

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2019.

UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO TOXICOLÓGICO
EM MÉTODOS ALTERNATIVOS DOS COMPÓSITOS
À BASE DE LÁTEX NATURAL E FOSFATOS DE
CÁLCIO PARA REPARAÇÃO ÓSSEA**

Matheus Carlos Romeiro Miranda

Tese de doutorado

2018

MATHEUS CARLOS ROMEIRO MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO TOXICOLÓGICO EM
MÉTODOS ALTERNATIVOS DOS COMPÓSITOS À BASE DE
LÁTEX NATURAL E FOSFATOS DE CÁLCIO PARA
REPARAÇÃO ÓSSEA**

**Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, com parte
dos requisitos para a obtenção do título
de doutor em Biotecnologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano
Coorientadores: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
Prof. Dr. Ricardo José de Mendonça**

**Araraquara
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

M672d Miranda, Matheus Carlos Romeiro
Desenvolvimento e estudo toxicológico em métodos
alternativos dos compósitos à base de látex natural e fosfatos de
cálcio para reparação óssea / Matheus Carlos Romeiro Miranda. –
Araraquara : [s.n.], 2018
112 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano
Coorientador: Eduardo Maffud Cilli
Coorientador: Ricardo José de Mendonça

1. Materiais biomédicos. 2. Compósitos poliméricos. 3. Látex.
4. Fosfato de cálcio. 5. Regeneração óssea. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento e estudo toxicológico em métodos alternativos dos compósitos à base de látex natural e fosfatos de cálcio para reparação óssea"

AUTOR: MATHEUS CARLOS ROMEIRO MIRANDA

ORIENTADOR: RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

COORIENTADOR: RICARDO JOSÉ MENDONÇA

COORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

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



Profa. Dra. ANA MARIA MINARELLI GASPAR

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



Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ANTONIO CARLOS SHIMANO

Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor / Faculdade de Medicina - USP - Ribeirão Preto



Profa. Dra. CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA

Departamento de Engenharia de Materiais / Faculdade de Engenharia Mecânica - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 27 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES

Matheus Carlos Romeiro Miranda

Formação acadêmica/titulação

- 2014 - Atual** Doutorado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil. Com **período sanduíche** na Universidad de Salamanca (Orientadora: Prof. Dr^a Esther Del Olmo Fernandez)
Título: Avaliação da liberação sustentada de fases de fosfato de cálcio empregando membranas de látex natural como suporte.
Orientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano
Coorientadores: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli / Prof. Dr. Ricardo José de Mendonça

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- 2012 - 2014** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Obtenção e estudos físico-químicos de biomembranas conjugadas de látex e peptídeos bioativos, Ano de obtenção: 2014.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
Coorientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- 2006 - 2010** Graduação em Ciências - Habilitação plena em biologia.
Centro Universitário Barão de Mauá, CBM, Ribeirão Preto, Brasil.

Publicações

1. **MIRANDA, M. C. R.**; BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; SANTOS FILHO, N. A.; MENDONÇA, R. J.; HERCULANO, R. D.; CILLI, E. M.
Evaluation of peptides release using a natural rubber latex biomembrane as a carrier. AMINO ACIDS. p.1 - 9, 2018.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00726-017-2534-y>
2. ESCARCENA, R.; **MIRANDA, M.**; PEZ-PEREZ, J. L.; FELICIANO, A. S.; MARTINEZ-VALLADARES, M.; E.-BALLESTEROS, M.; R.-VAZQUEZ, F. A.; B.-FOUCE, R.; OLMO, E. Actividad antiparasitaria de derivados de compuestos naturales. REVISTA LATINOAMERICANA DE QUÍMICA. v.2017, p.293 - 293, 2017.

3. BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; **MIRANDA, M. C. R.**; GARMS, B.; GEMEINDER, JOSÉ LÚCIO PÁDUA; SILVA, R. F.; Ribeiro-Paes, J. T.; Alves, K. A.; HERCULANO, R. D. Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE. v.134, p.45321, 2017.

<http://dx.doi.org/10.1002/app.45321>

4. GARMS, B.; dos Santos, Rachid E.; BARROS, N. R.; BORGES, F. A.; **MIRANDA, M. C. R.**; Oliveira, B. H.; Drago, Bruno C.; Gomes de Lima, V.M.; et al; HERCULANO, R. D. Characterization and Microbiological Application of Ciprofloxacin Loaded in Natural Rubber Latex Membranes. BRITISH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH. v.15, p.1 - 10, 2017.

<http://dx.doi.org/10.9734/BJPR/2017/31614>

5. DE BARROS, NATAN ROBERTO; **MIRANDA, MATHEUS CARLOS ROMEIRO**; BORGES, FELIPE AZEVEDO; GEMEINDER, JOSÉ LÚCIO PÁDUA; DE MENDONÇA, RICARDO JOSÉ; CILLI, EDUARDO MAFFUD; HERCULANO, RONDINELLI DONIZETTI. Natural rubber latex: Development and in vitro characterization of a future transdermal patch for enuresis treatment. INTERNATIONAL JOURNAL OF POLYMERIC MATERIALS, 2017.

<http://dx.doi.org/10.1080/00914037.2017.1280795>

6. **MIRANDA, M. C. R.**; PREZOTTI, F. G.; BORGES, F. A.; BARROS, N.; CURY, B.; HERCULANO, R. D.; CILLI, E. M. Porosity effects of natural latex Hevea brasiliensis on release of compounds for biomedical applications. JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE-POLYMER EDITION. 28(18), 2117-2130.

<http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2017.1377024>

7. ITO, SHURI; BARCHI, AUGUSTO CÉSAR; ESCARAMBONI, BRUNA; DE OLIVA NETO, PEDRO; HERCULANO, RONDINELLI DONIZETTI; AZEVEDO BORGES, FELIPE; **ROMEIRO MIRANDA, MATHEUS CARLOS**; FERNÁNDEZ NÚÑEZ, EUTIMIO GUSTAVO. UV/Vis spectroscopy combined with chemometrics for monitoring solid-state fermentation with Rhizopus microsporus var. oligosporus. JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. 2017.

<http://dx.doi.org/10.1002/jctb.5271>

8. BARCHI, A. C.; ITO, S.; ESCARAMBONI, B.; **MIRANDA, M.**; OLIVA NETO, P.; HERCULANO, R.; PASSALIA, F.; ROCHA, J. C.; NUNEZ, E. G. F. Artificial intelligence approach based on near-infrared spectral data for monitoring of solid-state fermentation. PROCESS BIOCHEMISTRY. 2016.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.017>

9. BARROS, N. R.; **MIRANDA, M. C. R.**; MENDONÇA, RICARDO JOSÉ; CILLI, EDUARDO M.; HERCULANO, R. D. Oxytocin Sustained Release U: Natural Rubber Latex Membranes. INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPT RESEARCH AND THERAPEUTICS(Print). p.435 - 444, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10989-016-9523-y>

10. BARROS, NATAN ROBERTO DE; CHAGAS, PAULO AUGUSTO MARQUES; BORGES, FELIPE AZEVEDO; GEMEINDER, JOSE LUCIO PADUA; MIRANDA, MATHEUS CARLOS ROMEIRO; GARMS, BRUNA CAMBRAIA; HERCULANO, RONDINELLI DONIZETTI. Diclofenac Potassium Transdermal Patches Using Natural Rubber Latex Biomembranes as Carrier. Journal of Materials. , v.2015, p.1 - 7, 2015.

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/807948>

11. AZEVEDO BORGES, FELIPE; DE ALMEIDA FILHO, EDSON; **CARLOS ROMEIRO MIRANDA, MATHEUS**; LUIZ DOS SANTOS, MÁRCIO; DONIZETTI HERCULANO, RONDINELLI; CARLOS GUASTALDI, ANTÔNIO. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE, POLYMER EDITION. 2015.

<http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2015.1086945>

12. BORGES, F.; TRECCO, A.; BARROS, N.; **MIRANDA, M.**; PIERRI, E.; SANTO, A.; HERCULANO, R. Casearia sylvestris Swartz Extract Release Using Natural Rubber Latex Biomembranes as Carrier. EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL PLANTS. v.4, p.1420 - 1430, 2014.

<http://dx.doi.org/10.9734/ejmp/2014/12039>

13. DIAS MURBACH, HEITOR; JAQUES OGAWA, GUILHERME; BORGES, F. A.; **MIRANDA, M. C. R.**; LOPES, RUTE; ROBERTO DE BARROS, NATAN; GUEDES MAZALLI, ALEXANDRE VINICIUS; GONÇALVES DA SILVA, ROSÂNGELA; FERREIRA CINMAN, JOSÉ LUIZ; DE CAMARGO DRAGO, BRUNO; DONIZETTI HERCULANO, RONDINELLI. Ciprofloxacin Release Using Natural Rubber Latex Membranes as Carrier. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOMATERIALS. , v.2014, p.1 - 7, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1155/2014/157952>

14. AIELO, PATRICIA B.; BORGES, FELIPE A.; ROMEIRA, KAROLINE M.; MIRANDA, **MATHEUS CARLOS ROMEIRO**; ARRUDA, LARISA B. DE; L. FILHO, PAULO NORONHA; DRAGO, BRUNO DE C.; HERCULANO, RONDINELLI D. Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. MATERIALS RESEARCH (São Carlos. Impresso), p.1420 - 1430, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1590/s1516-14392014005000010>

15. BORGES, FELIPE A; CESAR BOLOGNESI, LUIS FELIPE; TRECCO, ALBERTO; DE CAMARGO DRAGO, BRUNO; BALDO DE ARRUDA, LARISA; NORONHA LISBOA FILHO, PAULO; GONÇALVES PIERRI, ELAISE; DE OLIVEIRA GRAEFF, CARLOS FREDERICO; GONZAGA DOS SANTOS, ANDRÉ; MIRANDA, **MATHEUS CARLOS ROMEIRO**; HERCULANO, RONDINELLI D. Natural Rubber Latex: Study of a Novel Carrier for Casearia sylvestris Swartz Delivery. ISRN POLYMER SCIENCE. , v.2014, p.1 - 5, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1155/2014/241297>

Artigos aceitos para publicação

1. FLORIANO, J. F.; BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; GARMS, B. C.; MARCELINO, M. Y.; Scardelato, J.; SANTOS, R.; GRAEFF, C.; NORBERTO, A. M. Q.; HERCULANO, R. D. Physical, chemical and biological characterization of natural rubber latex membranes loaded with Cordia verbenacea DC. extract. CURRENT TRADITIONAL MEDICINE, 2018.

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. NORBERTO, A. M. Q.; BARROS, N.; MIRANDA, M. C. R.; MORIGUTI, J. C.; PONTES-NETO, O. M.; HERCULANO, R. D. Desenvolvimento de biomembranas de látex carreadora de escopolamina para controle de saliva na cavidade oral In: Congresso brasileiro de Disfagia, 2015, Ribeirão preto. **Congresso nacional de disfagia 2015**. 2015.

2. AIELO, P. B.; BORGES, F. A.; MIRANDA, M. C. R.; HERCULANO, R. D. Characterization and evaluation of sodium diclofenac release using natural RUBBER In: 8th COLAOB - Latinoamerican Meeting of Artificial Organs, Biomaterials and Tissue Engineering, 2014, ROSARIO. **8th Latinoamerican Meeting of Artificial Organs, Biomaterials and Tissue Engineering**. 2014.

