

Jéssica Afonso Ferreira

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE ACETATO DE CELULOSE  
INCORPORADAS COM ADITIVOS FUNCIONAIS PARA USO EM  
ODONTOLOGIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia

2015

Jéssica Afonso Ferreira

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE ACETATO DE CELULOSE  
INCORPORADAS COM ADITIVOS FUNCIONAIS PARA USO EM  
ODONTOLOGIA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Dechichi  
Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero  
Prof. Dr. Denildo de Magalhães  
Prof. Dr. Rodrigo Borges Fonseca  
Prof. Dr. Paulo Cézar Simamoto Júnior

Uberlândia

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
(CIP) Sistema de Bibliotecas da UFU, MG,  
Brasil.

---

F383d  
2015

Ferreira, Jéssica Afonso, 1991

Desenvolvimento de membranas de acetato de celulose incorporadas  
com aditivos funcionais para uso em odontologia / Jéssica Afonso  
Ferreira. - 2015.

60 f. : il.

Orientadora: Paula Dechichi.

Coorientador: Reinaldo Ruggiero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Odontologia - Teses. 2. Periodontia - Teses. 3. Acetato de celulose  
- Teses. 4. tetraciclina - Teses. I. Dechichi, Paula. II. Ruggiero, Reinaldo.  
III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia. IV. Título.

---

CDU:616.314

## **DEDICATÓRIA**

### **À Deus,**

Agradeço por zelar de cada detalhe em minha vida, por ter me dado sabedoria e saúde para lutar por mais esta etapa da minha vida profissional. Sou grata pela família maravilhosa que me concedeu, pelas pessoas que foram colocadas em meu caminho e por todas as oportunidades que surgiram e que eu soube aproveitar. Em especial, agradeço a Nossa Senhora Aparecida e ao seu Santuário, lugar onde encontro paz, fortaleço minha fé e entrego todos os meus dias e escolhas. Agradeço por me ensinar a superar dificuldades e por acreditar que os sonhos são possíveis quando se tem esperança.

### **Aos meus pais Silvana e Fábio,**

Obrigada mãe por ser meu esteio e por se doar inteiramente a mim, sendo minha fonte de força e amor. Obrigada pai, por ser meu primeiro herói, por lutar diariamente para oferecer o melhor para nossa família, o senhor é meu exemplo de humildade e caráter. Sem dúvidas, vocês são as pessoas a quem devo toda minha vida e formação. Vocês me ensinaram que o maior tesouro que poderiam me deixar é a educação. Obrigada por sempre acreditar em mim e, sobretudo em meus sonhos. Vocês são minha luz. Amo vocês.

### **As minhas queridas irmãs, Patrícia e Flaviane,**

Por serem minhas primeiras amigas, por juntas acreditarmos desde a infância que tudo que se pode sonhar, também se pode realizar. Por ser minha inspiração profissional e por acreditarem tanto em meu potencial. Ainda iremos conquistar e celebrar conquistas, obrigada por estarem sempre tão perto de mim. Agradeço com carinho meu cunhado Marco, pelos momentos de descontração e alegria.

### **Aos meus familiares,**

Agradeço de forma especial, minhas queridas vovós que são para mim, meus maiores exemplos de vida. Agradeço meus padrinhos, madrinhas, tios, tias,

primas e primos por ser parte de mim, por me fazerem felizes e por todo amor que nossa família dispensa para cada momento de alegria ou dificuldade. Sou muito grata a Deus por me presentear com pessoas tão especiais para dividir toda a vida, vocês tornaram esta caminhada mais alegre a cada encontro e palavras de carinho. Obrigada por tudo!

**Ao meu amor Luiz Júnior,**

Ao meu amado noivo, por todos os doces momentos que passamos juntos estes seis anos. Sei que foram momentos difíceis, de angústia, ausência e, você sempre colaborou para tornar tudo mais fácil. Por isso, agradeço sua paciência, por me fazer feliz, por tudo que você proporciona para que a nossa vida seja mais leve e alegre. Você é meu descanso, meu companheiro e amigo, juntos ainda iremos vencer todos nossos sonhos. Em especial, agradeço a sua família, meus cunhados Ana, Flávio, Thamiris, Weber, meu sogro Luiz e principalmente, minha sogra Sirlene, por cuidar de mim como se fosse filha e por me ensinar o significado da palavra generosidade. Você sempre tão disposta e solícita nos mostra diariamente como é possível superar obstáculos.

**Ao João Luiz, Gabriel, Theodora, Manuela e Analice,**

Vocês são a esperança de um mundo melhor, me alegram diariamente com a doce existência de vocês. Obrigada por passar a ideia de que tudo pode ser mais simples se for enxergado pelos olhos de vocês.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao professor **Dr. Denildo de Magalhães**, por ter me concedido a grande oportunidade de seguir seus passos e aprender cada dia mais com sua experiência e profissionalismo. Agradeço por ter acreditado em mim desde minha graduação, pelas inúmeras vezes que me aconselhou e me fez tornar um ser pensante. Obrigada pelos desafios e por confiar em meu trabalho, com certeza amadureci a cada conversa, cirurgia e discussão sobre meu trabalho. O senhor é o grande responsável pela minha formação profissional, serei eternamente grata a tudo que já evolui nestes cinco anos de convivência.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero**, pela paciência e disposição em me ensinar um pouco de Química e por tornar tudo mais simples possível. Obrigada pelo entusiasmo com meu trabalho, por dedicar-se em conhecer mais do meio biológico para que os resultados fossem aperfeiçoados a cada metodologia. Agradeço todo tempo dispensado nessa dissertação em busca de conhecimento e no desenvolvimento de um novo produto para a sociedade, sempre com humildade e disposição. Devo muito a você.

A **Prof<sup>a</sup>. Dra. Marina de Melo Naves**, minha co-orientadora desde a Iniciação Científica, profissional a quem eu devo grande parte da minha evolução pessoal e profissional. Obrigada por todo apoio, independente do dia ou horário, sempre esteve disposta a me ajudar da melhor maneira possível. Nosso encontro na pesquisa me presentou com uma grande amiga, que desejo carregar em meu coração toda a vida, agradeço de forma especial todos os ensinamentos, conselhos, por me mostrar o melhor caminho e, principalmente, por acreditar em mim. Sempre vou lembrar com carinho das várias vezes que você quis me livrar das escolhas que não ia me trazer sucesso, das situações que já te trouxe frustração e da sua intenção em me formar para que eu fosse melhor a cada dia, isso mostra o quanto você se

preocupa com meu crescimento e sucesso. Meus sinceros agradecimentos por tudo que faz por mim, minha admiração por você é imensurável!

Ao **Prof.Ms. HelderHenrique Machado de Menezes**, sou grata por dividir comigo suas ideias e por acreditar na minha capacidade de colocá-las em prática. Obrigada por seus ensinamentos, por questionar cada resultado e por dedicar-se a minha dissertação para que ela realmente gerasse um produto com serventia e aplicabilidade em Odontologia. Além disso, serei eternamente grata por todas as oportunidades que já me proporcionou, pelo interesse em me formar especialista, pelos momentos de descontração e principalmente por indagar minha capacidade de pensar. Sem dúvidas, seus ensinamentos são essenciais para minha formação profissional. Espero retribuir toda a confiança depositada em mim com muito trabalho e bons resultados. Muito obrigada!

A **Prof<sup>a</sup>.Paula Dechichi**, pelo seu apoio e gentileza em colaborar com meu mestrado, por todos os ensinamentos, disponibilidade e por dividir comigo seu preciso tempo.

Ao **Prof. Dr.Paulo Cézar Simamoto Júnior**,por ser solícito e disposto a dividir com os alunos sua vasta experiência clínicae seu conhecimento científico. Obrigada pelas palavras positivas, pelos votos de sucesso e por ser exemplo de dedicação e amor a Odontologia.

A **Prof<sup>a</sup>. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares**, por ter me despertado o gosto e amor pela pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos e oportunidades que tive quando ainda conhecia tão pouco o universo científico você é especial.

Ao **Prof. Dr. Carlos José Soares**, por se dedicar e abrir mãos de suas próprias atividades para dedicar ao nosso Programa de Pós Graduação.

Admiro seu conhecimento e paixão pela pesquisa científica brasileira. Obrigada por dividir conosco suas experiências.

A **Profª Dra. Patrícia Gontijo de Melo**, profissional competente e fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Seus conhecimentos foram preciosos, obrigada por toda paciência e carinho para colaborar com meu aprendizado. Desejo muito sucesso em sua nova caminhada, agora como Doutora em Química.

**Aos professores da FOUFU**, meus eternos e sábios mestres, pessoas a quem eu devo meus primeiros passos nesta jornada profissional, agradeço por cada momento compartilhado, pelas aulas, clínicas, experiências divididas na Graduação e Pós Graduação, em especial aos queridos: **Veridiana Resende Novais Simamoto, Adérito Soares da Mota, Alfredo Júlio Fernandes Neto, Luiz Carlos Gonçalves, Márcio Magno, Marlete Ribeiro da Silva, Rosana Ono, Márcio Teixeira, Paulo Sérgio Quagliatto, Luís Henrique Araújo Raposo, Letícia Resende Davi, Paulo César, Flávio Domingues das Neves e Paulo Vinicius Soares**. Vocês despertaram em mim o amor pelo ensino e pela Odontologia.

A escola de pós-graduação, **HD Ensinos Odontológicos**, onde cursei minhas especializações em Periodontia e Implantodontia, por ser um lugar onde me sinto em casa e por ser fonte de conhecimento diário. Agradeço aos professores, amigos de especialização e amizades que se formaram nesta escola, em especial, Natália, Guilherme, Ricardo, Rafael, Elisandra, Abadia, Nívea, Franciele, Andréa, Fabiana e os demais funcionários que colaboram para que seja um ambiente de descontração e trabalho.

A minha amiga e irmã **Marcela Gonçalves Borges**, como foi bom ter você ao meu lado, durante todo este tempo, dividindo sonhos, inseguranças e também vitórias. São muitos anos de amizade e em todo tempo estivemos

juntas em busca de nossos ideais. Obrigada por estar sempre ao meu lado, ainda temos muito que conquistar e evoluir.

Ao **Guilherme Faria Moura**, meu amigo, colega de graduação, mestrado e parceiro de clínica da especialização, obrigada por todos os momentos que já dividimos durante tantos anos de amizade. Você é especial, espero comemorar muitas vitórias ao seu lado, conte sempre comigo.

As minhas eternas amigas **Laura, Larissa, Jéssica e Marina**, por serem presentes de Deus em minha vida, por estarem comigo independente da situação e por tornar esta caminhada mais alegre. Obrigada por todos os momentos que já passamos juntas e pela certeza que teremos sempre o carinho e amor uma das outras. Amo vocês!

Às doces amigas e mestres **Karla, Anne, Ana Luiza, Aline e Vanessa**, por me mostrar o quando esta caminhada pode ser leve e pelos momentos de descontração.

As amigas **Francielle, Nayara, Ludmilla, Thauana, Flávia, Edilene e Thais** pelos momentos felizes e preciosos que já dividimos juntas. Vocês são especiais.

**Aos amigos de mestrado**, que entre seminários, e dificuldades, aprendemos uns com os outros, nos ajudamos, tornamos amigos e tenho certeza que todos nós iremos colher muitos frutos desta linda jornada. Sucesso a todos!

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia**, por possibilitar a concretização desta etapa. Tenho orgulho de ter me formado nesta casa e ter usufruído de todas as oportunidades que já foram oferecidas enquanto aluno de graduação e pós-graduação. Desde a participação no PET, Iniciação Científica e agora na pós graduação por ter

me permitido ir além da Odontologia e conhecer as áreas de Engenharia Mecânica e Química, e desenvolver esta dissertação em laboratórios de qualidade.

Ao **Instituto de Química e ao Laboratório Físico Química de Materiais Lignocelulósicos** pela estrutura e equipamentos onde foram realizados todos experimentos deste trabalho.

A **CAPES e CNPq** pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

## **EPÍGRAFE**

*"Meu sonho não tem fim, e eu tenho muita vida pela frente."*

*Ayrton Senna, 1991*

## **SUMÁRIO**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	5
2. PROPOSIÇÃO.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4. RESULTADOS.....	27
5. DISCUSSÃO .....	38
6. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AC** - Acetato de Celulose

**ACGC** - Acetato de Celulose + Glicerofosfato de cálcio

**ACGCT** - Acetato de Celulose + Glicerofosfato de cálcio + Tetraciclina

**ACT** - Acetato de Celulose + Tetraciclina

**BGP** - BioGide Perio

**DMTA** - Análise Térmica Dinâmica-Mecânica

**DRX** - Difração de Raio x

**DSC** - Calorimetria Exploratória Diferencial

**FDA** - Food and Drug Administration

**GC** - Glicerofosfato de Cálcio

**GD** - GenDerm

**GS** - Grau de Substituição

**H** - Hora

**ICr** - Índice de Cristalinidade

**MEV** - Mircrocopia Eletrônica de Varredura

**Nm** - Nanometros

**P<sub>H</sub>**. Permeabilidade a vapor de água

**ROG** - Regeneração Óssea Guiada

**RTG** - Regeneração Tecidual Guiada

**T** - Tetraciclina

**Tg** - Temperatura de transição vítreo

**TGA** - Análise Termogravimétrica

## **RESUMO**

Fundamentados nos mecanismos de manipulação celular por meio de barreiras físicas (RTG - regeneração tecidual guiada), os procedimentos regenerativos buscam a colonização do defeito a ser reconstruído por células viáveis, capazes de promover a regeneração periodontal. A RTG baseia-se no conceito da osteopromoção, que se refere ao uso de meios físicos para promover um selamento total de um local anatômico para prevenir que outros tecidos, principalmente tecido conjuntivo, interfiram na osteogênese, bem como no direcionamento da formação óssea. Esta barreira é colocada em contato direto com a superfície óssea circundante, posicionando o periôsteo na superfície externa da membrana. Logo, os objetivos deste estudo foram desenvolver e caracterizar aspectos físico-químicos de membranas sintéticas de acetato de celulose utilizadas na regeneração tecidual guiada e tendo em vista o propósito de criar um novo produto, tornou-se necessário o conhecimento físico-químico de membranas biológicas já existentes no mercado com intuito de comparar as características existentes a fim de entender o comportamento das mesmas. Para isso, foram desenvolvidas quatro diferentes membranas sintéticas de Acetato de Celulose (AC), com variação da quantidade de AC dependendo dos aditivos: Tetraciclina (Tet) e Glicerofosfato de Cálcio (GPC). As membranas desenvolvidas foram: acetato de celulose (AC), acetato de celulose + glicerofosfato de cálcio (AC +GPC), acetato de celulose + tetraciclina (AC +Tet) e acetato de celulose + glicerofosfato de cálcio + tetraciclina (AC + GPC +Tet). Para efeito comparativo, foram selecionadas duas membranas biológicas absorvíveis comumente utilizadas na regeneração óssea guiada, são elas: GenDerm (Baumer, São Paulo, Brasil) e BioGide Perio (Geistlich, São Paulo, Brasil). Foi determinado o grau de substituição das membranas de Acetato de Celulose produzidas, tempo de degradação final das seis membranas por meio de espectrofometria, análise qualitativa da morfologia das superfícies e fraturas por meio de microscopia eletrônica de varredura, índice de cristalinidade por meio dos difrartogramas de raios-X, capacidade de molhabilidade por meio do ângulo

de contato, as propriedades de barreiras (permeabilidade a vapor de água) e propriedades térmico-mecânicas dos materiais. As novas membranas desenvolvidas apresentaram tempo de degradação de 100 dias, aspectos morfológicos viáveis com porosidade suficiente para passagem e difusão de nutrientes, permitem exclusão celular e são de fácil manuseio. Sendo assim, as membranas producidas apresentam potencial para serem utilizadas como barreira na regeneração de tecidos periodontais e ósseos.

**Palavras chaves:** Acetato de celulose, degradação, tetraciclina, glicerofosfato de cálcio, membrana, terapia periodontal.

## **ABSTRACT**

Based on the use of physical barrier to isolate periodontal defects of the gingival connective and epithelial tissues so that bone, periodontal ligament, and cementum can be regenerated from their own cells, it was defined the principle of guided tissue regeneration (GTR), a procedure which has been used in many clinical situations to promote periodontal and bone regeneration. Therefore, the aim of this study was to develop and characterize physical-chemical aspects of membranes of cellulose acetate used in GTR. Given the purpose of creating a new material, it became necessary to know the characteristics of existing membranes in the market, aiming to establish their properties and understand their operation compared to the materials we have produced. We prepared 4 different membranes: cellulose acetate (CA), cellulose acetate + Calcium glycerophosphate (CA + GPC), cellulose acetate + Tetracycline (CA + Tet) and cellulose acetate + Calcium glycerophosphate + Tetracycline (CA + GPC + Tet). For comparative effect, we selected two biological absorbable membranes commonly used in GTR, which are GenDerm and BioGide Perio. The characterization was made taking into account the degree of substitution (DS) of cellulose acetate, ultimate degradation time of the six membranes by spectrophotometrically, qualitative analysis of the morphology of the surfaces and their fractures by scanning electron microscopy (SEM), crystallinity index through the X-ray diffraction, wettability through the contact angle, the barrier properties (permeability to water vapor) and thermo-mechanical properties. The estimated degradation time of the membrane was 100 days. The results indicate the potential of using membrane CA, CAT, CA Ca-GP and CA Ca-GPT in GTR.

