



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



ISABELLA RESENDE VIEIRA

**ESTUDO DO PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA UTILIZANDO
MEMBRANAS SINTÉTICAS COM ADITIVOS FUNCIONAIS: ESTUDO *IN*
*VITRO***

UBERLÂNDIA

2019

ISABELLA RESENDE VIEIRA

**ESTUDO DO PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA UTILIZANDO
MEMBRANAS SINTÉTICAS COM ADITIVOS FUNCIONAIS: ESTUDO *IN
VITRO***

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia da UFU, como requisito
parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Denildo de
Magalhães

Co-orientadora: Dr^a. Jéssica Afonso
Ferreira

UBERLÂNDIA

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por ser a base das minhas conquistas e por iluminar o meu caminho.

À minha família, em especial aos meus pais, Josias e Beatriz, e ao meu irmão Vinícius, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis e felizes da minha vida.

Ao meu prezado orientador, Prof. Dr. Denildo de Magalhães, por todos os ensinamentos e oportunidades.

Aos meus colegas e a todos os meus professores, que tornaram essa caminhada mais prazerosa e contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Ao professor Reinaldo Ruggiero e sua aluna orientada, Mariana, por possibilitarem a execução deste projeto.

À minha co-orientadora Dra. Jéssica Afonso, por toda dedicação, compreensão e amizade.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, CNPq e FAPEMIG, por financiarem este trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Acetato de Celulose

BGP – BioGide Perio

FDA – Food and Drug Administration

GD – GenDerm

GPC – Glicerofosfato de Cálcio

GTR – Guided Tissue Regeneration

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

Ph – Permeabilidade a vapor de água

ROG – Regeneração Óssea Guiada

RTG – Regeneração Tecidual Guiada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do AC.....	10
Figura 2 – Estrutura química do GPC.....	10
Figura 3 – Membranas de Acetato de Celulose produzidas.....	13
Figura 4 – Membranas comerciais de origem bovina.....	14
Figura 5 – Espectrofotômetro de ondas modelo UV.....	15
Figura 6 – Goniômetro.....	16
Figura 7A – Metalizador.....	18
Figura 7B - Microscópio Eletrônico de Varredura.....	18
Figura 8 – Absorção da membrana de AC durante o tempo analisado.....	18
Figura 9 – Absorção da membrana de AC+GPC durante o tempo analisado...	19
Figura 10 – Absorção da membrana GD durante o tempo analisado.....	19
Figura 11 – Absorção da membrana BGP durante o tempo analisado.....	20
Figura 12 – Imagens de superfícies das membranas	21
Figura 13 – Imagens de fraturas das membranas.....	22

RESUMO

O princípio da Regeneração Tecidual Guiada (RTG) na Periodontia é fundamentado em mecanismos de manipulação celular, utilizando barreiras físicas para promover um selamento total de um defeito tecidual com células viáveis e favorecer a regeneração periodontal. Baseando-se no conceito da osteopromoção, a barreira é colocada em contato direto com a superfície óssea circundante de forma a prevenir que outros tecidos, principalmente tecido conjuntivo, interfiram na osteogênese e no direcionamento da formação óssea. Diante disso, o objetivo deste estudo foi desenvolver membranas de acetato de celulose, puras e incorporadas com glicerofosfato de cálcio, e caracterizar os aspectos físicos e químicos. Foi utilizada espectrometria para analisar o tempo de degradação final das membranas, microscopia eletrônica de varredura para análise qualitativa da morfologia das superfícies e fraturas, capacidade de molhabilidade por meio do ângulo de contato e as propriedades de barreira (permeabilidade a vapor de água). O tempo de degradação das membranas desenvolvidas foi de 100 dias e, além disso, as mesmas apresentaram morfologia viável e porosidade suficiente para difundir nutrientes e permitir a exclusão celular. Desta forma, observou-se potencial para a utilização das membranas como barreira na regeneração de tecidos ósseos e periodontais.

Palavras-chave: Acetato de celulose, degradação, glicerofosfato de cálcio, membrana, terapia periodontal.

ABSTRACT

The principle of Guided Tissue Regeneration (GTR) in Periodontology is based on mechanisms of cellular handling, using physical barriers to promote a total sealing of a tissue defect with viable cells and promote periodontal regeneration. Based on the osteopromotion's concept, the barrier is placed in direct contact with the surrounding bone surface to prevent other tissues, especially connective tissue, from interfering with osteogenesis and the direction of bone formation. Therefore, the aim of this study was to develop pure cellulose acetate membranes incorporated with calcium glycerophosphate, and to characterize its physical and chemical aspects. Spectrometry was used to analyze the final membrane degradation time, Scanning Electron Microscope for qualitative analysis of surface morphology and fractures, wettability through contact angle and barrier properties (water vapor permeability). The degradation time of the developed membranes was 100 days and, in addition, they presented viable morphology and sufficient porosity to diffuse nutrients and allow cell exclusion. Thus, the potential for the use of membranes as a barrier in the regeneration of bone and periodontal tissues was observed.

