

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a
partir de 19/05/2026

HELOÍSA HELENA NIMIA

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE
RATOS RECOBERTOS POR MEMBRANAS DE LATEX INCORPORADAS COM
BETA-TRICÁLCIO FOSFATO NAS ESCALAS MICROMÉTRICA E
NANOMÉTRICA**

**Araçatuba – SP
2025**

HELOÍSA HELENA NIMIA

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE
RATOS RECOBERTOS POR MEMBRANAS DE LATEX INCORPORADAS COM
BETA-TRICÁLCIO FOSFATO NAS ESCALAS MICROMÉTRICA E
NANOMÉTRICA**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biomateriais

Orientadora: Profa. Dra. Debora de Barros Barbosa

**Araçatuba – SP
2025**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

N713a	Nimia, Heloisa Helena. Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos recobertos por membranas de latex incorporadas com beta-tricálcio fosfato nas escalas micrométrica e manométrica / Heloisa Helena Nimia. – Araçatuba, 2025 59 f. : il. ; tab. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba Orientadora: Profa. Débora de Barros Barbosa 1. Regeneração óssea 2. Materiais biocompatíveis 3. Látex I. T. Black D15 CDD 617.695
-------	--

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DEDICO ESTE TRABALHO...

À **Deus**, por guiar o meu caminho, dando-me força, coragem e persistência para alcançar mais esta realização profissional.

A minha amada mãe **Maria José de Campos Nimia** (in memoriam), pessoa sem a qual não consigo imaginar concluir todo esse processo. Sempre me inspirou e esteve ao meu lado para conquistar os meus sonhos, me ensinou a ter fé em Deus e me fez forte e esperançosa e, em virtude disto, hoje me encontro onde estou. Muito obrigado por seu amor e dedicação a todos nós. É muito difícil sua ausência em uma etapa tão importante, mas tenho a certeza que continua intercedendo por nós.

Ao meu pai amado **Milton Nimia**, por todo amor, cuidado, paciência, ajuda e incentivo. Com você, aprendi valores importantes que alicerçam a minha vida.

Ao meu esposo, companheiro, amigo e professor, **Francisley Ávila Souza**, por compartilhar da vida comigo, acreditar no meu potencial, ser um grande incentivador e apoiador das minhas conquistas profissionais. Seu apoio é fundamental para o nosso crescimento. O seu amor e cuidado com a nossa família foram fundamentais para a concretização deste sonho.

Aos meus filhos queridos **Marina Nimia Ávila Souza** e **Eduardo Nimia Ávila Souza**, por serem a razão do meu viver e por tornarem a minha vida mais leve e cheia de sentido. Agradeço a compreensão das minhas ausências nesses anos de curso.

A minha irmã **Fernanda Cristina Nimia**, que está sempre ao meu lado. Quero agradecer por ser a luz que ilumina sempre meu caminho.

Ao meu irmão **Luís Gustavo Nimia**, pelo carinho e constante retaguarda oferecida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, **Profa. Dra. DEBORA DE BARROS BARBOSA**, pelo carinho, sabedoria, dedicação e paciência que teve comigo. Obrigada pela acolhida e transmissão de conhecimentos precisos durante todo meu desenvolvimento no curso de doutorado. Receba meu profundo respeito e admiração pelo profissionalismo e dedicação com que realiza suas atribuições.

Ao **Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI**, referência em biomateriais, obrigada por permitir eu trabalhar na pesquisa de seu Auxílio Regular a Pesquisa FAPESP como nossa pesquisa de Doutorado. Receba os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade oferecida.

Ao **Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO**, obrigada por ceder sua propriedade intelectual, as membranas de látex, e permitir a mudança no estudo experimental, naquele momento em que o experimento piloto da nossa pesquisa inicial não foi bem sucedida, com o uso da membrana de látex em animais submetidos a queimadura de segundo grau.

A BANCA EXAMINADORA desta Defesa de Tese composta pela Profa. Dra. DÉBORA DE BARROS BARBOSA, Prof. Dr. IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR, Profa. Dra. ROBERTA OKAMOTO, Prof. Dr. ALBANIR GABRIEL BORRASCA e Profa. Dra. VIVIAN CRISTINA NORONHA NOVAES. Obrigado por deixarem seus afazeres a fim de julgar e avaliar esta tese de doutorado. O nosso agradecimento e reconhecimento é de coração e acataremos todas as considerações realizadas. Nossa tese está mais bem redigida do ponto de vista científico após realizada as considerações dos Senhores e Senhoras Professores.

Ao **Prof. Dr. RODOLFO DEBONE PIAZA** obrigada por ter viabilizado esta pesquisa científica através da incorporação do beta-tricálcio fosfato nas membranas.

