

SIMONE RODRIGUES

Preparo e caracterização *in vitro* de filmes de hidrogel de amido reticulado com glicerol visando aplicação em procedimentos regenerativos odontológicos.

Preparation and in vitro characterization of glycerol crosslinked starch hydrogel films for application in dental Regenerative Dentistry.

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

Uberlândia, 2019

SIMONE RODRIGUES

Preparo e caracterização *in vitro* de filmes de hidrogel de amido reticulado com glicerol visando aplicação em procedimentos regenerativos odontológicos.

Preparation and in vitro characterization of glycerol crosslinked starch hydrogel films for application in dental Regenerative Dentistry.

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

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Área de concentração: Periodontia e Implantodontia

Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero

Área de concentração: Físico-química
de macromoléculas e colóides

Banca Examinadora:

Prof.Dr. Denildo de Magalhães

Prof.Dra Patrícia Gontijo

Prof.Dra. Marina de Melo Naves

Prof.Dr. Reinaldo Ruggiero

Uberlândia-MG

Fevereiro, 2019

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

R696p
2019

Rodrigues, Simone, 1973

Preparo e caracterização *in vitro* de filmes de hidrogel de amido reticulado com glicerol visando aplicação em procedimentos regenerativos odontológicos = Preparation and in vitro characterization of glycerol crosslinked starch hydrogel films for applicati [recurso eletrônico] / Simone Rodrigues. - 2019.

Orientador: Denildo de Magalhães.

Coorientador: Reinaldo Ruggiero.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1239>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Odontologia. 2. Periodontia. 3. Regeneração óssea guiada. 4. Biofilmes. I. Magalhães, Denildo de, 1960, (Orient.). II. Ruggiero, Reinaldo, 1949, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



ATA

ta da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado COPOD

Data: 19/02/2019

Discente: **Simone Rodrigues (11712ODO021)**

Título do Trabalho: **Preparo e caracterização in vitro de filmes de hidrogel de amido reticulado com glicerol visando aplicação em procedimentos regenerativos odontológicos.**

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Implantodontia e Prótese sobre Implantes.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Implantodontia e Prótese sobre Implantes.

As **quatorze horas** do dia **dezenove de fevereiro de 2019** no Anfiteatro Bloco 4L Anexo A, sala 23 Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro de 2019, assim composta: Professores Doutores: Marina de Melo Naves (UFU); Patrícia Gontijo de Melo (IFTM); e o orientador(a) do(a) candidato(a): **Denildo de Magalhães**.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa **Dr. Denildo de Magalhães** apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadores (as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Finalizada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o(a) candidato(a) Aprovada.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada eletronicamente pela Banca Examinadora.



§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina de Melo Naves, Usuário Externo**, em 20/02/2019, às 13:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Gontijo de Melo, Usuário Externo**, em 25/02/2019, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1010193** e o código CRC **61C56D58**.

DEDICATÓRIA

À Deus por ter me dado vida e sonhos...

À Deus por ter me dado a mim mesma, assim pude conquistar realidades!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Denildo de Magalhães pela oportunidade, compreensão e tantos ensinamentos...com sua dedicação pude me apaixonar pela Periodontia, um amor maduro nesse momento da vida profissional. Você me abriu uma porta e me deu esperança, obrigada por acreditar em mim!

Agradeço também ao meu co-orientador Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero por iniciar-me nas ciências químicas, pelo empenho no melhoramento da metodologia desse trabalho à cada resultado, pela empolgação com a Odontologia e interesse pelos princípios da Regeneração, vislumbrando avanços tecnológicos e devolvendo a pesquisa à sociedade... pudemos encurtar distâncias! Te agradeço por toda dedicação!

Agradeço aos queridos professores Marina de Melo Naves e Helder Henrique Menezes pela acolhida no grupo de pesquisa o qual pude integrar... cada opinião e cada orientação puderam enriquecer meu aprendizado. Toda admiração por vocês!

Agradecimento especial à Mariana Fornazier Borges pela disposição em andar comigo, me ensinando cada passo em um laboratório de química, sua paciência e generosidade me comoveram em muitos momentos... e eu nunca estive só! Você vai brilhar ainda mais, é o que te desejo!!

Agradeço carinhosamente à Prof. Dra. Patrícia do IFTM que gentilmente me dispensou momentos de discussões científicas que muito contribuíram para o caminhar na novidade da Química. A sua amizade é para mim gratificante!

Agradeço a amizade dos colegas alunos do Laboratório de Materiais Lignocelulósicos do Instituto de Química da UFU pelas trocas de saberes e apoio ao meu desempenho, foi para mim, um prazer esse convívio!

Agradeço ao Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT), grupo de pesquisa apoiado pela FAPEMIG (APQ-00330-14), pela parceria nas análises do FTIR contribuindo com meu desempenho.

Agradeço aos colegas Jéssica Afonso, Isabella Resende Vieira, Karine Tolesano, Camila Peres Rosato, Thaís Chistina Nunes pela amizade, incentivo e apoio prestados em momentos decisivos nessa jornada... amigos são anjos!

Agradeço também aos colegas do mestrado com os quais pude conviver e compartilhar novos saberes especialmente a Gabriela Leite, Marcela Silva de Paula, Luciana do Carmo, Daniela Lima, Eduardo Moura, Brenda Pineda e Luis Gustavo. Vocês foram companhia, ânimo e luz em meu caminho...quero os sempre por perto!

Agradeço a Faculdade de Odontologia da UFU e ao programa de Pós-graduação, em especial aos professores Alfredo Júlio Fernandes Neto, Fabiana Sodré, Camila Crhistian Gomes, Veridiana Novais, Ana Paula Oliveira, Cristiane Pacheco, Carla Zancopé, LilianeTannus, dentre outros pelos ensinamentos que sempre me acompanharão... meu orgulho é ter me formado, me especializado e agora ser mestre por essa casa! Que riqueza, a nossa escola mãe!

Agradeço aos membros das comissões avaliadoras de qualificação e defesa pelo aceite ao convite, atenção e contribuições científicas valiosas para a conclusão desse trabalho.

Uma menção especial à professora Elen que esteve comigo desde o processo seletivo, quando o conhecimento da língua inglesa já carecia de uma dedicação e desde então tem me dado todo suporte nas traduções e interpretações e que com a riqueza do seu trabalho me incentiva sempre...

Gratidão ao Prof. Paulo César Azevedo por ser meu primeiro mentor e uma referência como docente e profissional, me conduzindo desde a graduação. Serei sempre grata.

Agradeço ao Prof. Marco Aurélio Borges Gagliardi, que viu em mim potencial para a docência e me dispensou oportunidades. Cursar o mestrado era o mínimo que eu poderia fazer em resposta a tal confiança. Você é um amigo, conselheiro e mestre em todo tempo. Gratidão sempre!

Agradeço a HD ensinos, por ser também minha casa, onde estudo aprendo, convivo, ensino e coopero por um exercício melhor e mais acessível da

odontologia, em especial a querida Nívea e meus queridos alunos... Eu me realizo junto a vocês!

Agradeço aos meus pais Laerte e Neyde, meus primeiros exemplos de amor à educação, aos meus filhos Lucas Jorge e Isadora Jorge por estarem sempre comigo, me honrando em minhas escolhas... vocês são a motivação real de todo esse propósito! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e familiares por serem motivadores da busca pelo saber, bons exemplos para mim!

Agradeço a um melhor amigo, namorado, companhia em momentos de alegria, mas também naqueles de silêncio ou frustração... a você mostrei minha dor, você me mostrou o privilégio de chegar onde estou. Lembranças com amor do estudo, choro e riso fáceis! Que presente tê-lo ao meu lado!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

EPÍGRAFE

“ Dono de toda ciência, sabedoria e poder, dá-me de beber da água da fonte da vida!

Antes que o mar já houvesse, Ele já era Deus, se revelou aos seus, do crente ao ateu, ninguém explica DEUS !! ”

Preto no Branco

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
1.1 Doença periodontal.....	11
1.2 Terapia periodontal.....	12
1.3 Regeneração tecidual guiada	13
1.4 Princípios biológicos e engenharia tecidual	15
1.5 Amido	18
1.5.1 Estrutura química	18
1.5.2 Gelatinização	20
1.5.3 Plastificantes	21
1.5.4 Reticulação	22
2. CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1	24
REFERÊNCIAS.....	56

RESUMO

A doença periodontal frequentemente resulta em danos ao aparelho de inserção dental e as intervenções ressectivas são indicadas a fim de interromper a destruição dos tecidos, porém estas intervenções guardam limitações significativas. Procedimentos regenerativos são propostos com o intuito de repor as estruturas perdidas no contexto das técnicas de regeneração tecidual guiada (RTG) e regeneração óssea guiada (ROG) e frequentemente associam substitutos ósseos e barreiras físicas visando maior longevidade e melhoria do padrão estético. Este estudo apresenta o amido como um biopolímero que gelatinizado produz filmes que sugerem sua utilização como material de barreira. Filmes biodegradáveis de hidrogel de amido de fécula de mandioca foram preparados incorporando glicerol nas concentrações de 0,15, 20, 30 e 40% com objetivo de estudar sua viabilidade. A caracterização dos filmes de hidrogel por microscopia (MEV), análise térmica (DSC), espectroscópicas (UV/Vis., FTIR, DRX), mecânica (Tração), além da análise do intumescimento, degradação e difusão de proteína (todos em pH e temperatura fisiológicos) mostrou que a incorporação do glicerol em até 20% atribuiu aos filmes um caráter plastificante, e em concentrações mais elevadas conferiu uma maior interação do glicerol (reticulação) com as cadeias de amido e um tempo de degradação que viabiliza a utilização destes como barreira física em RTG e ROG. Os filmes apresentaram resistência mecânica, maleabilidade e permissividade à difusão proteica nos ensaios *in vitro*, que vão ao encontro dos atuais atributos que norteiam a utilização desses recursos em biomateriais.

Palavras chaves: hidrogel de amido, reticulação, terapia periodontal.

ABSTRACT

Periodontal disease often results in damage to the dental insertion apparatus when resective interventions are indicated to interrupt tissue destruction, but these interventions have significant limitations. Regenerative procedures are proposed with the purpose of replace the lost structures in the context of guided tissue regeneration (GTR) and guided bone regeneration (GBR) techniques and frequently associate bone substitutes with physical barriers aiming at greater longevity and improvement of the aesthetic pattern. This study presents the starch as a biopolymer which gelatinized produces films that suggest its use as a barrier material. Biodegradable cassava starch hydrogel films were prepared incorporating glycerol at concentrations of 0, 15, 20, 30 and 40% aiming its application at dental regenerative procedures , with the objective of studying their viability. The characterization of hydrogel films by microscopy (SEM), thermal analysis (DSC), spectroscopic (UV / Vis., FTIR, XRD), mechanical (Traction), and analysis of protein swelling, degradation and diffusion and physiological temperature) showed that the incorporation of glycerol in up to 20% attributed to the films a plasticizer character and in higher concentrations, conferred a greater interaction of the glycerol (crosslinking) with the starch chains and a degradation time that allows the physical barrier in RTG and ROG. The films presented mechanical resistance, malleability and permissiveness to protein diffusion in the *in vitro* assays, which meet the current attributes that guide the use of these resources in biomaterials.

Key words: starch hydrogel, crosslinking, guided tissue regeneration.

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Doença periodontal

Infecções periodontais e cárie dentária são doenças induzidas pelo biofilme e indiscutivelmente são as doenças infecciosas mais comuns em humanos. Os microrganismos que causam a doença periodontal residem em biofilmes existentes nos dentes ou em superfícies epiteliais. A situação se define pelos microrganismos colonizando uma superfície estável e mantidos próximos, ou mesmo íntimos dos tecidos moles, porém fora do alcance dos mecanismos de defesa do hospedeiro, representando uma ameaça¹. Os microrganismos *A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* são patógenos periodontais designados pelo “Consensus Report”, 1996, no Simpósio Mundial de Periodontia².

Socransky et al, examinaram mais de 13.000 amostras de placas subgingivais e demonstraram a presença de associações específicas entre as espécies. Seis grupos intimamente relacionados foram reconhecidos e designados por cores. Os complexos amarelo, verde e roxo são colonizadores primários de superfícies dentárias cujo crescimento precedem a multiplicação dos complexos laranja e vermelho predominantemente Gram-negativos e que juntos compreendem as espécies consideradas principais agentes etiológicos das doenças periodontais. O estado da doença e a profundidade da bolsa periodontal são fatores do hospedeiro que junto de outros fatores como padrão genético do indivíduo, fatores ambientais como tabagismo e dieta, condições sistêmicas como diabetes e obesidade e até mesmo localização geográfica podem determinar variações na composição do biofilme³. As substâncias que levam ao dano tecidual e conseqüentemente à progressão da doença são designadas como fatores de virulência, sendo que o patógeno *P. gingivalis* produz uma série de proteases incomuns incluindo aquelas que degradam o colágeno⁴, imunoglobulinas⁵ e fibronectina⁶ entre outras. Baseada na presença do biofilme e em fatores que modificam o estado inflamatório da gengiva, a gengivite induzida pelo biofilme é considerada a forma mais comum de doença periodontal⁷. Ela se caracteriza por sinais clínicos de inflamação gengival envolvendo mudanças no contorno, cor e consistência e volume devido ao

edema ou fibrose, estando estes associados a um periodonto firme que não apresenta perda de inserção ou de osso alveolar⁸.

Considera-se que a periodontite inicia-se com uma gengivite induzida pelo biofilme, uma condição reversível que sem tratamento, pode progredir sendo que nem todos os sítios que apresentam inflamação gengival progridem para periodontite pois tipos específicos de respostas inflamatórias na gengiva são necessários para iniciar a destruição do tecido conjuntivo da inserção apical para a junção cimento esmalte. O cálculo subgengival está invariavelmente presente nos sítios doentes e tem relação direta com a higiene oral e níveis de placa. Estudos longitudinais demonstram que apesar da placa bacteriana iniciar e manter a periodontite, são os fatores do hospedeiro que determinam a patogênese e a progressão da doença^{9,10}.

Uma nova classificação para as doenças periodontais foi proposta no Proceedings do Workshop Mundial para a Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Periimplantares, realizado em novembro de 2017 e que posteriormente, em junho de 2018 passou a substituir a classificação de 1999 vigente até então¹¹.