Keywords: Cellulose acetate, degradation, calcium glycerophosphate, membrane, periodontal therapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 JUSTIFICATIVA	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 PREPARO E DESCRIÇÃO DAS MEMBRANAS.....	13
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS.....	15
3.2.1 Tempo de degradação das membranas.....	15
3.2.2 Análise da molhabilidade por meio de ângulo de contato	16
3.2.3 Análise da permeabilidade ao vapor de água	17
3.2.4 Análise qualitativa da morfologia das superfícies e fraturas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	18
4 RESULTADOS	19
4.1 TEMPO DE DEGRADAÇÃO DAS MEMBRANAS.....	19
4.2 MOLHABILIDADE E PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA.....	21
4.3 MORFOLOGIA DAS SUPERFÍCIES E FRATURAS POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	22
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos, através de fatores bioquímicos apropriados, combinação entre células e engenharia de materiais, pretende melhorar, substituir, restaurar, manter ou melhorar tecidos vivos ou órgãos inteiros. A bioengenharia é um campo interdisciplinar, que tem se desenvolvido ao longo da última década para corrigir defeitos de tecidos moles e duros, secundários a trauma e doenças adquiridas ou congênitas. É uma alternativa em potencial que visa substituir tecidos lesionados, recriando órgãos saudáveis e tecidos funcionais. (Kaigler; Mooney, 2001; Ratner et al., 2013; Ferreira et al., 2015).

O processo biológico em que tanto a estrutura quanto a função do tecido ósseo lesado são completamente restabelecidas é denominado regeneração óssea, quando o seu reparo ocorre sem a presença de uma “cicatriz” óssea (Junqueira; Carneiro, 2004). Frente ao trauma ou procedimento cirúrgico, ocorre extravasamento sanguíneo decorrente de lesão vascular, e a ativação de receptores envolvidos na hemostasia e trombose faz com que um sistema de transporte de elétrons regule a formação do trombo. Durante a formação de trombos, destaca-se também a importância de algumas proteínas como as isomerases, responsáveis pela atividade extracelular (Furie; Furie 2012). A estabilidade mecânica, o suprimento sanguíneo e a presença de um arcabouço tridimensional que oriente a proliferação celular são fatores dependentes para a consolidação do reparo no tecido ósseo (Klenke et al., 2008).

O processo de reparo ósseo ocorre em três fases: inflamatória, reparadora e de remodelação. A fase inflamatória caracteriza-se pela formação de um coágulo sanguíneo envolvendo as superfícies ósseas no local da lesão, estendendo-se por cavidades medulares próximas e periósteo, acompanhadas de edema mais ou menos intenso. Diante disso, a liberação de substâncias quimiotáticas provoca um processo inflamatório agudo, com grande mobilização de neutrófilos e macrófagos. Inicia-se então a fase reparadora, com a formação de um calo fibroso por fibroblastos produtores de colágeno tipo III, envolvendo a região lesionada. As células endoteliais remanescentes dos vasos rompidos e as células mesenquimais indiferenciadas

ocasionam a formação de uma nova rede capilar, invadindo a região do coágulo juntamente com fibroblastos e osteoblastos, formando um novo tecido ósseo imaturo no local por um processo de ossificação intramembranosa ou endoconjuntiva. Processos de neoformação e reabsorção ocorrem na fase remodeladora, até que a região lesionada restabeleça suas características biomecânicas, morfológicas e funcionais que possuía antes da lesão (Guimarães, 1982; Pospisilová, 1982).

Por serem células completamente diferenciadas, os osteoblastos apresentam capacidade limitada de migração e proliferação. Assim, células progenitoras mesenquimais indiferenciadas (células osteoprogenitoras) migram até o sítio e diferenciam-se em osteoblastos para a formação óssea (Junqueira; Carneiro, 2004; Lynch; Genko; Marx, 1999).

