

Felipe Azevedo Borges

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

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

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

Araraquara - SP
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: FELIPE AZEVEDO BORGES

ORIENTADOR: RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

COORIENTADOR: GUILHERME JOSÉ PIMENTEL LOPES DE OLIVEIRA

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



Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

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


Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI

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


Profª. Drª. TICIANA SIDORENKO DE OLIVEIRA CAPOTE

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


Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD

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


Prof. Dr. GUILHERME FERREIRA CAETANO

Centro Universitário Herminio Ometto de Araras / UNIARARAS - ARARAS

Araraquara, 16 de abril de 2019

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Felipe Azevedo Borges

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

ENDEREÇO PROFISSIONAL

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

Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 - s/n

Campos Ville

14800903 - Araraquara, SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

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

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

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Artigos aceitos para publicação

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

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

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

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

ESTÁGIO DOCÊNCIA

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

PRÊMIOS E TÍTULOS

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

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

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

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

SUPERVISÃO ACADÊMICA

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

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

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

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

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

BANCA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO:

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

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

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

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

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

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

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

dedico este trabalho
de modo especial, à minha família

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos colegas de laboratório.

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

À minha família, por todo apoio.

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE QUADROS

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

LISTA DE EQUAÇÕES

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

Outros significados:

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

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

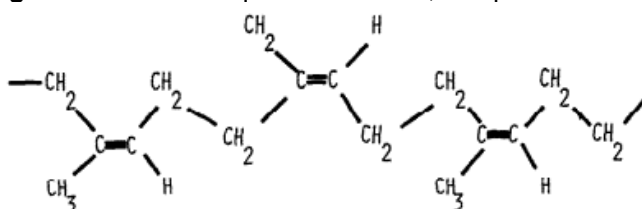
aumento da expectativa de vida, haverá a necessidade em se ampliar essa oferta (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

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

1.1 Látex natural da seringueira

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

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



Fonte: Goodman; Schilder e Aldrich (1974).

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

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

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



Fonte: Mendonça et al. (2010).

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

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

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

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

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

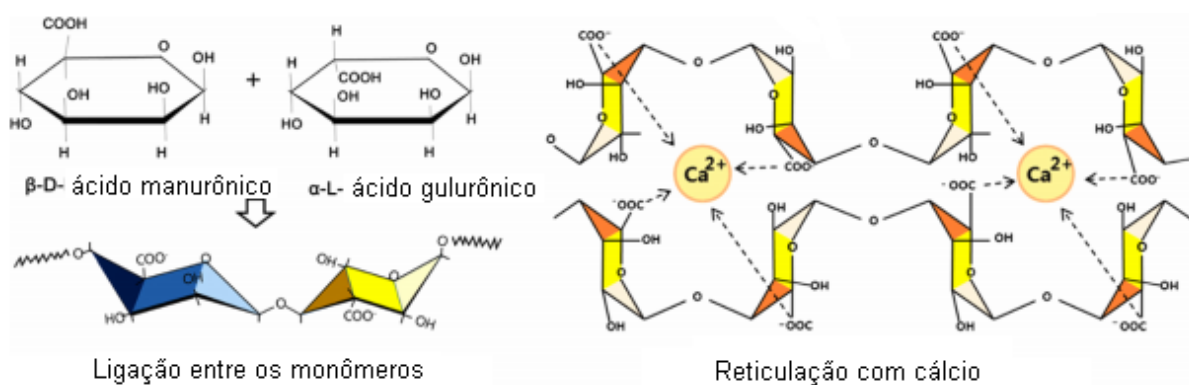
1.2 Alginato de sódio

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

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

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

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



Fonte: Kashima e Imai (2012).

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

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

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

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

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

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

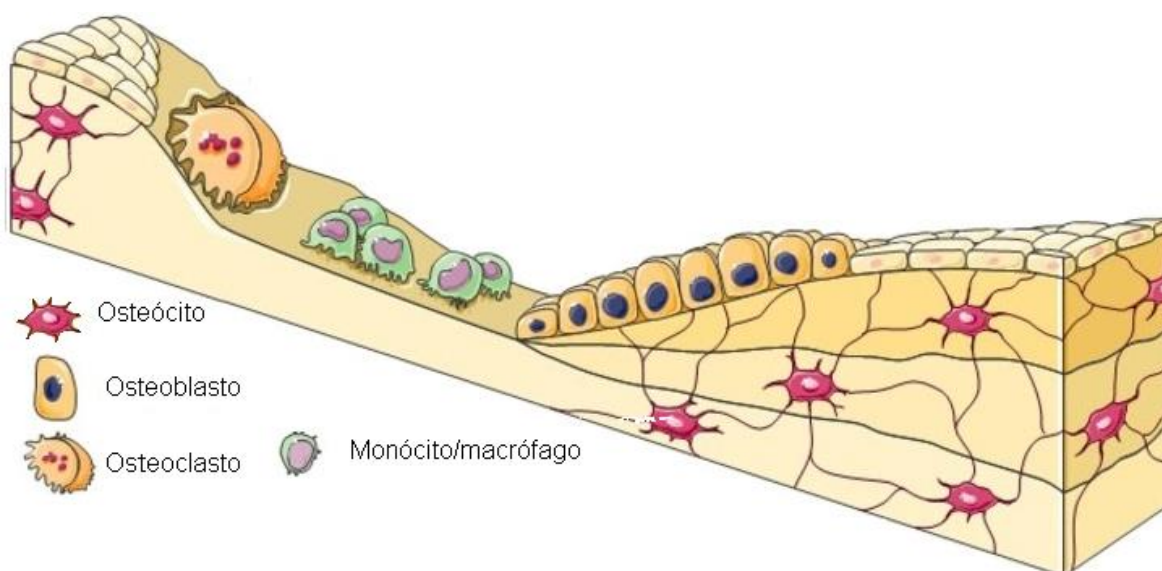
1.3 Tecido ósseo

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

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

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

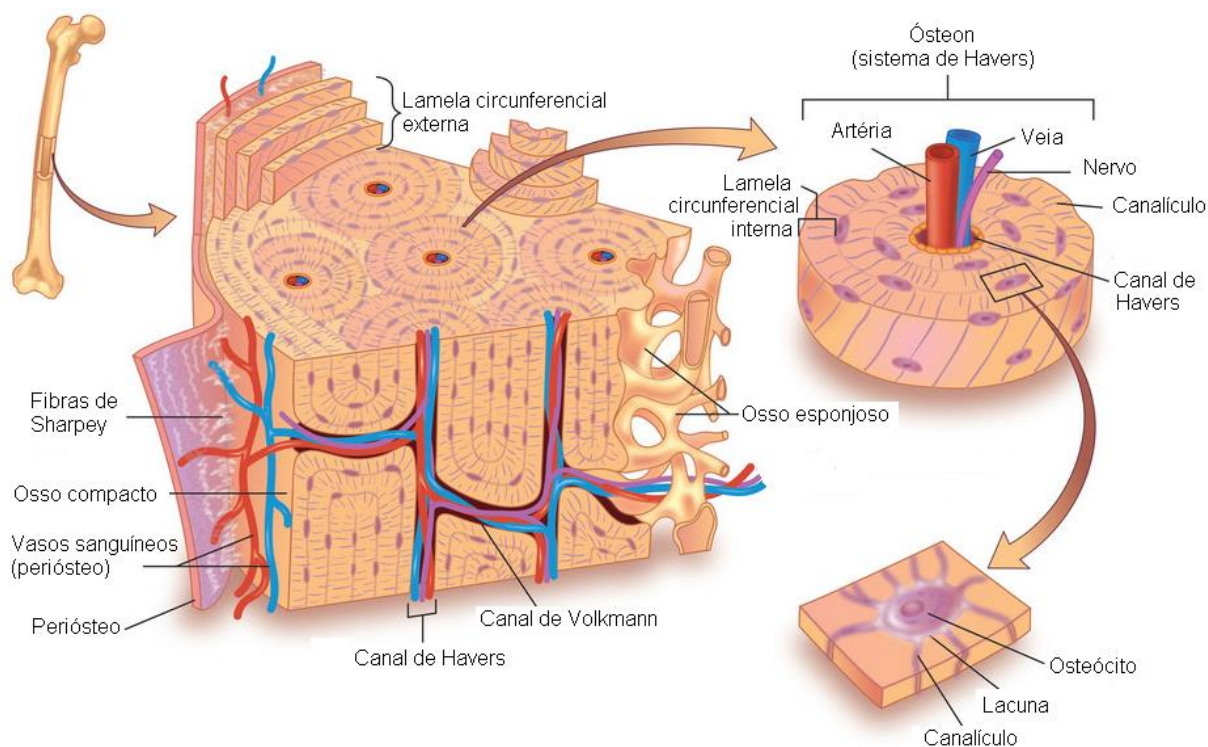
Figura 4 – Tipos celulares presentes no osso, e sua participação no evento de regeneração óssea.



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

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

Figura 5 – Representação da hierarquia de organização do osso.



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

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

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

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

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

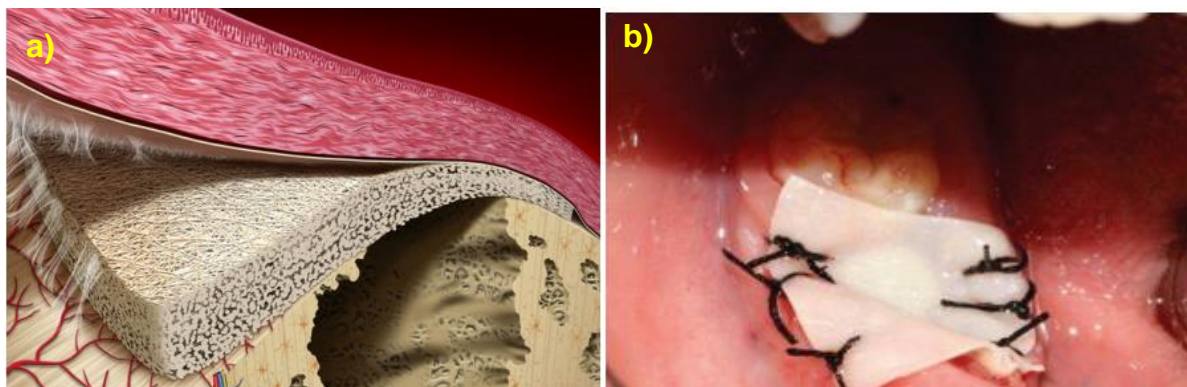
Figura 6 – Evolução do reparo ósseo em defeito crítico em calvária ao longo do tempo (da esquerda para direita) exemplificando a regeneração centrípeta (das margens para o centro).



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

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

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



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

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

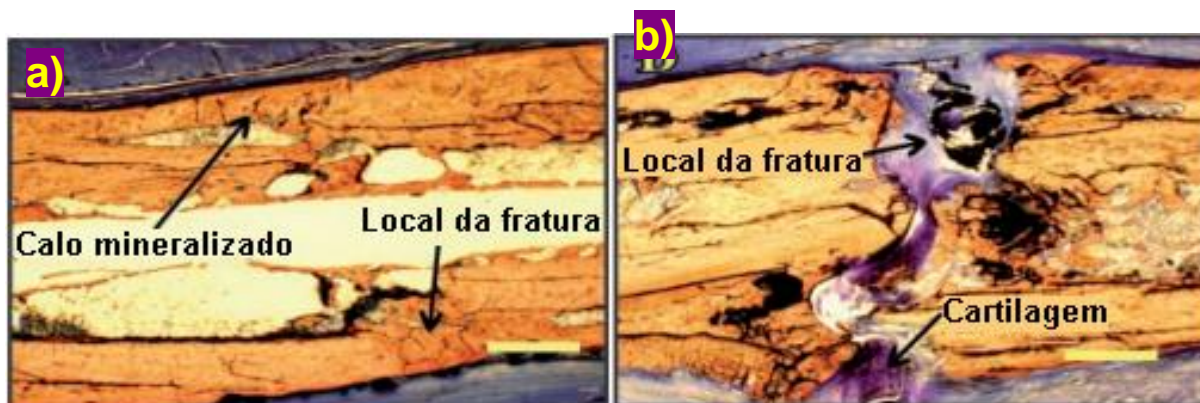
1.4 Fator de crescimento (PDGF-BB)

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Obtenção e caracterização de membranas de látex natural com alginato para regeneração óssea.

2.2 Objetivos específicos

-Desenvolvimento e caracterização de membranas de látex natural com diferentes proporções de alginato de sódio (com ou sem reticulação com cálcio);

-Caracterização química e física das blendas, miscibilidade, morfologia, estabilidade térmica, resistência mecânica, propriedade de barreira, hidrofiliicidade, degradação;

-Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* por hemólise e citotoxicidade;

-Analisar a regeneração óssea *in vivo*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Confeção das membranas

O látex natural foi obtido pela BDF Comércio de Produtos Agrícolas Ltda, Guarantã/SP (lote: 01703/13), a partir da mistura de diferentes clones (RRIM 600 e PB 235). O látex foi estabilizado com hidróxido de amônia 0,7% (m/m de borracha) para fornecer um pH 10 (para evitar a degradação e permitir sua estabilização) e centrifugado a 8000 rpm para fornecer uma solução de 60% (m/v) de borracha e reduzir as proteínas presentes no látex natural relacionadas à reação alérgica. O Quadro 1 mostra a caracterização do produto segundo o fornecedor. O alginato de sódio utilizado foi obtido pela empresa Êxodo Científica (código AS08563RA).

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

Requisitos	Valores
Sólidos totais	61%
Borracha seca	60%
Diferença entre sólidos totais e borracha seca	1%
Hidróxido de amônia	0,7%
pH	10,2
Viscosidade	30 seg
Estabilidade mecânica	515 seg
Ácido Graxo Volátil	0,0136%
Cor	Normal
Odor	Normal

Fonte: BDF Comércio de Produtos Agrícolas Ltda.

Foram produzidas membranas de látex natural, alginato e blendas com diferentes proporções mássicas, reticuladas ou não com cloreto de cálcio, por deposição das soluções da mistura dos polímeros em moldes e evaporação do solvente. Para confecção das membranas de látex, foi utilizada uma solução de látex natural 60% (m/v). Para a confecção das membranas de alginato, foi utilizada uma suspensão de alginato de sódio 3% (m/v, em água destilada). As blendas foram preparadas nas proporções de 1:1, 2:1, 3:1 e 4:1 (v/v, alginato:látex) e secas por 24 horas a 60°C. A reticulação foi realizada nas membranas secas, sob imersão em de solução de cloreto de cálcio 1% (m/v, em água destilada) por 10 minutos, e posteriormente secas por 24 horas a 60°C.

As diferentes formulações das blendas foram citadas neste trabalho conforme suas proporções entre o látex e o alginato, e sua reticulação, segundo a Tabela 1; os valores são referentes a uma placa de Petri de 60 mm.

Tabela 1 – Abreviação dos materiais elaborados assim como as respectivas composições mássicas.

Nomenclatura	Látex		Alginato		Reticulação (20 mL)
	Volume (mL)	% (m/m)	Volume (mL)	% (m/m)	
L	2	100,00	0	0,00	Não
1	2	95,24	2	4,76	Não
2	2	90,91	4	9,09	Não
3	2	86,96	6	13,04	Não
4	2	83,33	8	16,67	Não
A	0	0,00	10	100,00	Não
1C	2	95,24	2	4,76	Sim
2C	2	90,91	4	9,09	Sim
3C	2	86,96	6	13,04	Sim
4C	2	83,33	8	16,67	Sim
AC	0	0,00	10	100,00	Sim

Fonte: Autoria própria.

O PDGF-BB (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA, código P4056) foi utilizado apenas no teste *in vivo*. Para a incorporação do PDGF-BB, realizou-se triagem dentre as membranas para utilizar composição que apresentasse as características desejadas, tais como aumento da degradação sem prejuízo da sua segurança nos testes *in vitro*. A incorporação do PDGF-BB foi feita por adsorção, no momento da aplicação *in vivo* o PDGF-BB foi solubilizado com água destilada e foi depositado 20 µL na superfície da membrana, correspondendo a 200 ng de fator de crescimento por membrana (LEE et al., 2002; PARK et al., 1998; PARK et al., 2000).

3.2 Caracterização

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para as imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as amostras foram recobertas com ouro (modelo SCD 050, marca Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), e as micrografias foram obtidas em um MEV por Canhão de Emissão por Campo (MEV-FEG, marca JEOL, modelo JSM 7500F, com software de operação PC-SEM v 2.1.0.3, Tóquio, Japão) acoplado com um equipamento de Energia Dispersiva de Raio-X (EDS, marca Thermo Scientific, modelo Ultra Dry, com software de operação NSS 2.3, Massachusetts, EUA). As micrografias do MEV-FEG foram obtidas sob 2 kV e as análises de EDS sob 10 kV, da face superior, em áreas aleatórias da mesma amostra, no Laboratório de Microscopia Avançada, Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

3.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Os espectros de FTIR foram medidos usando o aparelho Bruker Tensor 27 (software OPUS), com o acessório de ATR (com cristal de diamante), no intervalo de 4000-380 cm^{-1} , com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} , fonte de tungstênio e mercúrio, laser de Hélio-Neônio e detector de KBr/DLaTGS.

3.2.3 Resistência mecânica à tração

Para os testes, foi utilizada a máquina universal de ensaios (EMIC DL2000), com uma célula de carga de 50 kgf, a uma velocidade de 500 mm/min (ASTM D412), a temperatura ambiente, com tração até a ruptura. Foram utilizados corpos de prova retangulares com dimensões de aproximadamente 0,5 mm de espessura, 25 mm de largura e 80 mm de comprimento (REZENDE et al., 2010), as medidas de espessura foram obtidas com micrômetro analógico (precisão de 0,01 mm, marca STANDARD GAGE, modelo 0114010) e a largura e comprimento foram medidas com paquímetro digital (precisão de 0,01 mm, marca Homes). O cálculo de tensão (MPa) foi calculado segundo a Equação 1, o alongamento (mm/mm) segundo a Equação 2, e o módulo de Young (MPa) foi calculado segundo a Equação 3 (considerando a região linear até 5% de alongamento, deformação elástica), onde F é a força (N), A é a área da seção transversal da amostra (mm^2), L é o comprimento final (mm) e L_0 é o comprimento inicial da amostra (mm). O ensaio foi realizado em quintuplicata e expresso como média e desvio padrão.

$$\text{Tensão} = \frac{F}{A} \quad (1)$$

$$\text{Alongamento} = \frac{(L-L_0)}{L_0} \quad (2)$$

$$\text{Módulo de Young} = \frac{\text{Tensão}}{\text{Alongamento}} \quad (3)$$

3.2.4 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas com o equipamento TGA-50 (Shimadzu), onde aproximadamente 5 mg de amostra foi acondicionada em cadinho de alumina, sob taxa de aquecimento de 10°C/min, de 25°C a 800°C, sob atmosfera de nitrogênio (25 mL/min). A termogravimetria derivada (DTG) foi obtida a partir da primeira derivada da variação da massa em relação à temperatura, utilizando programa OriginPro 2017, para auxílio na determinação das temperaturas de perda de massa.

3.2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), utilizou-se o equipamento DSC-60 (Shimadzu), onde aproximadamente 5 mg de amostra foi colocada em um cadinho de alumina. Todas as amostras foram submetidas a ciclos de resfriamento e aquecimento (-120°C a 200°C, sob taxa de 10°C/min) para eliminar a história térmica do material, sob atmosfera de nitrogênio (fluxo de 25 mL/min). Para a interpretação da temperatura de transição vítrea (T_g), considerou-se a segunda corrida térmica do experimento.

3.2.6 Ângulo de contato (molhabilidade)

As medidas de ângulo de contato foram realizadas pelo método de gota séssil (17 μL de água destilada a 0,5 $\mu\text{L}/\text{segundo}$) no goniômetro DataPhysics modelo OCA20 em atmosfera ambiente a 21°C por 30 segundos. O ângulo de contato foi calculado automaticamente pelo programa SCA20, por meio da análise do perfil da gota utilizando a equação de Young-Laplace para ajustar seu contorno. O ensaio foi realizado em triplicata e expresso como média e desvio padrão.

3.2.7 Intumescimento

Para análise da cinética do grau do intumescimento, as membranas (diâmetro de 37,4 mm) foram submersas em 30 mL c-SBF (fluido corporal simulado) a 37°C e pH 7,4 (OYANE et al., 2003). Em cada intervalo de tempo, o excesso de líquido foi removido da superfície e a absorção das membranas intumescidas foi apurada gravimetricamente em balança analítica com precisão 0,1 mg (marca Shimadzu, modelo AUY 220). O grau de intumescimento (%) foi determinado em função da massa inicial e final da amostra segundo a Equação 4, onde m_f é a massa final hidratada (g), m_i é a massa inicial seca (g). O ensaio foi realizado em quintuplicata e expresso como média e desvio padrão.

$$\text{Intumescimento} = \frac{(m_f - m_i)}{m_i} \times 100 \quad (4)$$

3.2.8 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada gravimetricamente, pelo método desseccante, segundo as normas da ASTM E96. As membranas foram utilizadas para selar os recipientes (abertura de 1,2 cm²) contendo sílica-gel (umidade relativa 0%). Os frascos foram mantidos em dessecador com solução saturada de cloreto de sódio (40 g/100 mL de água), proporcionando uma atmosfera com 75% de umidade relativa, a 36,5°C. A variação da massa foi registrada em intervalos de tempos regulares de 24 horas durante 7 dias. A permeabilidade ao vapor de água (g.mm/h.cm².mmHg) foi calculada segundo a Equação 5, onde, Δm é a variação da massa (g), e é a espessura da membrana (mm), t é o tempo (horas, h), A é a área (cm²), S é pressão de saturação de vapor de água (47,1 mmHg a 37°C) e ΔRU é a diferença de umidade relativa. O ensaio foi realizado em triplicata e expresso como média e desvio padrão.

$$\text{Permeabilidade ao vapor de água} = \frac{\Delta m \cdot e}{t \cdot A \cdot S \cdot \Delta RU} \quad (5)$$

3.2.9 Degradação *in vitro* em fluido simulado

Para o ensaio de degradação, as amostras foram feitas em placa de Petri de 60 mm, e submersas em c-SBF 1X (pH 7,4), 36,5°C, sem agitação, em 40 mL. Para evitar a degradação por microrganismos, o c-SBF foi esterilizado em autoclave (121°C, por 20 minutos) e as membranas foram submetidas a radiação ultravioleta (UV) por 20 minutos em cada superfície. Após o ensaio de degradação, as amostras foram secas em dessecador a temperatura ambiente até estabilização da massa. A análise gravimétrica de perda massa (%) foi obtida pela Equação 6, onde m_i é a massa inicial seca (g) e m_f é a massa final da amostra (g) nos tempos de 7, 15, 30, 60 e 120 dias. O ensaio foi realizado em quintuplicata e expresso como média e desvio padrão.

$$\text{Perda de massa} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (6)$$

O ensaio de degradação também foi avaliado por resistência mecânica à tração nos tempos de 7, 15, 30, 60 e 120 dias conforme a seção 3.2.3. A análise por FTIR-ATR foi realizada conforme a seção 3.2.2 e comparado entre o 30° dia de degradação e o espectro original. As medidas foram normalizadas em 835 cm^{-1} , referente à deformação fora do plano (=CH), presente apenas no látex, uma vez que todas amostras apresentam a mesma quantidade de látex (JIANG et al., 2015).