1.2 Terapia periodontal

O tratamento de pacientes acometidos pela doença periodontal, passa por uma fase inicial associada à causa cujo objetivo é interromper a destruição dos tecidos. A raspagem é o procedimento que objetiva a remoção de placa e cálculo da superfície dos dentes podendo ser a instrumentação supragengival e ou subgengival. O debridamento radicular consiste na remoção de placa e cálculo da superfície radicular sem a intencional remoção da estrutura dental¹² e visa a resolução da inflamação gengival, a interrupção da destruição progressiva do aparelho de inserção, bem como o edema, a hiperemia e a consistência flácida dos tecidos, tornando possível uma avaliação dos reais contornos e profundidade de bolsas¹³. A terapia cirúrgica é considerada coadjuvante por facilitar a remoção dos depósitos subgengivais e o controle de placa pelo paciente. Estima-se importante que a superfície radicular exposta seja biologicamente compatível com o periodonto saudável a partir de um

condicionamento que inclua a remoção bacteriana e de endotoxinas na junção cimento dentina¹⁴. O condicionamento ou biomodificação radicular por meio de substâncias como o ácido cítrico, ácido ortofosfórico, a tetraciclina e o EDTA são amplamente citados¹⁵.

Tanto a terapia periodontal cirúrgica quanto a não cirúrgica, resultam em recessão da gengiva marginal após cicatrização¹⁶. Em casos avançados de periodontite isso pode levar a estética deficiente em dentes da região anterior, particularmente quando são empregados recontornos ósseos para erradicação dos defeitos. Por outro lado, os referidos casos sem a técnica do recontorno, podem resultar em bolsas residuais de difícil higienização durante a manutenção pós tratamento. Essa limitação na resolução dos casos pode ter uma melhor expectativa quando do emprego de procedimentos cirúrgicos regenerativos, através dos quais, a perda de inserção periododental nos defeitos ósseos pode ser restaurada. A terapia regenerativa tem sua indicação baseada na melhoria da função e prognóstico à longo prazo, bem como melhoria no padrão estético¹⁷. Dentes com envolvimento de furca, também obtiveram um novo prognóstico quando a cirurgia ressectiva pouco pode acrescentar em termos de reinserção nessa região, considerada de difícil acesso a uma instrumentação adequada devido a anatomia com concavidades e sulcos¹⁸.

1.3 Regeneração tecidual guiada

Gottlow et al¹⁹, avaliaram a estabilidade de nova inserção periodontal conseguida através de procedimentos de Regeneração tecidual guiada, (RTG) e os resultados indicam que o ganho de inserção, obtidos podem ser mantidos em uma perspectiva à longo prazo. O potencial clínico da técnica de barreira de membrana foi reconhecido pela equipe de pesquisa de Karring e Nyman²⁰ que avaliaram vários estudos experimentais e clínicos que consolidaram as bases de uma nova abordagem complementar em Terapia Periodontal. A RTG desenvolvida para a regeneração de tecidos periodontais perdidos pela doença inflamatória foi amplamente estudada, a criação de espaço entre as superfícies: interna da membrana e radicular, dando preferência ao crescimento coronal de células do ligamento periodontal poderiam ser alcançadas. Uma nova deposição

de cimento a partir de cementoblastos, a deposição de tecido ósseo pelos osteoblastos e então a deposição de fibras colágenas por fibroblastos que orientadas de modo funcional se inserem ao cimento e ao osso alveolar seriam esperados a partir desse novo dispositivo ligamentar²¹.

Nas técnicas de RTG são utilizadas barreiras teciduais no intuito de anular a interferência de células indesejáveis provenientes dos tecidos adjacentes durante o processo de reparo visto que com a deposição de fibras colágenas pelos fibroblastos a neoformação óssea não se efetiva pois o espaço não foi fisicamente preservado²². Este princípio inicialmente denominado Regeneração Óssea Guiada (ROG), foi descrito por Boyne²³ e Bassett²⁴ que aplicaram filtros laboratoriais de acetato de celulose microporosos (millipore) para a cicatrização de defeitos corticais e em reconstrução óssea facial, respectivamente. Esta abordagem tem sua ampla aplicabilidade nas modalidades cirúrgicas odontológicas de regeneração dos tecidos periodontais lesados pela progressão da doença, regeneração de lesões periapicais^{25,26}, reconstrução de rebordos atróficos²⁷, deiscências ósseas ao redor de implantes²⁸ e instalação de implantes imediatos²⁹.

Em 2002, o “European Workshop on Periodontology” e o “Workshop on Emerging Technologies in Periodontics”³⁰, forneceram uma extensa avaliação sistemática da evidência de tecnologias atualmente disponíveis, a qual inclui membranas de RTG, enxertos e materiais biologicamente ativos.

Figura 1. Terapia Regenerativa.



Fonte: Regeneração de defeitos ósseos. Disponível em:

<http://www.dentarmed.pt/pt/news/cirurgia-plastica-periodontal>. Acesso outubro 2018.

Um material de membrana documentado para o fim da osteopromoção é o politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), um material inerte e com extensa história de uso na medicina clínica e seu uso está ilustrado em um relato publicado em 1988 por Dahlin et al.³¹. Os resultados mostraram reparo ósseo completo quando comparados ao grupo controle que se mostrou com pouca neoformação óssea nas margens do defeito devido à proliferação de tecido conjuntivo frouxo. Além disso a inatividade química e biológica das membranas de e-PTFE foi demonstrada pela ausência de reação tecidual adversa. Outra possível explanação sugerida por Schmitz et al.³², é que a ocorrência da não união óssea pode ser devido à uma falha das células designadas para a calcificação da matriz que estão presentes no local, supostamente causada pela ausência de crescimento ósseo adequado, derivado este dos fatores de crescimento e também de diferenciação celular nesses defeitos ósseos. Experimentos *in vitro* demonstraram que fibroblastos produzem um ou mais fatores solúveis, inibidores da diferenciação de células ósseas e osteogênese³³. Muitas pesquisas focaram no potencial osteogênico dos implantes de osso em pó desmineralizado. A restauração de defeitos esqueléticos por osso natural, (enxerto ósseo autógeno fresco) permanece sendo o resultado alvo a ser alcançado³⁴.

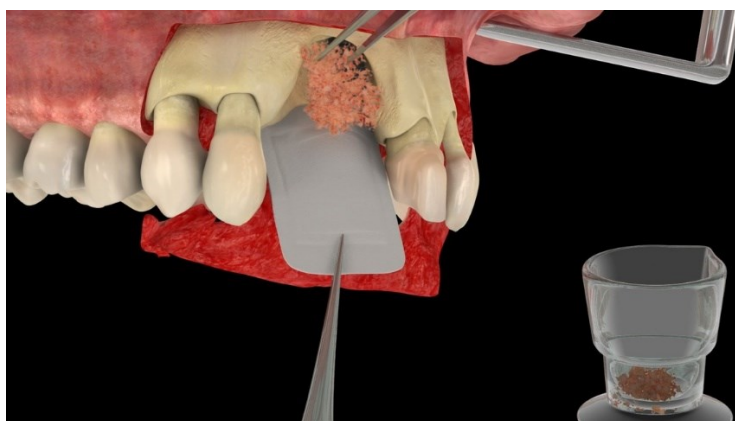
1.4 Princípios biológicos e engenharia tecidual

A eficácia de todos os recursos clínicos com a filosofia da regeneração dos tecidos depende do pequeno grupo de células progenitoras presentes no sítio tratado capazes de gerar novo tecido. Um esforço em criar ou induzir a formação de um tecido específico em local definido por meio da seleção e manipulação de células matrizes e estímulos biológicos agregam o conceito de engenharia tecidual. Enxertos, membranas, matrizes, fatores de crescimento ou citocinas só podem contribuir para a geração ou integração de um novo tecido pela sua influência no comportamento das células. Nenhum novo tecido pode formar-se sem a atividade de células viáveis³⁵. Os novos conceitos de terapia celular devem estar associados aos clássicos princípios de manutenção do espaço, arcabouço mecânico e oclusão celular. O arcabouço mineralizado com estabilidade mecânica e alto potencial de revascularização e osseocondução deve ser considerado³⁶. Já a interconectividade dos espaços proporciona meios

para a migração de células, angiogênese e possivelmente a remodelação óssea. O crescimento do número de células que povoam o local tratado depende da difusão de nutrientes e oxigênio^{37,38,39}.

Xenoenxertos como o Bio-Oss® atuam nos estágios preliminares da diferenciação de células mesenquimais contribuindo para a formação óssea⁴⁰. Esse biomaterial é muito próximo ao osso humano, devido a sua estrutura, interconectividade e porosidade. Por não conter células, histologicamente é chamado de tecido mineralizado não vital, podendo substituir o enxerto ósseo autógeno em várias situações^{41,42,43,44}.

Figura 2. Cirurgia regenerativa associando substitutos ósseos e membrana.



Fonte: Regeneración Ósea. Disponível em:

<http://federacionodontologica Colombiana.org/contenido/focadmin/files/Portafolio%20Diplomado%20Regeneraci%C3%B3n%20%C3%93sea%20Tisular%20Guiada.pdf>. Acesso outubro 2018.

A fim de selecionar materiais que melhor se enquadram em aplicações clínicas, fez-se necessário atentar-se aos requisitos funcionais dos biomateriais utilizados na elaboração de barreiras. Williams^{45,46} define a biocompatibilidade como a condição da relação existente entre um biomaterial em um meio fisiológico, sem que o material afete o organismo, da mesma forma que o ambiente do organismo não afete contraria e significativamente o material. Materiais sintéticos utilizados não são geralmente considerados antígenos potentes, porém alguns dos componentes de certos polímeros, em sua maioria monômeros residuais podem provocar reação de hipersensibilidade tardia em pacientes⁴⁷. Os materiais poliméricos comumente sugeridos na constituição de

membranas, os ácidos polilático e poliglicólico, degradam-se pelo processo de hidrólise, contudo durante o processo eles perdem sua integridade mecânica e fragmentam-se tendo um efeito tecidual local, podendo conduzir a uma reabsorção óssea verdadeira⁴⁸. Biomateriais derivados do colágeno podem dependendo da forma pela qual o colágeno doador é processado, ter um efeito significativo na estrutura, nas propriedades mecânicas, no potencial imunogênico e finalmente no tempo de degradação. Seu potencial imunogênico pode ser minimizado pela redução de resíduos de telopeptídeos, ou por ligações cruzadas⁴⁹.

A capacidade de um material alcançar integração tecidual é determinada, num grau significativo, pela natureza da resposta celular ao material. A inserção e propagação de fibroblastos, como precursores indispensáveis para a deposição e subsequente integração tecidual promoverá uma integração orientada de tecido conjuntivo gengival que inibirá ou retardará a migração epitelial⁵⁰.

A capacidade oclusiva das membranas foi avaliada por Karring, Neyman e coautores em uma sequência de trabalhos nos quais foi sugerido que membranas utilizadas em regeneração óssea tenham propriedades porosas e permitam a transferência de nutrientes teciduais fluidos e gasosos ao enxerto^{51,52}. Hurley et al.⁵³, incluíram membranas compostas de borrachas de silicone não porosas em fusões experimentais de espinhas em que os locais tratados com tais membranas fracassaram na cicatrização. Portanto, uma estrutura de membrana que permita a difusão de substâncias importantes e ainda encontre outras funções requisitadas constitui-se um alvo a se alcançar.

A membrana elaborada para a ROG deve apresentar características como a criação de espaço, manutenção de volume e geometria adequados suportando seu próprio peso e resistindo à pressão exercida pelo tecido subjacente visto que o colapso da membrana resulta em prejuízo a regeneração⁵⁴. A formação de um osso embrionário inicia-se na superfície da matriz óssea,⁵⁵ e se propaga em direção ao interior do defeito e depende dos índices de revascularização e do recrutamento de osteoblastos⁵⁶. Dessa forma a distância a ser percorrida pela regeneração óssea determinará o tempo em que a membrana deverá permanecer no local e funcionalmente intacta.

Nos estudos de Pelegrini et al⁵⁷, O uso da membrana Bio-Gide[®] demonstrou um incremento nos resultados regenerativos, provavelmente por prevenir a invasão indesejável de tecidos adjacentes ao defeito ósseo. Nos grupos experimentais análises histomorfométricas mostraram um aumento na quantidade de tecido mineralizado vital e diminuição da quantidade de tecido não mineralizado, corroborando Busenlechner et al⁵⁸. A membrana Bio-Gide[®] é a membrana bioabsorvível com o maior número de citações em periódicos. Investigações científicas relatam membranas reabsorvíveis, com certas vantagens sobre as membranas de primeira geração ou não reabsorvíveis⁵⁹. 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 literatura⁶⁰.

Em relação aos materiais utilizados para produção de filmes como barreira física possivelmente aplicáveis com membranas, o amido se apresenta como um polímero biocompatível, natural e abundante na natureza, derivado neste estudo do polvilho ou fécula da mandioca (*Manihot utilissima*), referindo-se ao produto amiláceo extraído das partes subterrâneas e comestíveis do vegetal, sendo este o material foco do presente estudo.

1.5 Amido

1.5.1 Estrutura química

Os polímeros naturais ou biopolímeros são aqueles encontrados na natureza, produzidos por plantas, animais e microorganismos ou seja, de fontes renováveis. Os biopolímeros são naturalmente biodegradáveis e têm despertado o interesse acadêmico e industrial com destaque para os polissacarídeos como o amido, passível de formação de hidrogel e os colóides. O amido é o biopolímero mais abundante no mundo após a celulose e se apresenta em forma de grânulos esféricos intracelulares de 2-100 µm de diâmetro. As variações de tamanho, forma, composição e associações são dependentes de sua origem botânica⁶¹.