**Key Words:** guided tissue regeneration, cellulose acetate, calcium glycerophosphate, degradation,membrane.

## **1- INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO**

A terapia periodontal apresenta dois objetivos principais: redução ou eliminação da inflamação tecidual induzida pelo biofilme dental com seus subprodutos e correção de defeitos anatômicos causados pelo processo da doença, restabelecendo a integridade da inserção dental (Wang et al., 1998). Em estágios avançados da doença, cirurgias ressecativas tradicionais mostram-se eficazes em interromper a progressão da doença, por facilitarem a remoção dos depósitos subgengivais e devolver a morfologia dos defeitos periodontais de sustentação e revestimento (Lindhe, 2005). Todavia são limitadas no sentido de promover uma regeneração significativa do periodonto (Karring et al., 1993). Na presença destas limitações, técnicas regenerativas foram recomendadas para inibir o crescimento dos tecidos indesejáveis, principalmente o epitelial que apresenta velocidade de crescimento maior que os tecidos conjuntivo e ósseo (Caton et al., 1976).

A Regeneração Tecidual Guiada (RTG) é definida como procedimento utilizado na tentativa de regenerar estruturas periodontais perdidas. Além disso, é uma técnica utilizada para regenerar os defeitos ósseos ao redor de implantes, cirurgias de lesões endodônticas, cirurgias mucogengivais e bucomaxilo-faciais. Os estudos clínicos relacionados à regeneração periodontal em humanos são promissores, principalmente os relacionados com lesões de furca grau II e defeitos intraósseos de três paredes (Gantes et al., 1988; Tonetti, Pini-Prato & Cortellini, 1995).

Muitos materiais biodegradáveis e não biodegradáveis têm sido utilizados na confecção das membranas. Independentemente do material, as barreiras devem apresentar biocompatibilidade, semipermeabilidade, integração pelos tecidos do hospedeiro, maleabilidade clínica e capacidade de manutenção de espaço (Karring et al., 1993). Pelo menos uma contraindicação do uso de membranas foi relatada na revisão de literatura feita por Paganini em 1999, em que contra indica a utilização de membranas sobre tecido conjunto com enxertos gengivais livres, pois podem prejudicar a irrigação do enxerto provocando necrose. Embora ambos os tipos de membrana, atendam os objetivos biológicos e mecânicos dos eventos

regenerativos, existe a possibilidade da exposição destas após a sua utilização cirúrgica, com consequente contaminação da área (Slots et al., 1999; Sbordone et al., 1999). A exposição é a principal complicação do tratamento, com prevalência variando de 50 a 100% (Trombelli et al., 1997). Infecções nos locais tratados com RTG estão comumente associadas à contaminações das membranas expostas precocemente (Ling et al. 2003), influenciando de forma negativa o ganho de inserção e a regeneração dos tecidos, podendo ainda acelerar o processo de degradação da membrana (Cristina et al., 1987; Selvig et al., 1990; Wakabayashi et al., 1996; Chen et al., 1997).

Atualmente uma série de membranas tem sido utilizada e sua eficácia relatada positivamente na literatura. Essas membranas são classificadas de acordo com sua absorvibilidade pelo organismo em membranas não absorvíveis, como politetrafluretileno expandido (PTFE-e), e membranas absorvíveis, como o colágeno, tendo essas últimas a vantagem de dispensar a retirada num segundo ato cirúrgico. Tanto os materiais de preenchimento, como as membranas, não são de uso compulsório. Quando se opta pelo uso de materiais de preenchimento, várias possibilidades de escolhas simples ou combinadas se apresentam, porém, não há consenso sobre qual tipo de membrana oferece melhores resultados (Fugazzotto, 1999).

As membranas também podem ser classificadas de acordo com a sua natureza como sendo biológicas ou sintéticas. As sintéticas comerciais são produzidas a partir de materiais orgânicos, em sua grande maioria polímeros como polisulfona, poliamida, policarbonato, poliacrilonitrila, acetato de celulose; e materiais inorgânicos como metais e cerâmicas, carbono e óxidos metálicos (Habert et. al., 2006). De acordo com suas aplicações as membranas apresentam diferentes morfologias e se classificam em densas e porosas. Podem ser simétricas (isotrópicas) ou assimétricas (anisotrópicas), ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura (Habert et. al., 2006).

As membranas simétricas podem ser totalmente densas, possuir poros de tamanho uniforme ao longo da seção transversal ou poros cilíndricos que atravessam toda a espessura da membrana (Habert et. al., 2006). As membranas assimétricas podem apresentar um gradiente de porosidade ao longo da estrutura ou ainda possuir uma camada superior fina (denominada “pele”), densa ou com poros muito pequenos, responsável pela seletividade, suportada sobre uma subestrutura porosa, que na maioria dos casos proporciona resistência mecânica à “pele” e oferece pouca resistência ao transporte. Se ambas as camadas são do mesmo material, a membrana é dita assimétrica integral, caso contrário, se diferentes materiais são empregados no preparo das camadas da membrana, ela é chamada assimétrica composta. Uma representação esquemática dos diferentes tipos de morfologia das membranas (Habert et. al., 2006). Membranas simétricas podem ser formadas a partir do espalhamento de uma solução polimérica, seguido da evaporação da mesma. Já as membranas assimétricas são produzidas a partir da inversão de fases. Nesse processo, um polímero é dissolvido em um solvente adequado e a solução é espalhada formando um filme de espessura uniforme. A inversão se inicia pela desestabilização solução por indução de supersaturação tornando-se termodinamicamente instável dando origem a duas fases líquidas, uma rica e uma pobre em polímero. Na formação da membrana, a fase rica em polímero dá origem à estrutura da membrana, enquanto a fase pobre dá origem aos poros (Rodrigues Filho et al., 2009). A desestabilização pode ocorrer de distintas formas, dentre elas:

- ✓ Evaporação do solvente (dry): a solução polimérica possui um não-solvente e à medida que o solvente evapora a concentração do polímero aumenta ocasionando a precipitação do polímero.
- ✓ Imersão em banho de coagulação (wet): a solução polimérica é espalhada e imersa em um banho de não solvente que se difunde pela solução enquanto o solvente se difunde para o banho, ocasionando a precipitação.

✓ Evaporação-imersão (dry-wet): solução polimérica é espalhada, o solvente deixado evaporar por algum tempo e em seguida a solução é imersa em banho de não solvente onde ocorre precipitação.

✓ Precipitação térmica: solução é preparada em alta temperatura e então resfriada, desestabilização é causada pela mudança de temperatura.

✓ Precipitação induzida por vapor de não solvente: filme da solução polimérica é exposto a vapores de não solvente que se difunde na solução até que ocorra a precipitação (Meireles, 2011).

Independente da técnica utilizada para produção de membranas, pequenas variações na síntese, como o banho de coagulação, tempo de evaporação do solvente e composição da solução polimérica, podem acarretar diferenças significativas na morfologia da estrutura formada.

Este fato chamou a atenção de pesquisadores quanto à necessidade de desenvolver uma barreira que possua não só uma correta capacidade oclusiva para isolamento da área, mas também que garanta uma maior proteção inclusive quanto a possíveis contaminações bacterianas (Sbordone et al., 2000). Para tal, as membranas absorvíveis apresentam um significativo destaque, devido à sua capacidade de permitir a incorporação a elas de agente antimicrobianos. Dentre os mais comumente empregados temos a tetraciclina e seus derivados (Ruggiero et al., 2015).

Devido à necessidade de obter melhorias nas membranas já existentes, o colágeno tem sido pesquisado por ser um dos principais constituinte de membrana absorvíveis utilizadas em Odontologia. Ele é uma proteína fibrosa formada por três cadeias polipeptídicas em tripla hélice chamadas cadeias  $\alpha$ ., sendo este um dos principais constituintes da matriz extracelular de vários tecidos. Existem cerca de 20 tipos de colágeno, dos quais os mais conhecidos e abundantes são o colágeno Tipo I e II (Lee et al., 2001). O colágeno representa a principal macromolécula extracelular do tecido conjuntivo periodontal. Cerca de 90% do colágeno humano é do tipo I, o qual é encontrado principalmente em ossos e pele, sendo o colágeno tipo II o maior constituinte da cartilagem (Delaisse et al., 2000)

Há alguns anos o FDA (Food and Drug Administration - EUA) aprovou o uso de colágeno xenógeno (obtido principalmente de bovinos) como material para uso clínico. Frequentemente o colágeno é obtido do couro do animal ou tendão. Contudo, a confecção de membranas a partir desse tipo de colágeno com vistas à RTG exige tratamento químico à base de glutaraldeído, por exemplo, a fim de aumentar o número de ligações cruzadas do colágeno e, por conseguinte, o tempo de permanência no tecido e dificultar a passagem de células (Rocha et al., 2002). Uma alternativa é utilizar a cortical bovina óssea desmineralizada, cuja parte orgânica é constituída principalmente por colágeno tipo I densamente organizado (Taga et al., 1997). Segundo alguns autores este material apresenta baixo potencial imune quanto implantado em animais e humanos (Hyder et al., 1992; Benqué et al., 1997)

Na degradação do colágeno estão envolvidas várias enzimas, no entanto as principais são as enzimas chamadas colagenases, que são especializadas em hidrolisar o colágeno. As colagenases pertencem à família das enzimas chamadas metaloproteinases da matriz (MMPs), estas formam uma grande família de enzimas zinco dependentes responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo e, recentemente foi demonstrada sua ação em momentos da modelação e remodelação óssea (Bord et al., 1996). Somente as MMP-1 e MMP-8 podem clivar o colágeno tipo I. Essas colagenases podem ser produzidas por diversos tipos celulares, entre elas estão os fibroblastos, macrófagos, células epiteliais e osteoclastos, bem como por algumas bactérias que estão presentes na cavidade oral como a *Porphyromonas gengivalis* (Wang & McNeil, 1998). Apesar das diversas vantagens do colágeno, sua aplicação tem uma desvantagem que é a excessiva maleabilidade quando em contato com o fluido corporal (Bord et al., 1996).

Outro material estudado neste trabalho foi a celulose, por ser um material natural abundante, o qual tornou-se um assunto em pauta na ciência, tão logo ferramentas apropriadas para investigações científicas tornaram-se disponíveis para melhorar as propriedades dos materiais.

Portanto, a celulose tem sido considerada como um dos mais importantes objetos de estudo na história da ciência dos polímeros (Zugenmaier, 2008).

Na celulose existem duas fases distintas dentro das microfibrilas: uma fase com grande ordenamento das moléculas denominada fase cristalina e outra, com baixo ordenamento, denominada porção amorfá. Estas regiões não possuem fronteiras bem definidas, mas parece haver uma transição de um arranjo ordenado das cadeias de celulose para um estado desordenado ou amorfó, no qual estas cadeias apresentam uma orientação menor. As regiões ordenadas são conhecidas sob os nomes de microcristalitos, cristalitos e micelas (D'Almeida, 1988).

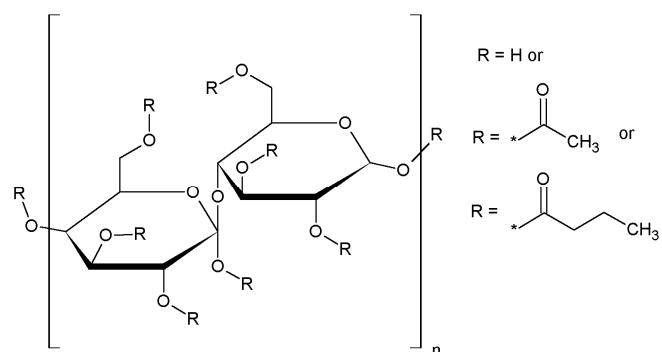
Na região cristalina, a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento, e à solvatação (absorção de solvente). A resistência à tração na região cristalina é quinze vezes maior do que o valor apresentado na região amorfá, onde a fibra tem sua maior flexibilidade (D'Almeida, 1988).

A estrutura física da celulose é responsável por suas reações não uniformes e, também por algumas de suas propriedades. Por exemplo, a fração de grupos hidroxilos disponíveis para interagir com a água é limitada, ao ponto de tornar a celulose insolúvel nesse meio, apesar de sua polaridade. Outro fato é a presença de regiões amorfás e cristalinas, nas quais a acessibilidade de agentes químicos normalmente difere, levando a produtos de reação não uniformes (Nascimento, 2010). Normalmente a celulose é convertida em derivados que possuem propriedades físicas e químicas muito peculiares abrindo caminho para uma série de aplicações. Dentre as aplicações está a produção de ésteres celulósicos, que têm se mostrado de grande importância comercial (Edgar et. al., 2001).

O Acetato de Celulose (AC) é um dos derivados de celulose mais importantes e amplamente utilizados na produção de fibras, plásticos, revestimentos resistentes aos solventes, para processos de separação por membranas, em sistemas de liberação controlada de fármacos, entre outros (Fischer et al., 2008 ). O mesmo já vem sendo estudado como dispositivos de liberação local, e por isso gera-se a hipótese do mesmo poder ser utilizado na Odontologia. Além disso, este foi o primeiro material usado como

membrana em RTG. Apesar da obtenção de resultados preliminares favoráveis, este material não possuía os requisitos químicos e estruturais ideais para o uso como barreira à migração epitelial. Um dos problemas referente a esse material é a dificuldade de degradação em meio aquoso, que consiste no maior componente do fluido corporal (Fischer et al., 2008). O acetato é produzido pela esterificação dos grupos hidroxila das unidades de glicose com grupos acetila. Uma vez que cada unidade de glicose contém três grupos hidroxilas livre, ligados aos carbonos 2, 3 e 6, pode se obter materiais com diferentes graus de substituição (GS) de acordo com número médio de grupos hidroxila esterificados com grupos acetila por unidade de glicose da celulose (Fischer, 2008). O GS pode variar de zero, para a celulose, até três para um triacetato (O AC pode ser obtido a partir de uma reação de acetilação da celulose, pelo método homogêneo ou heterogêneo). Ambos os métodos caracterizam-se pela reação da celulose com uma mistura de ácido acético e anidrido acético, na presença de ácido sulfúrico ou perclórico como catalisador. A principal diferença entre os dois métodos é que na acetilação heterogênea, utiliza-se um agente não-inchante, como o tolueno, que mantém a estrutura fibrosa da celulose. Na acetilação homogênea não se utiliza, este agente e, então a celulose é solubilizada no meio reacional, o que causa mudanças na morfologia das fibras de celulose (Sassi e Shanzy, 1995). Estes autores propuseram que quando as cadeias de celulose tornam-se suficientemente acetiladas, as mesmas desprendem - se do cristal tornando-se solúveis em meio reacional, em consequência, o cristal torna-se quebradiço e isso pode ser identificado por uma série de entalhes de onde foram retiradas as cadeias acetiladas. No caso da reação heterogênea, o agente não – inchante evitaria que as cadeias se desprendessem dos microcristais, mesmo depois de acetiladas, ou seja, a acetilação ocorre apenas nas cadeias localizadas na superfície das fibras de celulose. Uma das aplicações do AC é a produção de membranas para revestimento, processos de separação e liberação controlada de fármacos (Nyman et al., 1982).

As principais propriedades do AC são: alta dureza, resistência ao impacto, alto brilho, transparência, textura agradável e a ausência de eletricidade estática (Edgar et al., 2001; Quintana et al., 2013; de Moraes et al., 2015). A solubilidade do acetato de celulose depende, entre outras coisas, do GS, que é definido pelo nível de acetilação do acetato de celulose. O tipo de substituinte e o número médio de grupos que substituem as hidroxilas nas unidades glicosídicas. O GS tem relação direta com as propriedades finais do derivado, como por exemplo, a solubilidade em água. O GS pode variar de um grupo hidroxila substituído, monossubstituído até a forma totalmente substituída, trissubstituído. O GS varia de 0 para a celulose, até 3 para um derivado trissubstituído. Os acetilados com GS igual a 3 são solúveis em diclorometano e outros solventes clorados, GS de 2-2,5 são solúveis em acetona, dioxano, tetrahidrofurano e acetato de metila. AC com GS igual a 1 pode ser solúvel em água (Fischer et al., 2008). A estrutura química do AC encontra-se ilustrada na Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura química do AC.

Um aditivo já estudado em incorporações de membrana de AC é a Tetraciclina (TET), um antibiótico bacteriostático, com um amplo espectro de ação, atuando contra as bactérias gram - negativas e gram - positivas, por inibição específica do procariótico (bacteriano). A síntese de proteínas é, portanto, inibida na bactéria, impedindo a replicação e ocasionando a morte celular (Cunha et.al., 1982). Além do efeito antibacteriano, a tetraciclina tem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, uma vez que reduz a atividade dos fagócitos, dos leucócitos polimorfo - nucleares e a quimiotaxia de neutrófilos e leucócitos (Delaisse et. al. 2000).

É comum na literatura estudos que associam Dispositivos de Liberação Local (DLL) com a TET. Tais dispositivos podem ser classificado em biodegradáveis e não-biodegradáveis, dependendo do material utilizado como carreador (Soskolone & Freidman, 1996). Dispositivos que não são biodegradáveis possuem a vantagem de permitir o controle do tempo de exposição do ambiente da bolsa ao fármaco. Entretanto, a principal limitação desse tipo de dispositivo é a necessidade de remoção do mesmo após o período de tratamento e vários problemas têm sido associados a esse procedimento (Medlicott et al., 1994). Normalmente é necessária competência técnica para assegurar a retirada completa do dispositivo, devido à possibilidade do aparecimento de efeitos indesejáveis, tais como inflamação do tecido local, resultantes do reconhecimento pelo sistema imune de um corpo estranho (fragmentos). Além disso, a remoção do dispositivo é acompanhada por um rápido declínio na concentração antibacteriana (Tonetti et al., 1990), o qual está freqüentemente associado com recolonização da bolsa periodontal. Por outro lado, os dispositivos biodegradáveis possuem a grande vantagem do paciente necessitar de apenas uma visita ao dentista para a inserção do dispositivo, que não precisa ser retirado, havendo diminuição das visitas clínicas e assegurando melhor adesão do paciente ao tratamento (Steinberg & Friedman, 1988; Bromberg et al., 2001).