A **Profa. Dra. ROBERTA OKAMOTO** por mostrar-me que experiência, habilidade e simplicidade ajudam no conhecimento. A minha sincera gratidão pelos valiosos ensinamentos, pelo carinho e pelo exemplo de dedicação e competência.

Aos **PROFESSORES do DEPARTAMENTO DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS E PROTESE**, NA PESSOA DE SEU CHEFE Professor Titular Eduardo Piza Pellizer pela formação em pesquisa oferecida e por permitirem que esta pesquisa fosse realizada em suas dependências.

Aos **PROFESSORES do DEPARTAMENTO DE DIAGNÓSTICO E CIRURGIA**, NA PESSOA DE SUA CHEFE Profa. Dra. Daniela Atilé de Weert Brandini, por terem aberto as portas do Departamento para realização deste estudo e pela formação acadêmica proporcionada.

Aos **PROFESSORES da DISCIPLINA DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL E IMPLANTADONTIA**, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, Profa. Dra. Alessandra Aranega, Profa. Dra. Daniela Ponzoni, Profa. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza, obrigada pelo carinho que sempre me receberam no Departamento e Disciplina, bem como todo apoio, vocês são exemplos de dedicação e competência.

AO GRUPO DE PESQUISA Henrique Hadad, Ana Flávia Piquera Santos, Laís Kawamata de Jesus, Maisa Pereira da Silva, Paulo Matheus Honda, Maria Eduarda de Freitas Santana Oliveira, Harrisson Lucho Mamani Valeriano, Letícia Gabriella Rodrigues de Souza, Mateus Torres Silva, Nelson Padilha Silva, e Giovanini Sacilotto por sempre estarem presentes e terem me ajudado em cada etapa da pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

ÀS ALUNAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA Lilian Matos, Júlia Pietro Bão, Maria Fernanda Bessi, Anna Luisa Perri, Ana Laura Galvão e Brittnie Johnson, pela ajuda e compromisso com as pesquisas do grupo. Obrigada.

AS MINHAS AMIGAS PESSOAIS e COLEGAS DE TRABALHO, Profa. TERESA CRISTINA ALVISE, Profa. ISABELA BACELAR, Profa. LUCIANA JERONIMO E Profa. ELAINE CRISTINA FARIA com quem sempre pude contar nos momentos de alegrias e tristezas, onde sempre me apoiaram e por diversas vezes me ajudaram no trabalho diário.

Aos **SERVIDORES TÉCNICO-ADMINISTRATIVOS DO LABORATÓRIO DO DEPARTAMENTO DE DIAGNÓSTICO E CIRURGIA (LABORATÓRIO “PROFESSOR EMÉRITO TETUO OKAMOTO”)**: MARCO AURÉLIO DE OLIVEIRA IANNER, RENATO GOMES DE OLIVEIRA E PAULO ROBERTO GRATÃO, o meu agradecimento pelo feliz convívio e ajuda fornecida durante esses anos de pós-graduação. Meus agradecimentos por sempre me ajudarem nos trabalhos laboratoriais. Recebam minha profunda admiração.

Ao **AMIGO E INTERCESSOR PADRE ORIVALDO** que em todos os momentos da minha vida e da minha família está conosco. Obrigada padre, por seu constante apoio, orientação e palavras de sabedoria. Que o senhor continue sendo luz em nossos caminhos.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na pessoa de seus representantes, Senhor Diretor Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem e do Senhor Vice-Diretor Prof. Associado Luciano Tavares Ângelo Cintra, pela oportunidade de ser aluno desta tão renomada Instituição, onde cada um que faz parte tem consciência e faz jus ao legado que carrega.

A Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, campus Poços de Caldas – PUC-MINAS, na pessoa de seus representantes, Senhor Pró-Reitor, Prof. Dr. Iran Calixto Abraão e do Senhor Diretor Acadêmico, Prof. Dr. Márcio Leandro Gonçalves, por incentivar a realização deste Doutorado e permitir que este curso de Pós-graduação, Nível Doutorado fosse realizado com total apoio, seja intelectual, laboral e financeiro, proporcionando o Programa Permanente de Capacitação Docente (PPCD).

Ao Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa do Senhor Coordenador Prof. Associado Juliano Pelim Pessan, que proporcionou a oportunidade deste Doutorado e participou de minha formação na vida acadêmica e no eixo PESQUISA.

Ao Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa do Senhor Coordenador Prof. Titular Wirley Gonçalves Assunção, por permitir o intercâmbio de ideias e pesquisas, como a realizada neste Doutorado. Destaco também e agradeço pela participação na minha formação na vida acadêmica e no eixo PESQUISA.