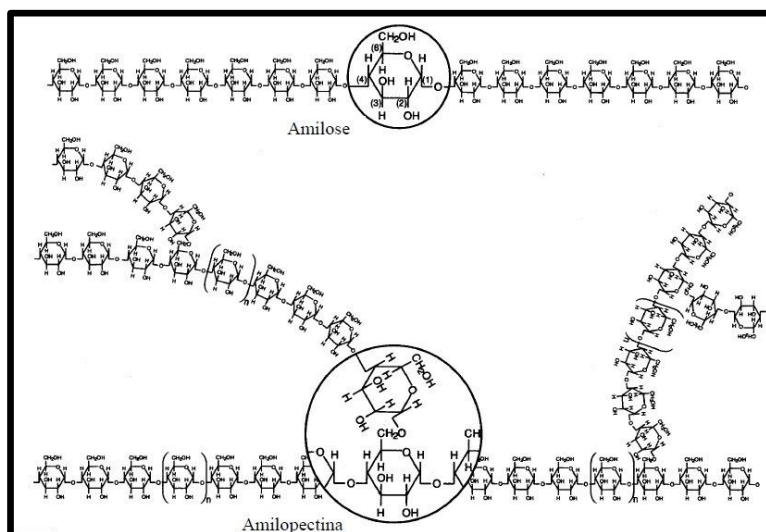
Figura 3. Apresentação da fécula de mandioca



Fonte: Autora

Por ser uma molécula complexa, de alto peso molecular ele é considerado um polissacarídeo de difícil solubilização, extraído de fontes naturais como mandioca, milho, batata dentre outras. Possui em sua composição a amilose, que consiste em um polissacarídeo de cadeia linear e a amilopectina, de cadeia ramificada. A razão e a conformação entre amilose e amilopectina varia de acordo com a fonte. A amilopectina possui a massa molar maior que a da amilose e por isso pouca mobilidade das cadeias poliméricas. A maioria dos amidos nativos contém de 20 a 30% de amilose e cerca de 70 a 80% de amilopectina⁶².

Figura 4. Estruturas da amilose e amilopectina.



Fonte: Bona,2007 ⁶³.

É possível verificar tanto na estrutura da amilose quanto da amilopectina a presença de grupos hidroxila (OH-), o que torna o amido

altamente hidrofílico. Em água fria o grânulo é insolúvel devido às fortes ligações de hidrogênio que mantêm as cadeias unidas, mas com o aumento da temperatura a água é incorporada a estrutura do grânulo, que expande seu volume, fenômeno este denominado intumescimento⁶⁴. Fisicamente muitos amidos são semi-cristalinos, (20 a 45%). A amilose e seus pontos de ligação com a amilopectina são regiões amorfas. A cristalinidade é devido às partes lineares das cadeias de amilopectina, apesar de também se observar cristalinidade na amilose, porém isto acontece com o aumento da temperatura no processo de gelatinização⁶⁵.

1.5.2 Gelatinização

A gelatinização do amido é tida como o colapso e a desintegração da ordem molecular dos grânulos e depende de vários fatores como o tipo de amido, a concentração da dispersão, a temperatura utilizada e a intensidade de cisalhamento durante o aquecimento. Entrando em contato com a água fria, os grânulos incham ligeiramente (10 a 20%), devido a difusão e absorção de água nas regiões amorfas, sendo este processo ainda reversível, porém quando a temperatura é elevada ocorre a fusão dos cristais, perda da organização estrutural com expansão irreversível dos grânulos⁶⁶. A lixiviação da amilose da fase intragranular para a fase aquosa aumenta a viscosidade do sistema dando origem ao hidrogel de amido⁶⁷.

Quando o amido gelatinizado é armazenado e mantido a temperatura ambiente, devido a sua linearidade, ele pode sofrer a retrogradação, onde as moléculas de amilose, tendem a se orientar paralelamente, aproximando-se o suficiente para formar pontes de hidrogênio entre as hidroxilas de polímeros adjacentes de tal modo que as cadeias atingem um estágio mais ordenado, provocando assim a diminuição de volume e reduzindo a afinidade do polímero pela água, o que permite ao amido gelatinizado formar filmes estáveis e flexíveis⁶⁸. A utilização de amidos na forma nativa pode apresentar algumas limitações como a inadequação das propriedades aos fins propostos, além da elevada tendência à separação de fases após a gelatinização, decorrente da reassociação das moléculas, com exsudação da água de hidratação durante o

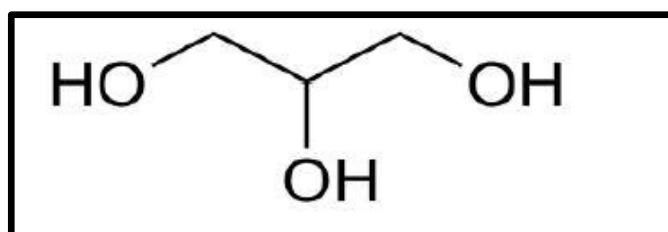
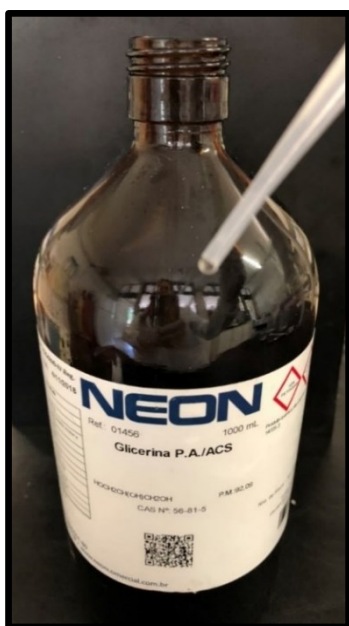
armazenamento (retrogradação e sinérese)⁶⁹. A fragilidade é uma propriedade inerente atribuída à estrutura complexa e às altas forças intermoleculares de polímeros naturais.

1.5.3 Plastificantes

Como os biomateriais elaborados a partir do amido são pouco flexíveis e quebradiços faz-se necessária a adição de plastificantes à matriz polimérica para melhorar suas características de flexibilidade. Para o desenvolvimento de soluções filmogênicas a partir do amido, são adicionados plastificantes que melhoram as características do filme, suavizando a rigidez da estrutura e aumentando a mobilidade das cadeias biopoliméricas, otimizando assim as propriedades mecânicas⁷⁰. A adição de um plastificante ao polímero diminui sua temperatura de fusão aumentando a flexibilidade dos filmes devido a mobilidade entre as cadeias, o que modifica as propriedades do material como a queda do alongamento e aumento do módulo de elasticidade, porém não altera a natureza química do polímero⁷¹.

O glicerol ou propano-1,2,3-triol é um álcool com três hidroxilas, sendo um dos plastificantes mais utilizados na produção de filmes com amido.

Figura 5. Apresentação e estrutura química do Glicerol.



Fonte: Autora

Ao avaliar o efeito plastificante do glicerol e do sorbitol em bioplásticos de amido de mandioca, Shimazu et al (2007) comprovou que o glicerol quando utilizado em baixas concentrações ($\leq 15\text{g}/100\text{g}$ de amido) apresentou o efeito antiplastificante, ou seja, as interações mais fortes entre o plastificante e o amido estão acontecendo por interações de ligações de hidrogênio, que induz a um decréscimo da mobilidade e da capacidade de ligação com a água⁷². Sendo assim dependendo da concentração empregada do plastificante no amido (geralmente abaixo de $20\text{g}/100\text{g}$ de amido), pode ocorrer um efeito contrário onde a flexibilidade e a hidrofília são diminuídas.

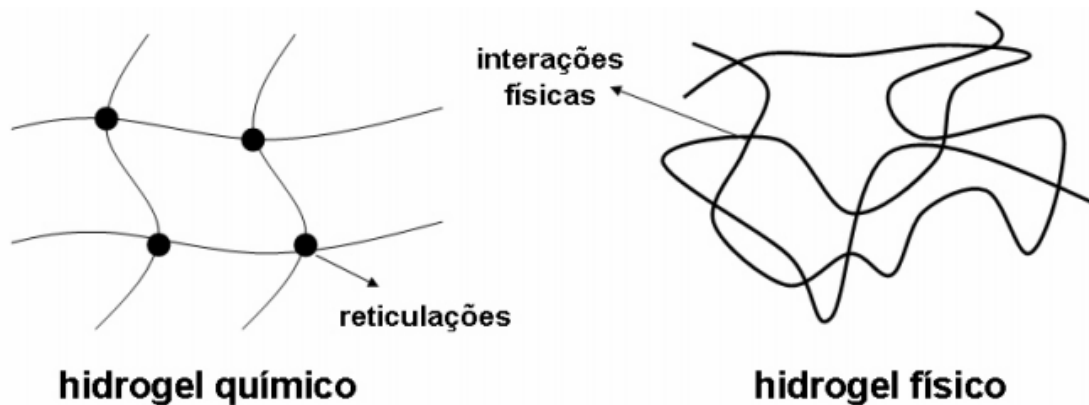
Além da otimização das propriedades mecânicas, os plastificantes podem dependendo da concentração empregada atuar como agente de reticulação, reduzindo a solubilidade dos biomateriais de amido melhorando assim sua aplicabilidade.

1.5.4 Reticulação

O processo de reticulação ou formação de ligação cruzada, é uma alternativa para a modificação das características dos filmes de hidrogel de amido, principalmente em relação a redução de sua solubilidade.

A reticulação constitui-se em um método de modificação química ou física que une as cadeias poliméricas, ou liga suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas⁷³. No método físico a reticulação resulta do estabelecimento de interações físicas entre as cadeias poliméricas. Estas interações físicas podem ser interações hidrofóbicas, ligações iônicas, pontes de hidrogênio, formação de complexos de inclusão (química supramolecular) e formação de complexos de coordenação metal-ligante. Já no método químico as cadeias são unidas covalentemente mediante a utilização de agentes reticulantes, que são compostos de baixa massa molar com grupos funcionais reativos⁷⁴⁻⁷⁵. Na figura 6 é possível visualizar as diferenças estruturais entre os dois tipos de reticulação.

Figura 6. Esquemas representativos das estruturas dos hidrogéis reticulados quimicamente e fisicamente.



Fonte: Aouada e Mattoso, 2009 ⁷⁶.

Considerando a hipótese de que filmes obtidos a partir de polímeros naturais como o amido advindo da fécula de mandioca apresentarem características que podem sugerir a sua utilização como barreira física em situações de RTG e ROG, consideramos a produção e investigação desses filmes de hidrogel advindos do processo da reticulação.

2. CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1

Capítulo 1

Rodrigues S, Borges M F, Ruggiero R, Magalhães D. Preparation and *in vivo* characterization of glycerol crosslinked starch hydrogel films for application in dental regenerative procedures. Ind. Crops. Prod. (2019).

Title Page

Preparation and *in vitro* characterization of glycerol crosslinked starch hydrogel films for application in dental regenerative procedures.

Simone Rodrigues ^{a*}, Mariana Fornazier Borges ^b, Reinaldo Ruggiero ^b, Denildo de Magalhães ^a

a- Dentistry School, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

b- Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

* Corresponding author at: Dentistry School, Federal University of Uberlândia,

Av. Pará 1720, CEP 38.405-320, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

Tel.: +55 (34) 3225-8115; fax: +55 (34) 3225-8108.

E-mail addresses: sijorgerodrigues@gmail.com (S. Rodrigues), reinaldo@ufu.br (R. Ruggiero), mariana-for@hotmail.com (M.F. Borges), denildo@foufu.ufu.br (D. de Magalhães).

Abstract

Periodontal disease often results in damage to the dental insertion apparatus when resective interventions are indicated to interrupt tissue destruction, but these interventions have significant limitations. Regenerative procedures are proposed with the purpose of replace the lost structures in the context of guided tissue regeneration (GTR) and guided bone regeneration (GBR) techniques and frequently associate bone substitutes with physical barriers aiming at greater longevity and improvement of the aesthetic pattern. This study presents the starch as a biopolymer which gelatinized produces films that suggest its use as a barrier material. Biodegradable cassava starch hydrogel films were prepared incorporating glycerol at concentrations of 0.15, 20, 30 and 40% aiming its application at dental regenerative procedures. The characterization of hydrogel films by microscopy (SEM), thermal analysis (DSC), spectroscopic (UV / Vis., FTIR, XRD), mechanical (Traction), and analysis of protein swelling, degradation and diffusion and physiological temperature)

showed that the incorporation of glycerol in up to 20% attributed to the films a plasticizer character and in higher concentrations, conferred a greater interaction of the glycerol (crosslinking) with the starch chains and a degradation time that allows the physical barrier in RTG and ROG. The films presented mechanical resistance, malleability and permissiveness to protein diffusion in the in vitro assays, which meet the current attributes that guide the use of these resources in biomaterials.

Key words: starch hydrogel, crosslinking, glycerol, degradation, membrane, guided tissue regeneration.

1. Introduction

Periodontal disease is characterized as a multifactorial chronic inflammatory disease associated with biofilm presenting clinically with loss of dental insertion apparatus. The treatment aims at interrupting the tissue destruction in which surgical interventions are presented with the purpose to promote root decontamination and adjust the periodontal structures through the resective and regenerative procedures. Considering the limitations of resective surgeries when using bone reconstructions to eradicate defects (Becker et al., 2001), regenerative techniques are recommended based on improved function and prognosis in the long term, as well as improvement in the esthetic pattern (Boyne, 1964).

Gottlow et al., 1986, evaluated the stability of new periodontal insertion achieved through guided tissue regeneration (GTR). This principle, initially called Guided Bone Regeneration (GBR), was described by Hurley et al., in 1959. It is possible to point out the use of tissue barriers in order to inhibit the interference of unwanted cells from adjacent soft tissues during the cicatricial process (Nyman et al., 1989). It is known that fibroblasts activity is much faster than the activity of osteoblasts and with collagen fiber deposition the bone neof ormation is not effective, since the space was not physically preserved (Pecora et al., 1997) Studies describe the efficacy of the membranes together with the reconstructive treatment as the result of contact inhibition by the interaction of heterotopic cells in addition to the exclusion of soluble inhibitory factors derived from cells, favoring

the local concentration of growth stimulating factors, even combined with properties stimulating the membrane itself (Linde et al., 1993).

Scientific investigations report absorbable membranes with certain advantages over the first generation membranes such as better biocompatibility (Williams, 1981), precise cell occlusion (Karring et al., 1985), tissue integration (Rothamel et al., 2005) and semi-rigidity when positioned at the interface of the defect and the epithelium (Chen et al., 1997), which collaborate with wound stabilization (Schwarz et al., 2008), transfer of oxygen and nutrients (Schwarz et al., 2006). However, anatomical and technical realities of clinical treatment may result in early exposure of the membrane to the oral medium and consequent bacterial invasion resulting in acute inflammation that is detrimental to osteogenesis (Warrer et al., 1991).

