

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 30/09/2018.

GABRIEL MOLINA DE OLYVEIRA

**Nanocompósitos naturais de celulose bacteriana para medicina
regenerativa**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi

**Araraquara
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

O53n Olyveira, Gabriel Molina de
Nanocompósitos naturais de celulose bacteriana para
medicina regenerativa / Gabriel Molina de Olyveira. –
Araraquara : [s.n.], 2016
138 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Antônio Carlos Guastaldi

1. Materiais biomédicos. 2. Polissacarídeos. 3. Fosfatos
de cálcio. 4. Materiais biomiméticos. 5. Células. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

GABRIEL MOLINA DE OLYVEIRA

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

Araraquara, 30 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara -SP



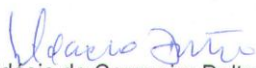
Profª. Drª. Sandra Helena Pulcinelli
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Luis Geraldo Vaz
Faculdade de Odontologia – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Jorge Enrique Rodriguez Chanfrau
Facultad de Química - Universidad de la Havana, La Habana - Cuba



Prof. Dr. Gildásio de Cerqueira Daltro
Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador - BA

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Gabriel Molina de Olyveira

Nascimento: 01/05/1983- Presidente Bernardes/SP

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2013 – 2014 *Doutorado em Química*

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Título: Nanocompósitos naturais de celulose bacterial para medicina regenerativa

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi

Bolsista: CNPQ

2007 – 2009 *Mestrado em Engenharia de Materiais*

Universidade Federal de São Carlos-UFSCAR

Título: Preparação e Caracterização de Nanocompósitos de LDPE e LDPE/EVA com partículas de Ag/TiO₂ para aplicações antimicrobiais

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Pessan

Bolsista: CNPQ

2002 – 2007 *Graduação em Engenharia de Materiais*

Universidade Estadual de Ponta Grossa-UEPG

3. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Máquinas Agrícolas Jacto

2004 - 2005

Vínculo: Estágio Voluntário, Enquadramento Funcional: Estágio no Lab. de Controle P&D e Engenharia, Carga horária: 12 semanas

Outras informações

Estágio no Lab. de Controle P&D e Engenharia de Produto no Setor de Borracha da empresa Máquinas Agrícolas Jacto SA no período de 12/2004 à 03/2005

UNIPAC Indústria e Comércio LTDA

2006 - 2006

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estágio na empresa Unipac Ind.Com.Ltda, Carga horária: 6 meses, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

Estágio na empresa Unipac Ind.Com.Ltda nos setores de Projeto, Laboratório de controle e P&D, Injeção, Sopro de termoplástico e Rotomoldagem no período de 04/2006 à 10/2006.

4. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Artigos completos publicados em periódicos durante o período de Doutorado:

1.

de Olyveira, Gabriel Molina; DOS SANTOS RICCARDI, CARLA ; DOS SANTOS, MÁRCIO LUIZ ; COSTA, LIGIA MARIA MANZINE ; DALTRO, PAULA BRAGA ; BASMAJI, PIERRE ; DE CERQUEIRA DALTRO, GILDÁSIO ; GUASTALDI, ANTÔNIO CARLOS . Physically Modified Bacterial Cellulose Biocomposites for Dental Materials Scaffolds. Materials Focus, v. 4, p. 111-117, 2015.

2.

de Olyveira, Gabriel Molina; DOS SANTOS, MÁRCIO LUIZ ; DOS SANTOS RICCARDI, CARLA ; COSTA, LIGIA MARIA MANZINE ; DALTRO, PAULA BRAGA ; BASMAJI, PIERRE ; DE CERQUEIRA DALTRO, GILDÁSIO ; GUASTALDI, ANTÔNIO CARLOS . Physically Modified Bacterial Cellulose Biocomposites for Guided Tissue Regeneration. Science of Advanced Materials (Print) ^{JCR}, v. 7, p. 1657-1664, 2015.

3.

OLYVEIRA, G.M.;DOS SANTOS, M.L.; RICCARDI, C.S.;COSTA, L.M.M.;DALTRO, P.B.;BASMAJI, P.;DALTRO, G.C.; GUASTALDI, A.C.Bacterial cellulose biocomposites for periodontology treatment. Advanced Science, Engineering and Medicine, 7,409-414, 2015.

4.

MOLINA DE OLYVEIRA, GABRIEL ; SANTOS, M. L. ; Ligia Maria Manzine Costa ; DALTRO, P. B. ; Pierre Basmaji ; DALTRO, GILDÁSIO ; GUASTALDI, A. C. . Bacterial biocomposites for guided tissue regeneration. Science of Advanced Materials , 6, 1-6, 2014.

5.

MOLINA DE OLYVEIRA, GABRIEL ; SANTOS, M. L. ; Ligia Maria Manzine Costa ; DALTRO, P. B. ; Pierre Basmaji ; DALTRO, G. C. ; GUASTALDI, ANTÔNIO CARLOS . Bacterial nanobiocomposites for dental materials scaffolds. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering,4,1-7, 2014.

6.

SANTOS, M. L. ; L.NORONHA, A. ; RICCARDI, C. S. ; **OLYVEIRA, GABRIEL MOLINA** ; A. FILHO, E. ; GUASTALDI, ANTÔNIO CARLOS . The influence of the heat treatment temperatures in calcium phosphate synthesis. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, 4,1-5, 2014.

7.

OLYVEIRA, G.M.;DOS SANTOS, M.L.; RICCARDI, C.S.;COSTA, L.M.M.;DALTRO, P.B.;BASMAJI, P.;DALTRO, G.C.; GUASTALDI.Bacterial cellulose nanobiocomposites for periodontal disease. Journal of Bionanoscience,8,319-324, 2014.

8.

BASMAJI, PIERRE ; **de Olyveira, Gabriel Molina** ; DOS SANTOS, MÁRCIO LUIZ ; GUASTALDI, ANTÔNIO CARLOS . Novel Antimicrobial Peptides Bacterial Cellulose Obtained by Symbioses Culture Between Polyhexanide Biguanide (PHMB) and Green Tea. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, v. 4, p. 59-64, 2014.

9.

ACASIGUA, GERSON ; **OLYVEIRA, GABRIEL** ; COSTA, LIGIA ; BRAGHIROLI, DAIKELLY ; FOSSATI, ANNA ; GUASTALDI, ANTONIO ; PRANKE, PATRICIA ; DALTRO, GILDÁSIO ; BASMAJI, PIERRE . Novel Chemically Modified Bacterial Cellulose Nanocomposite as Potential Biomaterial for Stem Cell Therapy Applications. Current Stem Cell Research and Therapy, v. 9, p. 117-123, 2014.

10.

de Olyveira, Gabriel Molina ; DOS SANTOS, MÁRCIO LUIZ ; DALTRO, PAULA BRAGA ; BASMAJI, PIERRE ; DE CERQUEIRA DALTRO, GILDÁSIO ; GUASTALDI, ANTÔNIO CARLOS . Bacterial Cellulose/Chondroitin Sulfate for Dental Materials Scaffolds. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, v. 4, p. 150-154, 2014.

11.

MOLINA DE OLYVEIRA, GABRIEL ; MARIA MANZINE COSTA, LIGIA ; BASMAJI, PIERRE . Physically Modified Bacterial Cellulose as Alternative Routes for Transdermal Drug Delivery. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, v. 3, p. 227-232,2013.

12.

OLYVEIRA, GABRIEL MOLINA ; ACASIGUA, GERSON ARISOLY XAVIER ; COSTA, LIGIA MARIA MANZINE ; SCHER, CRISTIANE REGINA ; FILHO, LAURO XAVIER ; PRANKE, PATRICIA HELENA LUCAS ; BASMAJI, PIERRE . Human Dental Pulp Stem Cell Behavior Using Natural Nanotolith/Bacterial Cellulose

Scaffolds for Regenerative Medicine. Journal of Biomedical Nanotechnology, v. 9, p. 1370-1377, 2013.

13.

Olyveira, Gabriel Molina ; COSTA, LIGIA MARIA MANZINE ; BASMAJI, PIERRE . High Dispersivity Bacterial Cellulose/Carbon Nanotube Nanocomposite for Sensor Applications. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, v. 3, p. 665-668, 2013.

4.2 Capítulo de livro publicado

1.

de Olyveira, Gabriel Molina; COSTA, LIGIA MARIA MANZINE ; Riccardi, Carla dos Santos ; Santos, Márcio Luiz dos ; DALTRO, PAULA BRAGA ; BASMAJI, PIERRE ; Daltro, Gildásio de Cerqueira ; GUASTALDI, ANTONIO CARLOS . Bacterial cellulose for advanced medical materials. Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering. 5ed.: Elsevier, 2016, v. , p. 57-82.

5. PRÊMIOS

2014

3 lugar no concurso público de pesquisador assistente do CETIM-IPT, IPT-USP.

2012

1 lugar no processo seletivo de Pré Incubação de empresas da Prefeitura Municipal de Santo André/SP, Prefeitura Municipal de Santo André.

2011

TOP 25 Hottest Articles- 21th most downloaded paper- 30 days, Carbohydrate Polymers- Elsevier.

6. ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES

1.

Paula Braga Daltro. Membranas de celulose bacterial com apatitas para odontologia e medicina. Início: 2014. Orientação de outra natureza. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. (Orientador).

DEDICATÓRIA

*A minha família e a minha companheira Ligia,
razão da minha força, das minhas lutas, das minhas vitórias e da minha existência.*

*“O homem não é nada
além daquilo que a educação
faz dele”*

Immanuel Kant

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi, pela orientação, dedicação e conselhos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pierre Basmaji, pelos conselhos e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini, pela realização dos ensaios de SAXS presente nesta tese.

Ao Grupo de Biomateriais, pelo apoio e cooperação prestados.

Aos meus pais, pelos ensinamentos deixados e presenças constantes em minha vida.

Ao meu amor, Ligia, razão da minha força e vontade de continuar sempre e pelo amor dedicado em todos os dias das nossas vidas.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

A Deus, pela razão da minha existência, tornando-me capaz de realizar este e todos os meus sonhos.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro indispensável.

RESUMO

A engenharia de tecidos é um campo que aplica os princípios de engenharia e ciências biológicas para desenvolver substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram o tecido ou a função do órgão por inteiro. A presente tese estudou arcabouços (scaffolds) produzidos com celulose bacteriana/fosfato de cálcio voltados para a regeneração óssea. Foram analisados a modificação do processo de fermentação da celulose bacteriana com moléculas naturais (sulfato de condroitina e ácido hialurônico), modificações físicas superficiais empregando-se irradiação gamma na celulose bacteriana e método biomimético para formação de fosfato de cálcio na superfície da membrana, posteriormente foram testados os biomateriais com células do ovário de hamster chineses (CHO-K1 cells). A modificação com moléculas naturais alterou a carga superficial e a cristalinidade das membranas, a modificação física alterou também propriedades físico-químicas de superfície, interferindo no processo de deposição de fosfato de cálcio. Os fosfatos de cálcio testados pelo método biomimético (SBFs 1 e 3), tiveram resultados melhores quanto a sua incorporação na superfície das membranas não irradiadas de celulose bacteriana e seus nanocompósitos.

Palavras-chave: Biomateriais, celulose bacteriana, Fosfato de cálcio, Método Biomimético, células.

ABSTRACT

Tissue engineering is a field that applies the principles of engineering and life sciences to develop biological substitutes that restore maintain or improve tissue or organ function entirely. This research project studied scaffolds with bacterial cellulose/ calcium phosphate for bone regeneration. The modification of fermentation process of bacterial cellulose with natural polymers (chondroitin sulfate and hyaluronic acid) were analyzed, besides it was analyzed surface physical modifications with gamma irradiation on the bacterial cellulose and biomimetic process to produce calcium phosphate on bacterial cellulose surface. After it was analyzed with CHO-k1 cells. The modification with natural molecules changed surface charge and crystallinity of the membranes, physical modification changed the amount of water in the material, making it more hydrophobic and interfering in calcium phosphate deposition process. Calcium phosphates tested by biomimetic method (SBFS 1 and 3) has better results as their incorporation on non-irradiated bacterial cellulose membranes and its nanocomposites.

Keywords: Biomaterials, bacterial cellulose, Calcium Phosphate, Biomimetic Method, cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representações esquemáticas da estrutura cristalina da Hidroxiapatita	26
Figura 2: Estrutura Química dos Materiais envolvidos na confecção das Membranas.	53
Figura 3: Esquema demonstrativo do mecanismo de reação entre celulose bacteriana e fosfatos de cálcio.	54
Figura 4: Espectro de RMN C ¹³ da celulose bacteriana e seus nanocompósitos.	61
Figura 5: Curva de DSC da membrana de celulose bacteriana e seus nanocompósitos.	63
Figura 6: Curva de DSC da membrana de celulose bacteriana e seus nanocompósitos.	65
Figura 7: Curva de intensidade de espalhamento para as membranas testadas.	66
Figura 8: Função distribuição de pares de distâncias P(r) das várias amostras, considerando um sistema monodisperso.	72
Figura 9: Plotagem de $Iq^2 \times q$ para baixo q.	73
Figura 10: FTIR das amostras de celulose bacteriana/sulfato de condroitina(BC/CS) e celulose bacteriana/ácido hialurônico(BC/HA).	74
Figura 11: FTIR das amostras de celulose bacteriana/ sulfato de condroitina(BC/CS) e celulose bacteriana/ ácido hialurônico(BC/HA) com recobrimento biomimético de SBF0.	76
Figura 12: FTIR das amostras de celulose bacteriana/ sulfato de condroitina(BC/CS) e celulose bacteriana/ ácido hialurônico (BC/HA) com recobrimento biomimético de SBF1.	77
Figura 13: FTIR das amostras de celulose bacteriana/ sulfato de condroitina(BC/CS) e celulose bacteriana/ ácido hialurônico(BC/HA) com recobrimento biomimético de SBF2.	78
Figura 14: FTIR das amostras de celulose bacteriana/ sulfato de condroitina(BC/CS) e celulose bacteriana/ ácido hialurônico(BC/HA) com recobrimento biomimético de SBF3.	79
Figura 15: a) FTIR das amostras de celulose bacteriana/ sulfato de condroitina modificada biomimeticamente com SBF 0.; b) FTIR das amostras de celulose bacteriana/ sulfato de condroitina modificada biomimeticamente com SBF 1.;c)- FTIR das amostras de celulose bacteriana/ sulfato de condroitina modificada biomimeticamente com SBF 2.; d)- FTIR das amostras de celulose bacteriana/ sulfato de condroitina modificada biomimeticamente com SBF 3.	81
Figura 16: Espectro de FTIR das membranas de celulose bacteriana (_); BC/CS não irradiada (_) e BC/CS irradiada com raios gamma (_) , e modificação biomimética; a) SBF0, b) SBF1, c) SBF2 e d) SBF3.	83
Figura 17: a) FTIR das amostras de celulose bacteriana ácido hialurônico modificada biomimeticamente com SBF 0.;b)- FTIR das amostras de celulose bacteriana/ ácido hialurônico modificada biomimeticamente com SBF 1.;c)- FTIR das amostras de celulose bacteriana/ ácido hialurônico modificada biomimeticamente com SBF 2.;d)- FTIR das amostras de celulose bacteriana/ ácido hialurônico modificada biomimeticamente com SBF 3.	84
Figura 18- Espectro de FTIR da membrana de celulose bacteriana (_) ; BC/HA não irradiada (_) e BC/HA irradiada(_) com radiação gamma; e modificação biomimética a) SBF0, b) SBF1, c) SBF2 e d) SBF3.	86