Ao Instituto de Química de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IO/UNESP) em nome do Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica em nome do Pós Doutorando Rodolfo e do Grupo de Biomateriais sob coordenação do Professor Titular Antônio Carlos Guastaldi.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho em nome do Prof. Dr. Élcio Marcantonio Júnior, das Técnicas de Laboratório Sra. Suleima Ferreira e Sra. Amanda Menezes Leite, ambas do Laboratório Multiusuário de Imagens da FOAr-UNESP, por meio

do equipamento Sistema EXAKT de cortes não-descalcificados; e em nome da Dra. Paula Aboud Barbugli do equipamento Microscópio de Fluorescência Multifocal.

Ao **Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** – FOA/UNESP, e ao Sr. João Batista Alves Correa, responsável pelo suporte, apoio e amizade no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao **Laboratório Multiusuário da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** - Sala de Microtomografia Computadorizada (FINEP/CT INFRA 01.12.0530.00) na pessoa da Senhora Natália Yoshie Ikegami pela realização da análise microtomográfica.

**Busquem, pois, em primeiro lugar o Reino de Deus e a sua justiça,
e todas essas coisas lhes serão acrescentadas.**

Mateus 6,33

RESUMO

Nimia HH. Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos recobertos por membranas de látex incorporadas com beta-tricálcio fosfato nas escalas micrométrica e nanométrica [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2025.

A funcionalização de membranas por meio da incorporação de cerâmicas de fosfato de cálcio com intuito de potencializar as propriedades biológicas no processo de reparo ósseo por meio do princípio de osteopromoção tem sido foco de novos estudos para o desenvolvimento de biomateriais. O objetivo deste trabalho foi determinar o nível de biocompatibilidade, bem como avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos críticos tratados com membrana de látex incorporada ou não com beta-tricálcio fosfato (β -TCP) nas escalas micrométricas e nanométricas. Foi realizada a análise da viabilidade celular em fibroblastos dérmicos humanos primários. Para o estudo pré-clínico experimental foram utilizados 96 ratos *wistar* e em cada animal foi criado um defeito crítico de 6 mm em sua calvária. Os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com a terapêutica a ser empregada para o defeito crítico: apenas coágulo sanguíneo (GC), membrana de látex (ML), membrana de látex + β -TCP micropartículas (Micro), membrana de látex + β -TCP nano partículas (Nano). Os animais foram eutanasiados após 15, 30 e 60 dias. As peças foram submetidas à análise microtomográfica, avaliando os parâmetros volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th) e separação (Tb.Sp) e número (Tb.N) de trabéculas, seguidas do processamento para inclusão em resina fotopolimerizável Technovit® e posterior análise confocal a laser, no intuito de mensurar a taxa de aposição mineral. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5%. As membranas apresentaram viabilidade celular, com exceção de ML em altas concentrações que apresentou resultados inferiores ao controle negativo e a incorporação do beta-tricálcio fosfato nas escalas micro ou nanométricas modulou favoravelmente a resposta celular ao longo do tempo. Para os parâmetros BV e BV/TV foi observado diferença estatística entre Micro e ML vs GC nos períodos de 30 e 60 dias, enquanto no parâmetro separação trabecular houve diferenças entre Nano vs GC no período de 15 dias. A taxa de aposição mineral dos grupos micro e nano foram estatisticamente superiores a GC em 15 dias e ao grupo ML em 15 e 30 dias. Diante dos resultados obtidos conclui-se que as membranas de látex com ou sem incorporação de beta-tricálcio fosfato nas escalas nano ou micrométricas

foram biocompatíveis e favoreceram a deposição e aposição mineral ósseas nos defeitos críticos em calvária de ratos.

Palavras-chave: regeneração óssea; materiais biocompatíveis; membrana; látex.

ABSTRACT

Nimia HH. Evaluation of bone healing of critical defects in the calvary of rats coated by latex membranes incorporated with beta-tricalcium phosphate at the micrometric and nanometric scale [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2025.

The functionalization of membranes through the incorporation of calcium phosphate ceramics in order to enhance the biological properties in the bone repair process through the principle of osteopromotion has been the focus of new studies for the development of biomaterials. The objective of this study was determine the level of biocompatibility, as well as evaluate the bone repair process in critical defects treated with a latex membrane incorporated or not with beta-tricalcium phosphate (β -TCP) at the micrometric and nanometric scales. The cell viability analysis was performed in primary human dermal fibroblasts. For the experimental preclinical study, 96 Wistar rats were used and a critical defect of 6 mm was created in each animal's calvaria. The animals were divided into 4 groups according to the therapy to be used for the critical defect: blood clot only (GC), latex membrane (ML), latex membrane + β -TCP microparticles (Micro), latex membrane + β -TCP nanoparticles (Nano). The animals were euthanized after 15, 30 and 60 days. The specimens were subjected to microtomographic analysis, evaluating the parameters bone volume (BV), percentage of bone volume (BV/TV), trabecular bone thickness (Tb.Th) and separation (Tb.Sp) and number (Tb.N) of trabeculae, followed by processing for inclusion in Technovit® photopolymerizable resin and subsequent confocal laser analysis, in order to measure the mineral apposition rate. The data obtained were subjected to statistical analysis with a significance level of 5%. The membranes showed cell viability, except for ML at high concentrations, which presented results inferior to the negative control, and the incorporation of beta-tricalcium phosphate at micro or nanometric scales favorably modulated the cellular response over time. For the BV and BV/TV parameters, a statistical difference was observed between Micro and ML vs GC in the periods of 30 and 60 days, while in the trabecular separation parameter there were differences between Nano vs GC in the period of 15 days. The mineral apposition rate of the micro and nano groups was statistically higher than GC in 15 days and then the ML group in 15 and 30 days. Given the results obtained, it is concluded that the latex membranes with or without incorporation of beta-tricalcium phosphate in the nano or micrometric scales were biocompatible and favored bone mineral deposition and apposition in critical defects in rat calvaria.