Among the materials used for the production of films, starch presents itself as a natural polymer, abundant in nature and biocompatible (Aggarwal and Dollimore, 1998), having its structure in the form of intracellular spherical granules of 2-100 μm in diameter and having in its composition amylose consisting of a linear chain polysaccharide and amylopectin, with a branched chain ratio of 30 and 70% respectively (Sweedman et al., 2013). Starch gelatinization is regarded as the collapse of the crystalline phase of the amylose grains being an irreversible process that includes granular expansion, native crystalline fusion, which leads to loss of birefringence and molecular solubilization (Singh et al., 2007). To develop of hydrogel films from starch, modifications such as the formation of crosslinks using the crosslinking process and the incorporation of plasticizers are necessary for a better control of the dissolution and degradation of the material when in contact with organic fluids, in addition to the optimization of mechanical properties (Srinivasa et al., 2007, Kou e Gao, 2018). This work suggest the preparation of starch hydrogel films using glycerol as a crosslinking and plasticizing agent and subsequent structural, morphological, spectroscopic and also physiological pH assays (Ruggiero et al., 2015), analyzing the influence of different concentrations of glycerol on the behavior of the films with the objective of studying their viability in the hypothesis of application in dental regenerative procedures.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Cassava starch (*Manihot utilissima*) refer to the starch product extracted from the ground and edible parts of the plant, containing approximately 25% amylose and 75% amylopectin, was commercially acquired locally, and glycerol from Neon. Phosphate buffered saline (PBS), pH = 7,4 was prepared by mixing sodium hydroxide (Vetec), sodium dihydrogen phosphate (Carlo ErbaReagents) and deionized water. Bovine serum albumin (BSA) protein was purchased from Sigma Aldrich.

2.2 Production of films

The different starch hydrogel films were developed by the casting method (Gontijo et al., 2018). From the same concentration of cassava starch (6% m / v) the glycerol was incorporated in the concentrations 0%, 15%, 20%, 30% and 40% (m / v) relative to the starch mass. For each formulation the starch and the glycerol in the different concentrations were diluted in 100.00 mL of deionized water and taken to the heating by means of a microwave oven with a power of 30 W until gelatinization occurred. The remaining solvent (100.00 mL) was then added and the systems were magnetic stirred for 10 minutes and then they were kept at a rest at room temperature for 24 hours. Finally the filmogenic solutions were poured into silicone molds and allowed to dry in a hood for a period of 30 hours. At the end of the drying time, the resulting hydrogel films were removed and stored.

2.3 Determination of Thickness and Density

The hydrogel films were cut into 1.5 cm² squares and weighed on analytical balance. Subsequently, the thickness (t) was determined at 3 different points using a ZAAS digital micrometer.

The density (d) was calculated from Equation (1), where "m" is the mass of the film, "t" the thickness (cm) of the sample and "A" the area of the sample (Müller et al., 2008)

$$d = \frac{m}{V} = \frac{m}{tA} \quad (1)$$

2.4 Analysis of humidity absorption

The hydrogel films were dried in an oven at 60 ° C for 2 hours, weighed on analytical balance for initial mass determination (m_i) and stored in "zip lock" plastics. At different time periods films were removed from the plastics, weighed again to obtain mass gain due to humidity absorption (m_h) and stored again until the next weighing period. The humidity absorption was determined by Equation (2).

$$\text{Humidity absorption (\%)} = \frac{m_h - m_i}{m_i} \cdot 100 \quad (2)$$

2.5 Analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM)

The morphology of the hydrogel films was analyzed with respect to their surface and cross-sectional surface using the CARL ZEISS MOD EVO MA10 microscope, with an acceleration voltage of 5 kV. Prior to analysis, the samples were coated with an ultrafine gold layer in a spray coating system and for cross-sectional surface analysis the samples were previously frozen in liquid nitrogen and fragmented. Analysis of the swollen films without the freezing and metallization procedures was also performed.

2.6 Analysis by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The infrared transmittance spectra of the films were obtained with a spectrometer FT-IR Spectrometer Frontier with attenuated total reflectance (ATR) accessory, in the range of 4000 to 650 cm^{-1} , with a resolution of 4 cm^{-1} .

2.7 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The analyzes were performed on a Q-20 model, TA Instruments, in a scan. The hydrogel films, about 7.00 mg, were heated from 25 °C to 175 °C, both at a heating rate of 10 °C min^{-1} , under an atmosphere of nitrogen with flow of 50 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$.

2.8 X-ray diffraction analysis (XRD)

The X - ray diffraction analysis was performed in a ShimadzuXRD - 6000 LabX diffractometer, operating at a power of 40 kV with 30 mA of current and radiation of Cu $K\alpha$ (1.5406 Å). The 2θ scan data were collected from 5 ° to 35 ° at a scanning speed of 1 ° min^{-1} .

The relative crystallinity index (CI) was quantitatively estimated as proposed by Rocha et al. (2008), based on the ratio of the area of the crystalline region and the total area covered by the curve, composed by the area of the crystalline region (A_c) and the area of the amorphous region (A_a), according to Equation (3):

$$CI (\%) = \frac{A_c}{A_c + A_a} \cdot 100 \quad (3)$$

2.9 Analysis of mechanical properties

The mechanical properties of the hydrogel films (tensile strength, Young's modulus and elongation at break) were evaluated by uniaxial tensile test using an Instron universal model 5982 mechanical test apparatus with a load cell of 5.00 kN. The films were cut into strips of 1.00 cm wide by 4.00 cm in length,

fixed in the apparatus and subjected to the stress and strain test with a velocity of 25.00 mm min⁻¹ and distance between the claws of 3.00 cm.

2.10 Analysis of swelling and degradation at physiological pH

Swelling and degradation were analyzed under conditions close to the post-surgical environment at physiological pH, which was simulated using a solution of phosphate buffered saline (PBS), whose pH = 7.4 is similar to the pH of the blood (pH = 7.35).

The swelling behavior was evaluated by the gravimetric method (Doulabi et al., 2013). The hydrogel films were weighed (w_d) and then immersed in 10.00 ml of PBS at 36.5 ° C. After distinct periods of time, the films were removed from the PBS, placed on paper towel to remove excess liquid and immediately weighed (w_m). The swelling ratio of the films was calculated using Equation (4). For the degradation studies, film samples were initially weighed (w_o), immersed in degradation media containing PBS and incubated at 36.6 ° C for several weeks. After each time interval the films were removed and completely dried before being reweighed (w_t). The mass loss was calculated using Equation (5) and the time required for total degradation of the films was determined by the equation of the line obtained from the graph of mass variation according to the time (Annex 1).

$$\text{Swelling rate}(\%) = \frac{w_w - w_d}{w_d} \cdot 100 \quad (4)$$

$$\text{Weight loss}(\%) = \frac{w_o - w_t}{w_o} \cdot 100\% \quad (5)$$

2.11 Protein diffusion study

The protein diffusion study was performed using bovine serum albumin (BSA) as a model. For this, a calibration curve was constructed with known concentrations of BSA in PBS, considering BSA had a maximum absorption at 280 nm (Zaia et al.1988), (Annex 2).

Diffusion of the BSA protein was analyzed using an identical two-compartment system separated by discrete hydrogel film samples containing one-side PBS and a BSA solution with a concentration of 2.00 mg mL^{-1} in PBS on the other side. At different time periods aliquots of 3.00 mL of solution were collected at the same point in the compartment containing only PBS solvent and its UV/Vis absorbance was determined in a spectrophotometer (Shimadzu, model UV 2501 PC) at wavelength 280 nm , the maximum absorption of BSA in this solution, determined previously.

3. Results and discussion

3.1 Determination of thickness and density

Biodegradable starch hydrogel films were produced by the casting method, resulting in translucent, homogeneous, depigmented samples without the presence of lumps or bubbles (Fig. 1). The flexibility of the films varied according to the glycerol content.

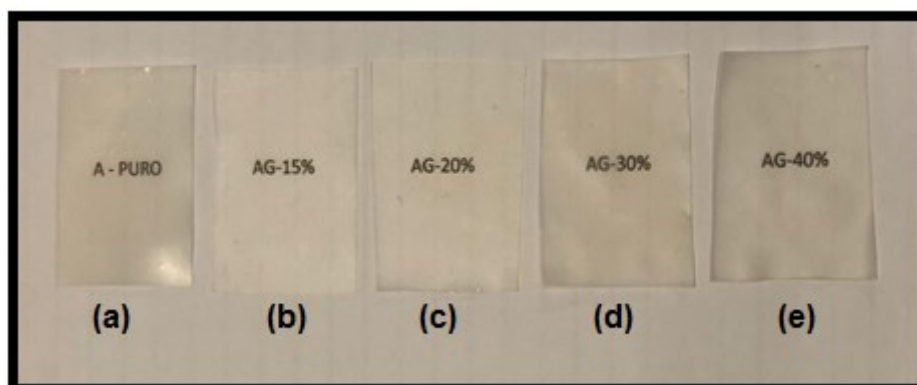


Fig 1. Hydrogel films of cassava starch with glycerol in the concentrations of: (a) 0%, (b) 15%, (c) 20%, (d) 30% and (e) 40%.

The thickness of the hydrogel films ranged from 0.174 mm to 0.229 mm , with significant differences between the formulations (Fig. 2). The addition of glycerol led to an increase in film thickness due to the higher mass in the polymer matrix. With respect to density (Fig. 2) one can observe an inverse behavior to the thickness data. At the beginning, with the incorporation of glycerol in 15% and 20%, an increase in the thickness on the one hand, and the decrease

in density, on the other hand, are observed. Until the concentration of 20% the interaction with the glycerol, does not seem to occur in an effective way, since the small increase of mass does not imply in decrease of the volume of the system. Above 20%, this phenomenon begins to reverse, suggesting a probable process of physical crosslinking, which reduces the empty spaces of the starch matrix.

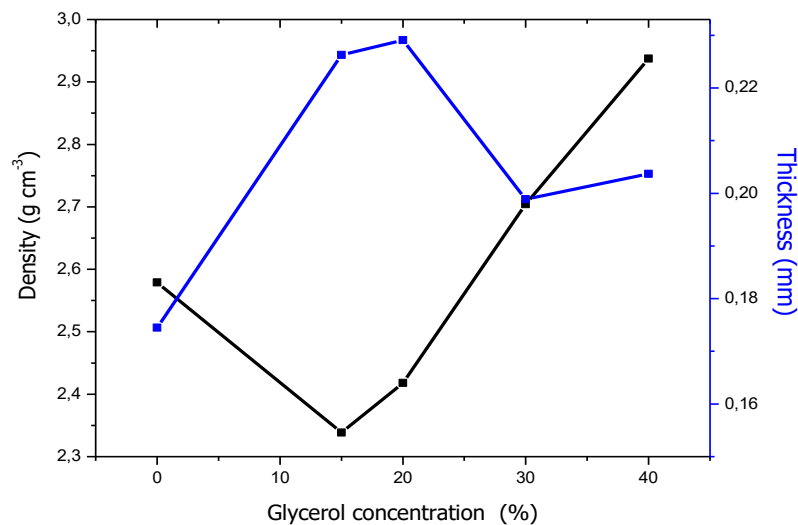


Fig. 2. Effect of glycerol concentration on density and thickness of hydrogel films.

Hydrogel films prepared in the presence of glycerol exhibited thickness and malleability favorable to handling suggesting adequate application. The clinical control can be determined by the ease of surgical manipulation, setting a format favorable to the operative handling. In more complex anatomical situations, the adaptation of a two-dimensional membrane on a three-dimensional surface may require of the film certain rigidity or memory to remain modelled to the bone contour, resulting in a more complete bone regeneration.

3.2 Analysis of humidity absorption

Hydrogel films prepared in the presence of glycerol exhibit increased humidity absorption, as shown in Fig. 3. This increase is related to the hydrophilic

character of the glycerol that allows a greater interaction of the film with the water present in the environment (humidity).

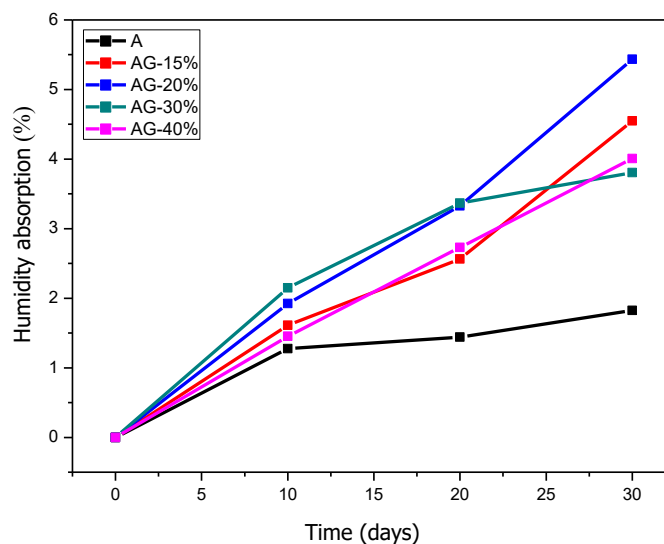


Fig. 3. Humidity absorption of the starch hydrogel films with different concentrations of glycerol.

It was expected that with higher concentrations of glycerol the humidity absorption would be higher, but this was only observed for the samples with glycerol content of up to 20%. This change is due to the intensification of glycerol-starch interactions, which hinder the interaction of glycerol molecules with water. This effect confirms the strong crosslinking between starch and glycerol, when the concentration of glycerol exceeds 20%, as observed in the data of density and thickness (Fig. 2).

As for the application of hydrogel films, the rate of humidity absorption should not be a problem, since they can be stored in sealed packages without contact with the environment.

3.3 Analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM)

In order to obtain more information on the morphology of the films under study, SEM analysis was performed. The analysis may illustrate the impact

of glycerol incorporation on the structure of cassava starch hydrogel films. Surface and cross-section (fracture) micrographs of dry and swollen films are shown in Fig.4. The images of the dry samples have different structural patterns. The first two films (A and AG-15%) look very similar to both surface and cross-sectional images, whereas in AG-20% film the images change radically with the appearance of striations. For the most concentrated films in glycerol (AG-30% and AG40%), the aspect changes again. On the surface clarification of the image occurs as the concentration of glycerol increase.

It is also noted in the of cross-sectional images that the AG-30% film presents wide vertical channels in all its extension from the surface and the film AG-40% presents an intense increase of thinner channels in all directions and in all extension transverse. The micrographs of the swollen samples also show structural alterations, with the occurrence of large vertical fringes on the surface in A and transverse in AG-15%. In the sample AG-20%, AG-30% and AG-40%, the fringes are drastically reduced both at the surface and in the cross-section appearing greater homogeneity. Another notable fact is the progressive clarification on the surface of the samples as the concentration of glycerol increase.

