

UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

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

Matheus Carlos Romeiro Miranda

Tese de doutorado

2018

MATHEUS CARLOS ROMEIRO MIRANDA

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

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

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

**Araraquara
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: MATHEUS CARLOS ROMEIRO MIRANDA

ORIENTADOR: RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

COORIENTADOR: RICARDO JOSÉ MENDONÇA

COORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

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



Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

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



Profa. Dra. ANA MARIA MINARELLI GASPAR

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



Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

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



Prof. Dr. ANTONIO CARLOS SHIMANO

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



Profa. Dra. CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA

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

Araraquara, 27 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES

Matheus Carlos Romeiro Miranda

Formação acadêmica/titulação

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

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

Publicações

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Artigos aceitos para publicação

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

Trabalhos publicados em anais de eventos

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

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

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

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

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

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

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

Patentes

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

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

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

Prêmios e títulos

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

Supervisão acadêmica

Iniciação científica

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

Participação em banca de comissões julgadoras

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

Dedicatória

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

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

À minha irmã Danielle por me defender sempre.

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À CAPES pela bolsa.

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

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURA

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

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

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

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

LISTA DE EQUAÇÕES

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

ATR- Refletância Total Atenuada

α -TCP- Alfa tricálcico

CPP- Pirofosfato de cálcio

BMP- 2- Proteínas Morfogénéticas Ósseas 2

DO- Densidade Óptica

DMSO- Dimetilsulfóxido

DRX- Difração de Raios-X

FTIR- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

HA- Hidroxiapatita

hpf- horas pós-fertilização

ICDD- International Centre for Diffraction Data

ISO- International Organization for Standardization

LN- Látex Natural

LMA- Laboratório de Microscopia Avançada

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

MFA- Microscopia de Força Atômica

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

OECD- Organisation for Economic Cooperation and Development

OGP- Osteogenic Growth Peptide

PEG- Polietilenoglicol

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

PBS- Phosphate-Buffered saline

SLS- Sistema de Liberação Sustentada

SUS- Sistema Único de Saúde

TG- Termogravimétrica

ZEFT- Embryo Acute Toxicity Test,

Outros significados:

MC3T3- Linhagem de pré-osteoblasto de ratos

Scaffold: Suporte para liberação sustentada

SUMÁRIO

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. Problemática

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

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

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

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

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

1.2. Tecido ósseo e reparação óssea

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

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

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

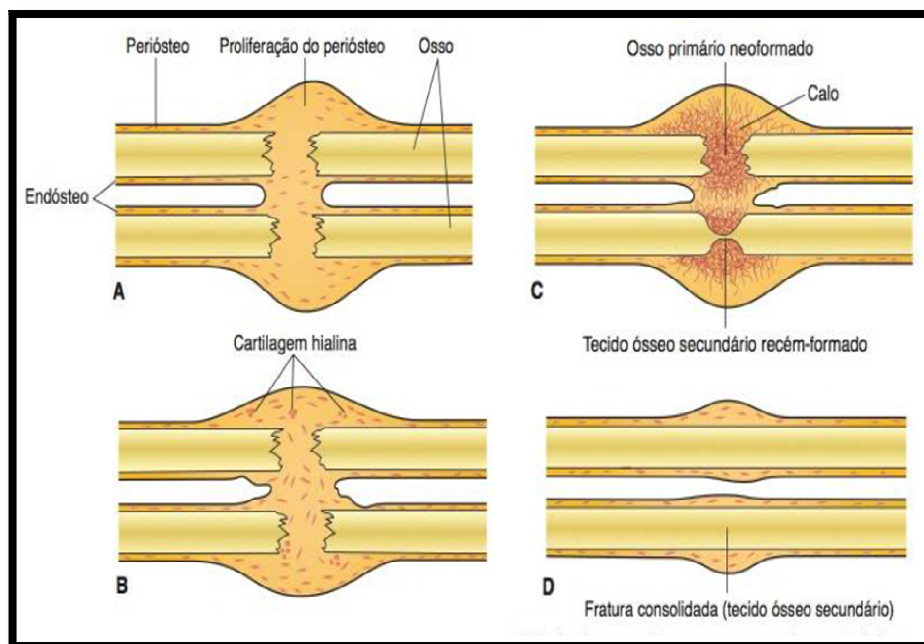
As células ósseas estão envolvidas nos processos de osteogênese, manutenção e remodelação óssea. Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I e V, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea, sendo, portanto, as células responsáveis pela expressão gênica dessas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

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

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

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

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



Fonte: (Junqueira e Carneiro, 2008)

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

1.3. Biomateriais

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

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

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

1.3.1. Histórico dos biomateriais

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

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



Fonte: (G1,2012)

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

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

1.3.2. Impacto econômico dos biomateriais

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

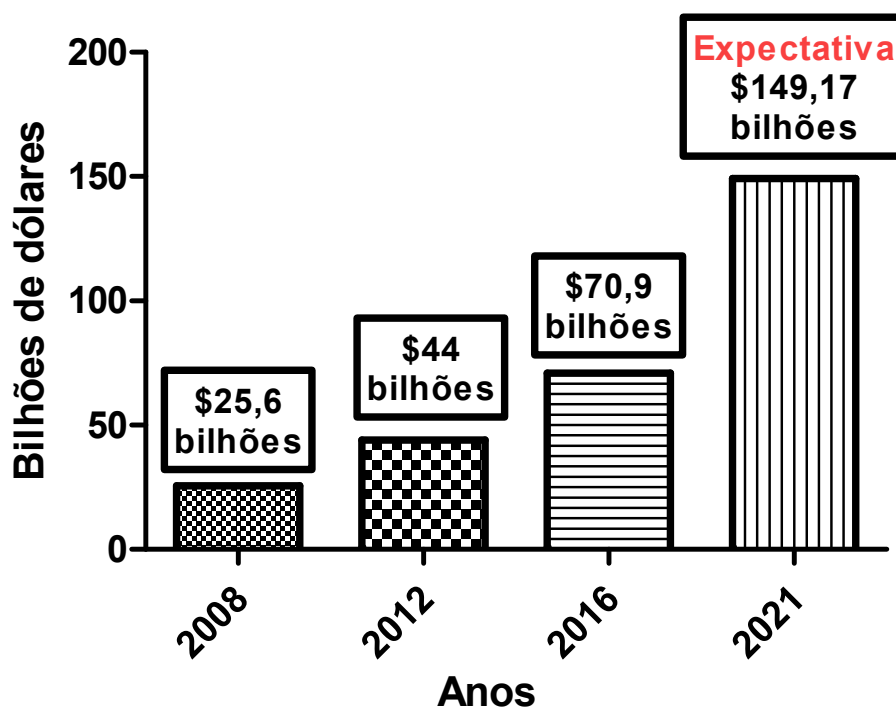


Figura 3. Gráfico com os valores movimentados pelo mercado de biomateriais entre os anos de 2008 e 2016 e previsão de aumento em 2021(MARKETS AND MARKETS, 2016).

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

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

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

1.4. Scaffolds para reparo ósseo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5. Fosfato de Cálcio

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

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

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

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

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

1.6. Látex natural (LN)

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

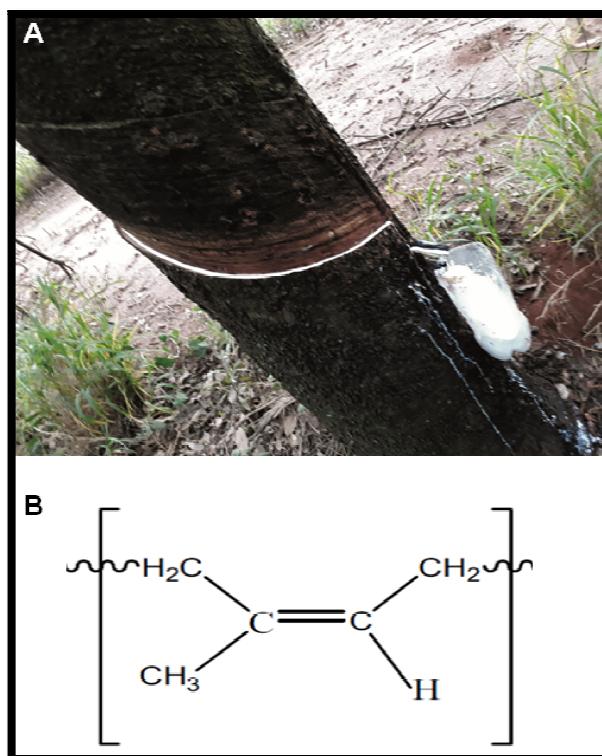


Figura 4. .A) *Hevea brasiliensis*, B) Monômero de cis-poliisopreno.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

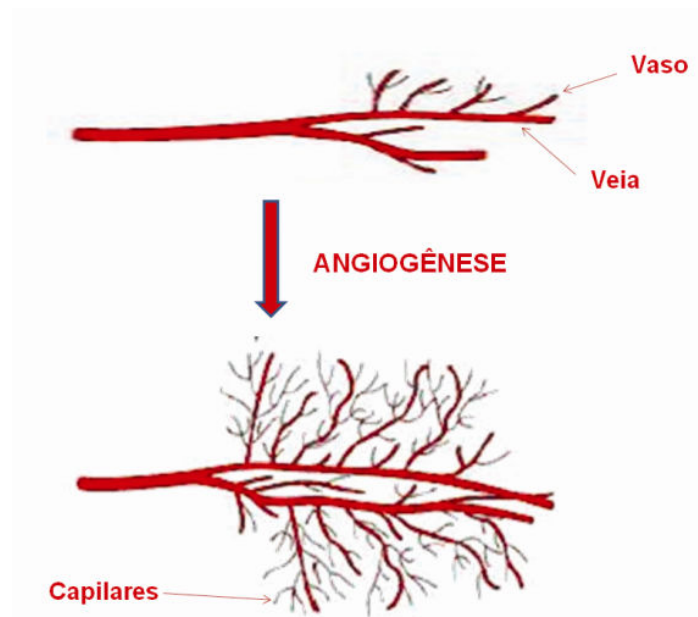
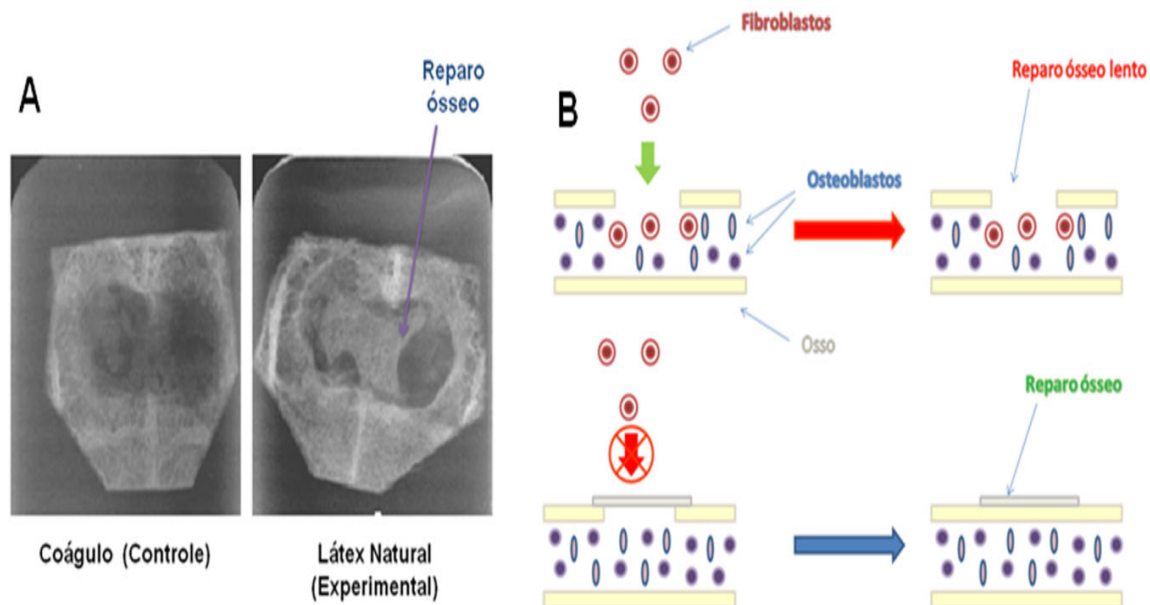


Figura 5. Demonstração do aparecimento de novos capilares pelo processo de angiogênese (Yoo e Kwon, 2013).

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



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

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

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

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

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

Tabela 1. Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio

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

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

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar a influência de diferentes tipos de fases de fosfato de cálcio sintetizadas pelo método sol-gel (CPP, HA e α -TCP) na liberação sustentada utilizando a membrana de LN como carreador. Além disso, desenvolver um compósito biocerâmica-membrana biocompatível que estimule a reparação óssea com eficácia e eficiência.

2.2. Objetivos específicos

- Síntese das fases dos fosfatos de cálcio (CPP, HA e α -TCP) através do método sol-gel e tratamento térmico;
- Caracterização físico-química das fases de fosfato de cálcio obtidas pelas seguintes técnicas: Difração de Raios-X (DRX), Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) e a Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo associada à técnica de energia dispersiva de raio-X (MEV-FEG/EDS);
- Confecção das membranas de látex natural incorporadas com CPP, HA e α -TCP;
- Caracterização físico-química das membranas de látex incorporadas com CPP, HA e α -TCP pelas técnicas de MEV-FEG/EDS, Microscopia de Força Atômica (MFA), Análise Termogravimétrica (TG), FT-IR, DRX, Ângulo de Contato, Análise de intumescimento e Ensaio de Resistência;
- Caracterizar a taxa de liberação de CPP, HA e α -TCP utilizando-se a técnica de espectrofotometria ótica;
- Avaliar a taxa de atividade hemolítica das membranas incorporadas com as fases de fosfato de cálcio;
- Avaliar a adesão das células MC3T3 (pré-osteoblastos) nas superfícies das membranas incorporadas com as fases de fosfato de cálcio;
- Avaliar a toxicidade das membranas incorporadas com as fases de fosfato de cálcio em *C. elegans*;

- Avaliar embriotoxicidade das membranas incorporadas com as fases de fosfato de cálcio em *Danio rerio* (Zebrafish).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Extração e preparação do LN

O látex natural utilizado neste trabalho foi adquirido da BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA, Guarantã - SP. Este látex foi obtido da mistura de dois clones: RRIM 600 e PB 235 (Lote: 01703/13). Depois da extração, o látex foi mantido em fase líquida através da adição de hidróxido de amônio corrigindo a acidez e estabilizando o meio ao pH igual a 10,2 (Miranda *et al.*, 2017). Posteriormente, o polímero foi submetido à centrifugação de 8000g por 2 horas, com o objetivo de diminuir a quantidade de proteínas de alto peso molecular, responsáveis por reações de hipersensibilidade (Garms, 2017; Miranda *et al.*, 2017).

3.2. Síntese de fosfato de cálcio pelo o método de secagem do sol-gel

Os materiais para a síntese de fosfato de cálcio foram os reagentes de qualidade analítica: nitrato de cálcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PA-ACS) e ácido fosfórico H_3PO_4 85% (resfriado em banho de gelo), que foram dissolvidos separadamente em álcool metílico CH_3OH (PA-ACS) sob agitação. A solução de ácido fosfórico foi adicionada à solução de nitrato de cálcio em banho de gelo permanecendo sob agitação (Figura 7). As concentrações dos reagentes foram escolhidas de modo a obter as razões molares Ca/P de 1,00; 1,67 e 1,50.

A solução obtida foi seca a 100 °C até a evaporação do solvente, e o pó obtido foi fracionado e tratado em diferentes temperaturas (400, 600 e 1200°C) com uma taxa de aquecimento de 5°C/min para a obtenção das distintas fases de fosfato de cálcio, 400°C para a obtenção de CPP, 600°C para HA e 1100°C para α -TCP (Dos Santos *et al.*, 2014).

A identidade das fases foi confirmada através das fichas cristalográficas padrões da base de dados software Search Match®.

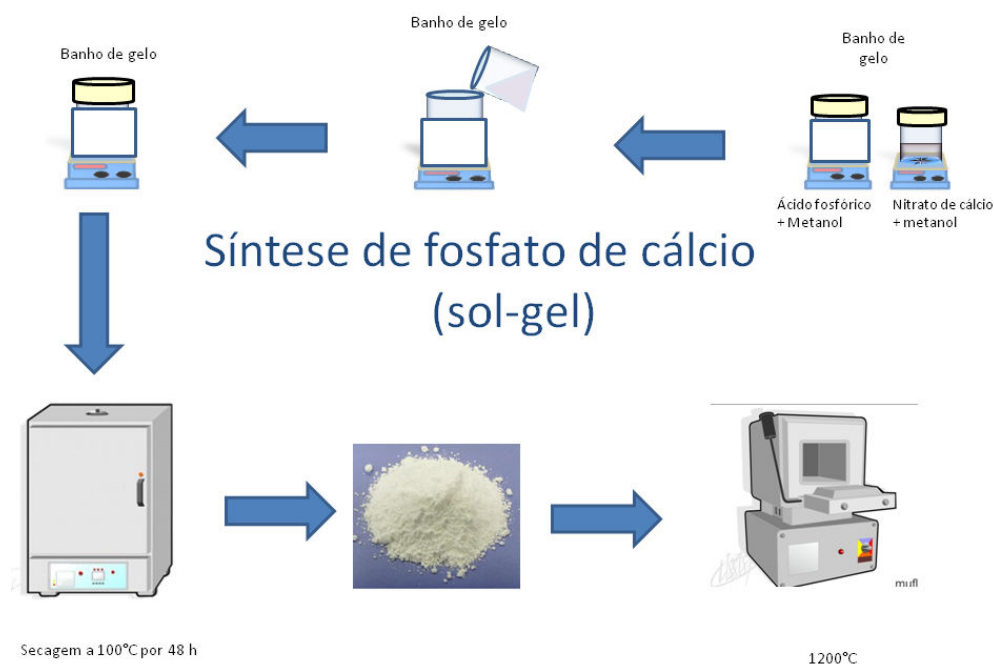


Figura 7. Fluxograma da síntese para a obtenção do fosfato de cálcio.

3.3. Incorporação das fases de fosfato de cálcio em membranas de LN

A fabricação das membranas consistiu em depositar 5mL de LN sobre a placa circular, mantendo-as em temperatura ambiente por 24h. Após a polimerização do látex foram adicionados sob a membrana 10mL de suspensão de fosfato de cálcio (10mg/mL) e mantidos em temperatura controlada de 50°C por 72h, para que o fosfato de cálcio precipitado na superfície do látex seja adsorvido para seu interior (Figura 8).

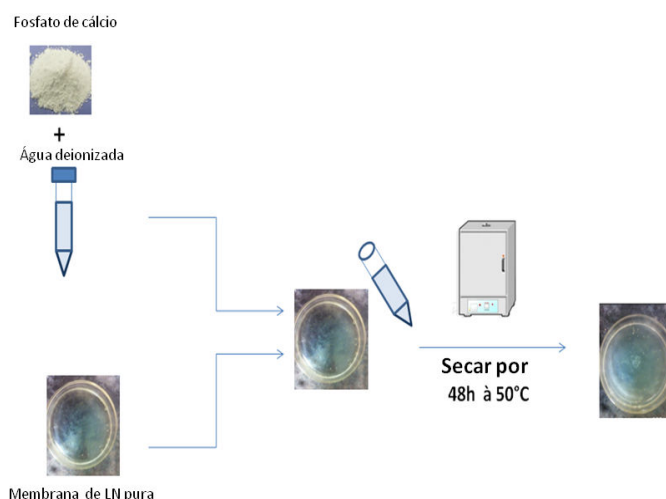


Figura 8. Fluxograma da confecção das membranas de LN e incorporação das fases de fosfato de cálcio.

3.4. Caracterização físico-química das fases fosfato de cálcio e das membranas NL incorporadas

3.4.1. Difração de Raios-X (DRX)

Os padrões de DRX, para determinar a estrutura cristalina, foram obtidos usando um difratômetro da marca Siemens modelo D5000, DIFFRAC PLUS XRD Commander, com um filtro de níquel e radiação de Cu ($K\alpha$), com varredura angular entre 4° a 70° com passo de $0,02^\circ$ (2θ) e tempo de aquisição de contagem de 3s para cada amostra. As amostras foram fixadas sobre um suporte de vidro. A identificação das fases cristalinas do fosfato de cálcio presentes nos compósitos foi realizada comparando-se os dados obtidos com as fichas cristalográficas padrões da base de dados software Crystallographica Search-Match[®] que é indexado no ICDD (International Centre for Diffraction Data – Powder Diffraction) (Mendes, 2012).

3.4.2. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV-FEG/EDS)

As micrografias foram realizadas para verificar a morfologia das partículas das fases de fosfato de cálcio, superfície e do interior das

membranas e também realizar uma análise qualitativa por EDS para confirmar a presença das partículas Ca e P.

Na preparação das amostras que estavam no formato de pó foram dispersas em 50mL de álcool isopropílico (Quimis; 99,5%), onde a solução foi agitada por dois minutos com o auxílio de uma ponta ultrasônica (Unique, modelo DES 500W) com o intuito de desaglomerar o material presente na solução. Em seguida, algumas gotas do material sobrenadante foram depositadas sobre substratos de silício condutor e seco em temperatura ambiente (Suman, 2012).