Keywords: bone regeneration; biocompatible materials; membrane; latex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da síntese para a obtenção do fosfato de cálcio	24
Figura 2 - A) Ilustração do planejamento de estimulação; B) Ilustração da interpretação da análise de viabilidade celular	27
Figura 3 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas: látex natural (ML), látex com Beta-tricálcio fosfato microestruturado (Micro) e látex com Beta-tricálcio fosfato nanoestruturado (Nano), nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C)	34
Figura 4 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro BV na análise por MicroCT. ‖ representa diferença estatística entre os grupos	41
Figura 5 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro BV/TV na análise por MicroCT. ‖ representa diferença estatística entre os grupos	42
Figura 6 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro tb.sp na análise por MicroCT. ‖ representa diferença estatística entre os grupos	43
Figura 7 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro tb.th na análise por MicroCT	44
Figura 8 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro tb.n na análise por MicroCT	45
Figura 9 - Imagens representativas da reconstrução em 3D dos diferentes grupos nos períodos de 15, 30 e 60 dias	46
Figura 10 - Gráfico representativo das médias de mineralização óssea/dia de acordo com os grupos e períodos avaliados nesse estudo. ($p < 0,0001$)	47
Figura 11 - Imagens do defeito crítico da calota com a presença de coágulo e membranas obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. Imagens evidenciando área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde) e com fluorocromo alizarina (vermelho)	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 24 h	35
Tabela 2 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 48 h	37
Tabela 3 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 72 h	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
ANOVA	Análise de variância
BIC	Extensão linear de contato osso-dispositivo (Bone implant contact)
BV	Volume Ósseo
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
C	Carbono
Ca	Cálcio
CO ₂	Gás Carbônico
cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Ctan	Ct-analyser
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
MAR	Taxa de aposição mineral
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg/Kg	Miligrama por quilo
mg/kg/dia	Miligrama-kilo dia
mg/L	Miligrama por Litro
Micro-CT	Micro tomografia computadorizada
ml	Mililitros
ml/Kg	Mililitro por quilo
mm	Milímetro
Mol.L-1	Mol Litro
N	Nitrogênio
N.cm	Newton por centímetro
Na	Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NBA	Área de osso neoformado (Newly bone formation)
O	Oxigênio
°C	Graus Celsius
p	Nível de significância

P	Fósforo
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
ph	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido Polilático
PLLA	Poli-L-Lactídeo
PDLA	Poli-D-Lactídeo
PLDLLA	Poli (L-lactide-co-D,L-lactide)
PGA	Ácido Poli-Glicólico
PDS	Poli dioxanona
PVP-I	Polivinilpirrolidona - Iodo
ROI	Área ao redor do implante
Rpm	Rotações por minuto
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação das trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular do osso
TC	Tomografia computadorizada
Ti	Titânio
μm	Micrômetro
μA	Micro ampere

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivo Específico	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Síntese do β -TCP pelo método de secagem do sol-gel	23
3.2 Extração e preparação do látex natural (LN)	24
3.3 Incorporação do β -TCP nas membranas pelo método Biomimético	25
3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria de Energia Dispersiva de raios X (EDS)	25
3.5 Análise de viabilidade celular	26
3.6 Animais e Grupos Experimentais	27
3.7 Procedimento Cirúrgico	28
3.8 Eutanásia e Coleta das Amostras	29
3.9 Microtomografia Computadorizada (micro-CT)	29
3.10 Preparação do Material para Análise Confocal a Laser	30
3.11 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Viabilidade Celular	32
4.2 Análise Microtomográfica	41
4.2.1 Volume Ósseo (BV)	41
4.2.2 Porcentagem de Volume Ósseo (BV/TV)	42
4.2.3 Separação trabecular	43
4.2.4 Espessura trabecular	44
4.2.5 Número de trabéculas	45
4.2.6 Análise Qualitativa	45
4.3 Microscopia confocal a laser	47
4.3.1 Taxa de aposição mineral (MAR)	47
4.3.2 Análise qualitativa	48
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea guiada (ROG) surgiu como uma abordagem terapêutica destinada a estimular o crescimento ósseo, utilizando membranas como barreiras físicas [1]. Estudos experimentais indicaram, de forma significativa, que a formação de osso é substancialmente favorecida quando a penetração de tecidos moles no local do defeito ósseo é impedida por meios mecânicos [2,3].