Rams & Slots (1996) afirmaram que os procedimentos terapêuticos atuais indicam que as doenças periodontais poderiam ser controladas pela supressão de algumas espécies de microrganismos do biofilme subgengival que são considerados patogênicos e pela interferência na recolonização destes sítios por estas bactérias. Observaram que o debridamento mecânico/cirúrgico na região radicular usualmente não erradica certos microorganismos como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermédia* e *B. forsythus* do ecossistema subgengival devido ao seu potencial invasivo para as células epiteliais e tecido conjuntivo. Com o intuito de intensificar a ação da raspagem e alisamento radicular no tratamento das periodontopatias, o emprego de agentes antimicrobianos

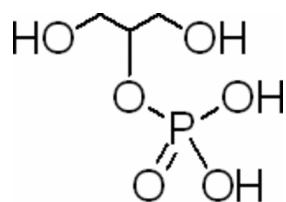
tópicos como os bochechos bucais ou a irrigação do sulco gengival e a colocação de dispositivos que liberem lenta e gradualmente essas substâncias foram propostos (Rams & Slots 1996).

O Actisite® foi um dos primeiros dispositivos de liberação local com tetraciclina utilizado em humanos. É um sistema constituído por fibras (copolímeros plásticos, não reabsorvíveis e biologicamente inertes) impregnadas com pó de tetraciclina hidroclorídrica 25% (Goodson et al., 1983).

A fibra é introduzida subgengivalmente até ocupar completamente o interior da bolsa periodontal e mantida in situ com o auxílio de um adesivo a base de cianocrilato por 7 a 10 dias (Goodson et al., 1991). O antibiótico é, então, liberado através do mecanismo de difusão e osmose. Esse sistema de liberação controlada é capaz de manter concentrações de tetraciclina no fluido gengival excedendo 1.300 mg/mL por um período de sete dias, com concentrações médias de 43 mg/mL nas porções superficiais da parede de tecido mole da bolsa (Ciancio et al., 1999). A fibra de tetraciclina combinada com raspagem dental e aplinamento radicular apresentou resultados significativamente melhores nos parâmetros de profundidade de sondagem e ganho clínico de inserção conjuntiva quando comparado ao tratamento convencional em pacientes incluídos na terapia periodontal de manutenção (Newman et al., 1994; Kinane & Radvar, 1999).

Nos últimos anos, novos veículos para liberação local de tetraciclina têm sido desenvolvidos. Jones et al., (2000) publicaram estudo no qual descrevem as características e avaliações clínicas preliminares de um gel de tetraciclina hidroclorídrica (5%) com capacidade de aderir aos tecidos gengivais e a superfície dental, permitindo a liberação lenta da droga no interior da bolsa periodontal. A pré-avaliação do desempenho clínico mostrou que o gel, associado a raspagem e alisamento radicular, promove diminuição da profundidade de sondagem e reduz o número de patógenos periodontais no interior da bolsa (Jones et al., 2000).

Outro aditivo importante trata-sedo Glicerofosfato de cálcio (GPC), uma fonte de cálcio e fosfato inorgânico obtido através da hidrólise por fosfatase alcalina no sangue e fluido de tecidos, pode ser convertido em hidroxiapatita, quando aplicado em proteção pulpar direta (Imai et al., 1993). Além disso, este medicamento não é citotóxico (Hayashi Y et al., 1992). O Fosfato de cálcio, incluindo a hidroxiapatita é gerado através do fenômeno de biomíneralização, e é o principal componente dos ossos e dentes no corpo humano. Cristais de hidroxiapatita possuem aplicações médicas e podem acelerar a regeneração óssea e reparação ao serem utilizados em defeitos ósseos (Fujishiro, Hench, e Oonishi, 1997). No entanto, a hidroxiapatita é considerada quebradiça (Okada & Furuzono, 2012). A fim de superar estes problemas, estes cristais podem ser combinados com numerosos polímeros bioativos (Bonfield, Grynpas, e Tully, 1981), incluindo as proteínas e polissacáridos (Ehrlich, 2010). A estrutura química do GFC pode ser observada na Figura 2.



**Figura 2.** Estrutura química do GPC.

A hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , representa de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes e é o principal constituinte mineral destas estruturas. Por ser sintética e possuir propriedades de biocompatibilidade, sua produção vem sendo estudada por pesquisadores na busca da obtenção de um produto onde não coexistam fases diversas baseadas no sistema Ca-P. (Hench & Best, 2004). A síntese de fosfatos de cálcio via precipitação química apresenta vantagens, quando comparada aos métodos tradicionais de produção de hidroxiapatita, devido ao seu baixo custo e simplicidade, no entanto a maioria dos procedimentos sintéticos apresenta a formação de

produtos não estequiométricos e mistura de fases. Os processos de precipitação consistem na adição de grupos fosfatos a suspensões que contenham íons cálcio, podendo partir de diferentes reagentes. Dependendo do processo de fabricação, as propriedades da hidroxiapatita apresentam características diferentes. Quando sintetizadas em altas temperaturas, apresentam boa cristalinidade e cristais grandes. Quando sintetizadas em baixas temperaturas, apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos. Atualmente os métodos de precipitação por via úmida são preferidos, devido ao produto produzido apresentar características similares às do tecido ósseo e dentário. Para a obtenção dos materiais à base de fosfato de cálcio, dependendo dos métodos utilizados, dos reagentes e das variáveis adotadas, é possível obter inúmeras fases, além de uma grande variação de comportamentos resultantes de outras variações, tais como: defeitos cristalinos, área superficial, afinidade por materiais orgânicos encontrados no meio fisiológico, etc (Rigo, 2007).

Investigações científicas relatam membranas reabsorvíveis, com certas vantagens sobre as membranas de primeira geração tais como melhor biocompatibilidade, oclusão celular precisa, integração do tecido e semi-rigidez (Shen et al., 1997). Além disso, testes de viabilidade celular indicam que membranas de AC possuem boa biocompatibilidade para proliferação de fibroblastos (CS Wu, 2014). Caracterização de novas membranas são comumente realizadas por meio de tempo de degradação, por métodos espectroscópicos, morfologia de superfícies e fraturas por microscopia eletrônica de varredura e índice de cristalinidade através de difração de raios X, como se pode observar em estudos publicados na literatura (Ruggiero et al., 2015; Filho et al., 2011).

Considerando a hipótese de que tetraciclina, glicerofosfato de cálcio e acetato de celulose apresentam características que podem favorecer a RTG, torna-se viável investigar e desenvolver membranas constituidas por estes materiais.

## 2. PROPOSIÇÃO

## **2.1. Objetivo geral**

Desenvolver e caracterizar aspectos físico-químicos de membranas sintéticas de acetato de celulose e comparar com membranas biológicas comerciais utilizadas na regeneração tecidual guiada.

## **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Comparar membranas sintetizadas com membranas biológicas comerciais.
- ✓ Determinar Grau de Substituição das membranas de Acetato de Celulose produzidas – caracterização química.
- ✓ Estabelecer tempo de degradação final das 06 membranas por meio de espectrofometria – caracterização físico-química.
- ✓ Analisar qualitativamente a morfologia das superfícies e fraturas das 06 membranas por meio de microscopia eletrônica de varredura – caracterização física;
- ✓ Analisar quantitativamente o índice de cristalinidade das 06 membranas por meio dos difratogramas de raios-X obtidos no Difratômetro XRD – caracterização físico-química;
- ✓ Analisar quantitativamente a capacidade de molhabilidade das 06 membranas por meio do ângulo de contato fornecido pelo Goniômetro – caracterização físico-química;
- ✓ Analisar quantitativamente as propriedades de barreiras (permeabilidade a vapor de água) das 06 membranas por meio do Copo de Payne – caracterização físico-química.
- ✓ Analisar as propriedades térmico-mecânicas em modo de tensão das 06 membranas – caracterização física.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Delineamento Experimental:**

1. *Unidade Experimental:* Membranas de Acetato de Celulose: Acetato de Celulose Puro (AC), Acetato de Celulose com Tetraciclina (AC + Tet), Acetato de Celulose com Glicerofosfato de Cálcio (AC+GPC) e Acetato de Celulose com Tetraciclina e Glicerofosfato de Cálcio (AC+GPC+TET) e

Membranas Biológicas Comerciais: Genderm/Baumer (GD) e BioGide Perio/Geistlich (BGP).

2. *Fatores em Estudo*:Tempo de degradação, permeabilidade, cristalinidade, resistência térmica, resistência mecânica à tração, grau de substituição do acetato de celulose, análise morfológica da superfície e ângulo de contato.

3. *Variáveis respostas*: Tempo (dias), fluído a vapor ( $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), índice de cristalinidade e ângulo de difração ( $2\Theta$ ), deformação ( $\mu\text{m}$ ) e ângulo de contato ( $\Theta$ ).

4. *Métodos de Análise*:Determinação do grau de substituição,tempo de degradação analisada em espectrofometria (UV), análise morfológica (MEV), difração por meio de raios-X (DRX), ângulo de contato (Goniômetro), análise de permeabilidade (Copo de Payne), análise termogravimétrica (TGA), análise termomecânica (DMA).

5. *Análise dos dados*:Os dados serão analisados de forma descritiva e comparativa.

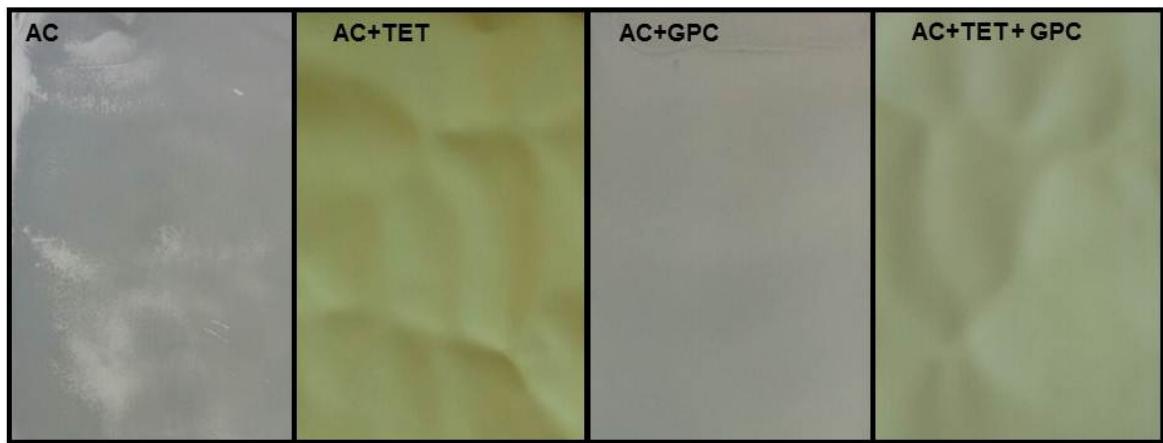
### **3.1. Descrição e preparo das amostras**

Para a confecção das membranas desenvolvidas neste estudo foram utilizados polímeros de Acetato de Celulose de massa molar média 30.000 g mol<sup>-1</sup>(Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, Missouri, USA), Tetraciclina em cápsula (Biopharma, Uberlândia, Brasil), Glicerofosfato de Cálcio de massa molar média 210.14 g (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, Missouri, USA), Acetona 99,5 % (Vetec Química Fina Ltda, Brasil) e Água Deionizada.Foram desenvolvidas quatro diferentes membranas sintéticas de Acetato de Celulose, demonstradas na Figura 3, com concentração fixa de 10 gramas de reagentes dissolvidos em 80 ml de acetona e 20 ml de água (10,0% m/v polímeros/solvente), com variação da quantidade de AC dependendo dos aditivos: Tetraciclina (TET) (0,5%)e Glicerofosfato de Cálcio (GPC)(0,04%), conforme na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição das composições das membranas de Acetato de Celulose sintetizadas.

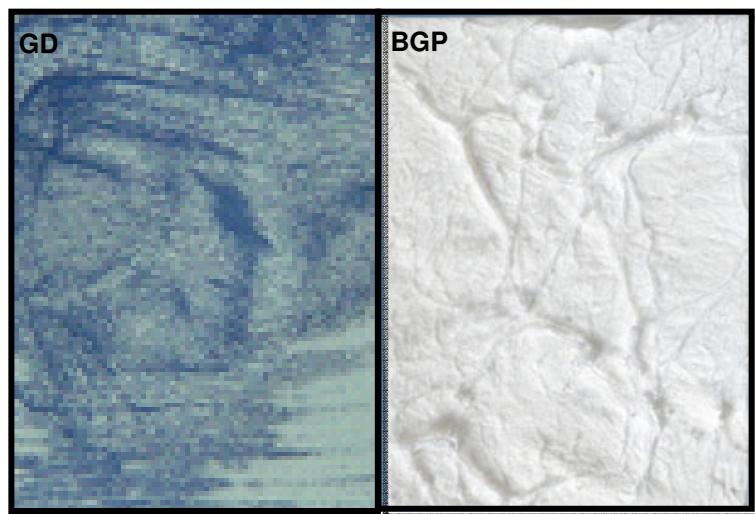
Membranas	Polímeros	Solvente (80:20ml)
AC	10,00 g AC	Acetona + Água
AC +TET	9,950 g AC + 0,050 g TET	Acetona + Água
AC + GPC	9,996g AC + 0,004 g GPC	Acetona + Água
AC +TET + GPC	9,946g AC + 0,005 g TET + 0,004 g GPC	Acetona + Água

Os sistemas foram submetidos à agitação mecânica por um período de 24 horas, após esse período as membranas foram espalhadas com espessura de 400 µm com um Aplicador de Filme Ajustável de alta precisão, com ajuste de 1 em 1 micron, largura útil de 15 cm conforme norma ASTM D823-53 (TKB Erichsen Comercial e Técnica Ltda, São Paulo, Brasil), as amostras foram manipuladas no interior de uma caixa de vidro de 50x50cm, com tampa e dois pequenos orifícios centralizados na parte horizontal para entrada das mãos, climatizada com acetona durante 1 hora antes do experimento, de tal forma que o solvente evaporasse de maneira uniforme em toda extensão dos filmes. As membranas formadas permaneceram em dessecador sob vácuo a temperatura ambiente durante 24 horas, com objetivo de eliminar resíduos de solvente, em seguida armazenadas em grau cirúrgico em local fresco, seco longe da luz do sol.



**Figura 3.** Membranas de Acetato de Celulose produzidas.

Tendo em vista o objetivo de desenvolver um novo produto, tornou-se necessário o conhecimento físico-químico de membranas biológicas já existentes no mercado com intuito de comparar as características existentes e entender o comportamento das mesmas. Para efeito comparativo, foram selecionadas duas membranas biológicas absorvíveis comumente utilizadas na regeneração óssea guiada, são elas: GenDerm (Baumer do Brasil, São Paulo, Brasil) e BioGide Perio (Geistlich do Brasil, São Paulo, Brasil), demonstradas na figura 4.



**Figura 4.** Membranas comerciais de origem bovina.

### **3.2. Caracterização das membranas**

#### **3.2.1. Determinação do Grau de Substituição**

A solubilidade do acetato de celulose depende, entre outras coisas, do GS, que é definido pelo nível de acetilação do acetato de celulose. O tipo de substituinte e o número médio de grupos que substituem as hidroxilas nas unidades glicosídicas. O grau de substituição do material produzido foi determinado de acordo com o procedimento disponível em Cerqueira et al., 2010. Adicionou-se 5,0 mL de hidróxido de sódio (0,25 mol L<sup>-1</sup>) e 5,0 mL de etanol a 0,10 g de acetato de celulose, deixou-se a mistura em repouso. Após 24 horas adicionou-se 10,0 mL de ácido clorídrico (0,25 mol L<sup>-1</sup>) e deixou-se em repouso por mais 30 minutos, em seguida a solução foi titulada com hidróxido de sódio, utilizando-se o indicador fenolftaleína.

