

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 16/04/2021.

Felipe Azevedo Borges

Desenvolvimento de uma membrana de látex natural e alginato para regeneração óssea

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

Orientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

Araraquara - SP
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

B732d Borges, Felipe Azevedo
Desenvolvimento de uma membrana de látex natural e
alginato para regeneração óssea / Felipe Azevedo Borges. –
Araraquara : [s.n.], 2019
115 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano
Coorientador: Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

1. Látex. 2. Alginatos. 3. Substâncias de crescimento.
4. Materiais biomédicos. 5. Regeneração óssea. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento de uma membrana de látex natural e alginato para regeneração óssea"

AUTOR: FELIPE AZEVEDO BORGES

ORIENTADOR: RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

COORIENTADOR: GUILHERME JOSÉ PIMENTEL LOPES DE OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. TICIANA SIDORENKO DE OLIVEIRA CAPOTE

Departamento de Morfologia / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD

Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia / Universidade de Araraquara - UNIARA - Araraquara


Prof. Dr. GUILHERME FERREIRA CAETANO

Centro Universitário Herminio Ometto de Araras / UNIARARAS - ARARAS

Araraquara, 16 de abril de 2019

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Felipe Azevedo Borges

Nome em citações bibliográficas: Borges, FA; Borges, F A; Borges, F. A.; BORGES, FA; BORGES, F A; BORGES, F. A.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 - s/n

Campos Ville

14800903 - Araraquara, SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2008/2012** Graduação e Licenciatura em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.
Título: Análise da incorporação e liberação do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando biomembranas de látex natural como suporte.
Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano.
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
- 2012/2015** Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
Título: Aplicação da biomembrana de látex natural (NRL) para cultura de células osteogênicas
Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano.
Coorientadora: Karina Alves de Toledo.
Bolsista do: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- 2015/2019** Doutorado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano.
Coorientador: Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

ZANCANELA, D. C.; FUNARI, C. S.; HERCULANO, R. D.; MELLO, V. M.; RODRIGUES, C. M.; **BORGES, F. A.**; BARROS, N. R.; MARCOR, M. C.; ALMEIDA, A. M. F.; GUASTALDI, A. C. (2019). Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviours. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 576-582.

MARCELINO, M. Y.; **BORGES, F. A.**; COSTA, A. F. M.; SINGULANI, J. L.; RIBEIRO, N. V.; COSTA-ORLANDI, C. B.; GARMS, B. C.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. (2018). Antifungal activity of fluconazole-loaded natural rubber latex against *Candida albicans*. *Future Microbiology*, 13(3), 359-367.

MIRANDA, M. C. R.; **BORGES, F. A.**; BARROS, N. R.; SANTOS FILHO, N. A.; MENDONÇA, R. J.; HERCULANO, R. D.; CILLI, E. M. (2018). Evaluation of peptides release using a natural rubber latex biomembrane as a carrier. *Amino Acids*, 50(5), 503-511.

CARVALHO, F. A.; UCHINA, H. S.; **BORGES, F. A.**; OYAFUSO, M. H.; HERCULANO, R. D.; GREMIÃO, M. P.; SANTOS, A. G. (2018). Natural membranes of *Hevea brasiliensis* latex as delivery system for *Casearia sylvestris* leaf components. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(1), 102-110.

BARROS, N. R.; HEREDIA-VIEIRA, S. C.; **BORGES, F. A.**; BENITES, N. M.; DOS REIS, C. E.; MIRANDA, M. C. R.; CARDOSO, C. A. L.; HERCULANO, R. D. (2018). Natural rubber latex biodevice as controlled release system for chronic wounds healing. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 4(3), 035026.

FLORIANO, J. F.; BOLOGNESI, L. F.; DE BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C.; **BORGES, F. A.**; CHAGAS, A. L. D.; PAULINO, C. G.; GARMS, B. C.; YONASHIRO, M. M.; PEREIRA, J. A. S.; SANTOS, A. G.; NORBERTO, A. M. Q.; GRAEFF, C. F. O.; HERCULANO, R. D. (2018). Physical, Chemical and Biological Characterization of Natural Rubber Latex Membranes Loaded with *Cordia verbenacea* DC. Extract. *Current Traditional Medicine*, 4(2), 140-154.

BORGES, F. A.; DE BARROS, N. R.; GARMS, B. C.; MIRANDA, M. C. R.; GEMEINDER, J. L. P.; RIBEIRO-PAES, J. T.; SILVA, R. F.; TOLEDO, K. A.; HERCULANO, R. D. (2017). Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(39), 45321.

GARMS, B. C.; **BORGES, F. A.**; SANTOS, R. E.; NIGOGHOSSIAN, K.; MIRANDA, M. C. R.; MIRANDA, I. U.; DALTRO, P.; SCARPARI, S. L.; GIAGIO, R. J.; BARROS, N. R.; ALARCON, K. M.; DRAGO, B. C.; GEMEINDER, J. L. P.; OLIVEIRA, B. H.; NASCIMENTO, V. M. G.; LOFFREDO, A. V.; HERCULANO, R. D. (2017).

Characterization and microbiological application of ciprofloxacin loaded in natural rubber latex membranes. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 15, 1-10.

FLORIANO, J. F.; DE BARROS, N. R.; CINMAN, J. L. F.; DA SILVA, R. G.; LOFFREDO, A. V.; **BORGES, F. A.**; NORBERTO, A. M. Q.; CHAGAR, A. L. D.; GARMS, B. C.; GRAEFF, A. F. O.; HERCULANO, R. D. (2018). Ketoprofen loaded in natural rubber latex transdermal patch for tendinitis treatment. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(6), 2281-2289.

Barros, N. R. D.; Miranda, M. C. R.; **BORGES, F. A.**; Gemeinder, J. L. P.; Mendonça, R. J. D.; Cilli, E. M.; Herculano, R. D. (2017). Natural rubber latex: development and in vitro characterization of a future transdermal patch for enuresis treatment. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66(17), 871-876.

MIRANDA, M. C. R.; PREZOTTI, F. G.; **BORGES, F. A.**; BARROS, N. R.; CURY, B. S. F.; HERCULANO, R. D.; CILLI, E. M. (2017). Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 28(18), 2117-2130.

ITO, S.; BARCHI, A. C.; ESCARAMBONI, B.; DE OLIVA NETO, P.; HERCULANO, R. D.; **BORGES, F. A.**; MIRANDA, M. C. R.; NUÑEZ, E. G. F. (2017). UV/Vis spectroscopy combined with chemometrics for monitoring solid-state fermentation with *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(10), 2563-2572.

FLORIANO, J. F.; NETO, F. C.; DA MOTA, L. S. L. S.; FURTADO, E. L.; FERREIRA, R. S.; BARRAVIERA, B.; GONÇALVES, P. J.; ALMEIDA, L. M.; **BORGES, F. A.**; HERCULANO, R. D.; OLIVEIRA GRAEFF, C. F. (2016). Comparative study of bone tissue accelerated regeneration by latex membranes from *Hevea brasiliensis* and *Hancornia speciosa*. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 2(4), 045007.

BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; **BORGES, F. A.**; DE MENDONÇA, R. J.; CILLI, E. M.; HERCULANO, R. D. (2016). Oxytocin sustained release using natural rubber latex membranes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 22(4), 435-444.

BARROS, N. R.; CHAGAS, P. A. M.; **BORGES, F. A.**; GEMEINDER, J. L. P.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; HERCULANO, R. D. (2015). Diclofenac potassium transdermal patches using natural rubber latex biomembranes as carrier. *Journal of Materials*, 2015.

BOLOGNESI, L. F. C.; **BORGES, F. A.**; CINMAN, J. L. F.; SILVA, R. G. D.; SANTOS, A. G. D.; HERCULANO, R. D. (2015). Natural latex films as carrier for *Casearia sylvestris* Swartz extract associated with ciprofloxacin. *American Chemical Science Journal*, 17-25.

BORGES, F. A.; FILHO, E. D. A.; MIRANDA, M. C. R.; DOS SANTOS, M. L.; HERCULANO, R. D.; GUASTALDI, A. C. (2015). Natural rubber latex coated with

calcium phosphate for biomedical application. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 26(17), 1256-1268.

BORGES, F. A.; Siguematsu, P. R.; Herculano, R. D.; Santos, C. (2016). Novel sustained-release of *Stryphnodendron obovatum* leaves extract using natural rubber latex as carrier. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 36(3).

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

MURBACH, H. D.; JAQUES OGAWA, G.; **BORGES, F. A.**; MIRANDA, R.; CARLOS, M.; LOPES, R.; BARROS, N. R.; MAZALLI, A. V. G.; SILVA, R. G.; CINMAN, J. L. F.; DRAGO, B. C.; HERCULANO, R. D. (2014). Ciprofloxacin release using natural rubber latex membranes as carrier. *International Journal of Biomaterials*, 2014.

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

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

BORGES, F. A.; BOLOGNESI, L. F. C.; TRECCO, A.; DRAGO, B. D. C.; ARRUDA, L. B. D.; LISBOA-FILHO, P. N.; PIERRI, E. G.; GRAEFF, C. F. O.; SANTOS, A. G.; MIRANDA, M. C. R.; HERCULANO, R. D. (2014). Natural rubber latex: study of a novel carrier for *Casearia sylvestris* Swartz delivery. *ISRN Polymer Science*.

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

Artigos aceitos para publicação

BARROS, N. R.; SANTOS, R. S.; MIRANDA, M. A. R.; **BORGES, F. A.** SCHIAVON, J. C.; MARQUES, R. F. C.; HERCULANO, R. D. NORBERTO, A. M. Q. Natural latex-glycerol dressing to reduce nipple pain and healing the skin in breastfeeding women. *Skin Research And Technology*, 2019.

GARMS, B. C.; **BORGES, F. A.**; BARROS, N. R.; MARCELINO, M. Y.; ARCO, M. C.; SALVADOR, S. L. S.; FRADE, M. A. C.; HERCULANO, R. D. Novel polymeric dressing to the treatment of infected chronic wound. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 2019.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

BORGES, F. A. XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2012.

ESTÁGIO DOCÊNCIA

Nanotecnologia de Materiais (2017) (curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP).

PRÊMIOS E TÍTULOS

2014 - Menção honrosa na área de Química de Produtos Naturais, XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil

2014 - Prêmio de melhor painel da área (Biomateriais metálicos, materiais nanoestruturados, recobrimentos, biomemética e microencapsulamento), 8th COLAOB

2013 - Menção honrosa no XIII Prêmio Carlos Roberto de Iniciação Científica, 16º ENBM (Encontro Nacional de Biomedicina)

2012 - 1º Lugar em Apresentação de Painel, Biotec Júnior da UNESP Assis

SUPERVISÃO ACADÊMICA

Mariana Biondi Cesar. Desenvolvimento e caracterização de uma nova blenda polimérica (látex natural/ácido polilático) para aplicação biomédica. 2016/2018. Iniciação científica (Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia)

Lucas Correa de Moraes. Materiais nanoestruturados: Aplicações na agricultura. Início: 2017. Iniciação científica (Graduando em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia)

Rafael Brull Tuma. Avaliação da liberação sustentada de fosfato de cálcio bifásico (HAP e beta-TCP) empregando membranas de látex natural (Hevea Brasiliensis) como suporte. 2018. Iniciação científica (Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia).

Beatriz Tiemi Morise. Desenvolvimento e caracterização físico, química e biológica das membranas de látex carregadas com escopolamina para tratamento da sialorréia. 2018. Iniciação científica (Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia).

Letícia Crippa Asenha. Desenvolvimento de nanocompósitos magnéticos para tratamento oncológico. 2019. Iniciação científica (Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia).

BANCA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO:

Larissa Traina. Development of EBC-46 loaded PLGA and MCM-41 nanoparticles. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Nicola Carlucci Sato. Avaliação da liberação controlada do metronidazol incorporado em nanopartículas de prata para tratamento dérmico empregando membranas de látex natural como suporte. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Marcelo Seiji Yamanaka. Avaliação da liberação sustentada de derivados do ácido protocatecúico empregando membranas de látex como carreador. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Luis Felipe Cesar Bolognesi. Caracterização da liberação sustentada do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz associado à ciprofloxacina empregando películas de látex natural como carreador. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – campus de Assis.