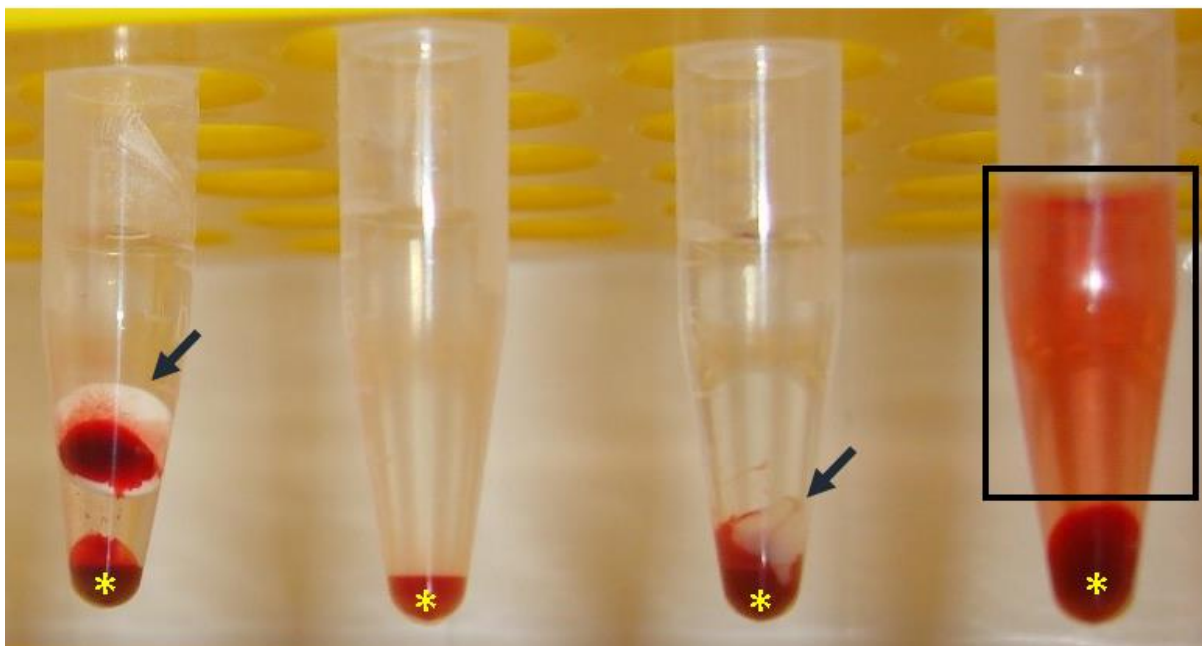
3.2.10 Caracterização *in vitro* em modelos celulares

3.2.10.1 Hemólise

O efeito hemolítico *in vitro* dos filmes foi realizado em conformidade com a norma da International Standard Organization 10993 parte 4 (ISO), por contato direto (Figura 9). O sangue de carneiro desfibrinado (Newprov) foi lavado 2x com solução salina 0,9%, a 1000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Membranas de 6 mm de diâmetro foram incubadas em contato direto com 1 mL solução de 5% de eritrócitos (v/v, em solução salina 0,9% m/v) por 1h a 37°C. No controle negativo (CN) não foi adicionado material e como controle positivo (CP) foi utilizado água destilada. Em seguida, as amostras foram centrifugadas 1000 rpm por 10 minutos, 100 μL do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços e a densidade óptica (DO, em absorbância) foi medida em leitora de microplaca sob 540 nm. O experimento foi realizado em quintuplicata e expresso como média e desvio padrão. A hemólise (%) foi estimada conforme a Equação 7, onde DO_a , DO_{CN} e DO_{CP} se referem à DO da amostra, CN e CP, respectivamente, onde até 5% de hemólise foi considerado como não hemolítico (ANDIAPPAN et al., 2013).

$$\text{Hemólise} = \frac{(DO_a - DO_{CN})}{(DO_{CP} - DO_{CN})} \times 100 \quad (7)$$

Figura 9 – Imagem representativa do teste de hemólise por contato direto. As setas pretas indicam a localização das membranas (látex à esquerda e alginato reticulado à direita), os asteriscos amarelos mostram a presença das hemácias, retângulo indica o sobrenadante com hemólise.



Fonte: Autoria própria.

3.2.10.2 Cultivo celular

A linhagem celular de pré-osteoblasto MC3T3-E1 subclone 14 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em garrafas de cultura (75 cm²) com meio de cultura completo composto por Meio Mínimo Essencial Alfa (α -MEM, suplementado com ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos da Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA, código M0644) suplementado com 10% de FBS (Soro Bovino Fetal, Gibco®, New York, EUA), 2 mM de L-glutamina e 1% de antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina e 0,25 μ g/mL de fungizona, Gibco®, New York, EUA), a 37°C, em atmosfera umidificada, a 5% de CO₂. As trocas de meio ocorreram três vezes por semana. Ao atingirem

confluência de 80-90%, as células foram dissociadas com TrypLe™ (Gibco®, New York, EUA) e subcultivadas na proporção de 1:6 a 1:8.

3.2.10.2.1 Adesão e morfologia celular

Esta análise foi utilizada para avaliar se os materiais servem de suporte para a adesão e crescimento celular, possibilitando sua utilização não só como barreira mecânica, mas também como fonte de células, o que poderia acelerar a regeneração. Para esta análise, as membranas foram preparadas dispersando a solução da mistura dos polímeros em lamínula circular de 13 mm, secas a 60°C, esterilizadas por luz ultravioleta por 20 minutos de cada lado, e por fim foram depositados em placa de 24 poços. As células MC3T3-E1 foram adicionados na concentração de 2×10^4 células/poço e cultivadas por 7 dias. Após este período, o meio de cultura foi removido, lavadas com tampão fosfato (PBS 1X, pH 7,4), fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% (v/v, em PBS 1X) por uma hora a temperatura ambiente, desidratadas em série crescente de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e duas vezes em 100%, 10 minutos cada), secas a temperatura ambiente e armazenadas em dessecador (sob vácuo e sílica a temperatura ambiente) até a análise por MEV-FEG segundo seção 3.2.1.

3.2.10.2.2 Proliferação celular

As células foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço sobre as amostras segundo a seção 3.2.10.2.3. A proliferação celular foi aferida pelos métodos colorimétricos de metabolização e redução de MTT e resazurina, em triplicata. A análise por MTT foi realizada conforme a seção 3.2.10.2.1. Para o método da resazurina, foram adicionados 40 µL de resazurina (0,15 mg/mL, em PBS 1x pH 7,4), incubados por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura completo, e a DO da fluorescência foi mensurada em espectrofluorímetro (LS 45, Perkin Elmer, EUA, programa FL Winlab) sob

comprimento de onda de 570 nm para excitação e de 585 nm para emissão (AHMED et al., 1994).

3.2.10.2.3 Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade celular foi realizado conforme as recomendações da norma técnica ISO 10993 partes 5 e 12, por contato direto com a linhagem MC3T3-E1. As células foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço em placa de 24 poços (2 cm²), permanecendo 24 horas para adesão. As membranas de 6 mm de diâmetro foram esterilizadas por luz ultravioleta por 20 minutos de cada lado e colocadas sobre a cultura por 24, 48 e 72 horas de contato com 1 mL de meio de cultura completo. Após cada intervalo de tempo, as membranas e o meio de cultura completo foram removidos, adicionou-se 400 µL de meio de cultura novo (sem soro nem vermelho fenol) com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) (0,5 mg/mL) e incubado por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi descartado, adicionou-se 400 µL de dimetilsulfóxido, incubando por 10 minutos no escuro para dissolver os cristais de formazan. Por fim a DO foi medida em leitor de microplaca (PowerWave Epoch 2, BioTeK Instruments, EUA, com programa versão 2.09.1) no comprimento de onda de 570 nm (MOSMANN, 1983). O experimento foi realizado em quadruplicata com 2 experimentos independentes, e a viabilidade celular (%) foi calculada em relação ao controle negativo (CN, poliestireno), conforme Equação 8 e expressa como média e desvio padrão.

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{DO_a}{DO_{CN}} \times 100 \quad (8)$$

3.3 Aplicação *in vivo* em modelo de defeito de calvária

Para o experimento *in vivo*, a membrana selecionada foi a membrana 4 (16,6% m/m de alginato) por apresentar melhor desempenho no teste de degradação e citotoxicidade *in vitro* e adesão celular. A membrana foi esterilizada por óxido de etileno pela empresa OXETIL Ltda, e o PDGF-BB foi adsorvido na superfície da membrana em contato com o defeito da calvária conforme seção 3.1. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas sob o protocolo CEUA/FCF/CAr nº 25/2015 (parecer nº 81/2015) (Anexo A).

3.3.1 Cuidado animal

Neste trabalho, foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Holtzman, machos, adultos, com massa corporal entre 300-400 g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-UNESP. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCFAr-UNESP em gaiolas plásticas forradas com maravalha (troca três vezes por semana), em gabinetes microprocessador com ventilação e ambiente com temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade (65-75%) controlados, ciclo claro/escuro de 12:12 horas, alimentados com água e ração *ad libitum*.

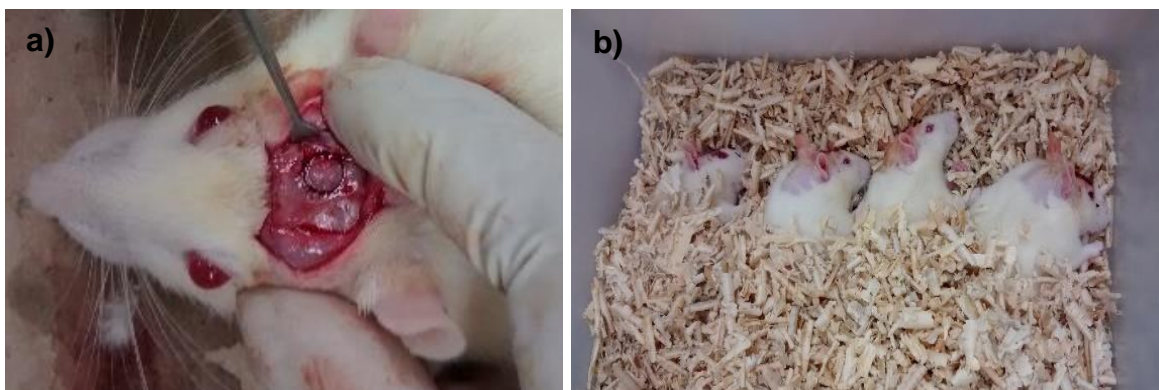
3.3.2 Cirurgia

Conforme o protocolo CEUA/FCF/CAr nº 25/2015 (parecer nº 81/2015), foram utilizados 42 animais os quais foram divididos em 3 grupos (controle/coágulo, membrana 4 e membrana 4 com 200 ng de PDGF-BB, denominados de C, 4 e 4P, respectivamente), contendo 7 animais por grupo nos seguintes períodos de análise

de 15 e 60 dias.

Os animais foram anestesiados (injeção intramuscular de cloridrato de ketamina 25 mg/kg e de cloridrato de xilazina 5 mg/Kg), tricotomizados na região parietal, foi realizada antissepsia com riodeine (polivinil pirrolidona iodo em solução aquosa, contendo 1% de iodo ativo), seguido de descolamento e rebatimento dos tecidos contendo epiderme, tecido muscular e periósteo, até a exposição do osso parietal. Os defeitos ósseos críticos na calvária foram realizados com o auxílio de uma trefina de 5 mm de diâmetro sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9% (m/v, em água destilada), mantendo-se a integridade da dura-máter evitando-se a região das suturas ósseas. O defeito foi preenchido com coagulo (controle), membrana ou membrana com fator de crescimento, e posteriormente suturados com por meio de pontos simples com Vicryl 4-0. No pós-operatório os animais receberam cetoprofeno, pentabiótico (Fort-Dodge, Brasil, 0,02 mL/100g) e foram mantidos em decúbito lateral sob temperatura de aproximadamente 32°C até se moverem (Figura 10).

Figura 10 – Cirurgia para criação do defeito na calvária: a) remoção da porção da calota cortada, b) recuperação pós-cirúrgica em decúbito lateral.



Fonte: Autoria própria.

O grupo de 60 dias recebeu doses de corantes intravitais fluorescentes para avaliação da cronologia da mineralização durante crescimento ósseo, segundo o cronograma:

- vermelho de alizarina S	30 mg/Kg	7 dias antes da cirurgia
- vermelho de alizarina S	30 mg/Kg	1 dia antes da cirurgia
- calceína azul	30 mg/Kg	10 dias após cirurgia
- tetraciclina	20 mg/Kg	20 dias após cirurgia
- calceína verde	20 mg/Kg	30 dias após cirurgia
- alaranjado de xilenol	100 mg/Kg	40 dias após cirurgia
- vermelho de alizarina S	30 mg/Kg	50 dias após cirurgia
- Eutanásia		60 dias após cirurgia

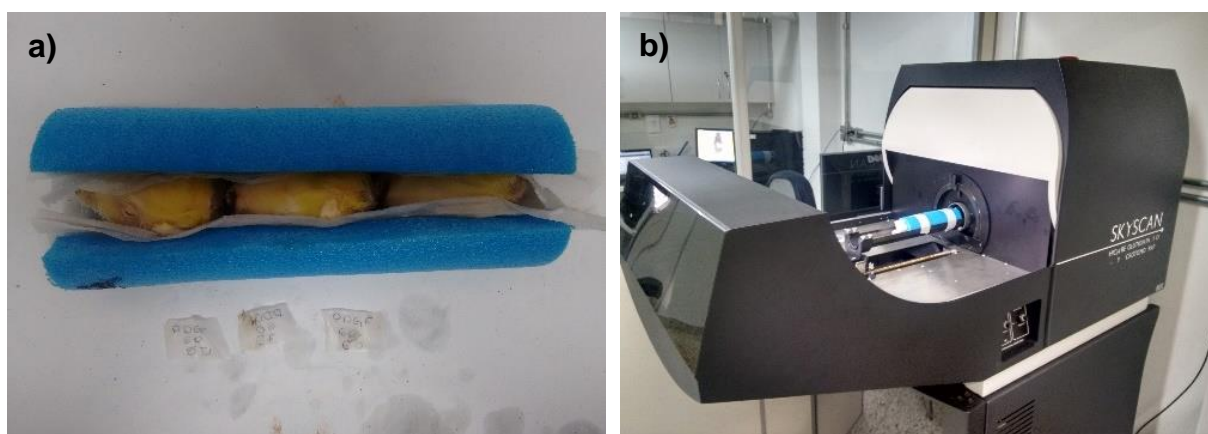
Após cada período, os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de anestesia. Os crânios foram separados por guilhotina, imediatamente mantidos 48 horas em paraformaldeído 4% (em PBS pH 7,4), posteriormente lavados por 4 horas em água corrente e por fim, armazenados em etanol 70% até as análises (MicroCT).

3.3.3 MicroCT

A análise microtomográfica foi obtida a partir equipamento Skyscan 1176 (Astselaar, Bélgica, 2003) (Figura 11). As amostras foram obtidas com um filtro de alumínio de 1,0 mm, cortes de 17,48 μm , por 360° (passo de rotação de 0,5°), voltagem de 70 kV, corrente de 357 μA e exposição de 400 ms. As amostras foram reconstruídas pelo programa NRecon (versão 1.7.3.1) e NReconServer (versão 1.7.3.2) sob os parâmetros de bean-hardening correction (40%), ring artifacts reduction (20), smoothing (1), dynamic image range (0,0045-0,065). Posteriormente, foram orientadas por meio do programa Data Viewer (versão 1.5.6.2) e salvas no eixo coronal x-z). Em seguida, as micrografias foram analisadas pelo programa

CTAnalyser (versão 1.17.7.2), onde a região de interesse (ROI) foi delimitada (região circular de 5 mm de diâmetros equivalente ao defeito criado) utilizando uma imagem 2D de referência do defeito, com limites equivalentes a 1 mm de espessura (58 cortes, para abranger toda a profundidade da regeneração, de forma a obter o volume de interesse (VOI), com binarização (escolha de um valor limiar para os pixels, “threshold”) cujos valores situados entre 70-255 foram convertidos em um valor denominado saturado, em uma imagem de 8 bits, obtendo uma imagem em preto e branco. A análise foi realizada em quintuplicata e os resultados expressos como média e desvio padrão.

Figura 11 – Análise da regeneração óssea por MicroCT: a) suporte para imobilizar as amostras, b) equipamento de microCT Skyscan 1176.



Fonte: Autoria própria.

3.4 Análise estatística

Para criação dos gráficos e análise estatística, utilizou-se o programa OriginPro 2017 e os dados foram registrados como média e desvio padrão. Para seleção dos métodos estatísticos, os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene). Os dados foram comparados pelo teste de t-Student ou o teste ANOVA (one way) seguido do pós-teste de Tukey. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 12 é uma micrografia sob ampliação de 1000x mostrando a morfologia da superfície das membranas produzidas. Nas membranas sem reticulação, não foi possível observar porosidade nas superfícies nem separação de fase entre o látex e o alginato, apresentando um aspecto denso e contínuo. Porém, nas membranas reticuladas com cálcio notam-se mais irregularidades na superfície, sendo que na membrana de alginato reticulada observam-se detalhes mais claros (protuberâncias), provavelmente ao sal reticulado com o alginato e depositado na superfície. Bierhalz et al. (2014) também observaram a presença de bário na superfície do alginato depois de sua reticulação com esse cátion.

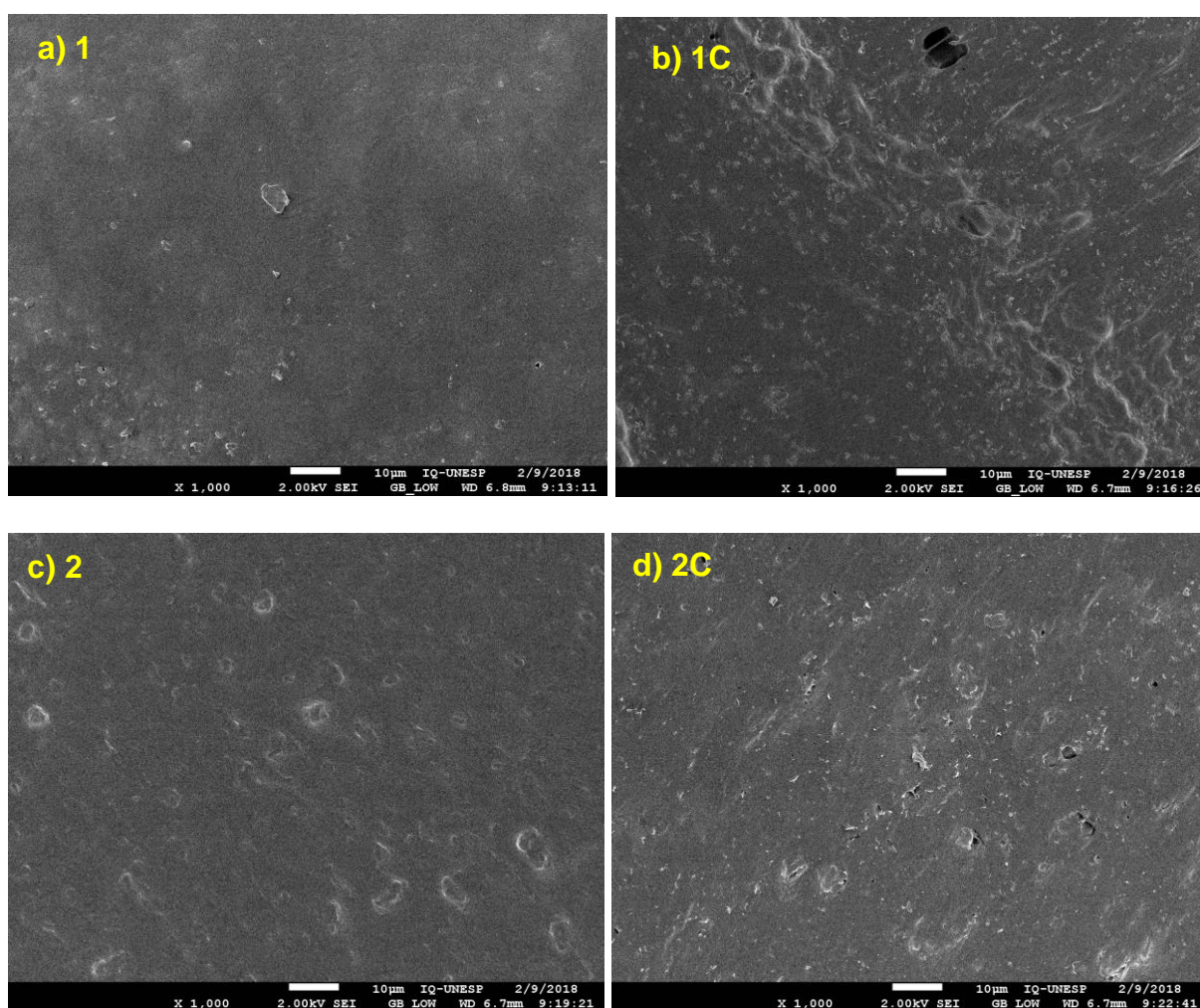
Esse aumento na irregularidade da superfície das blendas reticuladas pode ser devido à imersão na solução de cloreto de cálcio. Ho e Khew (2000) notaram que durante a formação do filme de látex formam-se exsudatos em sua superfície, e quando eles foram lixiviados, aumentou a rugosidade da superfície do filme. Além disso, uma vez que o alginato é hidrofílico e solúvel em água, também pode ocorrer a solubilização da camada mais superficial, antes de sua reticulação (RHIM, 2004). Assim como também pode ter ocorrido contração devido à tensão criada pela reticulação, uma vez que as membranas de alginato reticuladas se mostraram deformadas e extremamente rígidas e quebradiças após secagem.