A regeneração tecidual guiada (RTG) é uma técnica utilizada para regenerar defeitos ósseos ao redor de implantes, cirurgias de lesões endodônticas, cirurgias mucogengivais e bucomaxilo-faciais. Além disso, existem estudos clínicos promissores relacionados com lesões de furca grau II e defeitos intraósseos de três paredes (Tonetti, Pini-Prato & Cortellini, 1995). A regeneração óssea guiada (ROG) é uma modalidade terapêutica que permite a formação e a diferenciação de células osteoprogenitoras em uma área isolada, excluindo os tecidos epiteliais e conjuntivos, utilizando membranas como barreira biológica (Moseset al., 2008).

As membranas podem ser confeccionadas com materiais biodegradáveis e não biodegradáveis e devem apresentar biocompatibilidade, maleabilidade clínica, semipermeabilidade, capacidade de manutenção de espaço e integração com os tecidos hospedeiros (Karring et al., 1993). Apesar das membranas atenderem os objetivos mecânicos e biológicos dos eventos regenerativos, pode ocorrer sua exposição após utilização cirúrgica, com consequente contaminação da área (Slots et al., 2002; Sbordone et al., 1999). As contaminações das membranas expostas precocemente estão comumente associadas a infecções nos locais tratados, podendo interferir negativamente na regeneração dos tecidos e no ganho de inserção. Além disso, o processo de degradação da membrana também pode ser acelerado (Chen et al., 1997).

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

Pequenas alterações na síntese da membrana, como o tempo de evaporação do solvente, banho de coagulação e composição da solução polimérica, podem provocar diferenças significativas na morfologia da estrutura formada, independente da técnica utilizada para a produção. Viu-se então a necessidade de desenvolver uma barreira com uma correta capacidade de oclusão e isolamento da área, com a capacidade de proteger também quanto a possíveis contaminações bacterianas (Sbordone et al., 2000). Com a possibilidade de permitir a incorporação de agentes funcionais, as membranas absorvíveis apresentam um significativo destaque (Ruggiero et al., 2015).

A celulose é um material natural abundante e tem sido considerada como um objeto de estudo em pauta na ciência dos polímeros, assim que ferramentas para pesquisas científicas tornaram-se disponíveis para melhorar as propriedades dos materiais (Zugenmaier, 2008). O Acetato de Celulose (AC) é um dos derivados de celulose mais importantes, sendo amplamente utilizado na produção de fibras, plásticos, revestimentos resistentes aos solventes, sistemas de liberação controlada de fármacos, processos de separação por membranas, entre outros (Fischer et al., 2008). Além disso, foi o primeiro material utilizado como membrana em RTG mas, apesar da obtenção de resultados preliminares favoráveis, apresentava dificuldade de degradação em meio aquoso, sendo este o maior componente do fluido corporal, pois não possuía os requisitos químicos e estruturais ideais para o uso como barreira à migração epitelial (Fischer et al., 2008). Pode-se observar a estrutura química do AC na Figura 1.

Estrutura química do AC

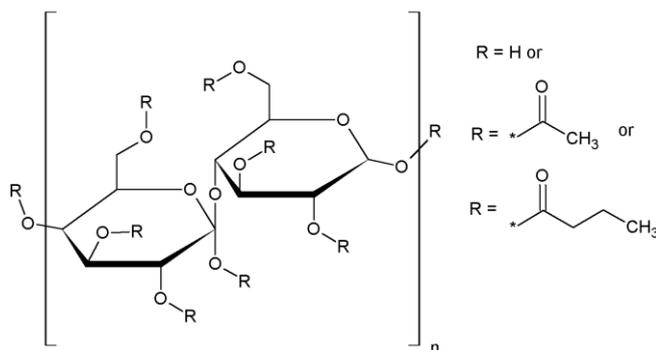


Figura 1: Estrutura química do AC

Fonte: O autor

Outro aditivo importante é o Glicerofosfato de Cálcio (GPC), por ser fonte de cálcio e fosfato inorgânico obtido através da hidrólise por fosfatase alcalina no sangue e fluido de tecidos. Quando aplicado em proteção pulpar direta, este aditivo pode ser transformado em hidroxiapatita (Imaiet al., 1993). Além disso, não é citotóxico (Hayashi Y et al., 1992). Através do processo de biomineralização, ocorre a formação do fosfato de cálcio, principal componente dos ossos e dentes no corpo humano. Cristais de hidroxiapatita possuem aplicações médicas e podem acelerar a regeneração óssea e reparação ao serem utilizados em defeitos ósseos (Fujishiro, Hench, e Oonishi, 1997). A hidroxiapatita, entretanto, é considerada quebradiça (Okada&Furuzono, 2012) mas, estes cristais podem ser combinados com numerosos polímeros bioativos (Bonfield, Grynepas, e Tully, 1981), incluindo as proteínas e polissacáridos (Ehrlich, 2010), de forma a superar essa questão. Pode-se observar a estrutura química do GPC na Figura 2.