A determinação do grau de substituição (GS) por via química baseia-se na determinação da porcentagem (% m/m) de grupos acetila (% GA) que foram substituídos na cadeia celulósica. O GA é calculado a partir da equação 1:

$$\% \text{GA} = \frac{(V_{bi} \mu_{bt} - V_a \mu_a) * M * 100}{m_{AC}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde,

% GA: porcentagem de grupos acetila

$V_{bi}$ : volume de hidróxido de sódio adicionado

$V_{bt}$ : Volume de hidróxido de sódio obtido na titulação

$\mu_b$ : molaridade do hidróxido de sódio

$V_a$ : volume de ácido clorídrico adicionado

$\mu_a$ : molaridade do ácido clorídrico

M: massa molar dos grupos acetila

$m_{AC}$ : massa de acetato de celulose utilizada

### 3.2.2.Tempo de degradação das membranas

O processo de degradação foi efetuado através do método descrito na literatura (Ruggiero et al., 2015) quando as amostras (1,0 cm<sup>2</sup> de área) foram imersas em 20 mL de uma solução tamponada com fosfato (pH = 7,2) a uma temperatura fixada em 36, 5 ± 0,5°C. Foram realizadas medidas de comprimento de onda definido em 280nm por meio do

espectrofotômetro UV (Shimadzu Corporation, São Paulo, Brasil, modelo UV 2501 PC, pertencente ao Instituto de Química/UFU)(Figura 5). A cada medida, as membranas foram alteradas para uma nova solução para evitar atingir o equilíbrio de dissolução. As análises foram realizadas em triplicatas e os tempos de análise da degradação foram de 0 h (dia inicial), 24 (1 dia), 48 (2 dias), 96 (4 dias), 192 (8 dias), 384 (16 dias), 768 (32 dias), 1536 (64 dias) e 2400 horas (100 dias), sempre duplicando os dias de análises com objetivo de estrear resultados caso as membranas não degradassem completamente em tempo viável para conclusão deste trabalho. Diariamente as membranas eram analisadas para serem levadas a leitura caso desaparecerem antes do tempo programado para próxima leitura. A solução tampão-fosfato era trocada a cada leitura com objetivo de não entrar em equilíbrio. Sendo assim, o tempo total de degradação foi estimado após a construção de um gráfico da absorbância em função do comprimento de onda e o processo foi acelerado através do aumento da temperatura até 50 °C e diminuição do pH da solução, esse processo conduz a degradação total da membrana.



**Figura 5.**Espectrofotômetro de ondas modelo UV.

### **3.2.3. Análise qualitativa da morfologia das superfícies e fraturas por meio de microscopia eletrônica de varredura**

Foram realizadas análises morfológicas de superfícies e fraturas das membranas em MEV. As fraturas dos filmes foram obtidas por meio de quebra após imersão em nitrogênio líquido por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram fixadas em tira de carbono sob os “stubs” metálicos, no plano horizontal para avaliar superfície e no plano vertical para avaliar o interior das membranas, as mesmas foram levadas ao dessecador por 24 horas, após receberem fina camada de ouro, com 15 nm de espessura. O conjunto foi posicionado no metalizador MED 10 (Oerlikon Balzers Coating, São Paulo, Brasil)(Figura 6A), cujo cilindro contém placa de ouro em sua parte superior. O cilindro de vidro forma uma câmara que se fecha hermeticamente e em seguida se conecta a bomba de vácuo, que produz vácuo na ordem de 10-1 mmHg. A câmara fica em conexão com reservatório de Argônio que substitui o ar e cria atmosfera deste gás. Assim estabelece-se entre a amostra e a placa de ouro diferença de potencial suficiente para ionizar o gás. Os íons positivos bombardeiam a placa de ouro arrancando seus átomos, que se depositam na superfície da amostra em espessura de aproximadamente 100-200 Å, com período de sputtering de 2-3 minutos. Após a metalização as amostras foram examinadas no MEV (EVO MA 10, CARL ZEISS, Germany), a voltagem de 10 KV. (Figura 6B). As imagens microscópicas foram obtidas do centro da amostra em aumento de 5000k tanto para superfícies quanto para fraturas.



**Figura 6.A – Metalizador.B - Microscópio Eletrônico De Varredura.**

### 3.2.4. Índice de cristalinidade e difração de raios-X

Os difratogramas de raios-X das membranas foram obtidos no Difratômetro XRD (Shimadzu Corporation, São Paulo, Brasil, modelo XDR-6100 pertencente ao Instituto de Química/UFU, operando a uma potência de 40 Kv com 30 mA de corrente, empregando-se radiação de CuK  $\alpha$  (1,5418 Å), com  $2\theta$  variando de 5° a 37°, com velocidade de varredura de 1° min<sup>-1</sup> e resolução de 0,02 °.

O índice de cristalinidade ( $I_{cr}$ ) das membranas foram obtidos pela Equação de Lorentz, demonstrada na equação 2, fornecidos pelo programa computacional do próprio equipamento que analisa os difratogramas de acordo com a convolução de picos baseados na Lorentziana conforme Figura 7 e fornece o índice de cristalinidade baseado na região cristalina da amostra, expresso em Kcps\*deg.

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x - x_c)^2 + w^2} \quad \text{Equação 2}$$

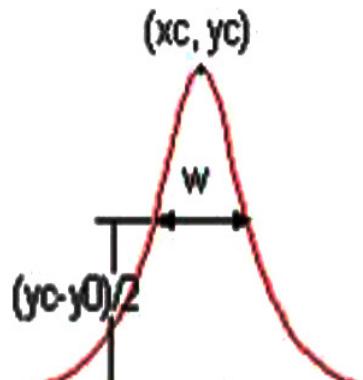
Onde,

$y_0$ : 0;

$x_c$ :  $x_{\text{centro}}$ ;

w: largura à meia altura;

A: área.

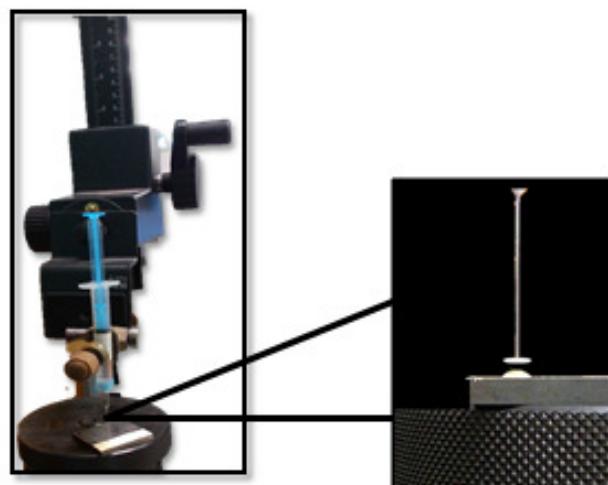


**Figura 7:** Exemplo de curva função Lorentziana.

### 3.2.5. Análise da molhabilidade por meio de ângulo de contato

A molhabilidade das superfícies pode ser quantificada pelo ângulo de contato de um líquido com o substrato sólido. A molhabilidade da superfície é largamente dependente da energia de superfície e influencia o grau de contato entre a membrana e o ambiente fisiológico; quanto maior a molhabilidade, maior é a interação da superfície do biomaterial com o ambiente biológico (Bico et al,

2002). Logo, a molhabilidade foi quantificada com a aplicação de uma micro-gota de água destilada por meio do Goniômetro (Ramé-Hart, Inc. Modelo NRL A-100 pertencente à FEMEC/UFU) (Figura 8) nas 06 membranas. Foi utilizada uma micro-seringa para liberar volumes iguais ( $0,5 \mu\text{L}$ ) do líquido na superfície das membranas.



**Figura 8:** Goniômetro.

Sendo assim, as amostras de 40 mm de comprimento e 10 mm de largura foram fixadas em uma lâmina de vidro por meio de fita adesiva. Uma gota de água destilada de  $50 \mu\text{L}$ , com o auxílio da seringafoi liberada sobre o filme em três pontos diferentes, as imagens foiram capturadas por meio de uma câmera digital de alto foco e as mesmas foram analisadas pelo software SurfTens 3.0 que ajusta o perfil da gota e determina o ângulo de contato. Os ângulos foram fotografados 20 s após a gota entrar em contato com as membranas. Foram feitas quantificações da molhabilidade em 03 amostras de cada tipo de membrana, totalizando 18 imagens. Foram calculados a média e o desvio padrão dos valores de ângulos de contato encontrados.

### 3.2.6. Análise da permeabilidade ao vapor de água

O ensaio de permeabilidade ao vapor de água foi realizado utilizando-se a técnica do copo de Payne (ASTM D1653-08). O copo de Payne consiste em um conjunto formado por um copo de alumínio com boca rosqueada, com variações de diâmetro interno de modo a formar uma base para

a fixação do filme, anéis de vedação de borracha e alumínio e uma tampa rosqueada vazada no centro, cuja área de permeação foi 7,373 cm<sup>2</sup>.

As membranas foram cortadas em forma de discos, e adaptadas em um ependorf com diâmetro igual ao interno, proporcional ao do copo de Payne, devido ao fato das membranas biológicas comerciais não possuírem diâmetro suficiente para serem levadas ao copo original. Previamente foi calculada a espessura com média das medidas em cinco regiões diferentes de cada filme, utilizando o micrômetro digital Mitutoyo (0-25 mm). (Mitutoyo Sulamérica Ltda, São Paulo, Brasil). Este sistema é colocado em um dessecador, na presença do agente secante Pentóxido de Fósforo (P<sub>2</sub>O). Na qual se pode avaliar a capacidade de cada uma das membranas de permear água através daperda de água do interior do copo.

Triplicatas foram realizadas para cada membrana e as mesmas foram colocadas em ambiente com temperatura controlada, o sistema foi acompanhado com registros das massas em intervalos de 60 minutos nas primeiras 10 horas, seguidas de medidas feitas a cada 24 horas durante 7 dias.

### 3.2.7. Análise térmico-mecânica (DMTA)

O comportamento dinâmico-mecânico das membranas foi estudado utilizando o DMA Thermal Analyzer, (TA Instruments, São Paulo, Brasil, modelo Q800, pertencente ao Instituto de Química/USP, São Carlos, Brasil). Os experimentos foram realizados em modo de tensão. As dimensões do corpo de prova foram de 16,0 mm x 5,0 mm, com espessuras de 200 µm. As condições experimentais foram: amplitude de oscilação de 8,0 µm, 1 Hz de frequência, aquecimento de -140 °C até 200 °C, em uma taxa de aquecimento de 3,0 °C min<sup>-1</sup>, força estática de 10 mN e ajuste automático de tensão em 125 %.

### 3.2.8. Análise Termogravimétrica

As análises foram feitas em um analisador térmico (Shimadzu Corporation, São Paulo, Brasil, modelo TGA-50, pertencente ao Instituto de Química /UFU). Cerca de 7 mg da amostra foi aquecida, em cadinhos de

alumínio, até 600 °C na velocidade de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>.

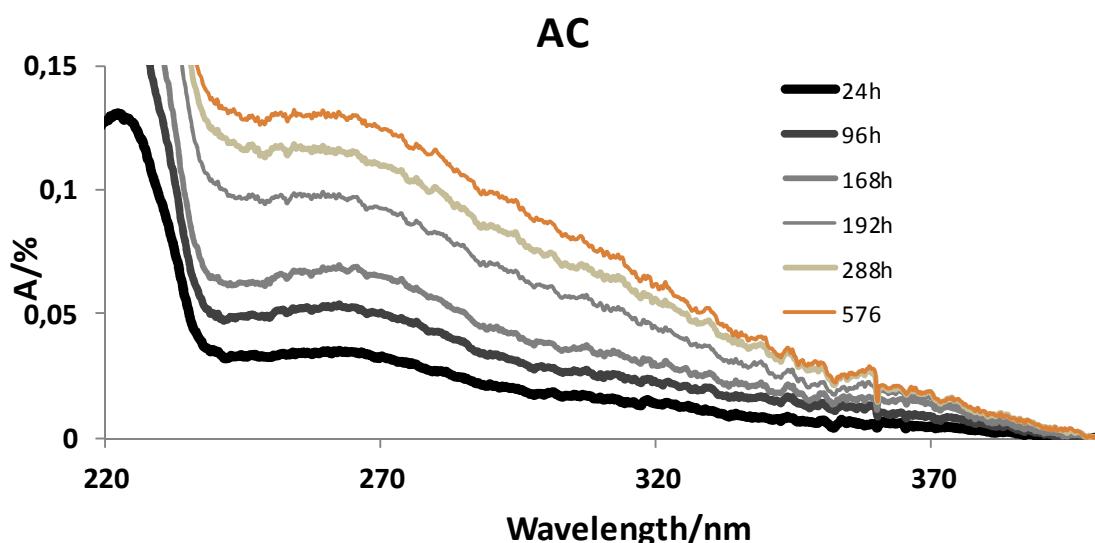
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Grau de substituição

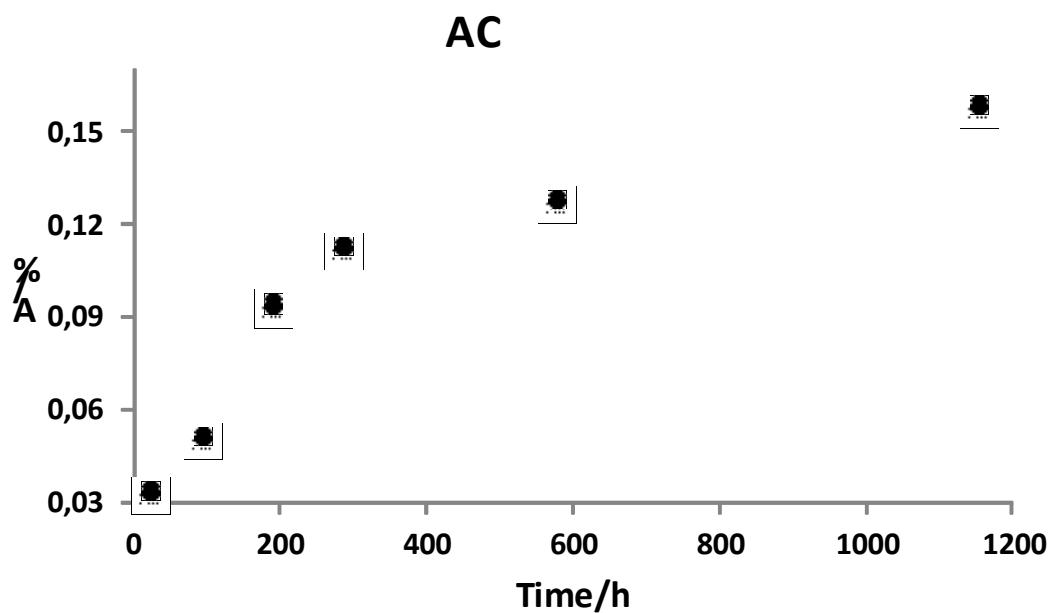
O grau de substituição do AC comercial utilizado neste trabalho foi de 2,2, este resultado indica que o AC possui aproximadamente dois grupos (-OH) substituídos por grupos acetila (-OCCH<sub>3</sub>).

### 4.2. Tempo de degradação das membranas

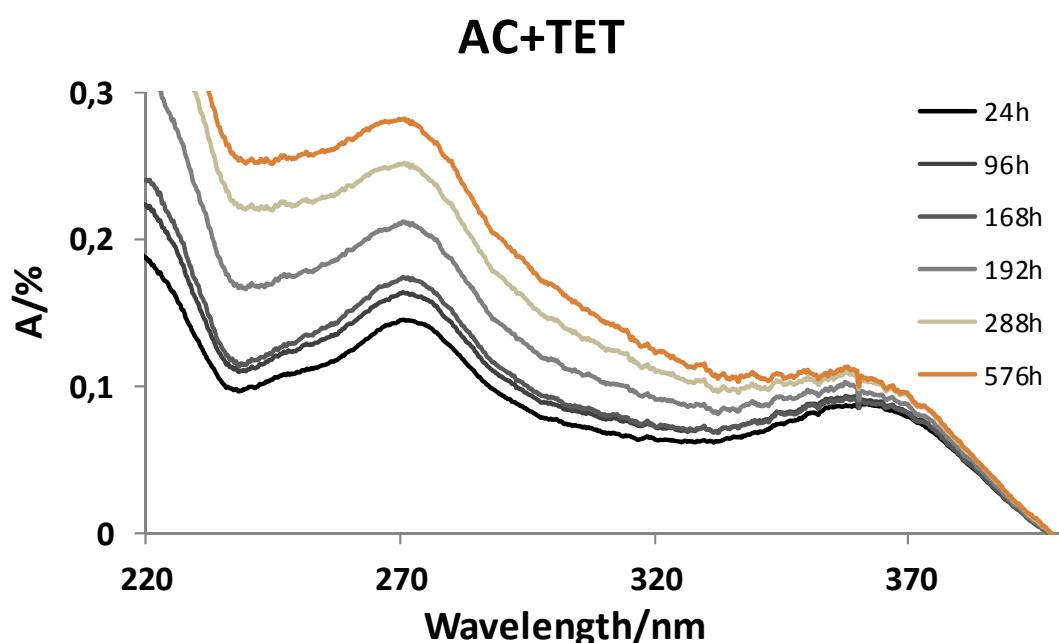
O tempo total de degradação foi estimado após a construção de gráficos de absorbância em função do comprimento de onda a fim de permitir a análise de horas necessárias para as membranas degradaram completamente e a velocidade de degradação das mesmas, apresentados nas Figuras 9-20..