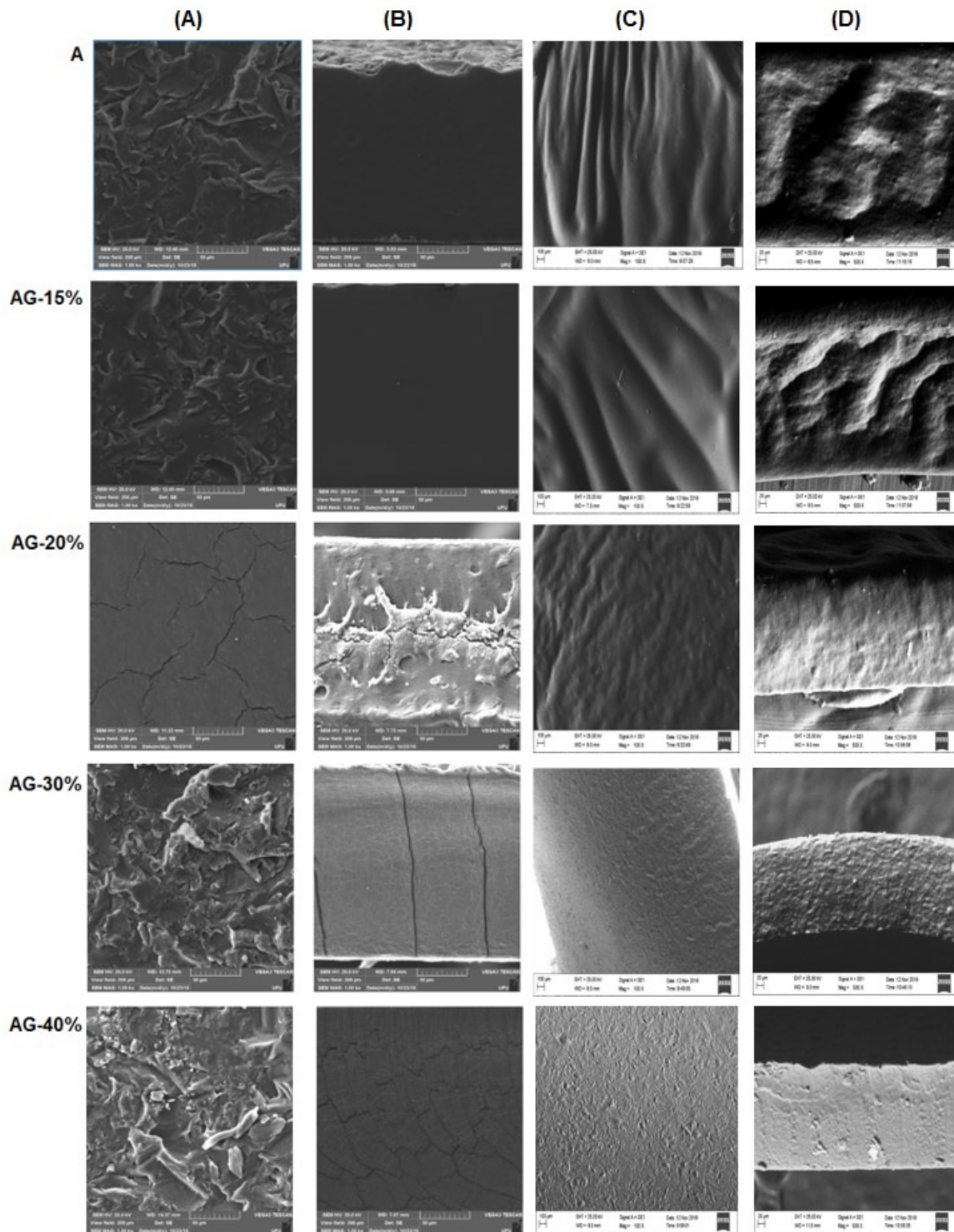


Fig. 4. MEV micrographs of hydrogel films: (A) surface for dry films (1000x), (B) cross section for dry films (1000x), (C) surface for swollen films (100x) and (D) cross section for swollen films (500x).

Based on the superficial texture of the hydrogel films produced and with respect to the integration of these to adjacent tissues in the repair process, we can expect them to be viable to this requirement. The biomaterial must provide a chemical structure that favors the growth of connective tissue or the insertion to the membrane during the healing process, promoting tissue integration (Somerman et al., 1991).

Analyzing the micrographs, it is possible to notice that the films, regardless of the formulation used, do not have pores on their surface and along their cross section, with homogeneous regions being observed. The transport of nutrients through the membrane is suggested by the permissiveness to the protein diffusion in the assays at physiological pH.

3.4 Analysis by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR spectroscopy was performed to determine the interactions between the starch matrix and glycerol. The spectra of the hydrogel films are shown in Fig. 5. The films presented spectra in characteristic bands: a) 3467 cm^{-1} at 3151 cm^{-1} , a range attributed to the stretching of free OH groups and associated with intra and intermolecular hydrogen bonds formed from hydroxyl groups of starch and glycerol; b) 2994 cm^{-1} at 2950 cm^{-1} , range attributed to the stretching of the C-H group present in the polymer matrix; c) 1690 cm^{-1} to 1589 cm^{-1} , the range attributed to the water absorbed by the starch molecules; d) 1346 cm^{-1} , attributed to glycerol molecules; and e) 1167 cm^{-1} at 930 cm^{-1} , range attributed to C-O stretching at C-O-H and C-O at C-O-C bonds, respectively (Wolkers et al., 2004; Jaramillo et al., 2016).

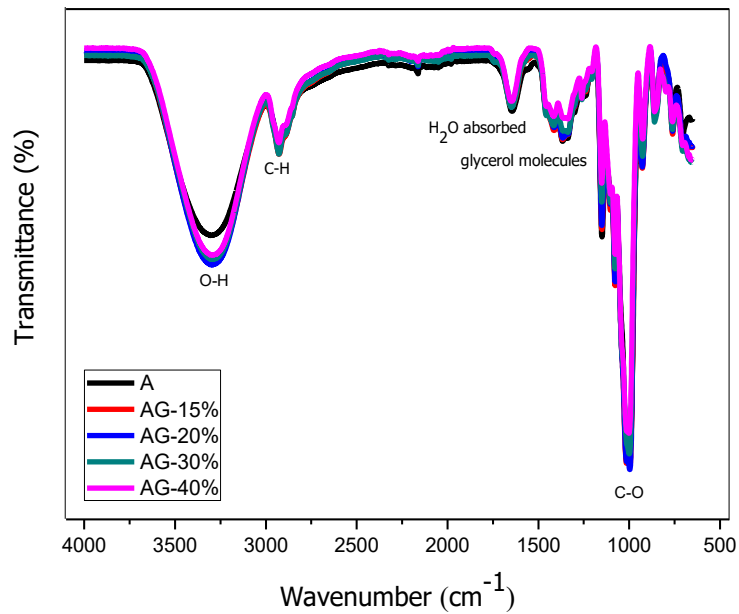


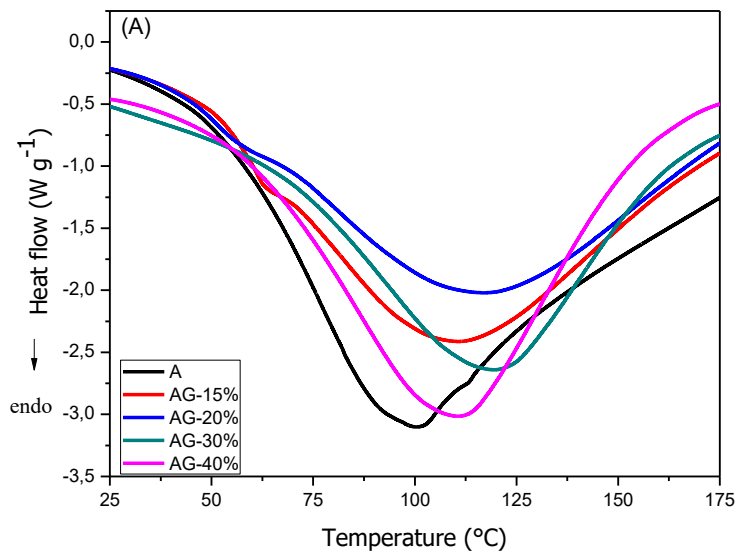
Fig.5. FTIR spectra of the starch hydrogel films with different concentrations of glycerol.

In general, the FTIR spectra of the films show the same principal main peaks with some variations in peak amplitude in certain regions, as the glycerol concentration increases. These modifications are more pronounced in the band related to hydroxyl groups, which increase in intensity due to the formation of hydrogen bonds between the starch and glycerol chains promoted by the crosslinking process.

3.5 Differential Exploration Calorimetry (DSC)

The DSC curves of the starch hydrogel films (Fig. 6) were analyzed to determine the differences in the thermal behavior of the materials with regard to the elimination of water. It is observed through the DSC curves that all films have profiles with occurrence of endothermic peaks, with some changes in maximum temperatures and intensity, through the incorporation of glycerol. In figure 6 A) we have the occurrence of an endothermic peak, around 100 ° C, attributed to the water exit of the structure of the films. Note that films containing glycerol exhibit a displacement of this peak at higher temperatures in figure 6 B),

indicating that water is associated with the other components of the films, at different intensities of interactions. Thus, it is observed that water retention increases as the amount of glycerol in the film increases, except for the AG-40% sample, where there is a small decrease in temperature. The graph for these data in figure 6 B) also shows that this increase in temperature occurs more slowly at concentrations above 20% glycerol and decrease from 30%, validating the previous discussions, where it is concluded that above 20% of glycerol, there is a growing attractive interaction between starch and glycerol, which makes the interaction of the sample with water less intense.



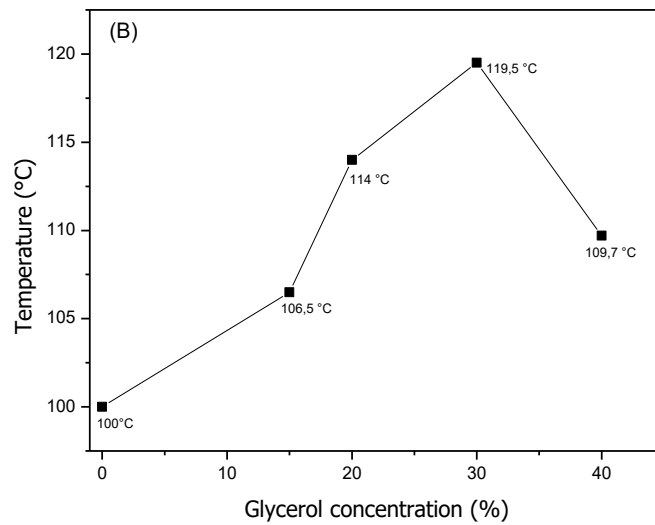


Fig.6. (A) DSC thermograms for starch hydrogel films and (B) Maximum water outlet temperature of the films.

3.6 X-ray diffraction analysis (XRD)

The structural analysis of the hydrogel films was obtained by XRD and the results are shown in Fig. 7. The starch granules have different types of crystallinity, such as types A, B or C, depending on the length of the amylopectin branched chains, described mainly due to the double helix formed (JANE, 2006). The diffractogram of the starch granule showed six main peaks around the diffraction angles of 11, 15, 17, 18, 20 and 23 ° and a low intensity peak around the diffraction angle of 5.5 °, which are characteristic of the starch type CA, due to the greater similarity of the peaks with the type A pattern (Kawabata *et al* 1984, Moorthy, 2002). The process of gelatinization of the starch to elaborate the films resulted in the loss of its structural order, with change in the intensity of the reflection peaks, remaining only a small intensity peak occurring around the angle of diffraction of 17 ° for the films A, AG -15% and AG-20% and around 14 ° and 17 ° for AG-30% and AG-40% films.

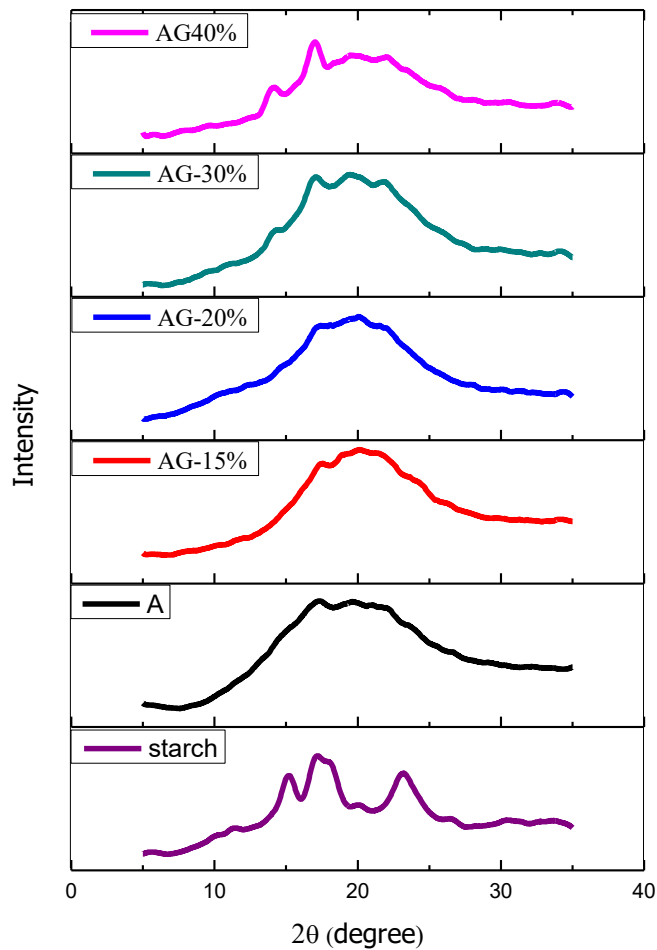


Fig. 7. X-ray diffraction patterns of the starch hydrogel films with the studied glycerol concentrations.

The differences between the films can be explained by the presence of glycerol, which favors the reorganization of the amylose and amylopectin chains, through its interaction with the hydroxyls present in the starch molecules. This process is dependent on the glycerol content, as it can be verified by the CI data (Table 1). At low concentrations, generally below 20%, glycerol can act as an antiplasticizer (Chang et al., 2006). In this case, it interacts with the polymer matrix, but in a less intense way, as seen in the density data, increasing with less effectiveness the molecular mobility, almost not interfering in the rigidity of this matrix. Above 20%, however, the glycerol begins to act as a crosslinking agent,

reducing the intermolecular starch-starch forces and thus increasing the mobility of its polymer chains.

Table 1.

The effect of glycerol concentration on the crystallinity index (CI), ultimate tensile stress, elongation at break and Young's modulus of the hydrogel films.