A preparação das membranas para a microscopia foi realizada de duas maneiras, na qual na primeira as membranas foram cortadas e posicionadas no porta-amostra do equipamento para a análise da superfície. Já na segunda as membranas foram submersas em nitrogênio líquido por 2 min e fraturadas e posicionadas no suporte com o lado da fratura para cima, com o objetivo analisar a presença das fases no interior das membranas. Após estas preparações as amostras foram recobertas com ouro durante 20s.

As micrografias e a análise EDS foram obtidas em microscópio eletrônico FEG-MEV; JEOL modelo 7500F localizado no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) no prédio multiusuário do Instituto de Química da UNESP – Araraquara, utilizando uma tensão de 10-25kV.

3.4.3. Microscopia de Força Atômica (MFA)

As amostras foram mantidas em dessecador e foram secas com jato de argônio imediatamente antes das análises. As análises de MFA foram realizadas utilizando o microscópio de varredura da Shimadzu (Scanning Probe Microscope) (Minatel *et al.* 2010), modelo SPM-9600 operando no modo fase (chamado de modo fase no Microscópio da Shimadzu, mas é mais comumente conhecido como modo tapping ou contato intermitente), à temperatura ambiente e ao ar. Para a análise foram utilizadas pontas de silício da Nanosensors, tipo PPP-NCHR, com as seguintes especificações de cantilever (Tabela 2).

Tabela 2. Especificações utilizadas para análise no MFA

Espessura	4.0±1.0 µm
Comprimento	125±10 µm
Largura	30±7.5 µm
Frequência de ressonância	204-497 kHz
Constante de força	10-130 N/m
Altura da ponta	10-15 µm

Obs.: A varredura foi realizada em condições de força constante.

3.4.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

Os espectros de FT-IR foram obtidos usando um Espectrofotômetro FTIR - VERTEX 70/BRUKER. As amostras foram analisadas através da técnica de reflexão totalmente atenuada (ATR). Os espectros foram realizados sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com acúmulo de 32 varreduras, com uma resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de absorção de 4000-400cm⁻¹; fonte: Laser de HeNe (emite radiação na região do infravermelho médio); Detector: DLaTGS).

3.4.5. Análise termogravimétrica (TG)

As curvas de TG foram obtidas utilizando o equipamento Netzsch STA 409. As amostras foram aquecidas em cadinho de alumina de 20°C à 1300°C sob atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 3,5 L/min com razão de aquecimento de 10°C/min.

3.4.6. Taxa de intumescimento das membranas

As amostras LN, LN+CPP, LN+HA e LN+α-TCP foram imersas separadamente em tampão PBS (pH 7,4) por 48h em temperatura controlada

de 37°C. As membranas foram removidas em tempos determinados, inicialmente 1 e 5 min, seguida de medidas a cada 5 min até totalizarem 30 min e depois medidas a cada 15 min até um total de 240 min, depois por 24h (Saska, 2011).

O excesso de água superficial foi rapidamente removido com papel de filtro e em seguida as membranas foram pesadas imediatamente. O grau de intumescimento das amostras foi realizado em triplicata.

O conteúdo de tampão PBS (pH 7,4) nas membranas intumescidas foi calculado pela equação 1:

$$\% = \left[\frac{Mi - Ms}{Mi} \right] \cdot 100$$

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

3.4.7. Ângulo de contato da superfície das membranas

O ângulo de contato foi medido por um equipamento Dataphysics modelo OCA-20 equipado com uma câmera CCD. O método utilizado para realizar as medidas foi o de gotejamento utilizando água deionizada (tensão superficial: 72,30mN/m²); a gota foi dispensada por uma seringa com uma agulha de 0,5 mm de diâmetro, com um volume de 17µL, em uma velocidade de gotejamento de 1µL/s sobre as superfícies das membranas (Saska *et al.*, 2012).

As imagens das gotas capturadas foram analisadas empregando o software SCA20. Desta forma, o ângulo de contato formado pela gota na superfície da amostra foi mensurado. As medidas para ângulo de contato foram realizadas para todas as amostras em triplicata (n=3), as medidas foram realizadas após 30s (T=30s). A medida do ângulo de contato entre a gota a superfície do material caracteriza a molhabilidade desta superfície conforme apresentado na Tabela 3. Esta propriedade influencia diretamente na resposta biológica de um material implantado podendo alterar adsorção de proteínas, coagulação sanguínea e principalmente afetar a adesão celular (Saska, 2011).

Tabela 3. Ângulos de contato e condições de molhabilidade.

$\theta = 0$	Molhabilidade completo
$0 < \theta < 90^\circ$	Molhabilidade parcial
$\theta > 90^\circ$	Não há molhabilidade

Fonte: SASKA (2012).

3.4.8. Testes de tensão-deformação das membranas

Os testes de tração das membranas foram realizados até sua ruptura, em uma máquina de ensaio (EMIC) DL-2000 com uma célula de carga de 50kgf, com uma velocidade de 500mm/min e à temperatura ambiente. Os valores foram convertidos em curvas de tensão-deformação e o módulo de elasticidade foi calculado a partir da parte linear inicial (0-5% de alongamento).

Para manter as mesmas características das membranas utilizadas nas liberações, optou-se por fazer membranas de 5mL em placa de petri e depois cortá-las com um molde e bisturi aquecido em bico de Bunsen. As amostras apresentavam largura de 25,8mm e distância entre as garras de 35mm, com espessura variável entre as amostras.

3.4.9. Ensaio de liberação sustentada (LS)

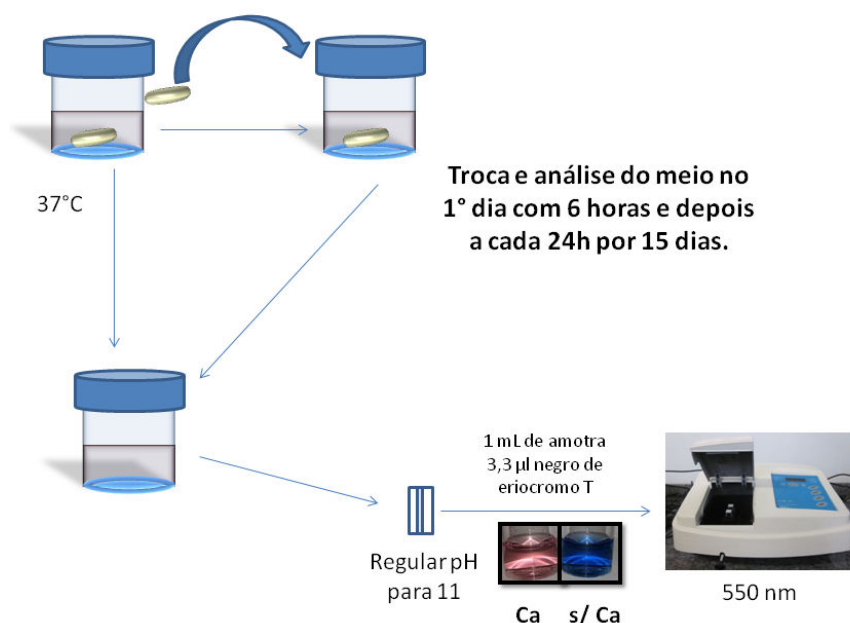
A espectroscopia ótica UV-VIS LGS53 foi utilizada para determinar a cinética de liberação dos compostos, entretanto, os constituintes do fosfato de cálcio não absorvem nos comprimentos de onda do espectrofotômetro. Desta forma, o negro de eriocromo T foi utilizado como indicador colorimétrico (Bird *et al.*, 1961; Coelho e Gargantini, 1969). O negro de eriocromo T é azul, mas torna-se rosa na presença do cálcio. Neste caso, a leitura no espectrofotômetro foi realizada em 550nm.

O ensaio de liberação sustentada foi realizado em 100mL de água deionizada por 330h ($\cong$ 15 dias) na temperatura controlada de 37°C para simular a temperatura corpórea.

No primeiro dia, a liberação foi analisada na 6ªh e nos dias posteriores a cada 24 h. Em cada análise (alíquota retirada) o meio foi trocado por um novo, com o objetivo de evitar sua saturação. Antes da análise, o pH do meio é corrigido para 11, pois para que o cálcio forme um complexo com o negro de eriocromo T é necessário que esteja em meio alcalino. Após a correção do pH foi adiciona 3,3µL de negro de eriocromo T para 1mL de meio de liberação (Figura 9).

As absorbâncias obtidas foram somadas com os valores do dia anterior a fim de se obter uma cinética de liberação ao longo de 330h. Foi necessário realizar a análise de cinética de liberação da membrana de LN pura (sem os fosfatos), para que esse valor fosse subtraído das liberações com as membranas contendo as fases, pois a membrana de LN contém uma pequena quantidade de cálcio que é liberada nas primeiras 24h.

É importante ressaltar que o método colorimétrico utilizando o negro de eriocromo T é capaz de formar um complexo somente com o cálcio e não com o fosfato de cálcio como um todo, por isso para calcular a real liberação foi realizada uma compensação utilizando as porcentagens de cada elemento contidas na fórmula das fases de fosfato de cálcio.



Obs.: Os valores são somados aos dos dias anteriores e a amostra controle foi subtraída das amostras experimentais.

Figura 9. Fluxograma da metodologia empregada para análise de liberação de fosfato de cálcio.

3.5. Obtenção das amostras para os ensaios de toxicidade

As diferentes membranas foram incubadas separadamente em solução salina tamponada com fosfato (PBS) à pH 7,4 na proporção 0,2mg de amostras a cada mL de PBS, durante 24 e 120 horas (para o ensaio de MTT com osteoblastos foi utilizado o Meio Essencial Alfa (α -MEM) completo ao invés do tampão PBS). As soluções resultantes da incubação das membranas foram utilizadas nos ensaios de toxicidade em hemoglobina, osteoblastos (MC3T3), larvas (L4) *C.elegans* e embriões de *Danio rerio* (Zebrafish).

3.6. Ensaios de toxicidade in vitro

3.6.1. Avaliação da atividade hemolítica

O protocolo utilizado foi uma modificação do Onuma *et al.* (1999), onde neste experimento foram utilizados hemácias de sangue de carneiro. Foram

incubadas 50µL das amostras resultantes das liberações das membranas e 50µL de solução de eritrócito a 37°C por 1h, os tubos foram centrifugados à 3000rpm por 3 min e alíquotas de 50µL do sobrenadante foram pipetadas em microplacas de 96 poços. A absorbância à 540nm foi determinada usando leitor de microplaca (Biotek, Modelo: Power wave 22). O valor de 100% de hemólise foi determinado utilizando 50µL de tampão PBS com 100µL de Triton X-100 à 1% (v/v), enquanto que o valor de 0% de hemólise foi obtido utilizando 10µL de tampão (*Fischer et al.*, 2003).

3.6.2. Ensaio de citotoxicidade em osteoblastos.

3.6.2.1. Cultura celular

A linhagem MC3T3-E1 subclone 14 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. Para expansão as células foram mantidas em garrafas de cultura (de 25 e 75cm²,) em meio α -MEM, modificado com ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos (LGCBio, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal da Gibco[®], New York, EUA), 2mM de L-glutamina e 1% de antibiótico/antimicótico (100U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25µg/mL de fungizona, da Gibco[®], New York, EUA), à 37°C em atmosfera umidificada à 5% de CO₂. As trocas de meio ocorreram três vezes por semana. Ao atingirem confluência de 80-90%, as células foram dissociadas com TrypLeTM (Gibco[®], New York, EUA) e expandidas em outras garrafas na concentração de 10⁴ células/cm². A contagem das células foi feita em microscópio óptico em câmara de Neubauer com 10µL de azul de tripan e 10µL de suspensão celular.

3.6.2.2. Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade celular foi realizado com as recomendações da norma técnica ISO 10993-5. Neste ensaio foi avaliada a citotoxicidade do eluato da membrana de LN pura e incorporadas com CPP, HA e α -TCP. As amostras foram imersas no meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino(*Borges et al.*, 2017). A extração foi realizada durante 24 e 120h, em

estufa à 37°C com 5% de CO₂, sem agitação, com citado no item 3.5. O teste foi realizado em triplicata sendo que as réplicas foram feitas no mesmo dia. Em placas de 96 poços foram adicionadas 2x10⁴ células/cm², permanecendo por 24h para adesão. Os eluatos) de 24 e 120h da membrana LN pura e das incorporadas com CPP. HA e α-TCP utilizando o meio de cultura contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino, o qual permaneceu na estufa o mesmo período de tempo de cada extração. O extrato permaneceu em contato com as células durante 24 e 72 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Como controle positivo Dimetilsulfóxido (DMSO) e como controle negativo utilizou-se o poliestireno da placa de cultura. A citotoxicidade foi avaliada pela técnica de MTT.

3.6.2.3. Citotoxicidade por metabolismo de MTT

Consiste na avaliação colorimétrica pela quantificação da redução metabólica, por células sadias, do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium), por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica associadas ao NADPH e ao NADH, resultando em cristais de formazan (de cor azul-púrpura) (Borges *et al.*, 2017). DMSO é utilizado para sua remoção de dentro das células e solubilização, permitindo sua quantificação por espectroscopia. Após o teste, o meio de cultura foi removido e foi adicionado meio de cultura novo (sem soro nem vermelho fenol) com 10% v/v de MTT (5 mg/mL em PBS) e incubado por 4h a 37°C a 5% de CO₂. Em seguida, o meio é descartado e é adicionado DMSO (dimetilsulfóxido) para dissolver os cristais, no mesmo volume do meio de cultura utilizado. O volume de 100µL das amostras foram coletadas e transferidas para um placa de 96 poços e a densidade óptica (DO) foi medida no espectrofotômetro Biotek Power wave 22 à 570nm. A viabilidade foi calculada em relação ao controle negativo.

3.6.2.4. Análise de dissociação dos osteoblastos pelo soro do látex

No ensaio de dissociação, cultivou-se os osteoblastos (MC3T3), em uma garrafa de cultura 25 cm² e as células ficaram incubadas em estufa de

CO₂ por 48h. Assim que as células entraram em confluência, o meio de cultura foi descartado, e foi adicionado à garrafa 1mL de soro de látex natural na concentração de 1mg/mL (obtido através da centrifugação do látex líquido a 12000rpm por 1h), o soro foi separado e liofilizado e incubado por 5 min. Após a incubação a dissociação foi observada através de um microscópio ótico.

Após a constatação que as células estavam dissociadas, o meio foi centrifugado e descartado. As células foram resuspendidas com meio de cultura completo e plaqueadas em uma nova garrafa de cultura e incubada por 72 h, e após esta incubação foi observado a adesão através de um microscópio ótico.

3.6.2.5. Lavagem das membranas para o ensaio de adesão

As membranas puras foram incubadas por 48h, a fim de extrair e neutralizar as enzimas que impossibilitam o teste de adesão, após as membranas serem incubadas os meios foram descartados (Borges *et al.*, 2017).

Um novo meio completo enriquecido com as fases de fosfato de cálcio foi adicionado nas membranas puras (lavadas), e incubadas por 48h e logo após os meios foram retirados com muito cuidado pelo canto dos poços para não extrair os fosfatos que ficaram precipitados sobre a superfície do látex.

3.6.2.6. Ensaio de adesão celular dos osteoblastos na superfície das membranas

Foi realizado o ensaio de adesão em placas de 24 poços, onde foram adicionados 30µL de LN sobre uma lamínula de vidro e polimerizados à 37°C por 24h. As membranas foram esterilizadas por luz ultravioleta por 20 min e incubadas e incorporada com as fases de fosfato de cálcio como citado anteriormente no item 3.6.2.5. Após essa metodologia de lavagem e incorporação, as células foram semeadas a 2×10^4 células/cm² diretamente sobre a superfície da membrana e cultivadas com o meio α -MEM (Borges *et al.*, 2017).

3.6.3.7. Morfologia celular

As amostras foram lavadas gentilmente com PBS (pH 7,2), fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% (v/v, em PBS) por uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e duas vezes em 100%) e secas a temperatura ambiente. As análises foram realizadas pelo MEV-FEG conforme descrito no item 3.4.2.

3.7. Ensaios de toxicidade in vivo

3.7.1. Avaliação da Toxicidade das membranas em *Caenorhabditis elegans*

As Larvas de *C. elegans* N2 foram sincronizadas por tratamento com hipoclorito de sódio e o estágio L4 foi utilizado para a realização do experimento. As larvas foram lavadas com NaCl 50mM e 10µL foram transferidos para placas de 96 poços contendo 90µL de 60% de NaCl 50mM, 40% de meio Brain Heart Infusion (BHI), 10µg/mL de colesterol em etanol, 90µg/mL de canamicina e 200µg/mL de ampicilina. E 100µL das amostras coletadas com 1 e 5d foram adicionados. As placas foram mantidas à 25 °C e a morte das larvas foram avaliadas em 24 e 48h, usando como critério sua mobilidade e sua forma (larvas com formato de vara foram consideradas mortas e com formato sinusoidal foram consideradas vivas). Imagens representativas foram adquiridas no microscópio Zeiss Discovery.V12 acoplado a uma câmera.

A análise estatística dos resultados foi realizada no programa Graph Pad Prisma 5 (La Jolla CA, EUA). Os dados foram apresentados como média e desvio padrão e foram analisados por análise de variância (ANOVA) com pós teste de Bonferroni. O valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.7.2. Avaliação da embriotoxicidade em *Danio rerio* (Zebrafish)

Os embriões utilizados foram fornecidos pelo biotério de Zebrafish do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Campus Araraquara.

Os embriões foram obtidos seguindo a criação por casais em criadeiras próprias para terem as mesmas horas pós-fertilização (hpf), foram lavados com meio embriônico (NaCl; KCl; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; H_2O e azul de metileno 0,03%) e aqueles que tiveram desenvolvimento normal foram selecionados para os testes de teratogenicidade, onde foram expostos as amostras provenientes da liberação das fases de fosfato de cálcio (CPP, HA, α -TCP) pela membrana de LN.

Após esta seleção, aproximadamente no estágio 1-2hpf, todos os embriões selecionados foram transferidos para uma placa de 96 poços (dois embriões por poço). Posteriormente à primeira coluna que foi preenchida com embriões e meio embriônico (controle), as colunas seguintes (3-6 colunas) apresentavam-se com as diferentes amostras provenientes da liberação da membrana de LN puras e incorporadas, repetidos seis vezes nas respectivas fileiras. As leituras realizadas destes experimentos foram até 96hpf e as imagens foram obtidas através da lupa Zeiss (Discovery. V12).

Neste ensaio os transtornos de desenvolvimento são um indicativo de efeito teratogênico (morte, atraso de desenvolvimento e deformação) foram avaliados segundo o guia da ZEFT (zebrafish embryo acute toxicity test, OECD test guideline 236 - Organisation for Economic Cooperation and Development test guideline, Busquet *et al.* (2014)).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das fases de fosfato de cálcio por FTIR, DRX e MEV-FEG/EDS

4.1.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR é importante, pois permite verificar os grupos vibracionais existentes nos materiais, que absorvem energia na região do infravermelho, indicando que a síntese das fases de fosfato de cálcio (CPP, HA e α -TCP) foi bem-sucedida. A Figura 4 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho.

No espectro do CPP (Figura 10, linha preta), é possível observar bandas características de estiramento de OH e deformação de H-OH da água respectivamente em 3434 e 1646 cm^{-1} , além disso, as bandas de H_2O_2 correspondente na deformação O-P-O em PO_4^{3-} (597 cm^{-1}) e estiramento em P-OH em HPO_4^{2-} (555 cm^{-1}) indicando a formação de CPP (Dos Santos *et al.*, 2014).

Já no espectro da HA (Figura 10, linha vermelha), observa-se as absorbâncias características da deformação assimétrica do grupo PO_4^{3-} entre 1100 e 1029 cm^{-1} e em torno de 874 cm^{-1} , associado ao estiramento P-OH em HPO_4^{2-} . A banda próxima a 600 cm^{-1} é correspondente à deformação assimétrica da ligação P-O do grupo PO_4^{3-} , já a absorção em 562 cm^{-1} corresponde à deformação assimétrica da ligação P-O(H) do grupo HPO_4^{2-} . Observa-se uma absorção em torno de 3638 cm^{-1} atribuída às vibrações de estiramento de grupos OH, tanto da água quanto do fosfato e sua deformação aparece em torno de 636 cm^{-1} . Esses resultados indicam a formação da fase HA (DOS SANTOS *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2009). A banda na região de 1450 cm^{-1} provavelmente é atribuída ao estiramento assimétrico e simétrico do N-O do íons nitrato proveniente da síntese (BRITO, 2014).