3. BORGES, F. A.; GIULIANO, C. B.; MIRANDA, M. C. R.; TOLEDO, K. A.; HERCULANO, R. D. Citotoxicity evaluation of micro-/nano- maghemite particles in MC3T3 cell. In: COLAOB - 8th Latinoamerican Meeting of Artificial Organs, Biomaterials and Tissue Engineering, 2014, ROSARIO. **8th Latinoamerican Meeting of Artificial Organs, Biomaterials and Tissue Engineering**. 2014.

4. HERCULANO, R. D.; BRUNELLO, C. A.; MELO JUNIOR, J. P.; MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; CHIAVACCI, L. A.; GRAEFF, C. DEVELOPMENT OF A NOVEL SOLID STATE NITRIC OXIDE SENSOR USING SILOXANE-POLY(OXYPROPYLENE) (PPO) AS MATRIX. 2014. In: COLAOB- 8th Latinoamerican Meeting of Artificial Organs, Biomaterials and Tissue Engineering, 2014, ROSARIO. **8th Latinoamerican Meeting of Artificial Organs, Biomaterials and Tissue Engineering**. 2014.

5. MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; BARROS, N.; MENDONCA, R. J.; HERCULANO, R. D.; CILLI, E. M. Study of controlled release of peptide hylina a1 using natural rubber latex biomembrane as scaffold. In: COLAOB - 8th Latinoamerican Meeting of Artificial Organs, Biomaterials and Tissue Engineering, 2014, ROSARIO. **8th Latinoamerican Meeting of Artificial Organs, Biomaterials and Tissue Engineering**. 2014.

6. MIRANDA, M. C. R.; LORENZON, E. N.; HERCULANO, R. D.; CILLI, E. M. Evaluation of peptides release using natural rubber latex biomembrane as scaffold In: XII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2013, Campos do Jordão- SP. **Anais do XII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais**. 2013.

7. ROSA, M. N.; MIRANDA, M. C. R.; MORTARI, M. R.; SANTOS, W. F. Neuroprotective activity of parawixin 11, isolated from parawixia bistriata (araneae, araneidae) spider venom, in wistar rats submitted to an experimental model acute glaucoma. In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products., 2011, Ouro preto. **3rd BCNP Brazilian Conference on Natural Products**. 2011.

Patentes

1. SILVA, R. G.; SILVA, R.; **MIRANDA, M. C. R.**; HERCULANO, R. D. BIOMEMBRANA DE LÁTEX NATURAL PARA O TRATAMENTO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS, 2017. Categoria: Produto e Processo. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR10201702175. Data de depósito: 09/10/2017.

2. **MIRANDA, M. C. R.**; HERCULANO, R. D.; CILLI, E. M. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANA POROSA DE LÁTEX NATURAL, MEMBRANA POROSA DE LÁTEX NATURAL E SEUS USOS, 2016. Categoria: Processo. Instituição onde foi depositada: **WIPO - World Intellectual Property Organization**. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: PCT/BR2016/0503. Número do depósito PCT: 503. Data de depósito: 19/12/2016.

3. **MIRANDA, M. C. R.**; HERCULANO, R. D.; CILLI, E. M. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANA POROSA DE LÁTEX NATURAL, MEMBRANA POROSA DE LÁTEX NATURAL E SEUS USOS., 2015. Categoria: Processo. Instituição onde foi depositada: **INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial**. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020150320477. Data de depósito: 21/12/2015.

Prêmios e títulos

- | | |
|-------------|---|
| 2016 | Prêmio melhor trabalho, na área: Biológicas, 7º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do Instituto Federal de Educação, Ciência de SP. |
| 2015 | Prêmio- 3º Lugar melhor trabalho, Núcleo de Estudos da Deglutição e Disfagia. |
| 2014 | Prêmio de melhor painel da área (Biomateriais metálicos, materiais nanoestruturados, recobrimentos, biomemética e microencapsulamento), 8th COLAOB. |

Supervisão acadêmica

Iniciação científica

1. Rafael Bull Tuma. **Avaliação da Liberação do fosfato de cálcio α -TCP utilizando membrana de látex natural como suporte.** 2016. Iniciação científica (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
2. Rafael Brull Tuma. **Avaliação da liberação sustentada de fosfato de cálcio bifásico (α -TCP) empregando membranas de látex natural (*Hevea brasiliensis*) como suporte.** 2016. Iniciação científica (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
3. Rafael Brull Tuma. **Análise da incorporação e liberação controlada de nanopartículas magnéticas empregando partículas de látex como carreador.** 2014. Iniciação científica (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Participação em banca de comissões julgadoras

1. Jornada de engenharia de bioprocessos e biotecnologia/ VI Congresso farmacêutico., 2017. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
2. Jornada de engenharia de bioprocessos e biotecnologia/ VII Congresso farmacêutico, 2016. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Dedicatória

À Deus, por me manter firme na direção dos meus objetivos.

Aos meus pais, Ana Lucia e José Carlos, que me ensinaram que amar é um dom, e que tudo que fazemos nessa vida tem ser feito com amor. E também por todas as vezes que se sacrificaram por mim.

À minha irmã Danielle por me defender sempre.

A minha namorada Marina, por me ajudar sempre que foi preciso, fazer esse caminho mais leve e pelo seu amor.

Agradecimentos

Ao Prof. Rondinelli, meu orientador , por abrir as portas do seu laboratório; pela confiança, apoio nos momentos mais difíceis e pela orientação profissional e pessoal.

Ao Prof. Eduardo, meu coorientador, por permitir que eu continuasse a trabalhar no seu laboratório.

Ao Prof. Ricardo, meu coorientador, que me ajudou sempre que precisei.

À Prof^a Esther Del Olmo, pela orientação durante o doutorado sanduíche na Universidad de Salamanca em Salamanca (Espanha) por todo o conhecimento passado, boa vontade e amizade.

Às professoras Ana Marisa e Maria José pelas colaborações e conselhos.

Aos meus amigos Bruna, Camila, Larissa, Jaff, Júlia, Natália Manuela, Natália (Cunhada) por fazer meus dias mais divertidos.

À todos meus amigos do núcleo de proteômica e especialmente para Marina, Junia e Mônica por me ajudarem muito neste final de doutorado.

Aos meu amigos Esteban, Felipe, Glauco, Lari, Natan, Norival pelos ensinamentos e apoio em todas as horas.

Ao meu irmão de coração Paulo, por me ouvir, aconselhar, apoiar e pelo carinho.

A meu amigo Gil que me ajuda desde o tempo que eu trabalhava como mecânico.

À Wennia da Seção de Pós-graduação por me ajudar muito nos processos para fazer o doutorado sanduíche na Espanha.

À todas as funcionarios da Seção de Pós-graduação por serem muito prestativos comigo.

À CAPES pela bolsa.

E à FAPESP por finaciar o projeto que no qual sou integrante.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

Com o aumento dos acidentes automotivos e da expectativa de vida e, consequentemente, o da população de idosos, as fraturas ósseas e a osteoporose estão mais recorrentes, incentivando assim, a busca por novos biomateriais para reparação óssea. Em vista desta problemática, o objetivo desse trabalho consistiu em estudar a influência de diferentes fases de fosfato de cálcio na liberação sustentada utilizando a membrana de latex natural (LN) como carreador para estimular a reparação óssea. Conforme os resultados de MEV/FEG, o sol-gel tratado à 400°C (CPP), 600°C (HA) e 1200°C (α -TCP), apresentaram partículas de 170-650nm, 110-620nm e 10-79nm, respectivamente. A análise de MEV/FEG da superfície das membranas apresentou partículas de CPP inclusas na superfície e no interior das membranas. No entanto, as membranas incorporadas com HA e α -TCP apresentaram uma inclusão mais superficial. As análises DRX e FT-IR confirmaram a identidade das fases presentes nas membranas. A membrana de LN pura apresentou um valor de rugosidade 71 vezes menor que a amostra de maior rugosidade (LN+ HA). No ensaio de ângulo de contato, as amostras LN pura e LN + CPP apresentaram molhabilidade parcial, enquanto as membranas incorporadas com HA e α -TCP apresentaram molhabilidade completa. Nos ensaios de cinéticas das liberações, as membranas apresentaram uma liberação de 48% para CPP, 95% para HA e 71% para α -TCP durante 330 horas. O ensaio de atividade hemolítica apresentou 1,1% para LN pura, 0% para LN+CPP, 2,2% LN+HA e 1,1% para LN+ α - TCP de hemólise. O ensaio de citotoxicidade (MTT em osteoblastos foi inconclusivo, pois enzimas contidas no látex desassociaram as células do fundo do poço da placa de cultura. No entanto, após uma lavagem das membranas LN foi realizado um ensaio de adesão, onde as células aderiram na superfície. O ensaio de toxicidade em *C. elegans* apresentou nas primeiras 24 horas que as amostras NRL 1dia, LN 5 dias, CPP 1 dia, CPP 5 dias, HA 1 dia, HA 5 dias, e α -TCP 1 dia não são tóxicas. No entanto, a amostra α -TCP 5 dias apresentou toxicidade significativa, onde somente 31% dos animais sobreviveram. Após 48 horas de ensaio, observou-se que as amostras NRL 1 dia, CPP 1 dia, CPP 2 dias e HA 1 dia não apresentaram toxicidade. No ensaio de embriotoxicidade em *Danio rerio* (Zebrafish), as amostras NRL, CPP e HA apresentaram uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 60%, que foi somente 16% menor que controle. No entanto, a amostra α -TCP a partir de 72 horas, apresentou um aumento de 24,82% na mortalidade dos embriões. Estes resultados indicaram que as membranas de LN puras e incorporadas com CPP e HA tem potencial para aplicações biomédicas em reparo ósseo.

Palavras-chaves: Biomateriais, Compósitos, Fosfato de cálcio, Látex natural, Reparo ósseo.

ABSTRACT

The increase in car accidents and life expectancy, and consequently, elderly population, bone fractures and osteoporosis are more frequent, thus encouraging the search for new biomaterials for bone repair. In view of this problem, the objective of this work was to study the influence of different phases of calcium phosphate on sustained release using the natural latex (NL) membrane as carrier to stimulate bone regeneration. According to the FEG/SEM results, the sol-gel treated at 400°C (CPP), 600°C (HA) and 1200°C (α -TCP) had particles of 170-650nm, 110-620nm and 10-79nm, respectively. FEG/SEM analysis of the membranes surface showed CPP particles included on the surface and inside the membranes. However, the incorporated membranes with HA and α -TCP had a more superficial inclusion. XRD and FT-IR analyzes confirmed the identity of the phases present in the membranes. The pure NL membrane presented a roughness value 71 times lower than the sample of greater roughness (NL + HA). In the contact angle test, the pure NL and NL + CPP samples showed partial wettability, while the incorporated membranes with HA and α -TCP showed complete wettability. In the release kinetics assays, the membranes showed a release of 48% for CPP, 95% for HA and 71% for α -TCP for 330 hours. The hemolytic activity assay presented 1.1% for pure NL, 0% for NL + CPP, 2.2% NL + HA and 1.1% for NL + α -TCP hemolysis. The cytotoxicity assay (MTT) in osteoblasts was inconclusive due enzymes contained in the latex disassociated the cells from the bottom of the well of culture plate. However, after one wash of the NL membranes, an adhesion assay was performed, where the cells adhered on surface. The toxicity test in *C. elegans*, showed in the first 24 hours that NL 1 day samples, NL 5 day, CPP 1 day, CPP 5 day, HA 1 day, HA 5 day, and α -TCP 1 day are non-toxics. However, the α -TCP 5 day sample presented significant toxicity, where only 31% of the animals survived. After 48 hours assay, the samples NL 1 day, CPP 1 day, CPP 2 day and HA 1 day were found to be nontoxic. Embryotoxicity assay in *Danio rerio* (Zebrafish) the NL, CPP and HA samples showed a survival rate of approximately 60%, which was only 16% lower than control. However, the α -TCP sample in 72 hours showed a 24.82% increase in embryo mortality. These results indicated that pure and incorporated NL membranes with CPP and HA have potential for biomedical applications in bone repair. However

Keywords: Biomaterials, Bone repair, Calcium phosphate, Composites, Natural rubber latex.