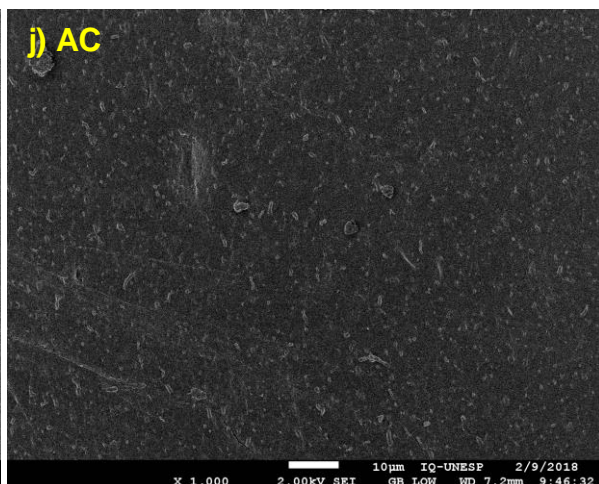
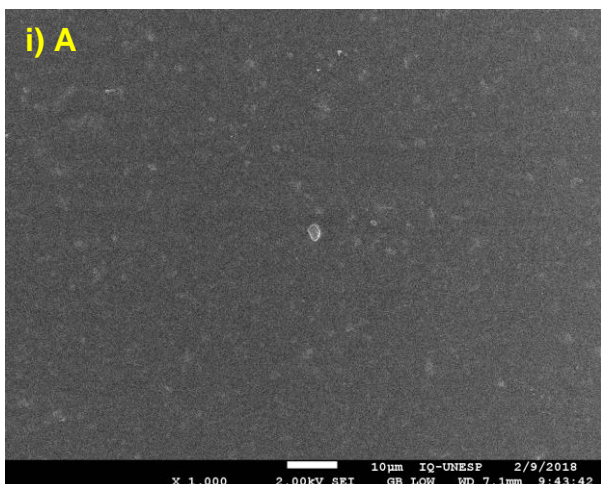
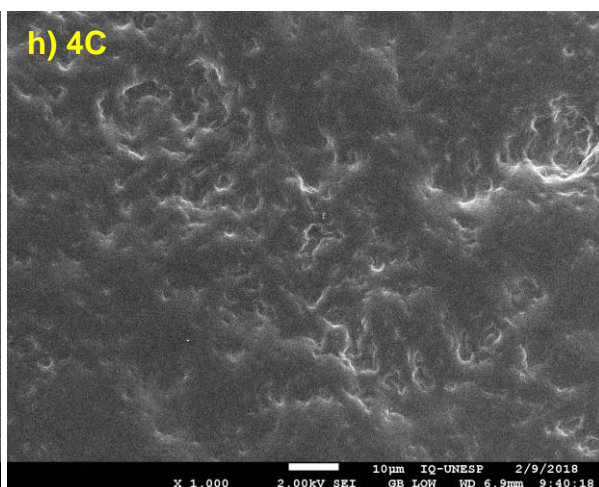
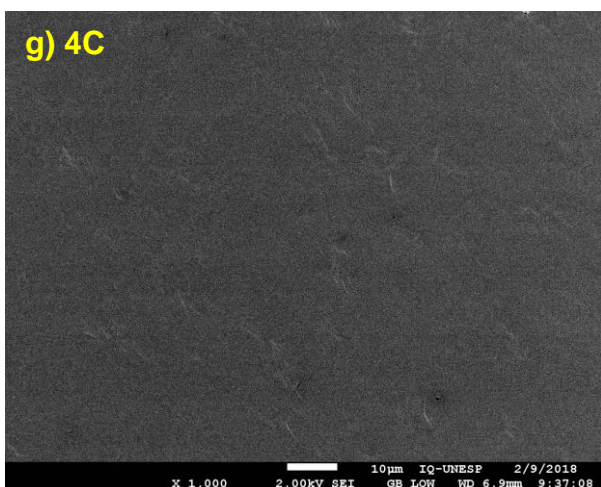
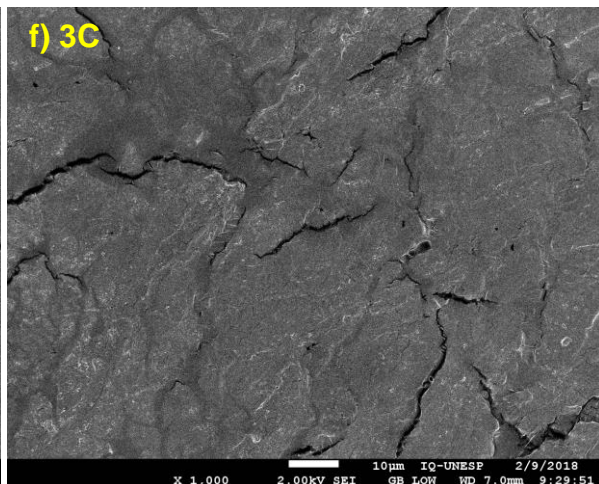
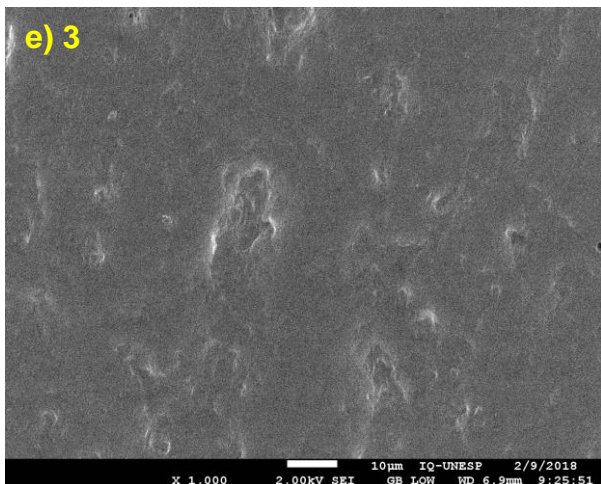
Na fabricação de membranas com fibroína de seda e alginato, Moraes et al. (2014) observaram separação de fase entre os dois polímeros em todas as proporções utilizadas, notando estruturas globulares, mesmo a partir de soluções homogêneas. O solvente é um fator importante para a miscibilidade, deposição e formação das membranas. Um e Park (2007) observaram a separação de fase na mistura de fibroína de seda com álcool polivinílico (PVA) em solução aquosa, entretanto, quando produziram as membranas a partir do ácido fórmico como solvente, observaram a formação de blendas miscíveis por MEV. A solução de látex

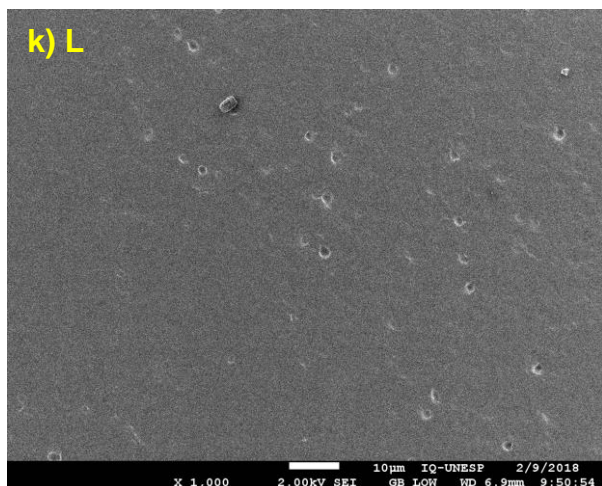
é estabilizada em um pH alcalino, o que pode favorecer a miscibilidade com o alginato, uma vez que sua viscosidade diminui com o aumento do pH (LEE; MOONEY, 2012).

A presença de protuberâncias na superfície também pode ser devido a ambos os polímeros apresentarem cargas negativas (WONGTHEP et al., 2012; LEE; MOONEY, 2012). Daemi, Barikani e Barmar (2013) justificou a formação de irregularidades na superfície de membranas de alginato com poliuretano devido a ambos polímeros apresentarem carga negativa do grupo carboxilato (COO^-), o que poderia levar a repulsão entre os polímeros.

Figura 12– Micrografia da morfologia superficial a partir do MEV sob ampliação 1000x das membranas: a)1, b) 1C, c) 2, d) 2C, e) 3, f) 3C, g) 4, h) 4C, i) A, j) AC e k) L.





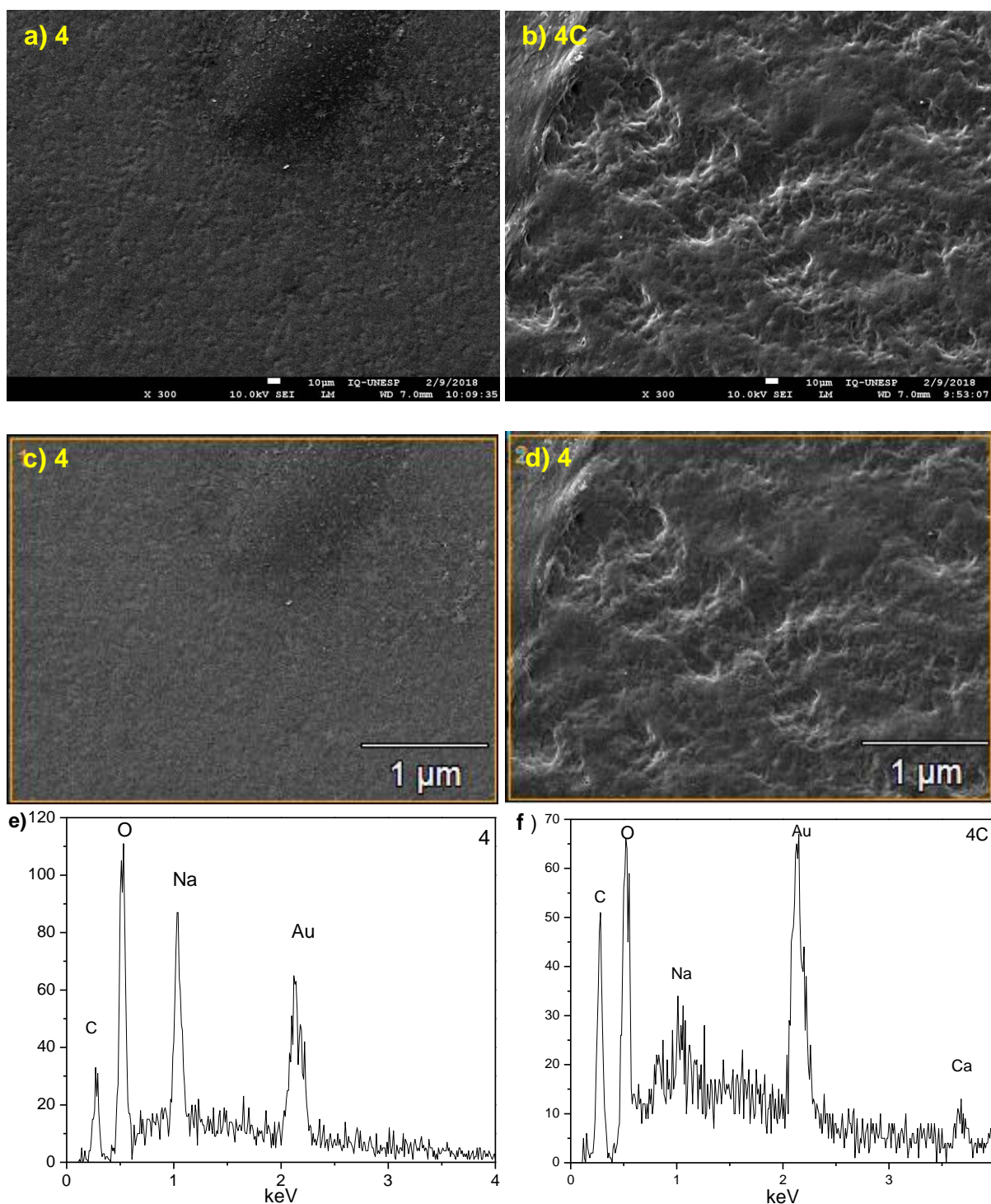


Fonte: Autoria própria.

A Figura 13 é uma micrografia da membrana 4. Para a formação da imagem, o MEV utiliza uma tensão de aceleração dos elétrons de 2 kV (Figura 13.a,b), gerando informação da camada mais superficial do material, originando assim uma imagem com aspecto tridimensional bem definida (elevada profundidade de campo), sendo útil para avaliar a estrutura topográfica. O EDS é um espectrômetro de Raio-X que utiliza uma tensão de aceleração maior (10 kV) (Figura 13.c,d) para análise, de forma que os elétrons apresentam uma penetração maior na amostra, ocorrendo sobreposição entre os sinais de diferentes profundidades, gerando uma imagem de nitidez inferior, mas que permite a avaliação da composição química (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). A análise de EDS foi escolhida para demonstrar a presença do cálcio utilizado na reticulação.

O sinal do ouro no EDS é devido ao recobrimento da amostra. É possível notar a presença de sódio em ambas as amostras, pois antes da reticulação, o alginato estava ligado com o cátion monovalente para permitir sua solubilização. A presença de cálcio é observada apenas na membrana reticulada (Figura 13.e,f)..

Figura 13 – Análise por MEV-EDS sob ampliação de 300x: a) micrografia por MEV da membrana 4, b) micrografia por MEV da membrana 4C, c) micrografia por EDS da membrana 4, d) micrografia por EDS da membrana 4C, e) EDS da membrana 4, f) EDS da membrana 4C.



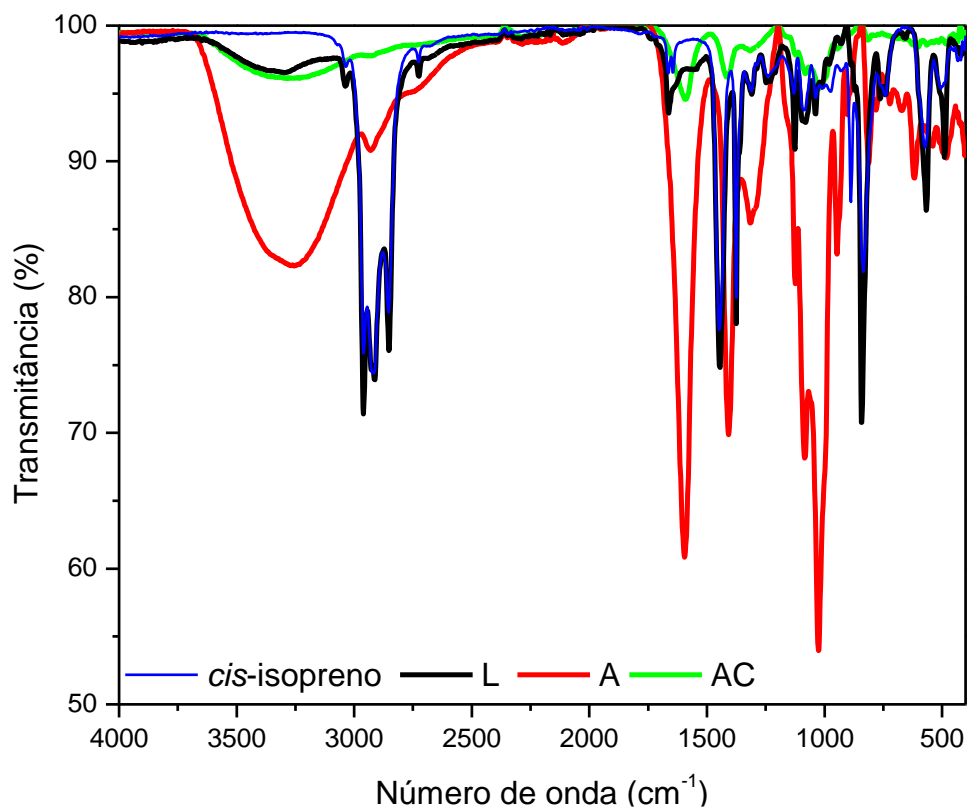
Fonte: Autoria própria.

4.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A Figura 14 resume o espectro de FTIR-ATR das membranas puras. Na membrana de látex, composto principalmente pelo polímero *cis*-1,4-isopreno, destacam-se principalmente as bandas em 2956 cm^{-1} , 2904 cm^{-1} e 2840 cm^{-1} , relacionadas com estiramento assimétrico CH_3 , simétrico de CH_3 e simétrico de CH_2 , 1661 cm^{-1} relacionado com estiramento de $\text{C}=\text{C}$, 1441 cm^{-1} com deformação de CH_2 , 1376 cm^{-1} com deformação assimétrica de CH_3 , 839 cm^{-1} com deformação angular fora do plano de $=\text{CH}$, 576 cm^{-1} e 476 cm^{-1} deformação de $\text{C}-\text{C}-\text{C}$ (NALLASAMY; MOHAN, 2004). No espectro do látex, observa-se também uma banda larga em $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ de ligação de hidrogênio, $1700\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ e $1580\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ de amida I e II, respectivamente. Estas bandas estão relacionadas às proteínas presentes no látex natural, e estão ausentes no espectro do isopreno sintético (FERREIRA et al., 2009).

No espectro da membrana de alginato (Figura 14), observa-se uma banda de absorção larga entre $3600\text{-}300$ de ligação de OH, entre $2980\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ de CH alifático, 1595 cm^{-1} e 1401 cm^{-1} devido ao estiramento assimétrico e simétrico da carboxila (COO^-), 1129 cm^{-1} estiramento de C-O, 805 cm^{-1} e 778 cm^{-1} aos resíduos de ácido manurônico e gulurônico que compõe o alginato (DAEMI; BARIKANI, 2012; PAPAGEORGIU et al., 2010).

Figura 14 – Espectro de FTIR do polímero *cis*-isopreno (azul) e das membranas de alginato (vermelho), alginato reticulado com cálcio (verde) e látex natural (preto).

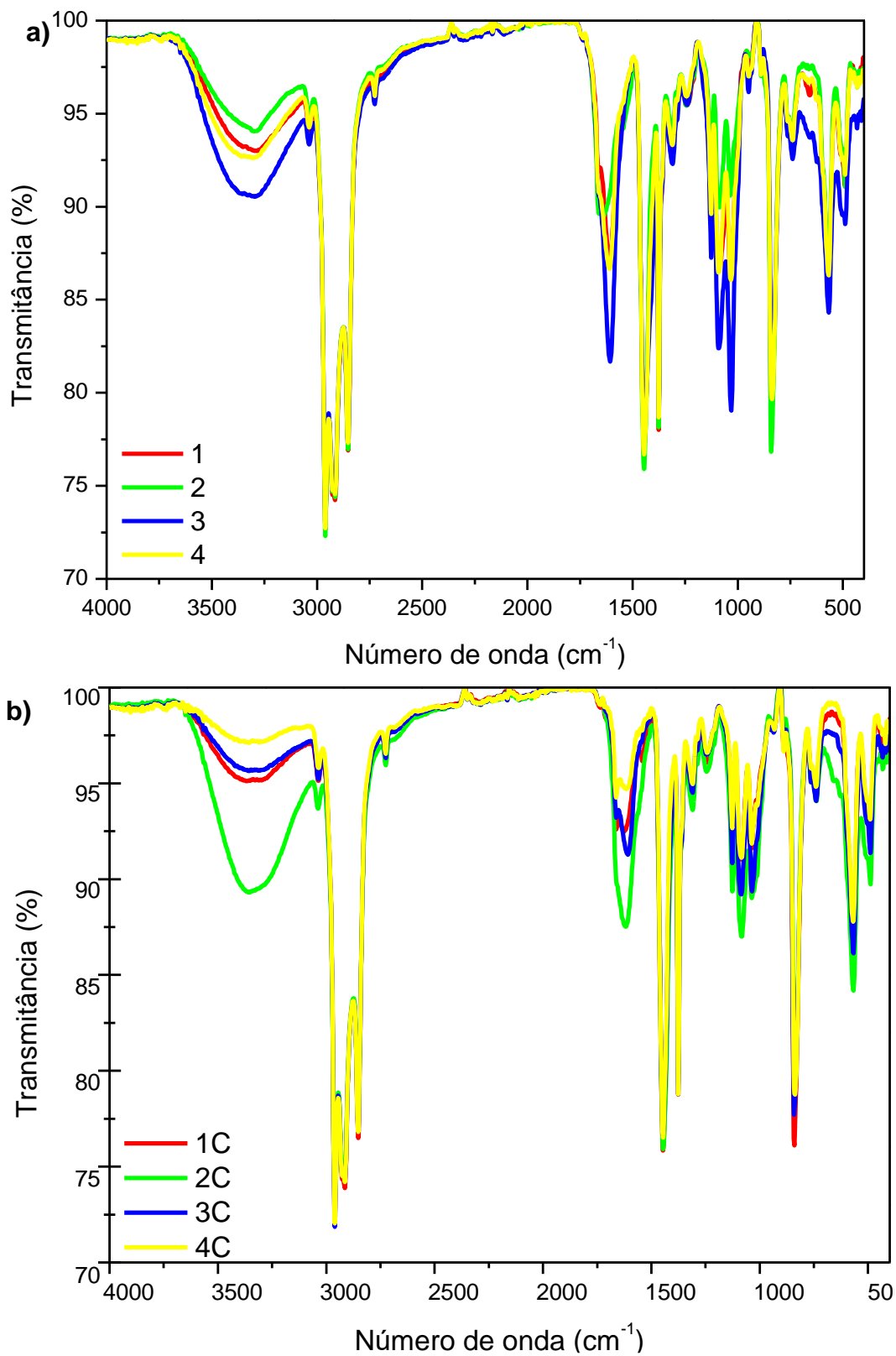


Fonte: Autoria própria.

A reticulação é comprovada principalmente com o deslocamento da banda de estiramento assimétrico da carboxila de 1595 cm⁻¹ para 1592 cm⁻¹, além da redução das intensidades das bandas. Essa mudança ocorre na hidroxila e carbonila ao quelar os íons de cálcio, e é ocasionada pela mudança de densidade de carga, raio e massa atômica (DAEMI; BARIKANI, 2012).

As blendas apresentam espectro misto, exibindo as bandas de ambos os polímeros, sendo que é possível distinguir a banda de alginato em aproximadamente 1595 cm⁻¹ e em 1592 cm⁻¹, para a membrana sem e com reticulação (Figura 15.a,b). Porém, a maioria das bandas são características do espectro do látex natural, componente em maior proporção.

Figura 15 – Espectro de FTIR das blendas com diferentes proporções de alginato: a) sem reticulação, b) com reticulação.



Fonte: Autoria própria.

4.3 Resistência mecânica à tração

Com o acréscimo de alginato, ocorreu uma redução do alongamento acompanhado por um aumento da tensão de ruptura e do módulo de Young, além disso, esses parâmetros foram intensificados com a reticulação, com diferença estatística apenas para as maiores proporções de alginato, conforme a Tabela 2. Não foi possível mensurar a membrana com alginato de cálcio reticulada, pois ela se apresentou extremamente quebradiça ao prender na máquina de ensaio mecânico.

Tabela 2 – Valores médios das propriedades mecânicas do teste de tração das membranas.

Amostra	Alongamento (mm/mm)	Tensão (MPa)	Módulo de Young (MPa)
1	4,88 ± 0,69 ^a	1,13 ± 0,17 ^a	1,71 ± 0,10 ^a
2	3,13 ± 0,72 ^b	1,62 ± 0,30 ^b	4,57 ± 0,34 ^b
3	3,29 ± 0,40 ^c	2,41 ± 0,27 ^c	8,26 ± 0,88 ^c
4	2,21 ± 0,38 ^d	2,41 ± 0,13 ^d	10,88 ± 1,18 ^d
L	10,84 ± 1,78	0,88 ± 0,21	0,73 ± 0,03
1C	4,79 ± 0,53 ^A	1,13 ± 0,20 ^a	1,67 ± 0,15 ^a
2C	3,42 ± 0,32 ^B	1,56 ± 0,15 ^b	4,01 ± 0,76 ^b
3C	3,16 ± 1,08 ^C	2,64 ± 0,49 ^C	10,09 ± 1,10 ^C
4C	1,15 ± 0,44 ^D	2,47 ± 0,35 ^D	13,66 ± 1,28 ^D
A	0,08 ± 0,004	16,46 ± 9,14	129,90 ± 55,37

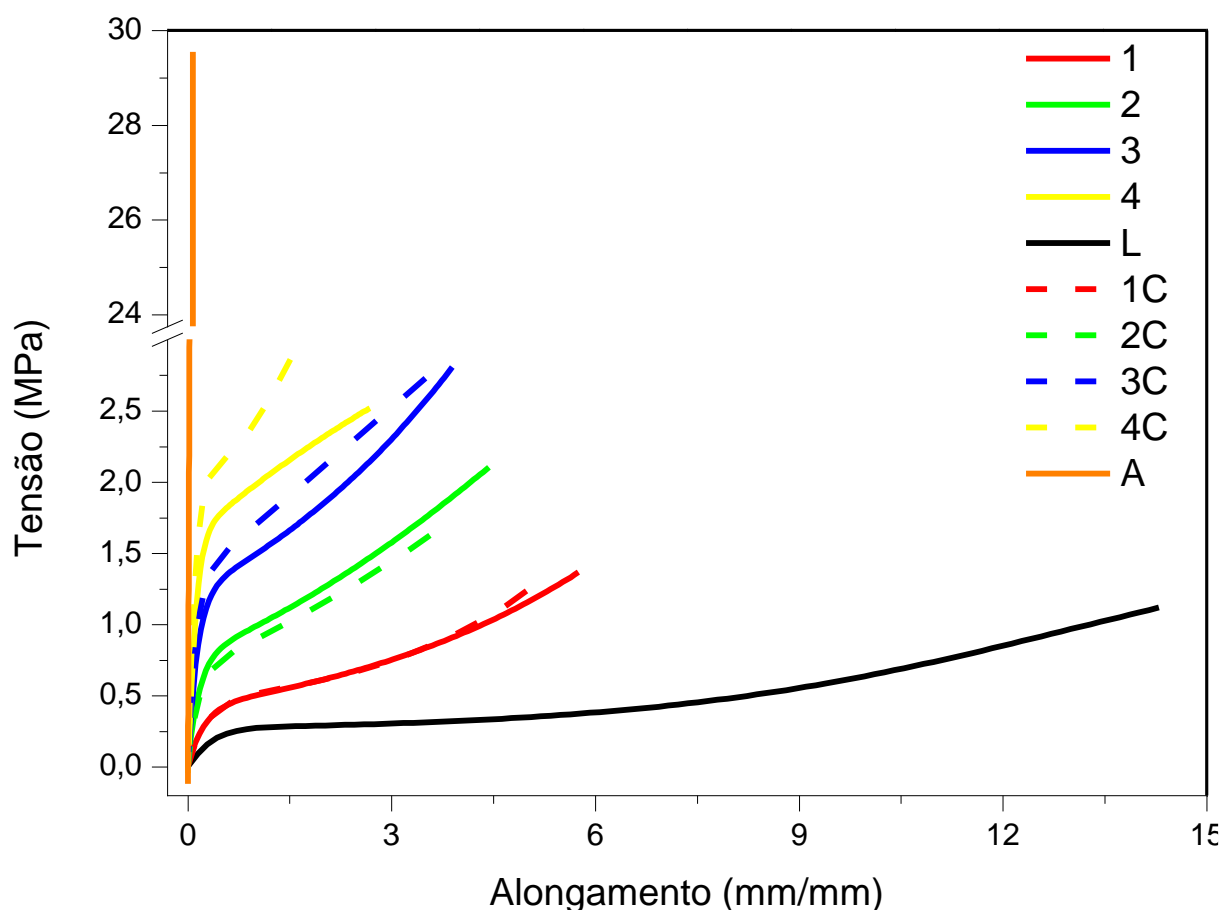
*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$). A estatística foi realizada comparativamente entre os materiais com e sem reticulação.