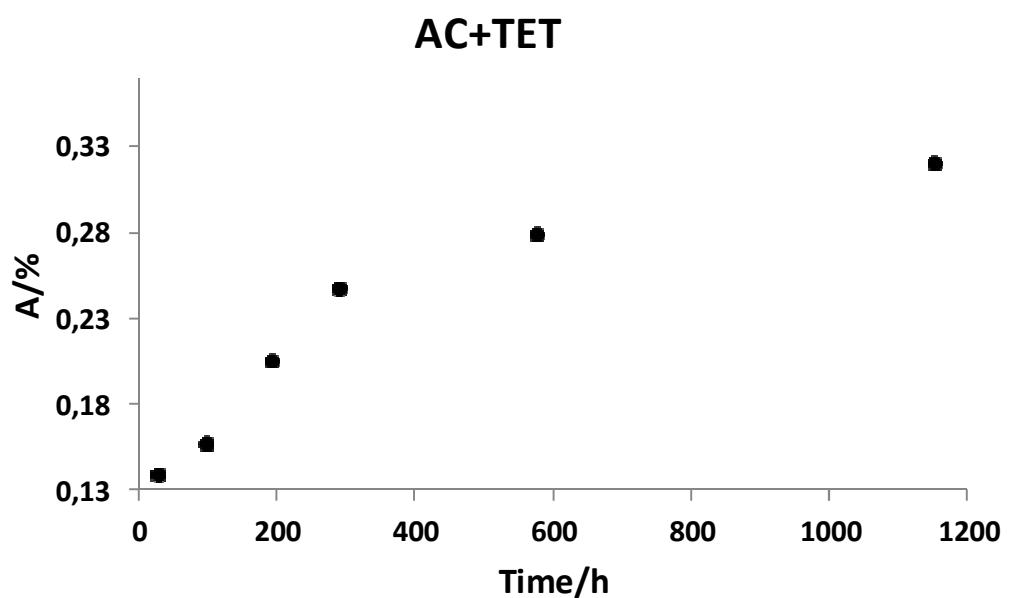
**Figura 9.** Absorção da membrana de AC durante o tempo analisado.



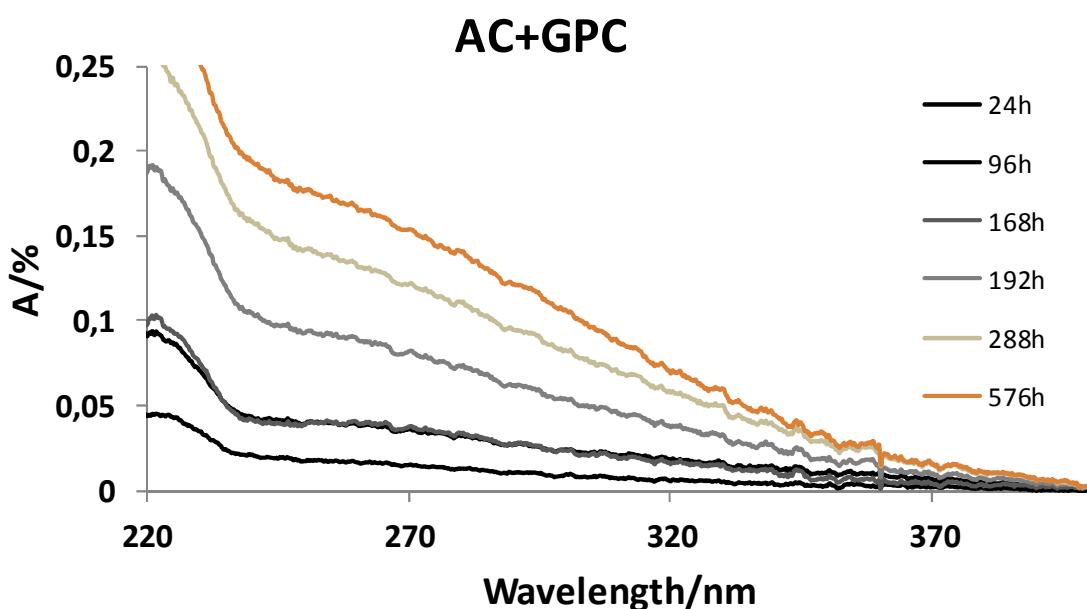
**Figura 10.** Espectro deabsorção da membrana de AC em função do tempo.



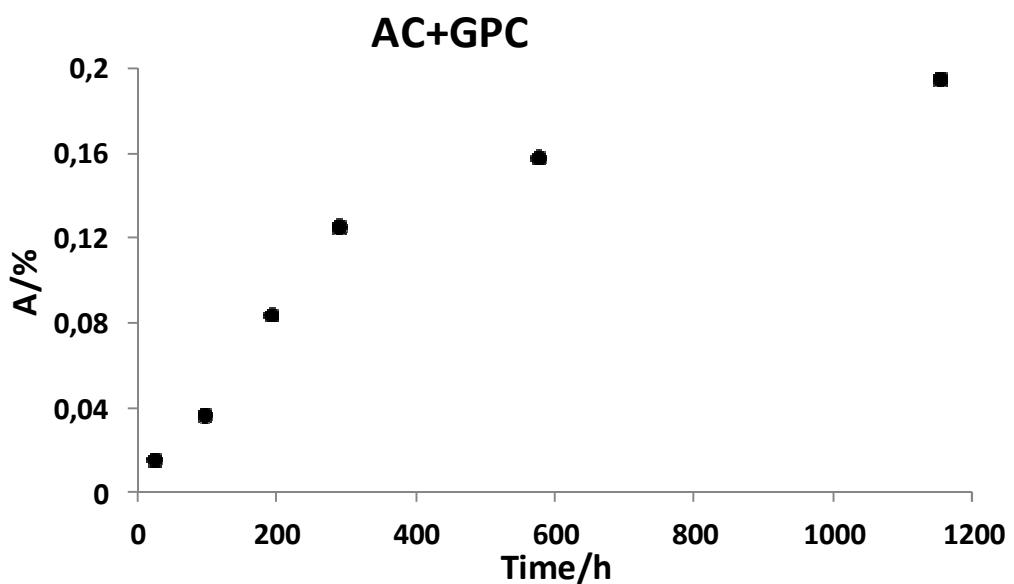
**Figura 11.** Absorção da membrana de AC+TET durante o tempo analisado.



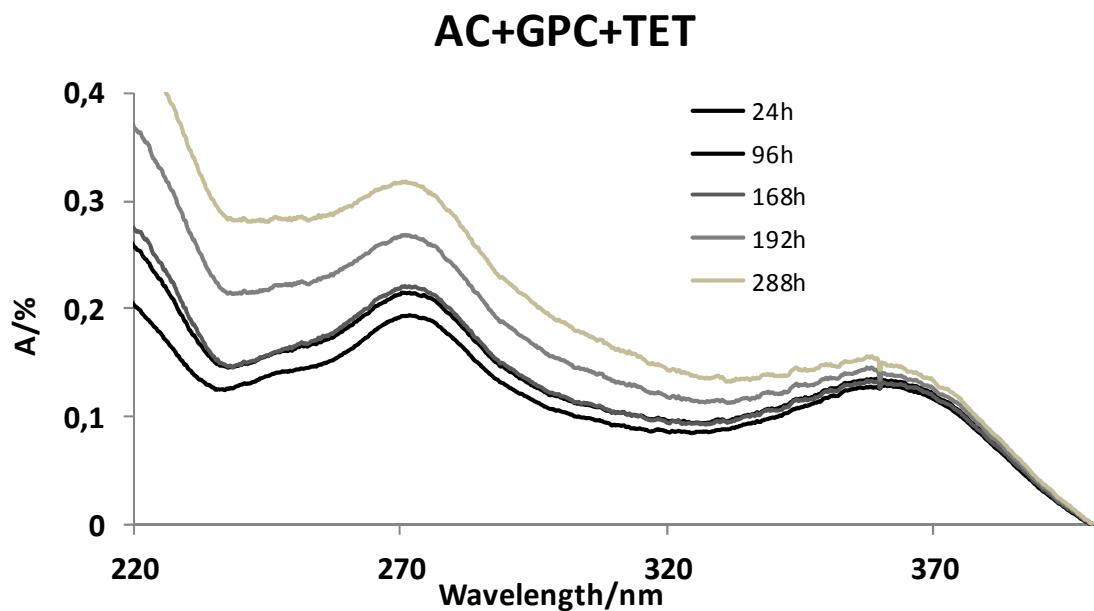
**Figura 12.** Espectro de absorção da membrana de AC+TET em função do tempo.



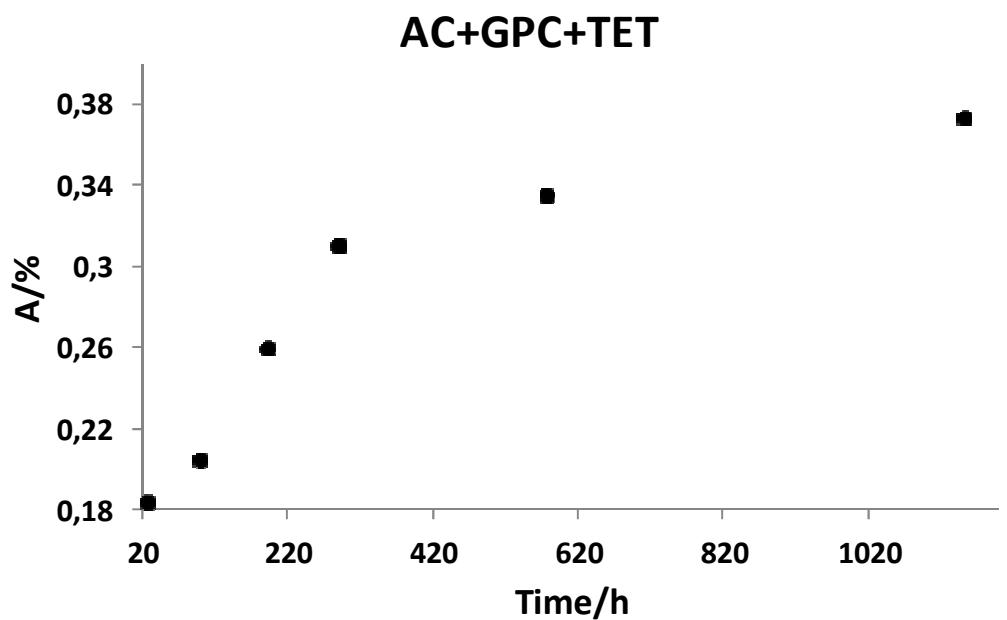
**Figura 13.** Absorção da membrana de AC+GPC durante o tempo analisado.



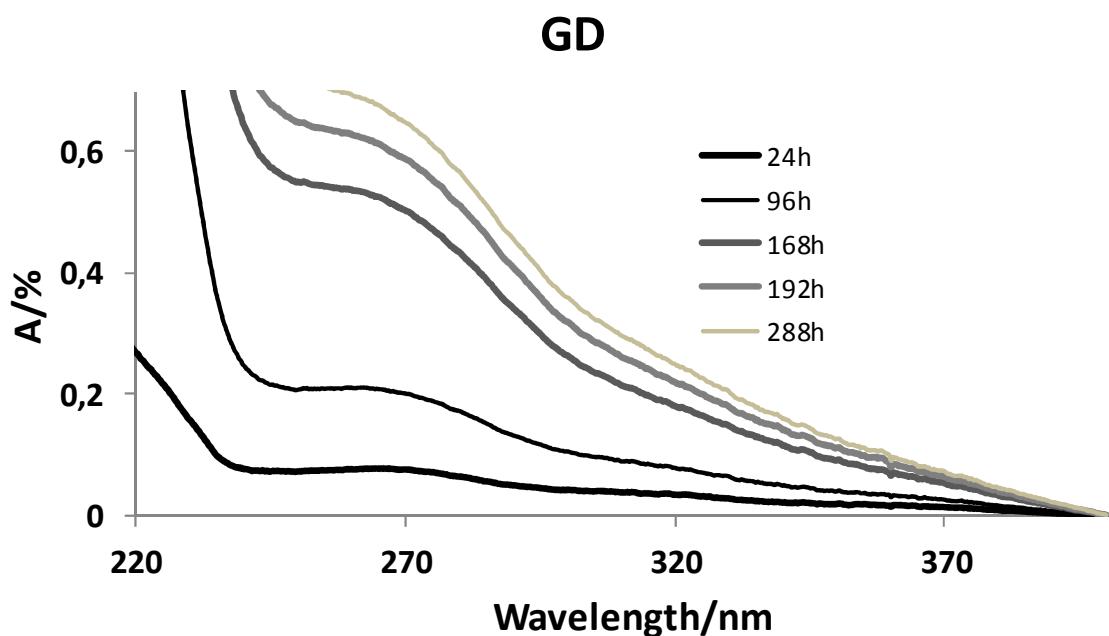
**Figura 14.** Espectro de absorção da membrana de AC+GPC em função do tempo.



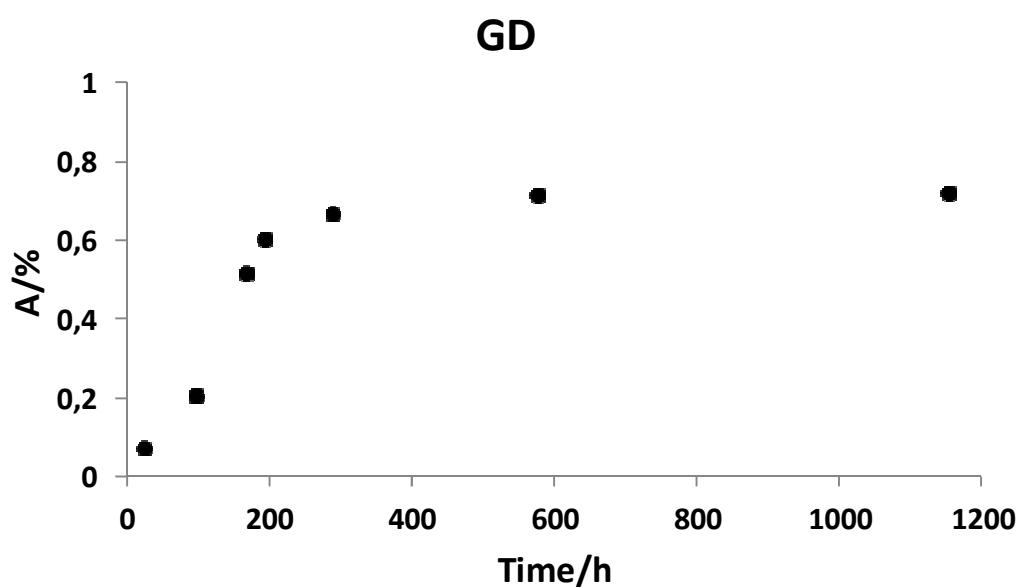
**Figura 15.** Absorção da membrana de AC+GPC+TET durante o tempo analisado.



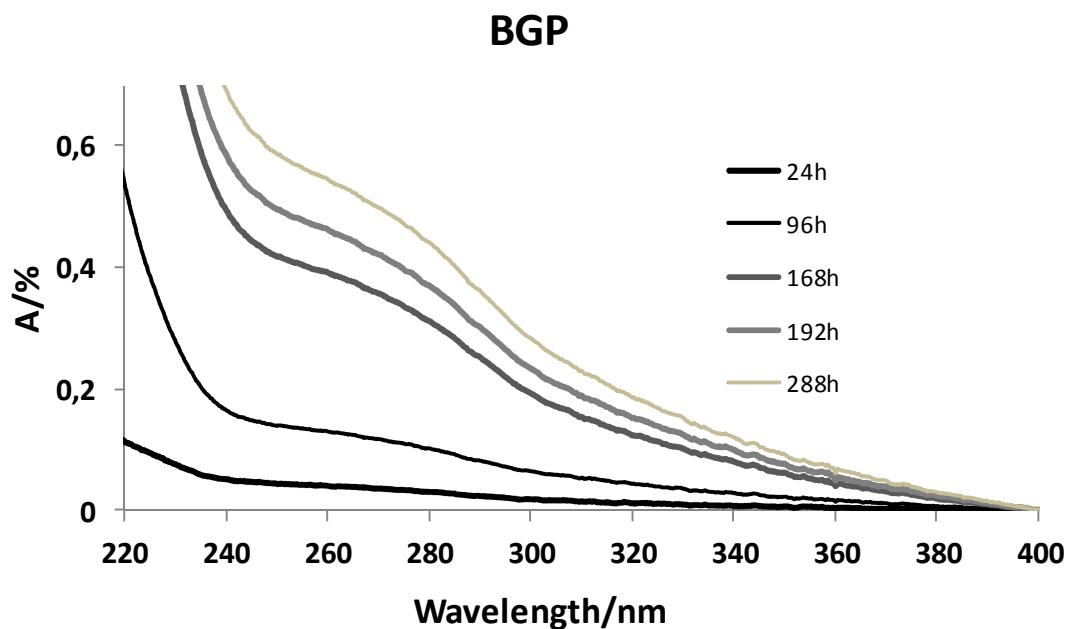
**Figura 16.** Espectro de absorção da membrana de AC+GPC+TET em função do tempo.



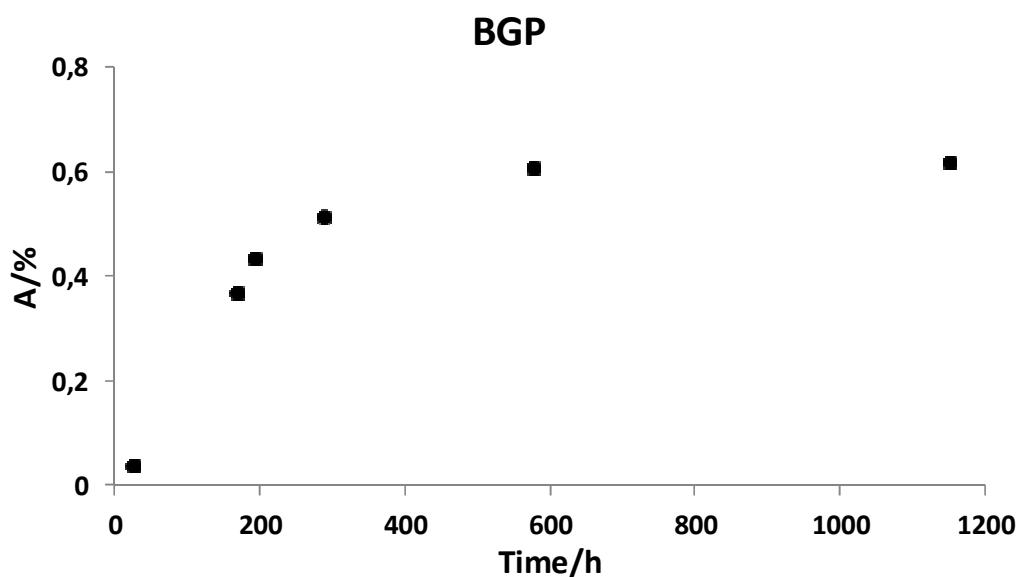
**Figura 17.** Absorção da membrana GD durante o tempo analisado.