Luis Otávio Baggio. Avaliação da liberação controlada nanopartículas de ouro empregando membranas de látex natural como carreador. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – campus de Assis.

Beatriz Tiemi Morise. Desenvolvimento e caracterização de membranas de látex carregadas com escopolamina para tratamento da sialorréia. 2019. Trabalho de conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – campus de Araraquara.

Mariana Biondi Cesar. Desenvolvimento e caracterização de uma nova blenda polimérica (látex natural/ácido polilático) para aplicação biomédica. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – campus de Araraquara.

dedico este trabalho
de modo especial, à minha família

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador Professor Rondinelli Donizetti Herculano, por ter confiado em mim desde a graduação.

Às agências de fomento CNPq, FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao professor Alvaro Antonio Alencar de Queiroz pela realização das análises térmicas no Laboratório de Alta Tensão Professor Manuel Luís Barreira Martinez (LAT-EFEI), Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI).

Ao professor Miguel Jafelicci Junior e ao Dr. Rodolfo Debone Piazza pela análise de ângulo de contato no Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides, do Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Aos que me auxiliaram com os experimentos *in vivo*, os professores Ana Maria Minarelli Gaspar, Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira, Suzane Cristina Pigossi, Joni Augusto Cirelli, à doutoranda Mariana Aline Cominotte e aos técnicos Claudia e Pedro.

Ao Grupo de Bioengenharia e Biomateriais e ao Núcleo de Proteômica pela infraestrutura fornecida (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP).

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP) e à Ma. Luana Elis Sabino pelo Equipamento Scanner de Microtomografia Computadorizado *In vivo* – Sky Scan.

Ao Laboratório de Ensaios Mecânicos da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP) pela disponibilidade de utilização da máquina universal de ensaios (EMIC DL2000).

Ao laboratório Laboratório de Microscopia Avançada (LMA-IQ, Instituto de Química de Araraquara, UNESP) pela disponibilidade de utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV-FEG).

Aos funcionários da Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química (UNESP).

Aos colegas de laboratório.

Às repúblicas Balaio de Gato e Alambik por terem sido meu lar em Araraquara.

À minha família, por todo apoio.

“Quando a vida te decepciona, qual é a solução?
Continue a nadar! Continue a nadar!
Continue a nadar, nadar, nadar!
Para achar a solução, nadar, nadar! ”

PROCURANDO Nemo. Direção: Andrew Stanton,
Produção: Graham Walters. Califórnia (EUA): Pixar
Animation Studios, 2003.1 DVD.

RESUMO

O látex natural extraído da *Hevea brasiliensis* apresenta atividade angiogênica, sendo empregado como próteses vasculares, suporte para osteoblastos, nanopartículas síntese, liberação de compostos, regeneração tecidual. Além disso, também tem sido utilizada como uma barreira para regeneração óssea guiada, dificultando invasão por células não osteogênicas na lesão óssea. O alginato é biocompatível, biodegradável, hidrofílico, e possui a capacidade de ativar macrófagos, auxiliando no processo de cicatrização e reepitelização do tecido. O PDGF-BB é um fator de crescimento que apresenta atividade angiogênica, mitogênica e quimiotática. Desta forma, este trabalho visou produzir, caracterizar e empregar blendas de látex e alginato (em diferentes proporções, com e sem reticulação por cálcio) para uso na regeneração óssea guiada. Os resultados mostraram que as blendas foram homogêneas, sem separação de fase, com superfície densa e sem porosidade. A adição de alginato, melhorou a hidrofiliabilidade da membrana de látex, segundo o intumescimento, ângulo de contato e permeação ao vapor de água. O alginato aumentou as propriedades mecânicas de tração do látex proporcional à adição de alginato, aumentando a tensão de ruptura de 0,88 MPa para até 16,46 MPa, e reduzindo o alongamento de 10,8 mm/mm para 1,5 mm/mm, assim como também aumentou sua degradação *in vitro* (de aproximadamente 1% para o látex natural, para 10% para membrana com 16% de alginato). As blendas não apresentaram efeito hemolítico (valores abaixo de 5%) nem citotóxico, proporcionando aumento da viabilidade da linhagem MC3T3-E1 de até 140%, conforme a proporção utilizada. Porém, ao ser utilizada em modelo de defeito na calvária de ratos, não foi encontrada diferença na regeneração óssea entre o controle, a membrana ou a membrana acrescida do fator de crescimento PDGF-BB.

PALAVRAS-CHAVE: Látex. Alginato. Blenda polimérica. PDGF-BB. Regeneração óssea. Biomaterial. Membrana.

ABSTRACT

The natural latex extracted from *Hevea brasiliensis* presents angiogenic activity, being used as vascular prostheses, support for osteoblasts, nanoparticles synthesis, release of compounds, tissue regeneration. In addition, it has also been used as a barrier to guided bone regeneration, difficulting the invasion by non-osteogenic cells in the bone lesion. The alginate is biocompatible, biodegradable, hydrophilic, and has the ability to activate macrophages, aiding in the healing process and tissue re-epithelization. PDGF-BB is a growth factor that presents angiogenic, mitogenic and chemotactic activity. In this way, this work aimed to produce, characterize and apply latex and alginate blends (in different proportions, with and without calcium crosslinking) for use in guided bone regeneration. The results showed that the blends were homogeneous, without phase separation, with a dense surface and no porosity. The addition of alginate improved the hydrophilicity of the latex membrane, according to swelling, contact angle and permeation to water vapor. Alginate increased the mechanical properties of the latex proportional to the addition of alginate, increasing the tensile strength from 0.88 MPa to up to 16.46 MPa, and reducing the elongation from 10.8 mm/mm to 1.5 mm/mm, as well as increased *in vitro* degradation (from about 1% for natural rubber latex to 10% for membrane with 16% alginate). The blends did not present a hemolytic effect (values below 5%) or cytotoxic, increasing the viability of the MC3T3-E1 lineage up to 140%, according to the proportion used. However, when used in a model of defect in rat calvaria, no difference was found in bone regeneration between the control, the membrane or the membrane plus the PDGF-BB growth factor.

KEYWORDS: Latex. Alginate. Polymer blend. PDGF-BB. Bone regeneration. Biomaterial. Membrane.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do <i>cis</i> -1,4-isopreno.	25
Figura 2 – Angiogênese observada na região delimitada em decorrência do uso do látex natural em modelo de membrana corialantóide.	26
Figura 3 – Estrutura química do alginato e sua reticulação com cálcio.	28
Figura 4 – Tipos celulares presentes no osso, e sua participação no evento de regeneração óssea.	30
Figura 5 – Representação da hierarquia de organização do osso.	31
Figura 6 – Evolução do reparo ósseo em defeito crítico em calvária ao longo do tempo (da esquerda para direita) exemplificando a regeneração centrípeta (das margens para o centro).	32
Figura 7 – Regeneração óssea guiada: a) ilustração mostrando a separação dos tecidos, b) aplicação da membrana de látex na regeneração óssea guiada.	33
Figura 8 – Regeneração óssea pela aplicação do fator de crescimento: a) aplicação do PDGF-BB, b) controle.	34
Figura 9 – Imagem representativa do teste de hemólise por contato direto. As setas pretas indicam a localização das membranas (látex à esquerda e alginato reticulado à direita), os asteriscos amarelos mostram a presença das hemácias, retângulo indica o sobrenadante com hemólise.	45
Figura 10 – Cirurgia para criação do defeito na calvária: a) remoção da porção da calota cortada, b) recuperação pós-cirúrgica em decúbito lateral.	49
Figura 11 – Análise da regeneração óssea por MicroCT: a) suporte para imobilizar as amostras, b) equipamento de microCT Skyscan 1176.	51
Figura 12 – Micrografia da morfologia superficial a partir do MEV sob ampliação 1000x das membranas: a) 1, b) 1C, c) 2, d) 2C, e) 3, f) 3C, g) 4, h) 4C, i) A, j) AC e k) L.	53
Figura 13 – Análise por MEV-EDS sob ampliação de 300x: a) micrografia por MEV da membrana 4, b) micrografia por MEV da membrana 4C, c) micrografia por EDS da membrana 4, d) micrografia por EDS da membrana 4C, e) EDS da membrana 4, f) EDS da membrana 4C.	56
Figura 14 – Espectro de FTIR do polímero <i>cis</i> -isopreno (azul) e das membranas de alginato (vermelho), alginato reticulado com cálcio (verde) e látex natural (preto).	58
Figura 15 – Espectro de FTIR das blendas com diferentes proporções de alginato: a) sem reticulação, b) com reticulação.	59
Figura 16 – Gráfico da tensão versus deformação da resistência mecânica à tração das membranas em diferentes proporções.	61
Figura 17 – Curva termogravimétrica em atmosfera de nitrogênio das membranas dos polímeros puros e das blendas: a) não reticuladas, b) reticuladas com cloreto de cálcio.	63
Figura 18 – Curva termogravimétrica derivada das membranas dos polímeros puros e das blendas: a) não reticuladas, b) reticuladas com cloreto de cálcio.	65
Figura 19 – Curva de calorimetria exploratória diferencial em atmosfera de nitrogênio, exemplificando os ciclos de aquecimento e resfriamento da membrana de látex. Pico endotérmico para baixo.	66

Figura 20 – Curva de calorimetria em atmosfera de exploratória diferencial em atmosfera de nitrogênio dos polímeros puros e das blendas: a) não reticuladas, b) reticuladas com cloreto de cálcio. Pico endotérmico para baixo.	67
Figura 21 – Micrografias representativas do ângulo de contato da gota de água destilada (17 µL) na superfície dos materiais: a) L, b) A, c) AC, d) 1, e) 2, f) 3, g) 4, h), 1C, i) 2C, j) 3C e k) 4C.	70
Figura 22 – Cinética de intumescimento das membranas realizado em c-SBF por 5 dias.	72
Figura 23 – Gráfico apresentando o tempo em que as diferentes membranas apresentaram o intumescimento máximo.	72
Figura 24 – Variação da massa durante a degradação.	76
Figura 25 – Variação do módulo de Young nos durante a degradação.	77
Figura 26 – Variação do alongamento durante a degradação.	78
Figura 27 – Variação da tensão de ruptura durante a degradação.	79
Figura 28 – Espectro de FTIR da degradação em c-SBF nos tempos 0 e 30 dias. As amostras foram normalizadas em 835 cm ⁻¹ . A seta indica a principal região alterada na degradação relacionada à oxidação.	81
Figura 29 – Micrografia por MEV sob diferentes ampliações das células aderidas na superfície das membranas: a) vidro, 300x, b) 2C, 1000x, c) 3, 1000x, d) 3C, 1000x, e) 4, 300x, f) 4C, 300x, g) A, 1000x, h) L, 1000x.	85
Figura 30 – Proliferação celular por resazurina. Placa controle sem a presença de célula, apenas com as membranas.	87
Figura 31 – Análise da adesão celular por MTT: a) visão geral das amostras, b) foco na membrana de látex, c) micrografia da membrana de látex por microscopia óptica (40x), d) micrografia por microscópio óptico (40x) da membrana de alginato com cálcio. A seta indica as células.	89
Figura 32 – Ensaio de citotoxicidade por contato direto: a) representação do teste, b) revelação por MTT, onde nota-se formação de halo de ausência celular. A seta indica o local da formação do halo de ausência celular.	90
Figura 33 – Gráfico da citotoxicidade por contato direto pela técnica de MTT em 24, 48 e 72 horas.	92
Figura 34 – Redução dos espécimes, parte superior do crânio onde foi realizada a cirurgia. Seta vermelha indica a área do defeito crítico, setas pretas indicam a presença da membrana.	94
Figura 35 – Reconstrução representativa da regeneração óssea por MicroCT: a) controle, 15 dias, b) controle, 60 dias, c) membrana, 15 dias, d) membrana, 60 dias, e) membrana+PDGF, 15 dias, f) membrana+PDGF, 60 dias.	95
Figura 36 – Parâmetros morfométricos obtidos pelo MicroCT: a) BV, b) BS, c) BV/TV, d) BS/BV, e) BS/TV.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Abreviação dos materiais elaborados assim como as respectivas composições mássicas.	38
Tabela 2 – Valores médios das propriedades mecânicas do teste de tração das membranas.	60
Tabela 3 – Medidas do ângulo de contato (média \pm desvio padrão) a partir da técnica de gota séssil.	69
Tabela 4 – Permeabilidade ao vapor de água pela técnica de dessecante.	74
Tabela 5 – Hemólise (%) <i>in vitro</i> por contato direto.	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Especificações físico-químicas do látex natural utilizado fornecido pela empresa BDF.	37
--	----