Figura 19: DRX das amostras de celulose bacteriana/sulfato de condroitina(BC/CS) irradiadas e não irradiadas submetidas a tratamento biomimético com SBF 0, SBF1 , SBF 2 e SBF 3. 88

Figura 20: DRX das amostras de celulose bacteriana/ácido hialurônico(BC/HA) irradiadas e não irradiadas submetidas a tratamento biomimético com SBF 0, SBF1 , SBF 2 e SBF 3. 91

Figura 21: MEV da membrana de celulose bacteriana/sulfato de condroitina modificadas biomimeticamente com SBF 0. 92

Figura 22: MEV da membrana de celulose bacteriana/sulfato de condroitina modificadas biomimeticamente com SBF 1. 93

Figura 23: MEV da membrana de celulose bacteriana/sulfato de condroitina modificadas biomimeticamente com SBF 2. 94

Figura 24: MEV da membrana de celulose bacteriana/sulfato de condroitina modificadas biomimeticamente com SBF 3. 95

Figura 25: MEV da membrana de celulose bacteriana/ácido hialurônico modificadas biomimeticamente com SBF 0. 96

Figura 26: MEV da membrana de celulose bacteriana/ácido hialurônico modificadas biomimeticamente com SBF 1. 97

Figura 27: MEV da membrana de celulose bacteriana/ácido hialurônico modificadas biomimeticamente com SBF 2. 98

Figura 28: MEV da membrana de celulose bacteriana/ácido hialurônico modificadas biomimeticamente com SBF 3. 99

Figura 29: MEV da membrana irradiada de celulose bacteriana/sulfato de condroitina modificadas biomimeticamente com SBF 0. 100

Figura 30: MEV da membrana irradiada de celulose bacteriana/sulfato de condroitina modificadas biomimeticamente com SBF 1. 101

Figura 31: MEV da membrana irradiada de celulose bacteriana/sulfato de condroitina modificadas biomimeticamente com SBF 2. 102

Figura 32: MEV da membrana irradiada de celulose bacteriana/sulfato de condroitina modificadas biomimeticamente com SBF 3. 103

Figura 33: MEV da membrana irradiada de celulose bacteriana/ácido hialurônico modificadas biomimeticamente com SBF 0. 104

Figura 34: MEV da membrana irradiada de celulose bacteriana/ácido hialurônico modificadas biomimeticamente com SBF 1. 105

Figura 35: MEV da membrana irradiadas de celulose bacteriana/ácido hialurônico modificadas biomimeticamente com SBF 2. 106

Figura 36: MEV da membrana irradiada de celulose bacteriana/ácido hialurônico modificadas biomimeticamente com SBF 3. 107

Figura 37: Termograma das amostras de celulose bacteriana/sulfato de condroitina tratadas com diferentes SBFs. 109

Figura 38: Termograma das amostras de celulose bacteriana/ácido hialurônico tratadas com diferentes SBFs. 110

Figura 39: Imagens das membranas de celulose bacteriana sem o processo de irradiação. 111

Figura 40: Imagens das membranas de celulose bacteriana modificada com o processo de irradiação. 112

Figura 41: Imagens das membranas de celulose bacteriana modificada com o grupamento sulfato de condroitina. 113

Figura 42: Imagens das membranas de celulose bacteriana modificada com o grupamento sulfato de condroitina e irradiação.	113
Figura 43: Imagens das membranas de celulose bacteriana modificada com o grupamento ácido hialurônico.	114
Figura 44: Imagens das membranas de celulose bacteriana modificada com o grupamento ácido hialurônico e irradiação.	114
Figura 45: Imagens das membranas de celulose bacteriana modificada sem o processo de irradiação e com Sulfato de Condroitina (SBF 0).	115
Figura 46: Imagens das membranas de celulose bacteriana modificada sem o processo de irradiação e com Sulfato de Condroitina (SBF 1).	115
Figura 47: Imagens das membranas de celulose bacteriana modificada sem o processo de irradiação e com Sulfato de Condroitina (SBF 2).	116
Figura 48: Imagens das membranas de celulose bacteriana modificada sem o processo de irradiação e com Sulfato de Condroitina (SBF 3).	116
Figura 49: Espectro Fotoelétrico mostrado sobre uma faixa de energia de ligação de 0-1200eV.	119
Figura 50: Deconvolução do Espectro Fotoelétrico da ligação Carbono(esquerda) e Oxigênio(direita) respectivamente com SBF0,1,2 e 3.	122
Figura 51: Deconvolução do Espectro Fotoelétrico da ligação Cálcio(esquerda) e Fósforo(direita) respectivamente com SBF0,1,2 e 3.	123
Figura 52: Viabilidade celular das membranas de cellulose bacteriana testadas.	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio.	24
Tabela 2: Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos.	25
Tabela 3: Composição Inorgânica de ossos e dentes.	25
Tabela 4- Estruturas cristalinas e parâmetros de rede das fases alotrópicas do TCP.	28
Tabela 5: Polímeros naturais e sintéticos usados para preparação de substratos funcionais para regeneração tecidual óssea.	47
Tabela 6: Concentrações iônicas das soluções SBF utilizadas (mmol.dm^{-3}).	55
Tabela 7: Frequências de infravermelho encontradas no fosfato de cálcio.	80
Tabela 8 : Ângulos de contato e condições de molhamento.	111
Tabela 9: Medidas do Ângulo de contato médio.	112
Tabela 10: Medidas do Ângulo de contato médio dos Nanocompósitos modificados com fosfato de cálcio.	117
Tabela 11: Porcentagem atômica na superfície das Membranas de Celulose Bacteriana.	120

LISTA DE SIGLAS

ACP – Fosfato de Cálcio Amorfo

BC- Celulose bacteriana

CPS- Contagem por segundo

CS- Sulfato de Condroitina

HA- Ácido Hialurônico

BMP-Proteína morfogenética óssea

CA – Apatita Carbonatada do Tipo A

CB – Apatita Carbonatada do Tipo B

DCP – Monohidrogênio fosfato de cálcio

DCPD – Monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado

DRX – Difractometria de Raios X

EDX – Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

HA_D – Hidroxiapatita Deficiente em Cálcio

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

OCP – Fosfato Octacálcico

ROG- Regeneração óssea guiada

RTG- Regeneração tecidual guiada

SAXS-Espalhamento de Raios X a baixo ângulo

SBF – Simulated Body Fluid

TCP – Fosfato Tricálcico

XPS-Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por Raios X

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Biomateriais	19
1.1.1 Definição e dados econômicos	19
1.1.2 Resposta dos biomateriais ao corpo humano	21
1.1.3 Biomateriais utilizados para Regeneração Óssea	23
1.1.4 Materiais Cerâmicos	23
1.2 Fosfatos de cálcio relevantes para área Médica	25
1.2.1 Hidroxiapatita	25
1.2.2 Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	26
1.2.3 Fosfato Octacálcico (OCP)	27
1.2.4 Fosfato Tricálcico (TCP)	28
1.3 Métodos de modificações de superfície com fosfatos de cálcio	29
1.3.1 Método Biomimético de recobrimento de Fosfato de cálcio	29
1.3.2 Que tipo de material exibe afinidade para crescimento ósseo?	30
1.3.3 Requerimentos para um material ter crescimento ósseo	31
1.3.4 Constituição Óssea	31
1.4 Scaffold Natural :Celulose Bacteriana	33
1.5 Membranas para regeneração óssea guiada	35
1.5.1 Membranas não reabsorvíveis	36
1.5.2 Membranas reabsorvíveis	38
1.5.2.1 Polímeros reabsorvíveis naturais	38
1.5.2.2 Polímeros reabsorvíveis sintéticos	43
1.5.3 Fatores de crescimento	45
1.5.4 Degradação das membranas	46
1.6 Celulose Bacteriana, Fosfato de cálcio: Desenvolvimentos recentes	48
OBJETIVOS	51
2 MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1 Materiais	52
2.2 Preparação dos scaffolds biocompósitos/fosfato de cálcio	53
2.3 Caracterização dos scaffolds produzidos	55
2.3.1 Caracterização do material recebido	55
2.3.2 Caracterização do material modificado	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
3.1 Resultados	60
3.1.1 Caracterização do material recebido	60
3.1.1.1 RMN no estado sólido	60
3.1.1.2 DSC	62
3.1.1.3 SAXS	65
3.1.2 Caracterização do material modificado	73
3.1.2.1 FTIR- Interação da Celulose bacteriana com sulfato de condroitina e ácido hialurônico	73
3.1.2.2 Interação das membranas Celulose bacteriana/sulfato de condroitina e ácido hialurônico com apatitas	74

3.1.2.3 Interação das membranas de celulose bacteriana com irradiação gamma e com fosfato de cálcio	80
3.1.2.3.1 Celulose bacteriana/sulfato condroitina	80
3.1.2.3.2 Celulose bacteriana/ácido hialurônico	83
3.1.2.4 DRX-Estudo da estrutura cristalina utilizando difração de raios X	86
3.1.2.5 Análise morfológica-MEV	91
3.1.2.5.1 Celulose bacteriana/sulfato de condroitina	91
3.1.2.5.2 Celulose bacteriana/ácido hialurônico	95
3.1.2.5.3 Amostras irradiadas de celulose bacteriana/sulfato de condroitina	99
3.1.2.5.4 Amostras irradiadas de celulose bacteriana/ácido hialurônico	103
3.1.2.6 Análise Termogravimétrica(TGA)	108
3.1.2.7 Medida de Ângulo de contato	110
3.1.2.8 XPS	117
3.1.2.9 Ensaio Celular	124
CONCLUSÕES	126
ETAPAS FUTURAS	128
REFERÊNCIAS	129

Introdução

1.1 Biomateriais

1.1.1 Definições e Dados Econômicos

Os Biomateriais são considerados como produtos para serem utilizados nos seres humanos com a finalidade de tratamento ou alívio de uma lesão, e também para a substituição anatômica ou de um processo fisiológico. Por isso, incluem qualquer produto natural, sintético e natural modificado que pode ser utilizado como um dispositivo médico. Assim, compreendem os materiais empregados em implantes até os utilizados na fabricação de instrumentos médicos e cirúrgicos que entram em contato com o organismo.¹

O desenvolvimento de materiais para reparo de tecidos ou substituição de órgãos vem ganhando destaque pelo avanço das pesquisas no campo de biomateriais, contribuindo para a melhoria da qualidade e expectativa de vida da população.²

Na atualidade, existe um número significativo de biomateriais metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos para utilização nos diversos campos da Odontologia e Medicina. A experiência com Biomateriais representa um grande avanço nestas áreas, mas ainda requer estudos aprofundados conclusivos no organismo humano.³

Para que um material seja aceito para aplicação como Biomaterial deve ser submetido a uma série de ensaios, rigidamente controlados de acordo com a norma ISO 10993, que exige o cumprimento de normas relacionadas com o caráter não tóxico, não carcinogênico, e sem efeitos adversos no organismo.³

A medicina é uma ciência em constante evolução. O surgimento de novas tecnologias avança numa velocidade alta com tratamentos ou procedimentos sofisticados para a preservação e manutenção da saúde da população de um modo geral.

Os números do setor mostram que, atualmente, existem cerca de 8 mil tipos de dispositivos médicos (Global Medical Devices Nomenclatura - GMDN) e, em 2000, havia no mercado cerca de 1,5 milhão de produtos diferentes (Fonte: OMS). Nos EUA, maior mercado consumidor, 8.000 novos produtos médicos são lançados a cada ano. No Brasil, que representa apenas 1,2% do mercado mundial, são lançados 2.000 novos produtos por ano (fonte: ANVISA). Dentre as empresas

presentes no país, 58,2% são consideradas de médio porte, possuindo uma média de R\$1,2 a 15 milhões de faturamento anual. Trata-se de setor caracterizado pela alta participação de empresas de capital nacional e no qual a competição é fortemente pautada pela capacidade de inovação e diferenciação de produtos.⁴

Fosfatos de cálcio (CaP) ou cerâmicas fosfo-cálcicas são opções ao uso de osso autólogo, materiais provenientes de banco de ossos e principalmente ao uso de enxertos de origem animal.⁵

Dentre todos os fosfatos cálcicos, a hidroxiapatita possui a menor taxa de biodegradação em solução aquosa, ou seja, reabsorção pelo organismo animal. Sendo o principal constituinte mineral da estrutura óssea, a hidroxiapatita vem sendo extensivamente estudada e utilizada como material para a inclusão permanente em estruturas ósseas defeituosas ou anômalas nas cirurgias de reparação óssea em função sua performance como biomaterial.⁶

Diversas técnicas de modificação da superfície de implantes cirúrgicos foram desenvolvidas no sentido de otimizar a adesão do tecido ósseo e conseqüentemente a fixação do implante ao osso. Dentre essas, destacam-se os processos de deposição de revestimentos em implantes que aliam características superficiais específicas do revestimento com propriedades estruturais do substrato. Para isto, tem sido recomendado o uso de revestimento de hidroxiapatita que acelera o período de fixação óssea e aumenta a longevidade do implante cirúrgico.⁷

Dentre estes biomateriais, os à base de cerâmicas têm merecido destaque, pois as biocerâmicas apresentam baixa toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações e habilidade em integrar-se ao tecido hospedeiro. Outros biomateriais são os biopolímeros a base de quitosana, poliuretana (PU), ácido polilático e glicólico (PLGA) e dentre estes a celulose bacteriana produzida por *Acetobacter xylinum*.^{8,9}

Nesse panorama a proposta principal da tese, é disponibilizar scaffolds de maior qualidade baseados em celulose para a sociedade. O rápido desenvolvimento tecnológico permitiu grandes avanços nessa área, aumentando a eficácia dos implantes dentários, representando um importante papel na reconstrução funcional /estética do paciente. Desta forma, o constante avanço da implantodontia tem dado incentivo à pesquisa de biomateriais para esse fim, bem como das reações que ocorrem na interface tecido-implante.¹⁰

O setor de fabricação de produtos médicos, hospitalares e odontológicos tem grande relevância, quando analisado sob o ponto de vista da política de saúde no país e das perspectivas econômicas e de mercado para as empresas fabricantes, como, também, das possibilidades de desenvolvimento tecnológico nacional.