**Figura 18.** Espectro de absorção da membrana GD em função do tempo.



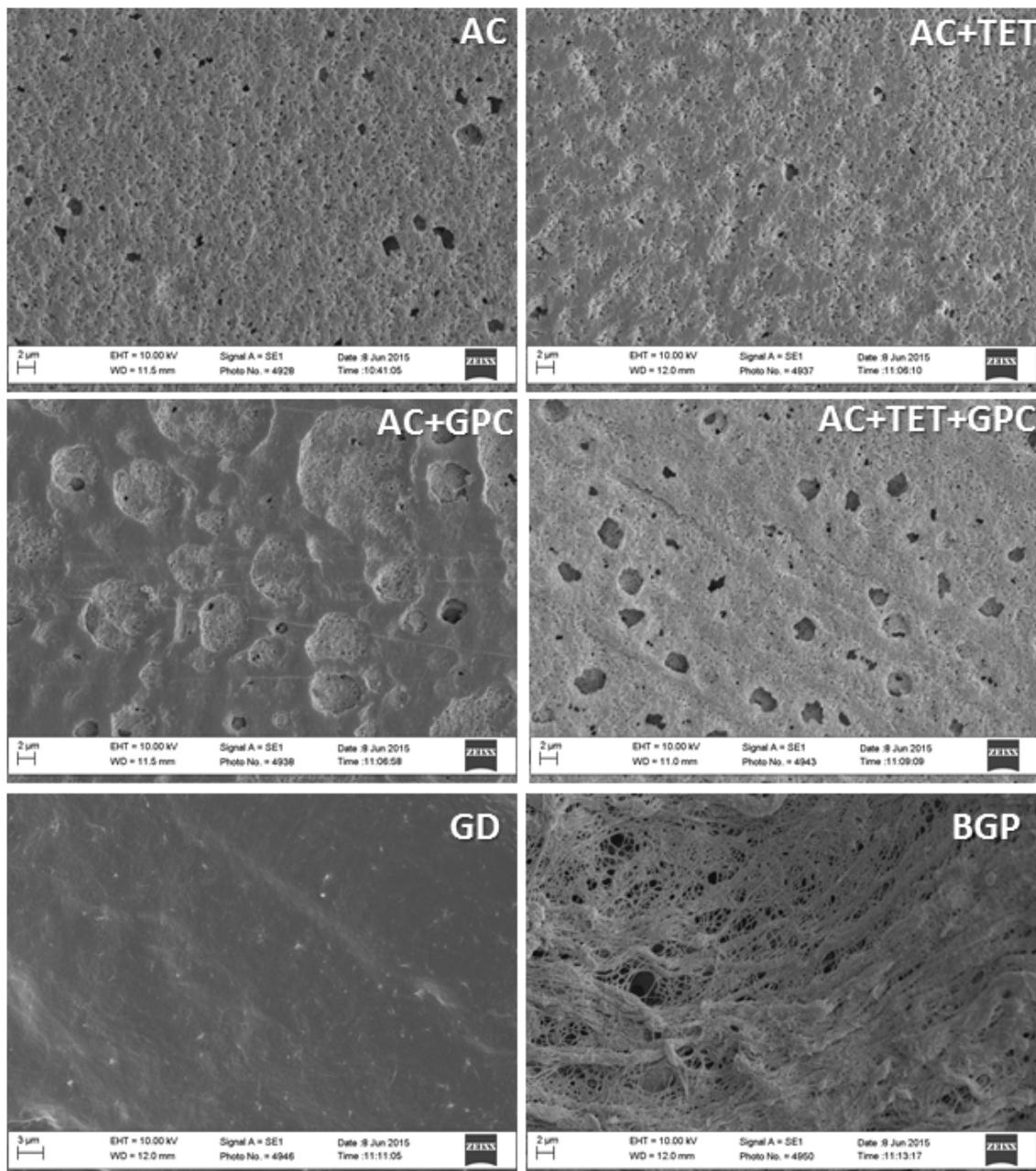
**Figura 19.** Absorção da membrana BGP durante o tempo analisado.



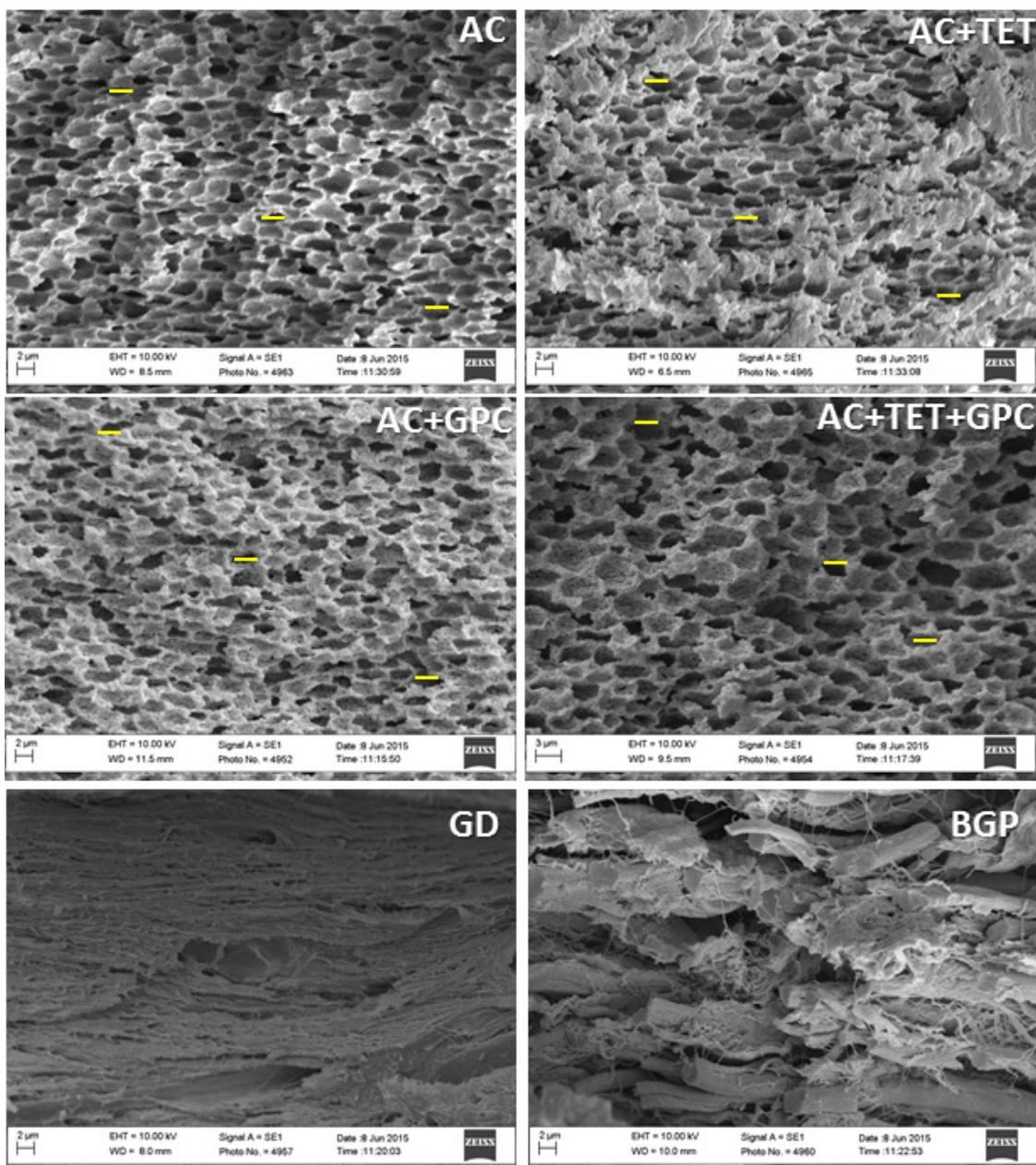
**Figura 20.** Espectro de absorção da membrana GD em função do tempo.

**4.3.Análise qualitativa da morfologia das superfícies e fraturas por meio de microscopia eletrônica de varredura**

As micrografias de superfícies e fraturas das membranas de AC e membranas biológicas comerciais são apresentadas em imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura no aumento de 5000x nas Figuras 21 e 22.



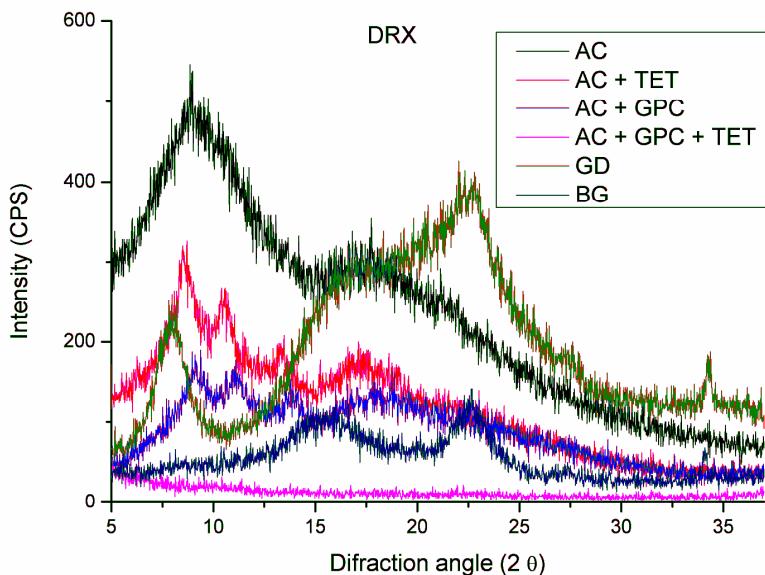
**Figura 21.** Imagens de superfícies das membranas AC, AC+TET, AC+GPC, AC+TET+GPC, GD e BGP. Ampliação de 5000x.



**Figura 22.** Imagens de fraturasdas membranas AC, AC+TET, AC+GPC, AC+TET+GPC, GD e BGP. Ampliação de 5000x. Marcações amarelas: tamanhos dos poros baseados nas escalas fornecidas pelas imagens.

#### 4.4. Índice de cristalinidade e difração de raios-X

Os  $I_{Cr}$  foram obtidos pelos valores de intensidade observados no difratograma apresentado na Figura 23.



**Figura 23.** Difratograma das membranas.

Os difratogramas das membranas de AC com os aditivos apresentam índice de cristalinidade entre 35,27 e 94,4, conforme a Tabela 2. Estes padrões de difração de ambos os materiais correspondem à estrutura de materiais acetilados (Kono et al., 1999), (Shaikh et al., 2009).

**Tabela 2-** Índice de cristalinidade das membranas.

Membranas	Ic (kcps*deg)
AC	94,4
AC+TET	50,8
AC+GPC	35,27
AC+TET+GPC	42,69
GD	19,15
BGP	43,32

#### **4.5. Molhabilidade e Permeabilidade ao vapor de água**

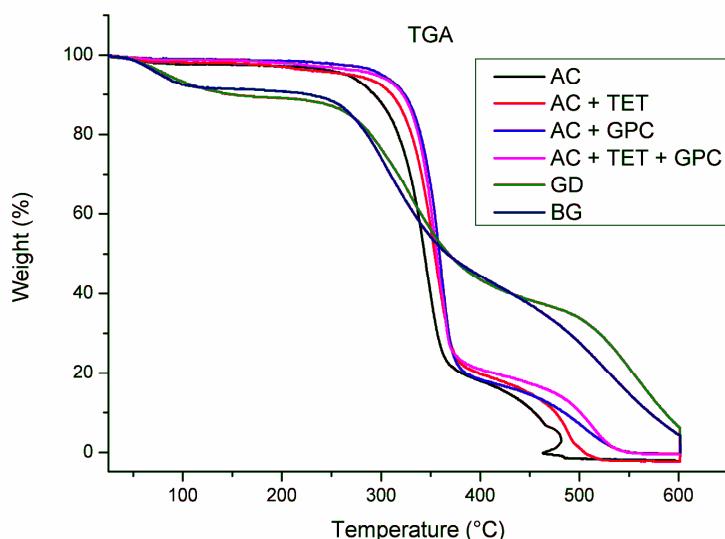
A permeabilidade a vapor de água e ângulo de contato são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Permeabilidade a vapor de água e ângulo de contato das membranas sintéticas e biológicas.

Membranas	Fluxo ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) ( $\pm$ D.V.)	Ângulo de contato ( $\theta$ ) ( $\pm$ D.V.)
<b>AC</b>	$3,035 \times 10^{-6}$ ( $\pm 1,27 \times 10^{-7}$ )	53,81 ( $\pm 3,45$ )
<b>AC+TET</b>	$2,79 \times 10^{-5}$ ( $\pm 5,75 \times 10^{-6}$ )	48,37 ( $\pm 1,15$ )
<b>AC+GPC</b>	$3,73 \times 10^{-5}$ ( $\pm 7,08 \times 10^{-6}$ )	54,24 ( $\pm 1,30$ )
<b>AC+TET+GFC</b>	$3,47 \times 10^{-5}$ ( $\pm 2,59 \times 10^{-6}$ )	69,66 ( $\pm 1,66$ )
<b>GD</b>	$2,83 \times 10^{-5}$ ( $\pm 3,39 \times 10^{-6}$ )	62,17 ( $\pm 6,01$ )
<b>BGP</b>	$4,13 \times 10^{-5}$ ( $\pm 5,03 \times 10^{-6}$ )	00,00 ( $\pm 0,00$ )

#### 4.6. Análises térmicas

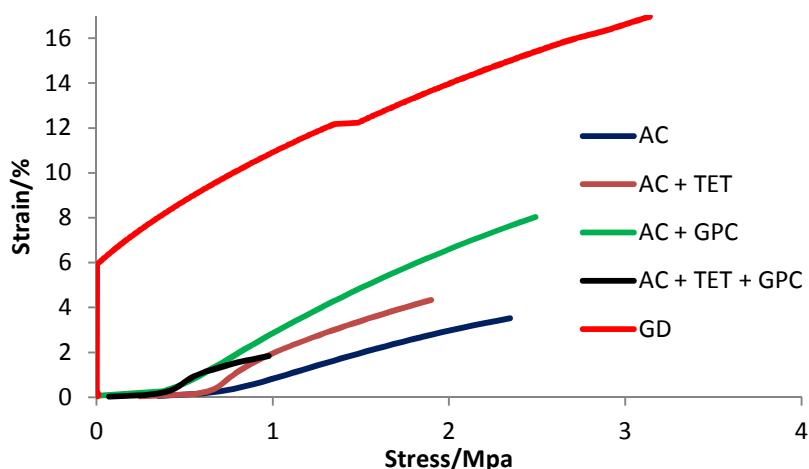
A estabilidade térmica das membranas foi avaliada por meio de curvas de perda de peso termogravimétrica, mostrado na Figura 24. De um modo geral, três principais eventos térmicos são observados para todas as membranas: dessorção de água adsorvida na estrutura do derivado celulósico (entre 30 e 110 °C), a desacetilação do polímero e despolimerização entre 315 e 375 °C, e a decomposição pirolítica do esqueleto celulósico entre 380 e 530 °C (Shaikh et al., 2009).



**Figura 24.** Termograma.

#### **4.7.Análise termodinâmico-mecânica**

A Figura 25mostra a dependência do módulo de armazenamento no teor de reagentes para a formação das películas.



**Figura 25.**Gráfico de tensão vs. deformação das membranas sintéticas de AC puro, AC incorporadas com TET e GPC comparadas com membrana comercial GD.

## **5. DISCUSSÃO**

Para as membranas absorvíveis e biodegradáveis, diversos fatores devem ser considerados, como a resposta tecidual hidrolítica sobre os compósitos resultantes da degradação ser mínima, reversível e não influenciar negativamente a regeneração dos tecidos (Gottlow, 1993).