Estrutura química do GPC

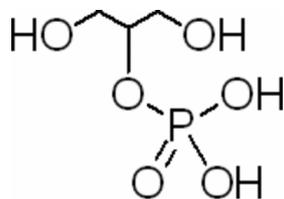


Figura 2: Estrutura química do GPC

Fonte: O autor

A hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é o principal constituinte mineral dos ossos e dentes, representando de 30 a 70% de sua massa. Quando comparada aos métodos tradicionais para produzir hidroxiapatita, a síntese de fosfatos de cálcio via precipitação química apresenta benefícios como simplicidade e baixo custo. No entanto, a maioria dos procedimentos sintéticos apresenta formação de produtos não estequiométricos e mistura de fases. Os processos de precipitação consistem na adição de grupos fosfatos a suspensões que contenham íons cálcio, podendo partir de diferentes reagentes. Dependendo do processo de fabricação, as propriedades da hidroxiapatita apresentam características diferentes. Quando sintetizadas em baixas temperaturas, apresentam cristais menores e baixa cristalinidade. Quando sintetizadas em temperaturas altas, apresentam cristais maiores e boa cristalinidade (Rigo, 2007).

Investigações científicas analisam vários aspectos da regeneração óssea dentro deste modelo, porém não demonstram detalhes como a expressão de componentes não colágenos da matriz óssea que estão envolvidas no início do processo de formação óssea, na sua maturação/mineralização, além da avaliação ultraestrutural do tecido neoformado entre o biomaterial e tempo de degradação de membranas reabsorvíveis *in vivo*.

Considerando a hipótese de que acetato de celulose e glicerofosfato de cálcio apresentam características que podem favorecer a RTG, se faz viável investigar e desenvolver membranas constituídas por estes materiais. O objetivo do presente estudo foi desenvolver e caracterizar membranas de acetato de celulose puras e incorporadas com glicerofosfato de cálcio, e comparar as suas propriedades físico-químicas com membranas comerciais consolidadas.

2 JUSTIFICATIVA

Muito se fala do uso de membranas a fim de regenerar regiões acometidas por perda óssea. Diante disso, o objetivo deste estudo é desenvolver e caracterizar membranas de glicerofosfato de cálcio e acetato de celulose a fim de, posteriormente, caracterizar e testar *in vivo* novos biomateriais sintéticos com potencial para aplicação na Odontologia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARO E DESCRIÇÃO DAS MEMBRANAS

Para a confecção das membranas desenvolvidas neste estudo foram utilizados polímeros de Acetato de Celulose de massa molar média 30.000 g mol⁻¹ (Sigma-Aldrich Corporation, *Saint Louis, Missouri, USA*), Glicerofosfato de Cálcio de massa molar média 210.14 g (Sigma-Aldrich Corporation, *Saint Louis, Missouri, USA*), Acetona 99,5% (VetecQuímica Fina Ltda, Brasil) e Água Deionizada. Foram desenvolvidas duas diferentes membranas sintéticas de Acetato de Celulose, com concentração fixa de 10 gramas de reagentes dissolvidos em 80 ml de acetona e 20 ml de água (10,0% m/v polímeros/solvente), com variação da quantidade de AC dependendo do aditivo Glicerofosfato de Cálcio (GPC) (0,04%), conforme na Tabela 1.

Descrição das composições das membranas de Acetato de Celulose sintetizadas.

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

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

Fonte: O autor

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

ambiente durante 24 horas, com objetivo de eliminar resíduos de solvente, em seguida foram armazenadas em grau cirúrgico em local fresco e seco longe da luz do sol.