As membranas atuam na proteção do coágulo sanguíneo, elemento essencial para o processo de regeneração óssea. Elas também contribuem para a diminuição da atividade de células osteoclásticas, provenientes da vascularização dos tecidos moles adjacentes, favorecendo, assim, a formação óssea nos estágios iniciais da cicatrização [4]. Evidências adicionais sugerem que a ação das membranas vai além de sua função como barreira física; elas podem também estimular diretamente a regeneração óssea no defeito subjacente. Essa atividade biológica pode estar relacionada ao recrutamento celular, à indução da angiogênese e à remodelação óssea, resultando na substituição do defeito por tecido ósseo maduro [5].

A eficácia clínica do uso isolado da membrana como barreira já foi comprovada, sendo observada uma maior formação óssea em áreas de fenestração óssea ao redor de implantes de titânio tratadas com membranas, quando comparadas a locais controle, nos quais as fenestrações foram deixadas apenas sob o periósteo, sem a utilização de membrana [6].

Diversos materiais, tanto sintéticos quanto de origem natural, absorvíveis ou não, têm sido empregados clinicamente como membranas na ROG [7-10]. Para além das funções oclusivas e bioestimuladoras, a biocompatibilidade representa um requisito fundamental, a fim de assegurar que os eventos biológicos envolvidos na reparação tecidual ocorram de forma adequada, sem interferência negativa da composição do material. O biomaterial utilizado deve induzir uma resposta tecidual apropriada, de modo que sua interação com os tecidos não comprometa a cicatrização, a integridade das estruturas adjacentes ou a segurança do paciente [11].

Nesse cenário, o látex se destaca por possuir propriedades compatíveis com as exigências biológicas do processo de reparação tecidual. Derivado da árvore *Hevea brasiliensis*, esse material tem se mostrado biocompatível e promissor em diversas aplicações biomédicas [12-15], combinando alta resistência mecânica com baixo custo, o que favorece sua utilização na área da saúde. Um estudo anterior [16] evidenciou que as membranas de látex são capazes de modular sua porosidade mediante a incorporação de diferentes volumes

de água, estabelecendo uma correlação entre a porosidade ajustada e a liberação controlada de fármacos. Ressalta-se que esse controle na fabricação é fundamental para assegurar que o material apresente características ideais para aplicação *in vivo*, favorecendo a liberação eficiente de substâncias incorporadas, ao mesmo tempo em que a pesquisa se alinha aos princípios dos 3Rs (redução, refinamento e substituição) no uso de animais de laboratório. Embora a porosidade específica não seja um requisito indispensável para sua aplicação em regeneração óssea guiada, essa característica pode contribuir para a melhoria dos resultados regenerativos [5].

Um estudo anterior [17], utilizando um modelo *in vivo* de defeitos críticos na calvária de coelhos, observou uma formação óssea mais expressiva nos grupos tratados com membranas de látex em comparação aos grupos controle (sem membrana), sugerindo o potencial do uso isolado dessas membranas, sem a associação com enxertos ou substitutos ósseos em procedimentos de ROG. Buscando não apenas explorar a função oclusiva da membrana, mas também potencializar seus efeitos biológicos recentemente identificados, como o recrutamento celular, a indução da angiogênese e a interação direta com os processos de formação e remodelação óssea, diferentes substâncias bioativas têm sido incorporadas às membranas [18–22]. Essas substâncias apresentam efeitos pleiotrópicos, propriedades antimicrobianas ou ações específicas na promoção da reparação óssea.

Os fosfatos de cálcio (Ca-P) despontam como promissores biomateriais para o futuro, devido à sua segurança, abundância natural no organismo, boa integração com os tecidos e possibilidade de produção em larga escala com baixo custo [23]. Dentre esses compostos, o beta-tricálcico fosfato (β -TCP) apresenta características particulares em relação aos demais fosfatos de cálcio [24], destacando-se por suas propriedades osteocondutivas e osteoindutivas [25,26]. Nos últimos anos, o β -TCP tem ganhado relevância como um dos substitutos ósseos mais promissores, graças à sua síntese laboratorial controlada e à combinação de osteocondução, osteoindução e reabsorção celular [27].