A análise do espectro do α -TCP (Figura 10, linha azul), observam-se as bandas características de estiramento do P-OH em HPO_4^{2-} em 1018 cm^{-1} , além do mais, a banda em 595 cm^{-1} correspondente na deformação O-P-O em PO_4^{2-} e estiramento do P-OH em HPO_4^{2-} confirmam a formação de α -TCP (MOTISUKE; CARRODEGUAS; ZAVAGLIA, 2012)

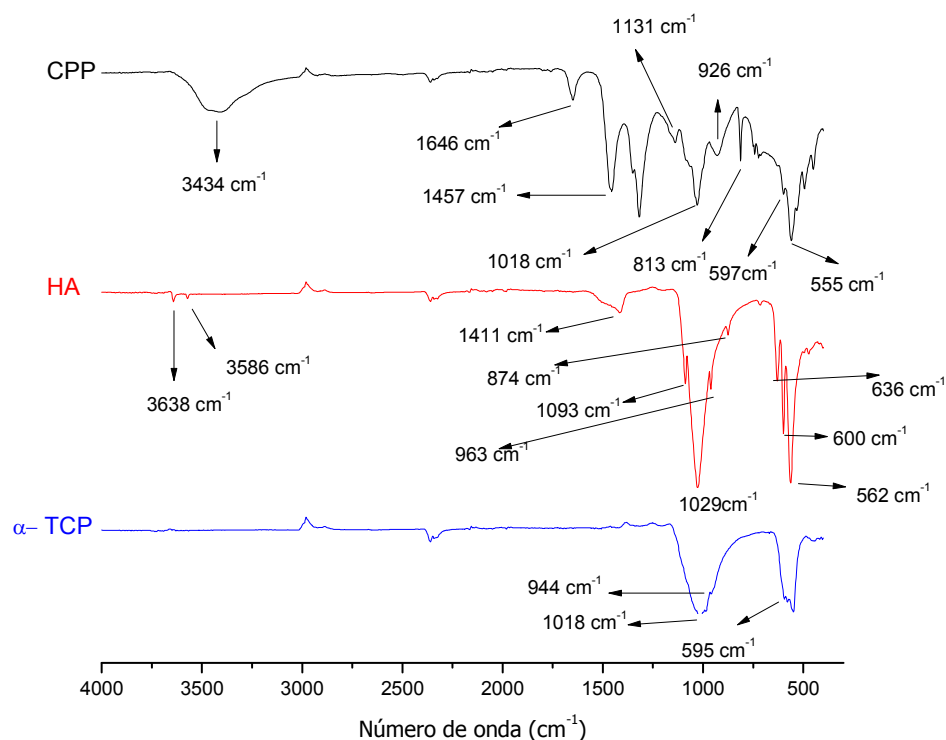


Figura 10. Espectros FTIR dos pós de CPP, HA e α -TCP.

4.1.2. Difractometria de Raios-X (DRX)

Os espectros de FTIR das fases de fosfato de cálcio foram confirmados através da técnica de DRX (Figura 11), onde a identificação das fases cristalinas dos fosfatos de cálcio foram realizadas comparando os dados obtidos com as fichas cristalográficas padrões da base de dados Search-Match[®] que comprovou a fase majoritária de cada tratamento térmico realizado no precipitado do sol-gel (Tabela 4)(Dos Santos *et al.*, 2014).

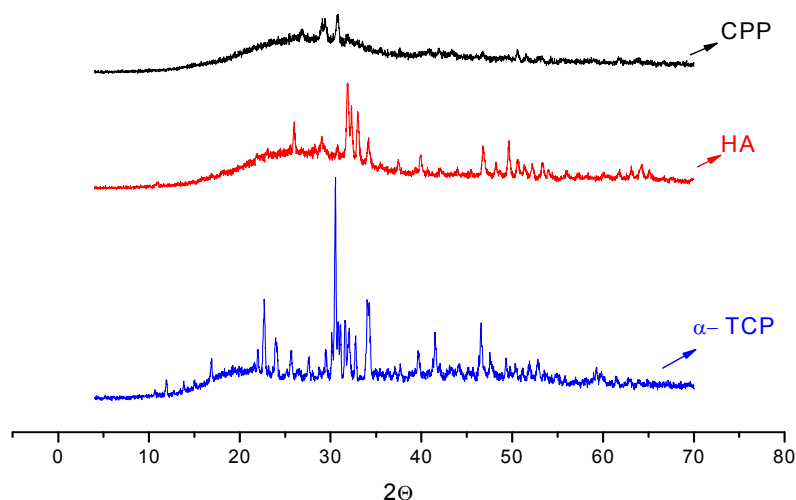


Figura 11. Difratogramas de DRX para as amostras: CPP, HA e α - TCP em (pó).

Tabela 4. Informações sobre os tratamentos térmicos empregados, fases de fosfato de cálcio predominantes obtidos, códigos de identificação do software Search-Match[®] e ângulos característicos de difração das amostras.

Tratamento térmico (°C)	Fases predominantes	Código (Search-Match [®])	Ângulos de difração (2 θ)
400°C	CPP (Ca ₂ P ₂ O ₇)	96-100-1557	25°, 32° e 35° (Oliveira <i>et al.</i> , 2009)
600°C	HA (Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH))	96-900-1234	26°, 31°, 33° (Oliveira <i>et al.</i> , 2016)
1200°C	α - TCP (Ca ₃ O ₈ P ₂)	96-210- 6195	30°, 30,5°, 31°, 32°, 34° (Motisuke <i>et al.</i> , 2012)

4.1.3. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV-FEG/EDS)

A Figura 12 (A, B e C) apresenta as micrografias das fases de fosfatos de cálcio submetidas a diferentes tratamentos térmicos, onde quanto maior a

temperatura de tratamento, menor o tamanho das partículas (Dos Santos *et al.*, 2014). O tratamento de 400°C apresentou partículas de 170-650nm e com forma filiforme, o tratamento de 600°C apresentou partículas de 110-620nm e com forma esférica, e o tratamento a 1200°C apresentou partículas de 10-79nm e no formato retangular.

Durante a análise morfológica também foi realizado uma análise quantitativa através da técnica de EDS (Figura 12D), onde as amostras apresentaram uma composição contendo Ca e P como o esperado. Os elementos Ca, P são componentes das amostras, enquanto o Silício (Si) observado pertence ao substrato condutor utilizado para a preparação da amostra (Suman, 2012)

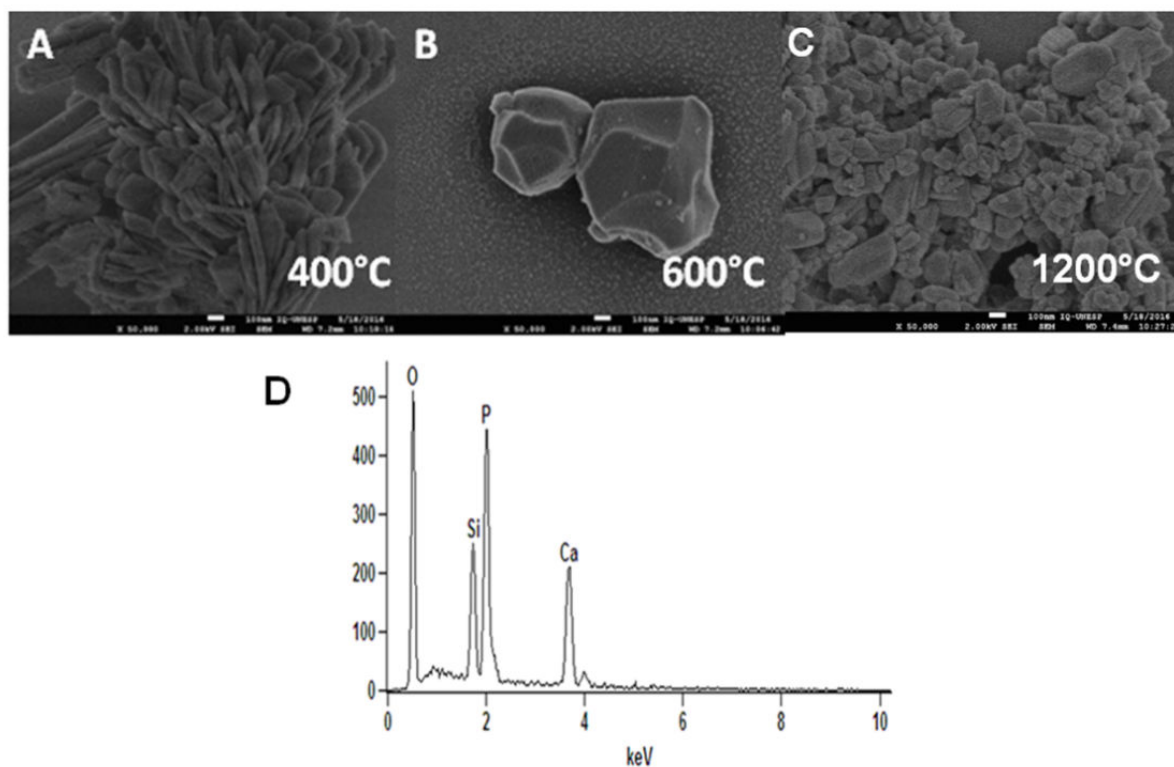


Figura 12. Micrografias dos pós tratados à: A)400°C; B)600° MEV; C)1200°C e D) Um análise qualitativa do por EDS (Aumento de 50K vezes).

4.2. Incorporação do fosfato de cálcio em membranas de LN

O processo de incorporação das fases de fosfato de cálcio foi realizado por precipitação, diferentemente do método por “casting” comumente utilizado

na literatura (Herculano *et al.*, 2010; Aiello *et al.*, 2014; Dias Murbach, Jaques Ogawa, Azevedo Borges, Romeiro Miranda, Lopes, Roberto De Barros, Guedes Mazalli, Gonçalves Da Silva, *et al.*, 2014), pois quando o CPP ou HA ou α -TCP entram em contato com a solução de LN, ocorre a polimerização de uma forma heterogênea não formando uma membrana (Figura 13). Este fenômeno ocorreu porque o íon Ca^{+2} promove a formação de cross-links causando a polimerização imediata do LN (Rippel *et al.*, 2002).

Borges *et al.* (2015) utilizou o método biomimético para adsorver HA na membrana de LN, mas esta técnica não foi utilizada neste trabalho, pois um dos objetivos futuros é adicionar proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) nesse compósito. O método biomimético impediria a incorporação desta proteína, pois o látex teria que ficar submerso em uma solução de SBF perdendo grande parte das proteínas incorporadas no látex no momento da confecção da membrana.

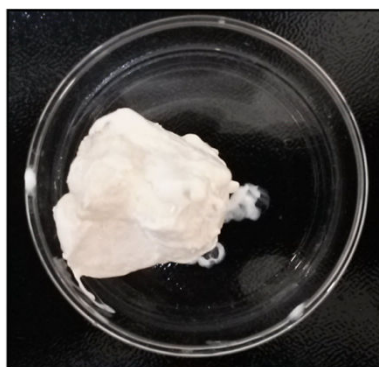


Figura 13. Polimerização heterogênea do látex causada pela adição de Fosfato de cálcio

4.3. Caracterização das membranas incorporadas com CPP, HA e α -TCP

4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura da superfície das membranas

Na Figura 14 foram observadas algumas partículas sobre a membrana de LN pura, isso é facilmente explicado, pois o método empregado para a produção desta membrana foi a adição de água sobre a membrana já polimerizada que foi seca à 50°C, e quando a membrana está submersa pela

água, as proteínas existentes no látex são liberadas e após a secagem ficam precipitadas sobre a membrana e também em seu interior (Ho e Khew, 2000).

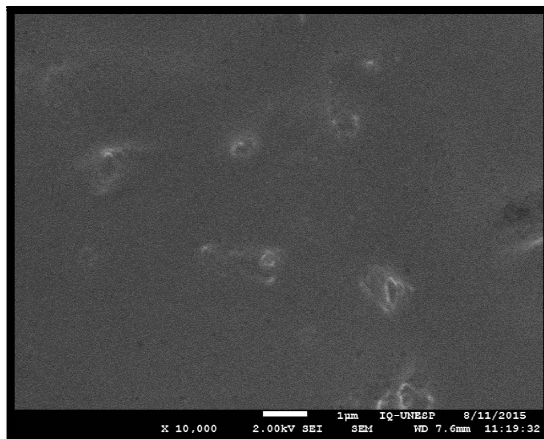


Figura 14. Micrografia da superfície da membrana de LN pura.

Na micrografia da membrana incorporada com CPP (Figura 15A) ficou evidente a inclusão do CPP na superfície da membrana. Ao analisar a micrografia da fratura (Figura 15B), foi possível observar a presença de partículas de CPP no interior da membrana, como ressaltado no aumento sinalizado pela seta branca.

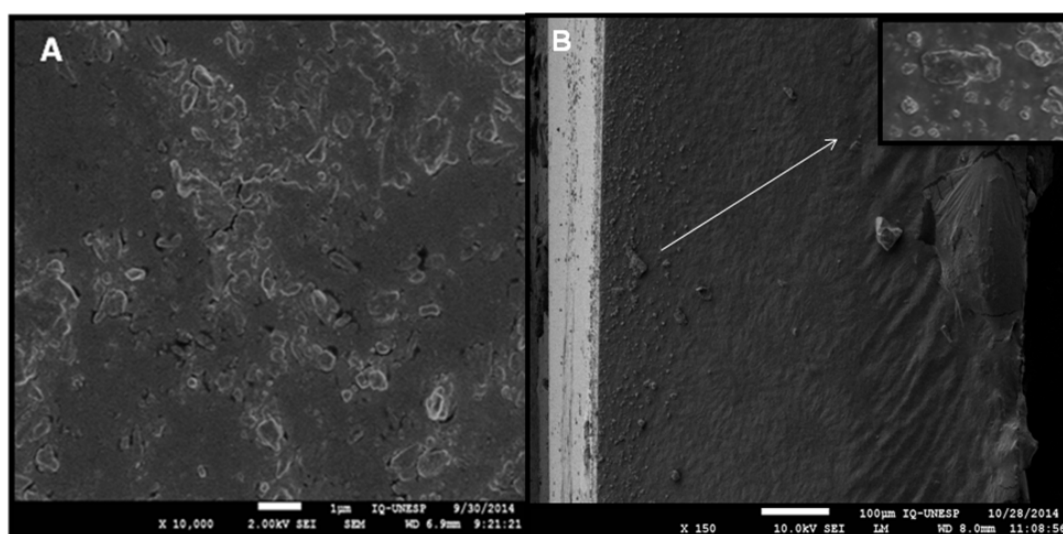


Figura 15. Micrografias A) da superfície da membrana incorporada com CPP. B) e da fratura da membrana incorporada com CPP (Imagem no canto direto superior, com aumento de 5000 vezes).

Para a confirmação da identidade destas partículas foi utilizada a técnica de EDS acoplada ao MEV (Figuras 16), onde foi detectada a presença dos elementos químicos Ca e P, constituintes do CPP sobre a superfície da membrana.

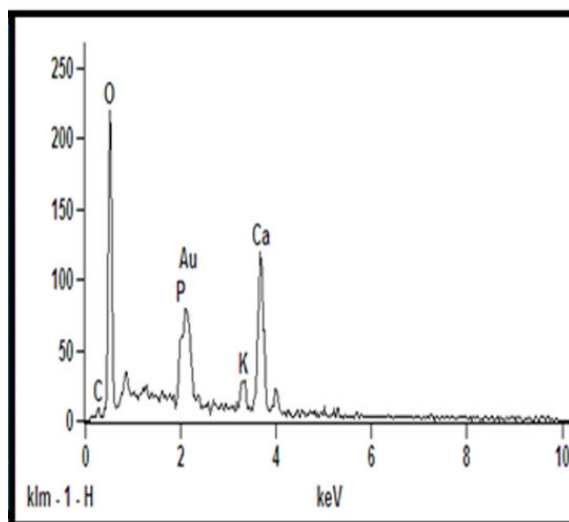


Figura 16. Espectro de EDS da membrana incorporada com CPP

Na micrografia da membrana incorporada com HA (Figura 17A) é denotada uma camada heterogênea de HA na superfície do material. Enquanto na micrografia da fratura, foi possível observar a presença de partículas de HA no interior da membrana, no entanto essas partículas apresentam uma inclusão mais superficial (Figura 17B), como ressaltado no aumento sinalizado pela seta branca.

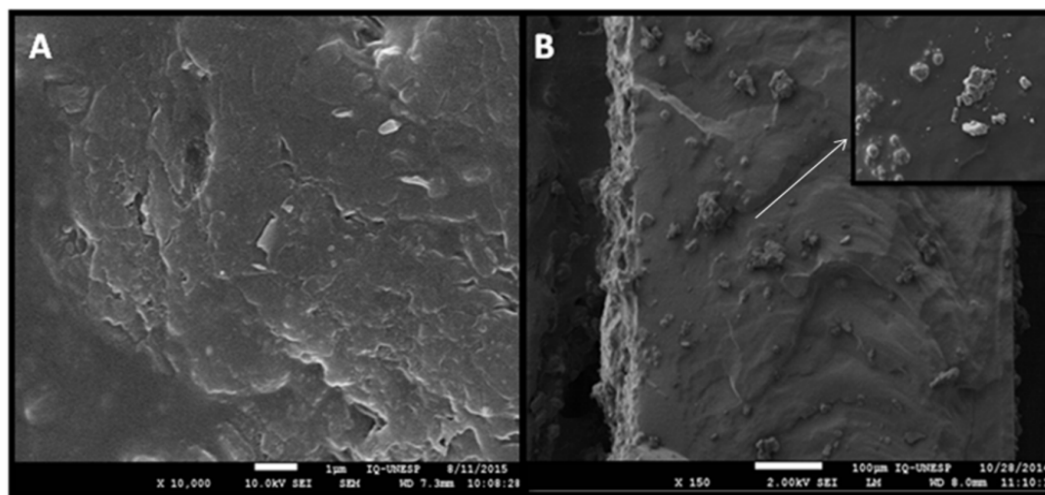


Figura 17. Micrografias A) da superfície da membrana incorporada com HA. B) e da fratura da membrana incorporada com HA (Imagem no canto direto superior, com aumento de 5000 vezes).

A técnica de EDS acoplada ao MEV (Figura 118) mostrou a presença dos elementos químicos Ca e P que são constituintes da HA.

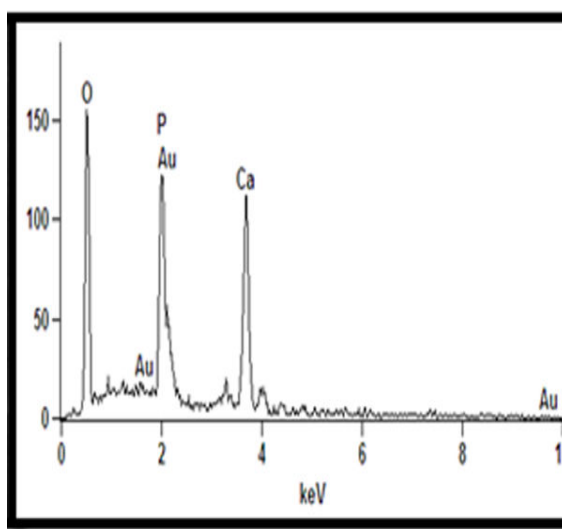


Figura 18. Espectro de EDS da membrana incorporada com HA.

Na micrografia da membrana incorporada com α -TCP (Figura 19A), também foi observado uma camada heterogênea de α -TCP na superfície da membrana. Já na micrografia da fratura (Figura 19B) foi possível observar a presença de partículas de α -TCP no interior da membrana, mas igualmente a

membrana incorporada com HA, apresentou uma inclusão superficial das partículas de α -TCP na membrana de LN, como ressaltado no aumento sinalizado pela seta branca.

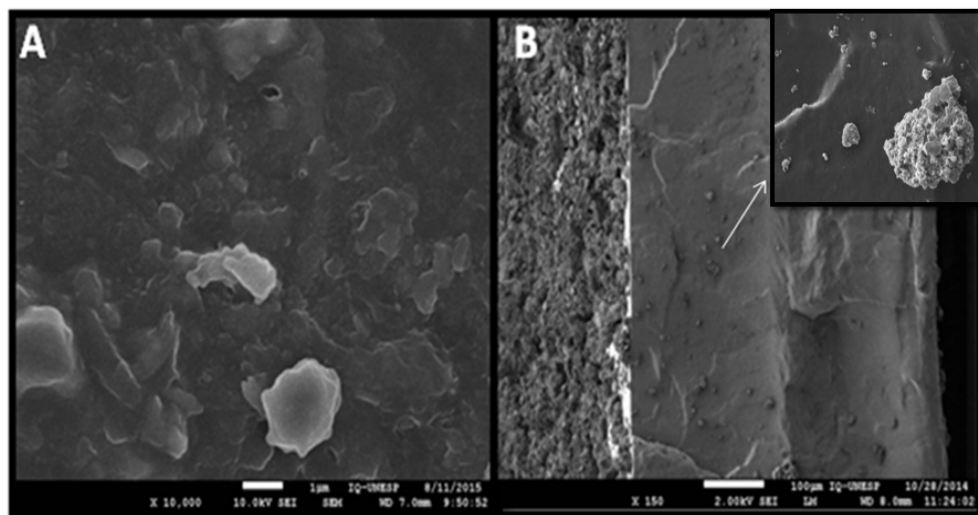


Figura 19. Micrografias A) da superfície da membrana incorporada com α -TCP. B) e da fratura da membrana incorporada com α -TCP (Imagem no canto direito superior, com aumento de 5000 vezes).