Membranas de Acetato de Celulose produzidas

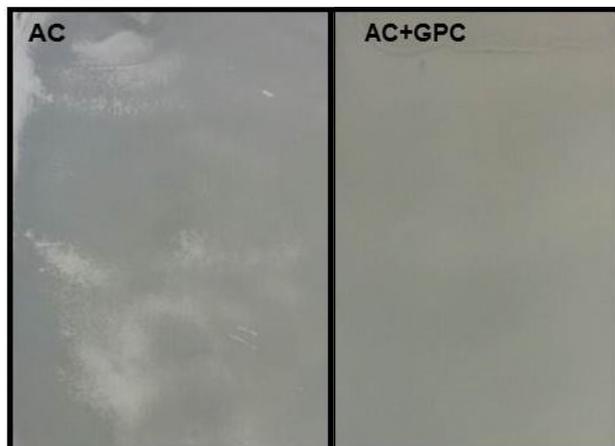


Figura 3: Membranas de Acetato de Celulose produzidas

Fonte: O autor

Tendo em vista o desenvolvimento de um novo produto, se faz essencial o conhecimento das propriedades físicas e químicas de membranas biológicas consolidadas no mercado, de forma a comparar o comportamento e as características existentes. Foram selecionadas duas membranas biológicas absorvíveis comumente utilizadas na ROG, são elas: GenDerm (GD) (Baumer do Brasil, São Paulo, Brasil) e BioGide Perio (BGP) (Geistlich do Brasil, São Paulo, Brasil), demonstradas na figura 4.

Membranas comerciais de origem bovina e suína

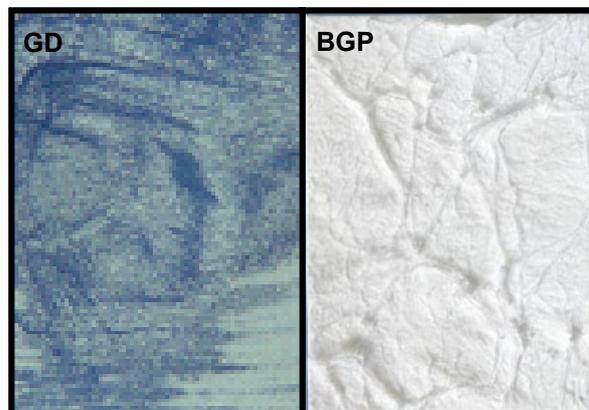


Figura 4: Membranas comerciais de origem bovina e suína.

Fonte: O autor

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

3.2.1 Tempo de degradação das membranas

O processo de degradação foi efetuado através do método descrito na literatura (Ruggiero et al., 2015) quando as amostras (1,0 cm² de área) foram imersas em 20 mL de uma solução tamponada com fosfato (pH = 7,2) a uma temperatura fixada em $36,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Foram realizadas medidas de comprimento de onda definido em 280nm por meio do espectrofotômetro UV (Shimadzu Corporation, São Paulo, Brasil, modelo UV 2501 PC, pertencente ao Instituto de Química/UFU) (Figura 5). A cada medida, as membranas foram alteradas para uma nova solução para evitar atingir o equilíbrio de dissolução. As análises foram realizadas em triplicatas e os tempos de análise da degradação foram de 0 horas (dia inicial), 24 (1 dia), 48 (2 dias), 96 (4 dias), 192 (8 dias), 384 (16 dias), 768 (32 dias), 1536 (64 dias) e 2400 horas (100 dias), sempre duplicando os dias de análises com objetivo de estrapolar resultados caso as membranas não degradassem completamente em tempo viável para conclusão deste trabalho.

Diariamente as membranas foram analisadas para serem levadas a leitura, caso desaparecessem antes do tempo programado para próxima leitura. A solução tampão-fosfato era trocada a cada leitura com objetivo de não entrar em equilíbrio. Sendo assim, o tempo total de degradação foi estimado após a construção de um gráfico da absorbância em função do comprimento de onda e o processo foi acelerado através do aumento da temperatura até 50°C e diminuição do pH da solução, esse processo conduz a degradação total da membrana.

Espectrofotômetro de ondas modelo UV



Figura 5. Espectrofotômetro de ondas modelo UV.

Fonte: O autor

3.2.2 Análise da molhabilidade por meio de ângulo de contato

A molhabilidade da superfície depende diretamente da energia de superfície e influencia o grau de contato entre o ambiente fisiológico e a membrana; pode ser quantificada pelo ângulo de contato de um líquido com o substrato sólido. Quanto maior a molhabilidade, maior é a interação da superfície do biomaterial com o ambiente biológico (Bico et al, 2002). Logo, a molhabilidade foi quantificada com a aplicação de uma micro-gota de água destilada por meio do Goniômetro (Ramé-Hart, Inc. Modelo NRL A-100 pertencente à FEMEC/UFU) (Figura 6) nas duas membranas. Foi utilizada uma micro-seringa para liberar volumes iguais ($0,5 \mu\text{l}$) do líquido na superfície das membranas.

