorgânico para implantodontia. 2014. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), 2014.

OSHIRO-Jr, J. A.; SHIOTA, L. M.; CHIAVACCI, L. A. Development of organic-inorganic polymeric film formers for controlled drug release and wound care. **Matéria**, (Rio de Janeiro), v. 19, p. 24–32, 2014.

OSHIRO-JR, J.A.; CARVALHO, F.C.; SOARES, C.P.; CHORILLI, M.; CHIAVACCI, L.A. Development of Cutaneous Bioadhesive Ureasil-Polyether Hybrid Films. **Int J Polym Sci** ., p. 1-7, 2015.

OSHIRO-JR, J. A.; MORTARI, G. R.; FREITAS, R. M.; MARCANTONIO-JUNIOR, E.; LOPES, L.; SPOLIDORIO, L. C.; MARCANTONIO, R. A. C.; CHIAVACCI, L. A. Assessment of biocompatibility of ureasil-polyether hybrid membranes for future use in implantodontology. **Int. J. Polym. Mater.** v. 65, n. 13, p. 647-652, 2016.

OSHIRO, J. A.; SATO, M. R.; SCARDUELI, C. R.; OLIVEIRA, G. J.; ABUÇAFY, M. P.; CHORILLI, M. Bioactive Molecule-loaded Drug Delivery Systems to Optimize Bone Tissue Repair. **Curr Protein Pept Sci.**, v. 18, n. 12, 2017.

PANSERI, S.; RUSSO, L.; MONTESI, M.; TARABALLI, F.; CUNHA, C.; MARACCI, M.; CIPOLLA, L. Bioactivity of surface tethered Osteogenic Growth Peptide motifs. **RS Chem.**, v. 5, p. 899-903, 2014.

PAREDES, M.; PULCINELLI, S.H.; PENICHE, C.; GONÇALVES, V.; SANTILLI, C.V. Chitosan/(ureasil-PEO hybrid) blend for drug delivery. **J Sol-Gel Sci Technol.**, n. 72. P. 233-238, 2014.

PARK, Y, J.; LEE, Y. M.; LEE, J. Y.; SEOL, Y. J.; CHUNG, C. P.; LEE, S. J. Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. **J Control Rel** ., v, 67 p, 385–394, 2000.

PARK, Y, J.; KIM, K. H.; LEE, J. Y.; KU, Y.; LEE, S. J.; MIN, B. M.; CHUNG, C. P. Immobilization of bone morphogenetic protein-2 on nanofibrous chitosan membrane for enhanced guided bone regeneration. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 43, p. 17–24, 2006.

PATEL, N.R. Itraconazole loaded poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for improved antifungal activity. Thesis Master, 2007, 1-98.

PEPPAS, N.A.; HILT, J.Z.; KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. **Adv. Mater.**, v. 18, n. 11, p. 1345-1360, 2006.

PEREIRA, N. S.; SOUZA, L. R. B.; SOARES, L. C.; SANTOS, I. M. S. P.; ARAUJO, K. S. Regeneração óssea guiada utilizando membrana reabsorvível fixada com etilcianocrilato. **Rev. Bras. Odontol.**, v.69, n. 1, p. 39-42, 2012.

PHILIP, G.; SCHIMIDT, H. New materials for contact lenses prepared from Si-and Ti-alkoxides by the sol-gel process. **J Non-Cryst Solids.**, v.63, p.283-292,1984.

PIATTELLI, A .; SCARANO, A .; RUSSO, P.; MARATASSO, S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. **Biomaterials**, v.17, n.8, p.791-796, 1996.

PFISTER, W.R. **Transdermal and Dermal Therapeutic Systems. Transdermal and topical drug delivery system**. Buffalo Grove: Interpharm Press, 1997. p. 33-112.

PIGOSSI, S.C.; OLIVEIRA, G.J.P.L.; FINOTI, L.S.; NEPOMUCENO, R.; SPOLIDORIO, L.C.; ROSSA-JR, C.; RIBEIRO, S.J.L.; SASKA, S.; SCAREL-CARMINAGA, R.M. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. **Soc Biomater.**, p. 3397-3406, 2015.