Com isso existe uma tendência natural apoiada pelo governo de que as empresas já existentes se reciclem e se especializem mais, bem como a nucleação de novas empresas com novas tecnologias. Dentro desse segmento, a inovação é o grande diferencial além do melhoramento contínuo, sempre buscando a agregar tecnologias e serviços ao seu leque de produto.

Além disso, a multidisciplinaridade e a intensa interação do setor com outras áreas do conhecimento apontam tendências tecnológicas de criação de dispositivos inteligentes, produtos minimamente invasivos, biotecnologia, produtos combinados (produtos médicos + fármacos), órgãos artificiais, tecnologia da informação e produtos para uso doméstico.

1.1.2 Resposta dos biomateriais no corpo humano

A resposta do meio biológico aos biomateriais é o estabelecimento de uma ligação interfacial entre o implante e o tecido vivo, sem a interposição de tecido fibroso, denominada Fixação Bioativa. Uma importante vantagem da fixação bioativa é que a ligação do implante com o tecido ósseo pode alcançar uma resistência igual ou superior a existente no próprio osso, num intervalo de 3 a 6 meses.

Apesar dos grandes avanços ocorridos nos últimos anos, poucos biomateriais podem substituir completamente todas as funções biológicas, faltando importantes características dos tecidos vivos: capacidade de autoreparação, de manter o fluxo sanguíneo e de modificar suas estruturas e propriedades para responder a estímulos externos. De acordo com Ratner et al.¹¹ a nova geração de Biomateriais é desenvolvida baseando-se no conhecimento de inflamação e cicatrização, na modificação da superfície dos dispositivos já existentes para minimizar a rejeição do corpo estranho, e no desenvolvimento de processos que auxiliem a regeneração e a formação de novo tecido. Dessa forma, o desafio futuro é desenvolver novos biomateriais que sejam capazes de regenerar tecidos.

1.1.3 Biomateriais Utilizados para Regeneração Óssea

Os primeiros materiais utilizados para a substituição do tecido ósseo foram os materiais metálicos, devido às suas propriedades mecânicas. As desvantagens incluem corrosão, alta densidade, liberação de íons que podem causar reações adversas e módulo de elasticidade superior ao do tecido ósseo natural. A diferença de módulo de elasticidade entre um implante e o tecido ósseo pode causar a perda óssea, denominada osteólise, na interface osso-implante, levando a instabilidade e, futuramente, à falha do implante.^{12,13,14}

Quando comparadas aos materiais metálicos, os materiais cerâmicos são considerados materiais aptos para a reposição óssea. Propriedades como resistência a corrosão e elevada resistência a compressão fazem com que os materiais cerâmicos sejam utilizados como substitutos ósseos.¹²

Materiais cerâmicos convencionais como a Alumina (óxido de alumínio) apresentam propriedades mecânicas, resistência ao desgaste, e estabilidade com o meio biológico.^{13,14}

Cerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio, especialmente Hidroxiapatita e o β -fosfato tricálcico (β -TCP), são extensivamente utilizadas para substituição do tecido ósseo devido à sua similaridade com este tecido, que lhe conferem excelente propriedades osteocondutivas, possibilitando a regeneração tecidual. Apesar das vantagens dos materiais cerâmicos em relação aos metálicos, o emprego destes materiais como substituto ósseo é limitado devido à baixa resistência à fratura e alta densidade.

O recobrimento de superfícies metálicas com Hidroxiapatita tem sido uma alternativa utilizada nos últimos 40 anos para conciliar as propriedades osteocondutivas das biocerâmicas com a resistência mecânica dos metais.^{12,13,14}

O desenvolvimento de biomateriais compósitos análogos ao osso iniciou-se em 1980 por Bonfield et al.¹⁵ com a incorporação de partículas cerâmicas em biopolímeros. Como o principal reforço no osso é a Hidroxiapatita envolvida no colágeno, então pareceu razoável obter um compósito utilizando o mesmo reforço.

1.1.4 Materiais cerâmicos

Os materiais cerâmicos a base de fosfato de cálcio apresentam baixa resistência mecânica e alta absorção pelo organismo o que resulta em uma eficiente fragmentação e posterior degradação dos mesmos.¹⁶ Dentre estes materiais, o fosfato octacálcio – OCP [$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$], monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado – DCPD [$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$], hidroxiapatita deficiente em cálcio, também denominado de fosfato de cálcio amorfo – ACP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$] e hidroxiapatita (HA) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e fosfato tricálcio – TCP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$].

Os fosfatos de cálcio têm despertado interesses nas áreas de Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecido pois desempenham um importante papel como biomateriais devido sua capacidade de promover ligações interfaciais entre implante e tecido ósseo facilitando sua integração, além de favorecer o processo de diferenciação de células osteoblásticas.¹⁶

Os fosfatos de cálcio estão entre os materiais utilizados para a reposição e regeneração óssea por apresentarem baixa toxicidade local e respostas inflamatórias. Tais características são explicadas pela natureza química destes materiais que, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico com o fluido biológico.¹⁷ Os fosfatos de cálcio são hoje utilizados numa variedade de diferentes aplicações para o tratamento de problemas ósseos, incluindo como recobrimento de próteses e na associação com materiais poliméricos, tais como colágeno e polietileno.¹⁸

Uma forma conveniente de classificar os fosfatos de cálcio é através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (razão Ca/P), a qual varia de 0,5 a 2,0, conforme mostra a tabela 1. De forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade, principalmente devido a ligação Ca-P ser diferente (esta presente em fosfato de cálcio com maiores razão Ca/P) da a ligação P-OH.

Tabela 1: Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio.²

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ca/P
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico (α , α' , β , γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Monohidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato Heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Dihidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato Monocálcico Monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (α , β , γ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Devido às semelhanças química e estrutural com a fase mineral de ossos e dentes, a HA é o fosfato de cálcio mais pesquisado e utilizado como biomaterial. Contudo, outros fosfatos de cálcio também são considerados de interesse biológico, pois ocorrem em calcificações normais e patológicas e durante as diferentes etapas de desenvolvimento ósseo.¹⁹ A tabela 2 relaciona diversos fosfatos de cálcio e suas ocorrências em sistemas biológicos.

Tabela 2: Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos.¹⁹

Fosfato de Cálcio	Ocorrências
Hidroxiapatita (HA)	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário e urinário.
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	Cálculo dentário e urinário.
Fosfato octacálcico (OCP)	Cálculo dentário e urinário.
Monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	Cálculo dentário, ossos decompostos.
Fosfato tricálcico (TCP)	Cálculo dentário e urinário, cáries dentárias. Calcificação de tecido mole.
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	Depósitos de pseudo-gotas em fluidos.

1.2 Fosfatos de Cálcio Relevantes para área Médica

1.2.1 Hidroxiapatita:

A Hidroxiapatita está presente em ossos e dentes de todos os vertebrados, representando 5% do peso total de um indivíduo adulto. Representa 55% da composição de ossos, 96% da composição do esmalte dentário e 70% da dentina. A tabela 3 apresenta a composição inorgânica de ossos e dentes.

Tabela 3: Composição inorgânica de ossos e dentes.²

Elementos	Osso (%)	Dente	
		Dentina (%)	Esmalte (%)
Ca	34	35	37
P	15	16	17
Mg	0,5	1	0,4
Na	0,8	0,4	0,6
K	0,2	0,1	0,2
C	1,5	1,1	0,8
Cl	0,2	Traços	0,3
F	0,08	0,03	0,01

Apresenta fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, podendo ser escrita também como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, mostrando que há 2 unidades de fórmula na célula unitária. Cristaliza-se no sistema hexagonal com parâmetro de rede, $a = b = 9,43\text{\AA}$, $c = 6,88\text{\AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 60^\circ$. Os átomos de cálcio estão localizados em sítios não equivalentes, sendo 4 no sítio I (Ca_1) e 6 no sítio II (Ca_2), e os íons OH^- ocupam os denominados sítios canais, como apresentado na figura 1.²⁰

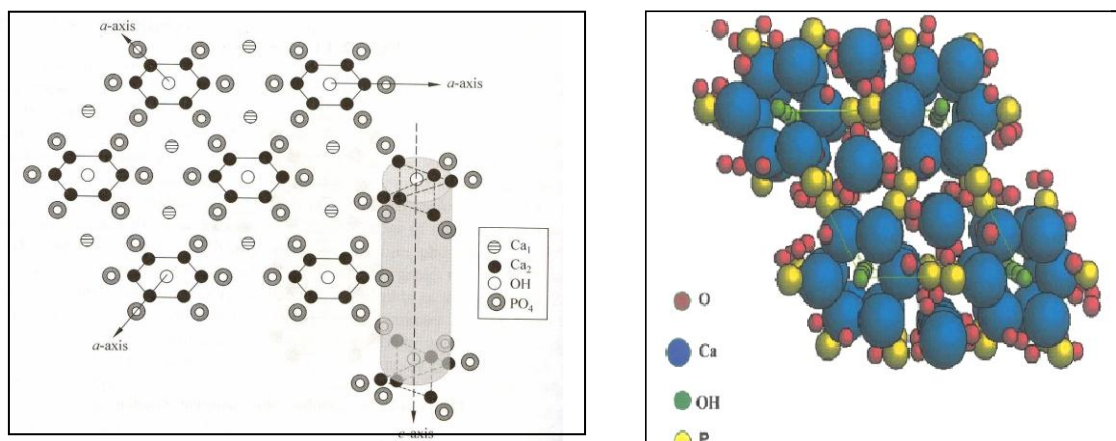


Figura 1: Representações esquemáticas da estrutura cristalina da Hidroxiapatita.²⁰

Apesar de todas as vantagens exibidas pela Hidroxiapatita, seu uso clínico é limitado devido à sua lenta biodegradação. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a Hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 a 5 anos de implantação.²¹

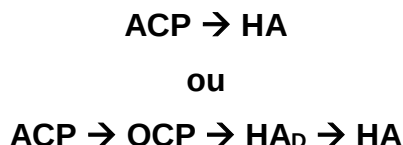
1.2.2 Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP):

Embora não pareça existir em quantidade detectável nos tecidos duros (ósseo), o ACP tem sido encontrado em sistemas biológicos como composição de cálculos dentários e urinários. Apresenta interesse como biomaterial, pois ocorre como uma fase intermediária durante a formação de Hidroxiapatita no meio biológico e em sistemas aquosos.²²

Apresenta fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, com n variando de 3 a 4,5. Corresponde em composição a HA deficiente em cálcio de composição $\text{Ca}_9\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

As principais propriedades apresentadas pelo ACP incluem:

- *Habilidade de transformação a outros fosfatos de cálcio:* o ACP é reconhecido ocorrer como uma fase metaestável nos estágios iniciais da formação de fosfatos de cálcio à partir de soluções aquosas supersaturadas com pH neutro ou alcalino e também durante a mineralização dos tecidos vivos. Pode converter-se diretamente a Hidroxiapatita ou tendo como fases intermediárias o fosfato octacálcico (OCP) e a Hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D), conforme descrito²³:



- *Solubilidade*: a maior solubilidade do ACP em comparação a Hidroxiapatita torna-se uma característica importante para a sua utilização como biomaterial, pois lhe confere maior velocidade de degradação no meio biológico. A velocidade de degradação de um material está fortemente relacionada à osteocondutividade e desempenha papel importante na fixação inicial de implantes com o tecido ósseo.

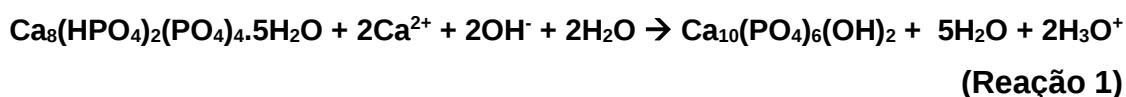
1.2.3 Fosfato Octacálcico (OCP):

Além de ocorrer como fase intermediária durante a formação de ossos e dentes, convertendo-se diretamente a Hidroxiapatita, o OCP apresenta fórmula química $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e estrutura cristalina pertencente ao sistema triclinico com parâmetros de rede $a = 19,71\text{\AA}$, $b = 9,53\text{\AA}$ e $c = 6,83\text{\AA}$ e $\alpha = 9,014^\circ$, $\beta = 92,52^\circ$ e $\gamma = 108,67^\circ$.

Consiste de um arranjo alternado entre camadas com estrutura semelhante a da Hidroxiapatita de composição $4[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}]$ e camadas hidratadas de composição $4[\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$.²⁴

As principais propriedades do OCP incluem :

- *Conversão a Hidroxiapatita*: O OCP é uma fase metaestável e sua transformação a Hidroxiapatita é termodinamicamente favorável, sendo espontânea e irreversível. Esta transformação ocorre por hidrólise do OCP, acompanhada pelo consumo de íons Ca^{2+} da solução ou do fluido biológico, segundo a reação 1²⁵.



Estudo In vitro e In vivo de Ti recobertas com Hidroxiapatita carbonatada e OCP foi realizado por Imaizumi et al.²⁶. Os autores atribuíram o melhor comportamento do OCP à sua maior velocidade de reabsorção que é seguida pela formação de novo tecido ósseo. Esses resultados indicam que o OCP é um

substituto ósseo mais adequado em aplicações onde se requer rápida formação óssea.