Sendo assim, as amostras de 40 mm de comprimento e 10 mm de largura foram fixadas em uma lâmina de vidro por meio de fita adesiva. Uma gota de água destilada de $50 \mu\text{L}$, com o auxílio da seringa foi liberada sobre o filme em três pontos diferentes, as imagens foram capturadas por meio de uma câmera digital de alto foco e as mesmas foram analisadas pelo software SurfTens 3.0 que ajusta o perfil da gota e determina o ângulo de contato. Os ângulos foram fotografados 20 s após a gota entrar em contato com as membranas. Foram feitas quantificações da molhabilidade em 03 amostras de cada tipo de membrana, totalizando 6 imagens. Foram

calculados a média e o desvio padrão dos valores de ângulos de contato encontrados.

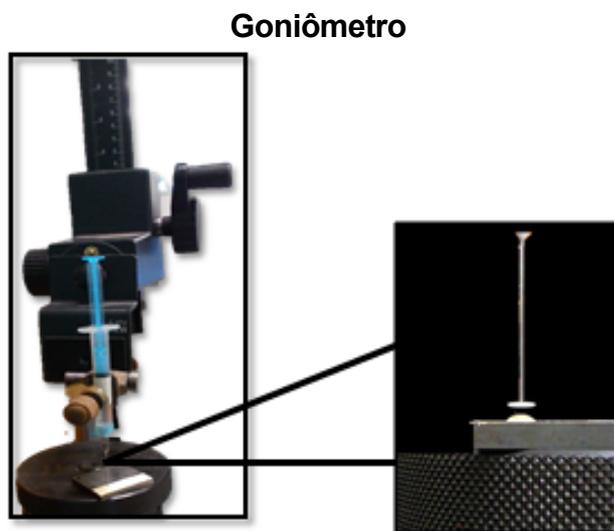


Figura 6: Goniômetro

Fonte: O autor

3.2.3 Análise da permeabilidade ao vapor de água

O ensaio de permeabilidade ao vapor de água foi realizado utilizando-se a técnica do copo de Payne (ASTM D1653-08). O copo de Payne consiste em um conjunto formado por um copo de alumínio com boca rosqueada, com variações de diâmetro interno de modo a formar uma base para a fixação do filme, anéis de vedação de borracha e alumínio e uma tampa rosqueada vazada no centro, cuja área de permeação foi $7,373 \text{ cm}^2$.

As membranas foram cortadas em forma de discos, e adaptadas em um ependorf com diâmetro igual ao interno, proporcional ao do copo de Payne. Previamente foi calculada a espessura com média das medidas em cinco regiões diferentes de cada filme, utilizando o micrômetro digital Mitutoyo (0-25 mm). (Mitutoyo Sulamérica Ltda, São Paulo, Brasil). Este sistema é colocado em um dessecador, na presença do agente secante Pentóxido de Fósforo (P_2O). Na qual se pode avaliar a capacidade de cada uma das membranas de permear água através da perda de água do interior do copo.

Triplicatas foram realizadas para cada membrana e as mesmas foram colocadas em ambiente com temperatura controlada, o sistema foi

acompanhado com registros das massas em intervalos de 60 minutos nas primeiras 10 horas, seguidas de medidas feitas a cada 24 horas durante 7 dias.

3.2.4 Análise qualitativa da morfologia das superfícies e fraturas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram realizadas análises morfológicas de superfícies e fraturas das membranas em MEV. As fraturas dos filmes foram obtidas por meio de quebra após imersão em nitrogênio líquido por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram fixadas em tira de carbono sob os “stubs” metálicos, no plano horizontal para avaliar superfície e no plano vertical para avaliar o interior das membranas, as mesmas foram levadas ao dessecador por 24 horas, após receberem fina camada de ouro, com 15 nm de espessura. O conjunto foi posicionado no metalizador MED 10 (Oerlikon *Balzars* Coating, São Paulo, Brasil) (Figura 7A), cujo cilindro contém placa de ouro em sua parte superior. O cilindro de vidro forma uma câmara que se fecha hermeticamente e em seguida se conecta a bomba de vácuo, que produz vácuo na ordem de 10^{-1} mmHg. A câmara fica em conexão com reservatório de Argônio que substitui o ar e cria atmosfera deste gás. Assim estabelece-se entre a amostra e a placa de ouro diferença de potencial suficiente para ionizar o gás. Os íons positivos bombardeiam a placa de ouro arrancando seus átomos, que se depositam na superfície da amostra em espessura de aproximadamente 100-200 Å, com período de sputtering de 2-3 minutos. Após a metalização, as amostras foram examinadas no MEV (EVO MA 10, CARL ZEISS, Germany), a voltagem de 10 KV. (Figura 7B). As imagens microscópicas foram obtidas do centro da amostra em aumento de 5000x tanto para superfícies quanto para fraturas.