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Tensão	40
Equação 2 – Alongamento	40
Equação 3 – Módulo de Young	41
Equação 4 – Intumescimento	42
Equação 5 – Permeabilidade ao vapor de água	43
Equação 6 – Perda de massa	44
Equação 7 – Hemólise	45
Equação 8 – Viabilidade celular	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	área
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATR	Refletância Total Atenuada
BMP	proteína morfogenética óssea
BS	área de superfície óssea
BV	volume do tecido ósseo
CAM	membrana corialantóide
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	controle negativo
CP	controle positivo
c-SBF	fluido corporal simulado
DO	densidade óptica
DO _a	densidade óptica da amostra
DO _{CN}	densidade óptica do controle negativo
DO _{CP}	densidade óptica do controle positivo
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	termogravimetria derivada
e	espessura da membrana
EDS	Energia Dispersiva de Raio-X
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Endo	endotérmico
EUA	Estados unidos da América
F	força
FBS	Soro Bovino Fetal
FCFAr	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FEG	Canhão de Emissão por Campo
FOAr	Faculdade de Odontologia de Araraquara
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
IGF	fator de crescimento semelhantes à insulina
ISO	International Standard Organization

<i>L</i>	comprimento final
<i>L₀</i>	comprimento inicial
LTDA	limitada
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
<i>mf</i>	massa final hidratada
<i>mi</i>	massa inicial seca
MicroCT	Microtomografia Computadorizada de Raios X
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium
PBS	tampão fosfato
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PLGA	poli ácido láctico-co-ácido glicólico
PTFE	politetrafluoretileno
PVA	álcool polivinílico
ROI	região de interesse
<i>S</i>	pressão de saturação de vapor de água
SP	São Paulo
<i>t</i>	tempo
TG	Termogravimetria
<i>T_g</i>	transição vítrea
TGF	fator de crescimento transformador
TV	volume do tecido
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV	ultravioleta
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
VOI	volume de interesse
α-MEM	Meio Mínimo Essencial Alfa
Δm	variação da massa
ΔRU	diferença de umidade relativa

Outros significados:

MC3T3-E1	linhagem celular pré-osteoblástica
1	blenda 4,76% de alginato sem reticulação
2	blenda 9,09% de alginato sem reticulação

3	blenda 13,04% de alginato sem reticulação
4	blenda 16,67% de alginato sem reticulação
L	membrana de látex natural
A	membrana de alginato sem reticulação
1C	blenda 4,76% de alginato sem reticulação
2C	blenda 9,09% de alginato sem reticulação
3C	blenda 13,04% de alginato sem reticulação
4C	blenda 16,67% de alginato sem reticulação
AC	membrana de alginato com reticulação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	LÁTEX NATURAL DA SERINGUEIRA	25
1.2	ALGINATO DE SÓDIO	27
1.3	TECIDO ÓSSEO	29
1.4	FATOR DE CRESCIMENTO (PDGF-BB)	33
2	OBJETIVOS	36
2.1	OBJETIVOS GERAIS	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	CONFECÇÃO DAS MEMBRANAS	37
3.2	CARACTERIZAÇÃO	39
3.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39
3.2.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em Modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)	40
3.2.3	Resistência mecânica à tração	40
3.2.4	Termogravimetria (TG)	41
3.2.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	41
3.2.6	Ângulo de contato (molhabilidade)	42
3.2.7	Intumescimento	42
3.2.8	Permeabilidade ao vapor de água	43
3.2.9	Degradação <i>in vitro</i> em fluido simulado	43
3.2.10	Caracterização <i>in vitro</i> em modelos celulares	44
3.2.10.1	<i>Hemólise</i>	44
3.2.10.2	<i>Cultivo celular</i>	45
3.2.10.2.1	<u>Adesão e morfologia celular</u>	46
3.2.10.2.2	<u>Proliferação celular</u>	46
3.2.10.2.3	<u>Citotoxicidade</u>	47
3.3	APLICAÇÃO <i>IN VIVO</i> EM MODELO DE DEFEITO DE CALVÁRIA	48
3.3.1	Cuidado animal	48
3.3.2	Cirurgia	48
3.3.3	MicroCT	50
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	52
4.2	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER EM MODO DE REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)	57
4.3	RESISTÊNCIA MECÂNICA À TRAÇÃO	60
4.4	TERMOGRAVIMETRIA (TG)	62
4.5	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	66
4.6	ÂNGULO DE CONTATO (MOLHABILIDADE)	68
4.7	INTUMESCIMENTO	71
4.8	PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA	73
4.9	DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i> EM FLUÍDO SIMULADO	75
4.10	CARACTERIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	84
4.10.1	Hemólise	84
4.10.2	Adesão e morfologia celular	85
4.10.3	Proliferação celular	87
4.10.4	Citotoxicidade	90
4.11	APLICAÇÃO <i>IN VIVO</i> EM MODELO DE DEFEITO DE CALVÁRIA	93
5	CONCLUSÃO	100
6	PERSPECTIVAS	101
	REFERÊNCIAS	102
	APENDICE A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	115

1 INTRODUÇÃO

As falhas ósseas podem ter origem em diferentes etiologias, como acidente de trânsito, arma de fogo, esporte de risco, além de casos onde é necessária a reposição óssea ou estímulo de sua formação como em retiradas de tumores, revisão de artroplastia, cirurgia craniofacial, implantodontia, entre outras (ZABEU et al., 2008).

Nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de 7,9 milhões de pacientes apresentam fraturas anualmente, onde 10% exibem uma cicatrização comprometida. Em 2006, foram gastos 500 milhões de dólares somente em tratamentos para estímulo do crescimento ósseo (FELDSTEIN et al., 2012). Além disso, nos EUA ocorreram cerca de 2 milhões de fraturas relacionadas com osteoporose em 2005, com custo de 17 bilhões de dólares, com projeções de crescimento de 50% até 2025 (WU et al., 2013).

No Brasil, as fraturas têm se mostrado um dos principais motivos de afastamento pelo Instituto Nacional de Seguridade Social, pois, 6 das 20 maiores causas de benefícios concedidos são relacionados às fraturas (com 99573 beneficiários). Já no estado de São Paulo, 7 são relacionados às fraturas (com 34940 beneficiários), enquanto na cidade de São Paulo são 9 (com 9568 beneficiários) (MOREIRA; GERCINA, 2014).

Segundo alguns dados sintetizados por Pires, Bierhalz e Moraes (2015), o mercado de biomateriais movimentou cerca de 25,6 bilhões de dólares em 2008 (sendo 2% referentes ao Brasil), e o mercado global tem apresentado crescimento de 22,1% ao ano. Em 2010, o Brasil movimentou aproximadamente 690 milhões de dólares.

Na área de biomateriais, o segmento com mais vendas é o setor de implantes ortopédicos, com movimentação de aproximadamente 1 a 2,5 milhões de unidades, destacando-se próteses de quadril, joelho e ombro. O crescimento desse mercado pode ser atribuído aos seguintes fatores: envelhecimento da população, aumento do poder aquisitivo e melhorias tecnológicas no tratamento de enfermidades. Com o

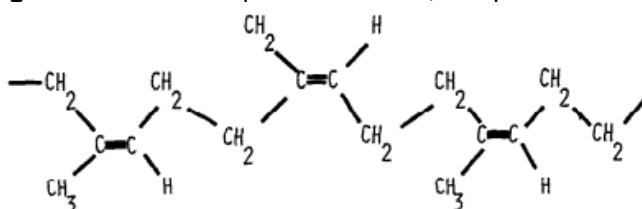
aumento da expectativa de vida, haverá a necessidade em se ampliar essa oferta (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Dentre os materiais utilizados em ortopedia, pode-se citar os materiais metálicos (como o titânio e aço inoxidável), cerâmicos (como a hidroxiapatita e biovidro) e poliméricos (como o colágeno e fibroína de seda). Esta última categoria apresenta diversas formas (fibra, sólido, gel), com diferentes propriedades (elasticidade à rigidez) e com degradação controlável, motivos pelos quais despertou interesse para aplicação nesse trabalho (RODRIGUES, 2013).

1.1 Látex natural da seringueira

O látex natural é um sistema coloidal extraído principalmente da seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. Former Adr. de Juss.) Muell – Arg). É composto por aproximadamente 50% (m/v) de água, 4-5% de proteínas, lipídeos e carboidratos e 30-45% de borracha (o hidrocarboneto *cis*-1,4-poliisopreno) (Figura 1). As partículas de borracha estão circundadas por partículas (orgânicas e inorgânicas) carregadas negativamente por proteínas fosfolipídicas que lhe conferem estabilidade coloidal e que não são removidas por centrifugação (NAWAMAWAT et al., 2011).

Figura 1 – Estrutura química do *cis*-1,4-isopreno.



Fonte: Goodman; Schilder e Aldrich (1974).

O látex apresenta 14 proteínas relacionadas à reação alérgica, dentre as principais, a Hev-b1 a Hev-b14 (YEANG et al., 2002). Porém, há vários métodos para torná-lo imune, sendo a centrifugação um modo prático, pois preserva as proteínas

relacionadas à angiogênese (MRUE et al., 2004; MENDONÇA et al., 2010) (Figura 2). As reações alérgicas relacionadas ao látex podem ser devidas aos agentes vulcanizantes, aceleradores de vulcanização e aos antioxidantes adicionados, que são desnecessários em engenharia de tecidos (HANSON; LOBNER, 2004).

Figura 2 – Angiogênese observada na região delimitada em decorrência do uso do látex natural em modelo de membrana corialantóide.



Fonte: Mendonça et al. (2010).

A literatura apresenta resultados promissores devido a sua eficiência como barreira à invasão de tecido não ósseo e pela sua atividade angiogênica (Figura 2). Ciapetti et al. (1994) estudaram a biocompatibilidade *in vivo* de membranas de látex para regeneração tecidual guiada em regeneração periodontal. Balabanian et al. (2006) utilizaram grânulos de látex natural como implante em alvéolos de ratos observando redução da espessura da cápsula de tecido conectivo, aumento da área ocupada por osso maduro e aceleração da formação óssea.

Herculano (2009) utilizou este material para regeneração óssea guiada de tíbias de coelho, apresentando neoformação óssea. Ereno et al. (2010) também a utilizaram como uma barreira oclusiva para regeneração óssea guiada em calvária de coelhos, comprovando a formação de hidroxiapatita por ressonância paramagnética eletrônica. Martins et al. (2010) obtiveram maior homogeneidade na formação óssea com membranas de látex ao comparar com o politetrafluoretileno (PTFE) em defeito crítico em calvária de coelhos.

Nesi et al. (2012) utilizaram este biomaterial como barreira na exodontia, concluindo ser eficiente na estabilização do coágulo sobre o alvéolo dental, culminando por sugerir diminuição da perda óssea. Kinoshita et al. (2014) utilizaram a membrana com nanopartículas de prata na regeneração óssea guiada de calvária de coelho observando maior atividade osteogênica. Oliveira (2008) observou uma maior formação do tecido ósseo empregando a membrana de látex natural como cobertura no auxílio da fusão intervertebral lombar. Floriano (2013) obteve melhores resultados ao utilizar látex sem amônia como estabilizante, além que os clones RRIM 600 e 873 IAN apresentaram melhor atividade na regeneração óssea.