PIŞKIN, E, et al. In vivo performance of simvastatin-loaded electrospun spiral wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 90, p. 1137-1151, 2009.

POLICASTRO, G. M.; BECKER, M. L. Osteogenic growth peptide and its use as a bio-conjugate in regenerative medicine applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomed Nanobiotechnol.*, v. 8, n. 3, p. 449-464, 2015.

POPAT, A.; LIU, J.; QING, G.; QIAO, S.Z. A pH-responsive drug delivery system based on chitosan coated mesoporous silica nanoparticles. **J. Mater. Chem.**, v. 22, p. 11173, 2012.

QUINONES, C.R. CAFFESSE, RG. Current status of guided periodontal tissue regeneration. **Periodontology**. 2000, Copenhagen, v. 9, p.55-68, 1995

RADINA, S.; FALAIZEA, S.; LEEA, M.H.; DUCHEYNEA, P. In vitro bioactivity and degradation behavior of silica xerogels intended as controlled release materials. **Biomaterials**, v. 23, n. 15, p. 3113-3122, 2002.

REKONDO, A.; FERNANDEZ-BERRIDI, M.; IRUSTA, L. Photooxidation and stabilization of silanised poly (ether-urethane) hybrid systems. **J. Eur. Pol.**, v. 42, n. 9, p. 2069-2080, 2006.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, Á.S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mater Res.**, n.6, p. 317-320, 2003.

RUSSELL, R.G.G.; ROGERS, M.J. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. **Bone.**, v. 25, n. 1, p. 97-106, 1999.

SANCHEZ, C.; JULIÁN, B.; BELLEVILLE, P.; POPALL, M. Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites. **J. Mater. Chem.**, v. 15, p. 3559-3592, 2005.

SANCHEZ, L.; MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; VINARDELL, M. P. Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability. **Toxicol Lett.**, v. 161, p. 53-60, 2006.

SANDBERG, E.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. **J. Oral. Maxillo. Fac. Surg.**, v.51, p.1106-114, 1993.

SAN-MIGUEL, S.M.; NAMDAR-ATTAR, M.; NOH, T.; FRENKEL, B.; BAB, I. ERK1/2-activated de Novo Mapkapk2 Synthesis Is Essential for Osteogenic Growth Peptide Mitogenic Signaling in Osteoblastic Cells. **J Biol Chem.**, v. 280, n. 45, p. 37495–37502, 2005.

SANTILLI, C. V.; CHIAVACCI, L. A.; LOPES, L.; PULCINELLI, S. H.; OLIVEIRA, A. G. Controlled drug release from ureasil-polyether hybrid materials. **Chem. Mater.**, v. 21, p. 463-467, 2009.

SASKA, S.; SCAREL-CARMINAGA, R.G.; TEIXEIRA, L.N.; FRANCHI, L.P.; SANTOS, R.A.; GASPAR-MINARELLI, A.M.; OLIVEIRA, P.T.; ROSA, A.R.; TAKAHASHI, C.T.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L.; MARCHETTOO, R. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. **J Mater Sci: Mater Med.**, v. 23, p. 2253–2266, 2012.

SELIGSHOHN, U. Factor XI in Hemostasis and Thrombosis: Past, Present and Future. **Thromb Haemost**, v. 98, p. 84 – 89. 2007.

SHIM, J. H.; YOON, M. C.; JEONG, C. M.; JANG, J.; JEONG, S. I.; CHO, D. W.; HUH, J. B. Efficacy of rhBMP-2 loaded PCL/PLGA/ β -TCP guided bone regeneration membrane fabricated by 3D printing technology for reconstruction of calvaria defects in rabbit. **Biomed Mater.**, v. 9, n. 6, p. 1-9, 2014.

SILVA, V.P.R.; SILVA, G.G.; CALIMAN, V.; RIEUMONT, J.; MIRANDA-PINTO, C.O. B.; ARCHANJO, B.S.; NEVES, B.R.A. Morphology, crystalline structure and thermal properties of PEO/MEEP blends. **Eur. Pol. J.**, v. 43, n. 8, p. 3283-3291, 2007.