Fonte: Autoria própria.

O látex é um elastômero, podendo ser observado pelo seu baixo valor do módulo de Young e alto estiramento. Neves-Junior et al. (2006) e Rezende et al. (2010) observaram valores semelhantes aos obtidos, com módulo de Young abaixo de 1 MPa, uma vez que também utilizou o látex natural sem agentes reticulantes. A Figura 16 mostra uma curva de tensão-deformação típica de um elastômero como o látex natural, apresentando um formato sigmoide, com três regiões: inicialmente uma região

elástica, com tensão e deformação crescentes linearmente onde a deformação pode ser recuperada ao seu valor inicial; seguida da região plástica onde ocorre pouca variação de tensão com bastante alongamento, gerando uma deformação permanente; por fim ocorre uma região de aumento da tensão, devido ao alinhamento das cadeias poliméricas na direção da tensão (cristalização induzida pela deformação), até ocorrer o rompimento da amostra (NEVES-JUNIOR et al., 2006).

Figura 16 – Gráfico da tensão versus deformação da resistência mecânica à tração das membranas em diferentes proporções.



Fonte: Autoria própria.

O alginato apresenta pouca deformação e maior tensão de ruptura, assim como as blendas formadas com sua adição. Daemi, Barikani e Barmar (2013) observaram o mesmo comportamento com a adição de alginato em elastômeros de poliuretano, devido à natureza quebradiça dos grupos dos ácidos urônicos e as ligações de

hidrogênio formadas. Segundo Trovatti et al. (2013), o incremento das propriedades mecânicas seria devido ao fenômeno de percolação mecânica, onde os grupos hidroxila da celulose bacteriana, e neste trabalho do alginato, exerceriam um papel de reforço ao formar ligações de hidrogênio intra e intermolecular.

4.4 Termogravimetria (TG)

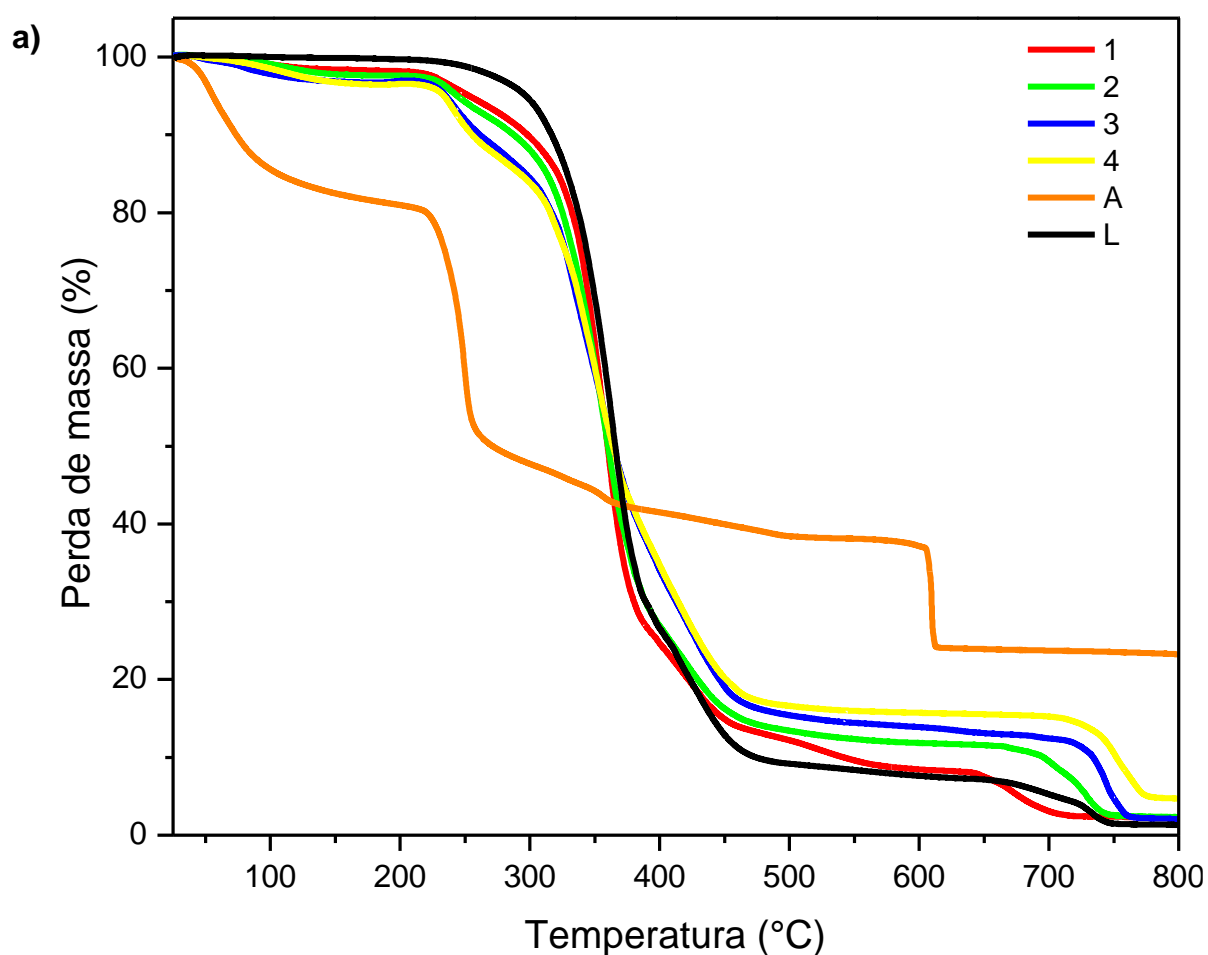
As análises térmicas permitiram caracterizar os materiais com respeito à sua estabilidade térmica, água livre ou ligada, pureza ou interação entre os polímeros das blendas. A Figura 17 e Figura 18 apresentam as curvas termogravimétricas de perda de massa das membranas em função da temperatura. Alguns eventos de degradação térmica ocorrem sobrepostos para ambos polímeros. O látex, por ser hidrofóbico, apresenta pouca variação de massa no início, ao contrário do alginato. Esta perda inicial (considerada até 200°C) deve-se a desidratação das amostras (SOARES et al., 2004). Os principais intervalos de perda de massa atribuídos ao alginato (BEKIN et al., 2013; SOARES et al., 2004) estão entre 200-290°C e 478-616°C; para o látex está entre 290-478°C e 616-800°C (RAO; JOHNS, 2008; RIPPEL, 2005).

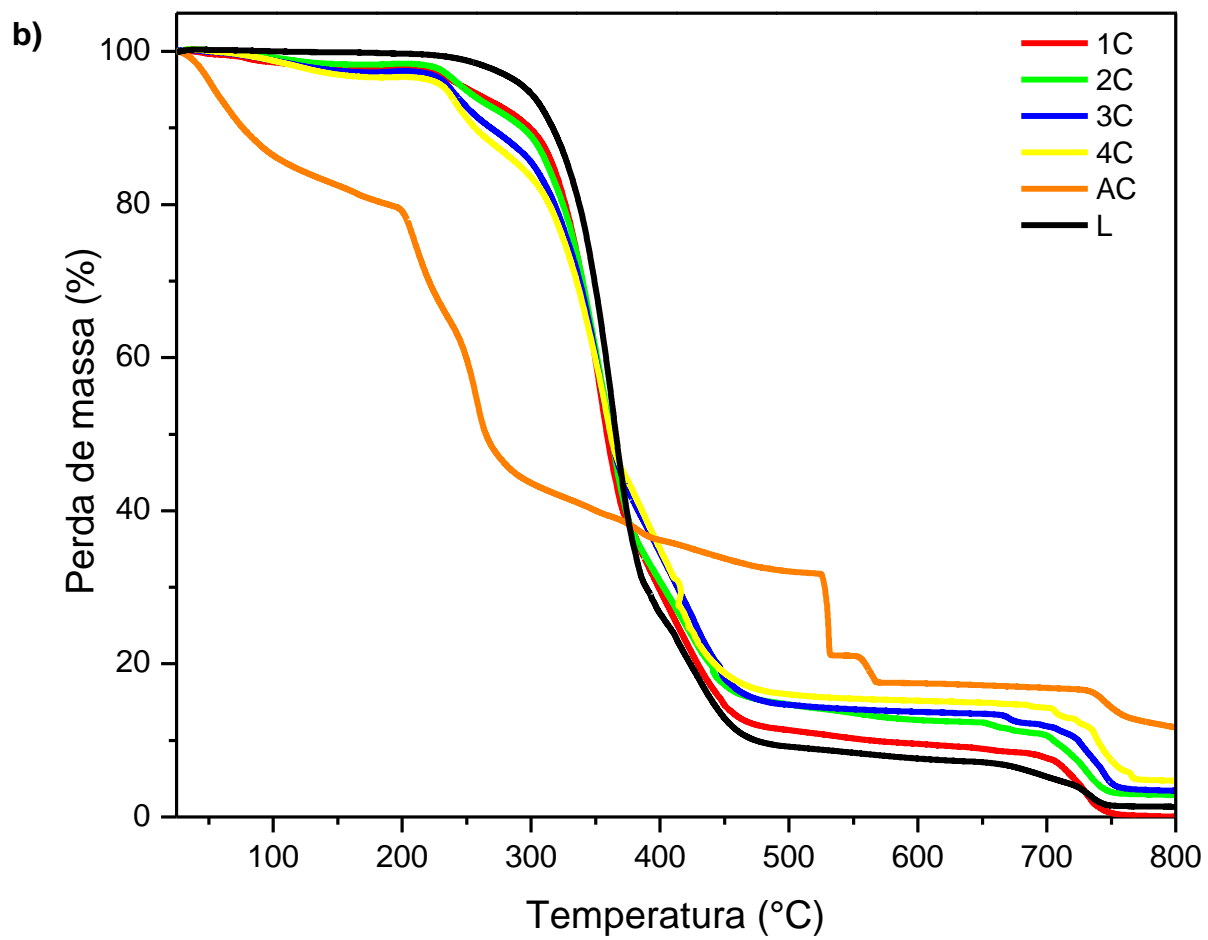
Pode-se observar que há sobreposição de perda entre os dois polímeros. Porém, com o aumento da proporção de alginato, observa-se um aumento de perda relativa à umidade (até 200°C), em que o látex apresenta apenas aproximadamente 0,5% de perda de massa e o alginato e alginato de cálcio 25,2 e 22,8%, respectivamente. Segundo Bekin et al. (2013), isso é devido aos grupos hidrofílicos do alginato (carboxila e hidroxila), enquanto que com a reticulação, há a ligação de cálcio na carboxila, adsorvendo menos umidade.

O látex apresenta maior estabilidade térmica, até aproximadamente 300°C. A perda de massa entre 200-290°C aumentou com a proporção de alginato, e é associado a quebra das ligações glicosídicas (BEKIN et al., 2013), assim como entre 290-370°C (porém, apresentou menor contribuição proporcionalmente a contribuição da degradação do látex). A maior perda de massa do látex ocorre em uma única etapa, associada com a formação de produtos voláteis, entre 290-478°C. Entre 400-450°C é

associado com a decomposição mais lenta das cadeias poliméricas, provavelmente de regiões reticuladas formadas durante a degradação térmica, uma vez que não foram utilizados agentes reticulantes para o látex (RIPPEL, 2005). A degradação nas temperaturas acima de 500°C está relacionada à formação de óxidos e carbonatos intermediários, em ambos os materiais (BEKIN et al., 2013; PATEL et al.2016; RAO; JOHNS, 2008; RIPPEL, 2005; SOARES et al., 2004).

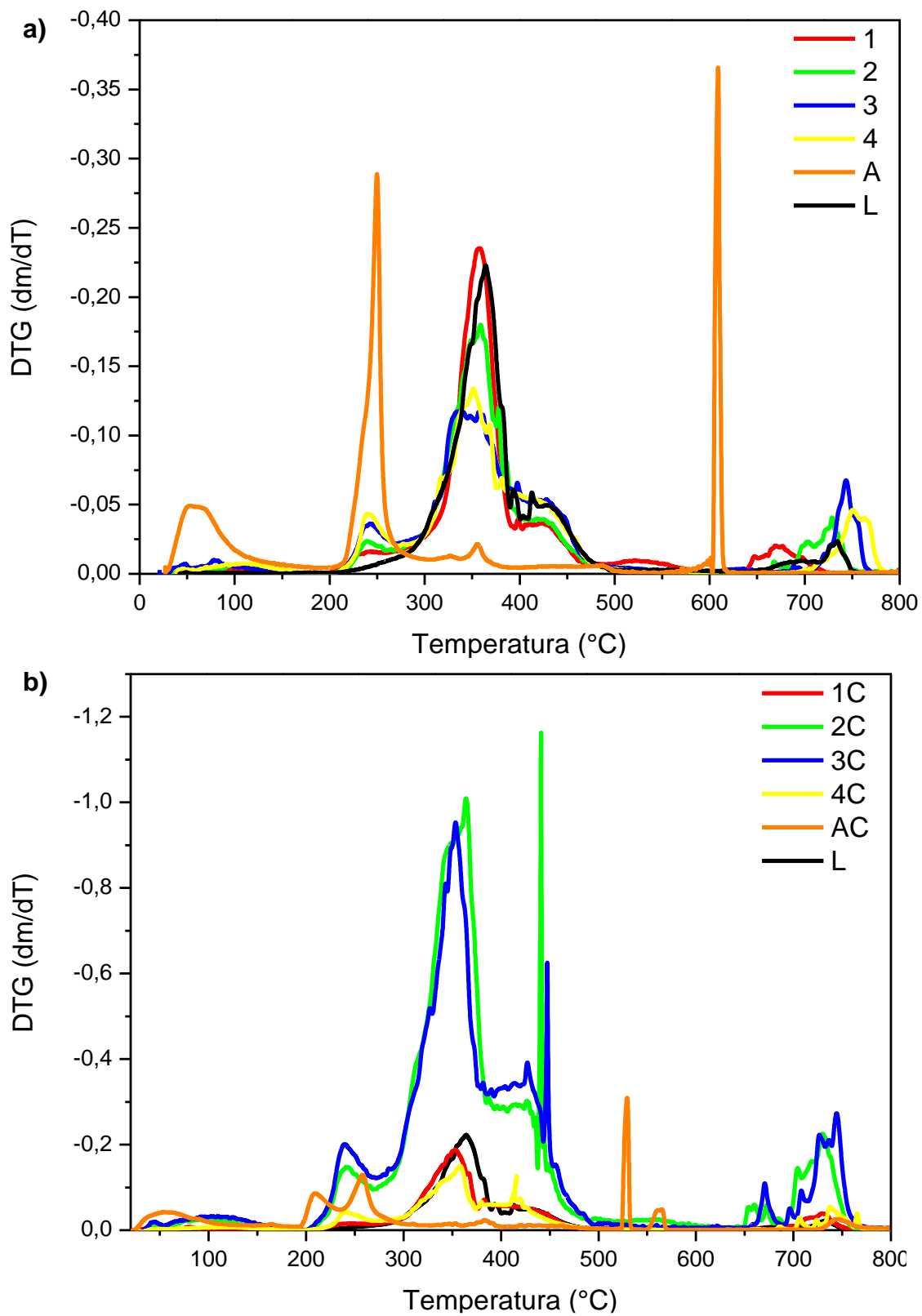
Figura 17 – Curva termogravimétrica em atmosfera de nitrogênio das membranas dos polímeros puros e das blendas: a) não reticuladas, b) reticuladas com cloreto de cálcio.





Fonte: Autoria própria.

Figura 18 – Curva termogravimétrica derivada das membranas dos polímeros puros e das blends: a) não reticuladas, b) reticuladas com cloreto de cálcio.

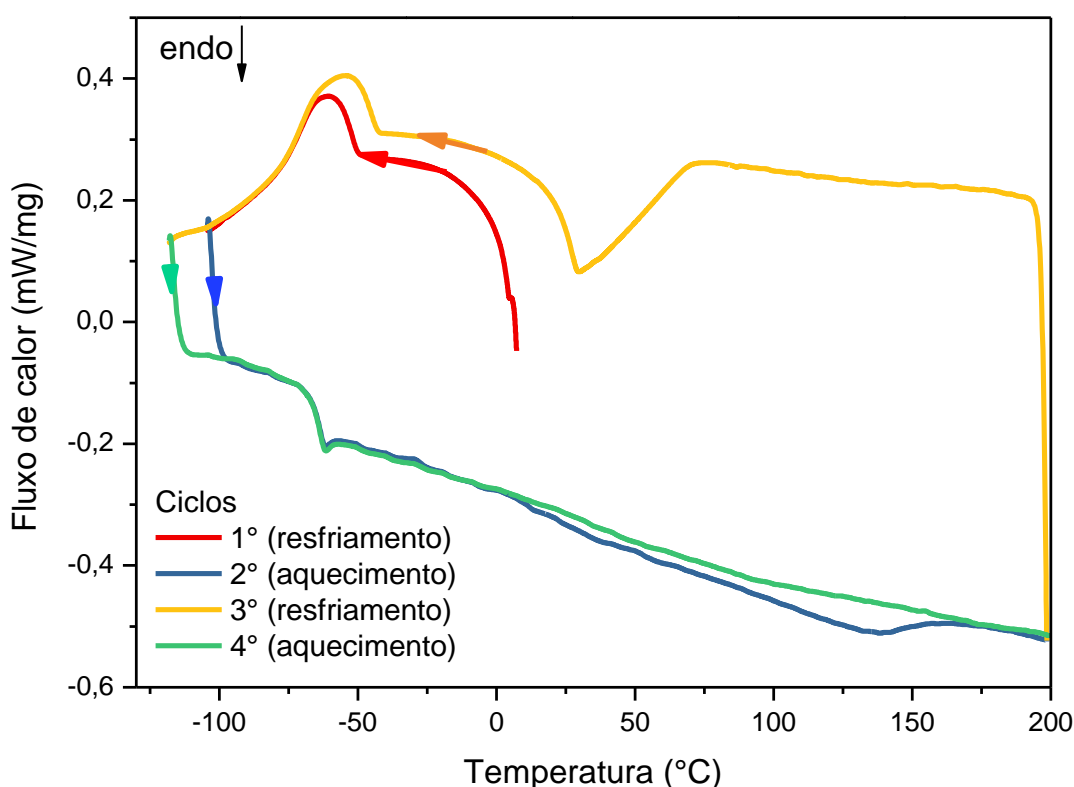


Fonte: Autoria própria.

4.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram interpretadas a partir do segundo aquecimento, a fim de eliminar a influência da história térmica do material (por exemplo, uma relaxação de tensão, comum em elastômeros). A Figura 19 mostra a curva DSC do látex, com todos os ciclos de aquecimento e resfriamento. Tanto na primeira, quanto na segunda varredura é obtido o mesmo valor de temperatura de transição vítrea (T_g , valor de temperatura onde acima dele o polímero passa de um estado rígido para um estado onde as cadeias poliméricas apresentam mais mobilidade) de -61°C (RIEGEL; FREITAS; SAMIOS, 1999).

Figura 19 – Curva de calorimetria exploratória diferencial em atmosfera de nitrogênio, exemplificando os ciclos de aquecimento e resfriamento da membrana de látex. Pico endotérmico para baixo.

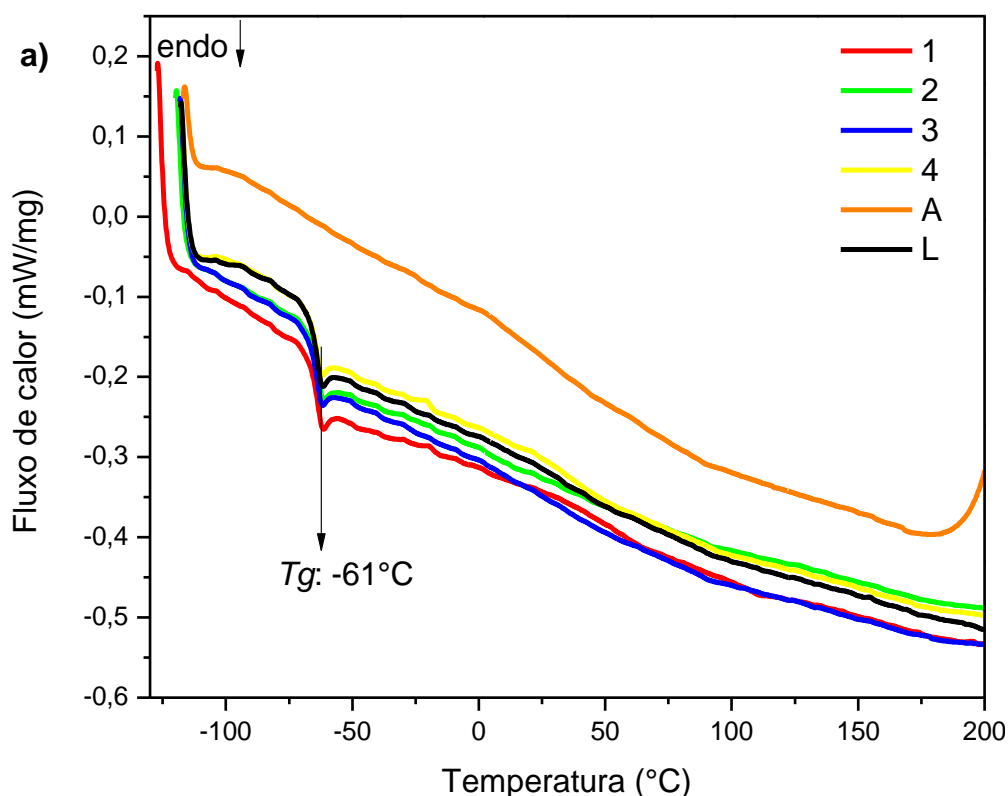


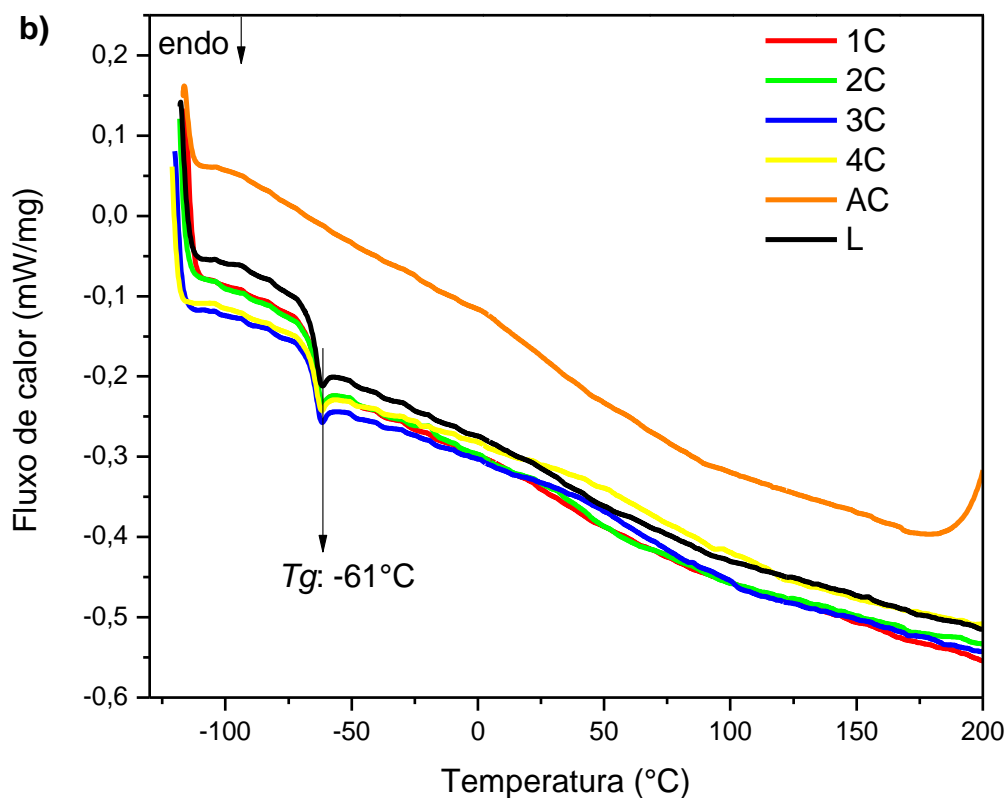
Fonte: Autoria própria.