De acordo com a literatura pesquisada, nenhum trabalho *in vivo* apresentou degradação do látex durante o período experimental. Entretanto, Wang et al. (1997) mostraram que osteoclastos podem fagocitar partículas de látex, permanecendo totalmente funcionais e Neale et al. (2000) comprovaram que a fagocitose de partículas de látex não afetou na diferenciação em osteoclasto, sendo considerado inerte e não tóxica aos macrófagos.

Suas aplicações na regeneração tecidual têm se mostrado promissoras, acelerando a cicatrização e proporcionando angiogênese (MRUE et al., 2004) (Figura 3). A vascularização é importante para a cicatrização, uma vez que fornece o aporte de nutrientes e oxigênio ao tecido que está se regenerando. Uma teoria para a aceleração da cicatrização é o estímulo da fase inflamatória natural por estresse oxidativo, aumentando o recrutamento de células inflamatórias (ANDRADE et al., 2011).

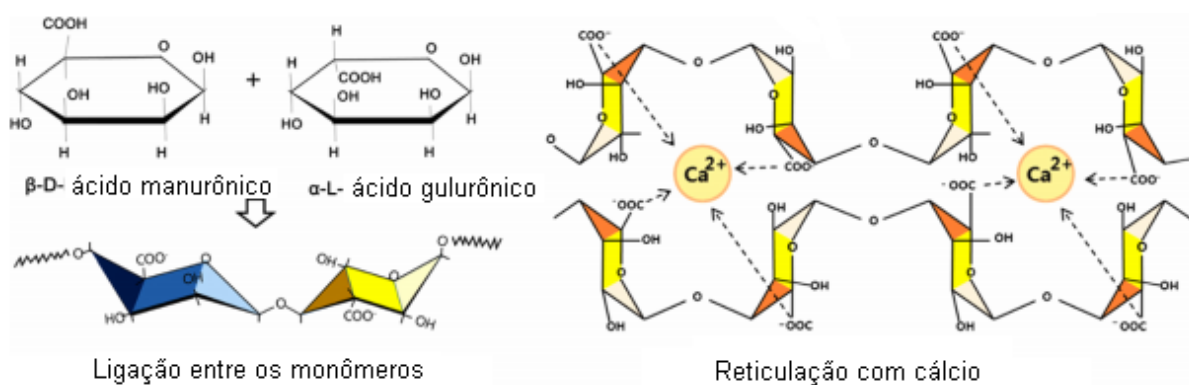
1.2 Alginato de sódio

O alginato de sódio (sal de sódio do ácido algínico) é um polissacarídeo aniônico natural presente nas paredes celulares e nos espaços intercelulares das algas pardas (*Laminaria hyperborean* e *digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum* e *Turbinarias* estão entre as com maior conteúdo), porém, também pode

ser produzido por algumas bactérias (*Azotobacter vinelandii* e algumas espécies de *Pseudomonas*) (NERY, 2014).

É um copolímero linear, formado pela repetição de dois monômeros, o ácido (1,4)- α -L-gulurônico (unidade G) e o ácido (1,4)- β -D-manurônico (unidade M), com variações na proporção e distribuição ao longo da cadeia (Figura 3). As propriedades físicas e químicas deste material são influenciadas pela composição, massa molar, extensão e sequência dos monômeros (NERY, 2014).

Figura 3 – Estrutura química do alginato e sua reticulação com cálcio.



Fonte: Kashima e Imai (2012).

O alginato é biocompatível, biodegradável, hidrofílico, tem baixo custo e possui diversas aplicações. Também possui a habilidade de ativar macrófagos, auxiliar no processo de cicatrização e reepitelização do tecido. Devido a sua capacidade de gelificação e a sua propriedade hemostática, os curativos confeccionados com alginato podem ser utilizados na recuperação de feridas, pois promovem a analgesia, auxiliam na construção do tecido de granulação e na coagulação (NERY, 2014).

Este polissacarídeo apresenta a capacidade de gelificação de maneira reversível, na presença de cálcio ou outros cátions divalentes ou trivalentes, formando um hidrogel termoestável (NERY, 2014; BITTENCOURT, 2008). Esta reticulação promove a modificação de suas propriedades, como aumento da resistência mecânica, propriedades de barreira, tempo de degradação, morfologia, entre outros, podendo ser controlada conforme o tempo de reticulação, concentração do agente

reticulante, entre outros. Ele pode ser utilizado na concentração de 1-20% (m/v), no entanto a concentração ideal para proliferação dos condrócitos é 1,5% (m/v). Este polímero natural apresenta diversas aplicações na área de cosmético, alimentícia e farmacêutica. Dentre seus diversos usos, os mais relevantes à temática são na medicina e engenharia de tecidos, sendo utilizado em liberação sustentada (LU et al, 2008).

Man et al. (2012) utilizaram microesferas de alginato preparados com plasma rico em plaqueta a fim de servir como arcabouço tridimensional para células tronco do tecido adiposo, obtendo significativo aumento da angiogênese e mineralização. Bittencourt (2008) também utilizou como arcabouço de condrócitos, tanto para cultura *in vitro* quanto para aplicação *in vivo*, obtendo formação de tecido cartilaginoso. Lu et al. (2008) controlaram a liberação de fatores de crescimento presentes no plasma rico em plaquetas a partir de esferas e capsulas de alginato.

Moraes et al. (2014) observaram redução da hidrofobicidade e aumento da dureza, ao adicionar alginato à fibroína de seda e Srisuwan et al. (2013) observaram aumento da dissolução do material com aumento da quantidade de alginato.

Assim, a incorporação do alginato ao látex natural formaria blendas com propriedades intermediárias entre os dois materiais, para a criação de uma membrana que possa favorecer um microambiente favorável à regeneração óssea.

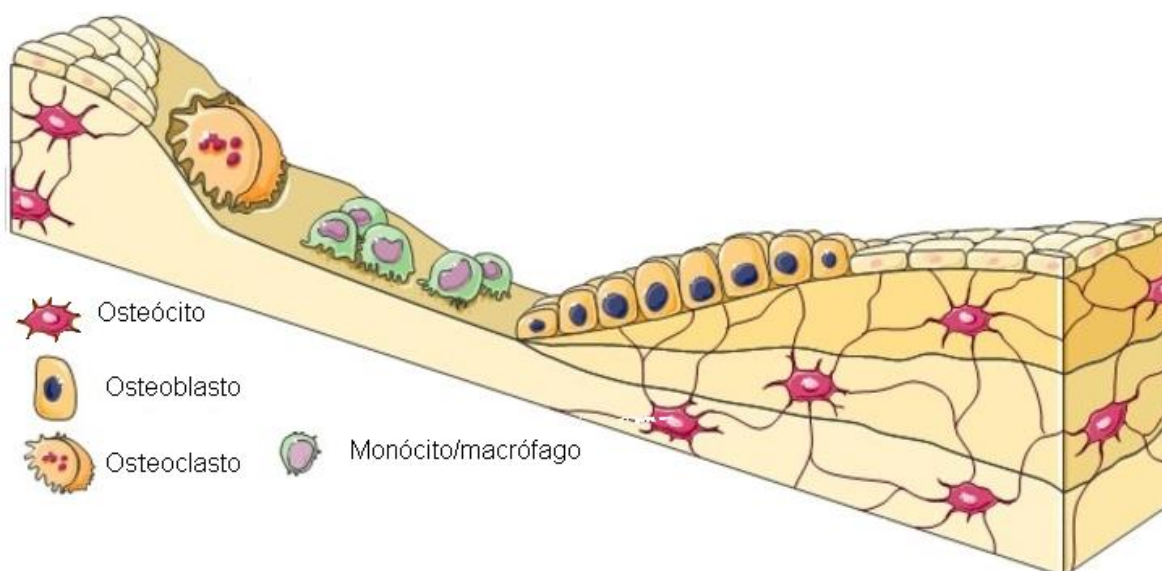
1.3 Tecido ósseo

A matriz óssea apresenta aproximadamente 35% de material orgânico chamado de osteóide (formado por glicoproteínas, fibras de colágeno e proteoglicanos que fornecem a flexibilidade e resistência à tração) e 65% de material inorgânico (cristais de fosfato, o qual confere ao osso sua resistência à compressão) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As principais células ósseas são: osteoblastos (responsáveis pela formação matriz óssea não mineral), osteócitos (formam-se a partir do aprisionamento dos

osteoblastos na matriz, responsáveis pela manutenção da matriz óssea) e osteoclastos (que produzem um meio ácido para reabsorção da matriz). Os osteoclastos são células móveis e multinucleadas que estão presentes nas áreas de reabsorção do tecido ósseo (lacunas de Howship). Os osteoblastos se localizam nas superfícies ósseas, lado a lado, sintetizando a parte orgânica (colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea. Uma vez aprisionado na matriz óssea, são chamados de osteócitos (PAJARINEN et al., 2019) (Figura 4).

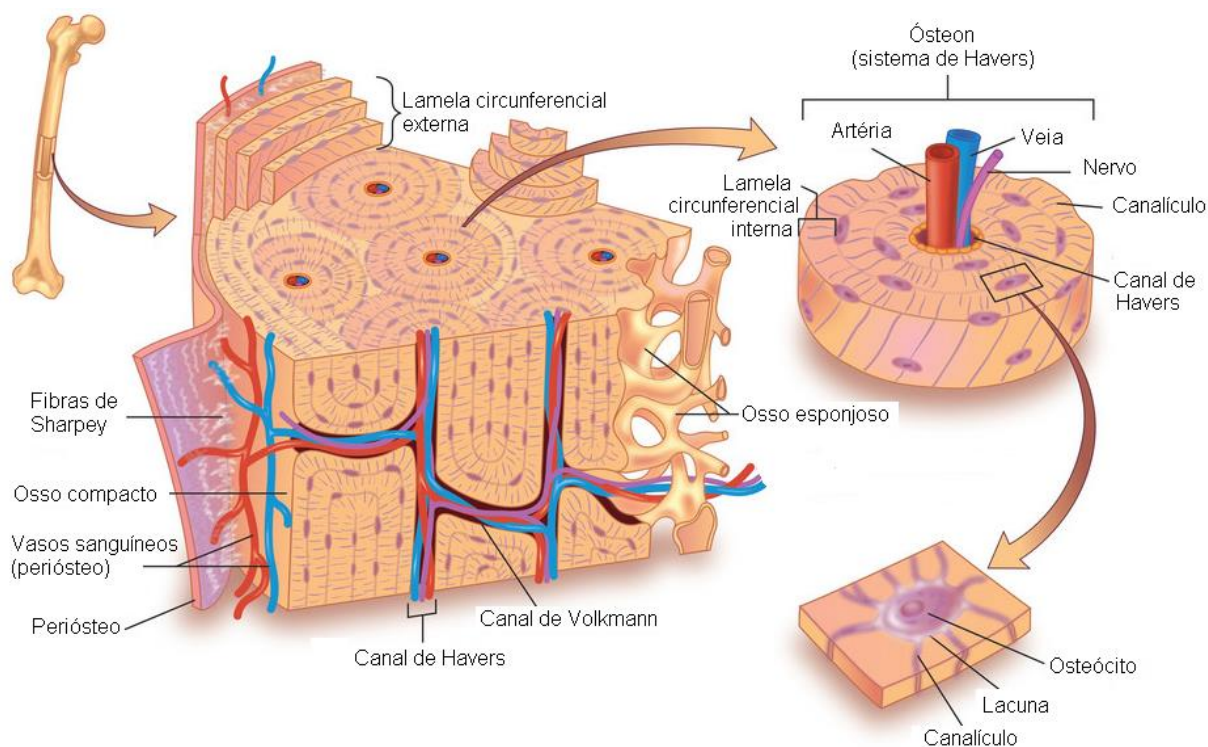
Figura 4 – Tipos celulares presentes no osso, e sua participação no evento de regeneração óssea.