SCHMOLKA, I.R. Poloxamers in the pharmaceutical industry. In: TARCHA, P. J. (Ed.). **Polymers for controlled drug delivery**. New York: CRC Press, 1991. p. 189-214.

SCHOEDER, I.Z., FRANKE, P., SCHAEFER, U.F., LEHR, C. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 65, p. 111-121, 2006.

SCHOTTNER, G. Hybrid Sol–Gel-Derived Polymers: Applications of Multifunctional Materials. **Chem. Mater.**, v. 13, n. 10, p. 3422-3435, 2001.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **J. Control. Release.**, n. 70, p. 1-20, 2001.

SOUZA, L.K.; BRUNO, C.H.; LOPES, L.; PULCINELLI, S.H.; SANTILLI, C.V.; CHIAVACCI, L.A. Ureasil-polyether hybrid film-forming materials. **Colloids Surf B: Biointerfaces.**, v. 101, p. 156-161, 2013.

SPIELMANN, H.; BALLS, M.; DUPUIS, J.; PAPE, W.J.; PECHOVITCH, G.; SILVA, O.; HOLZHUTTER, H.G.; DESOLLE, P.; GERBERICK, F.; LIEBSCH, M.; LOVELL, W.W.; MAURER, T.; PFANNENBECKER, U.; POTTHAST, J.M.; CSATO, M.; SLADOWSKI, D.; STEILING, W.; BRANTOM, P. The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study results of phase II (blind trial). Part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. **Toxicol. In Vitro.**, n. 12, p. 305–327, 1998.

SPREAFICO, A.; FREDIANI, B.; CAPPERUCCI, C.; LEONINI, A.; GAMBERA, D.; FERRATA, P.; ROSINI, S.; STEFANO, A.D.; GALEAZZI, M.; MARCOLONGO, R. Osteogenic Growth Peptide Effects on Primary Human Osteoblast Cultures: Potential Relevance for the Treatment of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. **J Cell Biochem.**, n. 98, p., 1007–1020, 2006.

STAKLEFF, K.S.; LIN, F.; CALLAHAN, L.A.S.; WADE, M.B.; ESTERLE, A.; MILLER, J.; GRAHAM, M.; BECKER, M.L.. Resorbable, amino acid-based poly(ester urea)s crosslinked with osteogenic growth peptide with enhanced mechanical properties and bioactivity. **Acta Biomater.**, v. 9, n. 5132–5142, 2009.

SUMMERS, B. N.; EISENSTEIN, S. M. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. **J. Bone. Joint. Surg.**, v. 71, p. 677-680, 1989.

SUN, Y.Q.; ASHHURST, D.E. OSTEOGENIC GROWTH PEPTIDE ENHANCES THE RATE OF FRACTURE HEALING IN RABBITS. **Cell Biol. Int.**, v. 22, n. 4, p. 313-319, 1998.

TORCHILIN, V.P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **J. Control. Release.**, v. 73, n. 2-3, p. 137-172, 2001.

TRIPPLET, R.G.; SCHOW, S.R. Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. **J. Oral Maxillofac Surg.**, v. 54, n. 4, p. 486-494, 1996.

- TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules. **Injury**, v. 38, p. S11-S25, 2007.
- USKOKOVIC, D.; STEVANOVIC, M. Poly(lactide-co-glycolide)-based micro and nanoparticles for the controlled drug delivery of vitamins. **Curr. Nanosci.**, v. 5, p. 5-14, 2009.
- VALLET-REGI, M.; COLLILAAB, M.; GONZALES, B. Medical applications of organic–inorganic hybrid materials within the field of silica-based bioceramics. **Chem. Soc. Rev.**, n. 40, p. 596-607, 2011.
- VAN-DIJK, M. A.; VAN DEN BERG, R. Ordering Phenomena in Thin Block Copolymer Films Studied Using Atomic Force Microscopy. **Macromolecules.**, v. 28, p. 6773-6778, 1995.
- VELDMAN, A.H.M.; EHRENFORTH, S. New Insights into the Coagulation System and Implications for New Therapeutic Options with Recombinant Factor VIIa. **Curr Med Chem.**, v. 10, p. 797 – 811, 2003.
- VENDRUSCOLO, C.W.; ANDREAZZ, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T.M.B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **Int. J. PHarm.**, v. 296, n. 1-2, p. 1-11, 2005.
- XUE, J.M.; SHI, M. PLGA/mesoporous silica hybrid structure for controlled drug release. **J Control Rel.** n. 98, p. 209-217, 2004.
- WANG, J.; WANG, L.; ZHOU, Z.; LAI, H.; XU, P.; LIAO, L.; WEI, J. Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. **Polymers.** n. 8, p. 115, 2016.
- WAN, X.; WANG, D.; LIU, S. Fluorescent pH-Sensing organic/Inorganic Hybrid Mesoporous Silica Nanoparticles with Tunable Redox-Responsive Release Capability. **Langmuir.**, n.26, v. 19, p. 15574-15579, 2010.
- WECHSLER, S.; FEHR, D.; MOLENBERG, A.; RAEBER, G.; SCHENSE, J.C.; WEBER, F.E. A novel, tissue occlusive poly(ethylene glycol) hydrogel material. **J Biomed Mater Res Part A.**, n. 85, p.285-292, 2008.
- WHITE, J.; TURNBULL, A. Weathering of polymers: mechanisms of degradation and stabilization, testing strategies and modelling. **J Mater Sci.** n. 29, p. 584-613, 1994.
- WU, A.C.; RAGGATT, L.J.; ALEXANDER, K.A.; PETTIT, A.R. Unraveling macrophage contributions to bone repair, **Bonekey Rep.** 2 (2013) 373.
- WUA, J.; WEIA, W.; WANGA, L.; SUA, Z.; M, G. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. **Biomaterials.**, n. 28, v. 13, p. 2220-2232, 2007.

ZHANG, F.; ZHANG, T.; YANG, XI.; ZHANG, LONG.; LENG, KAI.; HUANG, YI.; CHEN, Y.S. A high-performance supercapacitor-battery hybrid energy storage device based on graphene-enhanced electrode materials with ultrahigh energy density. **Energy Environ. Sci.**, v. 2, p. 1623, 2013.

ZHAO, Y.; MODDARESI, M.; JONES, S.A.; BROWN, M.B. A dynamic topical hydrofluoroalkane foam to induce nanoparticle modification and drug release in situ. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, n. 72, p. 512-528, 2009.

ZHIQ, I.L.; GAO, W.; HU, H.X.; MA, K.; HE, B.; DAI, W.; WANG, X.I.; WANG, J.C.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Novel thermo-sensitive hydrogel system with paclitaxel nanocrystals: High drug-loading, sustained drug release and extended local retention guaranteeing better efficacy and lower toxicity. **J Control Rel.** n. 174, p. 161-170, 2014.

Anexo 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 17/2012

Araraquara, 14 de Setembro de 2012

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 14/09/2012, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Estudo histológico do comportamento biológico de um polímero híbrido orgânico-inorgânico (polioxietileno e polioxipropileno) em diferentes proporções" (Proc. CEUA nº 17/2012) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para DEZEMBRO/2014.

Atenciosamente,


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

À

Prof. Dr^a. ROSEMARY ADRIANA CHIÉRICI MARCANTONIO
DD. Pesquisadora Responsável
a/c João Augusto O. Junior e Luiz Guilherme F. de Paula
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA
Rua Humaitá n° 1.680 - Centro - CEP 14891-903 - Caixa Postal n° 331 - ARARAQUARA - SP
5º andar - fone (16) 3301-6431/6432 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: diretor@cear.unesp.br - home page: <http://www.foc.unesp.br>

Perspectivas

Tendo em vista os resultados promissores obtidos, como proposta para estudos futuros utilizando as membranas ureasil-políeter, pode-se citar:

- Realizar ensaio de bioatividade pelo protocolo estático, uma vez que materiais contendo grupamentos silanois atuam como sítios de nucleação para o crescimento de cristais de hidroxiapatita, nessa apatita formada, osteoblastos podem se aderir, crescer e se proliferar.
- Avaliar a neoformação óssea in vivo das membranas contendo o OGP em defeitos críticos.