A partir da curva DSC é possível inferir sobre a interação entre os dois polímeros, a partir da T_g . Blendas são misturas entre pelo menos dois polímeros, os quais não são necessariamente miscíveis e homogêneos, podendo ocorrer separação de fase, onde seria esperado o aparecimento de duas temperaturas de T_g ou a mudança da T_g dos materiais (RIAZ; ASHRAF, 2014).

Não foi possível observar a T_g do alginato, e sua incorporação não causou alteração da T_g do látex em nenhuma das blendas, conforme apresentado na Figura 20 (a,b). Estes resultados sugerem que há boa miscibilidade e compatibilidade entre os materiais, entretanto, Moraes (2010) encontrou interação na mistura de alginato com o fibrina de seda, observando alteração dos picos de T_g . Pichayakorn et al. (2012) não observaram mudança na T_g na blenda entre o látex natural desproteínizado e o PVA, porém, observou uma redução T_g quando utilizado glicerina, considerando ambas as blendas compatíveis.

Figura 20 – Curva de calorimetria exploratória diferencial em atmosfera de nitrogênio dos polímeros puros e das blendas: a) não reticuladas, b) reticuladas com cloreto de cálcio. Pico endotérmico para baixo.





Fonte: Autoria própria.

Na mistura entre o látex com a quitosana, Rao e Johns (2008) observaram a presença de duas T_g , demonstrando que os polímeros são incompatíveis, inclusive observando a variação da T_g de ambos materiais, sendo que para o látex a T_g variou de -65°C (para o látex puro) até -71°C (para a blenda com 70% de quitosana). Daemi, Barikani e Barmar (2013) também observaram a incompatibilidade entre alginato e poliuretano por alteração da T_g devido a possível interação de ligação de hidrogênio entre o segmento mais flexível do poliuretano com o segmento mais rígido do alginato.

4.6 Ângulo de contato

O ângulo de contato se refere ao ângulo que forma entre a superfície de um líquido ao entrar em contato com um sólido, e avalia a molhabilidade de um material. É considerado molhável pelo líquido (hidrofílico quando usada a água), ângulos abaixo de 90° (COUTINHO, 2007).

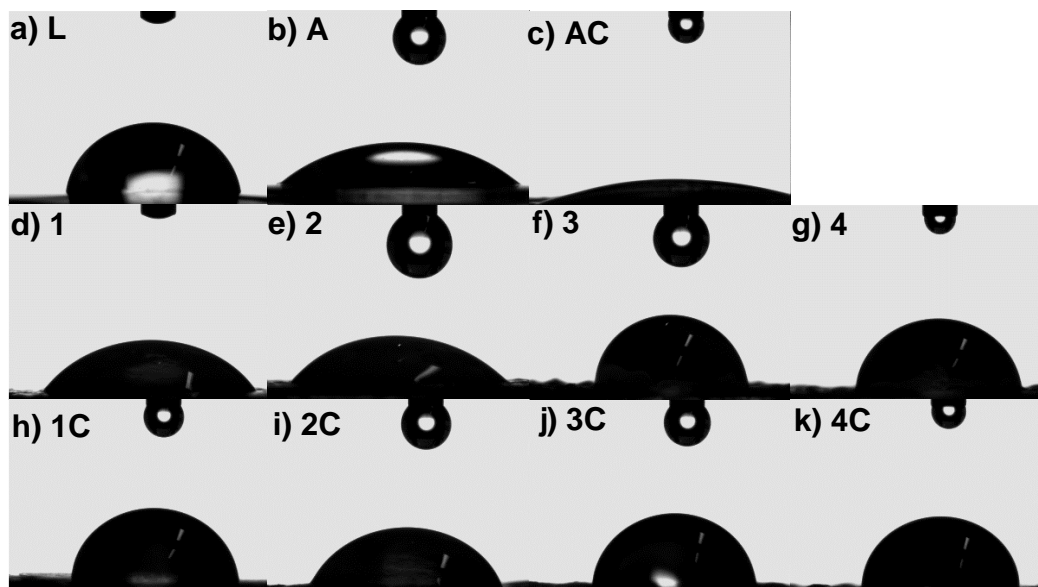
A membrana AC apresentou a maior molhabilidade, seguida pela de A, 2C e pelas membranas 1 e 2 (sendo que estas não apresentaram diferença estatística entre elas (Tabela 3). As membranas de látex, 3, 4, 1C, 3C e 4C não apresentaram diferença significativa, apresentando os maiores ângulos de contato, ou seja, menor hidrofobicidade (Figura 21.a-k). Pode-se observar que as membranas de alginato apresentaram maior molhabilidade e a de látex natural apresentou a menor molhabilidade. O acréscimo de alginato aumentou a molhabilidade das membranas, para as membranas 1 e 2 e 2C, porém, para as demais não houve diferença significativa.

Tabela 3 – Medidas do ângulo de contato (média \pm desvio padrão) a partir da técnica de gota séssil.

Amostra	Média	Desvio Padrão
L	86 \pm	2,4 ^a
1	58 \pm	3,2 ^b
2	52 \pm	2,9 ^b
3	84 \pm	6,0 ^a
4	88 \pm	2,6 ^a
A	42 \pm	0,8 ^c
1C	84 \pm	5,7 ^a
2C	70 \pm	8,0 ^d
3C	89 \pm	1,3 ^a
4C	90 \pm	1,5 ^a
AC	24 \pm	6,2 ^e

*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$). **Fonte:** Autoria própria.

Figura 21 – Micrografias representativas do ângulo de contato da gota de água destilada (17 μ L) na superfície dos materiais: a) L, b) A, c) AC, d) 1, e) 2, f) 3, g) 4, h), 1C, i) 2C, j) 3C e k) 4C.



Fonte: Autoria própria.

A hidrofobicidade do látex está de acordo com a literatura, uma vez que é composto principalmente pelo polímero de isopreno. Trovatti et al. (2015) observaram valores de 100° para a membrana de látex, e 90° com a adição de porosidade (devido à penetração na matriz), com uma redução do ângulo para 80° quando adicionado 20% de massa de celulose bacteriana.

O aumento da hidrofiliabilidade com o acréscimo de alginato também foi observado por Moraes (2010), onde a fibroína de seda apresentou 81° , e após a incorporação de alginato reduziu para 72° . Dentre a literatura apresentada, o presente trabalho obteve o maior aumento da hidrofiliabilidade em relação à massa de alginato adicionada, obtendo ângulo de $58 \pm 3^\circ$ com adição de 4,75% (m/m) de alginato no látex, sendo um resultado semelhante ao de Daemi, Barikani e Barmar (2013), o qual reduziu a hidrofobicidade do poliuretano de 75 ± 2 para $60 \pm 2^\circ$ com a adição de 4% de alginato. A hidrofiliabilidade da superfície é importante na interação célula e biomaterial, uma vez que as células preferem aderir em superfícies hidrofílicas (MORAES, 2010).

4.7 Intumescimento

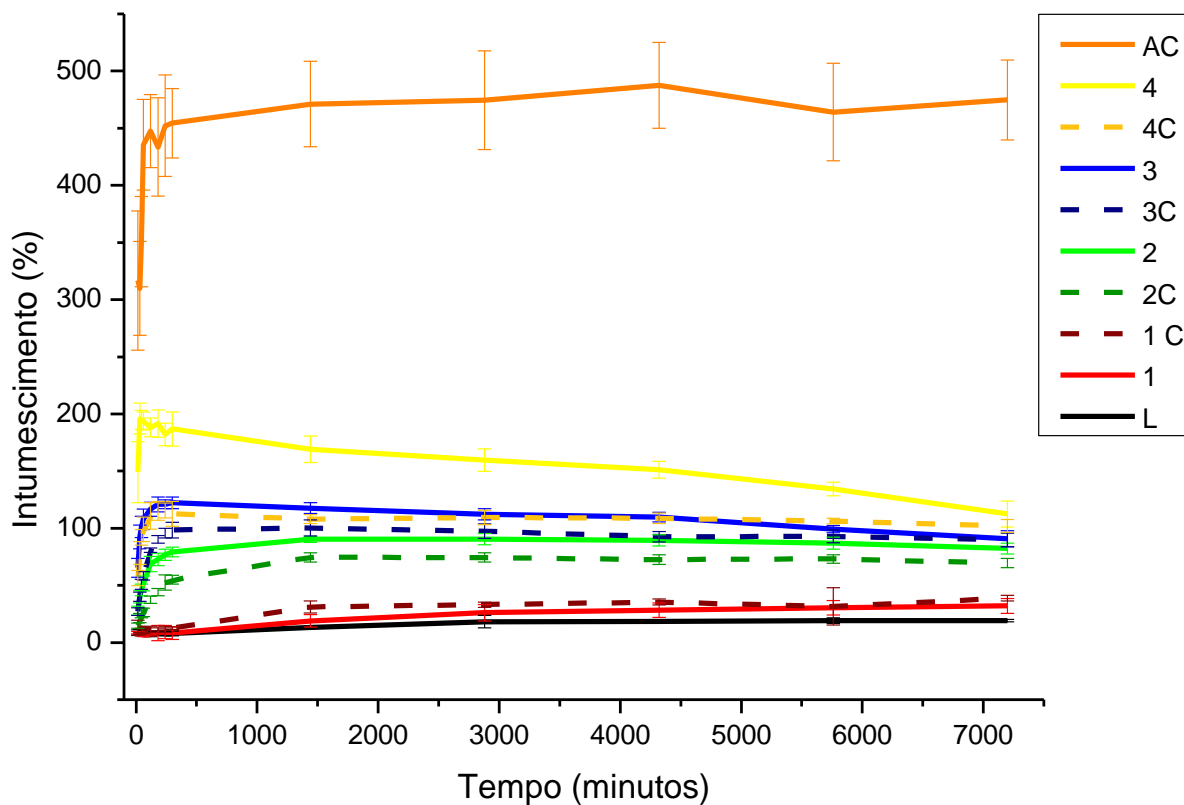
O intumescimento foi realizado em solução c-SBF durante 7 dias, e a absorção de água foi comparada proporcionalmente à massa inicial da amostra. Não foi possível analisar a membrana de alginato sem reticulação, uma vez que dissolvera completamente. A membrana de alginato reticulada apresentou o maior intumescimento e a de látex apresentou o menor, as demais apresentaram valores intermediários (Figura 22 e Figura 23).

Foi possível observar que com o aumento da quantidade de alginato houve aumento do intumescimento e do tempo para atingir a massa máxima, porém, quando realizada a reticulação com cloreto de cálcio (1%), houve redução no grau de intumescimento quando comparado com a amostra não reticulada. Isso é devido à reticulação com o cálcio, que se liga à carboxila deixando-a indisponível para absorver umidade, além de que a reticulação reduz a mobilidade das cadeias, impedindo que a membrana expanda (BEKIN et al., 2013).

A Figura 22 mostra o maior valor de absorção de água e o tempo em que ocorreu, podendo-se observar que também houve um maior tempo para o equilíbrio com o aumento do alginato, o qual também foi menor com a reticulação. Porém, as membranas não reticuladas apresentaram uma redução no grau de intumescimento nos tempos finais do experimento, provavelmente devido à dissolução de alginato e com isso à menor capacidade de retenção de líquido ao longo do tempo, indicando o início de sua degradação.

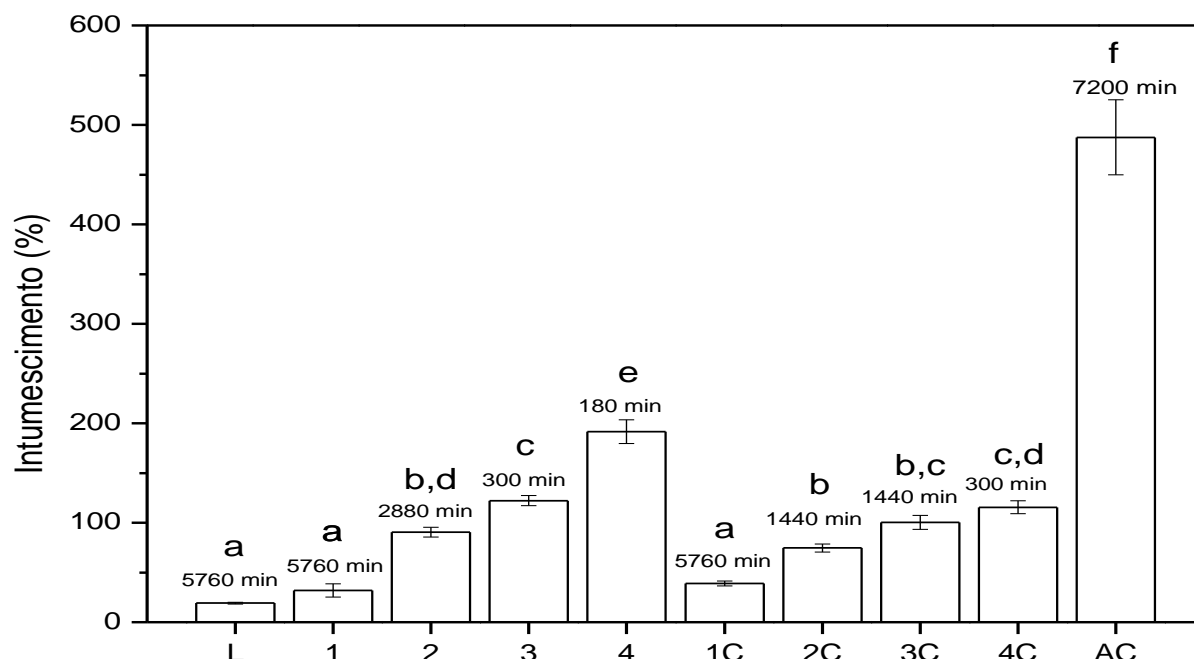
Esses resultados complementam os resultados de ângulo de contato, os quais embora não tenha sido observado melhora na molhabilidade da superfície para as maiores concentrações de alginato como era esperado, foi observado maior intumescimento. Uma possibilidade para o resultado inesperado do ângulo de contato, seria que com o acréscimo de alginato, haveria uma modificação da superfície da membrana, assim como a reticulação, modificando sua interação com a gota de água, uma vez que a rugosidade pode influenciar na análise de ângulo de contato (COUTINHO, 2007).

Figura 22 – Cinética de intumescimento das membranas realizado em c-SBF por 5 dias.



Fonte: Autoria própria.

Figura 23 – Gráfico apresentando o tempo em que as diferentes membranas apresentaram o intumescimento máximo.



*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$). Fonte: Autoria própria.

Segundo a literatura, uma ferida pode produzir entre 0,17-0,86 g/cm²/dia de exsudato (DEALEY; CAMERON; ARROWSMITH, 2006). As membranas elaboradas para o ensaio de intumescimento apresentaram média das massas de aproximadamente 0,64±0,19 g e área de aproximadamente 11 cm², ou seja, cada membrana precisaria absorver entre 4,4-13,2 g de água por dia, equivalente a absorção de 292-1478% da massa das membranas. Com esses valores, apenas a membrana de alginato reticulada com cloreto de cálcio seria passível de utilização, ou as membranas 4 e 4C, porém com trocas mais constantes.

4.8 Permeabilidade ao vapor de água

A Tabela 4 mostra a permeabilidade de vapor de água em gramas de água por dia, onde é possível observar que a membrana de alginato apresenta a maior taxa de permeabilidade (por ser hidrofílico), e o látex, por ser um material hidrofóbico, apresenta uma das menores taxas, devido à sua hidrofobicidade.

As blendas apresentam taxas intermediárias de permeabilidade. Outro ponto é que a reticulação com cálcio reduz a taxa em relação às membranas não reticuladas, devido ao seu efeito de reforço, aumentando a propriedade de barreira, dificultando a passagem do vapor. Os valores de permeabilidade ao vapor de água, padronizados pela área (m²) e diferença da umidade relativa (entre o interior do frasco com umidade 0% e o ambiente do dessecador com umidade 75%) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Permeabilidade ao vapor de água pela técnica de dessecante.

Amostras	Permeabilidade ao vapor de água	
	(g.mm/h.cm ² .mmHg)	(g/dia.m ²)
L	2,80E-08 ± 1,92E-09 ^a	45,78 ± 5,05
1	2,40E-08 ± 7,01E-10 ^a	40,01 ± 1,52
1C	2,19E-08 ± 5,21E-10 ^a	39,30 ± 1,91
2	3,04E-08 ± 3,63E-09 ^a	48,63 ± 5,80
2C	3,20E-08 ± 4,99E-09 ^a	52,16 ± 8,15
3	3,44E-08 ± 4,29E-10 ^a	60,84 ± 1,78
3C	3,23E-08 ± 3,58E-09 ^a	51,47 ± 7,25
4	3,53E-08 ± 3,05E-09 ^a	76,69 ± 15,28
4C	3,76E-08 ± 1,83E-09 ^a	64,60 ± 2,87
A	1,35E-07 ± 2,08E-08 ^b	905,14 ± 12,04

*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$). **Fonte:** Autoria própria.

O controle da permeabilidade é importante no caso de feridas de pele, pois está relacionada tanto com o não ressecamento da ferida quanto como a possibilidade de eliminação do excesso de exsudato. A permeabilidade da pele saudável é cerca de 204 g/m².dia (KWEON et al., 2001). A literatura apresenta alguns resultados controversos, onde segundo Moraes (2010), a maioria dos curativos ficam entre 76 a 9360 g/m².dia, e segundo Trovatti et al. (2015), o recomendado é entre 2000-2500 g/m².dia.

Embora o escopo deste trabalho seja a aplicação como uma barreira para regeneração óssea, o produto também teria a possibilidade de aplicação dérmica. Desta forma, apenas a blenda 4 sem reticulação se enquadraria para curativo dérmico. Um detalhe é que a norma da American Society for Testing and Materials (ASTM E96) estabelece que se considere no cálculo a diferença de umidade relativa e a espessura da membrana, parâmetros que não foram encontrados na maioria da literatura consultada, dificultando a comparação, por isso a Tabela 4 apresenta os valores para os diferentes cálculos.

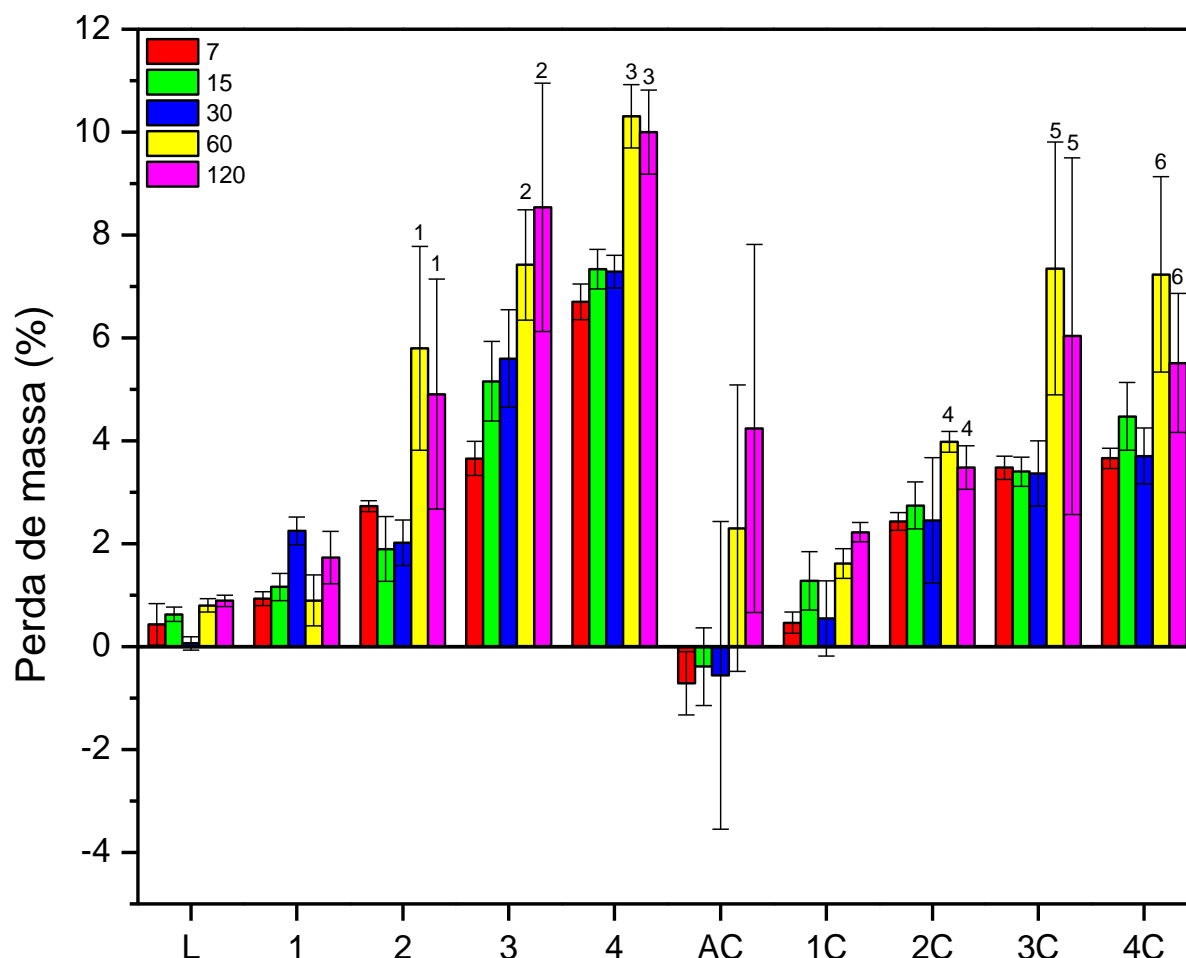
Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura onde o látex funciona como barreira. Trovatti et al. (2015) também observaram que com o acréscimo de celulose bacteriana aumentou a permeabilidade do látex, sendo maior para as membranas porosas. Yun, Yoo e Kim (2007) também obtiveram um acréscimo na permeabilidade com o acréscimo de alginato ao poliuretano.

4.9 Degradação *in vitro* em fluido simulado

O estudo da degradação *in vitro* foi realizado mimetizando o meio fisiológico com c-SBF (1X, pH 7,4) a fim de entender a variação de suas propriedades ao longo do tempo, selecionar a formulação com as propriedades desejadas e prever a necessidade de sua remoção futura.

É possível observar (Figura 24) aumento da perda de massa com o acréscimo de alginato, tanto para as membranas não reticuladas quanto para as reticuladas com cálcio, porém, a perda é mais significativa durante os primeiros 7 dias, sendo que houve diferença estatística na perda de massa com o tempo apenas para as membranas 2, 2C, 3, 3C, 4 e 4C até o 60º dia, e apenas a membrana 1 e 1C não apresentaram diferença estatística em relação à reticulação ($p < 0,05$).

Figura 24 – Variação da massa durante a degradação.