Fonte: Adaptado de Pajarinen et al. (2019).

Histologicamente o osso pode ser primário (ou imaturo) ou secundário (maduro ou lamelar). No tecido ósseo primário, as fibras de colágeno se dispõem irregularmente, sendo mais radiolúcidas (são atravessadas mais facilmente pelo raio-X). No tecido ósseo maduro, a principal característica são as fibras de colágeno organizadas paralelamente. Elas podem se dispor em camadas concêntricas, que posteriormente sofrem mineralização (tornando-se radiopacas), circundando os canais de Havers (ou osteons), e entre as lamelas encontram-se os osteócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) (Figura 5).

Figura 5 – Representação da hierarquia de organização do osso.



Fonte: Adaptado de VectorStock.com, image Id: 4102961, artista: MerlinPixi.

A regeneração óssea pode ocorrer de duas formas, via ossificação intramembranosa ou endocondral. A regeneração intramembranosa ocorre em fraturas pequenas e rigidamente fixadas, onde as células tronco diferenciam para osteoblastos, os quais depositam a matriz extracelular mineralizada (PAJARINEN et al., 2019)

A regeneração endocondral ocorre em defeitos grandes, como os defeitos críticos, e em locais com pouca estabilidade mecânica, seguindo quatro etapas (Figura 4). Inicialmente ocorre a formação do hematoma, onde os vasos sanguíneos extravasam sangue, formando um coágulo (que proporciona a presença de plaquetas que liberam fatores de crescimento, como PDGF) e um aporte inadequado aos osteócitos, de forma que o tecido ósseo adjacente morra. Posteriormente, forma-se o calo ósseo, em que se formam vasos sanguíneos no interior do coágulo à medida que se dissolve, os macrófagos removem os restos celulares, os osteoclastos reabsorvem o tecido ósseo morto, os fibroblastos constroem uma rede fibrosa de colágeno onde os condroblastos produzem cartilagem, a fim de manter o osso unido. A seguir, ocorre

a ossificação do calo, onde o calo externo é substituído por osso esponjoso por meio da ossificação endocondral. Por fim ocorre a remodelação óssea com a substituição do calo interno de osso esponjoso por osso compacto, ocorrendo das extremidades para o centro (LIU; KERNS, 2014; PAJARINEN et al, 2019).

A calvária é biologicamente inerte devido ao menor aporte sanguíneo e ausência de músculo para estabilizar o local, ocorrendo a regeneração intramembranosa (RENTSCH et al., 2014). Em defeitos críticos, a regeneração é restrita às margens, sendo o restante preenchido com tecido fibroso (Figura 6). Esta falha óssea é comumente utilizada como modelo de cicatrização óssea por não regenerar espontaneamente e por minimizar as dificuldades devido a diferenças de idade, local e espécie. Em ratos, o tamanho do defeito crítico é a partir de 5 mm (GOMES; FERNANDES, 2011).

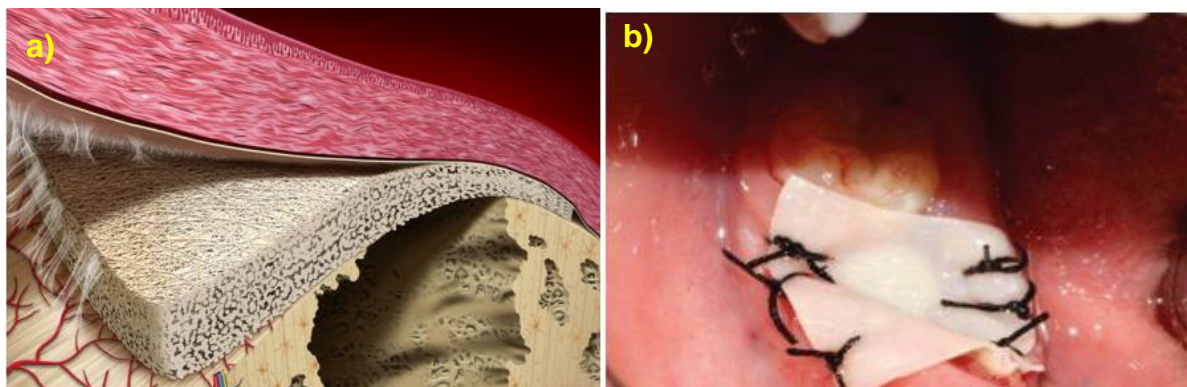
Figura 6 – Evolução do reparo ósseo em defeito crítico em calvária ao longo do tempo (da esquerda para direita) exemplificando a regeneração centrípeta (das margens para o centro).



Fonte: Adaptado de Youngstrom et al. (2017).

Uma forma em otimizar o reparo baseia-se na utilização da técnica de regeneração óssea guiada (Figura 7), onde se aplica uma barreira que impede a infiltração de células que dificultam a regeneração (como fibroblastos e células epiteliais), auxiliando na manutenção do espaço (LIU; KERNS, 2014).

Figura 7 – Regeneração óssea guiada: a) ilustração mostrando a separação dos tecidos, b) aplicação da membrana de látex na regeneração óssea guiada.



Fonte: a) Elgali et al., 2017, b) Nesi; Oliveira e Molina (2012).

Se uma membrana é empregada como barreira em contato direto com a superfície do osso e recobrendo o defeito, apenas células da região óssea migram para o defeito, sem a interferência das células do tecido mole circundante (LIU; KERNS, 2014). A membrana não deve apresentar porosidade que permita a infiltração de micro-organismos ou permitir migração das células indesejadas; e deve apresentar rigidez suficiente para promover manutenção do espaço suportando a pressão do tecido circundante sem colapsar e ao mesmo tempo apresentar plasticidade para ser facilmente moldado e ajustado à forma do defeito (ELGALI et al., 2017). As membranas podem ser classificadas como reabsorvíveis (alginato, quitosana, colágeno, entre outras) e não reabsorvíveis (por exemplo, o politetrafluoretileno). A maior limitação de barreiras não reabsorvíveis é a necessidade de um segundo procedimento para sua remoção, contudo, com a degradação das membranas reabsorvíveis pode ocorrer colapso e falha na manutenção do espaço (LIU; KERNS, 2014).

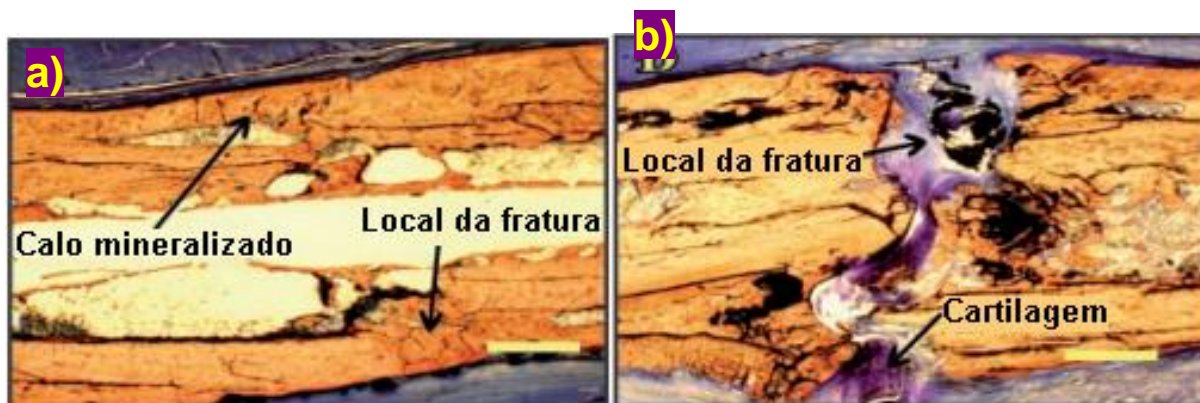
1.4 Fator de crescimento (PDGF-BB)

Uma forma de reduzir o tempo de cicatrização é através do uso de substâncias bioativas que promovam, por exemplo, a quimiotaxia, mitose ou diferenciação celular,

como o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), BMP (proteína morfogenética óssea), VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), entre outros.

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) está presente principalmente nos alfa-grânulos das plaquetas, somente sendo liberados no processo de coagulação e no mecanismo de adesão plaquetária na lesão a vasos sanguíneos (MASTROCINQUE et al., 2004). Também é produzido por macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células musculares e está relacionado à regeneração óssea (AL-ZUBE et al., 2009) (Figura 8).

Figura 8 – Regeneração óssea pela aplicação do fator de crescimento: a) aplicação do PDGF-BB, b) controle.



Fonte: Al-Zube et al. (2009).

Estas proteínas apresentam atividades angiogênica, mitogênica para células mesenquimais, incluindo fibroblastos e osteoblastos, estimulam a expressão de TGF- β pelos macrófagos e quimiotática para macrófagos e fibroblastos (MASTROCINQUE et al., 2004; MILLIS, 1999).

É uma glicoproteína de natureza catiônica, possui a capacidade de permanecer estável em temperaturas menores que 100°C e com ponto isoelétrico muito básico (pH 10). Ela pode ser separada em duas frações proteicas (que diferem no conteúdo de carboidratos unidos covalentemente), PDGF-A e PDGF-B, podendo existir como

heterodímero (AB) ou homodímero (AA, BB). A forma BB é mais mitogênica que a AB, que por sua vez é mais que a AA (MILLIS, 1999)

Lynch et al. (1989) concluíram que PDGF e IGF-I têm se mostrado potentes agentes mitogênicos e quimiotáticos para osteoblastos e fibroblastos *in vivo*, podendo estimular a migração destas células na área e promover sua proliferação. Além disso, estes fatores de crescimento parecem ser capazes de estimular processos metabólicos de recrutamento de células, levando à formação de novo colágeno e osso (Figura 8). Uma simples aplicação mostrou-se efetiva e resultou em melhora do crescimento ósseo com preenchimento dos defeitos periodontais quando comparados à prática comum (HOWELL et al., 1997).

Embora não esteja definida a dose ideal, sabe-se que a associação com outros fatores de crescimento (IGF-I e TGF- β) pode ser capaz de dobrar a aposição óssea em 48 horas (HOWELL et al., 1997; PFEILSCHIFTER et al., 1990). Howell et al. (1997) determinaram a segurança da aplicação em humanos, sendo que uma dose única de 150 μ L/mL de PDGF-BB e IGF-I proporcionou significativo crescimento ósseo.

Tal et al. (1996) utilizaram gel de colágeno e Marzouk et al. (2007) utilizaram microesferas de vinil estireno, baseando-se na capacidade de manutenção do espaço e a liberação dos fatores de crescimento. As regenerações dos grupos tratados não foram satisfatórias devido à lenta degradação e liberação dos materiais, o que dificultou repovoamento da área e ao longo tempo de exposição ao PDGF-BB.

5 CONCLUSÃO

Segundo o MEV, as membranas apresentaram aspecto denso e compacto, sem porosidade ou separação de fase. As análises de FTIR, TG e DSC não mostraram interação entre os materiais. O acréscimo de alginato aumentou a hidrofiliabilidade das membranas, observado por ângulo de contato, intumescimento e permeação ao vapor de água. A adição de alginato e sua reticulação, funcionaram como reforço nas propriedades mecânicas do látex natural, assim como a perda de massa foi proporcional à adição de alginato e sua reticulação.

Nos testes *in vitro* as membranas não apresentaram efeito hemolítico nem citotoxicidade em células MC3T3-E1, apresentando aumento da viabilidade celular para algumas proporções.

Na aplicação *in vivo* de defeito em calvária, não foi possível observar diferença na regeneração óssea entre o controle, a membrana 4 e a membrana 4 com 200 ng do fator de crescimento PDGF-BB.