A confirmação da identidade destas partículas foi realizada através da técnica de EDS acoplada ao MEV (Figura 20), onde foi detectada a presença dos elementos químicos Ca e P, constituintes do α -TCP.

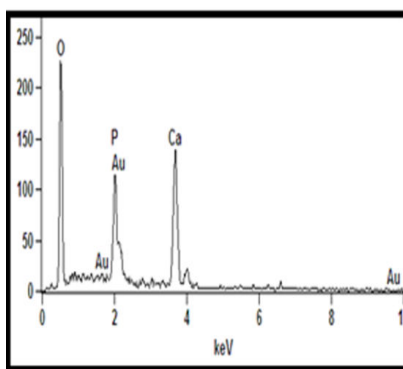


Figura 20. Espectro de EDS da membrana incorporada com α -TCP.

Foi observado que as membranas incorporadas com HA e α -TCP apresentaram uma morfologia menos uniforme que as membranas incorporadas com CPP que apresentaram um recobrimento homogêneo na superfície e uma boa adsorção para o interior da membrana. Provavelmente a grande responsável por essa diferença é a solubilidade em água de cada fase do fosfato de cálcio incorporada na membrana, pois quanto maior a razão Ca/P menor a solubilidade em água (Aparecida *et al.*, 2009; Guastaldi e Aparecida, 2010), onde a HA tem a maior razão Ca/P com valor de 1,67, enquanto o α -TCP possui 1,5 e o CPP a proporção de 1,0. Desta forma, essa grande diferença na solubilidade torna o CPP mais fácil de ser adsorvido pela membrana.

4.3.2. Microscopia de Força Atômica da superfície das membranas (MFA)

Os principais objetivos das análises de MFA das superfícies das membranas, foi observar as diferenças topográficas e de rugosidade entre as membranas de LN pura, LN+CPP, LN+HA, LN + α -TCP.

Pode-se observar na Figura 21, algumas partículas sobre a membrana de LN pura, esse dado corrobora com o resultado obtido pelo MEV, onde ocorre a presença destas partículas que são provenientes das proteínas, carboidratos e lipídios contidas no LN que são liberadas e precipitadas após a secagem da água no momento da produção da membrana (Ho e Khew, 2000).

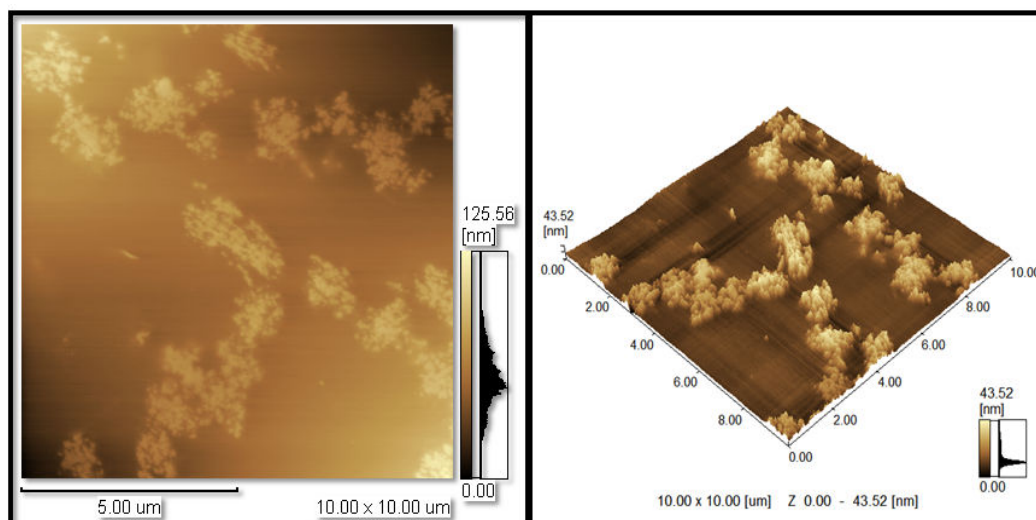


Figura 21. Micrografia de MFA e topográfica da membrana de látex natural pura.

Já nas micrografias das membranas incorporadas, foi possível observar as camadas formadas pelas fases do fosfato de cálcio. É possível observar as camadas formadas pelas fases do fosfato de cálcio. As superfícies das membranas recobertas com HA (Figura 23) e α -TCP (Figura 24) apresentam vales mais profundos e irregulares quando comparados com a membrana incorporada com CPP (Figura 22), isso provavelmente foi ocasionado pela menor solubilidade destas fases de fosfato por apresentarem maiores razões de Ca/P que são de 1,67 para HA e 1,50 para α -TCP (Siebers *et al.*, 2005; Guastaldi e Aparecida, 2010).

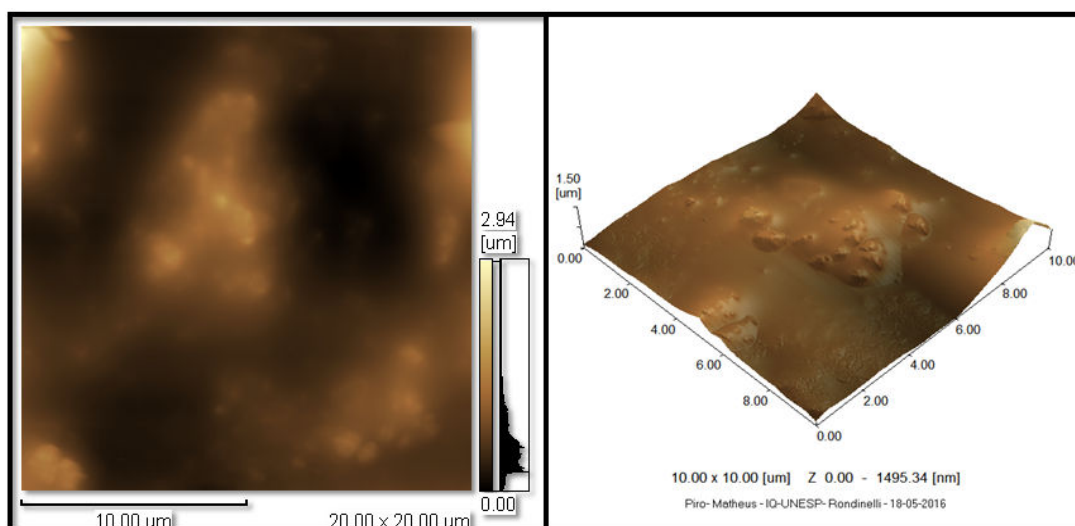


Figura 22. Micrografia de MFA e topográfica da membrana de látex natural incorporada com CPP.

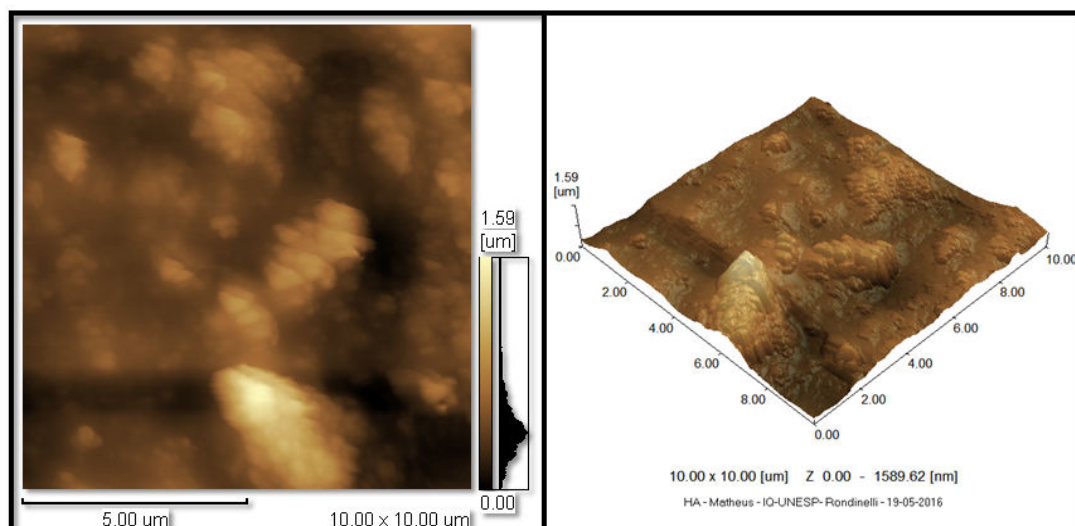


Figura 23. Imagem de MFA e topográfica da membrana de látex natural incorporada com HA.

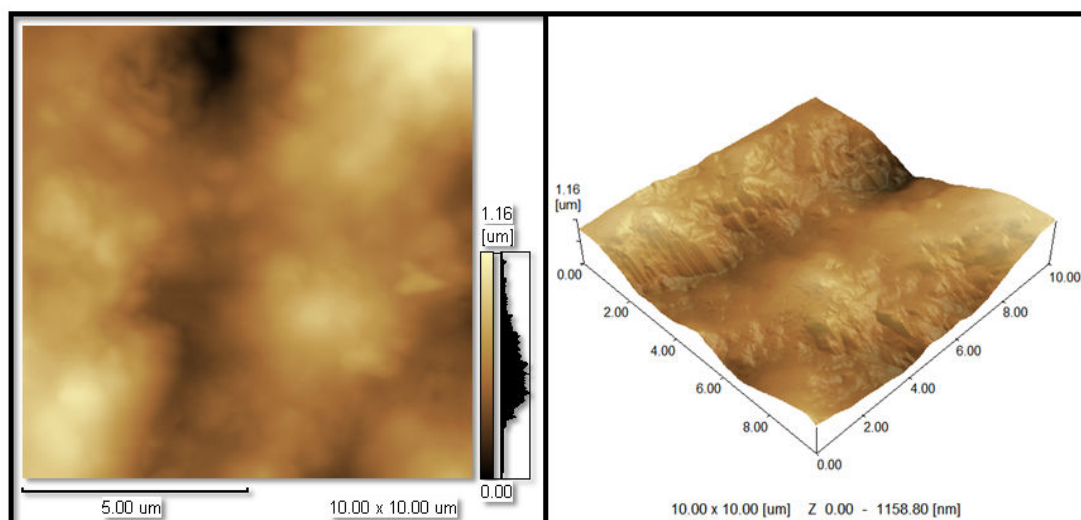


Figura 24. Imagem de MFA e topográfica da membrana de látex natural incorporada com α -TCP

Após a análise da morfologia da superfície das membranas através das micrografias e topografias, foi realizado o cálculo da rugosidade utilizando o software do equipamento (SPM- modo: offline / Shimadzu). Na Tabela 5 é possível observar que a membrana de LN pura apresentou um valor de rugosidade 31 vezes menor que a membrana incorporada menos rugosa (LN+CPP) e 71 vezes menor que a amostra de maior rugosidade (LN+ HA). Portanto estes resultados indicam um aumento elevado nos valores de rugosidade nas membranas incorporadas com fosfato de cálcio, quanto maior a razão Ca/P e a hidrofobicidade, maior foi da rugosidade do material.

Tabela 5. Valores de rugosidade calculado por MFA da membranas de látex pura e das membranas incorporadas com CPP, HA e α -TCP.

Amostras	Rugosidade (nm)
LN	8,426
LN + CPP	257,134
LN + HA	598,374
LN + α - TCP	377,854

Segundo Siebers *et al.* (2005) o recobrimento com fosfato de cálcio e o aumento na rugosidade aumentam a adesão dos osteoblastos, pois além de ser bioativo, o fosfato aumenta a fixação do implante devido a uma ligação química com o osso circundante.

4.3.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das superfícies das membranas

O objetivo da espectroscopia de absorção no infravermelho é a determinação dos grupos funcionais. Cada grupo absorve em uma determinada frequência característica de radiação na região do infravermelho. Assim, um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, o espectrograma de infravermelho, permite caracterizar os grupos funcionais de um material padrão ou de uma substância desconhecida, podendo detectar prováveis interações que podem interferir ou bloquear a liberação dos fosfatos.

No espectro de FTIR usando o modo de refletância total atenuada (ATR) obtidos do LN na região de $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ é possível observar as bandas de transmitância da amida I, amida II e C=O.

A Figura 25 apresenta os espectros do látex, do CPP em pó e da membrana incorporada, onde foi possível observar nos espectros a sobreposição de algumas bandas que são semelhantes no látex e no CPP. As presenças das bandas características do CPP em 597cm^{-1} (deformação O-P-O em PO_4^{3-}) e em 555cm^{-1} (estiramento em P-OH em HPO_4^{2-}) e em 1029cm^{-1} (deformação assimétrica do grupo PO_4^{3-}) comprovam a incorporação do CPP na membrana no látex. Além disso, novas bandas não apareceram, indicando que não houve novas interações, que poderia prejudicar a liberação sustentada do CPP.

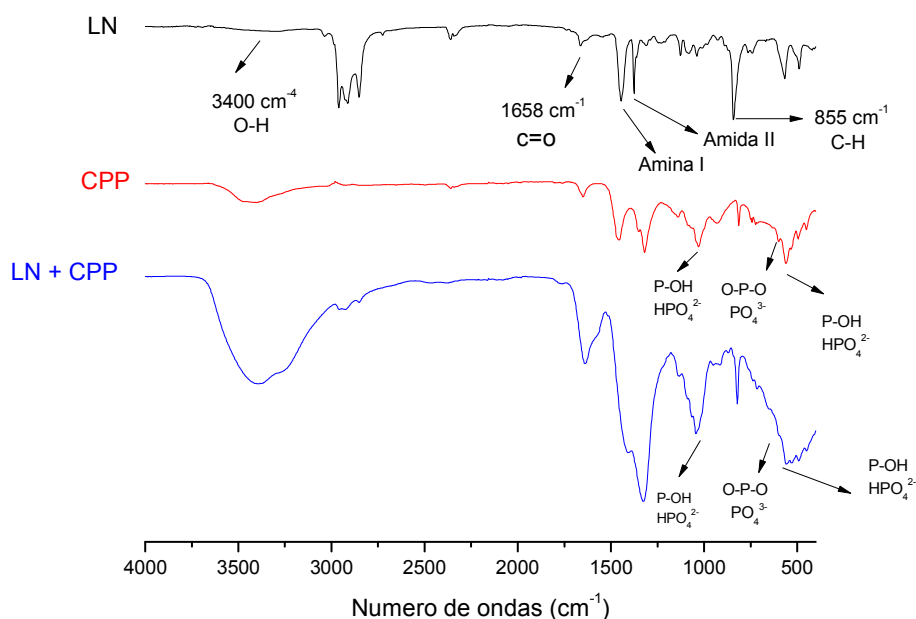


Figura 25. Espectro FTIR de comparação do látex como o CPP.

A Figura 26 apresenta os espectros do LN do HA em pó e da membrana incorporada, onde foi possível observar a sobreposição de algumas bandas nos espectros que são semelhantes no látex e no HA. As presenças das bandas características do HA entre 1100 e 1029 cm^{-1} (deformação assimétrica do grupo PO_4^{3-}) e em 874 cm^{-1} (estiramento P-OH em HPO_4^{2-}) e em 600 cm^{-1} (deformação assimétrica da ligação P-O do grupo PO_4^{3-}) que comprovam a incorporação da HA na membrana na látex. Além disso, não houve aparecimento de novos grupos funcionais, não influenciando assim, a liberação da HA.

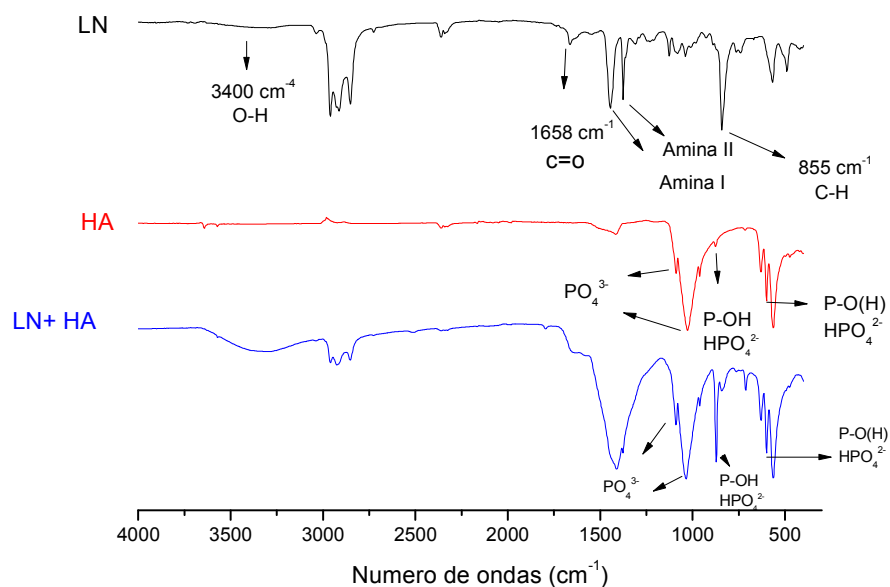


Figura 26. Espectro FTIR de comparação do látex como o HA.

A Figura 27 apresenta os espectros do látex, α -TCP em pó e da membrana incorporada, na qual foi possível observar a sobreposição nos espectros de algumas bandas semelhantes no látex e no α -TCP. Já as presenças das bandas características do α -TCP em 1018cm^{-1} - (estiramento do P-OH em HPO_4^{2-} em 1018cm^{-1}) e em 874cm^{-1} (estiramento P-OH em HPO_4^{2-}) e em 595cm^{-1} (deformação O-P-O em PO_4^{3-} e estiramento do P-OH em HPO_4^{2-}) comprovaram a incorporação do α -TCP na membrana de látex. Adicionalmente, devido à ausência de novas bandas, não houve formação de novas interações moleculares.

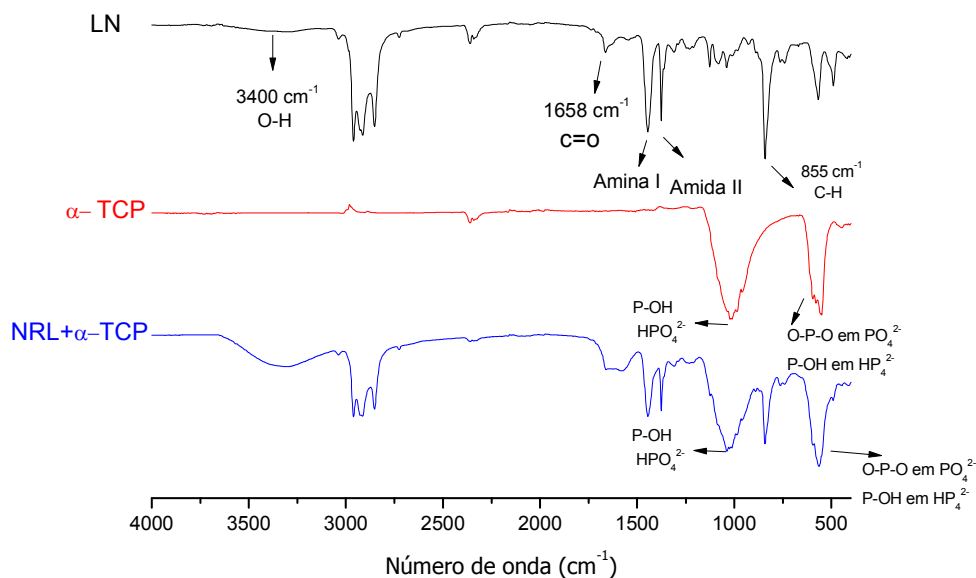


Figura 27. Espectro FTIR de comparação do látex como o α -TCP.

Portanto, estes resultados mostraram que todas as fases de fosfato de cálcio não apresentaram ligações fortes com membrana LN o suficiente para reter sua liberação.

4.3.4. Difração de Raio- X das membranas

A identificação das fases cristalinas do fosfato presentes nos compósitos foi realizada comparando-se os dados obtidos com as fichas cristalográficas padrões da base de dados Search-Match[®]. No difratograma do LN (Figura 28) não apresenta picos, pois o látex é um material amorfo (não tem fase cristalina).