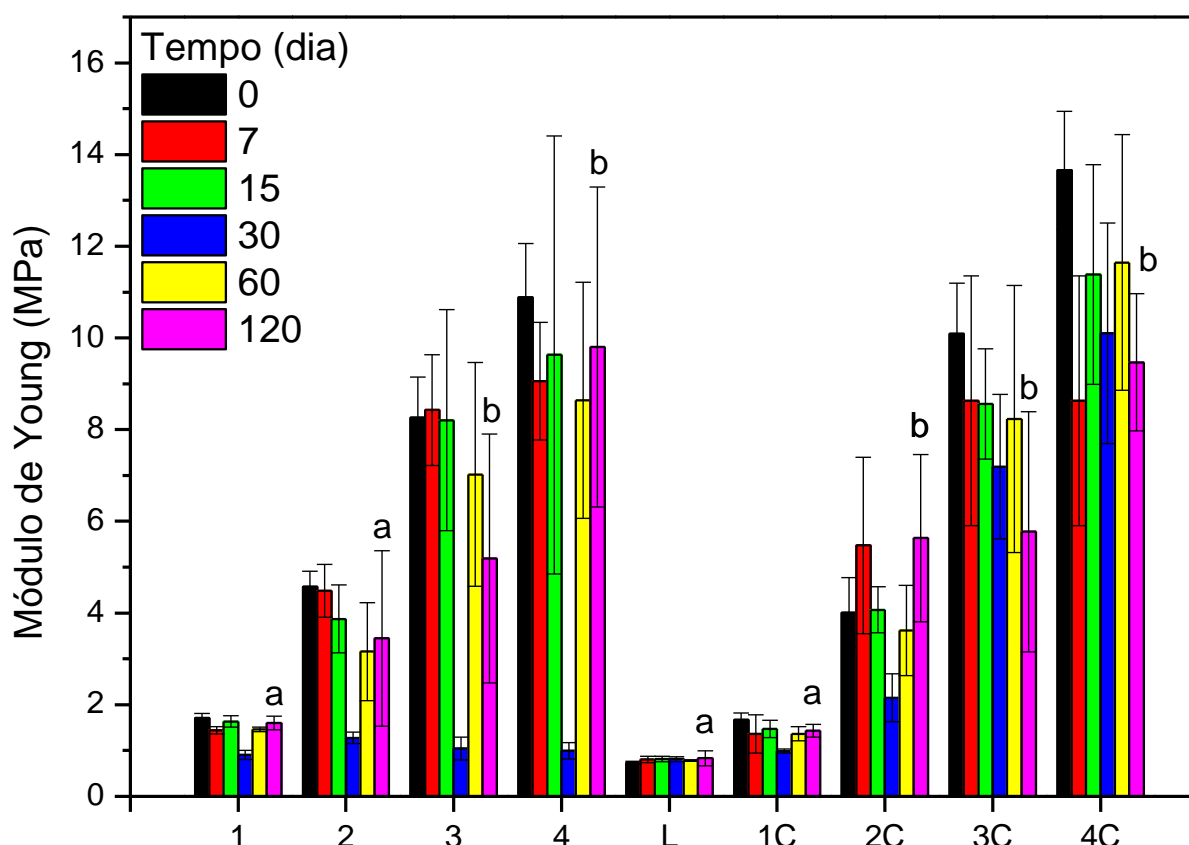
*Médias seguidas de pelo menos um número igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$). **Fonte:** Autoria própria.

Durante a degradação, foi observada a perda de massa das amostras, o que poderia levar a uma consequente perda das propriedades mecânicas. Através das curvas de tensão deformação, foi observado a variação do módulo de elasticidade (módulo de Young), alongamento máximo e tensão de ruptura. O módulo de Young é parâmetro que determina a dureza do material, sendo a tensão máxima suportada sem sofrer deformação permanente.

A Figura 25 mostra a variação do módulo de Young durante a degradação. Não foi observado diferença estatística de redução do módulo de Young ao longo do tempo em nenhuma membrana, talvez pelo grande desvio observado. A comparação entre as membranas foi realizada apenas no tempo de 120 dias, de forma que a membrana

4 apresentou maior módulo de Young que as membranas 1, 2, L e 1C, não apresentando diferença para as demais.

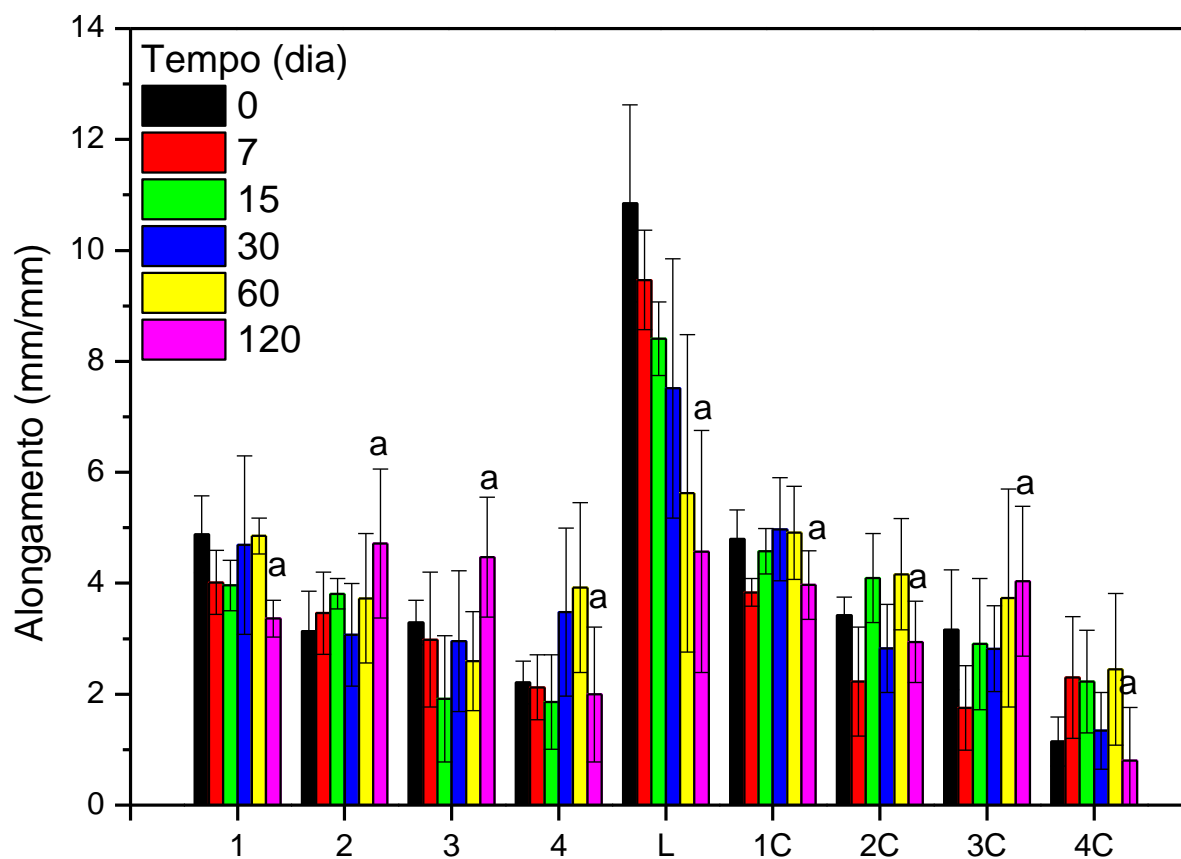
Figura 25 – Variação do módulo de Young nos durante a degradação.



*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$). Fonte: Autoria própria.

A Figura 26 representa a variação do alongamento durante a degradação, embora todas as membranas apresentem a mesma quantia de látex, apenas na membrana de látex apresenta uma tendência de redução do alongamento ao longo do tempo, porém, isso não foi confirmado estatisticamente, assim como nenhuma membrana apresentou diferença estatística ao longo do tempo nem na comparação entre grupos no tempo de 120 dias.

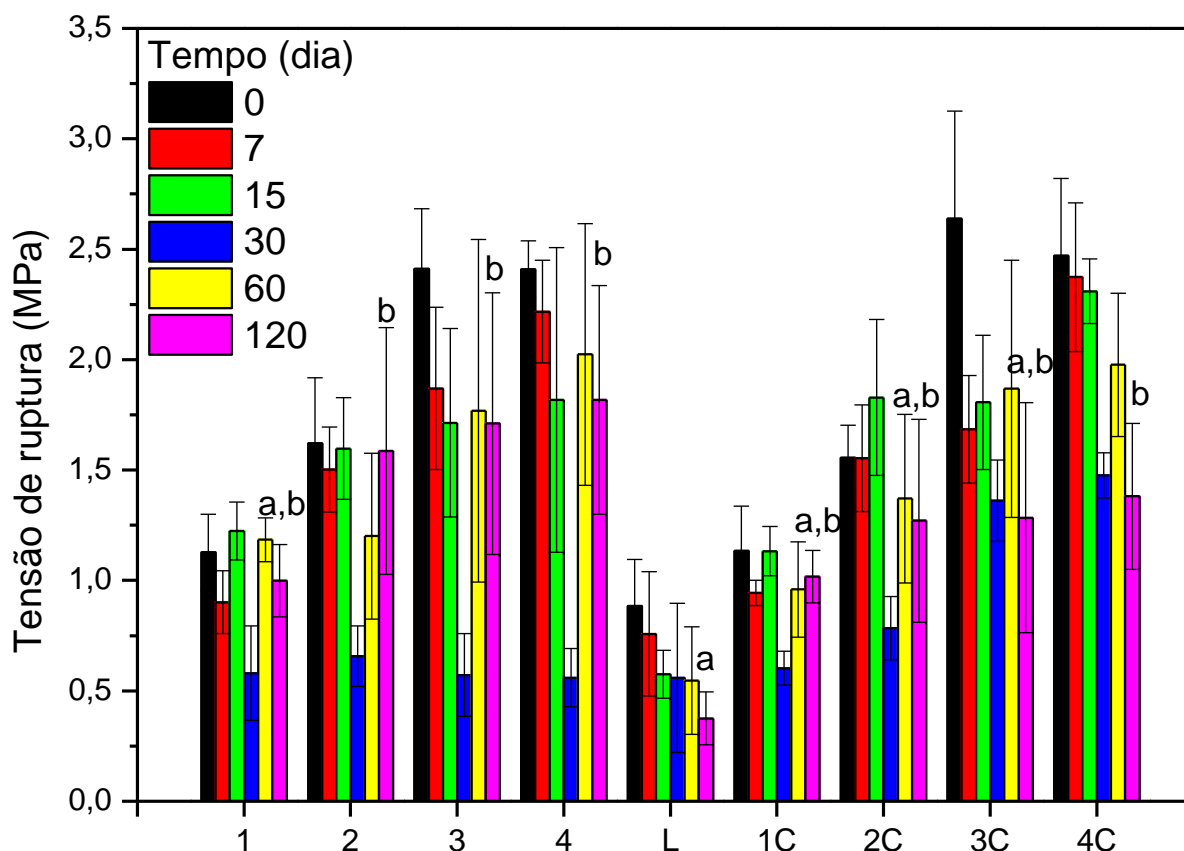
Figura 26 – Variação do alongamento durante a degradação.



*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$). **Fonte:** Autoria própria.

Para a tensão de ruptura representada na Figura 27, apenas a membrana 4C apresentou uma redução na tensão de ruptura ao longo do tempo. Na comparação estatística entre grupos no tempo de 120 dias, apenas a membrana de látex apresentou valor inferior às membranas 2, 3, 4 e 4C.

Figura 27 – Variação da tensão de ruptura durante a degradação.



*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$). Fonte: Autoria própria.

Os valores de resistência mecânica das membranas produzidas estão dentro intervalo encontrado na literatura para regeneração óssea guiada, onde o módulo de Young encontrado variou entre 0,18 MPa para policaprolactona, 1,54 MPa para a caprolactona com sílica e 15,7 MPa para a membrana comercial Bio-Guide. A tensão de ruptura variou entre 1,63 MPa para caprolactona, 8,45 MPa para a caprolactona com sílica, 4,8 MPa para a Bio-Guide e 13 MPa para as membranas comerciais Jason e Collprotect (LEE et al., 2010; ORTOLANI et al., 2015). Ha et al. (2014) compararam a resistência mecânica e a regeneração óssea entre as membranas de seda, colágeno e PTFE, e obtiveram que a membrana de seda apresentava maior propriedade mecânica, assim como maior formação óssea. Esses resultados reforçam a escolha das blendas com melhor resistência mecânica para manutenção do espaço.

O alginato é um polímero hidrofílico solúvel em água, composto por ligações 1-4 de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), no qual os grupos carboxila

do monômero G podem se ligar a cátions polivalentes, formando reticulações e reduzindo sua solubilidade. O que explica o aumento da perda de massa proporcional ao acréscimo de alginato no látex, e a redução da variação com a reticulação com cálcio.

A degradação gravimétrica das membranas parece ocorrer principalmente na primeira semana, também observado na literatura (HUNT et al., 2010; PEREIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2013). Porém, pode-se notar que as membranas reticuladas ainda apresentam maior resistência que as membranas não reticuladas, o que pode ser devido à presença de alginato ainda ligado ao cálcio na membrana. A reticulação aumenta a resistência do material, de forma a reduzir seu intumescimento, permeabilidade ao vapor de água, assim como a degradação (BEKIN et al., 2014; BIERHALZA et al., 2014).

A degradação das membranas é devido à presença do alginato, o qual aumenta a hidrofiliabilidade da blenda, uma vez que a membrana composta apenas por látex apresentou menor perda de massa e nenhuma diferença estatística em suas propriedades mecânicas, mesmo com todas as membranas contendo a mesma quantidade de látex. O látex é composto principalmente por *cis*-1,4-poliisopreno, um polímero hidrofóbico, o que justifica sua baixa perda de massa, provavelmente devido à perda de sais, carboidratos e proteínas também presentes.

Os trabalhos encontrados sobre degradação abordam a fotodegradação, pelo ambiente e por microrganismos. A degradação do látex natural em meio líquido é dependente da luz, recuperando apenas 22% da massa na presença de luz e 97% sem luz (STAMBOULISA; BAILLIE; PEIJS, 2011). A degradação na atmosfera ambiente mostrou reduzir 59% do alongamento em dois meses, contudo, no mar a perda foi de 48% em 12 meses (MOTT; ROLAND, 2001). O que demonstra sua resistência ao meio líquido.

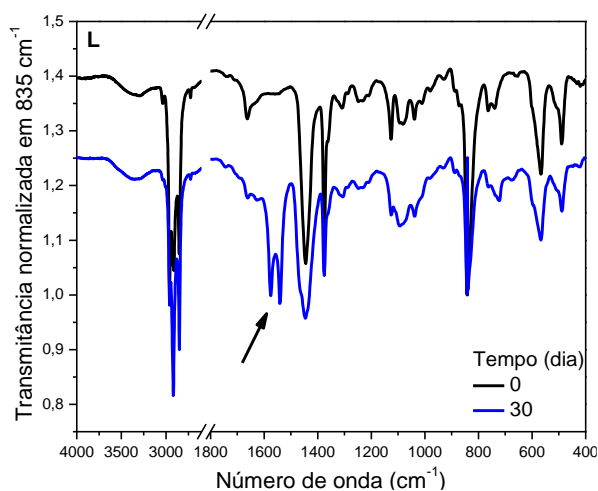
Alterações na estrutura das membranas durante a degradação foram analisadas por FTIR-ATR (Figura 28). As amostras foram normalizadas em 835 cm^{-1} (deformação fora do plano, =CH), uma vez que está presente apenas no látex e é utilizada para análises deste material. A presença de alginato nas membranas foi

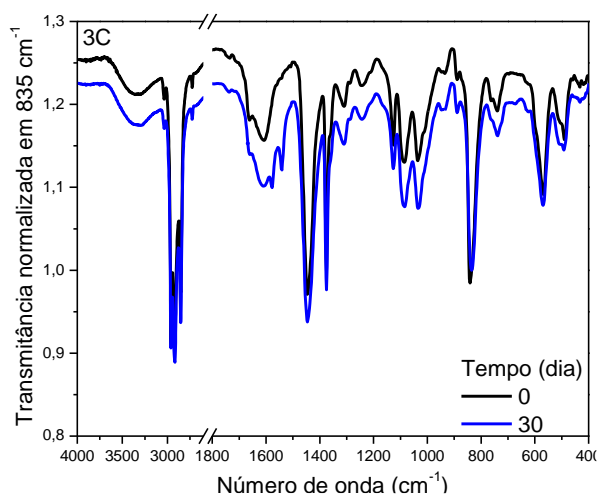
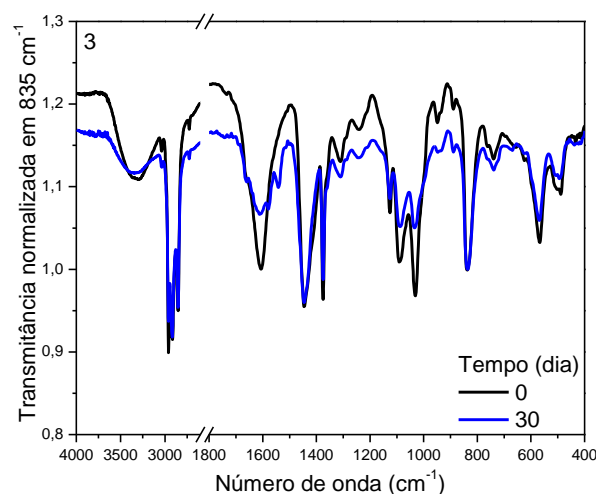
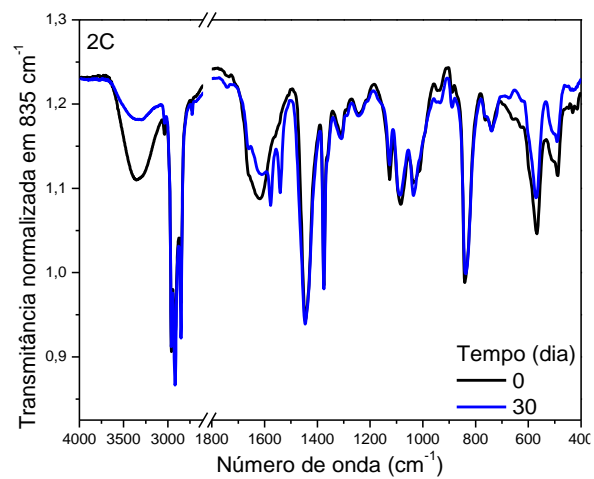
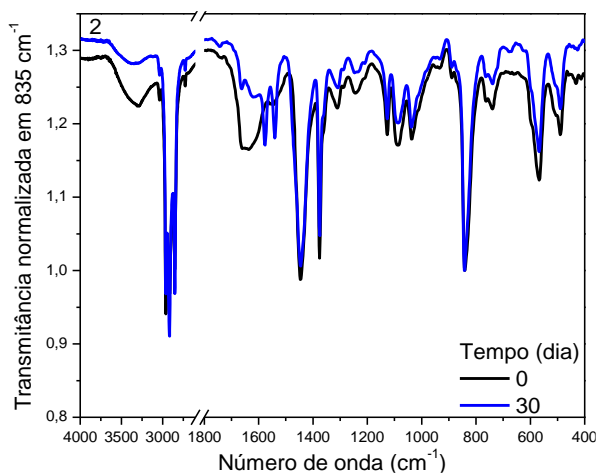
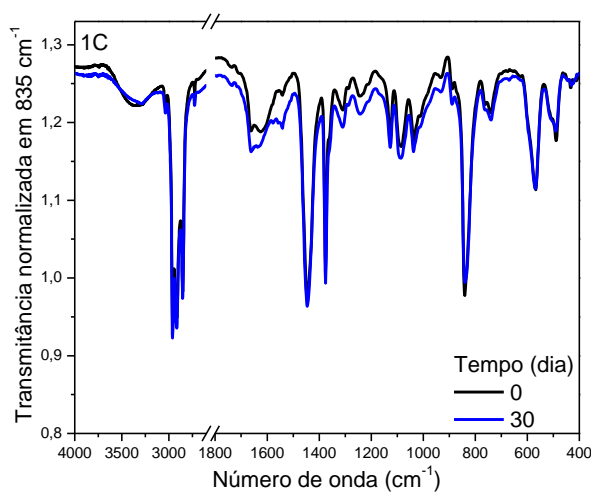
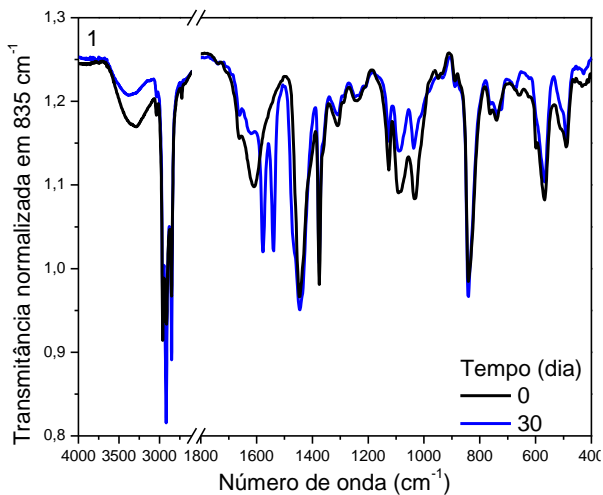
observada na região de 1600 cm^{-1} (estiramento assimétrico de COOH e COO-), região mais sensível à mudança na reticulação com cátions (LAWRIE et al., 2007).

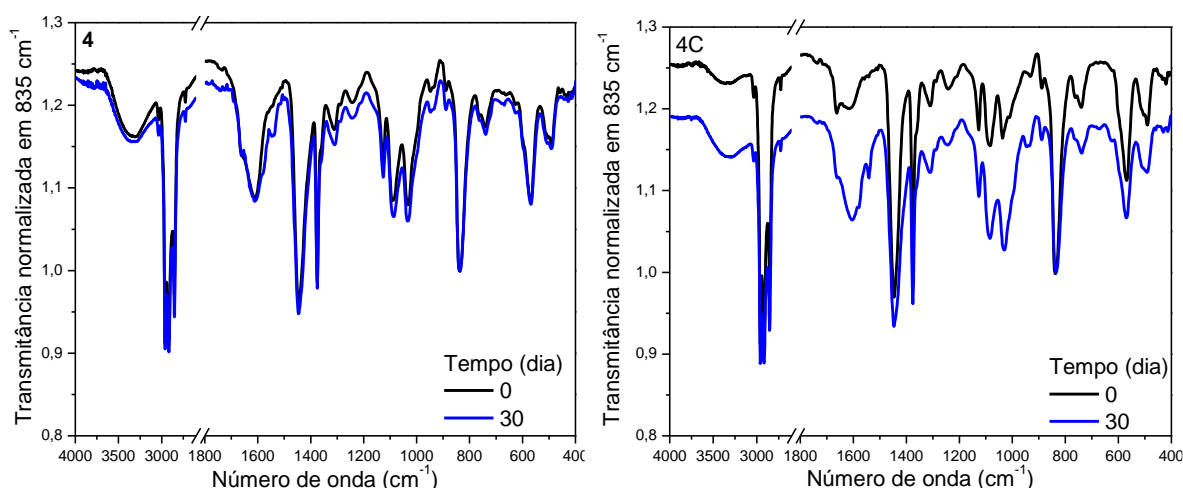
Embora não foi possível observar uma relação entre o tempo de degradação e a alteração na proporção das bandas, as amostras apresentaram alterações no espectro durante a degradação. Em todas as amostras apareceram bandas de intensidade baixa na região entre $1750\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (C=O), região relacionada à oxidação da amostra (LAMBERT et al., 2013; MANIGLIA-FERREIRA et al., 2007).

A alteração mais significativa foi observada na região 1600 cm^{-1} , presente principalmente nas membranas de alginato reticuladas com cálcio degradadas em pH 7,4, embora também está presente na membrana de látex. Esta banda está relacionada a formação de C-O.

Figura 28 – Espectro de FTIR da degradação em c-SBF nos tempos 0 e 30 dias. As amostras foram normalizadas em 835 cm^{-1} . A seta indica a principal região alterada na degradação relacionada à oxidação.







Fonte: Autoria própria.

Foi registrada a degradação do látex natural por actinomicetos, observando uma redução da absorbância em 835 cm^{-1} , aparecimento da banda em 1720 cm^{-1} e um alargamento da banda em 1660 cm^{-1} (LINOS et al., 2000). Na degradação com *Bacillus sp.* foi observado uma redução entre $1400\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ referente à quebra de $\text{C}=\text{C}$, assim como o surgimento de bandas em 1634 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} e 1590 cm^{-1} (SHAH et al., 2013).

Durante o teste de degradação, foi observada a redução da banda relacionada com o alginato em 1600 cm^{-1} , com o aparecimento de bandas em 1539 cm^{-1} , 1576 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} , 1662 cm^{-1} , 1743 cm^{-1} , e em menor intensidade em 1688 cm^{-1} , 1711 cm^{-1} , 1724 cm^{-1} e 1743 cm^{-1} .

Devido à alteração da banda relacionada com o alginato, pode-se inferir que houve degradação do material, uma vez que essa região é sensível à estrutura do grupo carboxilato, ao solvente e ao cátion ligado (PAPAGEORGIU et al., 2010). A banda em 1724 cm^{-1} poderia estar relacionada à formação de ácido algínico, assim como as bandas entre $1560\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ à ligação de diferentes cátions. No entanto, esta hipótese é menos provável, uma vez que também foram observadas no látex. A análise da guta-percha (*trans*-1,4-poliisoprene) extraída de canais dentários sadios também apresentaram o aparecimento de entre $1715\text{-}1737\text{ cm}^{-1}$ relacionadas à oxidação, quando havia contaminação a intensidade da banda era maior. Os autores

também observaram redução da massa molar (MANIGLIA-FERREIRA et al., 2007; SILVA-JR et al., 2006).