A membrana não apresentou prejuízo na sua utilização conforme os testes realizados, porém, também não apresentou melhora na regeneração óssea. Mais estudos são necessários para complementar a discussão e compreender os resultados obtidos. Testes *in vitro* de liberação e em modelo de ferida para avaliar se a liberação apresenta atividade em modelo de cultura de células ósseas, assim como a como avaliação histológica para avaliar a qualidade da regeneração a nível celular.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to [3H]thymidine incorporation assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 170, n. 2, 1994. doi: 10.1016/0022-1759(94)90396-4
- ALMEIDA, L. M.; FLORIANO, J. F.; RIBEIRO, T. P.; MAGNO, L. N.; MOTA, L. S.; PEIXOTO, N.; MRUÉ, F. MELO-REIS, P.; LINO-JUNIOR, R. S.; GRAEFF, C. F.; GONÇALVES, P. J. Hancornia speciosa latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 25, n. 9, 2014. doi: 10.1007/s10856-014-5255-8
- ALTMAN, R. F. A. Natural Antioxidants in Hevea Latex. **Rubber Chem. Technol.**, v. 21, n. 3, 1948. doi: 10.5254/1.3546954
- AL-ZUBE, L.; BREITBART, E. A.; O'CONNOR, J. P.; PARSONS, J. R.; BRADICA, G.; HART, C. E.; LIN, S. S. Recombinant human platelet-derived growth factor BB (rhPDGF-BB) and beta-tricalcium phosphate/collagen matrix enhance fracture healing in a diabetic rat model. **J. Orthop. Res.**, v. 27, n. 8, 2009. doi: 10.1002/jor.20842.
- ANDIAPPAN, M.; SUNDARAMOORTHY, S.; PANDA, N.; MEIYAZHABAN, G.; WINFRED, S. B.; VENKATARAMAN, G.; KRISHNA, P. Electrospun eri silk fibroin scaffold coated with hydroxyapatite for bone tissue engineering applications. **Prog. biomater.**, v. 2, n. 1, 2013. doi: 10.1186/2194-0517-2-6
- ANDRADE, T. A. M.; IYER, A.; DAS, P. K.; FOSS, N. T.; GARCIA, S. B.; COUTINHO-NETTO, J.; JORDÃO, A. A. JR.; FRADE, M. A. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 44, n. 10 2011. doi: 10.1590/S0100-879X2011007500116
- ARNEZ, M. F. M.; XAVIER, S. P.; FARIA, P. E. P.; PEDROSA-JÚNIOR, W. F.; CUNHA, T. R.; MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J.; SALATA, L. A. Implant osseointegration in circumferential bone defects treated with latex-derived proteins or autogenous bone in dog's mandible. **Clin. Implant. Dent. Relat. Res.**, v. 14, n. 1, 2012. doi: 10.1111/j.1708-8208.2009.00238.x
- BAEK, H. S.; YOO, J. Y.; RAH, D. K.; HAN, D. W.; LEE, D. H.; KWON, O. H.; PARK, J. C. Evaluation of the Extraction Method for the Cytotoxicity Testing of Latex Gloves. **Yonsei Med. J.**, v. 46, n. 4, 2005. doi: 10.3349/ymj.2005.46.4.579
- BALABANIAN, C. A.; COUTINHO-NETTO, J.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; LACERDA, S. A.; BRENTAGANI, L. G. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **J. Oral. Sci.**, v. 48, n. 4, 2006. doi: 10.2334/josnusd.48.201
- BARROS, N. R.; HEREDIA-VIEIRA, S. C.; BORGES, F. A.; BENITES, N. M.; REIS, C. E. MIRANDA, M. C. R.; CARDOSO, C. A. L.; HERCULANO, R. D. Natural rubber

latex biodevice as controlled release system for chronic wounds healing. **Biomed. Phys. Eng. Express**, v. 4, n. 3, 2018. doi: 10.1088/2057-1976/aab33a

BEKIN, S.; SARMAD, S.; GÜRKAN, K.; YENICI, G.; KEÇELI, G.; GÜRDAĞ, G. Dielectric, thermal, and swelling properties of calcium ion-crosslinked sodium alginate film. **Polym. Eng. Sc.**, v. 54, n. 6, 2014. doi: 10.1002/pen.23678

BIERHALZA, A. C. K.; SILVA, M. A.; BRAGA, M. E. M.; SOUSA, H. J. C.; KIECKBUSCHA, T. G. Effect of calcium and/or barium crosslinking on the physical and antimicrobial properties of natamycin-loaded alginate films. **LWT.**, v. 57, n. 2, 2014. doi: 10.1016/j.lwt.2014.02.021

BITTENCOURT, R. A. C. **Cultura de condrócitos para o uso terapêutico: reconstituição de cartilagem**. 2008. 159 f. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

Bone structure diagram vector image. Image Id: 4102961, artist: MerlinPixi. VectorStock. Disponível em: < <https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/bone-structure-diagram-vector-4102961> >. Acesso em: 26 mar. 2019.

BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; GARMS, B. C.; MIRANDA, M. C. R.; GEMEINDER, J. L. P.; RIBEIRO-PAES, J. T.; SILVA, R. F.; TOLEDO, K. A.; HERCULANO, R. D. Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 134, n. 39, 2017. doi: 10.1002/app.45321

BORGES, F. A.; FILHO, E. A.; MIRANDA, M. C. R.; SANTOS, M. L.; HERCULANO, R. D.; GUASTALDI, A. C. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, v. 26, n. 17. 2015. doi: 10.1080/09205063.2015.1086945

CIAPETTI, G.; STEA, S.; PIZZO-FERRATO, A.; CHECCHI, L.; PELLICIONI, G. A. A latex membrane, as an alternative device in the gtr technique - preliminary-report on its biocompatibility. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 5, n. (9-10), 1994. doi: 10.1007/BF00120348

COUTINHO, M. P. **Influência da morfologia da superfície na molhabilidade do titânio comercialmente puro**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2007.

CSEPREGI, R.; LEMLI, B.; KUNSÁGI-MÁTÉ, S.; SZENTE, L.; KŐSZEGI, T.; NÉMETI, B.; POÓR, M. Complex Formation of Resorufin and Resazurin with B-Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay?. **Molecules**, v. 23, n. 2, 2018. doi: 10.3390/molecules23020382

DAEMI, H.; BARIKANI, M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. **Sci. Iran.**, v. 19, n. 6, 2012. doi: 10.1016/j.scient.2012.10.005

DAEMI, H.; BARIKANI, M.; BARMAR, M. Compatible compositions based on aqueous polyurethane dispersions and sodium alginate. **Carbohydr. Polym.**, v. 92, n. 1. 2013. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.09.046.

DAEMI, H.; BARIKANI, M.; BARMAR, M. Highly stretchable nanoalginate based polyurethane elastomers. **Carbohydr. Polym.**, v.95, n. 2, 2013. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.039

DALBY, M. J.; GADEGAARD, N.; TARE, R.; ANDAR, A.; RIEHLE, M. O.; HERZYK, P.; WILKINSON, C. D.; OREFFO, R. O. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. **Nat. Mater.**, v. 6, n. 12, 2007. DOI: 10.1038/nmat2013

DEDAVID, B. A. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. 1. ed. Porto Alegre: Edipucrs, 2007. 60 p.

DELGADO, I. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Effects of Euphorbia milii latex on mitogen-induced lymphocyte proliferation. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 16, n. 1, 2014. doi: 10.1590/S1516-05722014000100015

DELGADO, J. J.; SÁNCHEZ, E.; BARO, M.; REYES, R.; EVORA, C.; DELGADO, A. A platelet derived growth factor delivery system for bone regeneration. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 23, n. 8, 2012. doi: 10.1007/s10856-012-4661-z

ELGALI, I.; OMAR, O.; DAHLIN, C.; THOMSEN, P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 125, n. 5, 2017. doi: 10.1111/eos.12364

ERENO, C.; GUIMARÃES, S. A.; PASETTO, S.; HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; GRAEFF, C. F.; TAVANO, O.; BAFFA, O.; KINOSHITA, A. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 95, n. 3, 2010. doi: 10.1002/jbm.a.32919

FELDSTEIN, A. C.; BLACK, D.; PERRIN, N.; ROSALES, A. G.; FRIESS, D.; BOARDMAN, D.; DELL, R.; SANTORA, A.; CHANDLER, J. M.; RIX, M. M.; ORWOLL, E. Incidence and demography of femur fractures with and without atypical features. **J. Bone Miner. Res.**, v. 27, n. 5, 2012. doi: 10.1002/jbmr.1550

FERREIRA, M.; MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J.; MULATO, M. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of Hevea brasiliensis. **Braz. J. Phys.**, v. 39, n. 3, 2009. doi: 10.1590/S0103-97332009000500010

FLORIANO, J. F. **Estudos sistemáticos de biocompatibilidade e potencial osteogênico de membranas bioativas em coelhos machos**. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2013.

FLORIANO, J. F.; MOTA, L. S.; FURTADO, E. L.; ROSSETTO, V. J.; GRAEFF, C. F. Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 25, n. 2, 2014. doi: 10.1007/s10856-013-5089-

FRADE, M. A. C.; ASSIS, R. V. C. D.; COUTINHO NETTO, J.; ANDRADE, T. A. M. D.; FOSS, N. T. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **An. Bras. Dermatol.**, v. 87, n. 1, 2012. doi: 10.1590/S0365-05962012000100005

FURUYA, M.; SHIMONO, N.; OKAMOTO, M. Fabrication of biocomposites composed of natural rubber latex and bone tissue derived from MC3T3-E1 mouse preosteoblastic cells. **Nanocomposites**, v. 3, n. 2, 2017. doi: 10.1080/20550324.2017.1352111

GOMES, M. T.; MELLO, V. J.; RODRIGUES, K. C.; BEMQUERER, M. P.; LOPES, M. T.; FAÇA, V. M.; SALAS, C. E. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. **Planta Med.**, v. 71, n. 3, 2005. doi: 10.1055/s-2005-837824

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Lab. Anim.**, v. 45, n. 1, 2011. doi: 10.1258/la.2010.010085

HA, Y. Y.; PARK, Y. W.; KWEON, H.; JO, Y. Y.; KIM, S. G. Comparison of the physical properties and in vivo bioactivities of silkworm-cocoon-derived silk membrane, collagen membrane, and polytetrafluoroethylene membrane for guided bone regeneration. **Macromol. Res.**, v. 22, n. 9, 2014. doi: 10.1007/s13233-014-2138-2

HANSON, M.; LOBNER, D. In vitro neuronal cytotoxicity of latex and nonlatex orthodontic elastics. **Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.**, v. 126, n. 1, 2004. doi: 10.1016/j.ajodo.2003.07.006

HERCULANO, R. D. **Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações médicas**. 2009. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

HO, C. C.; KHEW, M. C. Low Glass Transition Temperature (T_g) Rubber Latex Film Formation Studied by Atomic Force Microscopy. **Langmuir**, v. 16, n. 6, 2000. doi: 10.1021/la990192f

HOWELL, T. H.; FIORELLINI, J. P.; PAQUETTE, D. W.; OFFENBACHER, S.; GIANNOBILE, W. V.; LYNCH, S. E. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 68, n. 12, 1997. doi: 10.1902/jop.1997.68.12.1186

HUNT, N. C.; SMITH, A. M.; GBURECK, U.; SHELTON, R. M.; GROVER, L. M. Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. **Acta Biomater.**, v. 6, n. 9, 2010. doi: 10.1016/j.actbio.2010.03.026

ISHIKAWA, K.; UEYAMA, Y. MANO, T.; KOYAMA, T.; SUZUKI, K.; MATSUMURA, T. Self-setting barrier membrane for guided tissue regeneration method: initial evaluation of alginate membrane made with sodium alginate and calcium chloride aqueous solutions. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 47, n. 2, 1999. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199911)47:2<111::AID-JBM1>3.0.CO;2-0

JIANG, C.; HE, H.; YAO, X.; YU, P.; ZHOU, L.; JIA, D. In situ dispersion and compatibilization of lignin/epoxidized natural rubber composites: reactivity, morphology and property. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 132, n. 23, 2015. doi: 10.1002/app.42044

JIN, X.; ZHU, L.; YAO, Q.; MENG, X.; DING, G.; WANG, D.; XIE, Q.; TONG, Z.; TAO, C.; YU, L.; LI, H.; WANG, X. Expression profiling of mitogen-activated protein kinase genes reveals their evolutionary and functional diversity in different rubber tree (*Hevea brasiliensis*) cultivars. **Genes**, v. 8, n. 10, 2017. doi: 10.3390/genes8100261

JO, Y. Y.; KIM, S. G.; KWON, K. J.; KWEON, H.; CHAE, W. S.; YANG, W. G.; LEE, E. Y.; SEOK, H. Silk Fibroin-Alginate-Hydroxyapatite Composite Particles in Bone Tissue Engineering Applications In Vivo. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 4, 2017. doi: 10.3390/ijms18040858

JO, Y. Y.; KIM, S. G.; KWON, K. J.; KWEON, H.; CHAE, W. S.; YANG, W. G.; LEE, E. Y.; SEOK, H. Silk Fibroin-Alginate-Hydroxyapatite Composite Particles in Bone Tissue Engineering Applications In Vivo. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 4, 2017. doi: 10.3390/ijms18040858

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Cap. 8, p. 131-148.