LISTA DE FIGURA

Figura1. Esquemas exemplificando o processo de reparação da fratura,por formação de novo tecido ósseo a partir do endósteo e do periósteo.....	26
Figura2. Prótese funcional conhecida como “Dedo do Cairo” feita de madeira e couro encontrada em uma múmia na cidade de Luxor no Egito.....	28
Figura3. Gráfico com os valores movimentados pelo mercado de biomateriais entre os anos de 2008 e 2016 e previsão de aumento em 2021.....	29
Figura 4. A) <i>Hevea brasiliensis</i> , B) Monômero de cis-poliisopreno....	33
Figura5. Demonstração do aparecimento de novos capilares pelo processo de angiogênese.....	35
Figura6. A) Radiografia Digital do: grupo controle e experimental grupo tratado, após 120 dias a cirurgia. B)Biomembrana utilizada como barreira mecânica, impede a migração de células epiteliais e conjuntivas, facilitando a migração de células regenerativa.....	36
Figura7. Fluxograma da síntese para a obtenção do fosfato de cálcio.....	40
Figura8. Fluxograma da confecção das membranas de LN e incorporação das fases de fosfato de cálcio.....	41
Figura9. Fluxograma da metodologia empregada para análise de liberação de fosfato de cálcio.....	47
Figura10. Espectros FTIR dos pós de CPP, HA e α - TCP.....	54
Figura11. Difrátogramas de DRX para as amostras: CPP, HA e α - TCP em (pó).....	55
Figura12. Micrografias dos pós tratado à: A)400°C; B)600° MEV; C)1200°C e D) Um análise qualitativa do por EDS (Aumento de 50K vezes).....	56
Figura13. Polimerização heterogênea do látex causada pela adição de Fosfato de cálcio.....	57
Figura14. Micrografia da superfície da membrana de LN pura.....	58

Figura15. Micrografias A) da superfície da membrana incorporada com CPP. B) e da fratura da membrana incorporada com CPP (Imagem no canto direto superior, com aumento de 5000 vezes).....	58
Figura16. Espectro de EDS da membrana incorporada com CPP.....	59
Figura17. Micrografias A) da superfície da membrana incorporada com HA. B) e da fratura da membrana incorporada com HA (Imagem no canto direto superior, com aumento de 5000 vezes).....	60
Figura18. Espectro de EDS da membrana incorporada com HA.....	60
Figura19. Micrografias A) da superfície da membrana incorporada com α -TCP. B) e da fratura da membrana incorporada com α -TCP (Imagem no canto direto superior, com aumento de 5000 vezes).....	61
Figura20. Espectro de EDS da membrana incorporada com α -TCP....	61
Figura21. Micrografia de MFA e topográfica da membrana de látex natural pura.....	63
Figura22. Micrografia de MFA e topográfica da membrana de látex natural incorporada com CPP.....	64
Figura23. Imagem de MFA e topográfica da membrana de látex natural incorporada com HA.....	64
Figura24. Imagem de MFA e topográfica da membrana de látex natural incorporada com α -TCP.....	65
Figura25. Espectro FTIR de comparação do látex como o CPP.....	67
Figura26. Espectro FTIR de comparação do látex como o HA.....	68
Figura27. Espectro FTIR de comparação do látex como o α -TCP.....	69
Figura28. Difratoograma de raios-x obtido para a membrana LN (Amorfo).....	70
Figura29. Difratoograma de raios-X comparativo entre CPP em membrana de late incorporado com CPP.....	71
Figura30. Difratoograma de DRX comparativo entre HA em membrana de látex incorporado com HA.....	72
Figura31. Difratoograma de DRX comparativo entre α - TCP em membrana de látex incorporado com α - TCP.....	72
Figura32. Comparação dos termogramas das fases de fosfato de cálcio em pó (CPP, HA e α - TCP).....	74
Figura33. Comparação dos termogramas das amostras LN, LN+CPP,	

LN+HA e LN+ α - TCP.....	74
Figura34. Porcentagem de intumescimento das membranas LN, LN+CPP, LN+HA e LN+ α - TCP.....	75
Figura35. Fotografias da análise de ângulo de contado para as membranas: LN pura, LN+CPP, LN+HA e NL+ α -TCP.....	76
Figura36. Curva de tensão e deformação das membranas: LN pura, LN+CPP, LN+HA e LN α -TCP.....	78
Figura37. Curva de calibração a partir da banda de absorção do Ca (Equação da reta- $y=0,0188 + 5,3088 \cdot x$).....	80
Figura38. Cinética de liberação da membranas incorporadas com: A)CPP, B) HA C) α - TCP.....	82
Figura39. Hemólise das soluções resultantes da incubação das membranas de 24 e 120 horas.....	84
Figura40. Células MC3T3 dissociadas pelas enzimas contidas no soro do látex natural.....	86
Figura41. Osteoblastos (MC3T3) aderidos na garrafa 72 h, após a troca do meio no ensaio de dissociação.....	87
Figura42. Micrografias das células MC3T3 na membrana de LN pura (A) e incorporadas com CPP (B) HA (C) α -TCP (D).....	88
Figura43. Micrografias das ligações íntimas entre aglomerados de CPP (A), HA (B) e α -TCP (C) e os osteoblastos.....	89
Figura44. Micrografias das divisões celulares dos osteoblastos sobre as membranas incorporadas com CPP (A), HA (B) e α -TCP (C).....	90
Figura45. Porcentagem de sobrevivência de larvas de <i>C. elegans</i> N2 expostas às amostras testadas.....	92
Figura46. Larvas L4 vivas expostas a amostras provenientes da incubação de 24h do material em PBS analisadas 24 e 48 h após o início do experimento.....	93
Figura47. Larvas L4 mortas expostas a amostra proveniente da incubação do α -TCP por 24h em PBS analisadas 48 h após o início do experimento.....	93

Figura48. Larvas L4 vivas expostas a amostras provenientes da incubação de 48h do material em PBS analisadas 24 e 48 h após o início do experimento.....	94
Figura49. Larvas L4 mortas expostas a amostras provenientes da incubação de 48h do material em PBS analisadas 24 e 48 h após o início do experimento.....	95
Figura50. Larvas L1 provenientes da reprodução das larvas L4.....	96
Figura51. Gráfico de percentual de sobrevivência de Zebrafish expostos à amostras controle, LN, HA e α -TCP.....	97
Figura52. Gráfico qualitativo do percentual de efeito ocasionado pelas amostras testadas.....	98
Figura53. Desenvolvimento do embrião de Zebrafish encontrado na amostras controle, LN, CPP e HA.....	98
Figura54. Embriões de Zebrafish mortos encontrados nas amostras controle, LN, CPP e HA.....	99
Figura55. Desenvolvimento dos embriões com atraso expostos ao α -TCP proveniente da liberação das membranas, analisadas de 24 a 96h.....	99
Figura56. Embriões de Zebrafish mal formados e mortos encontrados na amostra α -TCP.....	100

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação para calcular a taxa de intumescimento, onde M_s é o peso da membrana seca, enquanto M_i é o peso da membrana intumescida..... **44**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio.....	37
Tabela 2. Especificações utilizadas para análise no MFA	43
Tabela 3. Ângulos de contato e condições de molhabilidade.....	45
Tabela 4. Informações sobre os tratamentos térmicos empregados, fases de fosfato de cálcio predominante obtido, códigos de identificação do software Search-Match® e ângulos característicos de difração das amostras.....	55
Tabela 5. Valores de rugosidade calculado por MFA das membranas de LN puras e das membranas incorporadas com CPP, HA e α -TCP.....	65
Tabela 6. Ângulo de contato resultante das membranas.....	76
Tabela 7. Valores mensurados no ensaio de resistência à tração para as amostras LN pura, LN+CPP, LN+HA e LN+ α -TCP.....	78
Tabela 8. Dados das equações das retas da liberação CPP e α -TCP.....	81
Tabela 9. Dados das equações das retas da liberação HA.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

ATR- Refletância Total Atenuada

α -TCP- Alfa tricálcico

CPP- Pirofosfato de cálcio

BMP- 2- Proteínas Morfogénéticas Ósseas 2

DO- Densidade Óptica

DMSO- Dimetilsulfóxido

DRX- Difração de Raios-X

FTIR- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

HA- Hidroxiapatita

hpf- horas pós-fertilização

ICDD- International Centre for Diffraction Data

ISO- International Organization for Standardization

LN- Látex Natural

LMA- Laboratório de Microscopia Avançada

MEV-FEG/EDS - Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo associada à técnica de Energia dispersiva de raios-X

MFA- Microscopia de Força Atômica

MTT- brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

OECD- Organisation for Economic Cooperation and Development

OGP- Osteogenic Growth Peptide

PEG- Polietilenoglicol

PLGA- Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PBS- Phosphate-Buffered saline

SLS- Sistema de Liberação Sustentada

SUS- Sistema Único de Saúde

TG- Termogravimétrica

ZEFT- Embryo Acute Toxicity Test,

Outros significados:

MC3T3- Linhagem de pré-osteoblasto de ratos

Scaffold: Suporte para liberação sustentada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Problemática.....	24
1.2. Tecido ósseo e reparação óssea.....	24
1.3. Biomateriais.....	27
1.3.1. Histórico dos biomateriais.....	27
1.3.2. Impacto econômico dos biomateriais.....	29
1.4. Scaffolds para reparo ósseo.....	30
1.5. Fosfato de Cálcio.....	31
1.6. Látex natural (LN).....	32
2. OBJETIVOS.....	38
2.1. Objetivo geral.....	38
2.2. Objetivos específicos.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Extração e preparação do LN.....	39
3.2. Síntese de fosfato de cálcio pelo o método de secagem do sol-gel.....	39
3.3. Incorporação das fases de fosfato de cálcio em membranas de LN.....	40
3.4. Caracterização físico-química das fases fosfato de cálcio e das membranas NL incorporadas.....	41
3.4.1. Difração de Raios-X (DRX).....	41
3.4.2. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV-FEG/EDS).....	42
3.4.3. Microscopia de Força Atômica (MFA).....	42
3.4.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR).....	43
3.4.5. Análise termogravimétrica (TG).....	43
3.4.6. Taxa de intumescimento das membranas.....	43
3.4.7. Ângulo de contato da superfície das membranas.....	44
3.4.8. Testes de tensão-deformação das membranas.....	45
3.4.9. Ensaio de liberação sustentada.....	45
3.5. Obtenção das amostras para os ensaios de toxicidade.....	47