Samples	CI (%)	Ultimate tensile stress (Mpa)	Elongation at break (%)	Young's modulus (Mpa)
starch	12	-	-	-
A	0.8	48.56 ± 0.50	3.51 ± 0.34	2,688.93 ± 8.60
AG-15%	0.85	6.17 ± 0.23	47.68 ± 0.15	458.03 ± 4.36
AG-20%	0.7	3.50 ± 0.09	86.58 ± 0.04	124.55 ± 1.51
AG-30%	0.9	3.57 ± 0.16	65.64 ± 0.21	37.36 ± 0.79
AG-40%	4.3	2.58 ± 0.13	63.70 ± 0.11	15.65 ± 1.36

3.7 Analysis of mechanical properties

The evaluation of the mechanical properties of the hydrogel films in relation to their tensile strength and deformation capacity were performed to verify the influence of the incorporation of the glycerol and to correlate the results obtained with its application. The parameters of the ultimate tensile stress, elongation at break and Young's modulus are shown in Table 1. The stress-strain characteristic curves of the films are shown below (Fig. 8).

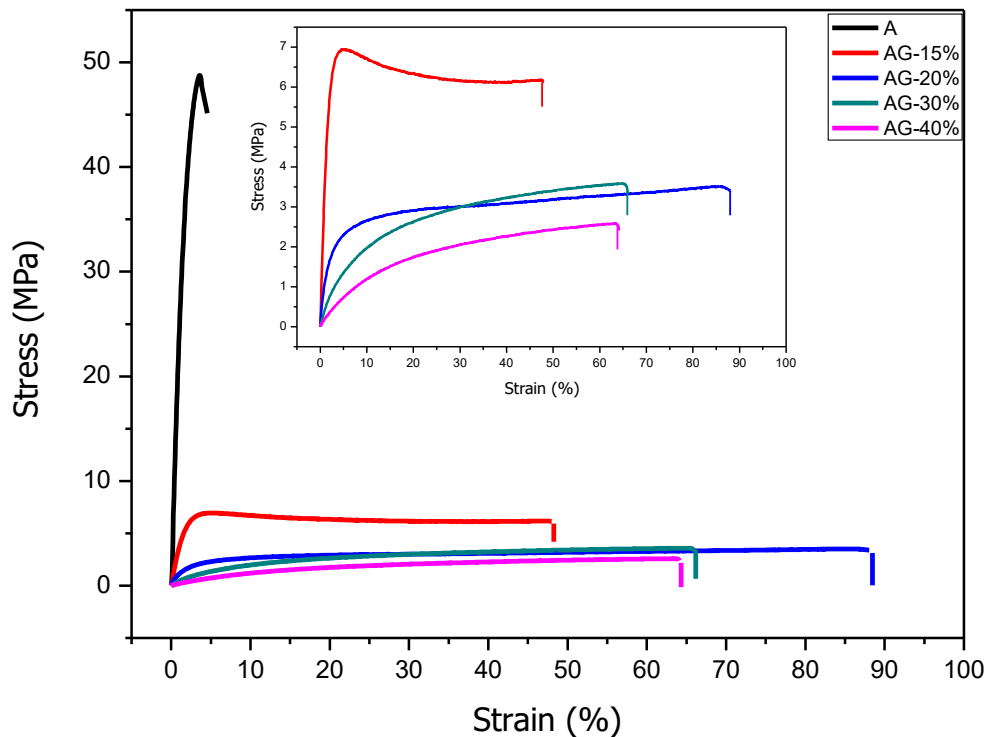


Fig. 8. Stress vs strain curves of hydrogel films (Zoom for films with glycerol).

The incorporation of the glycerol to the starch matrix induced a mechanical behavior of the films, which varied from brittle to ductile. This change is due to the plasticizing character of glycerol, which reduces the stiffness of the polymer matrix, as shown by the values of modulus of the elasticity, causing sliding between the starch chains and thus favoring the deformation of the film during the application of the tension. Thereby, it was expected that with the addition of the glycerol concentration the deformation rate would be higher, however this behavior is only valid up to the 20% concentration. Above this concentration the crosslinking effect of glycerol begins to overlap with its plasticizing effect due to the intensification of its interaction with the starch chains, which results in the formation of a structure less resistant to traction and deformation. This effect is also due to the presence of larger portions of crystalline regions in the structure of the films when high concentrations of glycerol are incorporated, as shown by the values of crystallinity index (Table 1).

From the results of resistance and elongation, it can be suggested that the films prepared in this study present favorable characteristics to the application in the context of alveolar bone regeneration, for example, where the anatomical, mechanical and technical realities of the clinical treatment may require of the membrane a behavior which guarantees the creation of space, adequate volume and geometry maintenance by supporting their own weight and resisting the pressure exerted by the overlapping tissue and external forces such as mastication. Membrane collapse results in the elimination of the required space, which may impair regeneration (Kohavi et al, 1991) or result in early exposure of the membrane to the oral medium in the course of treatment.

3.8 Analysis of swelling and degradation at physiological pH

The results of the swelling and mass loss studies of the starch hydrogel films in phosphate buffered saline (PBS) are shown in Fig. 9A). The swelling process of the films occurs by the spacing between the starch chains due to the retention of the molecules of the solvent PBS, which promote reduction in the intermolecular attraction forces, thus increasing the motility of the starch matrix chains. As the glycerol is incorporated into the polymer matrix, the swelling kinetics of the films is altered. Films with no and low glycerol content exhibit very close kinetics, even after a long time of contact with the simulated body fluid. AG-20% film has a peculiar kinetic behavior since up to 35 minutes in contact with the fluid, it swells less than AG-40% and up to 60 minutes, less than AG-30%. But the film AG-15%, from this time, it starts to swell more. In the two films most concentrated in glycerol, from 20 minutes the kinetics of swelling decreases significantly to a state close to equilibrium after 2 hours of immersion. The results also show that the presence of glycerol reduces the swelling ability of the films, since glycerol acts as a crosslinking agent in the starch, installing itself between amylose chains, favoring these interactions, permitting less space available for PBS to flow.

Concerning the study of mass loss, which was used to evaluate the degradation profile of the films, it was verified that the presence of the glycerol and the concentration in which it is incorporated affects differently the capacity of loss of mass. After 30 days of analysis, in the film with lower content of glycerol,

AG-15%, the loss of mass was greater than in the film without glycerol (increasing from 50% to 63%) and in the films with higher contents, AG-30 % and AG-40%, it was lower (it was reduced to approximately 35% in both). These changes are a consequence of the double effect promoted by glycerol, plasticizer and crosslinking. When the plasticizing effect predominates we have an increase in the mass loss capacity due to the hydrophilicity of the glycerol that favors the interaction of the starch matrix with the solvent PBS, but when the crosslinking effect predominates this interaction is difficult since glycerol is interacting effectively with the starch chains and thus it is not available to interact with the solvent as verified by the swelling study. The AG-20% film presents a borderline behavior between plasticizer and crosslinking effects, which gives it the odd properties as observed in previous characterizations.

In respect to the results of Figures 9B) and 10, we can deduce that the films produced with concentrations of glycerol from 20% presented degradation rates compatible with the requirement of tissue barrier, except for the AG-20% film that despite presenting the lowest loss of mass did not maintain its structural integrity, exhibiting a gelatinous appearance after 30 days. The films can be classified as absorbable, considering the estimated period of time for their total degradation (Table 2). The polymeric materials commonly suggested in the constitution of membranes, are degraded by the hydrolysis process and are clearly affected by the environment of the organism, so a degradation that does not promote damage to regenerating tissues is one of the first functions required in this category of biomaterials (Bostman, 1992).

In the RTG and ROG procedures the degradation rate is an essential parameter, since the membrane plays the role of tissue barrier, so it must remain intact by separating the bone tissue from the connective tissue by 3 at 4 weeks, a period in which there is probable formation of immature bone tissue at the site of the defect (Gerzon et al, 2016). The formation of an embryonic bone begins at the surface of the bone matrix, and propagates towards the interior of the defect (Hollinger e Chaudhari, 1992). By doing so the distance to be covered by the bone regeneration will determine the time in which the membrane should remain in place and functionally intact.

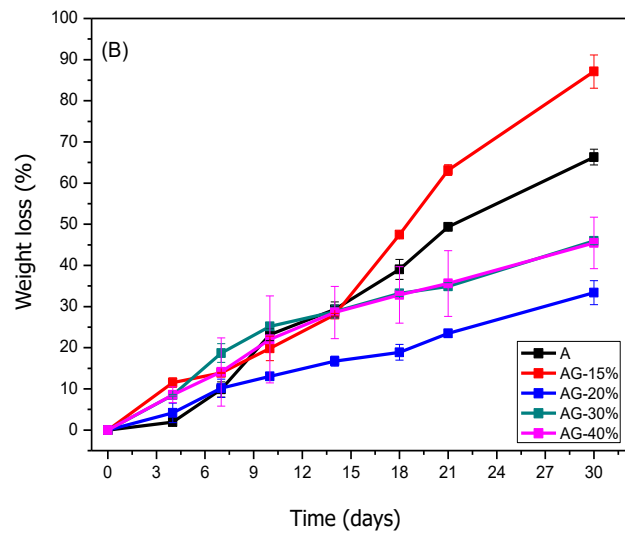
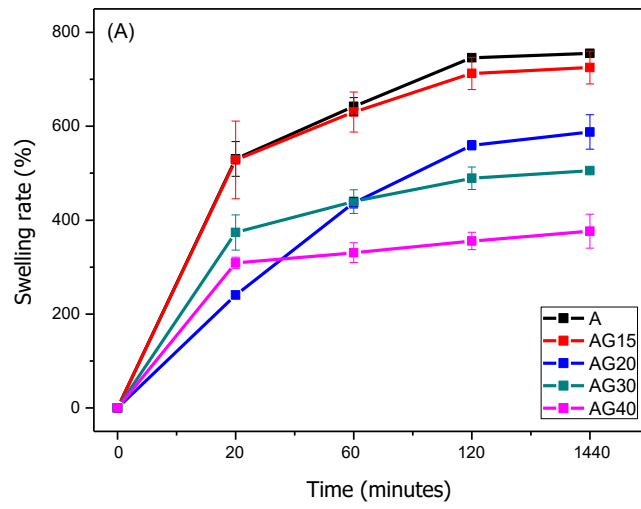


Fig.9. Influence of glycerol concentration on A) rate of swelling, B) loss of mass of starch hydrogel films.

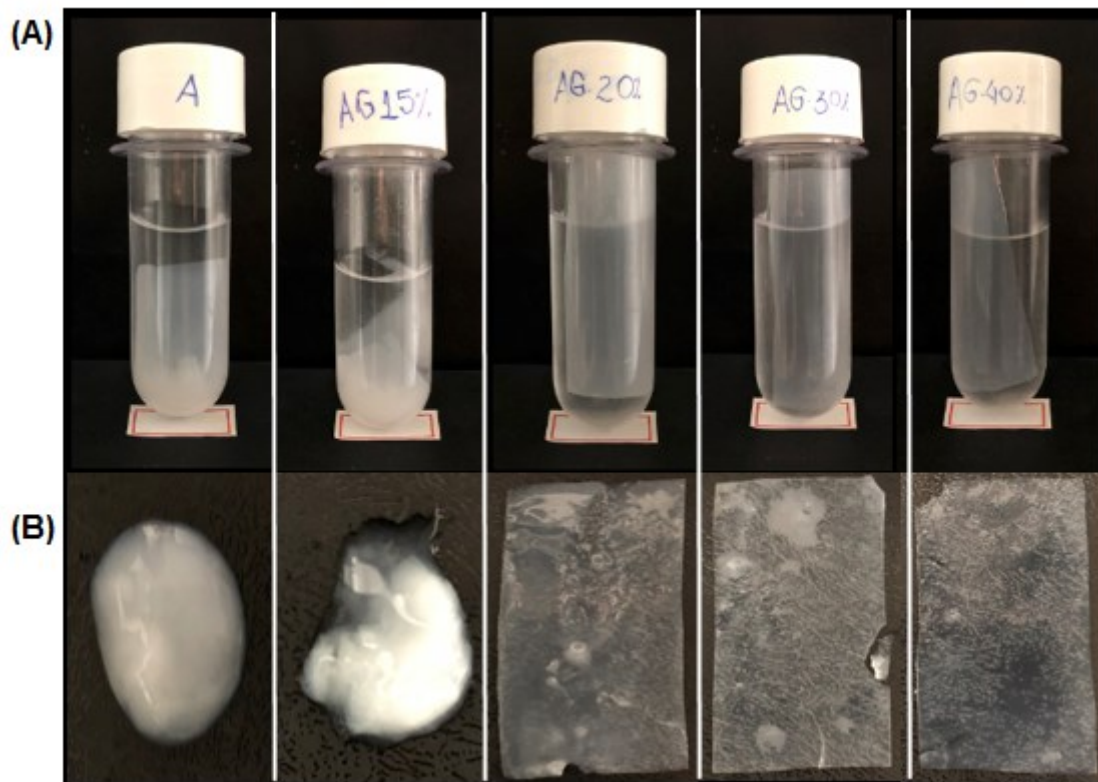


Fig. 10. Photograph of the starch hydrogel films after 30 days: (A) in solution and (B) after removal of the solution.

Table 2.

Estimation of the total degradation time in PBS of the glycerol crosslinked starch hydrogel films.

Samples	R ²	Estimated end time (days)
A	0.9848	44
AG-15%	0.9691	35
AG-20%	0.9884	92
AG-30%	0.9357	65
AG-40%	0.9737	63

3.9 Analysis of protein diffusion

The results obtained regarding to the diffusion profile and the amount of BSA diffused by the hydrogel films are shown respectively in Fig. 11 and in Table 3. As it can be seen in the graph, the film A presents a high diffusion rate in the period between 4 and 24 hours. As the concentration of glycerol increases, the diffusion of the BSA decreases. The data also show that in the first 4 hours, the films A and AG-15% have the lowest rates of protein diffusion (BSA), whereas the films with higher amount of glycerol presented higher diffusion rates, being AG-20 % > AG-30% > AG-40%. After 4 hours this behavior is reversed and the films with higher amounts of glycerol are those that present smaller diffusions, since in long period of time these films tend to have less permissiveness to the diffusion of the protein. This fact probably has to do with the greater crosslinking occurring in high concentrations of glycerol, as seen in the previous results, leading to a more attractive interaction between the components of the same, reducing the possibility of BSA diffusion. Furthermore, at concentrations above 20%, the polymer network tends to become denser, as shown by the density data, and hence less permeable to the protein.