Metalizador e Microscópio Eletrônico de Varredura



Figura 7: A – Metalizador. B - Microscópio Eletrônico De Varredura

Fonte: O autor

4 RESULTADOS

4.1 TEMPO DE DEGRADAÇÃO DAS MEMBRANAS

O tempo total de degradação foi estimado após a construção de gráficos de absorvância em função do comprimento de onda a fim de permitir a análise de horas necessárias para as membranas degradarem completamente e a velocidade de degradação das mesmas, apresentados nas Figuras 8-11.

Absorção da membrana de AC durante o tempo analisado

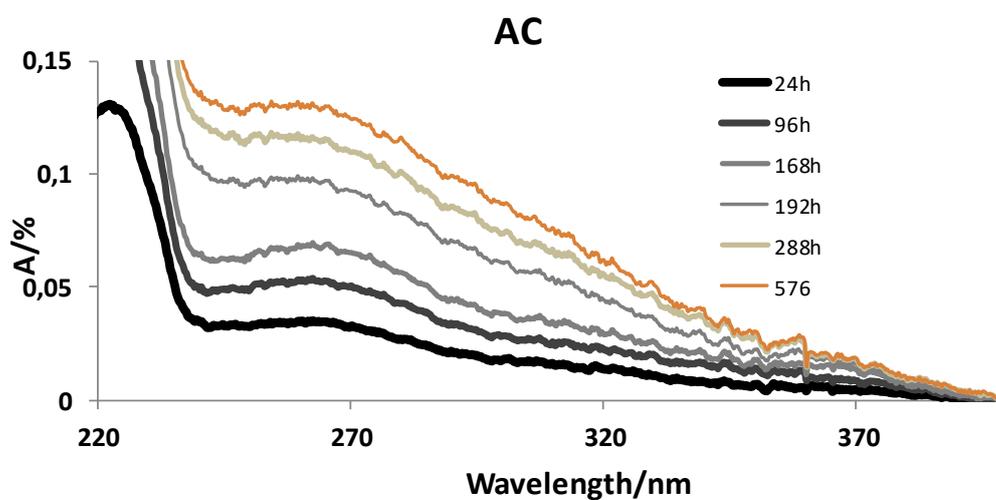
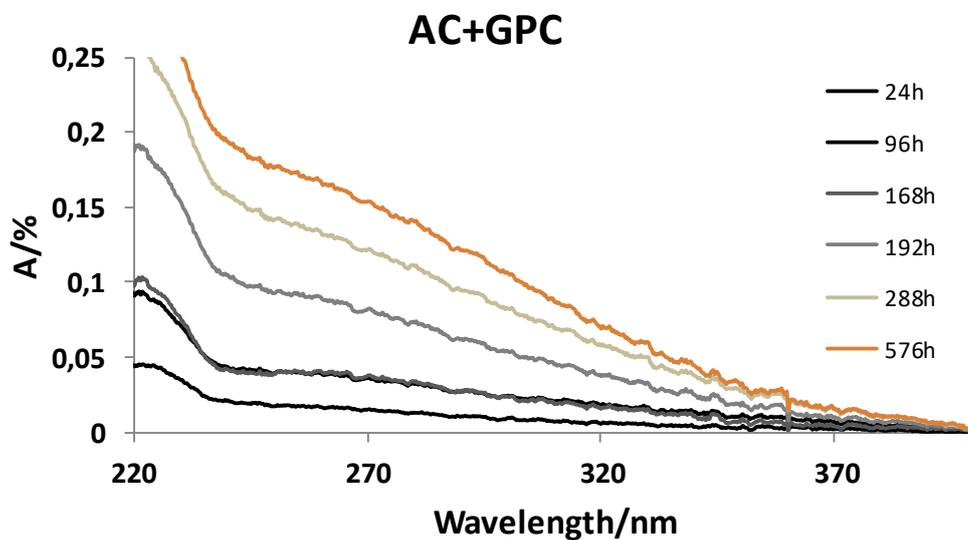
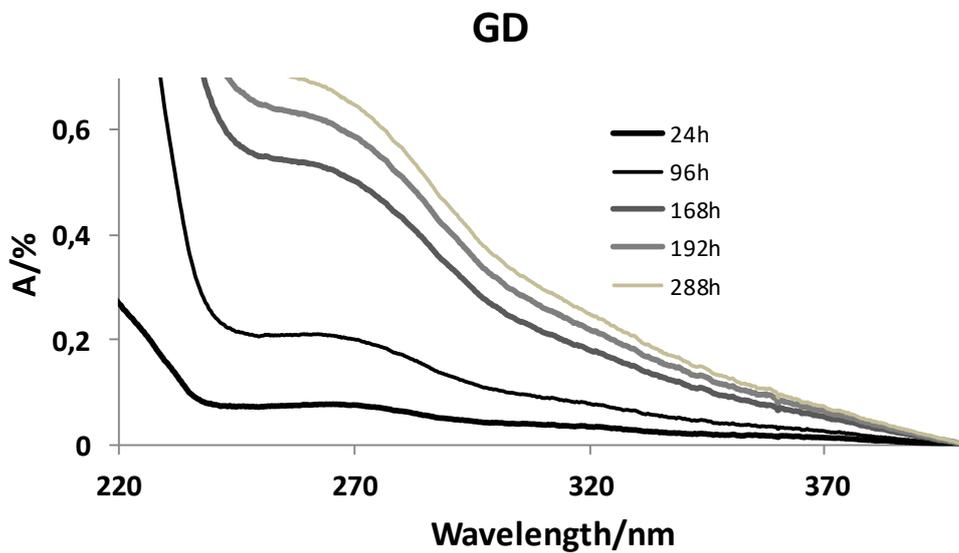