3.6. Ensaios de toxicidade in vitro.....	47
3.6.1. Avaliação da atividade hemolítica.....	47
3.6.2. Ensaio de citotoxicidade em osteoblastos.....	48
3.6.2.1. Cultura celular	48
3.6.2.2. Citotoxicidade.....	48
3.6.2.3. Citotoxicidade por metabolismo de MTT.....	49
3.6.2.4. Análise de dissociação dos osteoblastos pelo soro do látex...	49
3.6.2.5. Lavagem das membranas para o ensaio de adesão.....	50
3.6.2.6. Ensaio de adesão celular dos osteoblastos na superfície das membranas.....	50
3.6.3.7. Morfologia celular.....	51
3.7. Ensaios de toxicidade in vivo.....	51
3.7.1. Avaliação da Toxicidade das membranas em <i>Caenorhabditis elegans</i>	51
3.7.2. Avaliação da embriotoxicidade em <i>Danio rerio</i> (Zebrafish).....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. Caracterização das fases de fosfato de cálcio por FTIR, DRX e MEV- FEG/EDS.....	52
4.1.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	53
4.1.2. Difractometria de raios-x (DRX).....	54
4.1.3. Microscopia de Varredura (MEV).....	55
4.2. Incorporação do fosfato de cálcio em membranas de LN.....	56
4.3. Caracterização das membranas incorporadas com CPP, HA e α -TCP.....	57
4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura da superfície das membranas.....	57
4.3.2. Microscopia de Força Atômica da superfície das membranas....	62
4.3.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das superfícies das membranas.....	66
4.3.4. Difração de raio X das membranas.....	69
4.3.5. Análise termogravimétrica (TG).....	73
4.3.6. Taxa de intumescimento.....	74

4.3.7. Ângulo de contato.....	75
4.3.8. Testes de tensão e deformação das membranas.....	77
4.4. Ensaio de Liberação sustentada.....	79
4.5. Ensaio de Toxicidade <i>in vitro</i>	83
4.5.1. Atividade hemolítica.....	83
4.5.2. Citotoxicidade em Células ósseas (MC3T3).....	84
4.5.2.1. MTT.....	84
4.6. Ensaio de Toxicidade <i>in vivo</i>	90
4.6.1. Toxicidade em <i>Caenorhabditis elegans</i>	90
4.6.2. Ensaio de embriotoxicidade em <i>Danio rerio</i> (Zebrafish).....	96
5. CONCLUSÕES.....	100
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	102
REFERÊNCIAS.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. Problemática

Com o aumento dos acidentes automotivos e da expectativa de vida e consequentemente o aumento da população de idosos, as fraturas ósseas e a osteoporose são mais recorrentes (Lázari, 2016). Assim, estes fatos incentivaram a comunidade científica em buscar novos biomateriais para substituição ou reparação óssea.

A osteoporose é um distúrbio multifatorial e progressivo do esqueleto caracterizado por redução da massa óssea e deterioração da microarquitetura óssea, aumentando o risco de fratura (Khajuria *et al.*, 2011). Esta doença atinge idosos do sexo masculino e principalmente feminino após a menopausa, por apresentarem a diminuição ou cessação de produção ovariana de estrógenos (Leite *et al.*, 2014).

Durante o envelhecimento, a formação óssea ocorre em uma velocidade menor que sua reabsorção, favorecendo mudanças na arquitetura e outras mudanças compensatórias dentro do osso (Leite *et al.*, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a osteoporose atinge 10 milhões de brasileiros, além de causar mais de nove milhões de fraturas anualmente no mundo (Bonde, 2017). Os acidentes automobilísticos também são um dos maiores causadores de fraturas ósseas. Segundo BRASIL (2017), em 2016 ocorreram mais de 20 mil acidentes graves em rodovias federais, gerando mais de 21 mil de feridos graves.

É válido ressaltar que o Sistema Único de Saúde (SUS) gasta por ano R\$ 51 milhões com o tratamento de fraturas e R\$ 24,77 milhões com medicamentos para tratamento da osteoporose (BRASIL, 2010)

1.2. Tecido ósseo e reparação óssea

O tecido ósseo é o componente principal do esqueleto, e tem as funções de servir de suporte para os tecidos moles e protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica, bem como no canal

raquidiano. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue, proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Além disso, os ossos também têm a função de armazenar Ca^{2+} , PO_4^{3-} e outros íons, e liberá-los controladamente para manter a concentração destes íons constantes nos líquidos orgânicos. E também são capazes de absorver toxinas e metais pesados, minimizando assim seus efeitos em outros tecidos (JUNQUEIRA, 2008).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por 90% de matriz extracelular e 10% de água. A matriz é 60-70% mineral inorgânica (fosfato de cálcio microcristalino, sódio, magnésio e fluoreto entre outros íons). O colágeno tipo I (90%) e as proteínas não colagenosas (glicoproteínas, proteoglicanas, osteocalcina, osteopontina e fatores de crescimento) são os componentes orgânicos da matriz (Introini, 2011). Estas proteínas contribuem para a abundância de sinais no interior da matriz extracelular. As fibras de colágeno flexíveis e resistentes reforçadas com cristais de hidroxiapatita são importantes para o requisito de força compressiva e alta resistência do osso à fratura (Mendes, 2012).

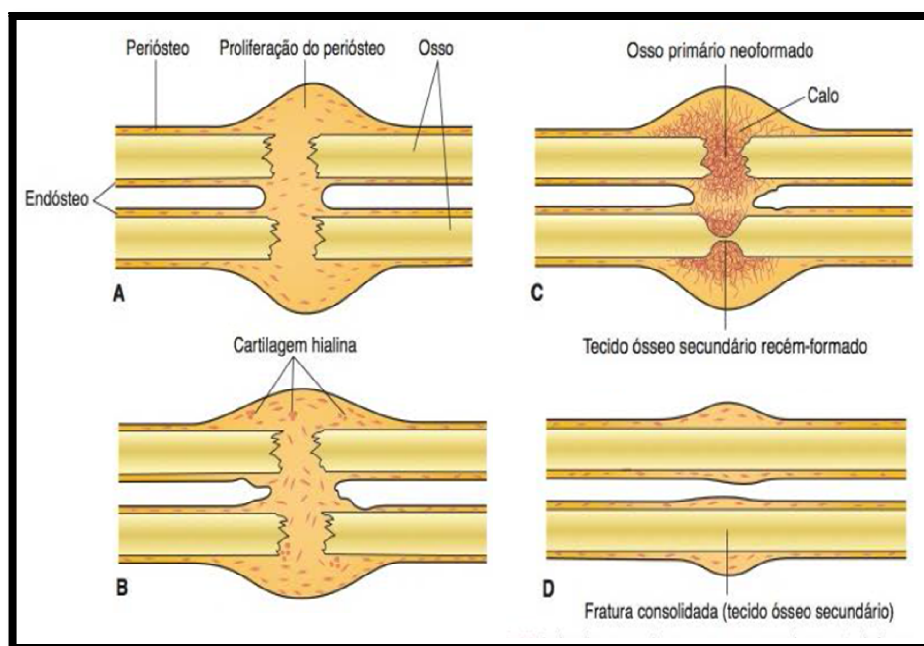
As células ósseas estão envolvidas nos processos de osteogênese, manutenção e remodelação óssea. Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I e V, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea, sendo, portanto, as células responsáveis pela expressão gênica dessas proteínas de forma a promover um equilíbrio de troca iônica, principalmente de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , iniciando a mineralização da matriz (Mendes, 2012).

As fraturas são definidas como a perda da solução de continuidade do tecido ósseo ou também como o resultado de uma fadiga da estrutura de um osso (Velloso, 2008).

No local da fratura óssea, ocorre uma hemorragia, pela lesão dos vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas. Para que a reparação se inicie, os macrófagos devem realizar a remoção de coágulos sanguíneos e os restos celulares e da matriz. O perióstio (camada externa do osso) e o endóstio (camada interna do osso) próximos à área fraturada

respondem com intensa proliferação, formando um aglomerado de células osteoprogenitoras mais conhecido como “cluster” que penetra entre as extremidades ósseas rompidas (Figura 1 A e B) (Introini, 2011). Nesse cluster, bem como no conjuntivo que se localiza entre as extremidades ósseas fraturadas, surge tecido ósseo primário ou imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que aí se formam, como também por ossificação intramembranosa. Podem ser encontradas no local de reparação, ao mesmo tempo, áreas de cartilagem, áreas de ossificação intramembranosa e áreas de ossificação endocondral. Este processo evolui de modo a aparecer, após algum tempo, um calo ósseo que envolve a extremidade dos ossos fraturados (JUNQUEIRA, 2008 #260).

Na Figura 1 C é possível observar a formação do calo ósseo que é constituído por tecido ósseo imaturo que une provisoriamente as extremidades do osso fraturado. As trações e compressões exercidas sobre o osso durante a reparação da fratura, e após o retorno do paciente a suas atividades normais, causam a remodelação do calo ósseo e sua completa substituição por tecido ósseo secundário (Figura 1D) (Junqueira e Carneiro, 2008).



Fonte: (Junqueira e Carneiro, 2008)

Figura 1. Esquemas exemplificando o processo de reparação da fratura, por formação de novo tecido ósseo a partir do endosteio e do periosteio.

1.3. Biomateriais

O aumento na expectativa de vida e dos acidentes e o grande consumo em dispositivos para tratamento das fraturas ósseas estimulou a pesquisa em biomateriais como substitutos funcionais para o reparo ou substituição de tecidos.

Biomaterial é todo tipo de substância ou mistura de substâncias naturais ou artificiais, que consegue atuar nos sistemas biológicos com o objetivo de substituição ou tratamento destes, assumindo o papel de uma estrutura viva ou de um dispositivo biomédico (Tathe *et al.*, 2010). Os biomateriais podem ser utilizados em muitas aplicações, como biossensores, suturas, implantes, válvulas cardíacas, substitutos ósseos e diafragma, órgão artificiais, dispositivos de liberação sustentada, curativos entre outros que podem ser fabricados a partir de diferentes tipos de materiais, como cerâmicas, polímeros, metais e compósitos (Pires *et al.*, 2015).

Para um material ser considerado biomaterial ele depende da análise de alguns requisitos como biocompatibilidade que se trata do efeito do ambiente orgânico no material e o efeito do material no organismo, a biodegradabilidade que é o fenômeno em que o material é degradado ou reabsorvido pelo organismo, a velocidade de degradação é uma característica fundamental para escolha de um material para cada tipo de aplicação (Oliveira *et al.*, 2010).

1.3.1. Histórico dos biomateriais

Segundo Pires *et al.* (2015), os biomateriais são utilizados desde a antiguidade, tendo registros do uso de suturas de linho e ouro no Antigo Egito (2000 AC) e de intestino de gatos, na Europa, durante a Idade Média, assim como de dentes artificiais feitos de conchas pelos maias (600 AC), de ferro pelos franceses (200 AC) e de ouro e madeira pelos romanos, chineses e astecas. Substitutos ósseos feitos de madeira também foram encontrados no Antigo Egito e na Europa, na Idade Média, tendo sido observada eficiente osteointegração.

Na Figura 2 pode-se observar o que pode ser a prótese mais antiga do mundo, este hálux feito de couro e madeira conhecido como “Dedo do Cairo” foi encontrado em uma múmia feminina enterrada próxima da cidade de Luxor no Egito, que foi datada entre 1069 e 664 antes de cristo (G1, 2012). O dedo do Cairo parece ser uma prótese funcional, pois é articulado e mostra sinais de uso (BBC, 2007).