4.10 Caracterização *in vitro*

4.10.1 Hemólise

A hemólise é um processo que se define como a ruptura (lise) da membrana celular das hemácias (glóbulos vermelhos do sangue), com a consequente libertação da hemoglobina para o exterior da célula. O efeito hemolítico de um material consiste na capacidade de induzir hemólise por contato com o sangue.

Neste trabalho foi realizado o contato direto das membranas com os eritrócitos. Segundo Andiappan et al. (2013), acima de 5% de hemólise o material é considerado hemolítico. Foi possível observar que nenhuma das amostras apresentou atividade hemolítica (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**Tabela 5) corroborado por outros trabalhos (BORGES et al., 2015; MIRANDA et al., 2017).

Tabela 5 – Hemólise (%) *in vitro* por contato direto.

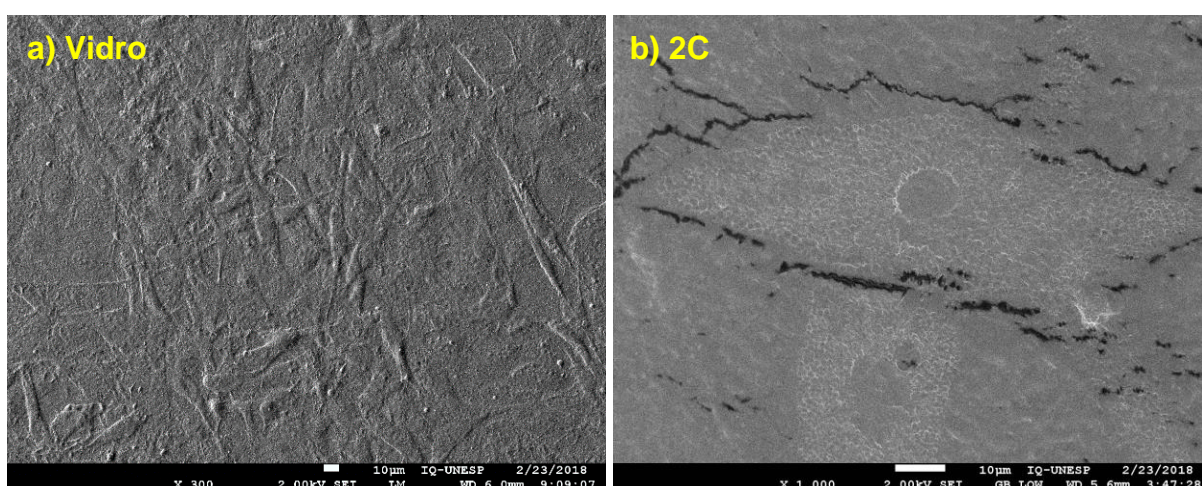
Amostras	Hemólise (%)
L	2,48 ± 1,20
1	3,04 ± 2,46
2	2,82 ± 2,75
3	2,22 ± 1,10
4	1,30 ± 2,28
A	1,30 ± 3,39
1C	0,13 ± 2,45
2C	0,91 ± 1,77
3C	1,04 ± 0,68
4C	1,83 ± 1,72
AC	0,00 ± 2,35

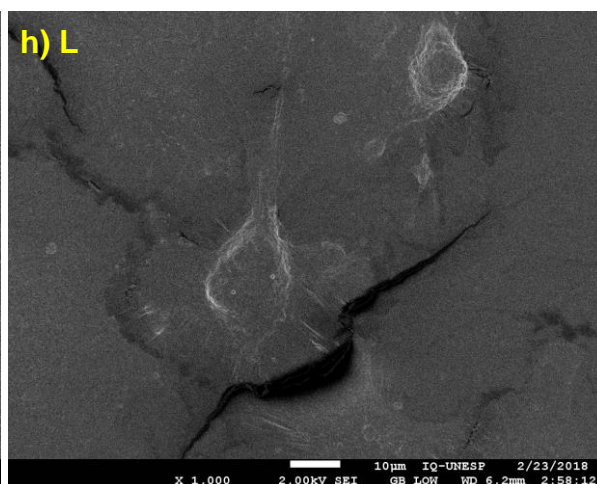
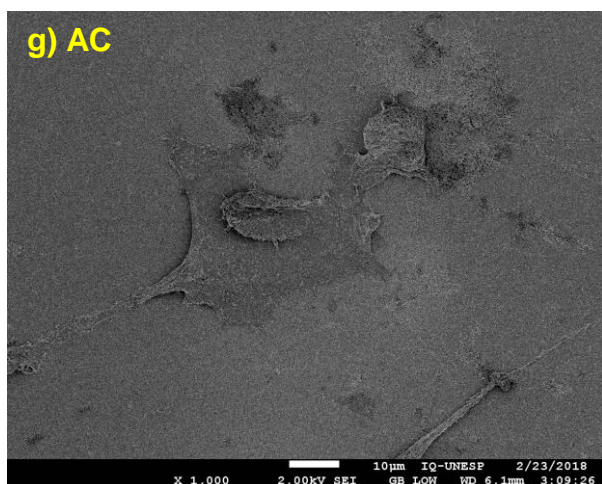
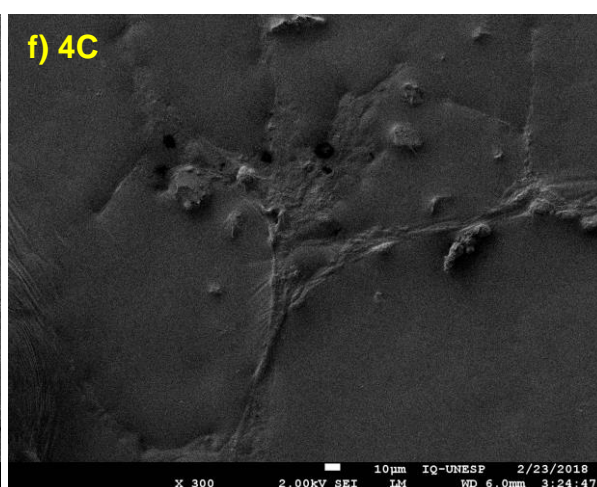
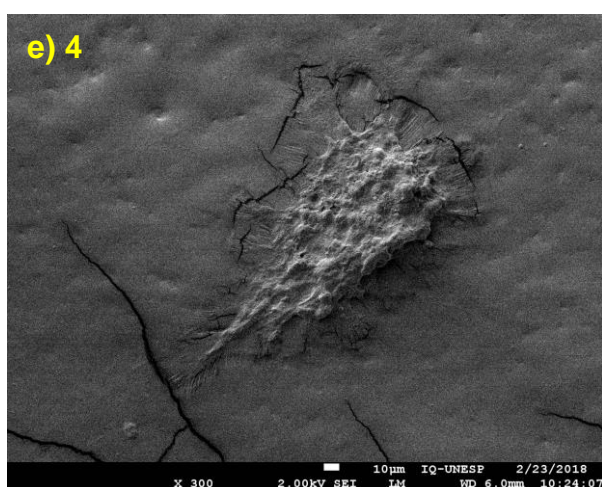
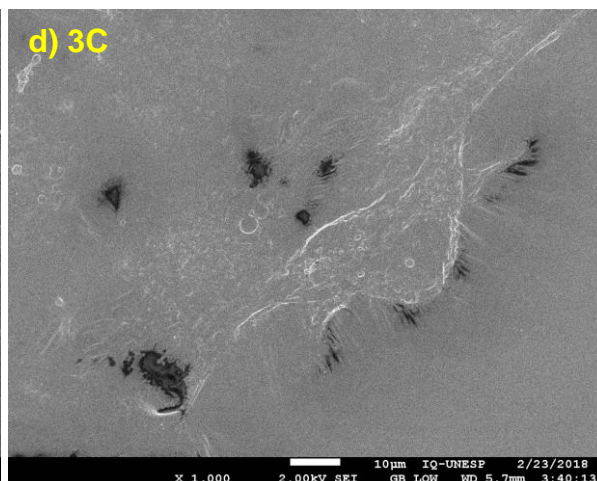
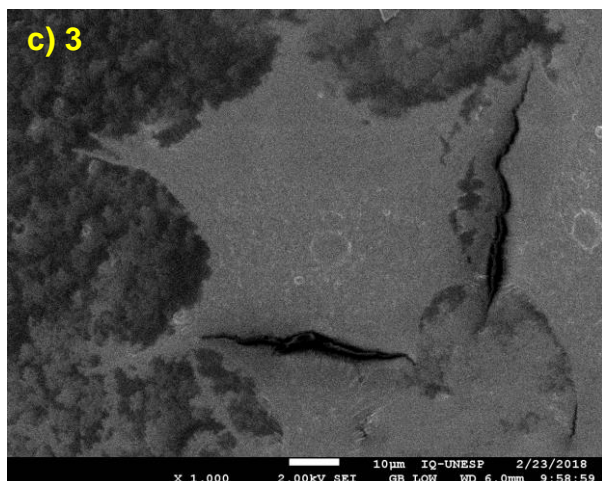
Fonte: Autoria própria.

4.10.2 Adesão e morfologia celular

As células apresentaram pouco contraste de altura em relação ao material (contraste topográfico), provavelmente por estarem bem aderidas, dificultando sua visualização (Figura 29). Não foi possível observar as células nas membranas 1, 1C, 2 nem na de alginato (devido a sua dissolução no meio de cultura). Inclusive, as células aderidas na lamínula de vidro utilizada como controle estão difíceis de visualizar, porém, é possível notar no vidro elas apresentam um formato mais fusiforme, enquanto nas membranas elas apresentam uma morfologia mais expandida. Sabe-se que as células respondem à topografia da superfície, Dalby et al. (2007) observaram que células osteoprogenitoras cultivadas em superfícies lisas apresentaram uma morfologia mais fusiforme além de reduzida produção de marcadores ósseos, embora apresentassem uma boa densidade celular, enquanto que as cultivadas em superfícies com diferentes topografias apresentaram uma menor densidade celular e maior expressão de marcadores ósseos.

Figura 29 – Micrografia por MEV sob diferentes ampliações das células aderidas na superfície das membranas: a) vidro, 300x, b) 2C, 1000x, c) 3, 1000x, d) 3C, 1000x, e) 4, 300x, f) 4C, 300x, g) A, 1000x, h) L, 1000x.





Fonte: Autoria própria.

4.10.3 Proliferação celular

O teste de proliferação foi realizado com as células aderidas à superfície das membranas e analisado utilizando a resazurina. A resazurina é um corante azul, solúvel em água, com baixa fluorescência, que é internalizado pelas células e metabolicamente reduzido a resorufina, que apresenta coloração rosa e grande fluorescência (e, posteriormente para hidrorosorufina, incolor). Devido à baixa toxicidade e a resorufina ser liberado para fora das células, a técnica permite acompanhar a proliferação das células continuamente, uma vez que tem correlação direta com a quantidade de células viáveis (RAMPERSAD et al., 2012).

Embora os resultados foram inconclusivos, uma vez que mesmo na ausência de células, foi possível notar que nas membranas que continham látex ocorreu a redução da resazurina. Como é possível observar na Figura 30, a coluna 5 continha apenas a membrana de alginato, e apresentou a coloração azul da resazurina, enquanto as demais (que continham látex) apresentaram a coloração rosa da resorufina, na ausência de células.

Figura 30 – Proliferação celular por resazurina. Placa controle sem a presença de célula, apenas com as membranas.



Fonte: Autoria própria.

Trabalhos mostraram que algumas substâncias podem reagir com a resazurina. Neufeld et al. (2018) relataram diversas substâncias que podem interferir com a resazurina, como cisteína, ácidos (vitamina C), grupo tiol, entre outros. Csepregi et al. (2018) também notaram a formação de complexos com ciclodextrinas.

A resazurina age como um receptor de elétrons (assim como o MTT), onde seu potencial de redução é +380 mV, de forma que quanto mais positivo, maior a tendência de receber elétrons, como por exemplo de compostos antioxidantes presentes na membrana. Por esse motivo que sua redução não é exclusivamente na mitocôndria, também ocorrendo no citoplasma, de forma a não prejudicar a respiração celular e permitindo avaliar a citotoxicidade mais amplamente. Embora o MTT seja reduzido exclusivamente por enzimas intramitocondriais, seu potencial de redução é de -110 mV, apresentando uma menor tendência de receber elétrons que a resazurina, podendo sofrer menos influência do látex (RAMBERSAD et al., 2012). Desta forma, o experimento foi realizado utilizando o MTT como marcador celular.

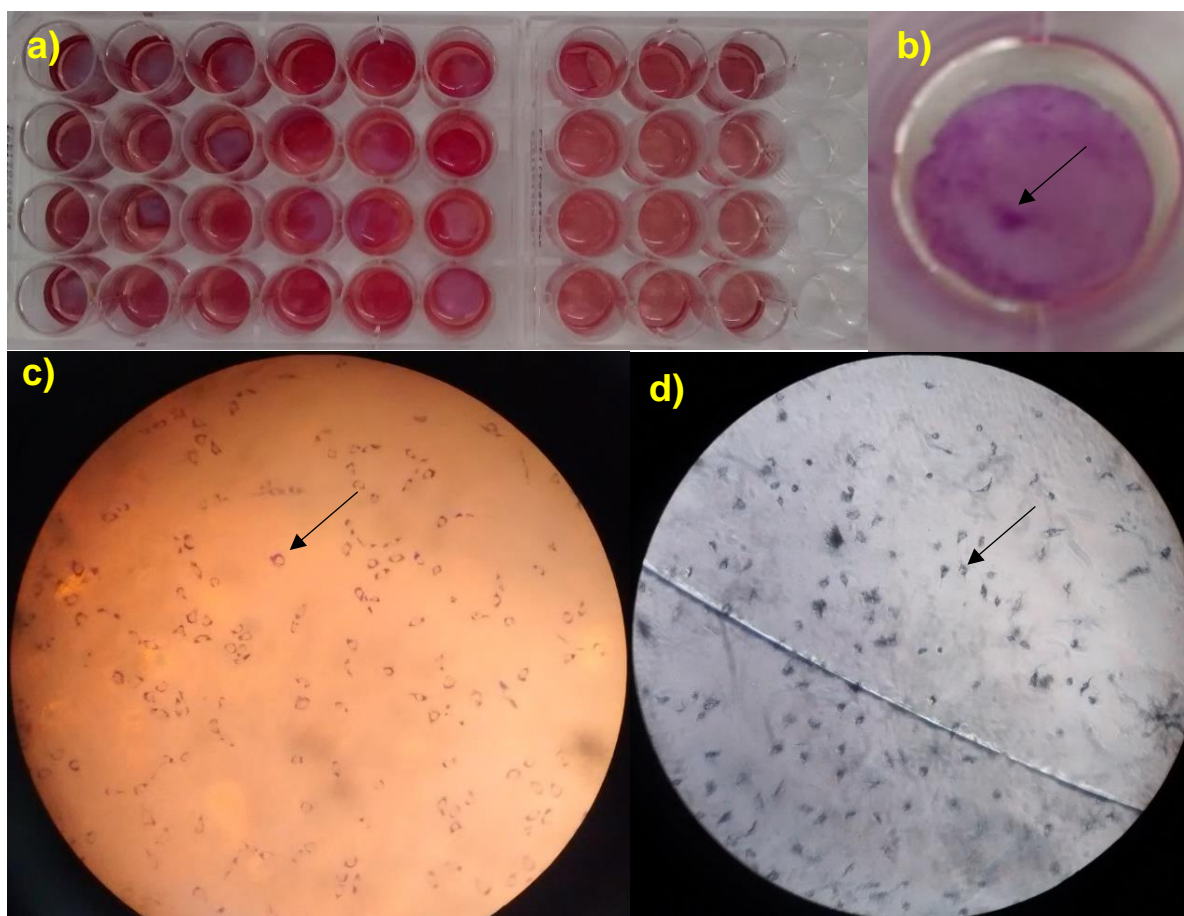
O teste do MTT é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração roxa (formazan), que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983). Porém, Stepanenko e Dmitrenko (2015) resumiram diversas substâncias que podem interferir no teste de MTT, tais como fármacos anticâncer, peptídeos e extratos vegetais que podem causar uma redução direta do MTT, inclusive na ausência de células.

O teste de proliferação foi realizado com as células aderidas na superfície do material, mas os resultados obtidos também foram inconclusivos, pois como pode-se observar (Figura 31), todas as amostras (com exceção das membranas de alginato e alginato de cálcio) apresentaram coradas com os cristais de formazan e os valores de absorvância foram extremamente altos. Como as membranas são elaboradas com o látex natural, é provável que mesmo após seu processamento (centrifugação, secagem, esterilização UV) ainda estejam presentes compostos antioxidantes que causaram a redução do MTT em cristal de formazan. Barros et al. (2018), observaram uma ligeira redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) ao utilizar a

membrana de látex como carreador, sugerindo a presença de atividade antioxidante. Outros autores também observaram a presença de compostos antioxidantes no látex de *H. brasiliensis* (ALTMAN, 1948; SILVA, 2017; ZHANG; LECLERCQ; MONTORO, 2017).

Ainda que se observe as membranas coradas, foi possível observar áreas com coloração mais intensa, e sob maior ampliação (Figura 31.b,c) observam-se pequenos pontos mais escuros na superfície das membranas, indicando a presença das células na sua superfície.

Figura 31 – Análise da adesão celular por MTT: a) visão geral das amostras, b) foco na membrana de látex, c) micrografia da membrana de látex por microscopia óptica (40x), d) micrografia por microscópio óptico (40x) da membrana de alginato com cálcio. A seta indica as células.

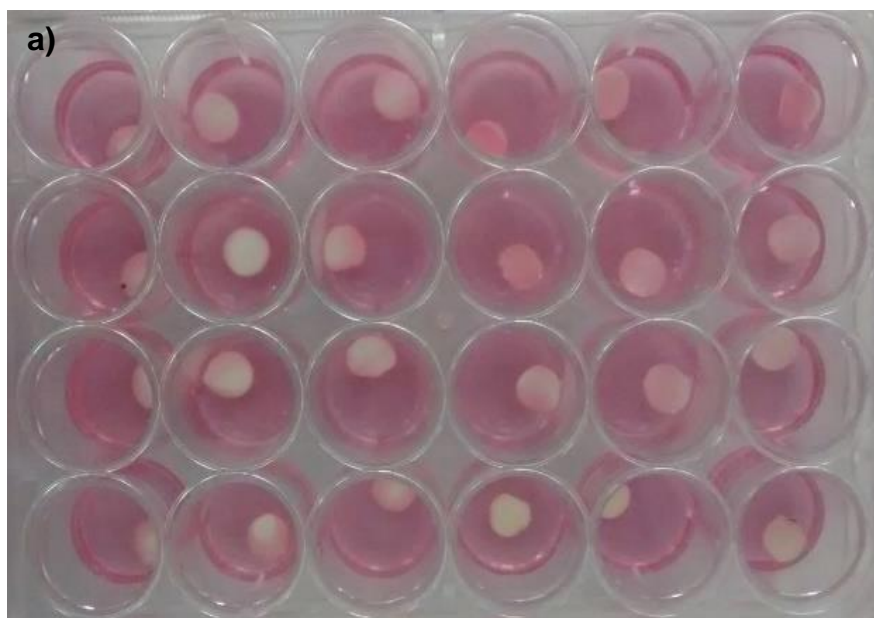


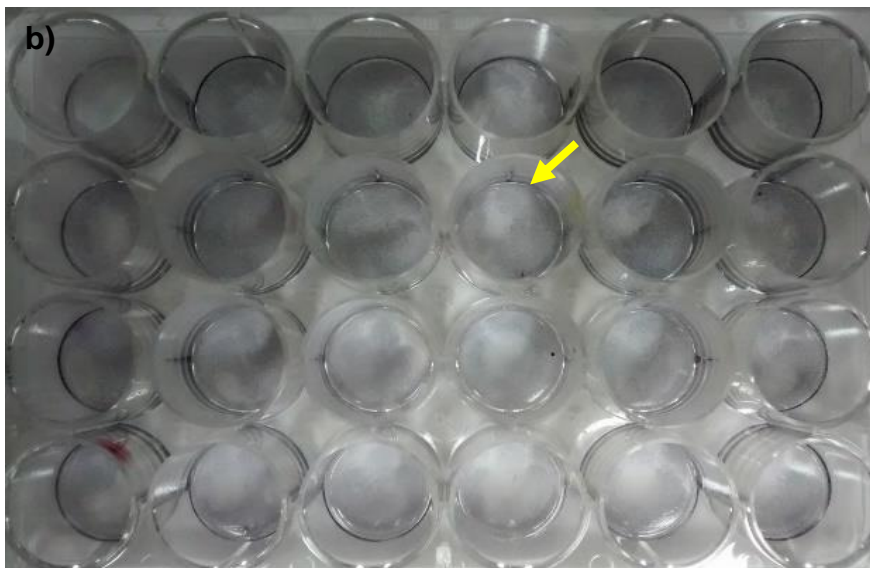
Fonte: Autoria própria.

4.10.4 Citotoxicidade

Para contornar atividade redutora do látex, foi realizado o teste de citotoxicidade de forma a não manter contato entre as membranas e o MTT, conforme descrito na metodologia. O teste foi realizado com as membranas boiando sobre a cultura celular (Figura 32.a), porém, na Figura 32.b pode-se observar que houve um halo na monocamada onde as membranas estiveram presentes.

Figura 32 – Ensaio de citotoxicidade por contato direto: a) representação do teste, b) revelação por MTT, onde nota-se formação de halo de ausência celular. A seta indica o local da formação do halo de ausência celular.



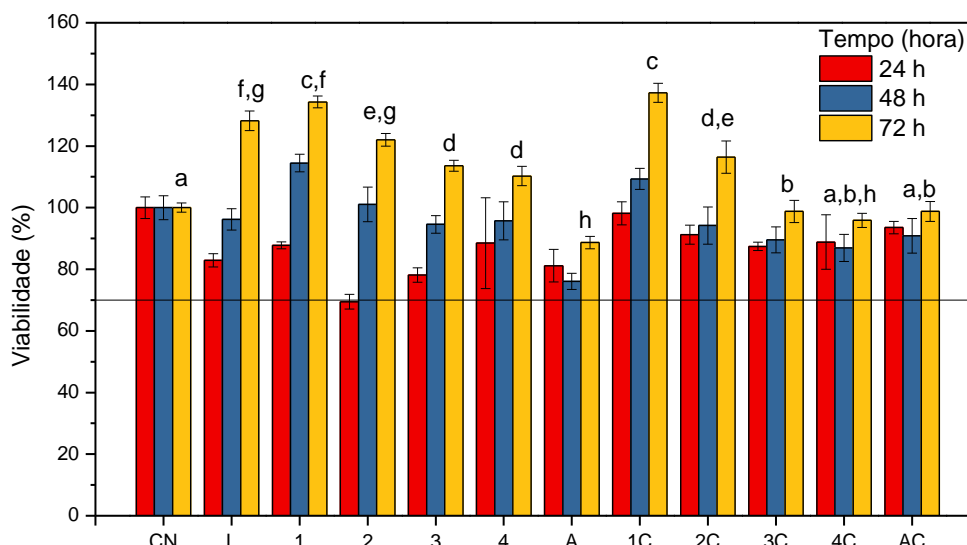


Fonte: Autoria própria.

A norma da ISO 10993 considera como citotóxico quando ocorre a redução de 70% da viabilidade, em relação ao controle, assim todas as amostras foram consideradas biocompatíveis (Figura 33). Pode-se observar que no terceiro dia, as amostras com maior proporção de látex apresentaram maior viabilidade celular e as com maior proporção de alginato apresentaram uma viabilidade menor sem diferença em relação ao controle negativo. Também não houve diferença estatística em relação à reticulação ou não, para cada proporção, com exceção da membrana 3.

Na (Figura 32.b), nota-se um halo de ausência de células, isso pode ser devido à presença de enzimas proteolíticas presentes no látex, que poderiam causar a dissociação as células. Sabe-se que os látex de diversas plantas apresentam compostos com atividade proteolítica (por exemplo, a papaína do látex da papaia *Carica papaya*, também utilizado em cultura celular) (PANCHISION et al., 2007; VOLOVITZ et al., 2016). Lynn e Clevette-Radford (1986) observaram a presença de havaina (serino protease) e Peng et al. (2008) de cisteíno protease no látex de *H. brasiliensis*, e Frade et al. (2004) relataram o debridamento em feridas tratadas com a membrana de látex natural. Resultados preliminares no nosso grupo mostraram que o soro do látex realmente tem a capacidade de dissociar as células, mas ainda permitir seu plaqueamento novamente (MIRANDA, 2018).