It has been suggested that membranes used in bone regeneration have properties that allow the transfer of fluid and gaseous nutrients, providing ample nutrition to the graft (Boyne, 1969). The films prepared with the starch do not present visible pores in their structure, however, the findings demonstrated that there is transfer of proteins through diffusion according to the results presented in (Fig.11). The transfer through the membrane is due to the difference in chemical potential due to the concentration gradient. The direction in which these gradients would be established and would be of sufficient magnitude to result in the diffusion of quantities of physiologically significant substances into the regenerating tissues still require other studies that quantify and better qualify these gains.

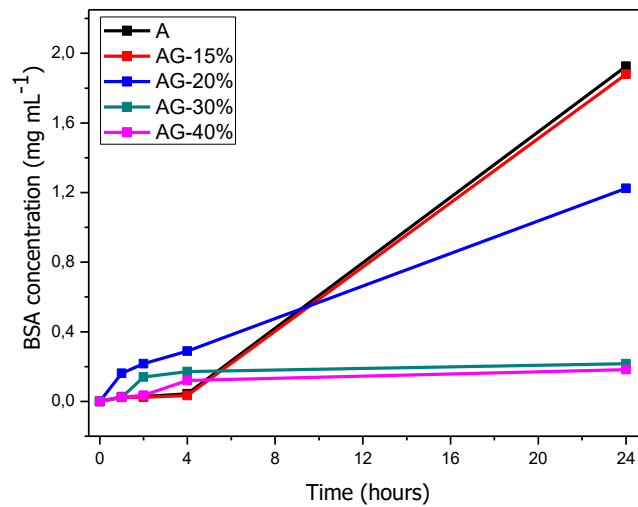


Fig.11 Diffusion profile of BSA by means of the hydrogel films as a function of time.

Table 3.

Amount of BSA diffused through the hydrogel films as a function of time.

Time (hours)	Amount of BSA diffused (mg mL ⁻¹)				
	A	AG-15%	AG-20%	AG-30%	AG-40%
1	0.02653	0.02359	0.16192	0.02285	0.02396
2	0.02744	0.02396	0.21703	0.13987	0.03553
4	0.04306	0.03388	0.28831	0.17092	0.1204
24	1.9253	1.88067	1.2241	0.21703	0.18249

Based on these results, it was observed that the films presented permissiveness to the diffusion of proteins that are similar to those organically present in the regenerative processes of ROG and RTG.

Considering that starch is a natural vegetable material, easily accessible and inexpensive, because it presents control of the production process and characteristics that make it biologically viable, the use of starch hydrogel film is suggested as a resource in biomaterials, although future studies are needed, such as: cytotoxicity, cell proliferation and in vivo evaluations.

4. Conclusion

Within the proposed methodology and the limitations of this in vitro study, we can conclude that:

- The hydrogel films of cassava starch and glycerol at concentrations above 20% present characteristics that suggest that they are applied as a barrier in ROG and RTG having properties such as, mechanical resistance, permissiveness to protein diffusion and degradation in a viable period to the process of repair and regeneration.

- Glycerol exhibits a double behavior since at concentrations below 20% there is a predominance of the plasticizer character and in the concentrations of 30 and 40% there is a predominance of the crosslinking effect.

- The AG-30% and AG-40% hydrogel films have a stable behavior maintaining the physical integrity and presenting sufficient degradation time to be used in RTG and ROG, resulting from the crosslinking process.

Acknowledgment

The authors thank FAPEMIG (Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel), CNPq (National Research Council), GMIT-UFU (Triangle Inorganic Materials Group), technical support in FETI-UFU (School of Chemical Engineering) FTIR analysis, technical support in the analysis of SEM, Faculty of Civil Engineering for technical support in traction analyzes and the Multiuser Laboratory of the Institute of Chemistry of the Federal University of Uberlândia.

References

Aggarwall, P., Dollimore, D., 1998. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. *Thermochim. Acta* 319,17-25
[https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(98\)00355-4](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(98)00355-4)

Becker, W., Becker, B.E., Caffese, R., Kerry G., Ochsenbein, C., Morrison, E., Prichard, J., 2001. A longitudinal study comparing scaling, osseous surgery and modified Widman procedures: Result after 5 years. *J Periodontol.* 72, 1675-1684.

<https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.12.1675>

Boyne P.J., 1964. Regeneration of alveolar bone beneath cellulose acetate filter implants. *J Dent Res.* 43,827.

Boyne P.J., 1969. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties. *J Am Dent Assoc.* 78, 767-776.

[https://doi.org/10.1016/S0002-8177\(69\)84023-7](https://doi.org/10.1016/S0002-8177(69)84023-7)

Bostman O.M., 1992. Intense granulomatous inflammatory lesions associated with absorbable internal fixation devices made of poliglicolide in ankle fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 278, 193-199.

Chang, Y. P.; Karim, A. A.; Seow, C. C., 2006. Interactive plasticizing-antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties on tapioca starch films. *Food Hydrocoll.* 20, 1-8.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.02.004>

Chen C.C., Wang H.L., Lopatin De, O'neal R.B., MacNEIL, R.I., 1997. Bacterial adherence to guided tissue regeneration barrier membranes exposed to the oral environment. *J Periodontol.* 68, 172-179.

<https://doi.org/10.1902/jop.1997.68.2.172>

Doulabi, A.H., Mirzadeh, H., Imani, M., Samadi, N., 2013.

Chitosan/polyethylene glycol fumarate blend film: Physical and antibacterial properties. *Carbohydr. Polym.* 92, 48–56.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.002>

Gerzson A.S., Ribeiro Júnior P.D., Matsumoto M.A., Duarte M.A.H., Weckwerth P.H., 2016. Barrier membranes for GBR: characteristics and indication. *J Clin Dent Res.* 13, 120-125.

<https://doi.org/10.14436/2447-911x.13.4.120-125.oar>

Gontijo, P.M., Borges, M.F., Ferreira, J., A., Silva, M.V.B., Ruggiero, R., 2018. Bio-based cellulose acetate films reinforced with lignin and glycerol. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1143.

<https://doi.org/10.3390/ijms19041143>

Gotlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T., Wennstrom, J., 1986. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports *J Clin Periodontol.* 13, 604-616.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1986.tb00854.x>

Hollinger J., Chaudhari A., 1992. Bone regeneration materials for the mandibular and craniofacial complex. *Cell Master*. 2,143.

Hurley L.A., Stinchfield F.E., Bassett C.A.L., Lyon W.H., 1959. The role of soft tissues in osteogenesis. *J Bone Joint Surg Am*. 41A, 1243-66.
<https://doi.org/10.2106/00004623-195941070-00007>

Jane, J., 2006. Current understanding on starch granule structure. *J. Appl. Glycosci*. 53, 205-213.
<https://doi.org/10.5458/jag.53.205>

Jaramillo, C.M.; Gutiérrez, T.J., Goyanes, S., Bernal, C., Famá, L., 2016. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. *Carbohydr. Polym*. 151, 150–159.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.025>

Karring T., Isidor F., Nyman S., Lindhe J., 1985. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol*.12, 51-60.

Kawabata, A., Sawayama, S., Nagashima, N., Rosario, R.R., Nakamura, M., 1984. Some physico-chemical properties of starches from cassava, arrowroot and sago. *J. Jpn. Soc. Starch Sci*.31, 224-232.
<https://doi.org/10.5458/jag1972.31.224>

Kohavi D., Pollack S.R., Brington G., Balkin B., 1991. Surgically modelled reduced ridge in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res*. 2, 45-50.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1991.020307.x>

Kou, T, Gao, Q., 2018. New insight in crosslinking degree determination for crosslinked starch. *Carbohydr res*. 458, 13-18.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.01.009>

Linde A., Alberius P., Dahlin C., Bjurström K., Sundin Y., 1993. Osteopromotion: A soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol*. 64, 1116-1128.
<https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.11s.1116>

Moorthy, S.N., 2002. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: a review. *Starch-Starke* 54, 559-592. Chang, Y.P., Karim, A. A.; Seow, C.C., 2006. Interactive plasticizing-antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties on tapioca starch films. *Food Hydrocoll*. 20, 1-8.

Müller, C., Yamashita, F., Larurindo, J.B., 2008. Evaluation of effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydr*.

Polym. 72, 82-87.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.026>

Nyman S., Linde J., Karring T., 1989. Reattachment- new attachment. In: Lindhe J. (ed). Textbook of Clinical Periodontology. ed 2 Copenhagen: Munksgard, 450-476.

Oliveira, R.S., Borges, M.F., Vieira, A.T., Henrique, M.A., Ribeiro, E.A.M., Bezerra, F.A., Portela, F.M., Pereira, N.R., Assunção, R.M.N., Ruggiero, R., 2018. Adsorção de contaminantes do biodiesel por fibras de bagaço modificadas na superfície. Quim. Nova 41, 121-128.

Pecora G., Baek S.H., Rethnam S., Kim S., 1997. Barrier membrane techniques in endodontic microsurgery. Dent Clin North Am. 41, 585-602.

Rocha, T.S; Demiate, I.M., Franco, C.M.L., 2008. Características estruturais e físico químicas de amidos de mandioca salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). Ciênc. Tecnol. Aliment. 28, 620-628.

<https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300018>

Rothamel D., Schwarz F., Sager M., Herten M., Sculean A., Becker J., 2005. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. Clin Oral Implants Res. 16, 369-378.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01108.x>

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

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.021>

Schwarz F., Rothamel D., Herten M., Wustefeld M., Sager M., Ferrari D., Becker J., 2008. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. Clin Oral Implants Res. 19, 402-415.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01486.x>

Schwarz F., Rothamel D., Herten M., Sager M., Becker J., 2006. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: a immunohistochemical study in the rat. Clin Oral Implants Res. 17, 403-409.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01225.x>

Singh, J., Kaur, L., McCARTHY, O.J., 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications – A review. Food Hydrocoll. 21, 1-22.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.02.006>

Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Tharanathan, R. N., 2007. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocoll.* 21, 1113-1122.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.08.005>

Somerman M.J., Sauk J.J., Foster R.A., Dikerson K., Norris K., Argraves W.S., 1991. Cells attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodont Res.* 26, 10-16.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1991.tb01620.x>

Sweedman, M.C., Tizzotti, M.J., Schaferb, C., Gilbert, R.G., 2013. Singh, J., Kaur, L., McCARTHY, O.J., 2007. Factors influencing the physic-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications – A review. *Food Hydrocoll.* 21, 1-22.

Warrer K., Gotfredsen K., Hjorting-Hansen E., Karring T., 1991. Guided tissue regeneration. Ensures osseointegration of dental implants placed into extraction sockets. An experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2, 166-171.

<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1991.020402.x>

Williams D.F., 1981. Biomaterials and biocompatibility: An introduction. In: Williams DF(ed). *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press.

Wolkers, W.F., Oliver, A.E., Tablin, F., Crowe, J.H., 2004. A Fourier-transform Infrared Spectroscopy Study of Sugar Glasses. *Carbohydr. Res.* 339, 1077-1085.

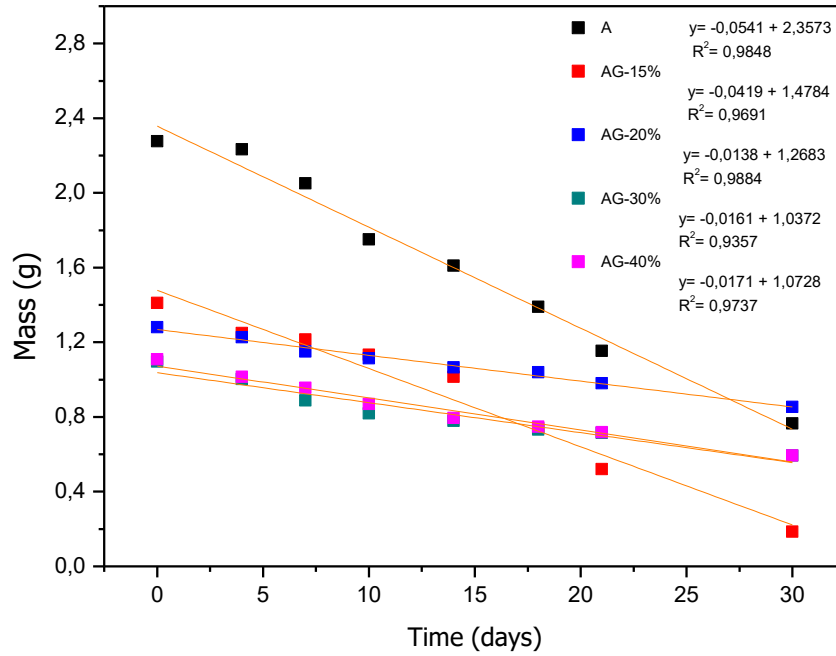
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.01.016>

Zaia, D. A. M., Zaia, C. T. B. V., Lichtig, J, (1988). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim Nova*, 21, 787-793.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000600020>

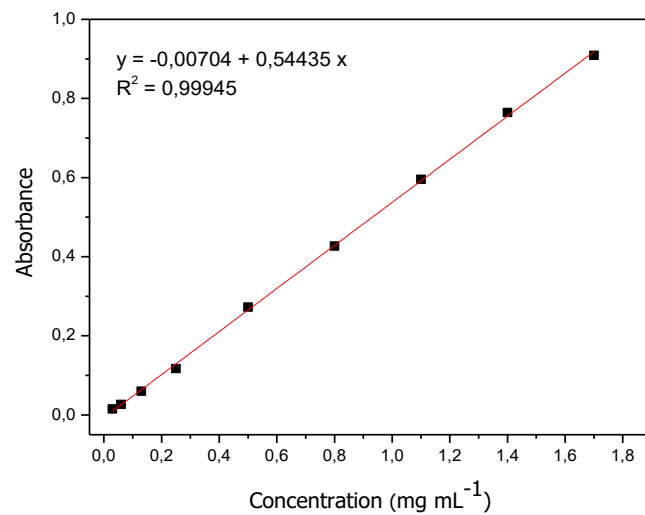
Annex 1.

Graph of mass variation according to the time.



Annex 2.

Calibration curve of the BSA at 280 nm.