Fonte: (G1,2012)

Figura 2. Prótese funcional conhecida como “Dedo do Cairo” feita de madeira e couro encontrada em uma múmia na cidade de Luxor no Egito.

Fazendo uma análise da evolução dos biomateriais, no início da pesquisa e desenvolvimento, os objetivos mudavam durante o tempo, primeiro os pesquisadores buscavam a biocompatibilidade para que pudessem substituir partes do corpo humano, com o fundamento de suporte mecânico, ao passar do tempo às pesquisas buscavam bioatividade para que tivesse mais influência no tratamento, depois a biodegradabilidade foi estudada para que o material fosse degradado ou reabsorvido pelo organismo após cumprir sua função e já nos tempos atuais o foco está na regeneração tecidual (Pires *et al.*, 2015).

1.3.2. Impacto econômico dos biomateriais

O mercado mundial de biomateriais movimentou mais de US\$ 25,6 bilhões no ano de 2008. Através da Figura 3 é possível observar o crescimento dessa movimentação de capital no mercado mundial de biomateriais, onde em 2012 este valor aumentou para US\$ 44 bilhões e quatro anos depois em 2016 este valor aumentou novamente para US\$ 70,9 bilhões. Segundo o site MARKETS AND MARKETS (2016) o mercado de biomateriais deverá atingir US\$ 149,17 bilhões até 2021, o crescimento do mercado global pode ser atribuído ao aumento dos fundos e doações por órgãos governamentais em todo o mundo, o crescente mercado de dispositivos implantáveis, avanços tecnológicos, aumento do número de procedimentos de substituição do quadril e do joelho e alto crescimento da população geriátrica, juntamente com a crescente incidência de doenças cardiovasculares.

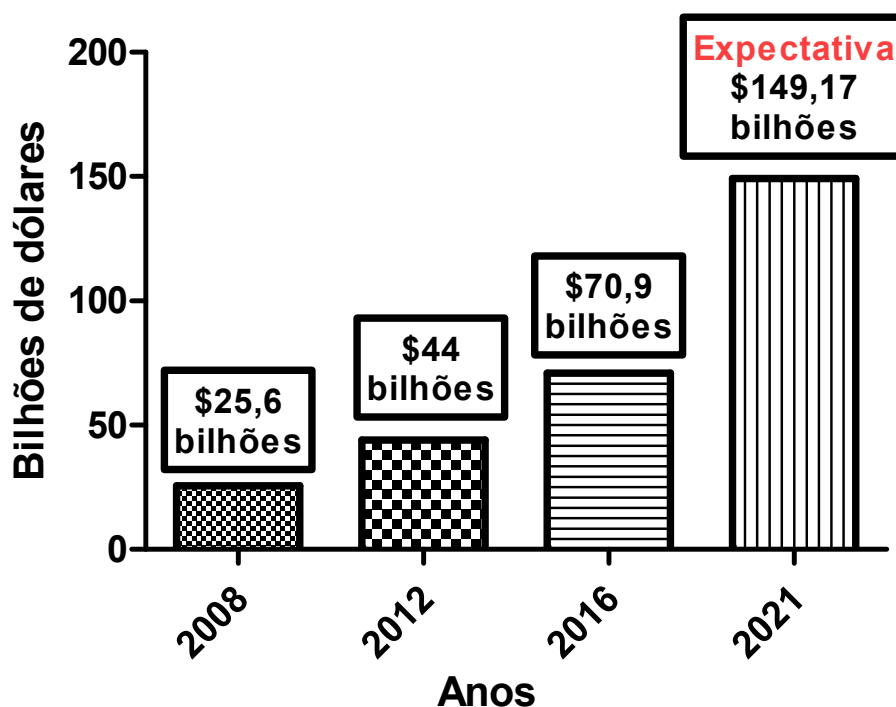


Figura 3. Gráfico com os valores movimentados pelo mercado de biomateriais entre os anos de 2008 e 2016 e previsão de aumento em 2021(MARKETS AND MARKETS, 2016).

No Brasil este mercado movimentou em 2008 mais de 550 milhões de dólares tendo uma expectativa de 20% de aumento a cada cinco anos (MARKETS AND MARKETS, 2011).

O segmento dos biomateriais que tem maior sucesso de vendas é o de implantes ortopédicos, onde em 2016 atingiu US\$ 57,7 bilhões de dólares em vendas.

O mercado de estimuladores de crescimento ósseo é avaliado em US\$ 1,4 bilhões até 2022 (MARKETS AND MARKETS, 2017). E já o mercado dos substitutos de enxertos ósseos utilizados na odontologia é estimado em US\$ 416,3 milhões em 2016, e deverá chegar a US \$ 664,3 milhões até 2021 (MARKETS AND MARKETS, 2016).

1.4. Scaffolds para reparo ósseo

Segundo Oliveira *et al.* (2008), os biomateriais são utilizados há muitos anos para substituir perda óssea. No início eram aplicados autoimplantes (material do próprio indivíduo), apesar de ser um ótimo alternativo, há desvantagens como pouca oferta de material. Diante destas limitações, os aloenxertos (material de outro indivíduo mesma espécie) e xenoenxerto (material de indivíduo de outra espécie) foram utilizados, mas o risco de rejeição e transmissão de doenças incentivou a utilização de biomateriais (Oliveira *et al.*, 2010).

Os biomateriais em scaffolds são aqueles que possuem arcabouço tridimensional poroso, propriedades bioativas, que servem de molde para a formação do novo tecido (Oliveira *et al.*, 2010).

Segundo Burg *et al.* (2000), os biomateriais podem ser utilizados como arcabouço para induzir a migração e o crescimento de células vindas de tecidos vizinhos, ou também pode ser materiais semeados com células antes de ser implantado.

O biomaterial para ser um candidato na utilização como scaffold na reparação óssea precisa ser biocompatível, osteoindutivo e osteocondutivo (Burg *et al.*, 2000).

Atualmente muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas utilizando scaffolds incorporados com estimuladores de crescimento ósseo no

tratamento de fraturas ósseas. Como por exemplo, o trabalho de Rahman *et al.* (2014) que estudaram uma blenda de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) e polietilenoglicol (PEG) como scaffold com liberação sustentada de Proteínas Morfogénicas Ósseas 2 (BMP-2), onde *in vitro* obteve 70% de liberação em três semanas de ensaio. Além disso, um teste de atividade confirmou que a BMP-2 liberada estava ativa para induzir a osteogênese. O scaffold de PLGA/PEG com liberação de BMP-2 apresentou um aumento de 31% de reparo ósseo em calvária de ratos, em comparação com as fraturas sem tratamento.

Ryan *et al.* (2015) estudaram diferentes métodos de produção de scaffolds de colágeno poroso incorporados com Hidroxiapatita para obter melhor interação com as células no tratamento de fraturas ósseas.

Como o foco deste trabalho são os scaffolds poliméricos é importante comentar sobre o trabalho de Saska *et al.* (2012) que produziu uma membrana de celulose bacteriana para a liberação controlada de peptídeos de crescimento osteogênico (OGP). Neste trabalho a membrana apresentou não ser citotóxica, genotóxica ou mutagênica podendo ser aplicada em reparo ósseo.

Recentemente De Olyveira *et al.* (2017) produziu uma membrana de celulose bacteriana onde a fermentação bacteriana da celulose foi modificada pela adição de sulfato de condroitina ao meio de cultura antes da inoculação da bactéria. Após a produção as membranas foram incorporadas com fosfato de cálcio através do método biomimético. As membranas de celulose bacteriana produzidas com condroitina e recobertas com fosfato de cálcio apresentaram ótima viabilidade celular, polaridade ideal para a aplicação em reparo ósseo.

1.5. Fosfato de Cálcio

Os ossos e dentes de todos os vertebrados são compósitos naturais formados por moléculas de colágeno ligadas em cadeias lineares arranjadas em fibras. Entre estas moléculas há pequenos compartimentos intersticiais regularmente espaçados, onde estão presentes nanocristais de um sólido

inorgânico conhecidos como fosfato de cálcio, que representa 65% da massa total do osso (Gomes *et al.*, 2012).

Os fosfatos de cálcio de maior relevância em aplicações biológicas são principalmente os amorfos, HA e demais apatitas, monetita, brushita, fosfato octacálcio, TCP e CPP. A influência das fases do fosfato de cálcio sobre os tecidos biológicos e especialmente o seu comportamento de biodegradação e interação são determinadas pela sua composição química, pela morfologia e topologia da superfície (Pereira, 2014).

O fosfato de cálcio é utilizado em uma série de aplicações biomédicas, incluindo implantes dentários, dispositivos percutâneos e no tratamento periodontal, em implantes para reparar e reconstruir os tecidos, no tratamento de defeitos ósseos, na substituição total da articulação, reconstrução crânio-maxilo-facial, em otorrinolaringologia, em cirurgia da coluna, na substituição do globo ocular, etc. (Lindhölm; Hamerschmidt, 2010).

Sabe-se que os processos de reparo ósseo ocorrem de acordo com um lento e complexo mecanismo do organismo como, por exemplo, a síntese da matriz óssea (Junqueira e Carneiro, 2008), e para isso tem-se intensificado a pesquisa de novas terapias para auxiliar a reparação. Tendo em vista estas informações, a incorporação de diferentes fases de fosfato de cálcio na membrana de látex natural (LN) e o estudo de liberação sustentada são alternativas inovadoras para potencializar as propriedades de reparo óssea.

1.6. Látex natural (LN)

O látex natural (LN) é extraído da árvore da espécie *Hevea brasiliensis* (Figura 4A), pertencente da família das Euforbiáceas é nativa da bacia do rio Amazonas no Brasil. Este material possui em sua constituição entre 40 a 45% em peso de moléculas poliméricas que formam a borracha (*cis*-poliisopreno)(Figura 4B), 4 a 5% em peso de outros constituintes orgânicos, tais como proteínas, lipídios, carboidratos, e 50% de água (Neves-Junior *et al.*, 2006).

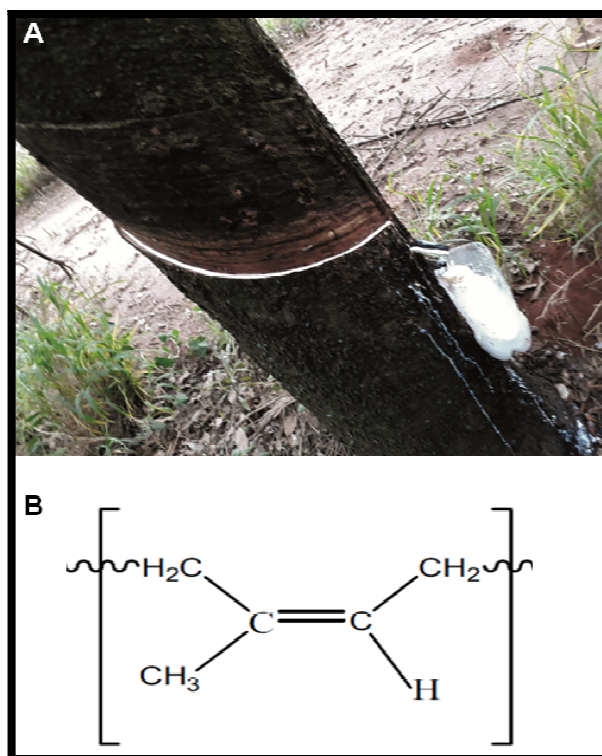


Figura 4. .A) *Hevea brasiliensis*, B) Monômero de cis-poliisopreno.