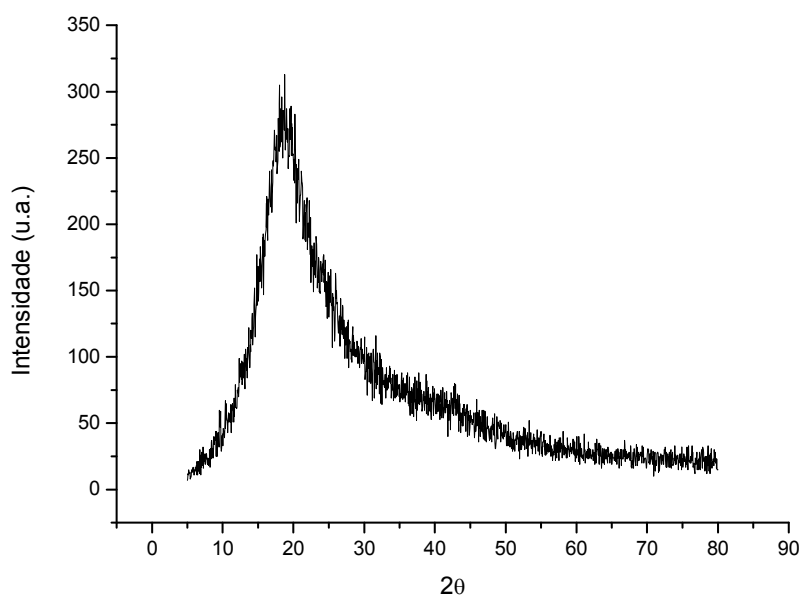


Figura 28. Difratoograma de raios-x obtido para a membrana LN (Amorfo).

Entretanto, quando a membrana foi incorporada com CPP (Figura 29) conseguimos observar a presença de dois picos de baixa intensidade característicos do CPP (25° e 32°), evidenciando sua presença na membrana. Estes picos apresentaram baixa intensidade provavelmente pela fina camada formada sobre a membrana, lembrando que por função da maior solubilidade do CPP uma grande parte dele foi adsorvido pela membrana, portando ficando menos concentrado na superfície da membrana.

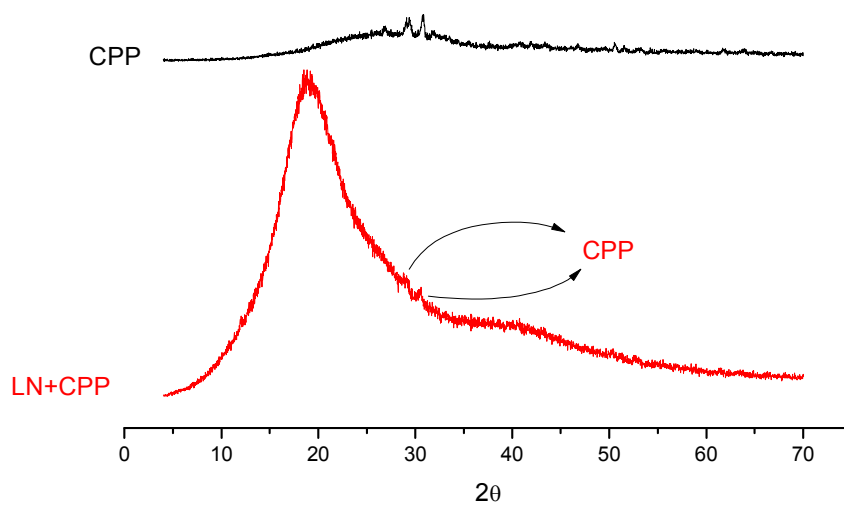


Figura 29. Difratoograma de raios-X comparativo entre CPP em membrana de late incorporado com CPP.

Nos difratogramas de DRX das membranas incorporadas com HA (Figuras 30) e α -TCP (Figura 31) conseguimos observar os picos que caracterizam a fase cristalina do HA (26° , 31° e 33°) e do α -TCP (30° , $30,5^\circ$, 31° , 32° , 34°) incorporadas às membranas.

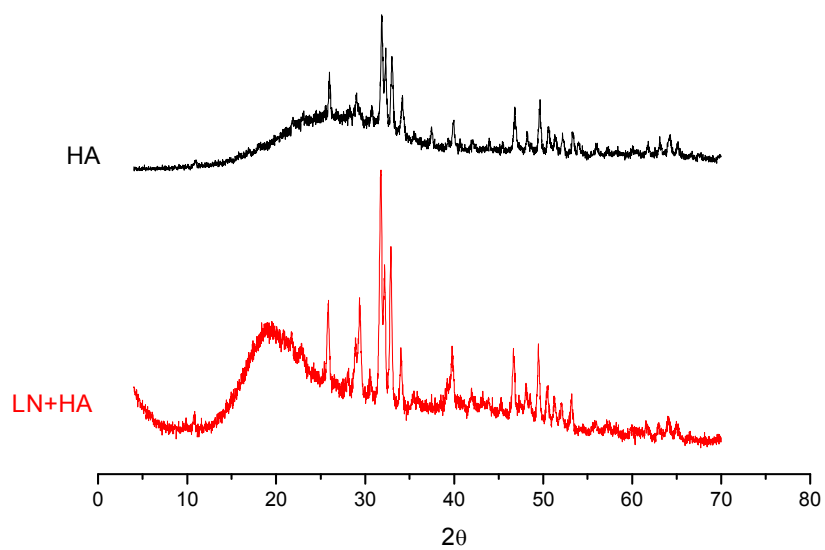


Figura 30. Difratoograma de DRX comparativo entre HA em membrana de látex incorporado com HA.

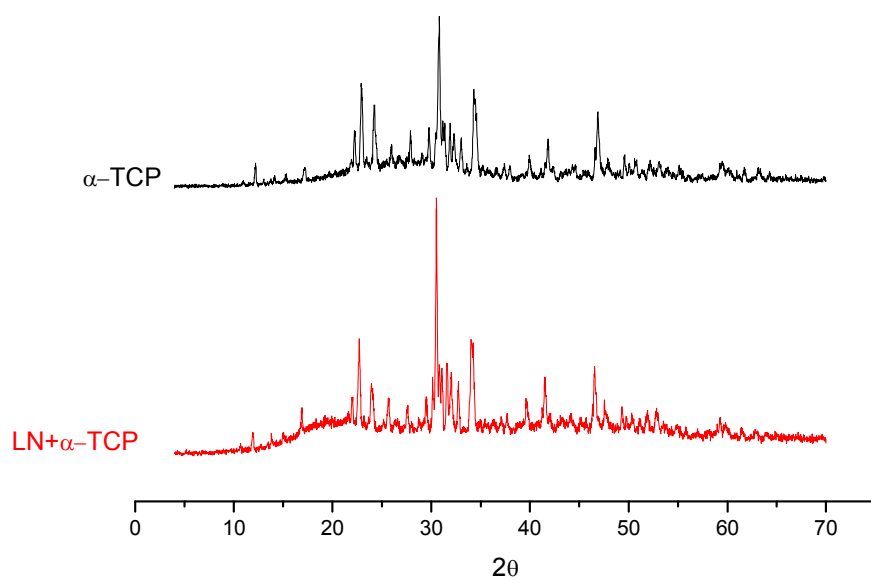


Figura 31. Difratoograma de DRX comparativo entre α- TCP em membrana de látex incorporado com α- TCP.

4.3.5. Análise termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica foi realizada com o objetivo de comparar os perfis de degradação da membrana de LN, das fases do fosfato de cálcio em pó (CPP, HA e α -TCP) e das membranas incorporadas. A partir desta técnica, estudou-se a interação da membrana de látex LN com cada fase dos fosfatos de cálcio.

Na Figura 32 é possível observar que o α -TCP é a fase do fosfato de cálcio mais termoestável, pois não apresenta degradação relevante até o limite máximo da análise que foi de 1300°C, enquanto o CPP apresentou uma degradação em aproximadamente 438°C e a HA em aproximadamente 566°C. Além disso, na Figura 33 observamos a comparação da estabilidade térmica da membrana de látex natural pura com as membranas incorporadas com CPP, HA e α -TCP, onde o termograma que representa o LN puro indica uma degradação em aproximadamente 320°C característica da degradação do isopreno (Herculano, 2009). Já nas membranas incorporadas com CPP, HA e α -TCP não houve mudança dessa temperatura de degradação. Este resultado indica que a análise TG não foi eficaz para mostrar as interações entre a membrana e os fosfatos de cálcio. Nesse caso, tivemos que utilizar somente as análises de espectroscopia de infravermelho para descobrir as interações que ocorrem entre o látex natural e as amostras.

Com esses resultados pode-se ver que mesmo que as fases do fosfato de cálcio sejam mais termoestáveis que a membrana de LN, quando incorporadas ao material na concentração utilizada neste trabalho, não apresentou interferir na termoestabilidade da membrana.

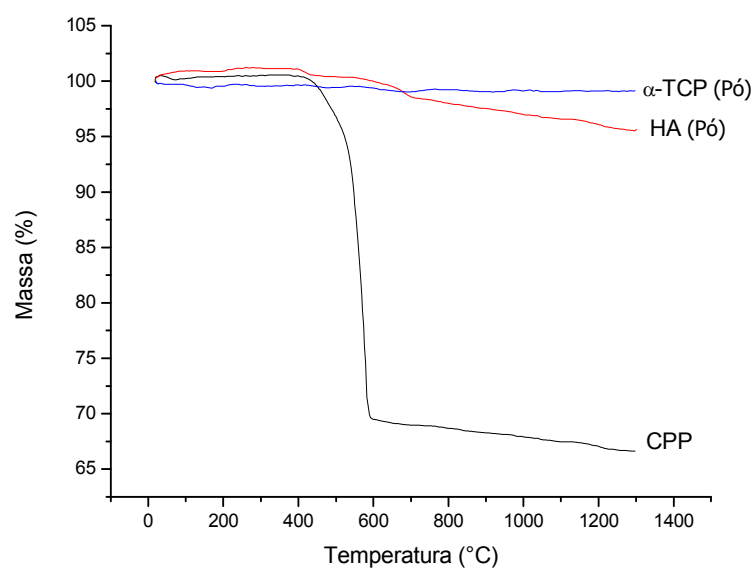


Figura 32. Comparação dos termogramas das fases de fosfato de cálcio em pó (CPP, HA e α -TCP).

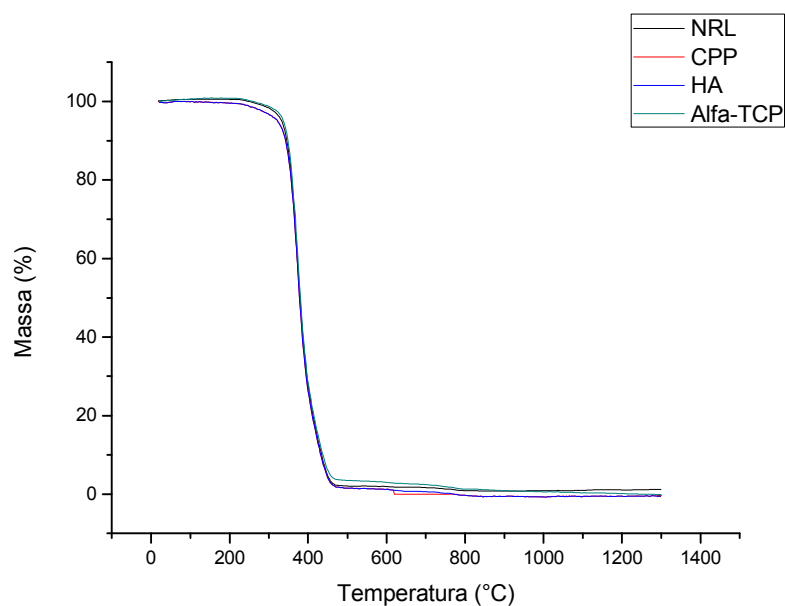


Figura 33. Comparação dos termogramas das amostras LN, LN+CPP, LN+HA e LN+ α -TCP.

4.3.6. Taxa de intumescimento

A análise de intumescimento foi realizada para quantificar em porcentagem a quantidade de SBF (pH 7.4) que foi absorvida pelas

membranas no intervalo de tempo de 1 e 24h (Figura 34). Após 1 hora, as taxas de intumescimento foram de 3,8% para membrana LN pura, 2,2% para LN+CPP, 0,4% LN+HA e 1% para LN+ α -TCP e após 24 h a taxa de intumescimento foi de 12,6% para membrana LN pura, 8,2% para LN+CPP, 7,3% para LN+HA e 1% para LN+ α -TCP. Os resultados mostram que adições das fases do fosfato de cálcio diminuem a taxa de intumescimento da membrana de LN. A amostra que mais intumescceu foi à membrana de látex pura e a que menos intumescceu foi à incorporada com HA. Os resultados obtidos corroboram com as técnicas de microscopia, onde indicam que quanto maior a razão de Ca/P das fases de fosfato de cálcio incorporadas menor será o intumescimento e por consequência menor polaridade.

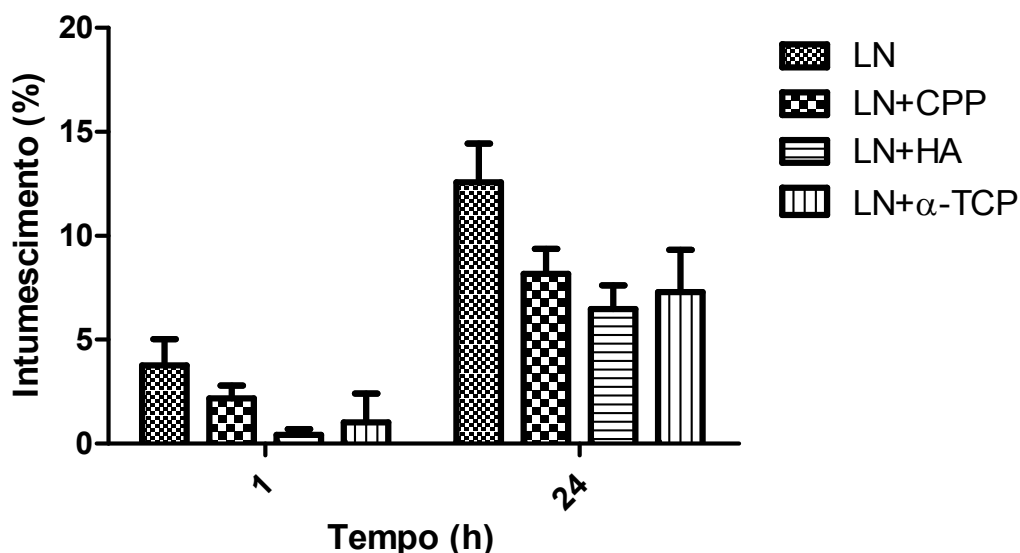


Figura 34. Porcentagem de intumescimento das membranas LN, LN+CPP, LN+HA e LN+ α -TCP.

4.3.7. Ângulo de contato

A técnica de ângulo de contato foi realizada em conjunto com a análise da taxa de intumescimento, com o propósito de avaliar o grau de hidrofobicidade das membranas. A Tabela 6 descreve os resultados obtidos pela técnica após 30 segundos de contato da gota com a membrana (Figura 35).

Tabela 6. Ângulo de contato resultante das membranas.

Amostra	Ângulo
LN	$17^{\circ} \pm 1,2$
LN+CPP	$62^{\circ} \pm 2,0$
LN+HA	$96^{\circ} \pm 3,6$
LN+ α -TCP	$92^{\circ} \pm 2,0$

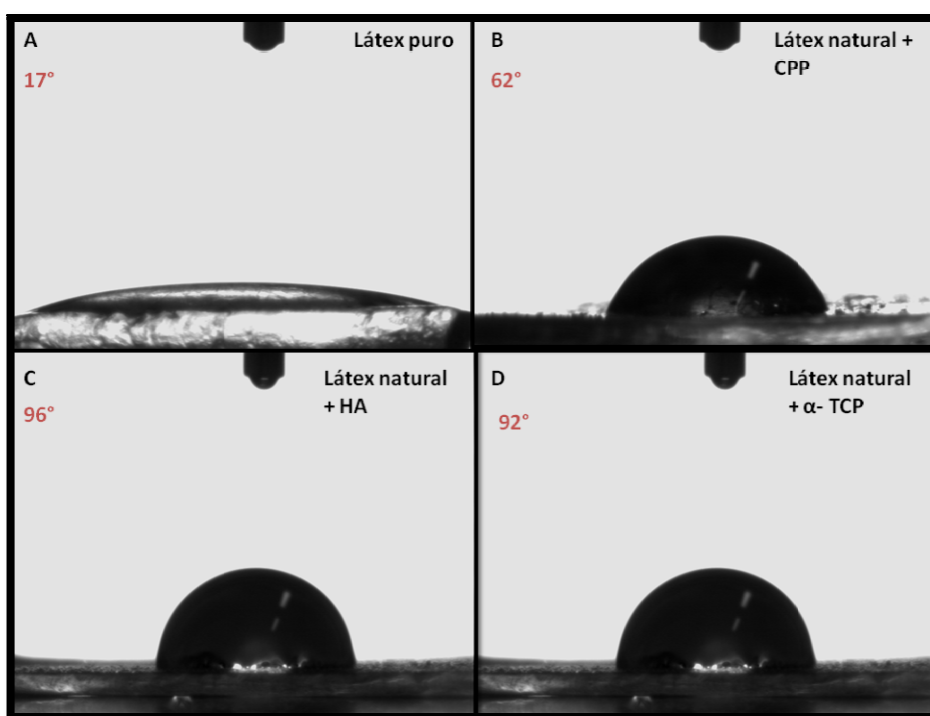


Figura 35. Fotografias da análise de ângulo de contato para as membranas: LN pura, LN+CPP, LN+HA e NL+ α -TCP.

Analisando os resultados segundo os parâmetros utilizados por Saska (2011), as amostras LN e o LN + CPP apresentam molhabilidade parcial, pois tem o ângulo >0 e <90 , e as membranas incorporadas α -TCP e HA apresentaram molhabilidade completa por apresentarem ângulo > 90 . Os resultados foram coerentes com a técnica de intumescimento, onde quanto maior a razão Ca/P do fosfato incorporado menor será a polaridade da membrana.

4.3.8. Testes de tensão e deformação das membranas

Neste trabalho foi realizado o ensaio mecânico de tração, que consiste na aplicação de uma força nas extremidades da amostra. Convém salientar que quando uma tensão é exercida em um corpo sólido, este tende a se deformar (Herculano, 2009).

É possível observar na Tabela 7 e na Figura 36 que a membrana pura apresentou uma tensão de ruptura de $2,2 \pm 0,5$ MPa e uma deformação de $12,38 \pm 1,2$ mm/mm que são valores característicos para elastômeros (Dias Murbach, Jaques Ogawa, Azevedo Borges, Romeiro Miranda, Lopes, Roberto De Barros, Guedes Mazalli, Gonçalves Da Silva, *et al.*, 2014). Já as membranas incorporadas com CPP, HA apresentaram valores semelhantes para tensão e deformação, enquanto a membrana com α -TCP obtiveram valor mais baixo para a tensão ($1,2 \pm 0,8$ MPa).

Estes resultados indicam que a adição das fases de fosfato cálcio nas membranas de LN influenciou significativamente na tensão de ruptura à tração das membranas, onde as amostras incorporadas com as fases de fosfato de cálcio apresentaram um decréscimo nestes valores de tensão quando comparadas com a membrana de LN pura, assim pode-se concluir que a adição das fases deixa o material menos resistente (Tabela 7).

Os dados de deformação na Tabela 7 indicam que a incorporação das diferentes fases do fosfato de cálcio não modificaram significativamente os valores de deformação das membranas de LN, o que faz sentido, pois os materiais elastoméricos apresentam ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas adjacentes, as quais quando submetidas a uma carga de tração, sofrem uma deformação elástica ocasionada pelo desenovelamento, desdobramento e alinhamento parcial, e após a liberação essa tensão, as ligações cruzadas presentes nesse tipo de material forçam as macromoléculas a voltarem às suas conformações originais (Callister e Ciência, 2008)

Todas as amostras obtiveram baixos valores para o módulo de elasticidade e também não apresentaram diferença significativa entre si, o que é uma característica dos elastômeros, por não apresentarem uma alta rigidez (Callister e Ciência, 2008).

Segundo Hench (1991) o módulo de elasticidade do osso é 7 à 20 GPa, o que é muito distante dos valores obtidos para as membranas produzidas neste trabalho (Tabela 7). Entretanto, este novo material tem a função de funcionar como um curativo ósseo que além de funcionar como barreira mecânica, seja capaz de liberar fosfato de cálcio. Para este tipo de função os valores de módulo de elasticidade das membranas incorporadas com fosfato de cálcio estão semelhantes aos encontrados na literatura ($0,9 \pm 0,08$ a $1,13 \pm 0,1$ MPa) (Saska *et al.*, 2012).

Tabela 7. Valores mensurados no ensaio de resistência à tração para as amostras LN pura, LN+CPP, LN+HA e LN+ α -TCP.