1.2.4 Fosfato Tricálcico (TCP):

Este fosfato de cálcio ocorre em várias calcificações patológicas, como cálculos dentários e urinários e é o principal constituinte de cáries dentárias.

Pode ocorrer em 4 formas alotrópicas, onde as temperaturas de transição e sequência de ocorrência são:



a fase γ -TCP só ocorre em altas pressões.

A estrutura cristalina e os parâmetros de rede de cada fase são apresentados na tabela 4. A estrutura cristalina da fase α' -TCP não é conhecida devido à dificuldade de preparação.

Tabela 4: Estruturas cristalinas e parâmetros de rede das fases alotrópicas do TCP.²³

	Sistema	a (nm)	b (nm)	c (nm)
α -TCP	Monoclínico	1,287	2,728	1,521
β -TCP	Romboédrico	1,043	1,043	3,737
γ -TCP	Romboédrico	0,524	-	1,867

As principais propriedades apresentada pelo TCP incluem²⁷ :

- *Biodegradação*: a utilização do TCP juntamente com a Hidroxiapatita tem sido uma alternativa viável para aumentar a velocidade de reabsorção da Hidroxiapatita. Nestes casos, a velocidade de dissolução da mistura Hidroxiapatita/TCP é controlada pela quantidade de TCP utilizado. Devido ao seu comportamento biodegradável, o TCP na formas alotrópicas α e β , tem se tornado objeto de interesse na área de biomateriais, sendo utilizado na ortopedia e odontologia como material de preenchimento de cavidades e defeitos ósseos e fixação de tecidos moles.

1.3 Métodos de Modificação de Superfícies com Fosfatos de Cálcio

A utilização dos fosfatos de cálcio como modificação de materiais metálicos e poliméricos é usual atualmente.

O interesse em usar recobrimentos é principalmente o de promover a estabilização do implante em longo e curto prazo e favorecer a conciliação de propriedades mecânicas e biológicas.²⁸

Os principais métodos utilizados para o recobrimento de superfícies com fosfatos de cálcio são: *Ion Sputtering*, Eletrolítico, *Plasma Spray*, Sol-Gel e Biomimético.

A utilização e exploração de métodos de recobrimento que utilizam soluções aquosas e baixa temperatura (<100°C) têm aumentado nos últimos anos, aumentando o interesse na aplicação e entendimento do Método Biomimético.²⁹

1.3.1 Método Biomimético de recobrimento de Fosfato de cálcio

Em 1990, foi desenvolvido por Abe e colaboradores¹ um procedimento que permite recobrir praticamente qualquer substrato com uma camada uniforme de fosfato de cálcio similar à biológica com até 15µm de espessura, denominado Método Biomimético.

O método utiliza uma solução com composição iônica e pH semelhantes ao plasma sanguíneo, denominada *Simulated Blood Fluid – SBF*, num processo de formação de fosfato de cálcio por precipitação heterogênea. Desde o início o método Biomimético sofreu diferentes variações, tendo em vista acelerar o processo de deposição e aumentar o recobrimento, incluindo pré-tratamentos do material e a utilização de soluções com concentrações variadas.³⁰ Outra alteração consistiu na modificação da composição da solução biomimética, realizada por Aparecida³¹, com o objetivo de possibilitar a obtenção das diferentes fases de fosfato de cálcio de importância biológica como recobrimento, diferente do que foi inicialmente desenvolvido com o propósito de se obter o recobrimento somente da Hidroxiapatita.

O processo de formação de fosfato de cálcio empregando-se o Método Biomimético ocorre pela interação eletrostática entre as cargas presentes na superfície do substrato e os íons da solução. Nos últimos anos, tem sido demonstrado que diversos grupos funcionais, tais como Si-OH, Ti-OH, Zr-OH, Nb-

OH e COOH, quando presentes na superfície do substrato induzem a nucleação de fosfato de cálcio nestas superfícies. Grupos funcionais carregados negativamente são mais efetivos para a nucleação que grupos carregados positivamente.³²

1.3.2 Que tipo de material exhibe afinidade para crescimento ósseo?

Alguns materiais artificiais implantados em defeitos ósseos são encapsulados por tecido fibroso e isolados do osso circundante. Entretanto, em meados de 1970, Hench et al. mostrou que houve formação óssea espontânea em alguns vidros, conhecidos como biovidros, sem encapsulação fibrosa.³³ Desde esta época, o osso tem sido mostrado com capacidade de ligação em cerâmicas vítreas contendo fosfato de cálcio cristalino numa matriz de fase vítrea, chamada Ceravital, hidroxiapatita sinterizada e uma cerâmica vítrea contendo fosfato de cálcio cristalino e Wolastonita numa matriz de fase vítrea, chamada Cerabone A-W. A maior parte destes materiais são já clinicamente usados como importante material para reparo ósseo.^{34,35}

Todos materiais descritos acima contém fosfato de cálcio cristalino ou seus constituintes como componentes principais. Consequentemente, é acreditado que a presença de fosfato de cálcio ou seus componentes foram essenciais para o osso se ligar a um material artificial. Isto clama a uma questão: Qual é o requerimento essencial para um material artificial exibir crescimento ósseo? Se pudéssemos responder a esta pergunta, nós poderíamos desenvolver vários tipos de materiais para crescimento ósseo.

Os mecanismos de formação de fosfato de cálcio nestes materiais operam da seguinte maneira. Os íons cálcio ou sódio são liberados da superfície destes materiais no corpo via troca com íons hidrônio (H_3O^+) do fluido corpóreo. Moléculas de água reagem com a superfície destes materiais criando superfícies ricas em $-OH$ e estas superfícies induzem a nucleação do fosfato de cálcio. Uma vez que núcleos de fosfato de cálcio são formados, eles crescem espontaneamente consumindo os íons cálcio e fosfato do fluido, desde que em condições normais o fluido corpóreo é supersaturado com respeito ao fosfato de cálcio.³⁶

1.3.3 Requerimentos para um material ter crescimento ósseo

Em todos os materiais que apresentaram crescimento ósseo descrito acima, incluindo hidroxiapatita sinterizada, a ligação com o osso tem sido observada por microscopia de transmissão ou de varredura ocorrendo através de uma camada de fosfato de cálcio intermediária que forma na superfície do material *In vivo*.³⁷ Tem sido confirmado que todos estes materiais formam uma camada de fosfato de cálcio na sua superfície utilizando método SBF com concentração iônica e pH próximo ao do plasma sanguíneo humano. Ambos, a composição e estrutura do fosfato de cálcio formada são similares aquelas do fosfato de cálcio ósseo. Consequentemente, é especulado que células que produzem osso poderiam preferencialmente proliferar e diferenciar nesta camada de fosfato de cálcio, além do mais tem sido mostrado que a atividade da alcalina fosfatase é consideravelmente aumentada na camada de fosfato de cálcio que se formam na Cerabone A-W e titânio tratado termicamente em SBF.³⁸

É assumido destes resultados que o requerimento essencial para um material artificial exibir crescimento ósseo é a formação da camada de fosfato de cálcio superficial *In vivo* e que a habilidade de crescimento ósseo num material artificial pode ser avaliado examinando a habilidade de formar fosfato de cálcio na sua superfície com método SBF.

1.3.4 Constituição Óssea

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, que representa cerca de 60% da massa total do osso.³⁹

O osso é feito de em torno de 60% minerais inorgânicos (fosfato de cálcio), 30% materiais orgânicos (colágeno tipo i, osteonectina, osteocalcina, osteopontina, proteoglicano e glicoproteínas) e 10% de componentes celulares (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos).⁴⁰ Cada componente tem uma função crítica para a regeneração e funcionamento do osso. Para todas aplicações em engenharia de tecido ósseo, o material implantado deve ser hermeticamente integrado com o tecido ósseo ao seu redor para fornecer uma ambiente celular adequado para a produção

de proteínas da matriz extracelular. Como mencionado acima, materiais utilizados em aplicações de engenharia de tecido devem mimetizar a matriz extracelular natural de maneira a fornecer suporte mecânico e regular o comportamento celular incluindo a ancoragem celular, segregação, comunicação e diferenciação.⁴¹

Destes 30% dos materiais orgânicos, 90% da fase orgânica é colágeno tipo I e os 10% restantes consistem de proteínas não colagenosas. Proteínas não colagenosas por exemplo, fatores de crescimento e citocinas (fator de crescimento como insulina e proteínas osteogênicas), proteínas indutivas ósseas (osteonectina, osteopontina e osteocalcina) e compostos da matriz extracelular (sialoproteína óssea, proteoglicano ósseo e proteolipídeos) fornecem contribuições menores ao peso total do osso mais tem contribuição maioritária nas funções biológicas, tais como regular o tamanho e orientação dos minerais e serve como reservatório para o cálcio e íons fosfatos. Durante a formação óssea, as proteínas não colagenosas são sintetizadas por osteoblastos e os íons minerais são depositados em zonas vazias e poros da matriz colágena para promover o crescimento ósseo.⁴²

A deposição do fosfato de cálcio nas moléculas de colágeno ocorre por um processo de biomineralização controlado envolvendo mais de 200 diferentes proteínas, que atuam como inibidores e nucleadores para o crescimento epitaxial e ancoragem ao colágeno. As fosfoproteínas são arranjadas nas fibras de colágeno tal qual os íons cálcio podem ser ligados em intervalos regulares, em concordância com a estrutura cristalina inorgânica, fornecendo uma condição repetitiva que leva a uma sequência ordenada ou cristalinidade da fase inorgânica. As células responsáveis pela maioria do processo de montagem são os osteoblastos. Quando o processo de montagem é completado, os osteoblastos se diferenciam para formar osteócitos quais são responsáveis pelo processo de manutenção óssea. A nucleação controlada e crescimento do mineral acontecem em buracos microscópicos formados na matriz de colágeno.⁴³

Não é só a arquitetura complexa do osso natural que o faz difícil de substituir, mas também sua habilidade dinâmica. O osso tem a habilidade de se regenerar quando fraturado e também se remodelar quando há mudanças das condições de forças, por exemplo a massa de mineral óssea pode ser aumentada com exercício, tornando o osso menos provável a fratura. Assim, é importante entender como as células ósseas se coordenam durante o processo de remodelagem óssea.

O osso como um órgão vivo pode mudar em tamanho, forma, posição e propriedade pelo seu processo de remodelagem para responder a diferentes tipos de tensão produzidos por atividade física ou forças mecânicas. Portanto, o osso tem capacidade de se auto reparar sobre tensão mecânica ativando o processo de remodelagem. Este processo envolve as três maiores tipos de células ósseas: osteoblastos (células de formação óssea), osteoclastos (células de reabsorção óssea) e osteócitos (células de manutenção óssea).⁴⁴

Osteoclastos são ativados por fatores de crescimento, citocinas e proteínas presentes na matriz óssea para reabsorver o osso antigo. Osteoblastos são então ativados por fatores de crescimento tal como fator de crescimento como insulina I e II secretados por osteoclastos e/ou osteócitos para depositar minerais que contenha cálcio. Osteócito regulam a nova formação óssea modulando a diferenciação osteoblástica de células que não depositam cálcio para células que depositam cálcio através da secreção de fatores de crescimento tal como fator de crescimento como insulina I e fator de crescimento tecidual β .⁴⁵

1.4 Scaffold Natural :Celulose Bacteriana

O grande interesse pela procura por novos biopolímeros com propriedades específicas para serem utilizados como *scaffolds* na engenharia de tecidos, tem aumentado nos últimos anos, o que pode ser verificado através de inúmeros estudos realizados que visam o desenvolvimento de novos biomateriais.⁴⁶

Sabe-se que o tecido ósseo é produto de minerais naturais, principalmente nanocristais de fosfato de cálcio e colágeno.⁴⁷ Desta forma nanocompósitos de hidroxiapatita e colágeno tem sido extensamente estudado, porém muitos são os relatos dos problemas envolvendo a prática do colágeno, como seu alto custo, dificuldade para o controle de infecções e poucas definições de fontes comerciais deste produto. Por outro lado, a celulose bacteriana quando comparada ao colágeno elimina a ocorrência de infecções e apresenta maiores propriedades mecânicas.⁴⁷

A celulose bacteriana é um tipo de polissacarídeo extracelular apresentado na forma de biofilme sintetizado por vários tipos de bactérias, principalmente pela *Acetobacter xylinum*, na forma de microfibrilas apresentando propriedades que a diferem da celulose vegetal. A celulose bacteriana possui características e propriedades úteis para engenharia de tecido e medicina regenerativa tal como baixa toxicidade, facilidade de manuseio e estrutura nanométrica, tendo assim um

ambiente físico-químico para adesão e proliferação celular. A celulose bacteriana tem excelentes resultados em humanos quanto a regeneração tecidual da pele.^{48,49}

Assim, a modificação da celulose parece ser um pré-requisito no processo de mineralização biomimética, o que pode ser alcançado por meio de modificações químicas nos grupos hidroxilas das cadeias da celulose, mudando a carga superficial e as propriedades de superfície deste material, facilitando o depósito de material inorgânico.⁴⁹

A celulose bacteriana tem sido amplamente utilizada na engenharia de tecidos devido às suas propriedades intrínsecas como hidrofiliabilidade, finas fibras que permitem o crescimento e proliferação de células e devido sua produção ser de baixo custo e em grande escala.

Na área médica tem sido utilizada como curativo em casos de lesões, queimaduras e ferimentos da pele, micro vasos artificiais e na engenharia de tecidos para reparação óssea.^{50,51} Estudos preliminares modificando o meio de cultura da celulose bacteriana com materiais naturais(mel, tâmara e cana de açúcar) e obtendo nanobiocompósitos com diferentes cristalinidades, propriedades térmicas e também carga superficial foram bem sucedidos.^{50,51} Deve se ressaltar que artigos já foram publicados durante o desenvolvimento do doutoramento utilizando as membranas de celulose bacteriana com modificações em seu meio fermentativo(sulfato de condroitina e ácido hialurônico) de maneira a ter sua carga superficial modificada apta assim para adesão e viabilidade celular, além do depósito de material inorgânico.^{52,53}

Tendo em vista o sucesso da regeneração tecidual em humano e animais, nosso grupo realizou também modificação superficial com radiação gamma da celulose bacteriana e os resultados foram surpreendentes.⁵⁴ Assim, um sistema que tenha diferente carga superficial, promete ser promissor na área de regeneração tecidual e biomateriais. Aliado a estas propriedades a utilização de células e fosfato de cálcio tem sido bastante estudada pois apresentam como característica a diferenciação osteogênica qual tem papel importante na regeneração óssea.^{8,9}

Com base nestas características, portanto, o biomaterial a ser desenvolvido deverá apresentar propriedades mecânicas condizentes com as do tecido a ser regenerado, oferecer estabilidade na interface tecido/ implante, além de promover a regeneração óssea.