Recentemente, pesquisas vêm utilizando o LN também em aplicações biomédicas. Mrue *et al.* (2004) utilizaram a membrana de látex natural pela primeira vez como prótese de um segmento do esôfago cervical de cães. Os resultados mostraram que o látex teve propriedade indutora de regeneração tecidual (neo-esôfago), sendo totalmente eliminado após dez dias de pós-operatório nas fezes dos animais.

Sader *et al.* (2000) estudaram o comportamento da membrana de LN como substituto parcial do pericárdio de cães. Os resultados mostraram que a membrana de látex foi satisfatória para a substituição parcial do pericárdio de cães.

Segundo Rabelo *et al.* (2005), a técnica de implantação da membrana de látex, poliamida e polilisina à 0,1%, apresentou bons resultados na reparação de hérnias umbilicais em bovinos leiteiros. Apesar de ser um material não absorvível, não foi observada reação inflamatória tipo corpo estranho ou demais complicações com o uso da membrana, possivelmente porque o material possui baixa antigenicidade.

Balabanian *et al.* (2006) implantaram grânulos de látex nas cavidades ósseas alveolares depois da extração dental em ratos, avaliando a biocompatibilidade do biomaterial. Os dados quantitativos confirmaram a aceleração da neoformação óssea e a diminuição da presença de tecido conjuntivo ao redor do implante.

De Pinho (2004) pesquisou o uso da membrana de látex natural com polilisina à 0,1% na reconstrução conjuntiva de olhos em coelhos neozelandeses adultos. Após análises histológicas, os autores observaram que a recuperação foi satisfatória em 60% dos olhos com membrana enquanto que, nos olhos do grupo sem membrana, ela foi satisfatória em apenas 20%. Esses dados sugeriram que a membrana de látex favorece a cicatrização conjuntival e a neoangiogênese.

Frade *et al.* (2011) pesquisaram possíveis reações alérgicas ao látex e demonstraram que a biomembrana de látex é segura como curativo para úlceras cutâneas, uma vez que não foi observada indução de reações de hipersensibilidade entre os voluntários de baixo e alto risco submetidos ao “patch test”, nem entre os pacientes ulcerados usuários da biomembrana, por meio de avaliações clínicas e imunológicas.

Rathnayake *et al.* (2012) produziram uma espuma de LN incorporada com nanopartículas de prata, que foi capaz inibir o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo), *Escherichia coli* (Gram-negativas) e o fungo *Aspergillus Níger*.

Araujo *et al.* (2012) estudaram os efeitos da biomembrana de látex como implante transitório no fechamento de perfurações timpânicas, onde látex provocou um maior processo de vascularização do enxerto, com interação satisfatória com os tecidos da membrana timpânica humana.

Furuya *et al.* (2017) pesquisaram a citotoxicidade e atividade anti-tumoral de nanopartículas de LN, onde foi verificado que os constituintes exibiram efeito significativo no bloqueio do ciclo celular e desencadearam a apoptose para células tumorais.

Alves (2003), mostrou que o látex possui a propriedade de formar novos capilares, evento conhecido por angiogênese (Figura 5).

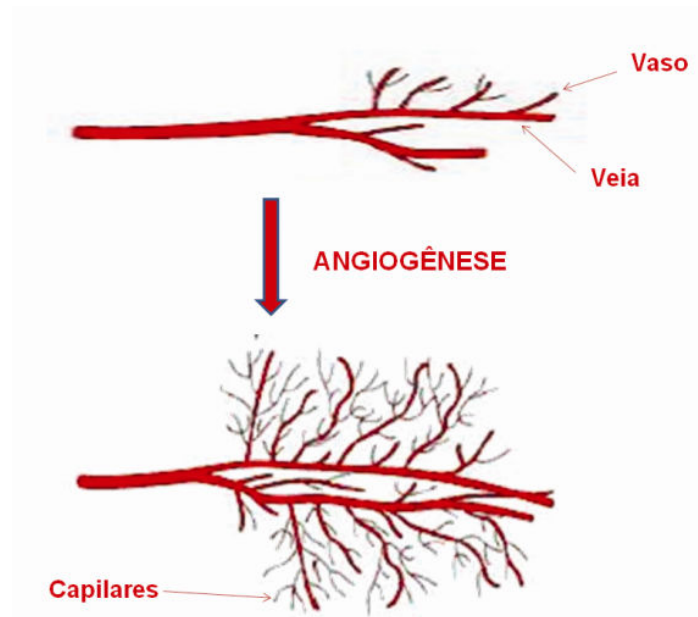
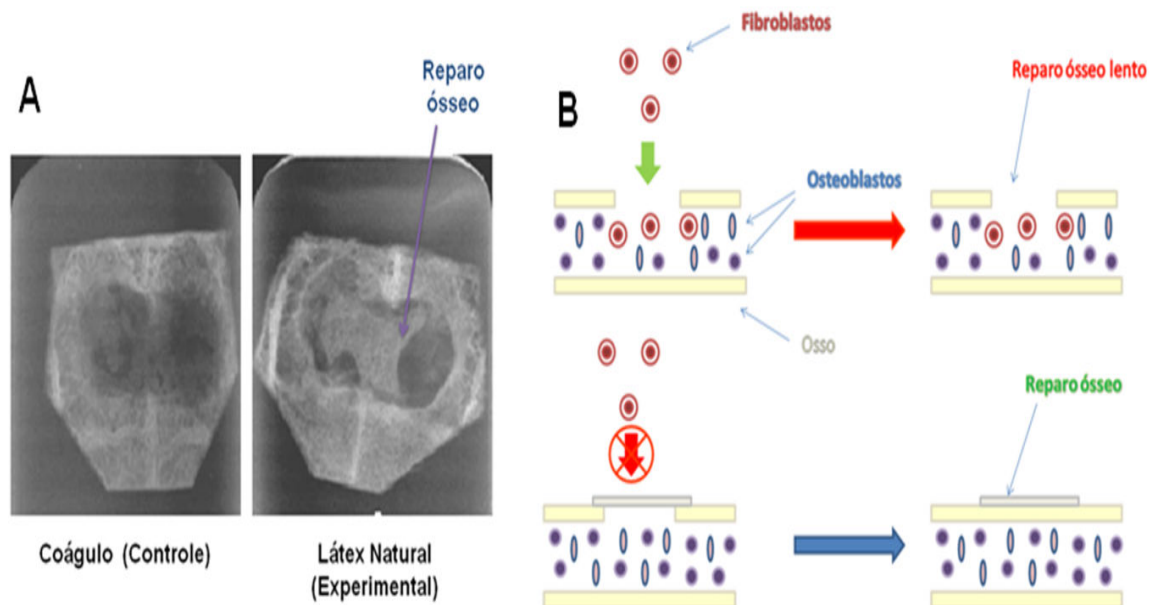


Figura 5. Demonstração do aparecimento de novos capilares pelo processo de angiogênese (Yoo e Kwon, 2013).

Ereno *et al.* (2010) utilizaram o LN como uma biomembrana passiva, que atua na reparação óssea (Figura 6A). Neste tipo de experimento, a biomembrana de LN foi aplicada sobre a fratura óssea, impedindo a migração do tecido epitelial e conjuntivo, e facilitando a migração de células regenerativas (Figura 6B).



Fonte: A) Ereno *et al.* (2010)

Figura 6. A) Radiografia Digital do: grupo controle e experimental grupo tratado, após 120 dias a cirurgia (Ereno *et al.*, 2010). B) Membrana de LN utilizada como barreira mecânica, impede a migração de células epiteliais e conjuntivas, facilitando a migração de células regenerativa.

Devido a estes ótimos resultados de biocompatibilidade e bioatividade, Herculano *et al.* (2009) utilizaram a membrana de LN como matriz de liberação sustentada. A partir deste trabalho estudos recentes têm demonstrado que o LN é viável para confecção de uma matriz de liberação sustentada de compostos bioativos, tais como: peptídeos (ocitocina e desmopressina) (De Barros *et al.*, 2016; De Barros *et al.*, 2017), antibióticos (metronidazol e ciprofloxacina) (Herculano *et al.*, 2010; Dias Murbach *et al.*, 2014), anti-inflamatórios (cetoprofeno, diclofenaco de sódio e potássio) (Aiello *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2015; Floriano *et al.*, 2017), nanopartículas (Prata e Ouro) (Barboza-Filho *et al.*, 2012; Guidelli *et al.*, 2013), e fitoterápicos (*Casearia sylvestris*, *Stryphnodendron sp* e própolis) (Romeira *et al.*, 2012; Azevedo Borges *et al.*, 2014; Zancanela *et al.*, 2017), nicotina (Suksaeree *et al.*, 2012), corantes orgânicos (Jayadevan *et al.*, 2017), aumentando assim suas aplicações biomédicas em próteses, enxerto e lesões devido as suas

características de compatibilidade biológica e ao estímulo natural de promover angiogênese.

Azevedo Borges *et al.* (2014); Nascimento *et al.* (2014); Borges *et al.* (2015) incorporaram e caracterizaram uma fase do fosfato de cálcio nas membranas de LN, mas não estudaram sua cinética de liberação. Desta forma, neste trabalho nosso maior objetivo é estudar o comportamento da liberação de diferentes fases de fosfato de cálcio quando carregados pela membrana de LN, pois estas fases utilizadas tem a razão Ca/P distintas, onde quanto maior essa proporção menor a solubilidade, oferecendo assim, a possibilidade de uma liberação mais lenta ou mais rápida dos íons PO_4^{3-} e Ca^{2+} (Tabela 1)(Guastaldi e Aparecida, 2010).

Tabela 1. Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio

Fases predominantes	Razão (Ca/P)
Pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$)	1,00
Hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$)	1,67
α- fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$)	1,50

Outros diferenciais deste trabalho com os de Nascimento *et al.* (2014) e Borges *et al.* (2015) foi de produzir uma membrana de LN por precipitação do fosfato de cálcio sobre a membrana e não por pelo método biomimético ou solubilização do LN e fases de fosfato de cálcio em clorofórmio, dando a possibilidade de adicionar outras moléculas de importante função no reparo ósseo e menor possibilidade de toxicidade pelos resíduos de clorofórmio. Além disso, foi estudado a citotoxicidade em células sanguíneas, osteoblastos, *Caenorhabditis elegans* e a embriotoxicidade em *Danio rerio* (Zebrafish). A produção deste novo biomaterial visa auxiliar a reparação óssea com rapidez, eficiência e baixo custo.

5. CONCLUSÃO

- As fases de fosfato de cálcio foram sintetizadas pelo método sol-gel e caracterizadas pelas técnicas de DRX, FTIR e MEV-FEG/EDS, onde foram confirmadas as identidades das fases (CPP, HA e α -TCP) predominantes de cada tratamento térmico.
- A partir das técnicas de DRX, MEV-FEG/EDS foi observado que as fases de fosfato de cálcio foram incorporadas na superfície e no interior da membrana, e que o CPP apresentou melhor inclusão na superfície da membrana de LN e adsorção para o interior da membrana, por apresentar melhor solubilidade e menor razão molar Ca/P.
- Através da técnica de FTIR, foi possível observar os grupos vibracionais característico de cada material, onde a técnica não apresentou novas bandas indicando que não houve ligações intramoleculares capazes de reter as fases de fosfato de cálcio no interior da membrana de LN.