A propriedade osteocondutiva do β -TCP foi investigada em estudo anterior [28], que mostrou uma energia de ligação óssea significativamente maior para o β -TCP em comparação à hidroxiapatita após 10 semanas de implantação. Além disso, é importante destacar que parte dos íons de cálcio liberados durante a reabsorção do β -TCP participa ativamente na formação do novo tecido ósseo [29]. A estrutura do material, fundamental para a regeneração tecidual, é amplamente avaliada na engenharia de tecidos, podendo influenciar diretamente o desempenho dos biomateriais aplicados na regeneração óssea. Sua conformação microporosa

contribui para a sobrevivência celular ao oferecer suporte às necessidades de transporte de massa essenciais para a nutrição, adesão e migração das células [30], enquanto poros com diâmetro superior a 300 μm favorecem a neovascularização [31,32].

Por outro lado, a utilização de materiais em escala nanométrica pode potencializar as propriedades regenerativas dos scaffolds, promovendo maior osteoindução e melhor estabilidade mecânica [33]. A fabricação de nanocompósitos de poli-L-ácido láctico (PLLA) incorporando nanopartículas de β -TCP como elementos estruturais mostraram efeitos positivos sobre a porosidade, o módulo de compressão, o perfil de adsorção de proteínas e a adesão de osteoblastos [34]. Diante da significativa demanda e dos desafios envolvidos na regeneração óssea de defeitos extensos, tanto na odontologia quanto na medicina, a otimização do processo de formação e reparo ósseo com materiais acessíveis, de fácil manuseio e alta eficácia é crucial para o sucesso das terapias de reabilitação [35]. Com base nisso, o presente estudo teve como objetivo determinar primariamente o nível de biocompatibilidade das membranas, bem como avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos críticos tratados com membrana de látex incorporada ou não com beta-tricálcio fosfato (β -TCP) nas escalas micrométricas e nanométricas. A hipótese nula testada foi de que a funcionalização da membrana de látex com beta-tricálcio fosfato nas escalas micro e nanométricas não promove melhorias na deposição mineral em defeitos críticos.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que a incorporação do β -TCP nas escalas micrométrica e nanométrica na membrana de látex melhorou o equilíbrio entre bioatividade e segurança celular e permitiu maiores níveis de deposição mineral e aposição mineral óssea durante o processo de reparo de defeitos críticos em calvária de ratos e quando a incorporação foi na escala nanométrica a aposição mineral foi potencializada.

REFERÊNCIAS

1. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988 May;81(5):672-6. doi: 10.1097/00006534-198805000-00004.
2. Melcher AH. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. *Arch Oral Biol.* 1969 Sep;14(9):1101-9. doi: 10.1016/0003-9969(69)90079-x.
3. Kahnberg KE. Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiosteally implanted Teflon mantle leaf. *Int J Oral Surg.* 1979 Dec;8(6):449-56. doi: 10.1016/s0300-9785(79)80084-8.
4. Omar O, Elgali I, Dahlin C, Thomsen P. Barrier membranes: more than the barrier effect? *J Clin Periodontol.* 2019 Jun;46 Suppl 21(Suppl 21):103-23. doi: 10.1111/jcpe.13068.
5. Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, Artzi Z, Bozic D, Calciolari E, et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *J Clin Periodontol.* 2019 Jun;46 Suppl 21:82-91. doi: 10.1111/jcpe.13123..
6. Dahlin C, Andersson L, Linde A. Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. *Clin Oral Implants Res.* 1991 Oct-Dec;2(4):159-65. doi: 10.1034/j.1600-0501.1991.020401.x.
7. Jardini MA, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Dec;100(6):666-73. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.03.020.
8. Ahn YS, Kim SG, Kim CS, Oh JS, Lim SC. Effect of guided bone regeneration with or without pericardium bioabsorbable membrane on bone formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Nov;114(5 Suppl):S126-31. doi: 10.1016/j.oooo.2011.08.008.
9. Jung UW, Lee JS, Lee G, Lee IK, Hwang JW, Kim MS, et al. Role of collagen membrane in lateral onlay grafting with bovine hydroxyapatite incorporated with collagen matrix in dogs. *J Periodontal Implant Sci.* 2013 Apr;43(2):64-71. doi: 10.5051/jpis.2013.43.2.64.
10. Ramalingam S, Al-Rasheed A, ArRejaie A, Nooh N, Al-Kindi M, Al-Hezaimi K. Guided bone regeneration in standardized calvarial defects using beta-tricalcium phosphate

and collagen membrane: a real-time in vivo micro-computed tomographic experiment in rats. *Odontology*. 2016 May;104(2):199-210. doi: 10.1007/s10266-015-0211-8.

11. Williams DF. Biocompatibility pathways: biomaterials-induced sterile inflammation, mechanotransduction, and principles of biocompatibility control. *ACS Biomater Sci Eng*. 2017 Jan;3(1):2-35. doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00607.