KASHIMA, K.; NOMOTO, R.; IMAI, M. A Novel Application of Oceanic Biopolymers — Strategic Regulation of Polymer Characteristics for Membrane Technology in Separation Engineering. In: PERVEEN, F. K. (ed). **Recent Advances in Biopolymers**. 1. ed. London: InTech, 2016. Cap. 8, p. 189-220.

KINOSHITA, A. M. O.; MARQUES, L.; GUIDELLI, E. J.; BAFFA-FILHO, O. **Regeneração óssea guiada por membrana de látex incorporada a nanopartículas de prata**. In: Congresso Brasileiro de Física Médica, 19, 2014. Goiânia. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/269036679_REGENERACAO_OSSEA_GUIADA_POR_MEMBRANA_DE_LATEX_INCORPORADA_A_NANOPARTICULAS_DE_PRATA. Acesso em: 25 mar 2019.

KWEON, H.; HA, H. C.; UM, I. C.; PARK, Y. H. Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films. **Appl. Polym. Sci.**, v. 80, n. 7, 2001. doi: 10.1002/app.1172

LAMBERT, S.; SINCLAIR, C. J.; BRADLEY, E. L.; BOXALL, A. B. Effects of environmental conditions on latex degradation in aquatic systems. **Sci. Total. Environ.**, v. 447, n. march, 2013. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.12.067

LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, 2007. DOI: 10.1021/bm070014y

LEE, E. J.; TENG, S. H.; JANG, T. S.; WANG, P.; YOON, S. W.; KIM, H. E.; KOH, Y. H. Nanostructured poly(epsilon-caprolactone)-silica xerogel fibrous membrane for guided bone regeneration. **Acta Biomater.**, v. 6, n. 9. 2010. doi: 10.1016/j.actbio.2010.03.022

LEE, J. Y.; NAM, S. H.; IM, S. Y.; PARK, Y. J.; LEE, Y. M.; SEOL, Y. J.; CHUNG, C. P.; LEE, S. J.; Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. **J. Control. Release.**, v. 8, n. (1-3), 2002. doi: 10.1016/S0168-3659(01)00498-9

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Prog Polym. Sci.**, v. 37, n. 1, 2012. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003

LINOS, A.; BEREKAA, M. M.; REICHELT, R.; KELLER, U.; SCHMITT, J.; FLEMMING, H. C.; STEINBÜCHEL, A. Biodegradation of cis-1, 4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 4, 2000. DOI: 10.1128/AEM.66.4.1639-1645.2000

LIU, J.; KERNS, D. G. Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. **Open Dent. J.**, v. 8, 2014. doi: 10.2174/1874210601408010056

LIU, J.; KERNS, D. G. Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. **Open Dent. J.**, v. 8, n. 1, 2014. doi: 10.2174/1874210601408010056

LÖNNROTH, E. C. Toxicity of medical glove materials: a pilot study. **Int. J. Occup. Saf. Ergon.**, v. 11, n. 2, 2005. doi: 10.1080/10803548.2005.11076642

LU, H. H.; VO, J. M.; CHIN, H. S.; LIN, J.; COZIN, M.; TSAY, R.; EISIG, S.; LANDESBURG, R. Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 86, n. 4, 2008. doi: 10.1002/jbm.a.31740

LU, H. H.; VO, J. M.; CHIN, H. S.; LIN, J.; COZIN, M.; TSAY, R.; EISIG, S.; LANDESBURG, R. Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 86, n. 4, 2008. doi: 10.1002/jbm.a.31740

LYNCH, S. E.; WILLIAMS, R. C.; POLSON, A.; M.; HOWELL, T.; H.; REDDY, M.; S.; ZAPPA, U. E.; ANTONIADES, H. N. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **J. Clin. Periodontol.**, v. 6, n. 8, 1989. doi: 0.1111/j.1600-051X.1989.tb02334.x

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Hevains: Serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 10, 1986. doi: 10.1016/S0031-9422(00)81679-9

MAN, Y.; WANG, P.; GUO, Y.; XIANG, L.; YANG, Y.; QU, Y.; GONG, P.; Deng, L. Angiogenic and osteogenic potential of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cell laden alginate microspheres. **Biomaterials**, v. 33, n. 34, 2012. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.054

MANIGLIA-FERREIRA, C.; SILVA, J. B. JR.; PAULA, R. C.; FEITOSA, J. P.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C.; GOMES, B. P.; SOUZA-FILHO, F. J. Degradation of trans-polyisoprene over time following the analysis of root fillings removed during conventional retreatment. **Int. Endod. J.**, v. 40, n. 1, 2007. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01172.x

MARDEN, L. J.; FAN, R. S.; PIERCE, G. F.; REDDI, A. H.; HOLLINGER, J. O. Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 6, 1999. DOI: 10.1172/JCI116912

MARTINS, R.; KINOSHITA, A. M. O.; CARVALHO, N. T. A.; GUIMARÃES, S. A. C. Comparative study of bone response guided tissue regeneration technique - macroscopic evaluation. Part 1. **Full Dent. Sci.**, v. 1, n. 3, 2010.

MARZOUK, K. M.; GAMAL, A. Y.; AL-AWADY, A. A.; SHARAWY, M. M. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 65, n. 8, 2007. doi: 10.1016/j.joms.2006.10.039

MASTROCINQUE, S.; TATARUNAS, A. C.; ZERWES, M. B. C.; QUEIROZ, G.; SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M.; FERRIGNO, C. R. A. Bone morphogenetic proteins and other growth factors. **Semina: Ciênc. Agrár.**, v. 25, n. 2, 2004.

MENDONÇA, R. J.; MAURÍCIO, V. B.; TEIXEIRA, L. B.; LACHAT, J. J.; COUTINHO-NETTO, J. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytother. Res.**, v. 24, n. 5, 2010. doi: 10.1002/ptr.3043.

MILLIS, D. L. Bone and non-bone-derived growth factors and effects on bone healing. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 29, n. 5, 1999. doi: 10.1016/S0195-5616(99)50111-3

MIRANDA, M. C. R. **Desenvolvimento e estudo toxicológico em métodos alternativos dos compósitos à base de látex natural e fosfatos de cálcio para reparação óssea**. 2018. 112 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

MIRANDA, M. C. R.; PREZOTTI, F. G.; BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; CURY, B. S. F.; HERCULANO, R. D.; CILLI, E. M. Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. **J. Biomater Sci. Polym. Ed.**, v. 28, n. 18, 2017. doi: 10.1080/09205063.2017.1377024

MORAES, M. A.; SILVA, M. F.; WESKA, R. F.; BEPPU, M. M. Silk fibroin and sodium alginate blend: miscibility and physical characteristics. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.**, v. 40, 2014. doi: 10.1016/j.msec.2014.03.047

MORAES, M. A.; SILVA, M. F.; WESKA, R. F.; BEPPU, M. M. Silk fibroin and sodium alginate blend: miscibility and physical characteristics. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.**, v. 40, 2014. doi: 10.1016/j.msec.2014.03.047

MORAES, M. M. **Obtenção e caracterização de blendas e compósitos poliméricos de fibroína de seda e alginato de sódio**. 2010. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2010.

MOREIRA, J.; GERCINA, C. Confirma as doenças que mais dão afastamento no INSS. Folha de São Paulo, São Paulo, 23 set 2014. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2014/09/1520341-veja-as-doencas-que-mais-dao-afastamento-no-inss.shtml>. Acesso em: 25 nov. 2014.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 65, n. 1-2, 1983. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

MOTT, P. H.; ROLAND, C. M. Aging of Natural Rubber in Air and Seawater. **Rubber Chem. Technol.**, v. 74, n. 1, 2001. doi: 10.5254/1.3547641

MRUE, F.; NETTO, J. C.; CENEVIVAI, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A.; TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Mat. Res.**, v. 7, n. 2, 2004. doi: 10.1590/S1516-14392004000200010

NALLASAMY, P.; MOHAN, S. Vibrational Spectra of Cis-1, 4-Polyisoprene. **Arab. J. Sci. Eng.**, v. 29, n. 1, 2004.

NAWAMAWAT, K.; SAKDAPIPANICH, J. T.; HO, C. C.; MA, Y.; SONG, J.; VANCOSO, J. G. Surface nanostructure of Hevea brasiliensis natural rubber latex particles. **Colloids. Surf. A.**, v. 390, n. (1-3), 2011. doi: 10.1016/j.colsurfa.2011.09.021

NEALE, S. D.; HAYNES, D. R.; HOWIE, D. W.; MURRAY, D. W.; ATHANASOU, N. A. The effect of particle phagocytosis and metallic wear particles on osteoclast formation and bone resorption in vitro. **J. Arthroplasty**, v. 15, n. 5, 2000. doi: 10.1054/arth.2000.6622

NERY, J. C. **Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

NESII, H; OLIVEIRAI, M. T.; Molina, G. O. Use of latex membrane in alveolar wound of following tooth extraction: a case report. **Rev. Bras. Odontol.**, v. 69, n. 1, 2012.

NEUFELD, B. H.; TAPIA, J. B.; LUTZKE, A.; REYNOLDS, M. M. Small Molecule Interferences in Resazurin and MTT-Based Metabolic Assays in the Absence of Cells. **Anal. Chem.**, v. 90, n. 11, 2018. doi: 10.1021/acs.analchem.8b01043

NEVES-JUNIOR, W. F. P.; GRAEFF, C. F. O.; FERREIRA, M, MULATO, M.; BERNARDES, M. S.; COUTINHO-NETTO, J. Elastic properties of natural rubber tubes produced by dip-coating. **J. Appl. Polym. Science**, v. 1000, n. 1, 2006. doi: 10.1002/app.23416

OLIVEIRA, F. A. F. **O uso de membrana de látex natural como cobertura e auxílio da fusão intervertebral lombar**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) - Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2008.