- As técnicas de ângulo de contato e intumescimento indicaram que as membranas incorporadas com as fases de fosfato de cálcio apresentaram menor molhabilidade, onde quanto maior a razão Ca/P das fases incorporadas às membranas, maior será a hidrofobicidade.
- A incorporação das fases fosfato de cálcio nas membranas de LN, não apresentou alteração significativa para deformação específica e módulo de elasticidade, no entanto as membranas incorporadas com fosfato de cálcio apresentaram uma diminuição significativa na tensão de ruptura em comparação com a membrana de LN pura.
- A liberação da HA foi mais lenta e duas vezes maior que o CPP e 23% maior que α -TCP em aproximadamente 15 dias.
- O ensaio de atividade hemolítica indicou que as membranas incorporadas não causaram hemólise significativa em até cinco dias de uso.
- O ensaio de citotoxicidade por metabolismo MTT em osteoblastos (MC3T3) não foi eficiente, pois enzimas contidas no LN dissociaram as células impossibilitando o ensaio.
- Para o ensaio de adesão celular sobre as membranas foi preciso realizar uma lavagem nas membranas de LN pura com meio α -MEM completo e incorporar as fases de fosfato de cálcio. Após estes procedimentos foi possível observar que as células estavam aderidas sobre a superfície de todas as membranas com contato íntimo através dos lamelipódios e filopódios. Ligações intercelulares também foram encontradas confirmando a ótima adesão. Divisões celulares também foram observadas nas membranas incorporadas com CPP, HA e α -TCP através da técnica MEV/FEG indicando a proliferação das células sobre as membranas.

- No ensaio de toxicidade in vivo utilizando o nematoide *C. elegans* foi possível observar que as amostras α -TCP 5d em contato com os animais por 24h e 48 h apresentaram mortalidade de 69 % e 100% respectivamente.
- A amostra α -TCP 5d em contato de 48h foi capaz de matar até mesmo as larva L1 provenientes da reprodução dos animais adultos.
- No ensaio de embriotoxicidade utilizando os embriões do peixe *Danio rerio* (Zebrafish) foi possível observar que a amostra α -TCP 5d apresentou atraso no desenvolvimento, má formação e morte (Teratogênese).
- Estes resultados indicaram que as membranas de LN e incorporadas com CPP e HA tem potencial para aplicações biomédicas em reparo ósseo, principalmente as membranas incorporadas com HA por ter sua bioatividade bem evidenciada na literatura.

REFERÊNCIAS

- AIELO, P. B.; BORGES, F. A.; ROMEIRA, K. M.; MIRANDA, M. C. R.; ARRUDA, L. B. D.; DRAGO, B. D. C.; HERCULANO, R. D. Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. **Materials Research**, v. 17, p. 146-152, 2014.
- ALVES, M. C. O. **Teste de angiogênese estimulada por membranas de látex natural**. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
- APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V.; GUASTALDI, A. C. Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 6, p. 1215-1222, 2009.
- ARAUJO, M. M.; MASSUDA, E. T.; HYPPOLITO, M. A. Anatomical and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural latex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Acta cirurgica brasileira**, v. 27, n. 8, p. 566-571, 2012.
- AUGUSTINE-RAUCH, K.; ZHANG, C. X.; PANZICA-KELLY, J. M. A developmental toxicology assay platform for screening teratogenic liability of pharmaceutical compounds. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 107, n. 1, p. 4-20, 2016.
- AZEVEDO BORGES, F.; CESAR BOLOGNESI, L. F.; TRECCO, A.; DE CAMARGO DRAGO, B.; BALDO DE ARRUDA, L.; NORONHA LISBOA FILHO, P.; GONÇALVES PIERRI, E.; DE OLIVEIRA GRAEFF, C. F.; GONZAGA DOS SANTOS, A.; MIRANDA, M. C. R. Natural rubber latex: study of a novel carrier for *Casearia sylvestris* swartz delivery. **ISRN Polymer Science**, p. 1-5, 2014.
- BALABANIAN, C. A.; COUTINHO-NETTO, J.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; LACERDA, S. A.; BRENTGANI, L. G. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**, v. 48, n. 4, p. 201-205, 2006.
- BARBOZA-FILHO, C. G.; CABRERA, F. C.; DOS SANTOS, R. J.; SAEZ, J. A. D. S.; JOB, A. E. The influence of natural rubber/Au nanoparticle membranes on the physiology of *Leishmania brasiliensis*. **Experimental parasitology**, v. 130, n. 2, p. 152-158, 2012.
- BARROS, N. R. D.; CHAGAS, P. A. M.; BORGES, F. A.; GEMEINDER, J. L. P.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; HERCULANO, R. D. Diclofenac potassium transdermal patches using natural rubber latex biomembranes as carrier. **Journal of Materials**, p. 1-7, 2015.

BBC. **Dedo egípcio de 2,6 mil anos pode ser prótese mais antiga.**

Brasília, 2007. Disponível em:

<http://www.bbc.com/portuguese/ciencia/story/2007/07/070727_primeiraproteseegitofn.shtml> Acesso em: 10 jan. 2018.

BIRD, E.; WEBER, J.; COX, C.; CHEN, T. Determination of calcium and magnesium in milk by EDTA titration. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 6, p. 1036-1046, 1961.

BONDE (Grupo Folha de comunicação). **Osteoporose atinge 10 milhões de brasileiros.** Londrina, 2017. Disponível em:<<http://www.bonde.com.br/saude/corpo-e-mente/osteoporose-atinge-10-milhoes-de-brasileiros-438522.html>>. Acesso em: 08 jan. 2018.

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.; DE TOLEDO, K. A.; HERCULANO, R. D. Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 39, 2017.

BORGES, F. A.; FILHO, E. D. A.; MIRANDA, M. C. R.; DOS SANTOS, M. L.; HERCULANO, R. D.; GUASTALDI, A. C. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 26, n. 17, p. 1256-1268, 2015.

BRANNEN, K. C.; PANZICA-KELLY, J. M.; DANBERRY, T. L.; AUGUSTINE-RAUCH, K. A. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 66-77, 2010.

BRASIL. **Mortes em rodovias federais caíram 6,8% em 2016.** Brasília, 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/defesa-e-seguranca/2017/02/mortes-em-rodovias-federais-cairam-6-8-em-2016>>. Acesso em: 08 jan. 2018.

BRASIL. Fraturas por osteoporose ocorrem mais do que câncer de mama no Brasil. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2010/10/fraturas-por-osteoporose-ocorrem-mais-do-que-cancer-de-mama-no-brasil>>. Acesso em: 08 jan. 2018.

BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2347-2359, 2000.

BUSQUET, F.; STRECKER, R.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T.; CARR, G. J.; CENIJN, P.; FOCHTMAN, P.; GOURMELON, A.; HÜBLER, N. OECD validation study to assess intra-and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 496-511, 2014.

CALLISTER, J.; WILLIAN, D. Ciências e engenharia dos materiais: uma introdução, 7ª edição. **Rio de Janeiro: LTC**, p. 724, 2008.

COELHO, F. A. S.; GARGANTINI, H. Determinação espectrofotométrica de cálcio em solos. **Bragantia - Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo**, v. 28, n. 20, p. 241-254, 1969.

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

DE BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; GEMEINDER, J. L. P.; DE MENDONÇA, R. J.; CILLI, E. M.; HERCULANO, R. D. Natural rubber latex: development and in vitro characterization of a future transdermal patch for enuresis treatment. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 66, p. 871-876, 2017.

DE OLYVEIRA, G. M.; BASMAJI, P.; COSTA, L. M. M.; DOS SANTOS, M. L.; DOS SANTOS RICCARDI, C.; GUASTALDI, F. P. S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; DE OLIVEIRA CAPOTE, T. S.; PIZONI, E.; GUASTALDI, A. C. Surface physical chemistry properties in coated bacterial cellulose membranes with calcium phosphate. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 1359-1365, 2017.

DE PINHO, E. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arquivos Brasileiros Oftalmologia**, v. 67, p. 27-32, 2004.

DELIGIANNI, D. D.; KATSALA, N. D.; KOUTSOUKOS, P. G.; MISSIRLIS, Y. F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. **Biomaterials**, v. 22, n. 1, p. 87-96, 2000.

DOS SANTOS, M. L.; RICCARDI, C. S.; NORONHA, A. L.; DE OLYVEIRA, G. M.; EDSON FILHO, A.; GUASTALDI, A. C. The influence of the heat treatment temperatures in calcium phosphate synthesis. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 4, n. 9, p. 744-748, 2014.

EHARA, A.; OGATA, K.; IMAZATO, S.; EBISU, S.; NAKANO, T.; UMAKOSHI, Y. Effects of α -TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization. **Biomaterials**, v. 24, n. 5, p. 831-836, 2003.

ERENO, C.; GUIMARÃES, S. A. C.; PASETTO, S.; HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; GRAEFF, C. F.; TAVANO, O.; BAFFA, O.; KINOSHITA, A. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95, n. 3, p. 932-939, 2010.

FISCHER, D.; LI, Y.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J.; KISSEL, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, p. 1121-1131, 2003.

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

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.; CHAGAS, A. L. D.; GARMS, B. C.; DE OLIVEIRA GRAEFF, C. F. Ketoprofen loaded in natural rubber latex transdermal patch for tendinitis treatment. **Journal of Polymers and the Environment**, p.1-9, 2017.

FRADE, M.; SALATHIEL, A.; MAZZUCATO, E.; COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N. A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers. **Medicina Cutânea Ibero-Latin-Americana**, v. 34, n. 3, p. 137-142, 2006.

FRADE, M. A. C.; COUTINHO NETTO, J.; GOMES, F. G.; MAZZUCATO, E. L.; ANDRADE, T. A. M. D.; FOSS, N. T. Curativo de biomembrana vegetal e hipersensibilidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 885-891, 2011.

FRADE, M. C.; CURSI, I. B.; ANDRADE, F. F.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBETTA, F. M.; FOSS, N. T. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Medicina Cutânea Ibero-Latin-Americana**, v. 32, n. 4, p. 157-62, 2004.

FURUYA, M.; SHIMONO, N.; YAMAZAKI, K.; DOMURA, R.; OKAMOTO, M. Cytotoxicity and anticancer activity of natural rubber latex particles for cancer cells. **Materials Today Chemistry**, v. 5, p. 63-71, 2017.

G1. **Dedão de múmia pode ser prótese mais antiga do mundo, diz estudo**. São Paulo, 2012. Disponível em: < <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2012/10/dedao-de-mumia-pode-ser-protese-mais-antiga-do-mundo-diz-estudo.html> > Acesso em: 10 jan. 2018.

GARMS, B. C. **Caracterização física, química e biológica de membranas de látex natural incorporadas com moxifloxacina para tratamento de feridas cutâneas**. 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista " Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2017.

GOMES, L.; DI LELLO, B.; CAMPOS, J.; SAMPAIO, M. Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha (Synthesis and characterization of calcium phosphates produced from chicken eggshell). **Cerâmica**, v. 58, p. 448-452, 2012.

GONZALEZ-MORAGAS, L.; BERTO, P.; VILCHES, C.; QUIDANT, R.; KOLOVOU, A.; SANTARELLA-MELLWIG, R.; SCHWAB, Y.; STÜRZENBAUM, S.; ROIG, A.; LAROMAIN, A. In vivo testing of gold nanoparticles using the *Caenorhabditis elegans* model organism. **Acta biomaterialia**, v. 53, p. 598-609, 2017.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-8, 2010.