REFERÊNCIAS*

- 1-Socransky, S S, Haffajee, A D. (2005) Periodontal microbial ecology. In: Haffajee, A D & Socransky, S S, eds. **Microbiology of Periodontal Disease. Periodontology**. 2000 38, 135-187.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>
- 2- Haffajee, AD & Socransky, SS. (1994) Microbial etiological agentes of destructive periodontal diseases. In Socransky, SS & Haffajee, AD eds. **Microbiology and Immunology of Periodontal Disease. Periodontology**. 2000; 5:78-111.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1994.tb00020.x>
- 3- Socransky, SS, Haffajee, AD, Cugini, MA, Smith, C, Kent, RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**. 1998;25(2):134-44.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>
- 4-Jin, KC, Barua, PK, Zambon, JJ, Neiders, ME. Proteolytic activity in black-pigmented bacteroides species. **Journal of Endodontics**. 1989;15(10):463-7.
[https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(89\)80025-1](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(89)80025-1)
- 5-Grenier, D, Mayrand, D, McBride, B C. Further studies on the degradation of imunoglobulins by black-pigmented Bacteroides. **Oral Microbiol Immunol**. 1989; 4(1):12-8.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1989.tb00400.x>
- 6-Lantz, MS, Allen,RD, Bounelis, P, Switalsk,LM, Hook M. Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius recognize different sites on human fibrinogen. **J Bacteriology**.1990;172(2):716-26.
<https://doi.org/10.1128/jb.172.2.716-726.1990>
- 7-Page, RC. Oral health status in the United States: Prevalence of inflammatory periodontal diseases. **J Dent Educ**.1985; 49(6):354-64.
- 8-Polson, AM, Goodson, JM. Periodontal diagnosis. Current status and future needs. **J Periodontol**.1985;56(1):25-34.
<https://doi.org/10.1902/jop.1985.56.1.25>
- 9- Schatzle, M, Loe, H, Burguin, W, Anerud, A, Boysen, H, Lang, NP. Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis. **J Clin Periodontol**. 2003;30(10):887-901.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.2003.00414.x>
- 10-Dietrich, T, Kaye, EK, Nunn, ME, Van Dike, T, Garcia, RI. Gingivitis susceptibility and its relation to periodontitis in men. **J Dent Res**. 2006;85(12):1134-7.
<https://doi.org/10.1177/154405910608501213>
- 11-Caton GJ, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant deseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Clin Periodontol**. 2018;45(Suppl 20):S1-8.

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

12-Koshy, G, Corbet, EF, Ishikawa, I. A full mouth disinfection approach to nonsurgical periodontal therapy-prevention of reinfection from bacterial reservoirs. **Periodontol** 2000. 2004;36:166-78.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2004.03678.x>

13- Lindhe,J, Lang N, Karring T.. Cirurg Periodontal: Acesso Cirúrgico. In: **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**. 5th Edition.Guanabara Koogan. Rio de Janeiro 2010;38 cap:753.

14- Blomlof, J, Lindskog, S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. **Eur J Oral Sci**. 1995;103(1):17-24.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1995.tb00005.x>

15-Blomlof, L, Jonsson, B, Blomlof, J & Lindskog, S. (2000). A clinical study of root surface conditioning with EDTA gel.II. Surgical periodontal treatment. **Int J Periodontics and Restorative Dent**. 2000;20(6):556-73.

16-Isidor, F, Karring, T. Long-term effect of surgical and non-surgical periodontal treatment. A 5-year clinical study. **J Periodontal Res**1986;21:462-72.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1986.tb01482.x>

17- Becker, W, Becker, BE, Caffese, R, Kerry G, Ochsenbein, C, Morrison, E, Prichard, J. A longitudinal study comparing scaling, osseous surgery and modified Widman procedures: Result after 5 years. **J Periodontol**. 2001;72(12):1675-84.

<https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.12.1675>

18- Swardstrom, G, Wennstrom, J. Furcation topography of the maxilar and mandibular first molars. **J Clin Periodontol**. 1988;15:271-75

<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1988.tb01583.x>

19-Gottlow, J,Nyman, S, Lindhe, J, Karring, T, Wennstrom, J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration.Case reports **J Clin Periodontol**.1986;13(6):604-16.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1986.tb00854.x>

20-Nyman S, Linde J, Karring T. Reattachment- new attachment.In: Lindhe J. (ed). **Textbook of Clinical Periodontology**.ed 2 Copenhagen: Munksgard,1989:450-76.

21-Gottlow J,Nyman S, Karring T. Maintenance of new attachment gained through guided tissue regeneration. **J Clin Periodontol**.1992;19(5):315-7

<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1992.tb00651.x>

22-Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **J Clin Periodontol**.1982;9(3)257-65.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1982.tb02065.x>

23-Boyne PJ. Regeneration of alveolar bone beneath cellulose acetate filter implants. **J Dent Res**.1964.

24-Bassett CAL, Creighton DK,Stinchfield FE. Contributions of endosteum, córtex and soft tissues to osteogenesis. **Surg Gynecol Obstet**.1961;112:145-52.

25-Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol.**1982b;9(4):290-6.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1982.tb02095.x>

26-Wallace SC, Gellin RG, Miller MC, Mishkin DG. Guided tissue regeneration with and without decalcified freeze-dried bone in mandibular Class II furcation invasions. **J Periodontol.**1994;65(3):244-54.
<https://doi.org/10.1902/jop.1994.65.3.244>

27-Buser D, Bragger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. **Clin Oral Impl Res.**1990 1;(1):22-32.

28-Dhalin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implant using a membrane technique: An experimental study in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants.**1989;4(1):19-25.

29-Becker W, Becker BE. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: Surgical techniques and case reports. **Int J Periodontics Restorative Dent.**1990;10(5):376-91.

30- David L. Cochran, Charles M. Cobb, Jill D. Bashutski, Yong-Hee Patricia Chun, Zhao Lin§, George A. Mandelaris, Bradley S. McAllister, Shinya Murakami, Hector F. Rios. Emerging Regenerative Approaches for Periodontal Reconstruction: A Consensus Report From the AAP Regeneration Workshop. **J Periodontol.** 2015;86(Suppl):S153-6.

31-Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg.**1988;81(5):672-6.
<https://doi.org/10.1097/00006534-198805000-00004>

32- Schimitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan B. Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta Anat.**1990;138(3):185-92.
<https://doi.org/10.1159/000146937>

33-Ogiso B, Hughes FJ, Melcher AC, MacCulloch CAG. Fibroblasts inhibit mineralized bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. **J Cell Physiol.**1991;146(3):442-50.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1041460315>

34-Prolo DJ, Rodrigo JJ. Contemporary bone graft physiology and surgery. **Clin Orthop Relat Res.**1985;(200):322-342.
<https://doi.org/10.1097/00003086-198511000-00036>

35-Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. **Clin Orthop Relat Res.**2002;(395):66-80.

36-Weibrigh G, Trettin R, Gnoth SH, Gotz H, Duchner H, Wagner W. Determining the size of the specific surface of bone substitutes with gas adsorption. **Mund Kiefer Gesichtschir.**2000;4:148-152

37-Chung CA, Yang CW, Chen CW. Analysis of cell growth and diffusion in a scaffold for cartilage tissue engineering. **Biotechnol Bioeng.**2006;94(6):1138-46.
<https://doi.org/10.1002/bit.20944>

38-Dunn JC, Chan WY, Cristini V, Kin JS, Lowengrub J, Singh S, Wu BM. Analysis of cell growth in three-dimensional scaffolds. **Tissue Eng.** 2006;12(4):705-16.
<https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.705>

39-Galban CJ, Locke BR. Analysis of cell growth kinetics and substrate diffusion in a polymer scaffold. **Biotechnol Bioeng.**1999;65(2):121-132.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991020\)65:2<121::AID-BIT1>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991020)65:2<121::AID-BIT1>3.0.CO;2-6)

40-Sollazzo V, Palmieri A, Scapoli L, Martinelli M, Girardi A, Alviano F, Pellati A, Perrotti V Carinci F. Bio-Oss® acts on stem cells derived from Peripheral Blood. **Oman Med J.**2010;25(1):26-31.
<https://doi.org/10.5001/omj.2010.7>

41-Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res.** 1997;8(2):117-124.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1997.080206.x>

42-Piatelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piatelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. **Int J Oral Maxillofac Implants.**1999;14(6):835-840.

43-Hallman M, Cederlund A, Lindskog S, Lundgren S, Sennerby L. A clinical histologic study of bovine hydroxyapatite in combination with autogenous bone and fibrine glue for maxillary sinus floor augmentation. Results after 6 to 8 months of healing. **Clin Oral Implants Res.**2001;12(2):135-143.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2001.012002135.x>

44-Tadjoedin ES, De Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective histomorphometrical study of five cases. **J Clin Periodontol.**2003;30(3):261-70.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.2003.01099.x>

45-Williams DF. Biomaterials and biocompatibility: An introduction. In: Williams DF(ed). **Fundamental Aspects of Biocompatibility**, vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 1981:1.

46-Williams DF. Regulatory biocompatibility requirements for biomaterials used in regenerative medicine. **J Mater Sci Mater Med.**2015;26(2):89.
<https://doi.org/10.1007/s10856-015-5421-7>

47-Rae T. Cell biochemistry in relation to the inflammatory response to foreign materials. In: Williams DF (ed). **Fundamental Aspects of Biocompatibility**, vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 1981:8.

48-Bostman OM. Intense granulomatous inflammatory lesions associated with absorbable internal fixation devices made of polyglycolide in ankle fractures. **Clin Orthop Relat Res.**1992;(278):193-9.

49-Quteish D, Dolby AE. Immune response to implanted human collagen graft in rats. **J Periodont Res.**1991;26(2):114-21.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1991.tb01634.x>

50-Somerman MJ, Sauk JJ, Foster RA, Dikerson K, Norris K, Argraves WS. Cells attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. **J Periodont Res.**1991;26(1):10-6.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1991.tb01620.x>

51-Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing followin implantation of periodontitis-affected roots into bone tissue. **J Clin Periodontol.**1980;7(2):96-105.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1980.tb01952.x>

52- karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduce but healthy periodontal ligament. **J Clin Periodontol.**1985;12(1):51-60.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1985.tb01353.x>

53-Hurley LA, Stinchfield FE, Bassett CAL, Lyon WH, 1959. The role of soft tissues in osteogenesis. **J Bone Joint Surg Am.** 41A, 1243-66.

<https://doi.org/10.2106/00004623-195941070-00007>

54-Kohavi D, Pollack SR, Brington G, Balkin B. Surgically modelled reduced ridge in the beagle dog. **Clin Oral Implants Res.**1991;2(3):145-50.

<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1991.020307.x>

55-Hollinger J, Chaudhari A. Bone regeneration materials for the mandibular and craniofacial complex. **Cell Master.**1992; 2:143.

56-Shenk RK, Perren SM. [Biology and biomechanics of fracture healing in long bones as a basis for osteosynthesis]. **Hefle Unfallheilkd.**1977;(129)29:41.

57-Pellegrine AA, Bataglia Jr JP, Henriques PSG, Octaviani C. Aumento da espessura do rebordo alveolar atraves da técnica de regeneração óssea guiada. **Rev Assoc Paul Cir Dent.**2005;59:288-91.

58-Busenlechner D, Kantor M, Tangl S, Tepper G, Zechner W, Haas R, Watzek G. Alveolar ridge augmentation with a proto type trilayer membrane and various bone grafts: a histomorphometric study in baboons. **Clin Oral Implants Res.**2005;16(2):220-7.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01103.x>

59-Chen CC, Wang HL, Lopatin De, O'neal RB, MacNEIL, RI. Bacterial adherence to guided tissue regeneration barrier membranes exposed to the oral envolviment. **J Periodontol.**1997;68(2):172-79.

<https://doi.org/10.1902/jop.1997.68.2.172>

60-Ruggiero, R, Carvalho, V.A, Silva, LG, Magalhães, D, Ferreira, JA, Menezes, H.M, Melo, PG, Naves, MN. Study of in vitro degradation of cellulose acetate membranes modified and incorporated with tetracycline for use as an adjuvant in periodontal reconstitution. **Ind Crops Prod.** 2015;(72):2-6.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.021>

61-Mali, S, Grossmann, MVE, Yamashita, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias.** 2010;31(1)137-156.

<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n1p137>

62- Sweedman, MC, Tizzotti, MJ, Schäfer, C, Gilbert, RG. Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. **Carbohydr Polym.**

2013;92(1):905-920.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.040>

63-BONA, JC. **Preparação e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de blendas de amido com polietileno.** [Dissertação] Florianópolis: Engenharia de Alimentos/ Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.

64-Róz, AL. **Preparação e Caracterização de Amidos Termoplásticos.** [Tese] São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos / Universidade de São Paulo; 2004.
<https://doi.org/10.11606/T.88.2004.tde-11062008-150517>

65-Chandra,R, Rustgi, R. Biodegradable Polymers. **Progr Mater Sci.**1998;23(7):1273-1335

66-Singh, J, Kaur, L, McCarthy, OJ. Factors influencing the physic-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications – A review. **Food Hydrocoll.** 2007;21(1):1-22
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.02.006>

67-Cereda, MP, Franco, CML, Daiuto, ER, Demiate, JM, Carvalho, LJCB, Leonel, M, Vilpoux, DF, Sarmiento, SBS. **Propriedades gerais do amido.** Campinas, Fundação Cargill, 2001.

68-Bobbio, PA.; Bobbio, FO. **Química do processamento de alimentos.** 2. ed. 151 p. São Paulo: Varela, 1995.

69-Cereda, MP. **Propriedades Gerais do Amido.** São Paulo: Fundação Cargill, 2002. 221 p. (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-americanas, v. 1).

70-Srinivasa, PC, Ramesh, MN, Tharanathan, RN. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. **Food Hydrocoll.** 200;21(7):1113-1122.

71-Gontard, N, Guilbert, S, Cuq, JL. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **J of Food Sci.** 1992;57(1):190-199.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>

72-Shimazu, AA.; Mali, S, Grossmann, MVE. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. Semina: **Ciências Agrárias.** 2007;28(1):79-81.
<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n1p79>

73-Hennink, WE, Van Nostrum, CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Adv Drug Deliv Rev.** 2012;64: 223–236.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.009>

74-Gonsalves, AA, Araújo, CRM, Soares, NA, Goulart, MOF, Abreu, FC. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Quim Nova.** 2011;34(7):1215-1223.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000700021>

75-Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **J Adv Res.** 2015;6(2):105–21.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>

76-Aouada AF, Mattoso LHC. Hidrogéis Biodegradáveis: uma opção na aplicação como veículos carreadores de sistemas de liberação controlada de pesticidas. **Embrapa Instrumentação-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**.2009.