ORTOLANI, E.; QUADRINI, F.; BELLISARIO, D.; SANTO, L.; POLIMENI, A.; SANTARSIERO, A. Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. **Ann. Ist. Super. Sanita.**, v. 51, n. 3, 2015. doi: 10.4415/ANN_15_03_11

OYANE, A.; KIM, H. M.; FURUYA, T.; KOKUBO, T.; MIYAZAKI, T.; NAKAMURA, T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 1, n. 65, 2003. doi: doi.org/10.1002/jbm.a.10482

PAJARINEN, J.; LIN, T.; GIBON, E.; KOHNO, Y.; MARUYAMA, M.; NATHAN, K.; LU, L.; YAO, Z.; GOODMAN, S. B. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. **Biomaterials**, v. 196, 2019. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.12.025

PAJARINEN, J.; LIN, T.; GIBON, E.; KOHNO, Y.; MARUYAMA, M.; NATHAN, K.; LU, L.; YAO, Z.; GOODMAN, S. B. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. **Biomaterials**, v. 196, 2019. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.12.025

PANCHISION, D. M.; CHEN, H. L.; PISTOLLATO, F.; PAPINI, D.; NI, H. T.; HAWLEY, T. S. Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24. **Stem Cells.**, v. 25, n. 6, 2007. doi: 10.1634/stemcells.2006-0260

PAPAGEORGIU, S. K.; KOUVELOU, E. P.; FAVVAS, E. P.; SAPALIDIS, A. A.; ROMANOS, G. E.; KATSAROS, F. K. Metal-carboxylate interactions in metal-alginate complexes studied with FTIR spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, v. 345, n. 4, 2010. doi: 10.1016/j.carres.2009.12.010

PARK, Y. J.; KU, Y.; CHUNG, C. P.; LEE, S. J. Controlled release of platelet-derived growth factor from porous poly(L-lactide) membranes for guided tissue regeneration. **J. Control. Release**, v. 51, n. 2-3, 1998. doi: 10.1016/S0168-3659(97)00169-7

PARK, Y. J.; LEE, Y. M.; PARK, S. N.; SHEEN, S. Y.; CHUNG, C. P.; LEE, S. J. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. **Biomaterials**, v. 21, n. 2, 2000. doi: 10.1016/S0142-9612(99)00143-X

PATEL, N.; LALWANI, D.; GOLLMER, S.; INJETI, E.; SARI, Y.; NESAMONY, J. Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. **Prog. Biomater.**, n. 5, n. 2, 2016. doi: 10.1007/s4020

PENG, S. Q.; ZHU, J. H.; LI, H. L.; TIAN, W. M. Cloning and characterization of a novel cysteine protease gene (HbCP1) from *Hevea brasiliensis*. **J. Biosci.**, v. 33, n. 5, 2008. doi: 10.1007/s12038-008-0088-6

PEREIRA, R. F.; CARVALHO, A.; GIL, M. H.; MENDES, A.; BÁRTOLO, P. J. Influence of Aloe vera on water absorption and enzymatic in vitro degradation of alginate hydrogel films. **Carbohydr. Polym.**, v. 98, n. 1, 2013. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.05.076

PEREIRA, R.; TOJEIRA, A.; VAZ, D. C.; MENDES, A.; BÁRTOLO, P. Preparation and characterization of films based on alginate and aloe vera. **Int. J. Polym. Anal. Ch.**, v. 16, n. 7, 2011. doi: 10.1080/1023666X.2011.599923

PFEILSCHIFTER, J.; OECHSNER, M.; NAUMANN, A.; GRONWALD, R. G.; MINNE, H. W.; ZIEGLER, R. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor β . **Endocrinology**, v. 127, n. 1, 1990. doi: 10.1210/endo-127-1-69

PICHAYAKORNA, W.; SUKSAEREEA, J.; BOONMEA, P.; AMNUAIKITA, T.; TAWEEPREDAB, W.; RITTHIDEJ, G. C. Nicotine transdermal patches using polymeric natural rubber as the matrix controlling system: Effect of polymer and plasticizer blends. **J Memb. Sc.**, v. 411-412, n. setembro, 2012. doi: 10.1016/j.memsci.2012.04.017

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomaterials: types, applications, and market. **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, 2015. doi: 10.5935/0100-4042.20150094

RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, 2012. doi: 10.3390/s120912347

RARO, V.; JOHNS, J. Thermal behavior of chitosan/natural rubber latex blends TG and DSC analysis. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 92, n. 3, 2008. doi: 10.1007/s10973-007-8854-

RENTSCH, C.; RENTSCH, B.; HEINEMANN, S.; BERNHARDT, R.; BISCHOFF, B.; FÖRSTER, Y.; SCHARNWEBER, D.; RAMMELT, S. (2014). ECM inspired coating of embroidered 3D scaffolds enhances calvaria bone regeneration. **BioMed Res. Int.**, v. 2014, 2014. doi: 10.1155/2014/217078

REZENDE, C. A.; BRAGANÇA, F. C.; DOI, T. R.; LEE, L. T.; GALEMBECK, F.; BOUÉ, F. Natural rubber-clay nanocomposites: mechanical and structural properties. **Polymer**, v. 51, n. 16, 2010. doi: 10.1016/j.polymer.2010.06.026

RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **LWT.**, v. 37, n. 3, 2004. doi: 10.1016/j.lwt.2003.09.008

RIAZ, U.; ASHRAF, S. M. Characterization of Polymer Blends with FTIR Spectroscopy. In: THOMAS, s.; GROHENS, Y.; Jyotishkumar, P. (eds). **Characterization of Polymer Blends**. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2015. Cap. 20, p. 625-678.

RIBEIRO, T. P.; SOUSA, T. R.; ARRUDA, A. S.; PEIXOTO, N.; GONÇALVES, P. J.; ALMEIDA, L. M. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of Hancornia speciosa latex in Allium cepa root model. **Braz. J. Biol.**, v. 76, n. 1, 2016. doi: 10.1590/1519-6984.20114

RIEGEL, I. C.; FREITAS, L. L. D. L.; SAMIOS, D. Envelhecimento físico de sistemas DGEBA/DDM investigado por análise térmica (DSC/DMA). **Polímeros**, v. 9, n. 3, 1999. doi: 10.1590/S0104-14281999000300011

RIPPEL, M. M. **Caracterização microestrutural de filmes e partículas de latex de borracha natural**. 2005. 319 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 2005.

RODRIGUES, L. B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estud. Tecnol. Eng.**, v. 9, n. 2, 2013. doi: 10.4013/ete.2013.92.02

ROSARIO, C.; RODRÍGUEZ-ÉVORA M.; REYES R.; DELGADO A.; ÉVORA C. BMP-2, PDGF-BB, and bone marrow mesenchymal cells in a macroporous β -TCP scaffold for critical-size bone defect repair in rats. **Biomed. Mater.**, v. 10, n. 4, 2015. doi: 10.1088/1748-6041/10/4/045008

SHAH, A. A.; HASAN, F.; SHAH, Z.; KANWAL, N.; ZEB, S. Biodegradation of natural and synthetic rubbers: a review. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, v. 83, n. september, 2013. doi: 10.1016/j.ibiod.2013.05.004

SILVA, L. E. K. **Avaliação in vitro e in vivo da capacidade antioxidante e antitumoral da fração C do látex de Hevea brasiliensis RRIM 600**. 2017. 106 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2017.

SILVA-JR, J. B. A.; PAULA, R. C.; FEITOSA, J. P.; GURGEL-FILHO, E. D.; MANIGLIA-FERREIRA, C.; SOUZA FILHO, F. J. In vivo aging of gutta-percha dental cone. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 100, n. 5, 2006. doi: 10.1002/app.23272

SOARES, J. D. P.; SANTOS, J. E.; CHIERICE, G. O.; CAVALHEIRO, E. T. G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. **Eclét. Quím.**, v. 29, n. 2, 2004. doi: 10.1590/S0100-46702004000200009

SRISUWAN, Y.; BAIMARK, Y. Preparation of biodegradable silk fibroin/alginate blend films for controlled release of antimicrobial drugs. **Adv. Mater. Sci. Eng.**, v. 2013, Article ID 412458. doi: 10.1155/2013/412458

STAMBOULIS, A.; BAILLIE, C. A.; PEIJS, T. Effects of environmental conditions on mechanical and physical properties of flax fibers. **Compos. Pt. A-Appl. Sci. Manuf.**, v. 32, n. 8, 2001. doi: 10.1016/S1359-835X(01)00032-X

TAL, H.; PITARU, S.; MOSES, O.; KOZLOVSKY, A. Collagen gel and membrane in guided tissue regeneration in periodontal fenestration defects in dogs. **J. Clin. Periodontol.**, v. 23, n. 1, 1996. doi: 10.1111/j.1600-051X.1996.tb00496.x

TROVATTI, E., CAPOTE, T., SCAREL-CAMINAGA, R., CARVALHO, A. J. F., & GANDINI, A. Development and characterization of natural rubber and bacterial cellulose-sponge composites. **World J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 4, n. 07, 2015.

TROVATTI, E.; CARVALHO, A. J.; RIBEIRO, S. J.; GANDINI, A. Simple Green Approach to Reinforce Natural Rubber with Bacterial Cellulose Nanofibers. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, 2013. doi: 10.1021/bm400523h

UEYAMA, Y.; ISHIKAWA, K.; MANO, T.; KOYAMA, T.; NAGATSUKA, H.; SUZUKI, K.; RYOKE, K. Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. **Biomaterials**, v. 23, n. 9, 2002. doi: 10.1016/S0142-9612(01)00332-5

UEYAMA, Y.; KOYAMA, T.; ISHIKAWA, K.; MANO, T.; OGAWA, Y.; NAGATSUKA, H.; SUZUKI, K. Comparison of ready-made and self-setting alginate membranes used as a barrier membrane for guided bone regeneration. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 17, n. 3, 2006. DOI: 10.1007/s10856-006-7315-1

UM, I. C.; PARK, Y. H. The effect of casting solvent on the structural characteristics and miscibility of regenerated silk fibroin/Poly(vinyl alcohol) blends. **Fiber Polym.**, v. 8, n. 6, 2007. 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.

VOLOVITZ, I.; SHAPIRA, N.; EZER, H.; GAFNI, A.; LUSTGARTEN, M.; ALTER, T.; BEN-HORIN, I.; BARZILAI, O.; SHAHAR, T.; KANNER, A.; FRIED, I.; VESHCHEV, I.; GROSSMAN, R.; RAM Z. A non-aggressive, highly efficient, enzymatic method for dissociation of human brain-tumors and brain-tissues to viable single-cells. **BMC Neurosci.**, v. 17, n. 1, 2016. doi: 10.1186/s12868-016-0262-y

WANG, W.; FERGUSON, D. J.; QUINN, J. M.; SIMPSON, A. H.; ATHANASOU, N. A. Biomaterial particle phagocytosis by bone-resorbing osteoclasts. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v. 79, n. 5, 1997. doi: 10.1302/0301-620X.79B5.7780

WONGTHEP, W.; SRITUILEONG, S.; MARTWISET, S.; AMNUAYPANICH, S. Grafting of poly(vinyl alcohol) on natural rubber latex particles. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 127, n. 1. 2012. doi: 10.1002/app.37829

WU, N.; LEE, Y.; SEGINA, D.; MURRAY, H.; WILCOX, T.; BOULANGER, L. Economic burden of illness among US patients experiencing fracture nonunion. **Orthop. Res. Rev.**, v. 2013, n. 5, 2013. 10.2147/ORR.S41123

YODTHONG, T.; KEDJARUNE-LEGGAT, U.; SMYTHE, C.; WITITSUWANNAKUL, R.; PITAKPORNPREECHA, T. I-Quebrachitol Promotes the Proliferation, Differentiation, and Mineralization of MC3T3-E1 Cells: Involvement of the BMP-

2/Runx2/MAPK/Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018. doi: 10.3390/molecules23123086

YOUNGSTROM, D. W.; SENOS, R.; ZONDERVAN, R. L.; BRODEUR, J. D.; LINTS, A. R.; YOUNG, D. R.; MITCHELL, T. L.; MOORE, M. E.; MYERS, M. H.; TSENG, W. J.; LOOMES, K. M.; HANKENSON, K. D. Intraoperative delivery of the Notch ligand Jagged-1 regenerates appendicular and craniofacial bone defects. **NPJ Regen. Med.**, v. 2, n. 1, 2017. doi: 10.1038/s41536-017-0037-9

YUN, J. K.; YOO, H. J.; KIM, H. D. Preparation and properties of waterborne polyurethane-urea/sodium alginate blends for high water vapor permeable coating materials. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 105, n. 3, 2007. doi: 10.1002/app.25731

ZABEU, J. L. A.; MERCADANTE, M. T. Bone graft substitutes compared to autologous bone graft in orthopedic surgery – Systematic literature review. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 43, n. 3, 2008. doi: 10.1590/S0102-36162008000200002

ZHANG, Y.; LECLERCQ, J.; MONTORO, P. Reactive oxygen species in Hevea brasiliensis latex and relevance to Tapping Panel Dryness. **Tree Physiol.**, v. 37, n. 2, 2017. doi: 10.1093/treephys/tpw106