GUIDELLI, E. J.; KINOSHITA, A.; RAMOS, A. P.; BAFFA, O. Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 4, p. 1-9, 2013.

HAMERSCHMIDT, R.; DOS SANTOS, R. F.; ARAÚJO, J. C.; STAHLKE JR., H. J.; AGULHAM, M. A.; MOREIRA, A. T. R.; MOCELLIN, M. Utilização de hidroxiapatita de cálcio no preenchimento de defeitos ósseos criados em mastóides de ratos. **Brazilian Journal of Otorhynolaryngology**, v. 77, n. 3, p. 315-321, 2010.

HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.

HERCULANO, R. D. **Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações médicas**. 2009. 129 f. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

HERCULANO, R. D.; GUIMARÃES, S. A. C.; BELMONTE, G. C.; DUARTE, M. A. H.; OLIVEIRA JÚNIOR, O. N. D.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. D. O. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. **Materials Research**, v. 13, n. 1, p. 57-61, 2010.

HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; ERENO, C.; GUIMARAES, S. A. C.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. D. O. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). **Materials Research**, v. 12, n. 2, p. 253-256, 2009.

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

14 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10.993-5:1999(E)**: biological testing of medical and dental material devices - part 5: test for *in vitro* cytotoxicity. Geneve, 1999. 14 p.

INTROINI, S. O. **Avaliação do reparo tecidual em defeito ósseo por microtomografia tridimensional por raio X**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de medicina de Ribeirão Preto e

Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, 2011.

JAYADEVAN, J.; ALEX, R.; GOPALAKRISHNAPANICKER, U. Chemically modified natural rubber latex-poly (vinyl alcohol) blend membranes for organic dye release. **Reactive and Functional Polymers**, v. 112, p. 22-32, 2017.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. Histologia Básica - texto e atlas. 11º ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008. Cap. 8 Tecido ósseo, p. 131-148.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Drugs for the management of osteoporosis: a review. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 51, n. 4, p. 372-382, 2011.

LÁZARI, L. M. D. **Cimentos bioativos injetáveis funcionalizados com peptídeo osteogênico para reparação óssea**. 2016. 220 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2016.

LEITE, S. C.; BARATTO, I. I.; SILVA, R. Consumo de cálcio e risco de osteoporose em uma população de idosos. **RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 8, n. 48, 2014.

LUO, X.; XU, S.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, S.; CHEN, S.; XU, A.; WU, L. A novel method for assessing the toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, v. 168, p. 648-657, 2017.

LYNN, K.; CLEVETTE-RADFORD, N. Purification and characterization of hevain, a serine protease from *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 963-964, 1984.

LYNN, K. R. Hevains: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 10, p. 2279-2282, 1986.

MARKETS AND MARKETS. **Biomaterials Market by Type of Materials (Metallic, Ceramic, Polymers, Natural) & Application (Cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic Surgery, Wound Healing, Neurology, Tissue Engineering, Ophthalmology) - Global Forecast to 2021**. Northbrook, 2016. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterials-393.html>>. Acesso em: 08 jan. 2018.

MARKETS AND MARKETS. **Bone Growth Stimulator Market by Product (Device, Bone Morphogenetic Protein, PRP), Application (Spinal Fusion, Delay Union & Non-union Bone Fracture, Oral-maxillofacial), End User (Hospitals, Home Care, Academia, CROs) - Global Forecasts to 2022.**

Northbrook, 2017. Disponível em:

<<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/bone-growth-stimulator-market-82341383.html> >. Acesso em: 08 jan. 2018.

MASHOCK, M. J.; ZANON, T.; KAPPELL, A. D.; PETRELLA, L. N.; ANDERSEN, E. C.; HRISTOVA, K. R. Copper oxide nanoparticles impact several toxicological endpoints and cause neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1-19, 2016.

MENDES, L. S. Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosa e aplicações como biomaterial. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2012.

MIRANDA, M. C. R.; PREZOTTI, F.; BORGES, F.; BARROS, N.; CURY, B.; HERCULANO, R.; CILLI, E. Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition**, v. 28, n. 18, p. 2117-2130, 2017.

MOTISUKE, M.; CARRODEGUAS, R. G.; ZAVAGLIA, C. A. D. C. Si-TCP synthesized from "Mg-free" reagents employed as calcium phosphate cement. **Materials Research**, v. 15, n. 4, p. 568-572, 2012.

MRUE, F.; NETTO, J. C.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A.; TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v. 7, n. 2, p. 277-283, 2004.

MURBACH, H. D.; OGAWA, G. J.; BORGES, F. A.; MIRANDA, M. C. M.; LOPES, R.; DE BARROS, N. R.; MAZALLI, A. V. G.; DA SILVA, R. G.; CINMAN, J. L. F.; DRAGO, B. C.; HERCULANO, R. D. Ciprofloxacin Release Using Natural Rubber Latex Membranes as Carrier. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, p. 7, 2014.

NASCIMENTO, R.; FAITA, F.; AGOSTINI, D.; JOB, A.; GUIMARÃES, F.; BECHTOLD, I. Production and characterization of natural rubber-Ca/P blends for biomedical purposes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 39, p. 29-34, 2014.

NEVES-JUNIOR, W.; FERREIRA, M.; ALVES, M.; GRAEFF, C.; MULATO, M.; COUTINHO-NETO, J.; BERNARDES, M. Influence of fabrication process on the final properties of natural-rubber latex tubes for vascular prosthesis. **Brazilian Journal of Physics**, v. 36, n. 2b, p. 586-591, 2006.

OLIVEIRA, J. A.; LOPES, J. R.; ESTEVES, A. D. A. Síntese e caracterização de pós de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ obtidas a partir do processo sol-gel. **FOCO: Caderno de Estudos e Pesquisas**, n. 8, p. 55-72, 2016.

OLIVEIRA, L. S. D. A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37-44, 2010.

OLIVEIRA, S. M.; MIJARES, D. Q.; TURNER, G.; AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; TEIXEIRA, C. C. Engineering endochondral bone: *in vivo* studies. **Tissue Engineering: Part A**, v. 15, n. 3, p. 635-643, 2008.

OLIVEIRA, S. V.; MEDEIROS, K. M.; ARAÚJO, E. P.; BRAGA, C. R. C.; ARAÚJO, E. M.; FOOK, M. V. L. Caracterização química e morfológica do pirofosfato de cálcio obtido por via úmida. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4, n. 3, 2009.

ONUMA, Y.; SATAKE, M.; UKENA, T.; ROUX, J.; CHANTEAU, S.; RASOLOFONIRINA, N.; RATSIMALOTO, M.; NAOKI, H.; YASUMOTO, T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 55-65, 1999.

PANDEY, M. R.; GUO, H. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and embryotoxicity of insecticide propoxur using flounder gill (FG) cells and zebrafish embryos. **Toxicology in vitro**, v. 28, n. 3, p. 340-353, 2014.

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*. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 5, p. 681-690, 2008.

PEREIRA, M. D. B. B. **Hidroxiapatita como sistema para liberação de ibuprofeno**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

PICHAYAKORN, W.; SUKSAEREE, J.; BOONME, P.; AMNUAIKIT, T.; TAWEEPRED, W.; RITTHIDEJ, G. C. Nicotine transdermal patches using polymeric natural rubber as the matrix controlling system: effect of polymer and plasticizer blends. **Journal of Membrane Science**, v. 411, p. 81-90, 2012.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.; MORAES, Â. M. Biomateriais: types, applications and market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

RABELO, R. E.; SANT'ANA, F.; PAULO, N. M.; ROMANI, A. F.; SILVA, L.; VIU, M.; ALVES, C. B.; LIMA, C.; SILVA, O. Emprego do compósito látex, poliamida e polilisina a 0,1% na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. **Acta Scientiae**, v. 33, n. 2, p. 169-175, 2005.

RAHMAN, C. V.; BEN-DAVID, D.; DHILLON, A.; KUHN, G.; GOULD, T. W.; MÜLLER, R.; ROSE, F. R.; SHAKESHEFF, K. M.; LIVNE, E. Controlled release of BMP-2 from a sintered polymer scaffold enhances bone repair in a mouse calvarial defect model. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 8, n. 1, p. 59-66, 2014.

RATHNAYAKE, W.; ISMAIL, H.; BAHARIN, A.; DARSANASIRI, A.; RAJAPAKSE, S. Synthesis and characterization of nano silver based natural rubber latex foam for imparting antibacterial and anti-fungal properties. **Polymer Testing**, v. 31, n. 5, p. 586-592, 2012.

RIPPEL, M. M.; PAULA LEITE, C. A.; GALEMBECK, F. Elemental mapping in natural rubber latex films by electron energy loss spectroscopy associated with transmission electron microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 11, p. 2541-2546, 2002.

ROMEIRA, K. M.; DRAGO, B. C.; MURBACH, H. D.; AIELO, P. B.; DA SILVA, R. M.; BRUNELLO, C. A.; HERCULANO, R. D. Evaluation of *Stryphnodendron* sp. release using natural rubber latex membrane as carrier. **Journal of Applied Sciences**, v. 12, n. 7, p. 693, 2012.

RYAN, A. J.; GLEESON, J. P.; MATSIKO, A.; THOMPSON, E. M.; O'BRIEN, F. J. Effect of different hydroxyapatite incorporation methods on the structural and biological properties of porous collagen scaffolds for bone repair. **Journal of anatomy**, v. 227, n. 6, p. 732-745, 2015.

SADER, S. L.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBIERI NETO, J.; MAZZETTO, S. O. A.; ALVES JÚNIOR, P.; VANNI, J. C.; SADER, A. A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 15, n. 4, p. 338-44, 2000.

SASKA, S. **Materiais compósitos orgânicos-inorgânicos a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, OGP e OGP [10-14], para regeneração óssea**. 2011. 256 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2011.

SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; TEIXEIRA, L. N.; FRANCHI, L. P.; DOS SANTOS, R. A.; GASPAR, A. M. M.; DE OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L.; TAKAHASHI, C. S.; MESSADDEQ, Y. Characterization and *in vitro* evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 9, p. 2253-2266, 2012.

SIEBERS, M.; TER BRUGGE, P.; WALBOOMERS, X.; JANSEN, J. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. **Biomaterials**, v. 26, n. 2, p. 137-146, 2005.

SUKSAEREE, J.; BOONME, P.; TAWEEPRED, W.; RITTHIDEJ, G. C.; PICHAYAKORN, W. Characterization, *in vitro* release and permeation studies of nicotine transdermal patches prepared from deproteinized natural rubber latex blends. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, n. 7, p. 906-914, 2012.

SUMAN, P. H. **Caracterização de nanoestruturas de óxido de estanho como sensores de gás**. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2012.

TATHE, A.; GHODKE, M.; NIKALJE, A. P. A brief review: biomaterials and their application. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 19-23, 2010.

VELLOSO, G. R. Fraturas: origem e tratamentos. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 3, n. 2, p. 297-301, 2008.

YOO, S. Y.; KWON, S. M. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

ZANCANELA, D. C.; HERCULANO, R. D.; FUNARI, C. S.; MARCOS, C. M.; ALMEIDA, A. M. F.; GUASTALDI, A. C. Physical, chemical and antimicrobial implications of the association of propolis with a natural rubber latex membrane. **Materials Letters**, v. 209, p. 39-42, 2017.