Amostras	Tensão (MPa)	Deformação (mm/mm)	Módulo de elasticidade (MPa)
LN	$2,2 \pm 0,50$	$12,38 \pm 1,2$	$1,1 \pm 0,15$
LN + CPP	$1,7 \pm 0,40$	$10,18 \pm 1,8$	$1,2 \pm 0,06$
LN + HA	$1,6 \pm 0,06$	$9,56 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,30$
LN + α -TCP	$1,2 \pm 0,80$	$9,27 \pm 1,4$	$1,2 \pm 0,05$

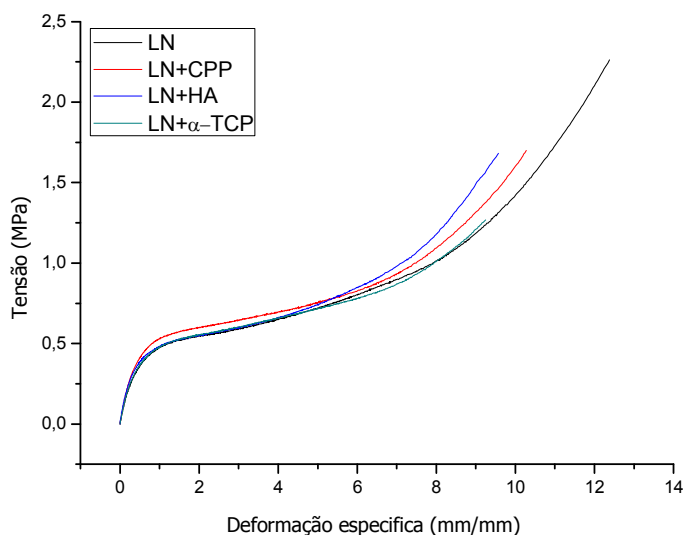


Figura 36. Curva de tensão e deformação das membranas: LN pura, LN+CPP, LN+HA e LN α -TCP.

4.4. Ensaio de Liberação sustentada

O ensaio de liberação foi realizado utilizando o método colorimétrico para detecção dos íons de cálcio (Ca^{+2}), pois as fases dos fosfatos de cálcio não são absorvidas nos comprimentos de onda (200-1000nm) do espectrofotômetro.

Desta forma, adaptamos o método colorimétrico/ complexométrico proposto por Coelho e Gargantini (1969) que utiliza o negro de eriocromo T em conjunto técnica de espectrofotometria para detecção de cálcio em amostras de solo.

Nesta técnica, a análise é realizada no comprimento de onda de 550 nm em espectrofotômetro, pois quando ocorre a formação do complexo, onde a solução azulada se torna rosa (Coelho e Gargantini, 1969).

A membrana de LN tem sido utilizada como matriz para liberação sustentada de peptídeos, moléculas, fármacos, nanopartículas e extratos vegetais, onde o controle da dispersão dos compostos bioativos ocorre principalmente por meio de difusão.

De acordo com Trecco *et al* (2014), Barros *et al* (2015) e Borges *et al* (2015), a membrana de látex funciona como um reservatório, onde quanto maior a quantidade de substâncias presente nas membranas, maior o total de substância liberada.

Após a definição deste parâmetro, foi construída a curva analítica no intervalo de 0,028 a 0,00028 mg/mL (Figura 37).

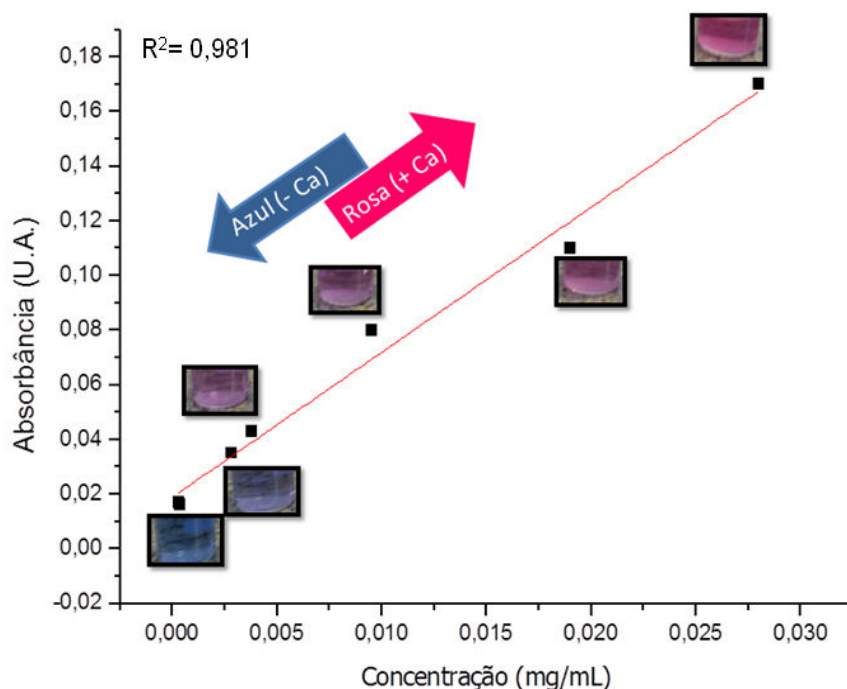


Figura 37. Curva de calibração a partir da banda de absorção do Ca (Equação da reta- $y=0,0188 + 5,3088 \cdot x$)

Os ensaios foram realizados em 100 mL de água deionizada e não em tampão SBF que mimetizaria o sangue humano, no entanto para que o cálcio forme o complexo com o negro de eriocromo T, o pH deve estar próximo do valor 11, e desta forma, o tampão dificultaria a alteração do pH (Bird *et al.*, 1961; Coelho e Gargantini, 1969).

As cinéticas das liberações apresentaram uma liberação de 48% para CPP (Figura 38A), 95% para HA (Figura 38B), 71% para α -TCP (Figura 38C) de íons de Ca^{+2} de cada fase de fosfato de cálcio durante 330 h.

A liberação da HA foi mais lenta e duas vezes maior que o CPP e 23% maior que α -TCP. Este perfil de liberação obedece a função bi-exponencial $y(t) = y_0 + A_1 e^{-t/T_1} + A_2 e^{-t/T_2}$ para CPP e α -TCP (Tabela 8), onde $y(t)$ é a quantidade de amostra presente na membrana de látex em um determinado tempo, t . O perfil de liberação da membrana incorporada com HA segue a função exponencial assintótica $Y = a \cdot b \cdot c^x$ (Tabela 9).

A liberação das fases dos fosfatos de cálcio em comparação com as outras moléculas liberadas pelo látex apresentou uma liberação mais lenta e

duradoura, e também vale salientar que enquanto a maioria das moléculas como metronidazol (Herculano *et al.*, 2010), ciprofloxacina (Dias Murbach *et al.*, 2014), nicotina (Pichayakorn *et al.*, 2012) e oxitocina (De Barros *et al.*) apresentaram em sua cinética de liberação um evento chamado “burst release” que é a liberação intensa durante as primeiras horas, a cinética de liberação das fases dos fosfatos de cálcio não apresentou um “burst release” acentuado.

Segundo Ehara *et al.* (2003), o período de maior diferenciação celular e mineralização são nos primeiros 7 dias, e desta forma, o material produzido neste trabalho foi capaz de liberar as fases de fosfato de cálcio por mais de 15 dias o que auxiliaria ainda mais no processo de reparo ósseo.

Estes resultados mostram que este novo material pode ser empregado como barreira mecânica para reparação óssea, unindo as propriedades cicatrizantes e angiogênicas do látex natural com as propriedades osteogênicas dos fosfatos de cálcio.

Tabela 8. Dados das equações das retas da liberação CPP e α -TCP.

Membranas	y0	A1	T1	A2	T2
CPP	0,02121	-0,01061	268,03144	-0,01061	268,0314
α-TCP	0,04878	-0,01637	383,7350	-0,01637	383,7312

Tabela 9. Dados das equações das retas da liberação HA.

Membrana	A	B	c
HA	0,06902	0,06902	0,99749

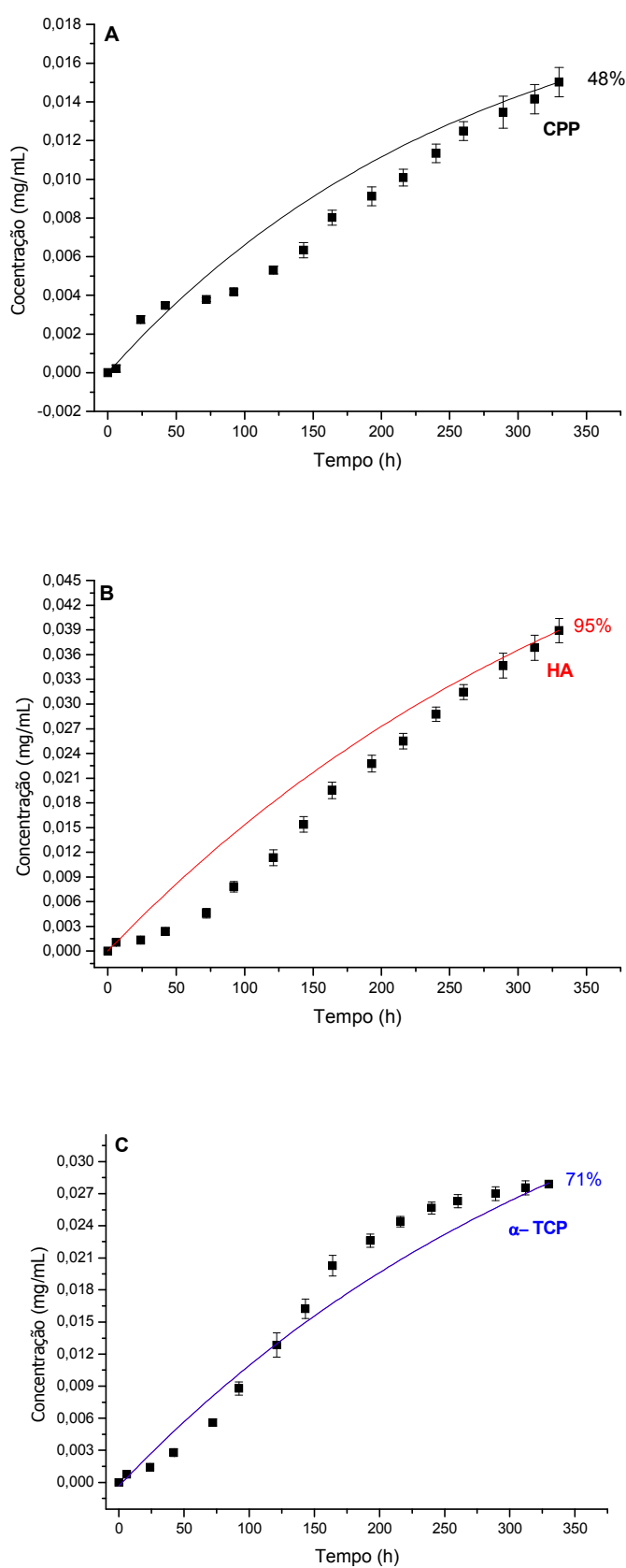


Figura 38. Cinética de liberação da membranas incorporadas com: A)CPP, B) HA C) α - TCP.

4.5. Ensaios de Toxicidade in vitro

4.5.1. Atividade hemolítica

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado para avaliar se os componentes liberados pelo LN e pela mistura com as diferentes fases de fosfato de cálcio foram capazes de romper a membrana das células sanguíneas de carneiro (Borges *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2017).

A membrana de LN pura e incorporadas com CPP, HA e α -TCP foram incubadas em tampão fosfato-salino (PBS), e os testes foram realizados com soluções resultantes da liberação das amostras nos tempos de 24 e 120h como descrito no item 3.5 (Figura 39). Seguindo o mesmo padrão da análise Fischer *et al.* (2003) que considera não tóxico até 10% hemólise, as nossas amostras não apresentaram atividade hemolítica significativa para ensaios com 24 horas de incubação. Os ensaios realizados com os amostras resultantes das liberações de 120h apresentaram hemólise no valor 1,1% para LN pura, 0% para LN+CPP, 2,2% LN+HA e 1,1% para LN+ α -TCP, ou seja, menores que 10 %.

Desta forma, comprovamos que todos os materiais não causaram lesão na membrana das hemácias em até 5 dias de aplicação, corroborando com os resultados obtidos por De Barros *et al.* (2016) que testou a atividade hemolítica de membranas de látex natural com oxitocina e também obteve valores menores que 5%.

Borges *et al.* (2015) estudou a atividade hemolítica da membrana de LN incorporado com fosfato de cálcio, onde as concentrações abaixo de 6,5mg/mL apresentaram menos de 10% de hemólise. A grande diferença do trabalho aqui apresentado e o de Borges *et al.* (2015) é que neste, foram avaliadas as atividades hemolíticas das diferentes fases de fosfato de cálcio, que por sua vez, apresentam concentrações de cálcio e fósforo distintas.

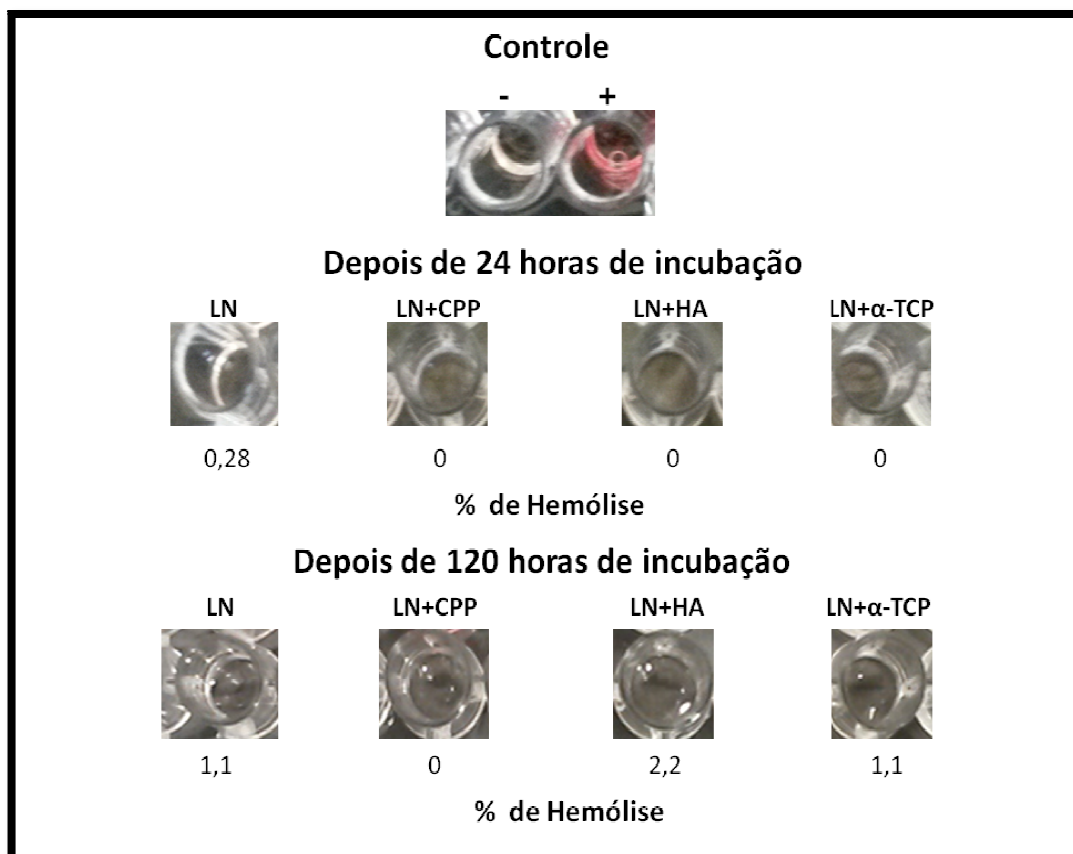


Figura 39. Hemólise das soluções resultantes da incubação das membranas de 24 e 120 horas (vermelho quando ocorre hemólise e transparente quando não ocorre hemólise).

4.5.2. Citotoxicidade em Células ósseas (MC3T3)

4.5.2.1. MTT

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando os eluatos das membranas incubadas em meio de cultura completo nos tempos de 24 e 120 h, como citado no item 3.5.

As células foram plaqueadas a 10^4 por poço em uma placa de 96 poços, após 24h do plaqueamento através de um microscópio óptico foi constatado que as células estavam aderidas e em quantidade homogênea, e também houve a substituição dos meios de cultura pelo os eluatos onde foram incubados por 48 h na estufa de CO₂. Após essa incubação foram

realizados os testes de citotoxicidade (MTT), onde foram observados que em todos os grupos exceto o controle positivo, obtiveram uma viabilidade abaixo de 50%. Estes resultados corroboram com o estudo de Borges *et al.* (2017), onde o eluato provenientes da incubação do látex natural sem diluição apresentou viabilidade de aproximadamente de 48%. Segundo Borges *et al.* (2017) este resultado indica a citotoxicidade dos materiais testados.

Entretanto estes resultados estavam contraditórios, quando comparados com os inúmeros ensaios *in vivo* realizados com o LN encontrado na literatura, onde apresentaram excelente biocompatibilidade e bioatividade (Sader *et al.*, 2000; Frade *et al.*, 2004; Rabelo *et al.*, 2005; Balabanian *et al.*, 2006; Frade *et al.*, 2006; Ereno *et al.*, 2010; Floriano *et al.*, 2014).

Tentando justificar esse resultado, foi realizada uma busca bibliográfica para encontrar componentes no LN que seja capaz de influenciar no teste de viabilidade celular. Nesta busca foi observado que o LN contém enzimas proteolíticas como a seriano-protease e a cisteíno-protease (Lynn e Clevette-Radford, 1984; 1986; Peng *et al.*, 2008). Diante de tais resultados e informações, surgiu a teoria de que as enzimas proteolíticas presentes no látex estavam dissociando as células do fundo dos poços, promovendo a baixa viabilidade celular observada.

Com o propósito de confirmar esta teoria, foi realizado um ensaio, onde cultivou-se em uma garrafa de cultura 25 cm² osteoblastos (MC3T3), e as células ficaram incubadas em estufa de CO₂. Assim que as células entraram em confluência, o meio de cultura foi descartado, e foi adicionado a garrafa 1mL de soro de látex natural na concentração de 1mg/mL e incubado por 5 minutos, após esta incubação, foi possível observar que as células não estavam mais aderidas (Figura 40). Este resultado indica que o soro com os constituintes do látex foi capaz de dissociar ou danificar as células.

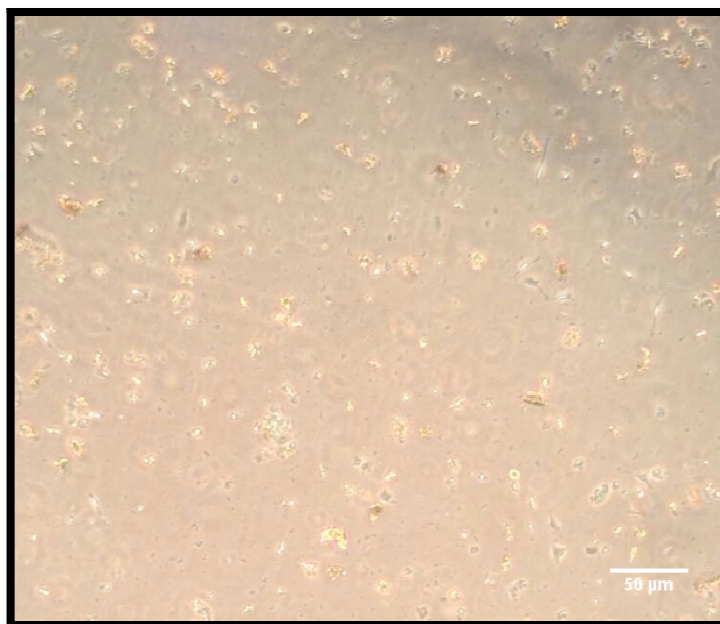


Figura 40. Células MC3T3 dissociadas pelas enzimas contidas no soro do látex natural.

Após a constatação que as células estavam dissociadas, o meio foi centrifugado e descartado. As células foram resuspendidas com meio de cultura completo e plaqueadas em uma nova garrafa de cultura e incubada por 72 h, onde pode-se observar na Figura 41, que as células estão aderidas. Estes resultados comprovam que as enzimas proteolíticas presentes no látex promovem a dissociação das células sem causar danos, já que as células conseguiram aderir novamente na garrafa de cultura.

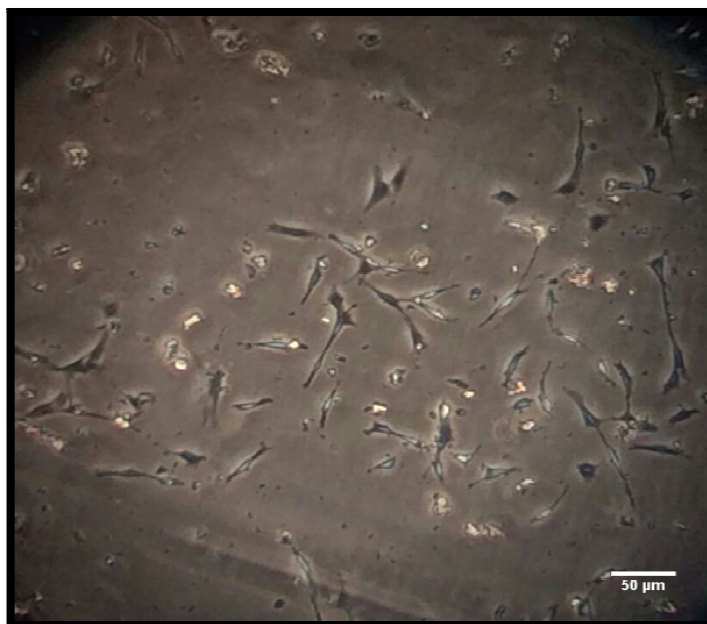


Figura 41. Osteoblastos (MC3T3) aderidos na garrafa 72 h, após a troca do meio no ensaio de dissociação.