12. Herculano RD, Silva CP, Ereno C, Guimaraes SAC, Kinoshita A, Graeff CFDO. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). *Mater Res*. 2009 Apr;12(2):253-6. doi: 10.1590/S1516-14392009000200023.

13. Borges FA, Almeida Filho E, Miranda MC, Santos ML, Herculano RD, Guastaldi AC. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2015;26(17):1256-68. doi: 10.1080/09205063.2015.1086945.

14. Zancanela DC, Funari CS, Herculano RD, Mello VM, Rodrigues CM, Borges FA, et al. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: physical-chemistry and antimicrobial behaviours. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Apr;97:576-82. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.042.

15. Carlos BL, Yamanaka JS, Yanagihara GR, Macedo AP, Watanabe PCA, Issa JPM, et al. Effects of latex membrane on guided regeneration of long bones. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2019 Oct;30(14):1291-307. doi: 10.1080/09205063.2019.1627653.

16. Miranda M, Prezotti FG, Borges FA, Barros NR, Cury B, Herculano RD, et al. Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. *J Biomater Sci Polymer Ed*. 2017;28(18):2117-130. doi: 10.1080/09205063.2017.1377024.

17. Ereno C, Guimarães SA, Pasetto S, Herculano RD, Silva CP, Graeff CF, et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Dec;95(3):932-9. doi: 10.1002/jbm.a.32919.

18. Park YJ, Lee YM, Park SN, Lee JY, Ku Y, Chung CP, et al. Enhanced guided bone regeneration by controlled tetracycline release from poly(L-lactide) barrier membranes. *J Biomed Mater Res*. 2000 Sep;51(3):391-7. doi: 10.1002/1097-4636(20000905)51:3<391::aid-jbm13>3.0.co;2-9.

19. Piao ZG, Kim JS, Son JS, Lee SY, Fang XH, Oh JS, et al. Osteogenic evaluation of collagen membrane containing drug-loaded polymeric microparticles in a rat calvarial defect model. *Tissue Eng Part A*. 2014 Dec;20(23-24):3322-31. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0717..
20. Shim JH, Yoon MC, Jeong CM, Jang J, Jeong SI, Cho DW, et al. 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*. 2014 Nov;9(6):065006. doi: 10.1088/1748-6041/9/6/065006..
21. Jo JY, Jeong SI, Shin YM, Kang SS, Kim SE, Jeong CM, et al. Sequential delivery of BMP-2 and BMP-7 for bone regeneration using a heparinized collagen membrane. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Jul;44(7):921-8. doi: 10.1016/j.ijom.2015.02.015.
22. Kütan E, Duygu-Çapar G, Özçakır-Tomruk C, Dilek OC, Özen F, Erdoğan Ö, et al. Efficacy of doxycycline release collagen membrane on surgically created and contaminated defects in rat tibiae: a histopathological and microbiological study. *Arch Oral Biol*. 2016 Mar;63:15-21. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.11.001.
23. Habraken W, Habibovic P, Epple M, Böhner M. Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future? *Mater. Today*. 2016 Mar;19(2):69–87. doi: 10.1016/j.mattod.2015.10.008.
24. Gao P, Zhang H, Liu Y, Fan B, Li X, Xiao X, et al. Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo. *Sci. Rep*. 2016;6:23367. doi: 10.1038/srep23367.
25. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater*. 2013 Sep;9(9):8037-45. doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.014.
26. Baheiraei N, Nourani MR, Mortazavi SMJ, Movahedin M, Eyni H, Bagheri F, et al. Development of a bioactive porous collagen/ β -tricalcium phosphate bone graft assisting rapid vascularization for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 2018 Jan;106(1):73-85. doi: 10.1002/jbm.a.36207.
27. Böhner M, Santoni BLG, Döbelin N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater*. 2020 Sep;113:23-41. doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.022.

28. Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T, Kotani S, Kokubo T, Takeuchi H. Four calcium phosphate ceramics as bone substitutes for non-weight-bearing. *Biomaterials*. 1993 Feb;14(3):216-24. doi: 10.1016/0142-9612(93)90026-x.
29. Le Huec JC, Clément D, Brouillaud B, Barthe N, Dupuy B, Foliguet B, et al. Evolution of the local calcium content around irradiated beta-tricalcium phosphate ceramic implants: in vivo study in the rabbit. *Biomaterials*. 1998 Apr-May;19(7-9):733-8. doi: 10.1016/s0142-9612(97)00189-0.
30. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*. 2005 Jul;4(7):518-24. doi: 10.1038/nmat1421.
31. de Wild M, Amacher F, Bradbury CR, Molenberg A. Investigation of structural resorption behavior of biphasic bioceramics with help of gravimetry, μ CT, SEM, and XRD. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Apr;104(3):546-53. doi: 10.1002/jbm.b.33419
32. Kapat K, Srivas PK, Rameshbabu AP, Maity PP, Jana S, Dutta J, et al. Influence of porosity and pore-size distribution in $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ Foam on physicommechanical properties, osteogenesis, and quantitative validation of bone ingrowth by micro-computed tomography. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Nov;9(45):39235-48. doi: 10.1021/acsami.7b13960.
33. Zhu L, Luo D, Liu Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *Int J Oral Sci*. 2020 Feb;12(1):6. doi: 10.1038/s41368-020-0073-y.
34. Lou T, Wang X, Song G, Gu Z, Yang Z. Structure and properties of PLLA/ β -TCP nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Jan;26(1):5366. doi: 10.1007/s10856-014-5366-2.
35. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7. doi: 10.1016/j.injury.2005.07.029.
36. Piazza DB, Pinto GC, VM, Herculano RD, Santos LS, Primo FL, Fernandes MA, et al. Size-controlled hydroxyapatite particle nucleation in natural rubber latex membranes. *Mater Chem Phys*. 2025 Jun;337:130606, doi: 10.1016/j.matchemphys.2025.130606.
37. Herculano RD, Mussagy CU, Guerra NB, Brasil GSP, Floriano JF, Burd BS, et al. Recent advances and perspectives on natural latex serum and its fractions for biomedical applications. *Biomater Adv*. 2024 Feb;157:213739. doi: 10.1016/j.bioadv.2023.213739.

38. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
39. Costa-Rodrigues J, Silva A, Santos C, Almeida MM, Costa ME, Fernandes MH. Complex effect of hydroxyapatite nanoparticles on the differentiation and functional activity of human pre-osteoclastic cells. *J Biomed Nanotechnol.* 2014 Dec;10(12):3590-600. doi: 10.1166/jbn.2014.1873.
40. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2013;28(1):2-17. doi: 10.1002/jbmr.1805.
41. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg.* 1991 Mar;74(3):487-91. doi: 10.3171/jns.1991.74.3.0487.
42. Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurstam K, Sundin Y. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol.* 1993 Nov;64(11 Suppl):1116-28. doi: 10.1902/jop.1993.64.11s.1116.
43. Dahlin C, Sandberg E, Alberius P, Linde A. Restoration of mandibular nonunion bone defects. An experimental study in rats using an osteopromotive membrane method. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1994 Aug;23(4):237-42. doi: 10.1016/s0901-5027(05)80378-9.
44. Moura JM, Ferreira JF, Marques L, Holgado L, Graeff CF, Kinoshita A. Comparison of the performance of natural latex membranes prepared with different procedures and PTFE membrane in guided bone regeneration (GBR) in rabbits. *J Mater Sci Mater Med.* 2014 Sep;25(9):2111-20. doi: 10.1007/s10856-014-5241-1.
45. Puttini IO, Poli PP, Maiorana C, Vasconcelos IR, Schmidt LE, Colombo LT, et al. Evaluation of osteoconduction of biphasic calcium phosphate ceramic in the calvaria of rats: microscopic and histometric analysis. *J Funct Biomater.* 2019 Jan;10(1):7. doi: 10.3390/jfb10010007.
46. Schmidt LE, Hadad H, Vasconcelos IR, Colombo LT, Silva RC, Santos AFP, et al. Critical defect healing assessment in rat calvaria filled with injectable calcium phosphate cement. *J Funct Biomater.* 2019;10(2):21. doi: 10.3390/jfb10020021.

47. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med.* 2012 Jul;10:81. doi: 10.1186/1741-7015-10-81.
48. Ferreira M, Mendonça RJ, Coutinho-Netto J, Mulato M. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Braz J Phys.* 2009 Sep;39(3):564-9. doi: 10.1590/S0103-97332009000500010.
49. Mrue F, Coutinho Netto J, Ceneviva R, Lachat JJ, Thomazini JA, Tambelini H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Mat Res.* 2004 Apr;7(2):277–83. doi: 10.1590/S1516-14392004000200010.
50. Pegorin GS, Leite MN, Antoniassi M, Chagas ALD, Santana LA, Garms BC, et al. Physico-chemical characterization and tissue healing changes by *Hancornia speciosa* Gomes latex biomembrane. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021 Jul;109(7):938-48. doi: 10.1002/jbm.b.34758.
51. Nascimento RM, Fata FL, Agostini DL, Job AE, Guimarães FE, Bechtold IH. Production and characterization of natural rubber-Ca/P blends for biomedical purposes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014 Jun;39:29-34. doi: 10.1016/j.msec.2014.02.019
52. Retzepi M, Donos N. Guided bone regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jun;21(6):567-76. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01922.x.