1.5 Membranas para regeneração óssea guiada

A terapia de regeneração tecidual guiada (RTG) foi introduzida com o objetivo de se conseguir um redirecionamento de fibroblastos do ligamento periodontal e promover regeneração dos tecidos em casos de periodontite crônica.⁵⁵

Atualmente, técnicas para RTG vem sendo extensivamente usadas tanto em cirurgias periodontais quanto em craniotomias em reconstruções de pacientes fissurados, cirurgias ortopédicas ou em cirurgias plásticas.⁵⁶

Os princípios para RTG baseiam-se: 1-criar e manter um ambiente protegido e favorável para as células, 2-impedir que os tecidos incapazes de promover a regeneração entrem em contato com o tecido a ser regenerado; 3- permitir a proliferação das células viáveis para regeneração. Quando a regeneração guiada está relacionada à reparação de estruturas ósseas denomina-se regeneração óssea guiada(ROG), a qual controla a estimulação da neoformação óssea em defeitos ósseos por osteogênese, restabelecendo as características estruturais e funcionais do tecido ósseo, baseando-se em quatro princípios: 1-restrição de infiltrado de tecido conjuntivo no local do defeito; 2-criação e manutenção do espaço; 3- proteção fundamental do coágulo; 4- estabilização da ferida.⁵⁷

O conceito de regeneração tecidual guiada em Periodontia foi proposto por Melcher, que descreveu o comportamento biológico de diferentes tecidos(epitélio gengival, tecido conectivo, ligamento periodontal, osso alveolar) durante cicatrização.⁵⁸ De acordo com este conceito, células que tem a capacidade de formar osso, cemento e ligamento periodontal devem ocupar o defeito num apropriado tempo e numa própria sequência para resultar em regeneração dos tecidos como oposto ao simples reparo do defeito. Por que as células progenitoras residem no ligamento periodontal ou osso alveolar, a colocação da barreira física entre o retalho gengival e o defeito antes do reposicionamento do retalho e da sutura foi proposto para evitar o epitélio gengival e o tecido conectivo de ocupar o espaço sobre a barreira.⁵⁹

No princípio da utilização desta terapia, o tratamento de preferência em ROG, era com membranas não reabsorvíveis de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE), devido a suas características biológicas inertes e por apresentarem resultados efetivos e previsíveis como barreira mecânica.⁶⁰ Em ROG, a membrana para ser efetiva deve satisfazer alguns critérios como: biocompatibilidade, integração aos

tecidos adjacentes, estabilidade mecânica e fácil manuseio. E com advento de novos substitutos ósseos ou de tecido moles, naturais e/ou sintéticos, estes se tornaram biomateriais com potencial para aplicações clínicas nas diversas áreas da saúde. Sendo que, as membranas reabsorvíveis vem ganhando espaço com o desenvolvimento de novos biomateriais, pois o resultados mostram que não há diferença significativa entre as não reabsorvíveis e as reabsorvíveis em ROG.⁶¹

Dentre os materiais mais usados como membranas reabsorvíveis estão: colágeno (tipo I e III), poliácido láctico (PLA), poliácido glicólico (PGA), copolímero de poliácido láctico/poliácido glicólico (PLGA). Estas membranas podem estar associadas à biocerâmicas ou a fatores de crescimento, apresentando propriedades osteoindutoras.⁶²

1.5.1 Membranas não reabsorvíveis

Politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE)

As membranas de e-PTFE são reconhecidas como as mais utilizadas, dos derivados para regeneração tecidual guiada, principalmente a Gore-Tex®. Já a Gore-Tex® Reinforced é a membrana de e-PTFE reforçada com titânio. Estas membranas de e-PTFE, estão disponíveis de diversas formas, assim mantém adequadamente o espaço a ser regenerado, mesmo em caso de exposição são facilmente removidas.

A aplicação dos princípios de regeneração óssea guiada utilizando membranas compostas de e-PTFE para tratamento e/ou reconstrução de defeitos críticos ou não críticos de ossos longos ou craniofaciais está bem consolidada devido a seus resultados ao longo dos anos apresentarem alto índice de sucesso e de previsibilidade a curto e a longo prazo, principalmente quando estas membranas estão associadas a materiais de preenchimento ósseo, como enxertos ou substitutos ósseos⁶³ ou a fatores de crescimento⁶⁴. Estudos clínicos e experimentais corroboram com este tipo de terapia, pois a ROG pode reduzir a necessidade de outras intervenções cirúrgicas, por exemplo, enxertias ósseas em pacientes com volume ósseo inadequado para instalação de implantes.⁶⁵

Apesar das membranas de e-PTFE apresentarem previsibilidade em seus resultados, inúmeras desvantagens tem sido relacionadas ao longo dos estudos tanto clínicos quanto experimentais com membranas não reabsorvíveis.⁶⁶

Atualmente, estes resultados conduzem esse tipo de membrana para o insucesso clínico, pois a engenharia com advento de novas técnicas no processo de desenvolvimento e aprimoramento de características mecânicas, físicas e químicas dos biomateriais reabsorvíveis, principalmente em polímeros de origem natural, vem conquistando importante espaço nas terapias de ROG por apresentarem propriedades similares aos materiais não reabsorvíveis. Com o uso de membranas reabsorvíveis não há necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, apresentam menor índice de exposição da membrana, consequentemente, redução de infecção pós operatória.⁶⁶

Os resultados da revisão literária, mostraram que os estudos com e-PTFE associados a ROG estão relacionados a carregadores para as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), principalmente para recombinante humana de proteínas morfogenéticas ósseas-2 (rhBMP-2). O carregador mais usado nesses estudos foi a esponja de colágeno reabsorvível.⁶⁵

As BMPs são glicoproteínas extraídas da matriz óssea desmineralizada ou sintetizadas e purificadas por meio de recombinação gênica (DNA recombinante), representam 0,1% da massa da matriz óssea, pesam cerca de 18 KDa, hidrofóbicas e são responsáveis pela osteoindução. Classificadas como uma subfamília dentro da superfamília dos fatores de crescimento e transformação- β (TGF- β), além disso são encontradas em outros tecidos como cérebro, coração, pulmão, apresentando uma importante função nos processos fisiológicos durante a embriogênese.⁶⁷

Outra complicação relacionada às membranas e-PTFE foi exposição prematura destas quando exposta a cavidade oral, o risco de infecção e contaminação é alto afetando a regeneração de tecidos. Contudo, um estudo experimental realizado por Strietzel e colaboradores (2006) onde compararam 7 tipos de membranas para ROG, 4 tipos não reabsorvíveis e 3 tipos reabsorvíveis se observou ausência de fístula em todas testadas.⁶¹

Politetrafluoroetileno denso(d-PTFE)

A utilização de membranas composta de politetrafluoroetileno denso para ROG é muito limitada, pois impedem adequado suprimento sanguíneo no local a ser regenerado. Portanto, para barreiras não porosas é necessário durante o procedimento cirúrgico colocar uma fina camada de tecido conjuntivo por baixo da membrana para que consiga obter uma efetiva cicatrização óssea.⁶⁸ Os resultados obtidos com d-PTFE foram: ausência de exposição e de fístula e histologicamente ausência de infiltração de tecido conjuntivo no interior do defeito ósseo devido a densidade do material e fina camada de tecido conjuntivo sobre e sob as membranas; além de acentuada densidade óssea trabecular.⁶¹

Titânio

As membranas de titânio são membranas rígidas, portanto, sem tendência de colapsar dentro dos defeitos, e, quando requeridas para tratamento ROG geralmente estão associadas a enxertos ósseos. Estas membranas possuem microporosidades capaz de prevenir a penetração de células e fibras colágenas e permitem a difusão do fluído intersticial. Devido as suas características mecânicas, esta barreira promove uma melhor manutenção do espaço, favorecendo formação e estabilidade do coágulo sanguíneo, que é essencial para proliferação celular e regeneração tecidual.⁶⁹ Por possuir uma superfície menos aderente às bactérias, o titânio pode ser uma boa alternativa quando há necessidade de usar membranas não reabsorvíveis, pois se ocorre exposição da membrana, o risco de contaminação é menor.

1.5.2 Membranas reabsorvíveis

1.5.2.1 Polímeros reabsorvíveis naturais

Os polímeros naturais possuem vantagem no reconhecimento biológico que pode positivamente suportar adesão e função celular. As desvantagens encontradas na utilização destes polímeros são: 1- podem induzir imunorejeição e transmitir patógenos quando os materiais são de fontes animais ou de cadáveres; 2- menos controle sobre a degradação e consistência do polímero; 3- Fraca resistência

mecânica. A reabsorção destes polímeros se resulta por mecanismos celulares, através de reações enzimáticas ou por fagocitose.

Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante nos vertebrados. Esta classe de proteína promove suporte estrutural para os tecidos, sendo de importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo. No homem, o colágeno representa mais de 30% de sua proteína total, e 80-90% do colágeno corporal constituem-se do tipo I,II,III.⁷⁰

O colágeno tipo I é a proteína animal mais abundante, forma a matriz do osso, da pele e de outros tecidos. Presente nos tendões, na cartilagem fibrosa, no tecido conjuntivo frouxo comum e no tecido conjuntivo denso. A matriz de colágeno tipo I oferece um ambiente favorável para indução de diferenciação de osteoblastos *In vitro* e osteogênese *In vivo*.⁷⁰

O colágeno tipo II é produzido por condrócitos, aparece na cartilagem hialina e na cartilagem elástica. Presente nos discos intervertebrais, olhos e cartilagem.

O colágeno tipo III constitui as fibras reticulares dos tecidos, e também é muito utilizado na confecção de membranas para RTG. Está presente em tecidos como: pele, aorta, pulmões.⁷¹

As membranas de colágeno quando não mineralizados são normalmente frágeis dificultando sua manipulação clinicamente. A grande vantagem é que possuem excelente afinidade celular, estimulando a produção de fibroblastos e agindo como suporte de migração dessas células. Outras vantagens são: a boa adaptação a superfícies ósseas, principalmente de raízes dentárias e efeito hemostático. Quando embebidas na matriz óssea são gradualmente metabolizadas pela remodelação óssea, ou ainda, podem ser incorporadas parcialmente na matriz óssea.⁷¹

A reabsorção do colágeno ocorre paralelamente a neoformação óssea, bem como junto à neoformação de tecidos periodontais (cimento e ligamentos periodontais) quando ROG é aplicada às cirurgias periodontais durante um período de 6 a 8 semanas.⁷¹

A membrana Bio-Gide®, nos últimos cinco anos, foi a membrana mais utilizada para regeneração óssea guiada, composta de colágeno tipo I e III de

origem suína, possui uma estrutura de bicamada sendo uma compacta e outra porosa. Sobre a camada compacta (face externa), o tecido de granulação e vasos sanguíneos crescem sobre a região do defeito, e, na camada porosa (face interna) forma uma matriz tridimensional para integração óssea. A estrutura natural do colágeno Bio-Gide® é ideal para adesão de tecidos, sendo que o osso neoformado é protegido contra o crescimento de tecido conjuntivo dentro da região do defeito; apesar de impedir infiltração celular esta membrana é permeável para nutrientes, e, a degradação ocorre através de reações enzimáticas sem irritar os tecidos adjacentes.⁶¹

Estudo com membrana de colágeno em ROG tem relatado resultados satisfatórios *In vivo*, por exemplo, a taxa de regeneração óssea possui efetividade similar às membranas de e-PTFE, isto devido ao advento de membranas de colágeno com boa resistência mecânica. No passado, era difícil obter resultados tão satisfatórios e previsíveis devido à dificuldade de se produzir membranas de colágeno com estas características.⁶¹

A membrana GenDerm®, foi outra membrana bastante estudada, esta membrana é composta por colágeno ósseo natural originado da descalcificação e laminação de osso cortical bovino. É tolerada pelos tecidos e é completamente reabsorvida por células mononucleares e células gigantes multinucleadas depois 30-60 dias pós operatório.⁷²

Outro material que apresentou excelentes resultados na ROG foi a Bio-OssCollagen®. Consiste em um material de preenchimento ósseo com aproximadamente 90% de partículas de osso bovino desproteínado, embebidas em uma matriz de colágeno de porco reabsorvível. Estudos histológicos em humanos tem mostrado regeneração de cimento, ligamento periodontal e preenchimento dos defeitos periodontais intra-ósseos, com redução da profundidade de sondagem e ganho em nível de inserção gengival expressivo utilizando somente o Bio-Oss Collagen® ou em associação com membranas de colágeno (ROG). A degradação desse material ocorre parcialmente durante os primeiros 6 meses, sem afetar os parâmetros clínicos.⁷³

Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo natural biodegradável, composta de ligações 1,4 – β - D-glicosamina. Está presente em quantidades abundantes em invertebrados

marinhos e terrestres. Atualmente, a quitosana desacetilada exibe baixa taxa de degradação em meio aquoso e pode demorar vários meses para se degradar sendo portanto, um material em potencial para o desenvolvimento de sistemas baratos e versáteis para carregadores de drogas.⁷⁴ Alguns trabalhos tem relatado as propriedades osteoindutoras e osteocondutoras da quitosana quando usada como scaffolds ou em associação com carregadores de colágeno (ACS/quitosana).⁷⁵ Yeo e colaboradores (2005) sintetizaram uma membrana de quitosana e compararam-na com membrana a base de PLGA (Biomesh®) em ROG, e observaram que as membranas de quitosana proporcionaram um aumento acentuado de neoformação óssea e cementária, sugerindo que este material poderá futuramente ser utilizado para indução de regeneração de tecido periodontal.⁷⁶

Celulose Bacteriana

Atualmente, acredita-se que a celulose bacteriana possa se tornar um dos produtos biotecnológicos mais importantes tanto na área da saúde quanto para o setor industrial, pois pode ser obtida em larga escala com baixo custo de fabricação. Obtida através de rotas de biossíntese por meio de bactérias de alguns gêneros como: *Glucanoacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*.⁷⁷

Esta celulose é pura, livre de componentes como ligninas, hemicelulose, e outros polissacarídeos encontrados embebidos na celulose vegetal. Este fator diminui o custo final da produção, visto que a etapa de extração do material não é necessária⁷⁷.