A partir destes resultados, as membranas puras sem adição de fosfato foram incubadas por 48 h, para realizar o teste de adesão das células. Assim, com o propósito de extrair as enzimas que impossibilitam o teste de adesão, estas membranas após serem incubadas, tiveram seus meios descartados.

Depois disso, um novo meio completo enriquecido com as fases de fosfato de cálcio foi adicionado nas membranas puras, e incubadas por 48 h e logo após, este meio foi retirado com muito cuidado pelo canto dos poços para não extrair os fosfatos que ficaram precipitados sobre a superfície do látex.

As células foram fixadas e desidratadas e analisadas por MEV-FEG, onde foi observada uma grande quantidade de células planas com contato íntimo com as membranas, através dos lamelipódios e filopódios que podem ser observadas na Figura 42 identificadas com setas vermelhas, e conexões intercelulares com setas azuis, essas características apontam uma ótima adesão (Borges *et al.*, 2017).

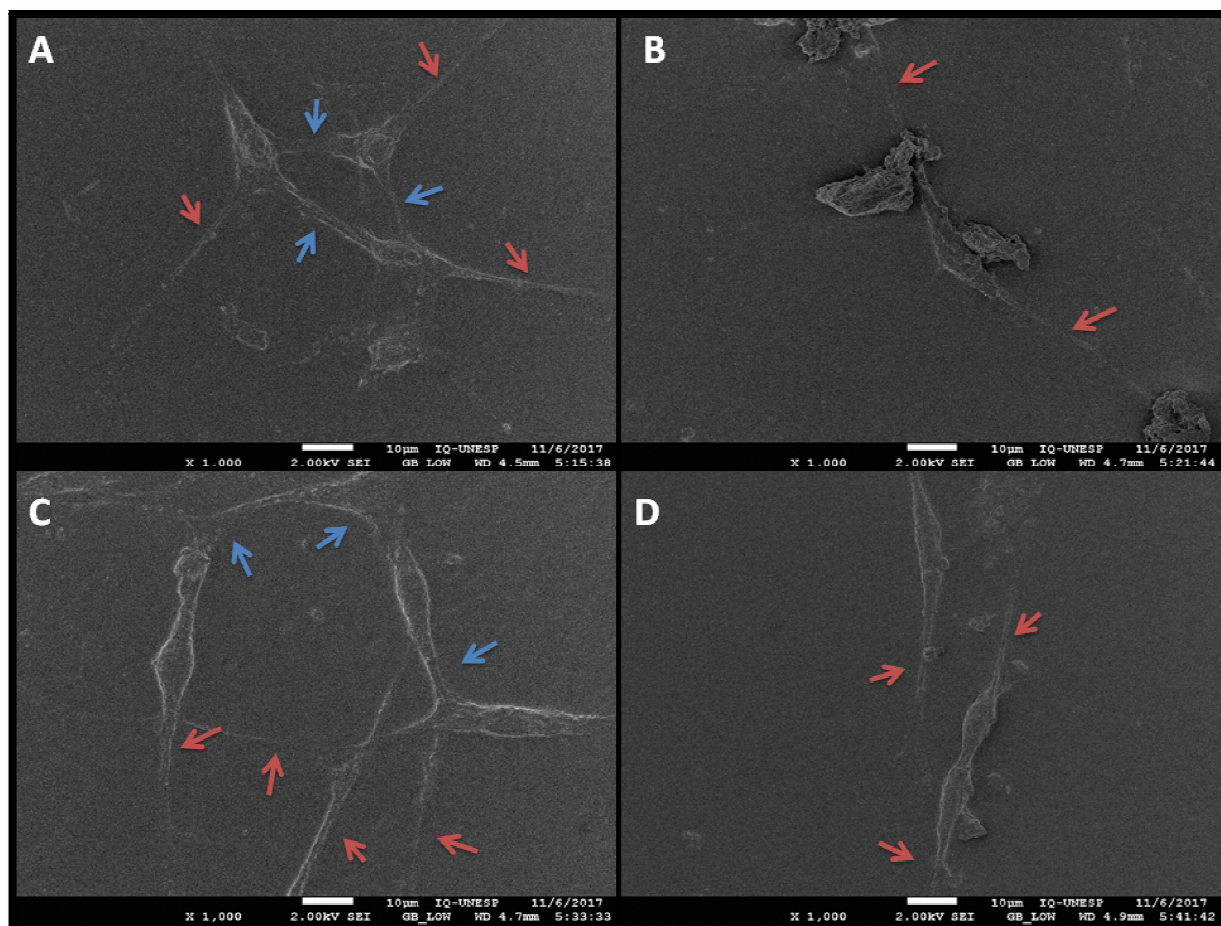


Figura 42. Micrografias das células MC3T3 na membrana de LN pura (A) e incorporadas com CPP (B) HA (C) α -TCP (D).

Segundo Deligianni *et al.* (2000), os osteoblastos tem melhor proliferação, adesão e mineralização em superfícies rugosas e arenosas. Sendo assim as fases de fosfatos de cálcio são ótimos candidatos para o recobrimento de polímeros, pois além destas características já citadas, o fosfato de cálcio é formado pelos principais constituintes ósseos se ligando quimicamente e diretamente ao osso, resultando em um melhor reparo ósseo (Deligianni *et al.*, 2000).

A Figura 43 apresenta uma ligação íntima entre aglomerados de CPP (A), HA (B) e α -TCP (C) e os osteoblastos na superfície das membranas de LN (setas verdes).

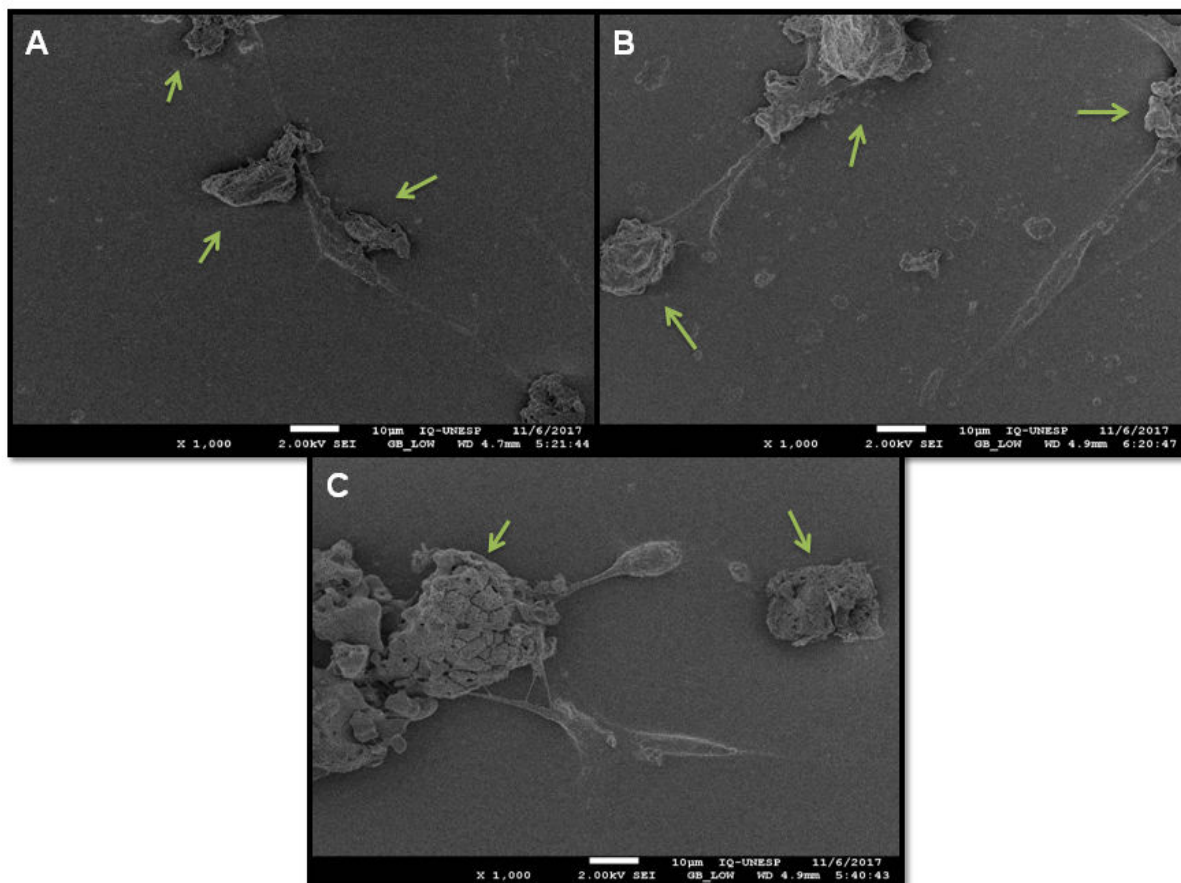


Figura 43. Micrografias das ligações íntimas entre aglomerados de CPP (A), HA (B) e α -TCP (C) e os osteoblastos.

Durante o ensaio de adesão foi possível observar através das da análise de MEV-FEG a divisão celular nas amostras LN pura e incorporada com CPP, HA e α -TCP (Figura 44), indicando qualitativamente que a células estão se proliferando.

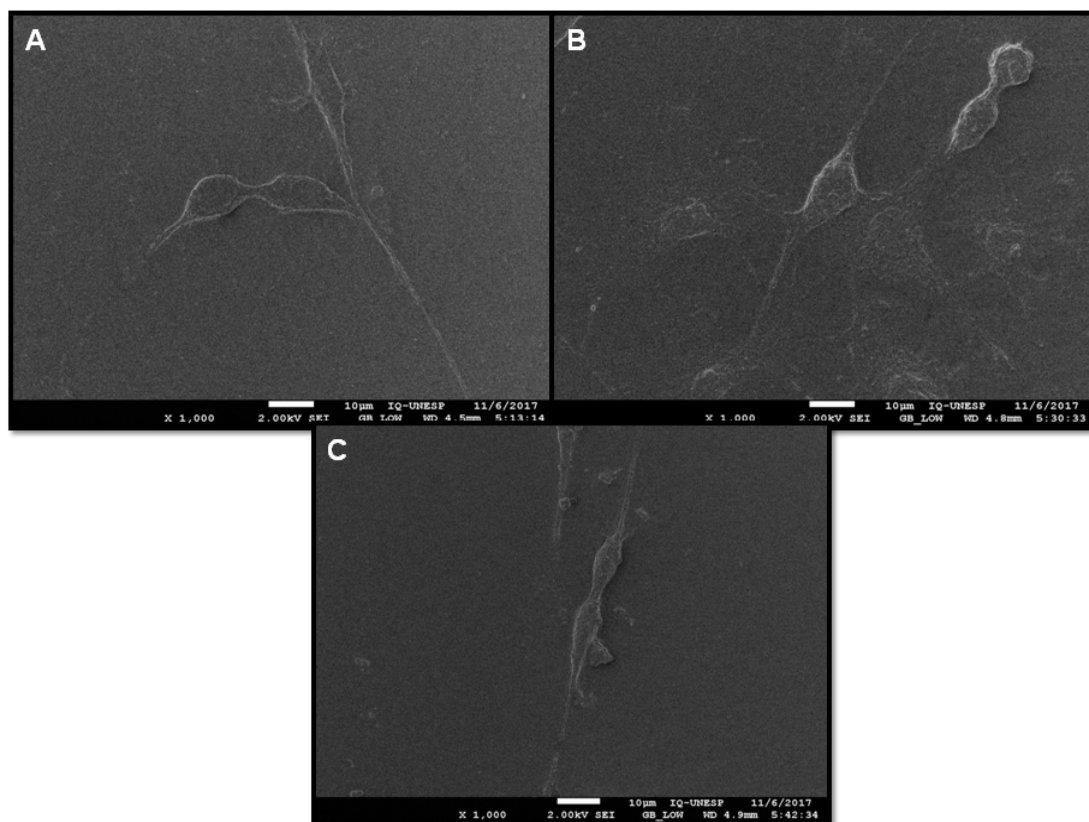


Figura 44. Micrografias das divisões celulares dos osteoblastos sobre as membranas incorporadas com CPP (A), HA (B) e α -TCP (C).

Em virtude dos resultados de citotoxicidade utilizando o MTT não serem confiáveis por sofrerem interferências das enzimas contidas no látex, foi realizado ensaios de toxicidade *in vivo* utilizando dois organismos alternativos (métodos alternativos), os quais são *Caenorhabditis elegans* e embriões de *Danio rerio* (Zebra Fish).

4.6. Ensaios de Toxicidade *in vivo*

4.6.1. Toxicidade em *Caenorhabditis elegans*

Este modelo animal foi escolhido porque o *C. elegans* é um nematóide que apresenta homologia do genoma de 60-80% com humanos, e compartilha uma multiplicidade de características biológicas em termos de fisiologia, anatomia, metabolismo e imunologia (Gonzalez-Moragas *et al.*, 2017). Além

disso, esses animais são pequenos (1 mm de comprimento), proliferativos, curto ciclo de vida e possuem poucos requisitos de manutenção, o que facilita o estudo em organismo multicelular (Gonzalez-Moragas *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2017).

Como citado na metodologia todas as membranas foram incubadas separadamente em tampão PBS por 1 dia (24h) e 5 dias (120h), onde estas amostras foram analisadas por 24 e 48h, após a adição do soro proveniente da incubação das membranas.

Nas primeiras 24h de experimento foi possível observar que as amostras LN 1d, LN 5d, CPP 1d, CPP 5d, HA 1d, HA 5d, e α -TCP 1d não apresentaram toxicidade significativa (Figura 45). No entanto a amostra α -TCP 5d apresentou toxicidade significativa, onde somente 31 % dos animais sobreviveram. É possível observar nas Figuras 46 e 47, a forma sinusoidal para as larvas vivas e de vara para as mortas.

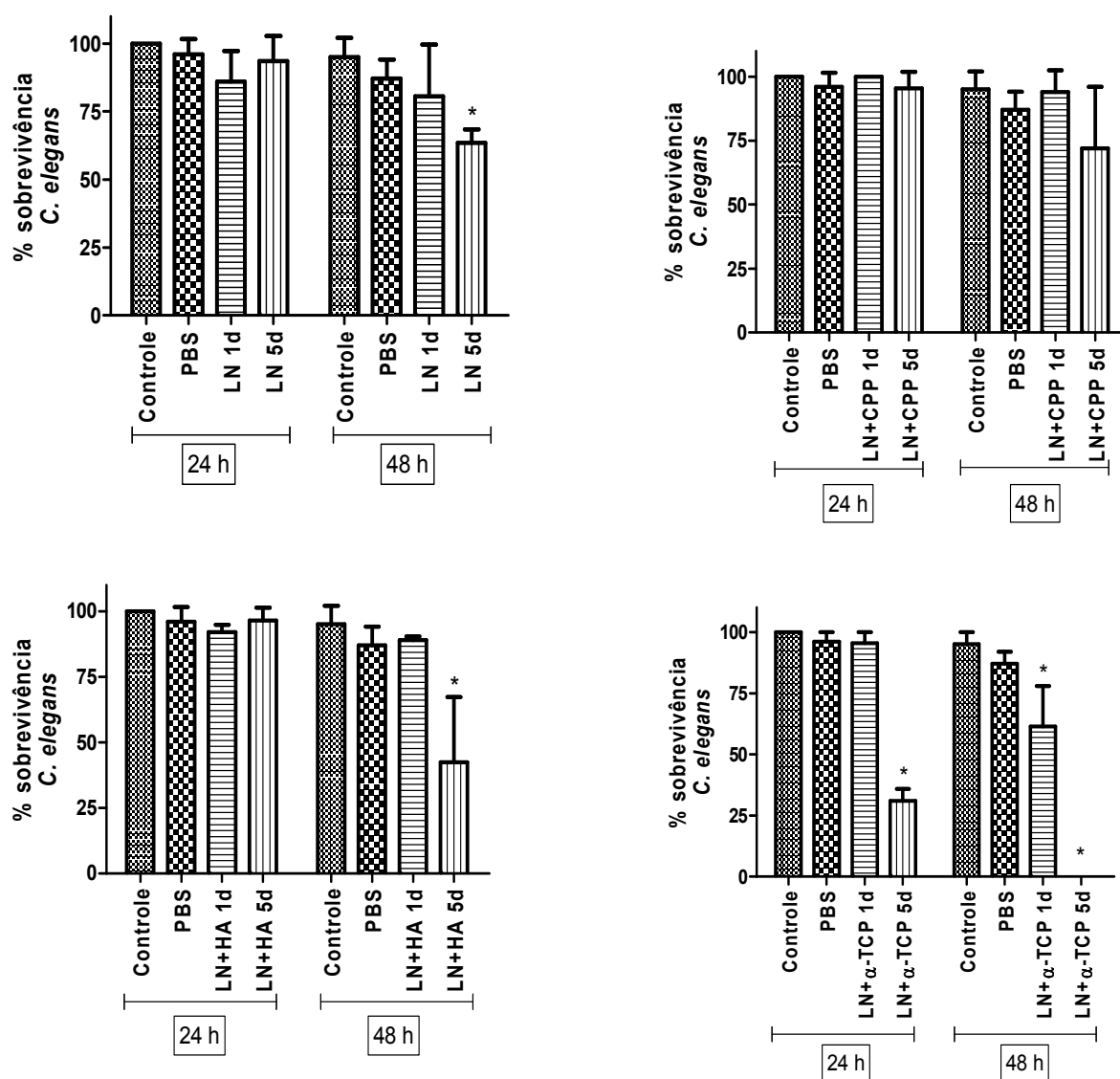


Figura 45. Porcentagem de sobrevivência de larvas de *C. elegans* N2 expostas as amostras testadas.

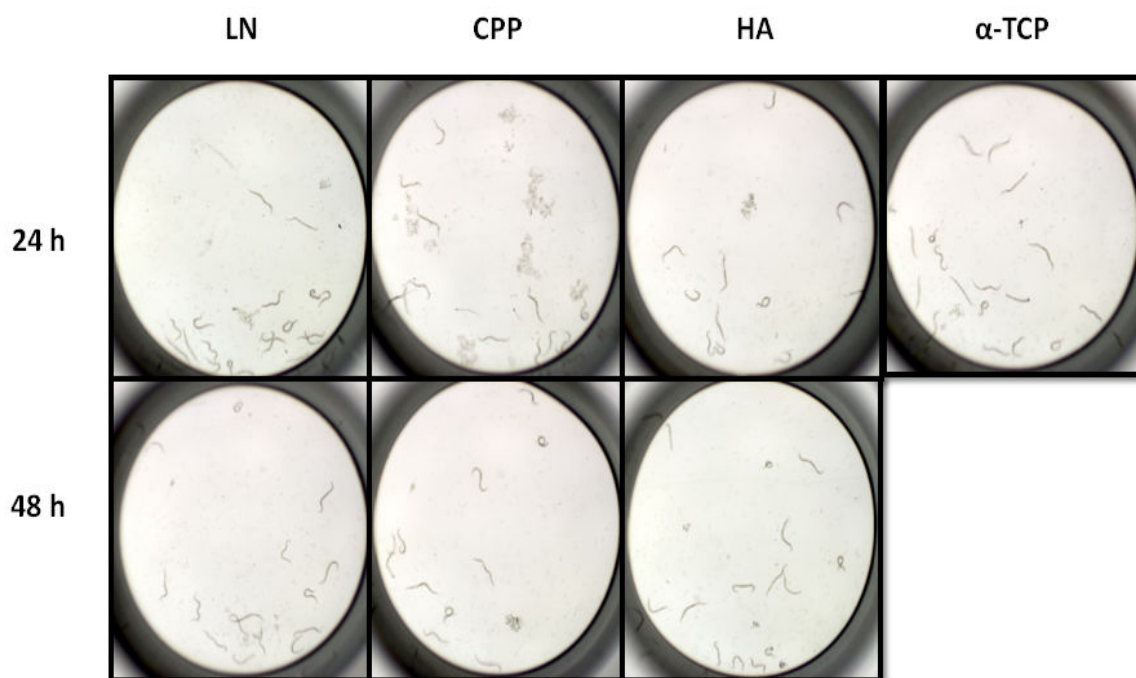


Figura 46. Larvas L4 vivas expostas a amostras provenientes da incubação de 24h do material em PBS analisadas 24 e 48 h após o início do experimento.

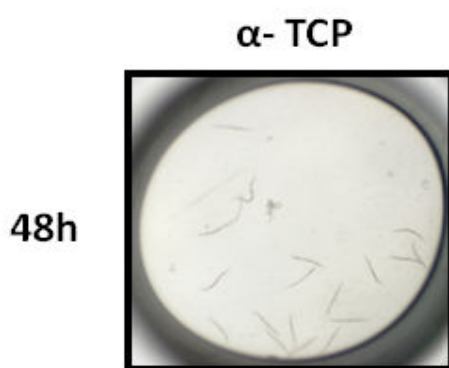


Figura 47. Larvas L4 mortas expostas a amostra proveniente da incubação do α -TCP por 24h em PBS analisadas 48 h após o início do experimento.