Uma nova geração de membranas biodegradáveis tem surgido que incluem membranas de Colágeno, membranas de Ácido Polilático e Poliglicólico, membranas de Monômero de Fibrina e Elastina, membranas de Vicryl (Polyglactin 910) e membranas de Acetato de Celulose. São materiais biodegradáveis que não provocam inflamação tecidual. A vantagem da membrana absorvível é a facilidade de manipulação e manutenção pós-operatória, sem a necessidade de segundo ato cirúrgico para sua remoção, ainda apresentam vantagens adicionais como, otimização da cicatrização dos tecidos moles, em algumas membranas ocorre incorporação pelos tecidos hospedeiros, e reabsorção rápida em caso de exposição, diminuindo

a probabilidade de tomarem-se fatores retentivos que propiciam a contaminação bacteriana (Lorenzoni et al., 1998). As desvantagens são sua reabsorvibilidade rápida, pobre visibilidade quando molhada, tendência ao colapso em defeitos infra-ósseos e possíveis reações alérgicas locais (Martins et al., 2001). Membranas absorvíveis, como as de colágeno, foram criadas e estão sendo desenvolvidas para transpor estes problemas (Wang e Carroll, 2001). Membranas de colágeno promovem adesão celular, quimiotaxia, homeostasia, e degradação fisiológica com baixa imunogenicidade, o que faz dela um material ideal como barreira. Estes materiais devem manter por um tempo apropriado sua integridade, o que ocasiona maior sucesso na exclusão celular. (Zohar et al., 2004). As membranas de colágeno têm sido utilizadas na medicina e odontologia devido à sua provada biocompatibilidade e capacidade de promoção da cicatrização da lesão cirúrgica e prevenção do crescimento epitelial, onde deverá formar tecido ósseo, durante as fases iniciais do reparo. Estudos mostram resultados semelhantes ao se aplicar o método de RTG quando comparadas com membranas não absorvíveis, como as ePTFE. Uma das principais funções da membrana é exclusão celular, principalmente de fibroblastos, e consolidação do osso alveolar. Convencionalmente, sugere-se estabilidade da membrana para obtenção de melhores resultados (Caton et al., 1976).

Devido a sua atividade osteoindutiva, o colágeno é considerado um bom substituto ósseo. Além disso, a matriz colagênica estimula a migração e infiltração celular e, ainda, suporta a proliferação das células, ou seja, possui propriedades importantes para facilitar o processo regenerativo. As membranas derivadas de colágeno são constituídas de puro colágeno suíno tipo I e tipo III, extraído de porcos com certificado veterinário de cautelosa purificação do animal (para prevenir respostas antigênicas do paciente), sendo realizada por radiação gama. Ela consiste de uma superfície porosa, que deve ser posicionada adjacente ao osso, para permitir a invasão de osteoblastos e uma superfície lisa que previne a invasão de tecido fibroso para o interior do defeito ósseo, devendo ficar adjacente ao

retalho. A membrana é absorvida em 24 semanas, de acordo com estudos realizados em animais (Schlegel et al., 1997).

Considerando a hipótese de que tetraciclina, glicerofosfato de cálcio e acetato de celulose apresentam características que podem favorecer a RTG, tornou-se viável investigar e desenvolver membranas constituidas por estes materiais. O crescente interesse em explorar derivados celulósicos, assim como novas aplicações, é decorrente principalmente do fato da celulose ser proveniente de fonte renovável (Heinze & Liebert, 2001). Além do mais, o acetato de celulose é um dos derivados de celulose mais importantes (Chou WL et. al. 2007).

Visando uma caracterização detalhada dos materiais desenvolvidos, foram estudados de forma detalhada os polímeros AC, GPC e o medicamento TET, utilizado apenas como aditivo passível de aperfeiçoar a estrutura físico-química dos novos materiais desenvolvidos neste estudo por um experimento *in vitro*.

De acordo com Fischer e colaboradores em 2008, a solubilidade do acetato de celulose depende, entre outras coisas, do GS que é definido pelo nível de acetilação do acetato de celulose. O tipo de substituinte e o número médio de grupos que substituem as hidroxilas nas unidades glicosídicas. O GS tem relação direta com as propriedades finais do derivado, como por exemplo, a solubilidade em água. O GS pode variar de um grupo hidroxila substituído, monossubstituído até a forma totalmente substituída, trissubstituído. O GS varia de 0 para a celulose, até 3 para um derivado trissubstituído. Os acetilados com GS igual a 3 são solúveis em diclorometano e outros solventes clorados, GS de 2-2,5 são solúveis em acetona, dioxano, tetrahidrofurano (THF) e acetato de metila. Acetato de celulose com GS igual a 1 pode ser solúvel em água. Diante disso, o grau de substituição do AC comercial utilizado neste trabalho foi de 2,2, este resultado indica que o AC é solúvel em acetona, diante disso, as quatro diferentes membranas sintéticas de AC foram formadas sem dificuldades e apresentaram-se com aspecto de opacidade, resistentes ao rasgamento e fácil manuseio.

O tempo total de degradação foi estimado após a construção de gráficos de absorbância em função do comprimento de onda, foram necessárias 2400 horas/100 dias para as membranas de AC e seus aditivos degradarem completamente, visto que por meio das análises foi possível estender os resultados fornecidos a partir de análises feitas em períodos controlados. Além disso, foi realizado o acompanhamento real das membranas onde foi observado o desaparecimento das amostras no mesmo período de tempo. Já as membranas comerciais apresentaram comprimentos de onda visíveis na leitura do 8º dia, ou seja, nas primeiras 288 horas, no entanto, na leitura realizada no 21º dia não foi possível identificar nenhum sinal das membranas e as mesmas haviam desaparecido da solução de tampão fosfato, com isso, conclui-se que as membranas GD e BGP degradaram em menos de 21 dias em condições definidas na metodologia. Apesar de variar entre indivíduos, a osteogênese intra-alveolar de seres humanos é concluída entre o terceiro e quarto mês após a extração de dentes (90 - 120 dias). O processo de remodelação parece estar concluído em aproximadamente seis meses. A mineralização do osso trabecular recém-formado começa por volta do 20º dia, com um pico de cerca de três meses (Carranza et al., 2012). Desse modo, as membranas desenvolvidas neste estudo apresentaram tempo de degradação suficiente para RTG enquanto as membranas comerciais parecem degradar em tempo insuficiente.

As microscopias eletrônicas de varredura obtidas neste estudo permitem uma análise qualitativa em relação às superfícies e regiões transversais das amostras. Por meio das figuras 23 e 24, é possível constatar uma maior homogeneidade nas membranas de AC em termos de porosidade, além disso, maiores poros nas membranas incorporadas por glicerofosfato de cálcio, quando comparados com as membranas comerciais e/ou as membranas de acetato de celulose puro ou somente com adição da tetraciclina. A incorporação de TET nas membranas resultou em uma superfície um pouco irregular, isto pode estar relacionado ao fato da TET ter sido pouco dissolvida no AC e por isso, apresentaram resíduos entre as fibras de AC.

As micrografias das superfícies das membranas de AC dissolvidos em acetona/água mostra a heterogeneidade do filme quanto à presença de poros uniformes dispersos na membrana, devido à presença de água na composição. Os poros apresentam dimensões próximas a 2 $\mu$ m como demonstrado pelas barras amarelas baseadas no tamanho das escalas fornecidas nas imagens. A membrana GD apresenta-se com baixa quantidade de poros e praticamente obliterada enquanto a membrana BPG apresenta-se com aberturas irregulares e formatos/dimensões despadronizados.

A existência de poros permite a difusão de fluidos sanguíneos, entretanto, os poros devem ser menores do que as células de tal modo que a membrana impeça a passagem de fibroblastos para a área do defeito ósseo. Há poucos relatos na literatura sobre a dimensão exata dos osteoblastos e fibroblastos, no entanto, Alhadlaq e Mao, relataram em 2003, osteoblastos encapsulados dentro do côndilo mandibular com dimensões de 110 $\mu$ m x 70 $\mu$ m. Um estudo recente publicado por Zhou et al. 2015, avalia a morfologia de fibroblastos em diferentes superfícies e permitiu concluir, por meio de imagens de MEV, o tamanho aproximado de fibroblastos em média 175 $\mu$ m x 150 $\mu$ m. Considerando que as células apresentam tamanhos superiores aos poros das membranas mostrados em secção transversal na fig. 24, pode-se afirmar a capacidade de exclusão celular das quatro membranas desenvolvidas, visto que os poros medem aproximadamente 2 $\mu$ m, medidos em relação a escala fornecida pela própria microscopia, destacada por uma barra amarela. Assim, as membranas são capazes de atuar como uma barreira e permitir RTG/ROG. Tais observações morfológicas podem ser diretamente associadas com o processamento da membrana, visto que o solvente evapora mais rapidamente do que o não solvente, resultando em dois efeitos principais: o aumento da taxa de coalescência, o que leva à separação das fases para a formação da matriz, e o aumento da concentração de não solvente na estrutura polimérica, levando à a formação de poros. Isto pode também ser uma consequência de diferentes ésteres de acetato utilizados na elaboração das membranas sintéticas, em comparação com as comerciais. Estas características

classificam as membranas de AC e aditivos comoassimétricas. Ao analisar os cortes transversais das membranas comerciais, observam-se estruturas completamente densas, o que caracterizam estes biomateriais como membranas simétricas. Neste caso, os componentes da solução na formulação das membranas são o solvente (acetona) e o polímero. Uma vez que o solvente evapora-se livremente quando um não solvente está ausente, poros estáticos não são formados na matriz, e ao invés disso, camadas densas são formados.

A cristalinidade é uma das principais características que diferem cada forma polimórfica (região cristalina e não cristalina) do acetato de celulose. O AC na forma de pó apresenta uma estrutura padrão cristalino com forte reflexão localizado  $2\theta$ :  $8.5^\circ$ ,  $10.5^\circ$ ,  $13.5^\circ$ ,  $17.5^\circ$  e  $23.5^\circ$  (Ramesh; Shanti; Morris, 2013). O processo de espalhamento do filme na presença de água 10,0 % (v/v) juntamente com a adição de GPC e TET diminuiu a ordem da matriz polimérica das membranas, produzindo uma película mais amorfa, verificado por baixas curvas no difratograma em relação a AC. O índice de cristalinidade das membranas diminui comparativamente com a adição de TET e GPC no AC como se pode observar na Tabela 2. A intensidade dos picos de difração da membrana de AC foi reduzida, principalmente, com a adição de GPC, visto que diminuiu a agregação das cadeias poliméricas e modificou o empacotamento das mesmas. Pode-se afirmar que a presença do sal quebra as interações intramoleculares e intermoleculares da cadeia polimérica a fim de se formar novas intermoleculares entre o polímero e o glicerofosfato, ou seja, sua presença desestrutura a cadeia de AC, enfraquecendo as ligações entre o oxigênio (-O) e acetato (AC) em átomos (-OAC) do grupo funcional, sendo assim, aumenta a acessibilidade dos átomos de oxigênio, permite, portanto a formação de interações intermoleculares com átomos de hidrogênio oriundos das moléculas do glicerofosfato, que estruturalmente possui alta densidade de grupos hidroxila. A membrana GD apresenta o menor valor entre as amostras estudadas, o que indica baixo padrão de cristalinidade. A membrana BGP, considerada padrão ouro em aplicabilidade clínica, apresentou  $I_{Cr}$

intermediário entre a GD e AC. Com o acréscimo de TET e GPC, foi possível observar diminuição da cristalinidade e aproximação das membranas desenvolvidas com a BGP.

Uma das formas de se avaliar a hidrofilicidade das membranas é através da determinação do ângulo de contato, que por sua vez, é uma medida da molhabilidade da superfície. Materiais hidrofóbicos repelem a água, fazendo com que seu contato com a superfície seja o menor possível, resultando em altos valores de ângulos de contato (Nogueira, 2012). O ângulo de contato se altera consideravelmente quando a TET é adicionada ao AC, o mesmo não ocorre quando o GPC é incorporado na membrana. Isto pode ser atribuído a uma concentração muito baixa deste componente na membrana (0,04%). No entanto, a adição de GPC aumentou significativamente a permeabilidade ao vapor de água (cerca de 90%), as membranas com GPC em suas composições apresentaram valores de permeabilidade semelhantes à membrana BGP. Isto pode ser atribuído devido à capacidade deste aditivo que é inserido entre as fibras de AC aumentar a porosidade da membrana, como foi observado na imagem de MEV das superfícies de membranas na Figura 23. No que diz respeito às membranas comerciais, pode-se observar que a membrana GD é muito hidrofóbica com ângulos de contato maiores do que as membranas de acetato de celulose. O oposto pode ser observado na membrana BGP que se apresentou totalmente hidrófila devida ausência de gota formada, ou seja, o líquido espalhou-se completamente sobre a superfície da membrana.

As altas permeabilidades ao vapor de água dessas membranas podem estar associadas às microestruturas das membranas, pois através da microscopia eletrônica de varredura, encontraram-se microestruturas porosas, devido à presença de água na formulação da membrana, que facilitam a passagem de líquido. Pode-se afirmar que a água atua como um solvente e induz a formação de poros à medida que o processo de evaporação de acetona ocorre, gerando uma estrutura porosa. A água atua como plastificante na matriz (Schlemmer; Sales; Resck, 2010), aumentando as interações com a cadeia da matriz polimérica. Baseando-se nesta teoria, a

difusão de um agente ativo através de uma matriz polimérica pode ser dificultada devido a um mecanismo chamado “topologia randômica dos poros” (Nogueira, 2012).

A degradação térmica do acetato de celulose é descrito na literatura ocorrendo em três fases. O primeiro passo é iniciado com medida da temperatura inicial, a temperatura ambiente, e a temperatura de cerca de 100 °C, que ocorre a evaporação de água absorvida no material. O segundo passo ocorre entre 330 °C e 500 °C, principal faixa de degradação térmica do material onde ocorre a degradação das cadeias do acetato de celulose e saída de matéria volátil. Próximo de 500 °C e em temperaturas superiores ocorre à carbonização dos produtos degradados a cinzas, que corresponde à terceira etapa da degradação térmica dos acetatos de celulose (Ren, J. L et al, 2007).

As membranas de AC possuem perfis de temperatura que exibem essencialmente três estágios característicos. O primeiro estágio está relacionado com a evaporação de água absorvida ou composto de baixo peso molecular, por exemplo, o grupo acetil. As membranas de AC não sofreram alterações características deste primeiro estágio, visto que apenas perderam estrutura a partir de 330°C. O contrário ocorreu para as membranas comerciais que começaram a sofrer degradações no primeiro estágio, entre 30 e 130 °C e houve até uma pequena perda de massa menor que 3%. De acordo com (Cyras et al., 2008), o segundo evento corresponde basicamente ao processo de degradação do glicerofosfato de cálcio. A temperatura de degradação térmica de todas as amostras que contêm aditivos foi maior do que a membrana de AC puro. O último estágio corresponde à degradação do AC, os resultados mostraram que a presença de aditivos retardou a perda de massa, pois o início da decomposição ocorreu em temperaturas maiores quando comparados à membrana AC.

Nas aplicações odontológicas propostas, os novos materiais desenvolvidos dificilmente irão submeterem-se a temperaturas tão altas, no entanto, tornou-se viável esta análise com objetivo de conhecer características relacionadas à resistência de degradação em relação à

temperatura com a finalidade de sugerir limites de armazenamento e esterilização destes materiais, visto que são fatores que dependem diretamente da capacidade dos mesmos resistirem ao calor. Os resultados indicam que os novos produtos desenvolvidos neste trabalho podem ser esterilizados em autoclave tradicional, visto que ocorre em temperatura média de 160ºC e os resultados indicam resistência das membranas até aproximadamente 375ºC.

Em relação ao comportamento termomecânico dos materiais analisados, pode-se observar para a membrana AC, módulo de armazenamento entre 34 MPa e 3043 MPa, que aumenta, sugerindo uma redução da rigidez da película. Aparentemente, a presença de GPC, mais uma vez, aumentou interações entre polímeros, reduzindo o volume livre entre cadeias, promovendo o aumento no módulo de elasticidade, o que sugere a formação de filmes mais resistentes. A adição de TET não apresentou melhorias significantes em relação à resistência dos materiais. A membrana GD apresentou maior resistência em comparação com as membranas desenvolvidas neste estudo. Não obstante, as resistências obtidas nas membranas desenvolvidas são suficientes para aplicabilidade em regeneração guiada, uma vez que deve ser resistentes ao rasgamento e permitir manuseio pelo cirurgião-dentista. Devido limitações do biomaterial BGP em relação ao tamanho da amostra, não foi possível avaliar sua resistência, visto que esta membrana apresenta tamanho insuficiente para adaptar ao equipamento de teste.

De forma geral, os aditivos melhoraram as características físicas químicas avaliadas. A adição de GPC nas membranas de AC permitiu aumento na resistência física, homogeneidade superficial e aumento na quantidade de poros. A adição de TET tornou a membrana mais hidrofílica, no entanto, não influenciou na resistência mecânica, apresentou sua superfície mais obliterada, com menor permeabilidade e maior índice de cristalinidade. Os aditivos não influenciaram no tempo de degradação. Diante destes fatos, pode-se observar que o GPC possibilitou melhores resultados físico-químico em relação ao AC e a TET, entretanto, torna-se

necessário avaliar mais profundamente a membrana AC+TET+GPC, em relação a capacidade antimicrobiana da TET, visto que além de possuir o GPC que apresentou resultados positivos pode ser utilizada como um dispositivo de liberação local de fármaco devido à presença de TET.

## **6. CONCLUSÃO**

Dentro da metodologia aplicada e das limitações deste estudo in vitro, conclui-se que:

1. As membranas desenvolvidas neste experimento indicaram propriedades favoráveis para aplicação em RTG.
2. As membranas avaliadas neste estudo apresentaram tempo de degradação suficiente para RTG e degradam mais devagar em relação às membranas comerciais.
3. OOGPC apresentou boas propriedades mecânicas, aumento na quantidade de poros e homogeneidade superficial.
4. Por ser de origem sintética, e então, não possuir genética animal, os materiais desenvolvidos possuem capacidade de controle de produção, baixos custos industriais e menor risco biológico a rejeição por fatores genéticos.
5. Dentre as membranas desenvolvidas, a AC+GPC apresentou, de forma geral, melhores características físico-químicas.