Glucanoacetobacter xylinum (*Acetobacter xylinum*) é uma bactéria gram-negativa heterotrófica, sendo que o meio de cultura para esta bactéria é simples, podendo-se utilizar uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio para seu crescimento em um meio líquido, mas basicamente se utiliza a glicose como fonte de carbono⁷⁷.

A membrana de celulose é uma estrutura tridimensional constituída de um sistema ultrafino de nanofibras (3-8nm). Esta estrutura 3-D resulta numa celulose altamente cristalina (60-80%) e alta resistência mecânica, porém a membrana é não absorvível no corpo humano, sendo somente absorvível em ruminantes que possuem as enzimas necessárias para sua degradação.⁷⁸

No Brasil, na década de 80, a Innovatec's Produtos Biotecnológicos Ltda. passou a produzir a Nanoskin®, uma película de celulose pura microfibrilar biosintética, obtida por bactérias do gênero *Acetobacter*, podendo ser usada como instrumento na reconstrução e substituição temporária da pele, em queimaduras e outras situações como úlceras e enxertos, pois sua estrutura fisiológica é semelhante a pele humana. Em Odontologia, foi empregada para regeneração tecidual guiada e regeneração óssea guiada. Obtendo sucesso clínico em todos estudos.⁷⁹

A Nanoskin®, portanto apresenta características importantes como biocompatibilidade, sendo também atóxica, e permeável, permitindo trocas gasosas. Atua também como uma barreira contra os microorganismos, em tecido ósseo funciona como uma barreira impedindo que células fibroblásticas e o tecido conjuntivo fibroso invadam os defeitos ósseos, assim promovendo uma neoformação óssea efetiva no local.⁸⁰

Em relação aos estudos *In vivo*, estudos experimentais com celulose bacteriana e ROG foram realizados. Olyveira et al. verificaram o potencial osteogênicos de membranas de celulose bacteriana com nanopartículas de otólitos, que tem comprovadas propriedades de osteogênese.⁴⁶

Otólitos são concreções de carbonato de cálcio presentes dentro de câmaras no aparelho vestibular do ouvido interno dos vertebrados e que têm a função de controlar a posição do corpo do animal, ou seja, manter o equilíbrio postural.⁴⁶

As membranas estimularam a formação da barreira tecidual mineralizada e induziram a resposta reparativa da polpa dentária, sendo um material potencial para regeneração da polpa dentária.⁴⁶

Macedo et al. testaram 2 barreiras físicas usadas para tratar defeitos ósseos por Regeneração Tecidual guiada, PTFE (Politetrafluoroetileno-Teflon) e Membranas de Celulose Bacteriana. Os defeitos cobertos com as barreiras de Teflon (PTFE) foram completamente reparados com tecido ósseo enquanto as baseadas em Celulose Bacteriana resultou em buracos e falta de continuidade de deposição óssea. Assim, as Membranas baseadas em Teflon (PTFE) preencheram todos requerimentos para induzir a regeneração do osso natural ⁸¹.

Helenius et al. testaram a biocompatibilidade das membranas de celulose. A celulose bacteriana foi implantada subcutaneamente em ratos e avaliadas em 1, 4 e 12 semanas. Não houve sinal macroscópico e nem microscópico de inflamação em

torno do implante. Sem cápsulas fibróticas e células gigantes, os fibroblastos foram infiltrados na celulose bacteriana, qual foi bem integrado no tecido hospedeiro e não mostrou nenhuma reação inflamatória crônica.⁸²

1.5.2.2 Polímeros reabsorvíveis sintéticos

Poliácido láctico, poliácido glicólico e poliácido(láctico-co-glicólico)

Os polímeros reabsorvíveis sintéticos, baseados primeiramente nos Poliésteres, são usados clinicamente nas formas de fio de sutura, derivados de sistemas de fixação interna rígida (placas e parafusos), e, como matrizes para regeneração e reparação óssea (membranas e scaffolds). A degradação destes materiais ocorre por hidrólise não enzimática devido as ligações ésteres serem hidroliticamente fracas, os produtos liberados desta etapa são metabólicos naturais e atóxicos, que são convertidos à água e a dióxido de carbono.⁸³

Durante o processo de degradação dos polímeros bioreabsorvíveis as ligações ésteres sofrem hidrólise originando cadeias menores (oligômeros até monômeros). Estes polímeros e copolímeros possuem uma taxa de degradação controlada podendo ser reabsorvível em poucas semanas ou em vários anos dependendo da proporção de PLA e PGA. A velocidade de degradação desses materiais depende, portanto, da composição química de cada um deles, cristalinidade, peso molecular e distribuição de peso molecular.⁸³

Os copolímeros PLGA possuem vantagem sobre outros polímeros bioreabsorvíveis, como o poli (L-ácido láctico) devido ao fato do copolímeros PLGA requerer um menor tempo para sua completa degradação, implicando menor probabilidade de reações adversas, as quais decorrem muitas vezes de fragmentos cristalinos liberados por polímeros com tempo de degradação excessivamente longos.⁸³

Em regeneração óssea, esses polímeros são empregados como um suporte funcional em conjunto com outras tecnologias, por exemplo, na engenharia tecidual esses materiais podem ser empregados como scaffolds, os quais podem ser semeados com células ou integrados com fatores de crescimento para regeneração óssea, cartilaginosa e de outros tecidos. Na maioria dos casos clínicos tanto em

Odontologia quanto em Ortopedia, as membranas foram associadas a materiais de preenchimento ósseo como autoenxerto, aloenxerto, xenoenxerto.⁸⁴

Os resultados obtidos pelos diversos autores comprovaram a eficiência clínica desses tipos de membranas na regeneração óssea guiada a longo prazo, com diminuição significativa dos defeitos intra-ósseos. Quando comparadas com membranas não reabsorvíveis, as membranas Resolut® apresentaram regeneração similar as Gore-Tex®, levando ao sucesso do tratamento.⁸⁴

Gore Resolut® XT consiste em uma estrutura de 3 camadas, com 2 matrizes de fibras (face interna) e 1 (face externa) com filme oclusivo para as células. É composta de polímeros sintéticos como políácido láctico, políácido glicólico e carbonato de trimetileno. Dentro de 8 a 10 semanas permanece com sua estrutura intacta, mantendo sua função de barreira, com reabsorção completa dentro de 6 a 7 meses, já a Gore Resolut Adapt®LT mantém sua função de barreira entre 16-24 semanas e gradualmente sendo reabsorvidas.⁸⁴

Polietileno glicol(PEG)

PEG compreende um grupo de polímeros sintéticos degradáveis na forma de hidrogéis, os quais podem ser injetados dentro de cavidades de maneira minimamente invasiva para as células. Os hidrogéis podem ser definidos como materiais que exibem capacidade para absorver água e reter uma fração significativa de água dentro de sua estrutura, esta capacidade de absorção de água é devido à presença de grupos hidrofílicos como: -OH, -CONH, -CONH₂, -COOH, -SO₃H.⁸⁵

A desvantagem do hidrogel para aplicação na engenharia tecidual óssea é devido a sua baixa resistência mecânica, apresentando dificuldades em manuseá-la *in situ* na preparação de membranas para ROG.⁸⁵

Há duas maneiras de se preparar e aplicar este biomaterial, uma delas é a aplicação do hidrogel com certa viscosidade sobre o defeito ósseo, obtendo-se uma fina camada de PEG. A outra forma é a preparação de uma membrana pré moldada, passível de esterilização prévia ao procedimento cirúrgico, neste modo o PEG não possui agente para controlar o escoamento do material.⁸⁶

A degradação do PEG ocorre por hidrólise dos grupos ésteres entre as cadeias do material num período curto, poucos dias ou semanas *In vivo*, o que tornaria este material pouco viável para ROG, pois em ROG é necessário um

controle maior na duração da membrana em função, como barreira, por vários meses para o procedimento ser efetivo.⁸⁶

PEG foi usado em ROG em defeito cirúrgicos não críticos em calota (coelho), tanto membranas pré-moldadas quanto em gel manipuladas *In situ*, apresentaram efetividade na regeneração óssea em 4 meses semelhante as membranas de e-PTFE.⁸⁵

Novas tendências biotecnológicas para ROG

A busca constante do aprimoramento das propriedades Físico-Químicas das membranas leva inúmeros pesquisadores a desenvolverem Biomateriais com máximo de características que se consiga satisfazer a forma e técnicas de aplicações das Membranas Reabsorvíveis em ROG.⁸⁷

Os critérios que devem nortear o material das membranas são: 1- Biocompatibilidade; 2- Integração tecidual; 3- Resistência Mecânica; 4- Estabilidade química.⁸⁷

O material da membrana contendo esses critérios consegue-se obter osteogênese com segurança e previsibilidade. Desta forma, as propriedades físico – químicas que um biomaterial deve possuir para ROG estão relacionadas à superfície do material.⁸⁷

Os resultados da literatura verificaram que as membranas reabsorvíveis promovem ganho de inserção gengival, redução da profundidade de sondagem e maior ganho em tecido ósseo; além de não haver necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para remoção da membrana.⁸⁸

Contudo, há uma variabilidade entre os estudos e relevância das alterações clínicas, ficando difícil traçarem conclusões gerais sobre os benefícios clínicos da ROG, mas fica evidente que as membranas reabsorvíveis para ROG podem apresentar resultados tão efetivos quanto as membranas não reabsorvíveis.⁸⁹

1.5.3 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são polipeptídeos que agem como mediadores biológicos, estes fatores como: as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o peptídeo sintético com 15 resíduos

(P-15) associado a osso bovino inorgânico são terapias que atualmente vem sendo extensivamente analisadas em ROG. O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena de fatores de crescimento derivados de plaquetas, obtido através do processo de centrifugação e sua utilização em defeitos periodontais ainda é recente não havendo dados substanciais para sua aplicação em ROG.^{90,91}

Por exemplo, o ácido aspártico (RGD), uma pequena sequência peptídica, tem sido capaz de mediar a adesão celular para várias proteínas da matriz extracelular tais como fibronectina, vitronectina, sialoproteína óssea e osteopontina. Além de estas respostas celulares primárias, o material deve também conter sítios celulares ligantes de integrina e sítios celulares ligantes de fator de crescimento para promover osteointegração.⁹²

O componente inorgânico do osso não somente promove a adesão de osteoblasto e migração (osteocondução), mais também fornece resistência ao tecido ósseo. No caso da formação do novo tecido, osteoindução e angiogênese são 2 processos críticos para a regeneração do tecido.⁹³

Fatores de crescimento de transcrição tal como fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), fatores de crescimento derivados da plaqueta (PDGFs), fator de crescimento como insulina (IGFs) são reportados em ter maior função na osteoindutividade das células tronco mesenquimais. Similarmente, fatores de crescimento tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) são sugestões para neovascularização.⁹³

Contudo, vários pontos devem ser esclarecidos antes desses fatores de crescimento se tornarem uma alternativa rotineira, a variabilidade da resposta local e sistêmica aos fatores de crescimento precisa ser mais bem esclarecida.

1.5.4 Degradação das membranas

A engenharia de tecido tipicamente envolve três principais elementos quais fornecem os fatores essenciais para o processo de regeneração fisiológico. O primeiro componente é o substrato (membrana, espuma, gels e scaffolds 3D) para propriedades de osteocondução. Estas propriedades são definidas como a habilidade de suportar a migração celular nos sítios de defeitos do tecido hospedeiro e promover a proliferação e crescimento celular.⁹⁴

O segundo elemento é representado por sinais, como fatores de crescimento que fornecem propriedades osteoindutivas, a habilidade de induzir a proliferação de tipos específicos de células e dirigir elas para produzir um novo tecido. O último componente são as células para propriedades osteogênicas. Estas propriedades são definidas como a capacidade de induzir as células locais a proliferar e se diferenciar em células específicas.⁹⁵

A biodegradabilidade ou bioreabsorção são propriedades essenciais para obter scaffolds que podem agir como matriz extracelular temporária. A biodegradabilidade deve acontecer de tal maneira que a taxa de biodegradação se combine com a taxa de formação do novo tecido. Quando dito sobre polímeros biodegradáveis, é fundamental que seu produto de degradação encontre critérios de biodegradação e bioabsorção. Para uma efetiva integração tecidual, é importante que o polímero e seu produto de degradação mostre uma resposta inflamatória mínima. A resposta inflamatória é influenciada pela composição do polímero e sua taxa de degradação, qual depende também da estrutura do scaffold: taxa de degradação rápida pode promover alta concentração de produtos de degradação com potencial inflamatório.⁹⁴

A tabela 5 ilustra exemplos de polímeros naturais e sintéticos usados para preparação de substratos funcionais para regeneração do tecido ósseo.⁹⁴

Tabela 5-Polímeros naturais e sintéticos usados para preparação de substratos funcionais para regeneração tecidual óssea.⁹⁴

Material	Tempo de degradação	Degradação
Colágeno	Depende do grau de ligação cruzada	Enzimática
Quitosana	Depende do grau de ligação cruzada e do pH ambiental	Hidrólise, Enzimática
Ácido hialurônico	Relacionado ao peso molecular	Enzimática
Celulose	-----	Enzimática
Poliácido láctico	6 meses- 2 anos, dependendo do peso molecular	Hidrólise

Os mamíferos incluindo humanos não podem digerir a celulose, mas bactérias contidas no rúmen de bovinos e outros ruminantes produzem enzimas que podem quebrá-las. Tipicamente, esta habilidade é possuída somente por bactérias, quais estão localizadas nas paredes do intestino dos ruminantes tal como a vaca e ovelha.⁹⁶