Realizando uma analogia com os resultados de liberação do α -TCP em 120 h, a membrana foi capaz de liberar uma concentração de 0,013mg/mL que representa 13% do total de α -TCP incorporado ao látex, vale salientar que o látex também libera substâncias pertencentes de sua constituição como por exemplo enzimas, proteínas, carboidratos, lipídios e outros componentes aumentando assim a concentração da amostra testada (Miranda *et al.*, 2017).

Após 48h de ensaio foi analisado novamente as taxas de sobrevivência dos animais expostos às amostras, onde é possível observar nas Figuras 45 e 48 que as amostras LN 1d, CPP 1d, CPP 2d e HA 1d não apresentaram toxicidade significativa.

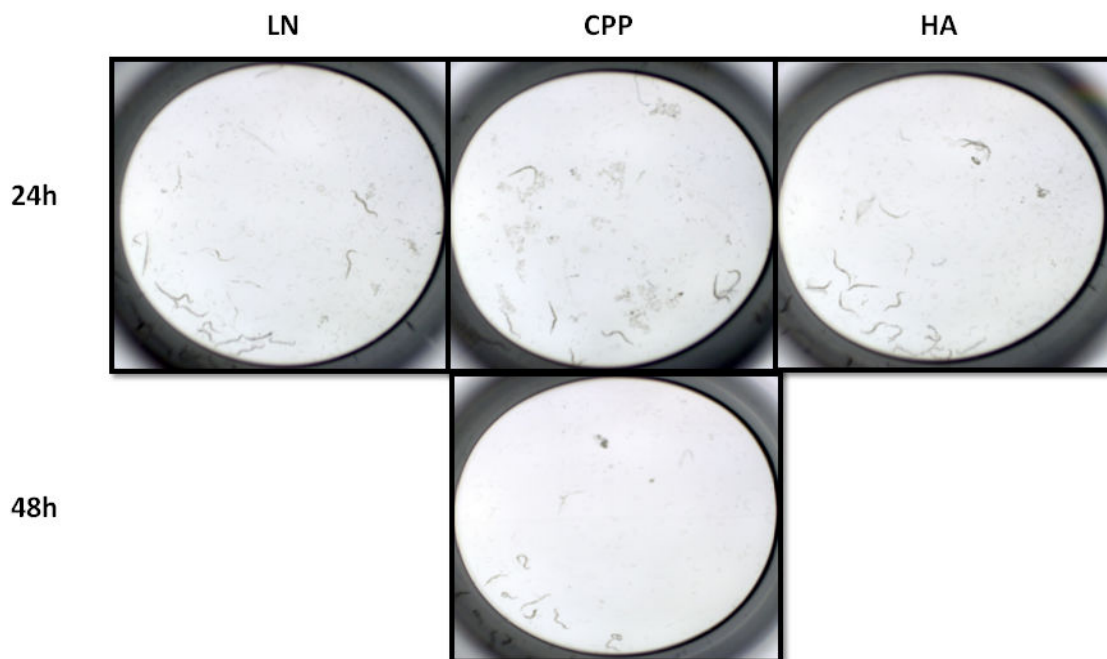


Figura 48. Larvas L4 vivas expostas a amostras provenientes da incubação de 5 dias do material em PBS analisadas 24 e 48 h após o início do experimento.

No entanto, os animais expostos as amostras LN 5 d, HA 5d, α -TCP 1d e α -TCP 5d apresentaram taxa de sobrevivência de 63%, 42%, 61% e 0% respectivamente.

Desta forma os estudos apontam que a amostra α -TCP 5d em contato de 24 h com as larvas e as amostras LN 5 d, HA 5d, α -TCP 1d e α -TCP 5d em contanto de 48 h apresentaram toxicidade (Figuras 45 e 49).

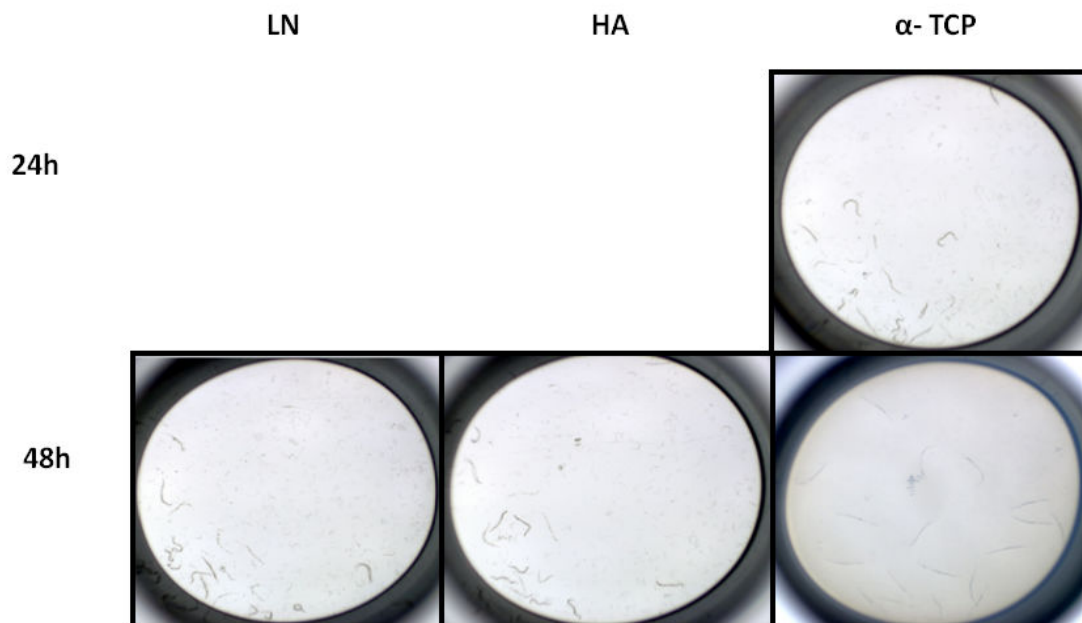


Figura 49. Larvas L4 mortas expostas a amostras provenientes da incubação de 5 dias do material em PBS analisadas 24 e 48 h após o início do experimento.

No entanto as amostras α -TCP 5d (24 h de exposição), α -TCP 1d e α -TCP 5d (48 h de exposição) apresentaram toxicidade moderada que talvez possa ser solucionada com um melhor controle da liberação, diminuindo as concentrações liberadas.

Além disso, a amostra α -TCP 5d com 48 h de exposição com os animais atingiu a taxa de 100% de mortalidade. Essa amostra apresentou esta taxa provavelmente pela concentração liberada ou pelo maior tempo de exposição.

Convém ressaltar que as amostras referentes CPP não apresentaram toxicidade, estes resultados podem estar ligados a baixa concentração liberada pela membrana em 24 e 48 h, que foi de 0,005 mg/mL (5%).

Além destes resultados, foi observado durante as contagens das larvas vivas e mortas, a presença de larvas L1 provenientes da reprodução das larvas L4 em todas as amostras, inclusive a amostra α -TCP 5d que foi tóxica. A Figura 50 apresenta as larvas L1 vivas em 24h. Entretanto, para a amostra α -TCP 5d no contato de 48 h, foi observado que as larvas L1 morreram (Mashock *et al.*, 2016).



Figura 50. Larvas L1 provenientes da reprodução das larvas L4.

A literatura relata ensaios de toxicidade utilizando *C. elegans* N2 como modelo experimental empregando nanomateriais, como por exemplo nanopartículas de ouro (Gonzalez-Moragas *et al.*, 2017), prata (Luo *et al.*, 2017) e de óxido de cobre (Mashock *et al.*, 2016). Enquanto, este estudo apresenta a toxicidade dos compostos liberados pela membrana de látex nestes animais alternativos, apresentando inclusive uma toxicidade menor que os nanomateriais acima relatado.

4.6.2. Ensaio de embriotoxicidade em *Danio rerio* (Zebrafish)

Em busca de outro modelo alternativo para o ensaio da toxicidade in vivo com animal vertebrado, e ainda mais sensível que o *C. elegans*, foi escolhido o teste em embriões do peixe *Danio rerio*, mais conhecido como Zebrafish ou Paulistinha. Além de ser mais sensível aos testes, este modelo também apresenta dados ligados ao desenvolvimento e má formação dos embriões (Teratogênese) (Augustine-Rauch *et al.*, 2016).

O grande motivo para utilização das fases embrionárias, ao invés do Zebrafish adulto para os ensaios de toxicidade, está ligado ao fato de que os estágios embrionários são extremamente sensíveis, sendo uma ótima saída para determinação de toxicidade de substâncias (Pandey e Guo, 2014). Além disso, devido à natureza transparente dos ovos e dos embriões permite a visualização de anormalidades morfológicas e estruturais em todo o corpo (Brannen *et al.*, 2010; Pandey e Guo, 2014).

As amostras testadas foram obtidas com a mesma metodologia utilizada no ensaio com *C. elegans*, sendo incubadas separadamente em tampão PBS por 5 dias (120h). É importante salientar, que para este ensaio somente foi testada as amostras incubadas por 5 dias, pois os resultados obtidos neste grupo apresentaram diferenças significativas. Após a obtenção das amostras, os ovos foram expostos, e analisados nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h.

Na Figura 51 pode-se observar de forma quantitativa que todas as amostras, inclusive o controle, apresentaram mortes. As amostras LN, CPP e HA obtiveram sobrevivência de aproximadamente 60%, que foi 16% menor que controle que foi de 76%. Este resultado indica uma baixa embriotoxicidade, pois os valores se aproximam da amostra controle que foi adicionada somente em meio embrionário, largamente utilizado como controle neste tipo de ensaio (Busquet *et al.*, 2014). No entanto, a amostra α -TCP a partir de 72 horas apresentou uma aumento de 24,82% na mortalidade dos embriões.

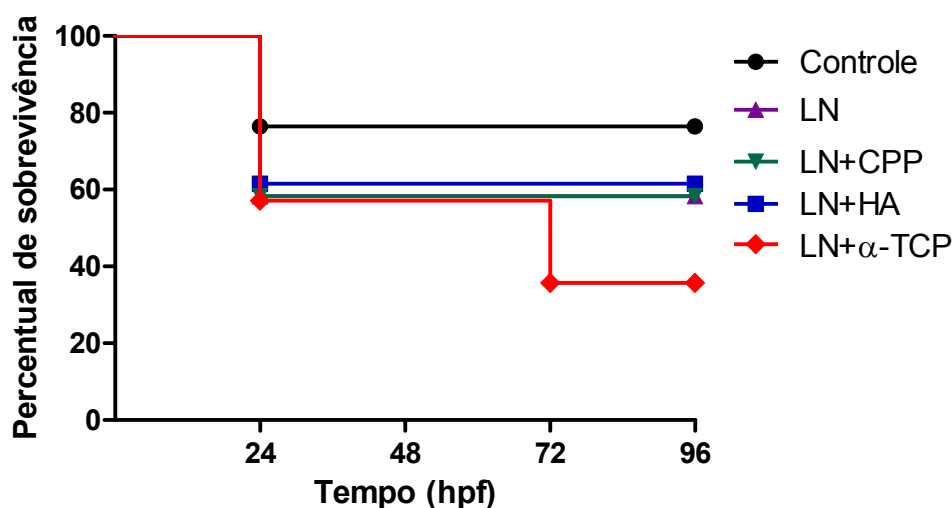


Figura 51. Gráfico de percentual de sobrevivência de Zebrafish expostos à amostras controle, LN, HA e α -TCP.

Diante destes resultados, também foi realizado as análises qualitativas dos embriões, onde foram classificados em vivo, morto, atrasado e mal formado. É possível observar na Figura 52 que o controle, LN, CPP, HA,

somente apresentaram animais vivos ou mortos. As Figuras 53 e 54 mostram todo o desenvolvimento dos embriões encontrados nestas amostras, bem como os mortos, já que não foi encontrada má formação.

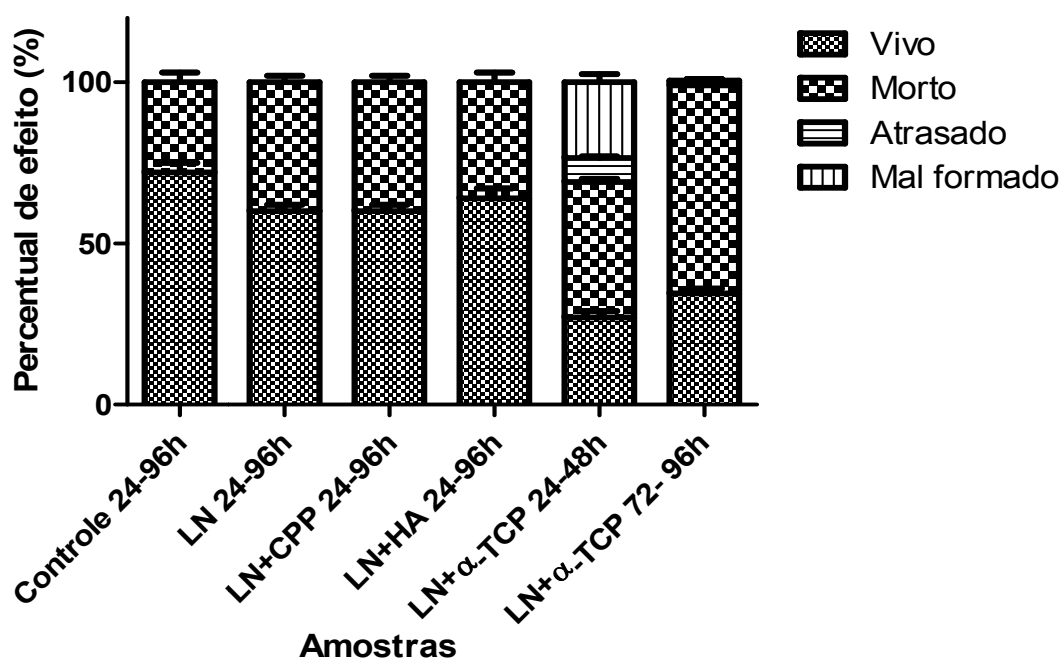


Figura 52. Gráfico qualitativo do percentual de efeito ocasionado pelas amostras testadas.

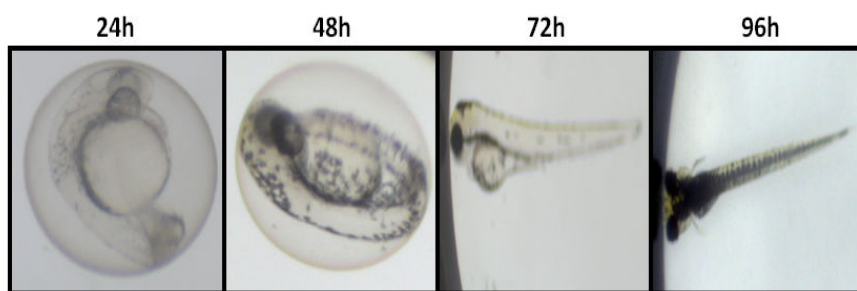


Figura 53. Desenvolvimento do embrião de Zebrafish encontrado nas amostras controle, LN, CPP e HA.

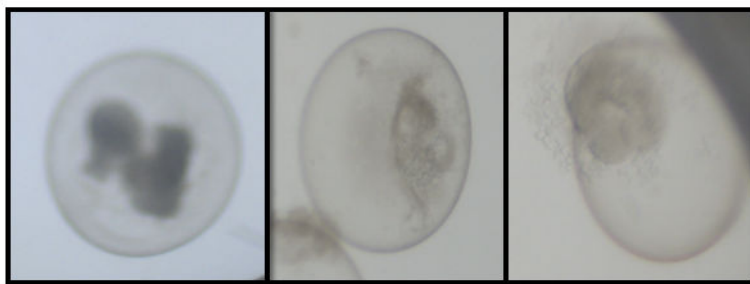


Figura 54. Embriões de Zebrafish mortos encontrados nas amostras controle, LN, CPP e HA.

Já os ensaios realizados com as amostras de α -TCP apresentaram vivos, mortos, atrasados e mal formados. Na Figura 55 foi observado nas primeiras 24 e 48h que aproximadamente 7% dos embriões expostos α -TCP liberado apresentaram atraso em seu desenvolvimento. Além disso, é possível observar uma morfologia que é característica de 12 horas de desenvolvimento, estando no estágio de gástrula com 50 % de epibolia, assim no tempo de 96 h apresentou desenvolvimento normal para o período (Pandey e Guo, 2014).

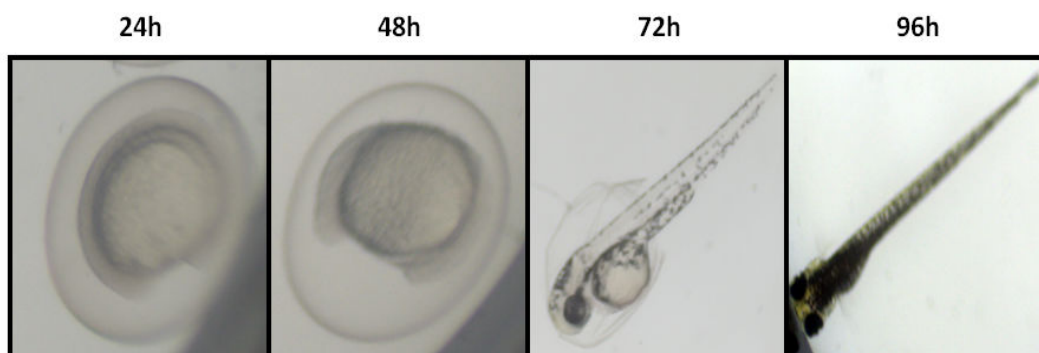


Figura 55. Desenvolvimento dos embriões com atraso expostos ao α -TCP proveniente da liberação das membranas, analisadas de 24 à 96h.

Realizando uma análise temporal dos resultados envolvendo os embriões mal formados, nos tempos 24 e 48h, observou-se que os animais expostos ao α -TCP apresentaram má formação, mas, no entanto em 72h de experimento todos os embriões mal formados morreram (Figura 56), aumentando assim o número de mortos para o grupo exposto a amostra

α -TCP de 43% para 64%. Este resultado corrobora com os resultados obtidos nos ensaios realizados em *C. elegans* onde o material contendo α -TCP apresentou ser muito tóxico.

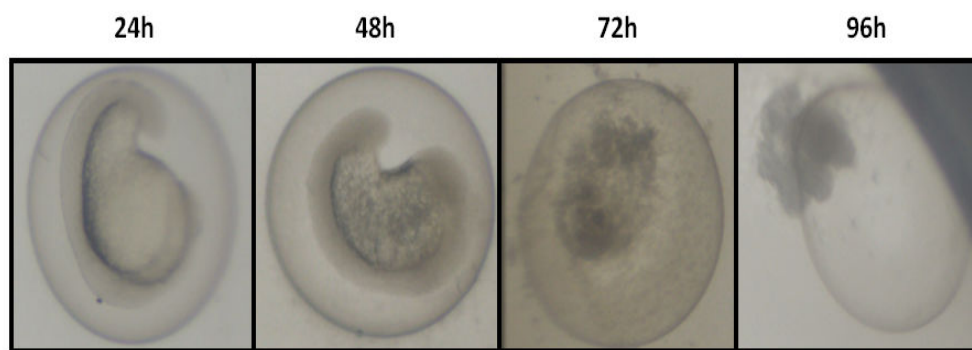


Figura 56. Embriões de Zebrafish mal formados e mortos encontrados na amostra α -TCP.

5. CONCLUSÃO

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

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

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

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como propostas para estudos futuros utilizando os materiais desenvolvidos neste trabalho, pode-se citar:

- Avaliar bioatividade das membranas incorporadas com as fases CPP, HA e α -TCP em fraturas críticas na calvária de ratos.
- Desenvolver compósitos de LN + fase de fosfato de cálcio que apresentou melhor bioatividade nos ensaio in vivo para liberação de outros compostos como proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), peptídeos de crescimento osteogênicos (OGP) e outro fatores de crescimento.
- Avaliar o comportamento da liberação desses compostos.
- Avaliar bioatividade do LN incorporado com a fase de fosfato de cálcio que apresentou melhor bioatividade e proteína ou peptídeo com atividade osteogênica em fraturas críticas na calvária de ratos.

REFERÊNCIAS

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

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

Brasília, 2007. Disponível em:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FLORIANO, J. F.; DE BARROS, N. R.; CINMAN, J. L. F.; DA SILVA, R. G.; LOFFREDO, A. V.; BORGES, F. A.; NORBERTO, A. M. Q.; CHAGAS, A. L. D.; GARMS, B. C.; DE OLIVEIRA GRAEFF, C. F. Ketoprofen loaded in natural rubber latex transdermal patch for tendinitis treatment. **Journal of Polymers and the Environment**, p.1-9, 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Northbrook, 2017. Disponível em:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PENG, S. Q.; ZHU, J. H.; LI, H. L.; TIAN, W. M. Cloning and characterization of a novel cysteine protease gene (HbCP1) from *Hevea brasiliensis*. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 5, p. 681-690, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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