Figura 33 – Gráfico da citotoxicidade por contato direto pela técnica de MTT em 24, 48 e 72 horas.



*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$), estatística realizada apenas para 72 h. **Fonte:** Autoria própria.

Compostos à base de látex natural podem apresentar citotoxicidade. Hanson e Lobner (2004) observaram que elásticos ortodônticos apresentaram citotoxicidade em células neuronais, causando a morte das células da mesma maneira que o zinco, sendo que ao usar o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como quelante, esse efeito foi atenuado. Baek et al. (2005) também observaram a citotoxicidade de luvas de látex em fibroblastos utilizando diferentes solventes para extração, e observaram que o meio de cultura com soro fetal, apresentou maior citotoxicidade, por prover a extração tanto de compostos polares quanto apolares.

Porém, nos trabalhos que utilizam o látex como biomaterial não utilizam os vulcanizantes que são usados na indústria, apresentando resultados positivos, semelhantes aos observados nessa pesquisa, inclusive de outras espécies laticíferas. Floriano et al. (2014) compararam a citotoxicidade de diferentes clones e o armazenamento (com e sem amônia) e obtiveram que o uso de amônia causou uma redução da viabilidade, sendo que os clones RRIM 600 e IAN 873 aumentaram a viabilidade celular em aproximadamente 300%.

O látex de outras plantas também tem se mostrado seguro. Ribeiro et al. (2016) observaram que o látex de *Harconia speciosa* é seguro em testes de cito- e genotoxicidade em modelo de raiz de *Allium cepa*. Almeida et al. (2014) também demonstraram que o látex da *H. speciosa* apresentou atividade semelhante ao látex da seringueira, observando angiogênese em teste de CAM (membrana corialantóide de

ovo de galinha *Gallus domesticus*) e biocompatibilidade em fibroblastos observando aumento da viabilidade em cerca de 150% em 72 horas de teste.

O estudo de diversas plantas laticíferas tem mostrado que seus látexes apresentam compostos mitogênicos. Delgado e Paumgarten (2014) observaram que o látex da planta coroa-de-cristo (*Euphorbia milii*) apresentou aumento na proliferação celular de linfócitos humanos, possivelmente devido à presença de ésteres de forbol ou de lecitinas. Gomes et al. (2005) reportaram que duas cisteíno proteases presentes no látex de *Carica candamarcensis* estimularam a proliferação de fibroblastos e células epiteliais em até 60%, sendo a primeira protease com ação na via MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos).

Embora não tenha encontrado estudos relacionando proteases do látex da seringueira, Jin et al. (2017) encontraram a expressão de MAPK no látex da *H. brasiliensis*. Recentemente Yodthong et al. (2018) reportaram que o L-quebrachitol (encontrado principalmente no soro do látex da seringueira) promoveu a proliferação e diferenciação celular de MC3T3 (com regulação da rota de MAPK) e mineralização (ativando a expressão de marcadores ósseos relacionados à mineralização), indicando ação na osteoblastogênese. Estas pesquisas estão de acordo com Furuya et al. (2017) que utilizaram nanopartículas de látex com hidroxiapatita e Borges et al. (2017) que utilizaram membranas de látex para adesão celular, em que ambos trabalhos também utilizaram a linhagem MC3T3 e observaram a diferenciação e mineralização das células ósseas.

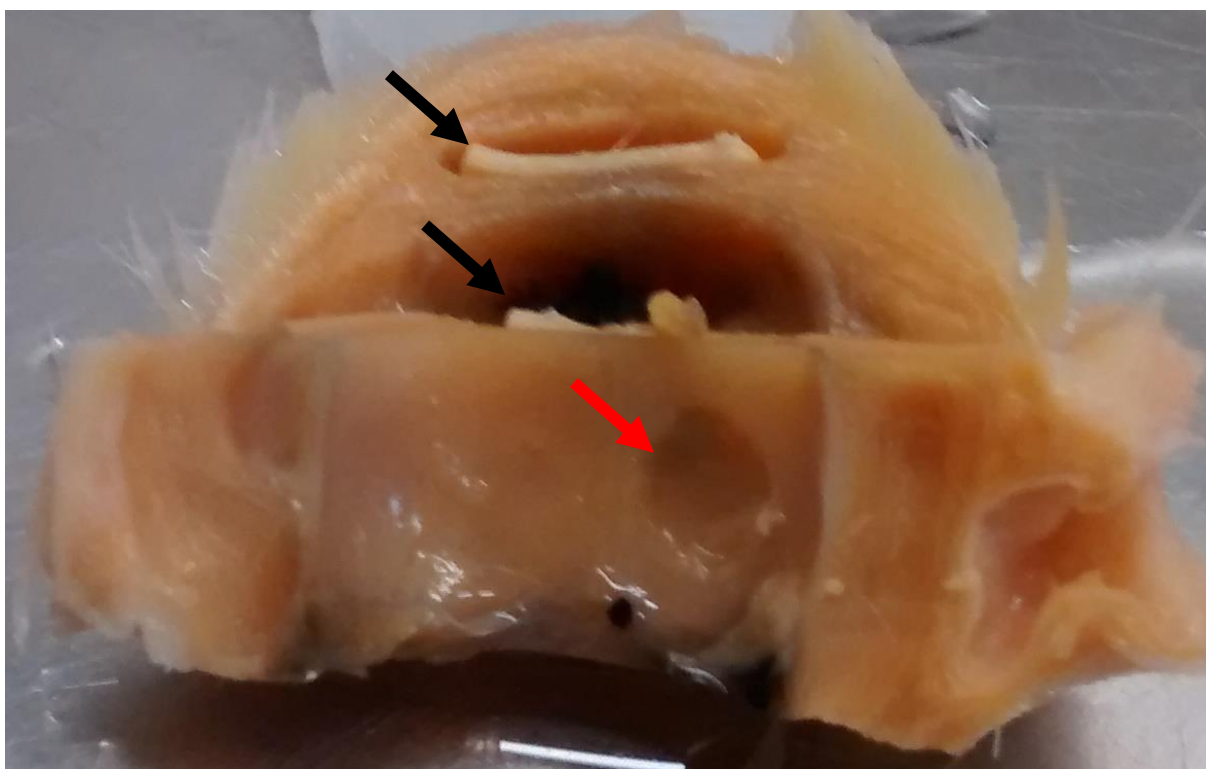
Os dados corroboram com os resultados da literatura, onde embora tenha sido encontrado efeito dissociativo na monocamada celular, não foi encontrado efeito citotóxico nas condições experimentais, mas sim um aumento na viabilidade celular.

4.11 Aplicação *in vivo* em modelo de defeito de calvária

A membrana selecionada para o experimento foi a membrana 4, pois segundo os resultados ela apresentou a maior taxa de degradação *in vitro*, melhor resistência

mecânica após o teste de degradação, sem efeito hemolítico nem citotóxico, com viabilidade celular semelhante ao controle. Nenhum animal faleceu durante o experimento, nem apresentou alteração comportamental ou alimentar. Também não foi observado deslocamento da membrana (Figura 34).

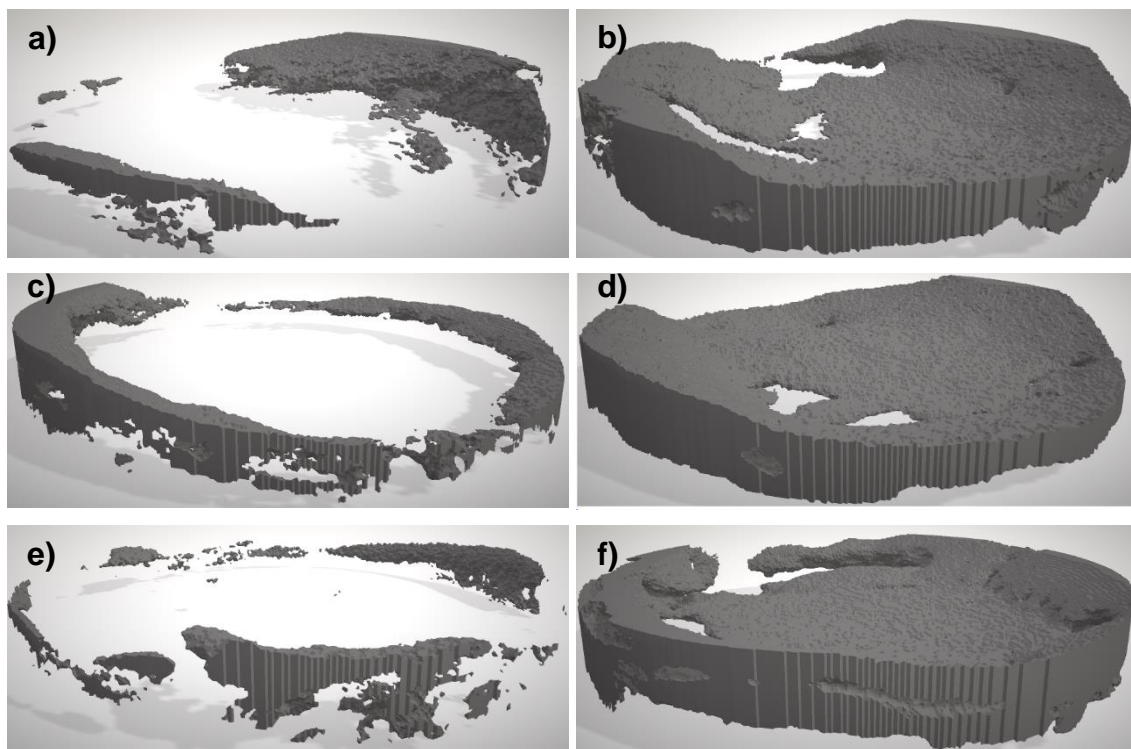
Figura 34 – Redução dos espécimes, parte superior do crânio onde foi realizada a cirurgia. Seta vermelha indica a área do defeito crítico, setas pretas indicam a presença da membrana.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 35 mostra a reconstrução apenas da região do defeito, onde é possível observar que a regeneração ocorreu da periferia para o centro, apresentando a forma de bisel, o que é esperado nesse modelo. Embora não se observou diferença estatística na regeneração óssea, notou-se que nos grupos de 60 dias em que foi empregado o PDGF-BB, foi maior a frequência dos defeitos em que permaneceram abertos no centro, apesar de que isso foi observado em todos os grupos, uma vez que é o que se caracteriza por defeito crítico. Nenhum animal faleceu durante o experimento.

Figura 35 – Reconstrução representativa da regeneração óssea por MicroCT: a) controle, 15 dias, b) controle, 60 dias, c) membrana, 15 dias, d) membrana, 60 dias, e) membrana+PDGF, 15 dias, f) membrana+PDGF, 60 dias.



Fonte: Autoria própria.

As imagens 3D foram reconstituídas para cada amostra e os seguintes parâmetros morfométricos foram obtidos:

- volume do tecido ósseo (BV, em mm^3): quantidade de tecido mineralizado presente no interior do defeito;

- área de superfície óssea (BS, em mm^2): área total da superfície do tecido mineralizado;

- porcentagem de tecido ósseo (BV/TV, em %): também chamado de densidade de volume ósseo, indica o volume de osso dentro do volume de tecido analisado. É razão do volume de tecido mineralizado (BV) pelo total do volume analisado (TV, também chamado de VOI). Também chamado de densidade de volume;

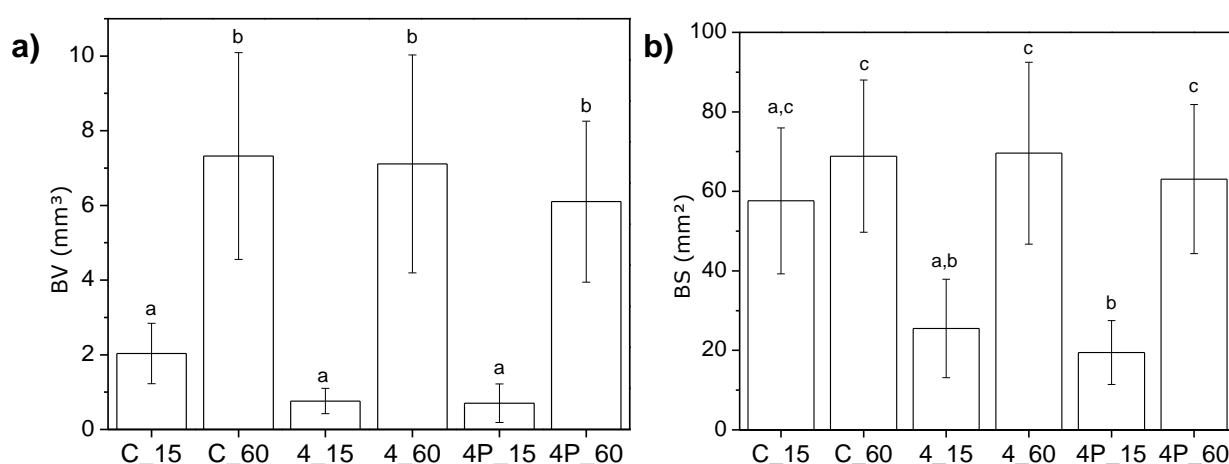
- superfície óssea específica (BS/BV, em mm^{-1}): proporção entre superfície e volume ósseos dentro do TV. É um parâmetro para caracterizar a espessura e complexidade de estruturas;

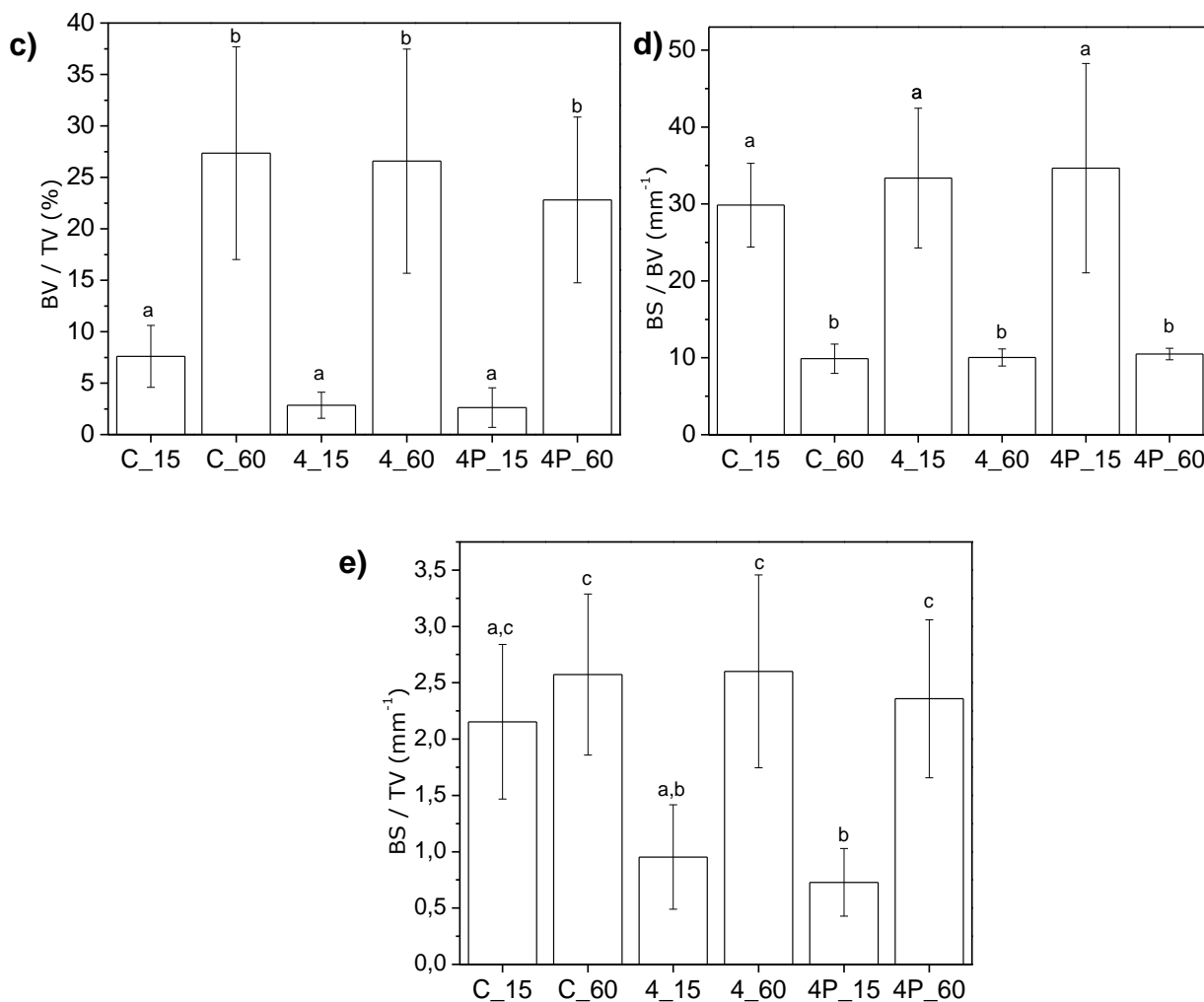
- densidade de superfície óssea (BS/TV): razão da área total da superfície óssea (BS) pelo volume total analisado (TV).

A membrana aplicada nesse trabalho é inédita, sendo uma blenda entre o alginato e o látex natural (com e sem o fator de crescimento PDGF-BB), mesmo com a utilização isolada dos materiais, foram encontrados diversos resultados contraditórios na literatura, sendo que os materiais utilizados neste trabalho não apresentaram diferença estatística em relação ao controle (Figura 36).

É possível observar que todos os grupos apresentaram crescimento ósseo, com diferença estatística entre 15 e 60 dias de regeneração, porém, de maneira geral, sem diferença estatística entre os grupos em 15 nem em 60 dias, mostrando que pela análise por microCT, nem a membrana ou a membrana+PDGB-BB promoveram alteração na regeneração óssea.

Figura 36 – Parâmetros morfométricos obtidos pelo MicroCT: a) BV, b) BS, c) BV/TV, d) BS/BV, e) BS/TV.





*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$). **Fonte:** Autoria própria.

O PDGF-BB influencia a regeneração óssea, atraindo e estimulando a proliferação de células progenitoras (MASTROCINQUE et al., 2004; MILLIS, 1999), sendo quimiotático para monócitos, neutrófilos e fibroblastos e estimula a proliferação e atividade de células ósseas (MARDEN et al., 1993). Entretanto, os resultados deste trabalho não apresentaram influência do PDGF-BB sobre a regeneração óssea. Alguns trabalhos também observaram desde a falta de influência do fator de crescimento como também influência negativa. Rosário et al. (2015) aplicaram 250 ng em defeito crítico de calvária e observaram que quando aplicado com o fator de crescimento BMP-2, o PDGF-BB teve efeito antagonista, reduzindo sua atividade de forma dose-dependente, e quando aplicado sozinho não teve diferença em relação ao controle. Marden et al. (1993) também observaram o efeito negativo de forma dose-dependente do PDGF-BB em relação ao fator de crescimento osteogênico.

O alginato também foi utilizado para regeneração óssea com resultados positivos (ISHIKAWA et al.,1999). Porém, no atual trabalho ele foi utilizado na forma de uma blenda com o látex natural e não teve diferença na regeneração óssea em relação ao controle. Jo et al. (2017) também não observaram diferença entre o controle e a blenda de alginato com fibroína. Sua falta de sítios receptores para adesão celular e capacidade de adsorção de proteínas também podem comprometer sua eficiência. Segundo Ueyama et al. (2002), o defeito crítico regenerou completamente com a aplicação da membrana de alginato, contudo observaram um atraso na regeneração óssea. Ueyama et al. (2006) realizaram a reticulação durante a aplicação do alginato, reportando que ele funcionou como barreira oclusiva, entretanto prejudicou a regeneração óssea por ser muito grosso.

O látex natural tem apresentado diversos resultados positivos na regeneração óssea guiada, promovendo maior deposição óssea, além de estar relacionado com atividade angiogênica. No entanto, Arnez et al. (2012) não encontraram benefício na regeneração óssea ao utilizar a fração proteica angiogênica do látex natural.

Uma possível justificativa para não ter ocorrido melhora na regeneração óssea pode ser devido à alta degradação do material, que poderia causar porosidade na membrana possibilitando infiltração de células não osteogênicas e comprometendo sua função de oclusão, assim como à falha em promover estrutura, colabando no defeito.

Outra possibilidade seria relacionada ao PDGF. Sob condições fisiológicas o PDGF atua principalmente na fase inicial de regeneração óssea, e sua permanência nas fases posteriores podem prejudicar a regeneração. Uma comparação da literatura mostrou que os trabalhos em que o PDGF apresentou liberação prolongada não houve uma regeneração satisfatória. Lee et al. (2001) e Delgado et al. (2012) observaram uma rápida liberação utilizando a quitosana e poli ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA) respectivamente, obtendo um aumento da regeneração óssea. Kaipel et al. (2012) utilizaram matriz de fibrina, ocorrendo a liberação do PDGF por aproximadamente 14 dias, e Lu et al. (2007) observaram a liberação por até 21 dias utilizando capsulas de alginato, sendo que ambos observaram prejuízo no reparo ósseo. Como os materiais utilizados na membrana são aniônicos e o PDGF ser catiônico, pode ter ocorrido uma interação com a membrana, impedindo sua liberação

ou ainda ter prolongado sua permanência no defeito. A liberação rápida obtida por Lee et al. (2001) pode ser devido à natureza catiônica da quitosana. Segundo Lu et al. (2007), a liberação prolongada do PDGF pelo alginato pode ser devido a sua ligação à matriz polimérica, enquanto a reticulação com cálcio poderia reduzir os domínios de ligação.

Segundo a literatura, a aplicação isolada dos materiais utilizados nesta pesquisa apresentou resultados controversos, desde o estímulo até o atraso da regeneração óssea. Porém, neste trabalho não obtivemos diferença em relação ao controle para ambas as membranas (com e sem o fator de crescimento).

5 CONCLUSÃO

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

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

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

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

6 PERSPECTIVAS

Como proposta para estudos futuros, seria interessante a realização de outras análises a fim de complementar os resultados obtidos, tais como:

- realização da liberação *in vitro* do fator de crescimento a fim de avaliar se ele fica retido na membrana ou ocorre liberação, e por quanto tempo, uma vez que a literatura citada mostrou influenciar os resultados *in vivo*;

- avaliar a atividade cicatrizante da liberação em modelo *in vitro* de ferida com osteoblastos (scratch test), no qual avalia a proliferação ou migração das células ósseas quando realizado uma falha na monocamada celular aderida à placa de cultura. Este ensaio foi aprendido quando realizei um curso pelo CBAB (Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia) em agosto de 2018;

- avaliação histológica, para poder comparar a qualidade do osso formado, angiogênese, infiltrado celular e fibras colágenas. Devido ao tempo demandado para a histologia de tecido ósseo, não foi possível a realização neste projeto. Contudo, as amostras já estão em processamento para histologia (picrossirius, tricrômico de Masson e hematoxilina e eosina);

- avaliação *in vivo* por corantes fluorescentes vitais, para observar a taxa de aposição óssea. Como pôde ser visto, fez parte da metodologia a administração dos corantes, uma vez que não prejudicam o experimento. Porém essa análise requer corte de amostra mineralizada, e os materiais de consumo tinham um custo que fugia do orçamento deste projeto, sendo postergado para análises futuras.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

UM, I. C.; PARK, Y. H. The effect of casting solvent on the structural characteristics and miscibility of regenerated silk fibroin/Poly(vinyl alcohol) blends. **Fiber Polym.**, v. 8, n. 6, 2007.10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética.



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



Parecer nº 06/2018 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 18 de abril de 2018, analisou e aprovou o pedido de prorrogação por um ano do relatório final do Protocolo CEUA nº 025/2015 para uso de animais na pesquisa "Látex/alginato de sódio: desenvolvimento de uma nova blenda polimérica com fator de crescimento (PDGF-BB) para regeneração óssea guiada", apresentado pelo Pesquisador Felipe Azevedo Borges.

Portanto, o relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MARÇO de 2019, em formulário para este fim.

Araraquara, 18 de abril de 2018.

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA
Coordenadora da CEUA