1.6 Celulose Bacteriana, Fosfato de cálcio: Desenvolvimentos recentes

As pesquisas utilizando celulose bacteriana e fosfato de cálcio tiveram seu desenvolvimento inicial em meados de 2006, com o grupo de Hong et al. (2006), eles modificaram quimicamente as membranas de celulose bacteriana com CaCl_2 antes da incubação das mesmas na solução biomimética (SBF). Os cristais de hidroxiapatita foram incorporados na superfície da celulose bacteriana.⁹⁷

Ainda em 2006, o grupo de Wan et al. modificou quimicamente as membranas de celulose bacteriana com CaCl_2 e com grupamentos fosfatos antes da incubação das mesmas na solução biomimética (SBF). Os cristais de hidroxiapatita foram incorporados na superfície da celulose bacteriana. Por FTIR foram encontrados que os cristais de fosfato de cálcio foram parcialmente substituídos com grupamentos carbonatos e por DRX que o tamanho dos cristais eram nanométricos e com baixa cristalinidade.⁹⁸

Um grupo de Nge e Sugiyama em 2006, modificaram tanto o meio de cultura (Carboximetilcelulose) quanto a modificação de superfície da celulose bacteriana com TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpyperidine-1-oxyl) antes da incubação das mesmas na solução biomimética (SBF). Por FTIR e ICP, os autores obtiveram a fase fosfato de cálcio carbonetado deficiente em cálcio com fase inicial em fosfato octacálcico. Os autores alegam que a modificação da superfície aumentou a taxa de nucleação dos fosfatos de cálcio.⁹⁹

Em 2007, Wan et al. provaram por diversas caracterizações e mecanismos que a modificação com grupos fosfatos efetivamente consegue formar cristais de hidroxiapatita na superfície da celulose bacteriana antes da incubação das mesmas na solução biomimética (SBF). Por FTIR foram encontrados que os cristais de fosfato de cálcio foram parcialmente substituídos com grupamentos carbonatos e por DRX que o tamanho dos cristais eram nanométricos e com baixa cristalinidade.¹⁰⁰

Em 2008, Shi et al. modificaram quimicamente as membranas de celulose bacteriana com NaOH e depois CaCl_2 antes da incubação das mesmas na solução biomimética (SBF). Os autores provaram por caracterizações e mecanismos a formação de hidroxiapatita deficiente em cálcio na superfície da celulose bacteriana. Os autores alegam que a modificação alcalina antes da incubação na solução SBF aumentou a taxa de nucleação dos fosfatos de cálcio.¹⁰¹

Em 2009, Grande et al. foi o primeiro grupo a utilizar células em membranas de celulose bacteriana e fosfato de cálcio. Os autores também trabalharam com um método diferente de formação de fosfato de cálcio, a co-precipitação e modificaram o meio de cultura (Carboximetilcelulose) da celulose bacteriana. Por microscopia de força atômica, o grupo observou fibras de diâmetros menores quando houve a presença de (Carboximetilcelulose) no meio de cultura. A análise termogravimétrica mostrou que 23,7% do peso no nanocompósito era de fosfato de cálcio. O material se mostrou viável a diferenciação e proliferação das células.¹⁰²

Em 2011, Zimmermann et al. foi o primeiro grupo a trabalhar com celulose bacteriana na forma de películas e tubos. Os autores modificaram quimicamente a celulose bacteriana com CaCl_2 e Carboximetilcelulose antes da incubação das mesmas na solução biomimética (SBF). Os autores determinaram pela primeira vez a razão Ca/P utilizando o equipamento XPS. Para determinar a viabilidade dos scaffolds *In vitro*, a morfologia e diferenciação das células osteoblásticas foi analisada por Microscopia de Fluorescência e a presença dos cristais de hidroxiapatita deficiente em cálcio na superfície da celulose bacteriana resultou no aumento da adesão celular.¹⁰³

Em 2011, Saska et al. modificaram quimicamente as membranas de celulose bacteriana com CaCl_2 antes da incubação das mesmas na solução de Na_2HPO_4 . Os cristais de hidroxiapatita foram incorporados na superfície das membranas de celulose bacteriana. As membranas foram avaliadas *In vivo* em defeitos ósseos não críticos da tíbia do rato em 1,4 e 16 semanas. Os testes *In vivo* mostraram sem reação inflamatória em 1 semana. Depois de 4 semanas, os defeitos foram completamente preenchidos pelo novo tecido ósseo. As membranas assim foram efetiva para regeneração óssea.¹⁰⁴

Em 2014, Caminaga et al. desenvolveram membranas de celulose bacteriana com colágeno ou hidroxiapatita e peptídeos de crescimento osteogênicos. Foram realizados testes *In vitro* citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos com células CHO-

K1. Somente a membrana com hidroxiapatita e peptídeos de crescimento osteogênicos mostrou um pequeno efeito mutagênico, as outras membranas testadas demonstraram nenhuma alteração citotóxica, genotóxica e mutagênica. Futuros estudos devem ser investigados para melhor compreensão deste resultado.¹⁰⁵

Em 2015, Pigossi et al. desenvolveram membranas de celulose bacteriana, hidroxiapatita e peptídeos de crescimento osteogênicos. As membranas foram avaliadas *In vivo* em defeitos ósseos críticos do crânio do rato em 3,7,15,30,60 e 90 dias. Foi analisada a expressão gênica dos biomarcadores ósseos, análise histológica e regeneração óssea por microtomografia computadorizada. Após 3 dias do pós-operatório foi detectado biomarcadores ósseos em ambas membranas qual indicam diferenciação osteoblástica destes biomateriais. Em 60 e 90 dias uma alta porcentagem de formação óssea foi observada por microtomografia computadorizada em ambas membranas. Em conclusão, a membrana somente com hidroxiapatita promoveu uma melhor formação óssea em defeitos ósseos críticos do crânio de rato e a incorporação de peptídeos não aumenta a regeneração óssea a longo prazo.¹⁰⁶

Em 2015, Sundberg et al. produziu celulose bacteriana macroporosa com partículas de parafina e modificou com carboximetilcelulose (CMC) sua superfície, antes da modificação biomimética com fosfato de cálcio e celular com células tronco mesenquimais. Os resultados mostraram que os macroporos não impediram a formação de fosfatos de cálcio na superfície nem a célula tronco mesenquimal de se diferenciar em osteoblástica dentro da estrutura da celulose bacteriana, mostrando ser uma material promissor para aplicação em regeneração óssea.¹⁰⁷

De acordo com o exposto, foram desenvolvidos na presente Tese membranas de celulose bacteriana modificada com moléculas naturais (ácido hialurônico e sulfato de condroitina) de maneira a modificar sua degradabilidade, após foram irradiadas com radiação Gamma para aplicações Biomédicas e recobertas com fosfato de cálcio para aplicação em Regeneração Óssea.

Conclusões

As membranas de celulose bacteriana sofreram modificações em seu meio de fermentação (sulfato de condroitina e ácido hialurônico) e modificações de propriedades de superfície para adesão de fosfato de cálcio de interesse biológicos.

Os resultados de DSC foram bem satisfatórios na região da perda de água, mostrando claramente que a irradiação modificava a quantidade de água no material, o tornando mais hidrofóbico e interferindo no processo de deposição de fosfato de cálcio, conforme todas variações relatadas na figura 6.

Pode se observar por SAXS, claramente em toda curva, que as modificações com as moléculas de sulfato de condroitina e ácido hialurônico alteraram a cristalinidade do material, tendo uma intensidade menor que a amostra de celulose bacteriana padrão (figura 7), ou seja menor cristalinidade.

Empregando-se FTIR, DRX, MEV os grupamentos funcionais foram caracterizados e pode-se constatar que a deposição de fosfato de cálcio de interesse biológico foram bem sucedidas, principalmente nas amostras não irradiadas sob SBF 1 e 3.

Por TGA, pode se concluir que o efeito da radiação nas propriedades térmicas dos nanocompósitos apresentou resultados divergentes, possivelmente o posicionamento dos grupamentos superficiais (sulfato de condroitina e ácido hialurônico) foi também um fator para o depósito de fosfato de cálcio nos nanocompósitos.

De acordo com as medidas de ângulo de contato, as amostras irradiadas e não irradiadas apresentaram diferenças, sendo as irradiadas mais hidrofóbicas, resultado corroborado pelo DSC. Na modificação com ácido hialurônico, a amostra fica muito hidrofílica, perdendo sua resistência mecânica em contato com a água, conforme tabela 9 e figura 43,44.

Na análise de XPS, se observa principalmente na deconvolução da ligação do carbono, que a ligação por ponte de hidrogênio entre o sulfato de condroitina (grupamento NH₂ e carbonila) e celulose bacteriana(OH) acontece pela ligação do carbono. Na deconvolução da ligação do oxigênio, pode se notar que os fosfatos de

cálcio se ligam preferencialmente com o Oxigênio. Ou seja, tanto a ligação por ponte de hidrogênio foi bem sucedida no trabalho quanto a incorporação do fosfato de cálcio na membrana, havendo seletividade com relação ao sítio de ligação. Além disso, na tabela 11 pode-se observar que os SBFs testados 1 e 3 possuem maior quantidade atômica dos íons Ca e P do que os SBFs 0 e 2, resultado que corrobora com as análises anteriores realizadas nesta tese (FTIR, DSC, MEV, TGA).

A viabilidade celular de todas as concentrações de eluatos de BC, BC/CS, SBF 0, 1, 2 e 3 apresentaram resultados estatísticos não significativamente diferente do controle negativo ($p > 0.05$; Dunnett), porém teve diferenças entre os fosfatos de cálcio testados, sendo o SBF 1 o menos citotóxico.

Além disso, analisando a tabela 6 e os resultados desta tese, possivelmente a influência do íons Mg^{2+} foi prejudicial na formação de fosfatos de cálcio na superfície da membrana de celulose bacteriana, tal íon presente nos SBFs 0 e 2 apresentou formação de pouca quantidade de fosfato de cálcio na superfície.

Referências

- 1 ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilising a biological process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 233-238, 1990.
- 2 AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. Tokio: JAAS, 1991. 214 p.
- 3 CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive materials. **Ceramic International**, v. 22, n. 6, p. 493-507, 1996.
- 4 LACERDA, A. C. et al. **Tecnologia: estratégia para a competitividade**. São Paulo: Nobel, 2001. 176 p.
- 5 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.
- 6 DUCHEYNE, P. Titanium and calcium phosphate ceramic dental implants, surfaces, coatings and interfaces. **Journal Oral Implantology**, v. 14, n. 3, p. 325-340, 1988.
- 7 JONES, J. R.; EHRENFRIED, L. M.; HENCH, L. L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 7, p. 964-973, 2006.
- 8 OLYVEIRA, G. M. et al. Human dental pulp stem cell behavior using natural nanofibers/bacterial cellulose scaffolds for regenerative medicine. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 8, p. 1370-1377, 2013.
- 9 ACASIGUA, G. A. X. et al. Novel natural bacterial cellulose nanocomposites as potential biomaterial for stem cell therapy. **Current Stem Cell Research and Therapy**, v. 9, n. 2, p. 117-123, 2014.
- 10 KOKUBO, T. et al. Surface structure of bioactive glass-ceramic A-W implanted into sheep and human vertebra. In: HEIMKE, G. (Ed.). **Bioceramics**. Cologne: German Ceramic Society, 1990. v. 2, p. 105-112.
- 11 RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1997. 484 p.
- 12 WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2133-2151, 2003.
- 13 KATTI, K. S. Biomaterials in total joint replacement. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 39, n. 3, p. 133-142, 2004.

- 14 RAMAKRISHNA, S. et al. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, n. 9, p. 1189-1224, 2001.
- 15 BONFIELD, W. et al. Hydroxyapatite reinforced polyethylene: a mechanically compatible implant material for bone replacement. **Biomaterials**, v. 2, n. 3, p. 185-186, 1981.
- 16 VERCIK, L. C. O. et al. Recobrimento de apatitas "in vitro" sobre titânio-influência do tratamento térmico. **Eclética Química**, v. 28, n. 1, p. 25-31, 2003.
- 17 HERRERA, A. H. et al. Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (acp) e conversão a fosfato octacálcico (ocp). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 892-896, 2007.
- 18 BEST, S. M. et al. Bioceramics: past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, n. 7, p. 1319-1327, 2008.
- 19 KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.
- 20 DESAI, A. Y. **Fabrication and characterization of titanium-doped hydroxyapatite thin films**. 2007. 41 f. Dissertation (Master of Philosophy in Physics) - Trinity College, University of Cambridge, Cambridge, 2007.
- 21 REY, C. et al. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: implications for biominerals and biomaterials. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, n. 2, p. 198-205, 2007.
- 22 JULIEN, M. et al. Physico-chemical–mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates. **Biomaterials**, v. 28, n. 6, p. 956-965, 2007.
- 23 KANAZAWA, T. **Inorganic phosphate materials**. Tokio: Elsevier, 1989. 306 p. (Materials science monographs, v. 52).
- 24 ELLIOT, J. C. **Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates**. New York: Elsevier, 1994. 404 p.
- 25 SOMRANI, S. et al. Physico-chemical and thermochemical studies of the hydrolytic conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatite. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 178, n. 5, p. 1337-1348, 2005.
- 26 IMAIZUMI, H. et al. Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. **Calcified Tissue International**, v. 78, n. 1, p. 45-54, 2006.
- 27 KWON, S.-H. et al. Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 23, n. 7, p. 1039-1045, 2003.