## REFERÊNCIAS\*

Addy M, Hassan H, Moran J, Wade W, Newcombe R. Use of antimicrobial containing acrylic strips in the treatment of chronic periodontal disease. A three month follow-up study. **J Periodontol.** 1988 Sep; 59(9):557-64.

Addy M, Langeroudi M. Comparison of the immediate effects on the subgengival microbiota of acrylic strips containg 40% chlorhexidine, metronidazole or tetracycline. **J Clin Periodontol.** 1984 Jul; 11(6); 379-86.

Alhadlaq, A., Mao, J.J. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. **J Dent Res.** 2003; 82(12):951-6.

Benqué E, Zahedi S, Brocard D, Oscaby F, Justumus P, Brunel G. Guided tissue regeneration using a collagen membrane in chronic adult and rapidly progressive periodontitis patients in the treatment of 3-wall intrabony defects. **J Clin Periodontol.** 1997; 24(8):544-9.

Bico J, Quéré D. Rise of liquids and bubbles in angular capillary tubes. **J Colloid Interface Sci.** 2002; 247(1):162-6.

Bonfield, W., Grynpas, M. D., & Tully, A. E. Hydroxyapatite reinforcedpolyethylene—A mechanically compatible implant material for bonereplacement. **Biomaterials.** 1981; (2) 185–186.

Bord S., Horner A., Hembry R.M., Reynolds J.J., Compston J.E. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo. **Bone.** 1996 Jul; 19(1):35-40.

Bromberg, L. E.; Buxton, D. K.; Friden, P. M. Novel periodontal drug delivery system for treatment of periodontitis. **J. Control. Rel.** 2001; v.71, p.251-259.

\*De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver.  
Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

Carranza, F.A., Newman, M.G., Takei, H., Klokkevold, P.R.  
**Periodontia Clínica.** Elsevier Brasil. Edição 2012.

Caton J, Zander HA. Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. **J Clin Periodontal.** 1976; 3 (1): 54-8.

Caton J., Zander H.A. Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. **J Clin Periodontol.** 1976; 3(1):54-8.

Chen C.C., Wang H.L., Lopatin De, O'Neal R.B., MacNEIL, R.I. Bacterial adherence to guided tissue regeneration barrier membranes exposed to the oral environment. **J Periodontol.** 1997;68(2):172-79.

Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2001; 65:232-60.

Chou WL, Yu DG, Yang MC, Jou CH. Effect of molecular weight and concentration of PEG additives on morphology and permeation performance of cellulose acetate hollow fibers. **Sep Purif Technol.** 2007; 57(2):209–219.

Ciancio SG. Site specific delivery of antimicrobial agents for periodontal disease. **Gen Dent.** 1999 Mar-Apr; 47(2):172-8, 181.

Cristina A.G., Hobgood C.D., Webb L.X., Myrvik Q.N. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. **Biomaterials.** 1987; (6): 423-26.

Cunha BA, Sibley CM, Ristuccia AM. Doxycycline. **Ther Drug Monit.** 1982; 4(2); 115-35.

D'Almeida, M. L. O. **Celulose e papel: tecnologia de fabricação de pasta celulósica.** 2. ed. São Paulo: SENAI/IPT, 1988.

De Moraes, A. C. M.; Andrade, P. F.; De Faria, A. F.; Simões, M. B.; Salomão, F. C. C. S.; Barros, E. B.; Gonçalves, M. D. C.; Alves, O. L. Fabrication of transparent and ultraviolet shielding composite films based on

graphene oxide and cellulose acetate. **Carbohydrate Polymers**, 2015; (123) 217–227.

Deilasse JM, Engsig MT, Everts V, Ovejero MC. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. **Clin. Chim. Acta.** 2000; (291) 223-234

Delaissé J.M., Engsig M.T., Everts V., Ovejero, M.C. et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. **Clinica Chimica Acta.** 2000; 223-234.

Edgar, K. J.; Buchanan, C. M.; Debenham, J. S.; Rundquist, P. A.; Seiler, B. D.; Shelton, M. C.; Tindall, D. Advances in cellulose ester performance and application. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 26, n. 9, p. 1605–1688, 2001.

Ehrlich, H., Steck, E., Ilan, M., Maldonado, M., Muricy, G., Bavestrello, G., et al. Three dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part II. Biomimetic potential and applications. **International Journal of Biological Macromolecules.** 2010; 47, 141–147.

Fischer, S., Thummel, K., Volkert, B., Hettrich, K., Schmidt, I., Flischer, K., Properties and Applications of Cellulose Acetate. Macromolecular. **Symposia**, 2008; 262, 89–96.

Fischer, S., Thümmel, K., Volkert, B., Hettrich, K., Schmidt, I., Fischer, K. Properties and applications of cellulose acetate. **Macromolecular Symposia**, v. 262, n. 1, p. 89–96, 2008.

Fugazzotto P.A. The need for GTR therapy. **Postgrad Dent.** 1999; 6(3):7-14.

Fujishiro, Y., Hench, L.L., Oonishi, H. Quantitative rates of in vivo bone generation for Bioglass and hydroxyapatite particles as bone graft substitute. **J Mater Sci Mater Med.** 1997; 8(11):649–652.

Gantes B., Martin M., Garrett S., Egelberg J. Treatment of periodontal furcation defects. (II). Bone regeneration in mandibular class II defects. **J Clin Periodontol.** 1988;15(4):232-9.

Goodson JM, Holborow D, Dunn RL, Hogan P, Dunham S. Monolithic Tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets. **J Periodontol.** 1983; 54(10):575-79.

Goodson JM, Tanner A, McArdle S, Dix K, Watanabe SM. Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy. III. Microbiological response. **J Periodontal Res.** 1991 Sep;26(5):440-51.

Goodson, J.M., Offenbacher, S., Farr, D.H., Hogan, P.E. Periodontal Disease treatment by Local Drug Delivery. **J.Periodontol** May, 1985.

Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. **J Periodontol.** 1993 Nov; 1157-65.

Habert, A. C.; Piacsek, B. C.; Nobrega, R. **Processos de separação por membranas.** 2006. 1º edição. Hayashi Y, et al. Toxicity of dental medicaments on pulp cells in vitro. I1. The effect of organic phosphates. **Journal of Conservative Dentistry.** 1992; 35, 1033-6.

Heinze and Liebert. Chemical characteristics of cellulose acetate. **Macromolecular Symposia.** 2004; 208, 167-238.

Heinze T., Liebert T. Unconventional methods in cellulose functionalization. **Progress in Polymer Science.** 2001; 26, 1689-1762.

Hench, L. L., & Best, S., In B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, & J. E. Lemons (Eds.), Biomaterials science: An introduction to materials in medicine. **Amsterdam, Elsevier, Academic.** 2004; p. 153.

Hyder P.R., Dowell P., Singh G., Dolby A.E. Freeze-dried, cross-linked bovine type I collagen: analysis of properties. **J Periodontol.** 1992; 63(3):182-6.

Imai, M. and Hayashi, Y. Ultrastructure of wound healing following direct pulp capping with calcium-/3-glycerophosphate (Ca-BGP). **Journal of Oral Pathology & Medicine**. 1993; (22) 411-7.

Jones DS, Woolfson AD, Brown AF, Coulter WA, McClelland C, Irwin CR. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. **J Control Release**. 2000 Jul 3;67(2-3):357-68.

Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. **Periodontol 2000**. 1993;1:26-35

Kho, J, G, L. & Newman, H, N, Subgingival plaque control by a simplified oral hygiene regime plus local chlorhexidine or metronidazole. **Journal of Periodontal Research**. 1983 18, 607-619.

Kinane DF, Radvar M. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. **J Periodontol**. 1999;70(1):1-7.

Kono, H.; Numata, Y.; Nagai, N.; Erata, T.; Takai, M. CPMAS <sup>13</sup>C NMR and X-ray studies of cellobiosaccharide acetates as a model for cellulose triacetate. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**. 1999 (37) 4100–4107.

Lee, C.H.; Slingla, A.; Lee, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**. 2001 (22) 22.

Lindhe, J; Karring, T; Lang NP. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**. Guanabara Koogan, 4<sup>a</sup> edição, 2005.

Ling H., Boudsocq F., Plosky B.S., Woodgate R., Yang W. Replication of a cis-syn thymine dimer at atomic resolution. **Nature**. 2003 Aug 28;424

Lorenzoni M., Perl C., Keil C., Wegscheider W.A. Treatment of peri-implant defects with guided bone regeneration: a comparative clinical study

with various membranes and bone grafts. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1998; 13(5):639-46.

Martins, E.O.B., Janjacomo, L.A., Milanezi, L.A., Martins, F. Regeneração tecidual guiada, uma solução atual para o tratamento de lesões de furca grau II. **Fac Odontol Lins.** 2001; (13) 17-25.

Medlicott, N. J., Rathbone, M. J., Tucker, I. G., Holborow, D. W. Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. **Adv. Drug Deliv.** 1994. Rev., v. 13, p. 181-203, 1994

Meireles, C. da S. **Síntese e caracterização de membranas assimétricas de acetato de celulose obtido a partir da celulose do caroço de manga e do jornal.** Uberlândia, 2011.

Minabe, M, et al. Therapeutic effect of the combined therapy using tetracycline immobilized collagen film and root planning in single root teeth. **Journal of Periodontal Research Submitted,** 1990.

Morejon MG, Salup RD, Cue MB. Actualización en tetraciclinas. **Rev CubanaFarm.** 2003; 37(3):1.

Moses O., Vitrial D., Aboodi G., Sculean A., Tal H., Kozlovsky A., Artzi Z., Weinreb M., Nemcovsky C.E. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. **J Periodontol.** 2008;79(5):905-11

Nascimento B. **Síntese e caracterização do sulfato de acetate de celulose, obtido do bagaço de cana-de-açucar, para aplicação como aditivo na construção civil.** [dissertação] Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

Newman MG, Kornman KS, Doherty FM. A 6-month multi-center evaluation of adjunctive tetracycline fiber therapy used in conjunction with scaling and root planing in maintenance patients: clinical results. **J Periodontol.** 1994 Jul;65(7):685-91.

NOGUEIRA, F. T. **Síntese e caracterização de membranas de filme fino composto de polissulfona/quitosana reticulada com glutaraldeído.** 2012. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2012.

Nyman S., Lindhe J., Karring T., Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 1982;9(4):290-6.

Okada, M., & Furuzono, T. Hydroxyapatite nanoparticles: Fabrication methods and medical applications. **Science and Technology of Advanced Materials.** 2012; (13) 641-3.

Paganini L. **Fechamento primário de alvéolos com implantação imediata: apresentação de técnicas cirúrgicas.** Monografia de Especialização. Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, 1999.

Puleo, A. C.; Paul, D. R.; Kelley, S. S., The Effect of Degree of Acetylation on Gas Sorption and Transport Behavior in Cellulose-Acetate. **Journal of Membrane Science.** 1989; 47 (3) 301-332.

Quintana, R.; Persenaire, O.; Lemmouchi, Y.; Sampson, J.; Martin, S.; Bonnaud, I.; Dubois, P. Enhancement of cellulose acetate degradation under accelerated weathering by plasticization with eco-friendly plasticizers. **Polymer Degradation and Stability.** 2013 (98) 1556–1562.

Ramesh, S.; Shanti, R.; Morris, E. Characterization of conducting cellulose acetate based polymer electrolytes doped with “green” ionic mixture. **Carbohydrate Polymers.** 2013 (91) 14–21.

Rams T.E., Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. **Periodontol 2000.** 1996; (10) 139-59

Ren, J. L., Sun, R. C., Liu, C. F., Cao, Z. N., & Luo, W. Acetylation Of Wheat Straw Hemicelluloses In Ionic Liquid Using Iodine As A Catalyst. **Carbohydrate Polymers.** 2007;70(4), 406–414.

Ribera A. Tetraciclines. **Treballs de la SCB.** 2004; (55) 121-134.

Rigo E.C.S., Gehrke S.A., Carbonari M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Rev. Dental Press Periodontia Implantol.** 2007; (1) 39-50.

Roberts M.C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiol Rev.** 1996; 19:1-24.

Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiol Rev** 1996; 19:1-24.

Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials.** 2002; 23(2):449-56.

Rodrigues Filho G., Toledo L.C., Da Silva L.G., de Assunção R.M.N., Meireles C.S., Cerqueira D.A., Ruggiero R. **Membranes of Cellulose Triacetate Produced from Sugarcane Bagasse Cellulose as Alternative Matrices for Doxycycline Incorporation.** 2009.

Rodrigues Filho, G., Toledo, L. C., Cerqueira, D. A., de Assuncao, R. M. N.; Meireles, C. D.; Otaguro, H.; Rogero, S. O.; et al. Water flux, DSC, and cytotoxicity characterization of membranes of cellulose acetate produced from sugar cane bagasse, using PEG 600. **Polymer Bulletin.** 2007; (59) 73-81.

Ruggiero, R., Carvalho, V.A., Silva, L.G., Magalhães, D., Ferreira, J.A., Menezes, H.H.M., Melo, P.G., Naves, M.N. Study of in vitro degradation of cellulose acetate membranes modified and incorporated with tetracycline for use as an adjuvant in periodontal reconstitution. **Industrial Crops and Products.** 2015; (72)2–6

Sassi J.F., Chanzy H. Ultrastructural aspects of the acetylation of cellulose. **Research Papers Cellulose.** 1995; (2) 111-127.

Sbordone L, Barone A, Di Genio A, Ramaglia, LS. Bacterial colonisation during GTR treatment. A longitudinal analisys. **Minerva Stomatol.** 1999; 48(11): 501-08.

Sbordone L., Barone A., Di Genio M., Ramaglia L. Tetracycline fibres used to control bacterial infection during guided tissue regeneration (GRT). **Minerva stomatol.** 2000; 49 (1-2):27-34.

Sbordone L., Barone A., di Genio M., Ramaglia L. Bacterial colonisation during GTR treatment. A longitudinal analysis. **Minerva Stomatol.** 1999 ; 48(11):501-8.

Schlegel A.K., Möhler H., Busch F., Mehl A. Pre clinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). **Biomaterials.** 1997; 18 (7):535-8.

Schlemmer, D., Sales, M.J.A.; Resck, I.S. Preparação, caracterização e degradação de blendas PS/TPS usando glicerol e óleo de buriti como plastificantes. **Polímeros.** 2010.

Shaikh, H.M., Pandare, K.V., Nair, G., Varma, A.J. Utilization of sugarcane bagasse cellulose for producing cellulose acetates: novel use of residual hemicellulose as plasticizer. **Carbohydr. Polym.** 2009; 76, 23–29.

Shen, E. C., Chen, C. L., Sfeir, C. Treatment of intrabony defects by polylactic acid matrix barrier. **Periodontol Clin Investig.** 1997; 19-22.

Slots J., MacDonald E.S., Nowzari H. Infectious aspects of periodontal regeneration. **Periodontol 2000.** 1999; (19) 164-72.

Soskolne, W.A.; Friedman, M.F. Intra-periodontal pocket drug delivery systems. In: RATHBONE, M. J. (Ed.). **Oral mucosal drug delivery.** New York: Marcel Dekker, 1996.v. 74, p. 359-379.

Steinberg, D.; Friedman, M. Sustained release drug delivery devices for local treatment of dental diseases. In: TYLE, P. (ed.). **Drug Delivery Devices.** New York: Marcel Dekker, 1988. p. 491-515.

Taga M., Minaguchi H. Change in C-terminal cross-linking domain of type I collagen in urine, a new marker of boneresorption, during and after gonadotropin-releasing hormone agonist administration.**Eur J Endocrinol.** 1997; 137(2):167-71.

Tonetti MS, Cortellini P, Carnevale G, Cattabriga M, de Sanctis M, Pini Prato GP. A controlled multicenter study of adjunctive use of tetracycline periodontal fibers in mandibular class II furcations with persistent bleeding. **J Clin Periodontol.** 1998 Sep; 25(9): 728-36.

Tonetti, M.; Cugini, M. A.; Goodson, J. M. Zeroorder delivery with periodontal placement of tetracycline-loaded ethylene vinyl acetate fibres. **J. Periodont. Res.** 1990;v. 25, p. 243-249.

Trombelli L., Tatakis D.N., Scabbia A., Zimmerman G.J. Comparison of mucogingival changes following treatment with coronally positioned flap and guided tissue regeneration procedures.**Int J Periodontics Restorative Dent.** 1997;17(5):448-55.

V.P. Cyrus, L.P. Manfredi, M.T. Ton-That, A. Vásquez Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers.** 2008; 55–63

Wang H.W., Tedla N., Lloyd A.R., Wakefield D., McNeil P.H. Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice.**J Clin Invest.** 1998; (8): 1617-26.

Wang HL, MacNeil RL. Guided tissue regeneration. Absorbable barriers.

Wang, H.L; Carroll, M.J. Guided bone regeneration using bone grafts and collagen membranes. **Quintessence Int.** 2001; (32) 504-515.

Wu CS. Influence of modified polyester on the material properties of collagen-based biocomposites and in vitro evaluation of cytocompatibility.**Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.** 2015; 48:310-9.

Zhou, L., Lai, Y., Huang, W., Huang, S., Xu, Z., Chen, J., Wu, D. Biofunctionalization of microgroove titanium surfaces with an antimicrobial peptide to enhance their bactericidal activity and cytocompatibility. **Colloids Surf B Biointerfaces.** 2015; 1(128)552-60.

Zohar, R. et al. Tetracycline impregnation delays collagen membrane degradation in vivo. **J Periodontol.** 2004; (75) 1096-1101.

Zugenmaier, P. Crystalline cellulose and derivatives. **New York Springer.** 2008; 285.