- 28 ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais**: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538 p.
- 29 FENG, Q. L. et al. Influence of solution conditions on deposition of calcium phosphate on titanium by NaOH-treatment. **Journal of Crystal Growth**, v. 210, n. 4, p. 735-740, 2000.
- 30 BIGI, A. et al. Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method. **Biomaterials**, v. 26, n. 19, p. 4085-4089, 2005.
- 31 APARECIDA, A. H. et al. Influência dos íons K^+ e Mg^{2+} na obtenção de apatitas biomiméticas. **Eclética Química**, v. 30, n. 4, p. 13-18, 2005.
- 32 LEONOR, I. B. et al. Surface potential change in bioactive polymer during the process of biomimetic apatite formation in a simulated body fluid. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 38, p. 4057-4063, 2007.
- 33 HENCH, L. L. et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 5, n. 6, p. 117-141, 1972.
- 34 JARCHO, M. et al. Tissue, cellular and subcellular events at bone-ceramic hydroxyapatite interface. **Journal of Bioengineering**, v. 1, n. 2, p. 79-92, 1977.
- 35 KOKUBO, T. et al. Apatite and wollastonite-containing glass-ceramic for prosthetic application. **Bulletin of the Institute for Chemical Research**, v. 60, n. 3/4, p. 260-268, 1982.
- 36 LI, P. et al. The role of hydrated silica, titania and alumina in inducing apatite on implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 28, n. 1, p. 7-15, 1994.
- 37 YAN, W. Q. et al. Bonding of chemically treated titanium implants to bone. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 37, n. 2, p. 265-275, 1997.
- 38 LOTY, C. et al. In vitro bone formation on a bonelike apatite layer prepared by a biomimetic process on a bioactive glass-ceramic. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 49, n. 4, p. 423-434, 2000.
- 39 MANN, S.; WEBB, J. M.; WILLIAMS, R. J. P. **Biomineralization**: chemical and biochemical perspectives. Germany: VCH, 1989. 541 p.
- 40 RHO, J. Y.; SPEARING, L. K.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering & Physics**, v. 20, n. 2, p. 92-102, 1998.
- 41 TRIPPEL, S. B. Potential role of insulin like growth factors in fracture healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 355, p. 301-313, 1998.
- 42 GIRAUD-GUILLE, M. M. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. **Calcified Tissue International**, v. 42, n. 3, p. 167-180, 1988.

- 43 ROWE, D. J.; LEUNG, W. W.; DELCARLO, D. L. Osteoclast inhibition by factors from cells associated with regenerative tissue. **Journal of Periodontology**, v. 67, n. 4, p. 414-421, 1996.
- 44 MARIN, B. R.; BURR, D. B. **Structure function and adaptation of compact bone**. New York: Raven Press, 1989. 275 p.
- 45 STEIN, G. S.; LIAN, J. B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of osteoblast phenotype. **Endocrine Reviews**, v. 14, n. 4, p. 424-442, 1993.
- 46 COSTA, L. M. M. et al. Novel otoliths/bacterial cellulose nanocomposites as a potential natural product for direct dental pulp capping. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 2, n. 1, p. 48-53, 2012.
- 47 COSTA, L. M. M. et al. Bacterial cellulose towards functional medical materials. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 2, n. 3, p. 185-196, 2012.
- 48 OLYVEIRA, G. M.; COSTA, L. M. M.; BASMAJI, P. Physically modified bacterial cellulose as alternative routes for transdermal drug delivery. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 3, n. 2, p. 227-232, 2013.
- 49 BASMAJI, P. et al. Novel antimicrobial peptides bacterial cellulose obtained by symbioses culture between polyhexanide biguanide (PHMB) and green tea. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 4, n. 1, p. 59-64, 2014.
- 50 COSTA, L. M. M. et al. Bacterial cellulose towards functional green composites materials. **Journal of Bionanoscience**, v. 5, n. 2, p. 167-172, 2011.
- 51 OLYVEIRA, G. M. et al. Bacterial cellulose/chondroitin sulfate for dental materials scaffolds. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 4, n. 2, p. 150-154, 2014.
- 52 OLYVEIRA, G. M. et al. Bacterial biocomposites for guided tissue regeneration. **Science of Advanced Materials**, v. 6, n. 12, p. 2673-2678, 2014.
- 53 OLYVEIRA, G. M. et al. Physically modified bacterial cellulose biocomposites for guided tissue regeneration. **Science of Advanced Materials**, v. 7, n. 8, p. 1657-1664, 2015.
- 54 OLYVEIRA, G. M. et al. Physically modified bacterial cellulose biocomposites for dental materials scaffolds. **Materials Focus**, v. 4, n. 2, p. 111-117, 2015.
- 55 NYMAN, S. et al. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 9, n. 4, p. 290-296, 1982.
- 56 JONES, I.; CURRIE, L.; MARTIN, R. A guide to biological skin substitutes. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 55, n. 3, p. 185-193, 2002.

- 57 OH, T. J. et al. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 1, p. 80-90, 2003.
- 58 MELCHER, A. H. On the repair potential of periodontal tissue. **Journal of Periodontology**, v. 47, n. 5, p. 256-260, 1976.
- 59 CATON, J. G.; GREENSTEIN, G. Factors related to periodontal regeneration. **Periodontology 2000**, v. 1, n. 1, p. 9-15, 1993.
- 60 KAY, S. A. et al. Guided bone regeneration: integration of a resorbable membrane and a bone graft material. **Practical Periodontics and Aesthetic Dentistry**, v. 9, n. 2, p. 185-194, 1997.
- 61 STRIETZEL, F. P. et al. Healing pattern of bone defects covered by different membrane types—a histologic study in the porcine mandible. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 78B, n. 1, p. 35-46, 2006.
- 62 SONG, J. H.; KIM, H. E.; KIM, H. W. Collagen-apatite nanocomposite membranes for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 83B, n. 1, p. 248-257, 2007.
- 63 OKAZAKI, K. et al. Blood-filled spaces with and without deproteinized bone grafts in guided bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n. 2, p. 236-243, 2005.
- 64 JOVANOVIC, S. A. et al. Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridge defects. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, n. 2, p. 224-230, 2007.
- 65 WIKESJO, U. M. et al. rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 2, p. 194-204, 2004.
- 66 SIMION, M. et al. A preliminary report on a method for studying the permeability of expanded polytetrafluoroethylene membrane to bacteria in vitro: a scanning electron microscopic and histological study. **Journal of Periodontology**, v. 65, n. 8, p. 755-761, 1994.
- 67 EPPLEY, B. L.; PIETRZAK, W. S.; BLANTON, M. W. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 6, p. 981-989, 2005.
- 68 BARTEE, B. K.; CARR, J. A. Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. **Journal of Oral Implantology**, v. 21, n. 2, p. 88-95, 1995.
- 69 PINHO, M. N. et al. Titanium membranes in prevention of alveolar collapse after tooth extraction. **Implant Dentistry**, v. 15, n. 1, p. 53-61, 2006.

70 MIZUNO, M. et al. Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo. **Bone**, v. 20, n. 2, p. 101-107, 1997.

71 DUSKOVA, M. et al. Guided tissue regeneration, barrier membranes and reconstruction of the cleft maxillary alveolus. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 6, p. 1153-1160, 2006.

72 OLIVEIRA, R. C. et al. Tissue response to a membrane of demineralized bovine cortical bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 15, n. 1, p. 3-8, 2004.

73 ZITZMANN, N. U.; RATEITSCHAK-PLUSS, E.; MARINELLO, C. P. Treatment of angular bone defects with a composite bone grafting material in combination with a collagen membrane. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 5, p. 687-694, 2003.

74 KUO, S. M. et al. Guided tissue regeneration for using a chitosan membrane: an experimental study in rats. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76A, n. 2, p. 408-415, 2006.

75 KUO, S. M. et al. Evaluating chitosan/ β -tricalcium phosphate/poly(methyl methacrylate) cement composites as bone-repairing materials. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 89, n. 14, p. 3897-3904, 2003.

76 YEO, Y. J. et al. Effects of chitosan nonwoven membrane on periodontal healing of surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 72B, n. 1, p. 86-93, 2005.

77 CZAJA, W. K. et al. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.

78 CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Jr. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, n. 3, p. 403-411, 2004.

79 OLYVEIRA, G. M. et al. Bacterial cellulose nanobiocomposites for dental materials scaffolds. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 4, n. 7, p. 536-542, 2014.

80 BASMAJI, P.; OLYVEIRA, G. M.; COSTA, L. M. M. Nanoskin extracellular matrix modified with hyaluronic acid and chondroitin sulfate for regenerative medicine applications. **Journal of Bionanoscience**, v. 9, n. 4, p. 306-310, 2015.

81 MACEDO, N. L. et al. Evaluation of two membranes in guided bone tissue regeneration: histological study in rabbits. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 3, n. 8, p. 395-400, 2004.

82 HELENIUS, G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76A, n. 2, p. 431-438, 2006.

83 MOTTA, A. C.; DUEK, E .A. R. Síntese, caracterização e degradação "in vitro" do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Matéria**, v. 11, n. 3, p. 340-350, 2006.

84 STAVROPOULOS, F. et al. A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects. An experimental study in a canine model. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 4, p. 435-442, 2004.

85 JUNG, R. E. et al. Evaluation of an in situ formed synthetic hydrogel as a biodegradable membrane for guided bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 4, p. 426-433, 2006.

86 HAMMERLE, C. H. F.; JUNG, R. E. Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodontology 2000**, v. 33, n. 1, p. 36-53, 2003.

87 BUSER, D. **20 anos de regeneração óssea guiada na implantodontia**. São Paulo: Quintessence, 2010. 276 p.

88 LIAO, S. et al. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 26, n. 36, p. 7564-7571, 2005.

89 KIKUCHI, M. et al. Development of guided bone regeneration membrane composed of beta-tricalcium phosphate and poly (L-lactide-co-glycolide-co-epsilon-caprolactone) composites. **Biomaterials**, v. 25, n. 28, p. 5979-5986, 2004.

90 CHONG, C. H. et al. Human periodontal fibroblast response to enamel matrix derivative, amelogenin, and platelet-derived growth factor-BB. **Journal of Periodontology**, v. 77, n. 7, p. 1242-1252, 2006.

91 VASTARDIS, S. et al. Periodontal regeneration with peptide-enhanced anorganic bone matrix in particulate and putty form in dogs. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 10, p. 1690-1696, 2005.

92 ANDRADE, F. K. et al. Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 92A, n. 1, p. 9-17, 2010.

93 PETER, S. J. et al. Effects of transforming growth factor β 1 released from biodegradable polymer microparticles on marrow stromal osteoblasts cultured on poly(propylene fumarate) substrates. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 50, n. 3, p. 452-462, 2000.

94 KHAN, Y. et al. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 90, n. 1, p. 36-42, 2008.

95 REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413-3431, 2006.

- 96 KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.
- 97 HONG, L. et al. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**, v. 60, n. 13/14, p. 1710-1713, 2006.
- 98 WAN, Y. Z. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 66, n. 11/12, p. 1825-832, 2006.
- 99 NGE, T. T.; SUGIYAMA, J. Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 81A, n. 1, p. 124-134, 2007.
- 100 WAN, Y. Z. et al. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, n. 4, p. 855-864, 2007.
- 101 SHI, S. et al. Biomimetic mineralization synthesis of calcium-deficient carbonate-containing hydroxyapatite in a three-dimensional network of bacterial cellulose. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 285-290, 2009.
- 102 GRANDE, C. J. et al. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 5, p. 1605-1615, 2009.
- 103 ZIMMERMANN, K. A. et al. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 1, p. 43-49, 2011.
- 104 SASKA, S. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **International Journal of Biomaterials**, v. 2011, 2011. doi:10.1155/2011/175362.
- 105 SCAREL-CAMINAGA, R. M. et al. Nanocomposites based on bacterial cellulose in combination with osteogenic growth peptide for bone repair: cytotoxic, genotoxic and mutagenic evaluations. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2014.
- 106 PIGOSSI, S. C. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 10, p. 3397-3406, 2015.
- 107 SUNDBERG, J.; GOTHERSTROM, C.; GATENHOLM, P. Biosynthesis and in vitro evaluation of macroporous mineralized bacterial nanocellulose scaffolds for bone tissue engineering. **Biomedical Materials and Engineering**, v. 25, n. 1, p. 39-52, 2015.

- 108 MASUDA, K. et al. Solid-state ^{13}C and ^1H spin diffusion NMR analyses of the microfibril structure for bacterial cellulose. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 23, n. 4, p. 198-212, 2003.
- 109 ISOGAI, A. et al. Solid-state CP/MAS carbon-13 NMR study of cellulose polymorphs. **Macromolecules**, v. 22, n. 7, p. 3168-3172, 1989.
- 110 ZHANG, S. et al. Characterisation of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites. **Polymers & Polymer Composites**, v. 17, n. 6, p. 353-358, 2009.
- 111 SALVI, D. T. B. de et al. Preparation, thermal characterization, and DFT study of the bacterial cellulose. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 118, n. 1, p. 205-215, 2014.
- 112 ASTLEY, O. M. et al. Structure of acetobacter cellulose composites in the hydrated state. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, n. 3, p. 193-202, 2001.
- 113 TISHER, P. C. et al. Nanostructural reorganization of bacterial cellulose by ultrasonic treatment. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1217-1224, 2010.
- 114 ZHBANKO, R. G.; STEPANOV, B. I.; DENSHAM, A. B. **Infrared spectra of cellulose and its derivatives**. New York: Consultants Bureau, 1966. 333 p.
- 115 OLYVEIRA, G. M. et al. Bacterial cellulose nanobiocomposites for periodontal disease. **Journal of Bionanoscience**, v. 8, n. 4, p. 319-324, 2014.
- 116 OLYVEIRA, G. M. et al. Bacterial cellulose biocomposites for periodontology treatment. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, v. 7, n. 5, p. 409-414, 2015.
- 117 ALVAREZ, V. A.; RUSECKAITE, R. A.; VAZQUEZ, A. Degradation of sisal fibre/Mater Bi-Y biocomposites buried in soil. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 12, p. 3156-3162, 2006.
- 118 DEEPA, B. et al. Structure, morphology and thermal characteristics of banana nano fibers obtained by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1988-1997, 2011.
- 119 SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 185 p.
- 120 PARK, J. B.; LAKES, R. S. **Biomaterials an introduction**. New York: Plenum Press, 1992. 394 p.
- 121 XIONG, G. et al. Enhanced biological behavior of bacterial cellulose scaffold by creation of macropores and surface immobilization of collagen. **Macromolecular Research**, v. 23, n. 8, p. 734-740, 2015.

122 TSUCHIDA, T. et al. Reaction of ethanol over hydroxyapatite affected by Ca/P ratio of catalyst. **Journal of Catalysis**, v. 259, n. 2, p. 183-189, 2008.

123 KIESWETTER, K. et al. Characterization of calcium phosphate powders by ESCA and EDXA. **Biomaterials**, v. 15, n. 3, p. 183-188, 1994.

124 JANTOVA, S. et al. Comparison of murine fibroblast cell response to fluor-hydroxyapatite composite, fluorapatite and hydroxyapatite by eluate assay. **Acta Biologica Hungarica**, v. 60, n. 1, p. 89-107, 2009.