Figura 8: Absorção da membrana de AC durante o tempo analisado.

Fonte: O autor

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

Fonte: O autor

Absorção da membrana GD durante o tempo analisado**Figura 10:** Absorção da membrana GD durante o tempo analisado.

Fonte: O autor

Absorção da membrana BGP durante o tempo analisado

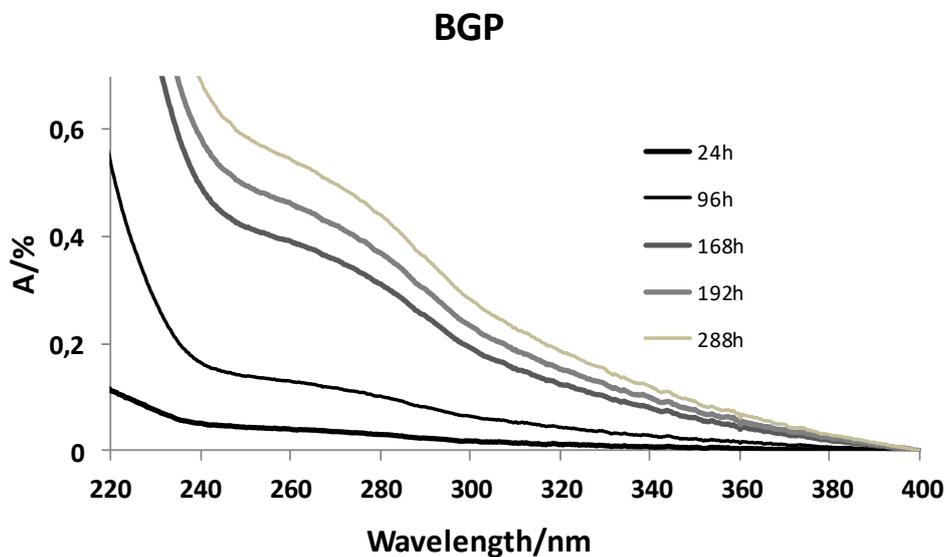


Figura 11: Absorção da membrana BGP durante o tempo analisado.

Fonte: O autor

4.2 MOLHABILIDADE E PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA

A permeabilidade a vapor de água e ângulo de contato são apresentados na Tabela 2.

Permeabilidade a vapor de água e ângulo de contato das membranas sintéticas e biológicas.

Membranas	Fluxo ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) (\pm D.V.)	Ângulo de contato (θ) (\pm D.V.)
AC	$3,035 \times 10^{-6}$ ($\pm 1,27 \times 10^{-7}$)	53,81 ($\pm 3,45$)
AC+GPC	$3,73 \times 10^{-5}$ ($\pm 7,08 \times 10^{-6}$)	54,24 ($\pm 1,30$)
GD	$2,83 \times 10^{-5}$ ($\pm 3,39 \times 10^{-6}$)	62,17 ($\pm 6,01$)
BGP	$4,13 \times 10^{-5}$ ($\pm 5,03 \times 10^{-6}$)	00,00 ($\pm 0,00$)

Tabela 2: Permeabilidade a vapor de água e ângulo de contato das membranas sintéticas e biológicas.

Fonte: O autor

4.3 MORFOLOGIA DAS SUPERFÍCIES E FRATURAS POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As micrografias de superfícies e fraturas das membranas de AC e membranas biológicas comerciais são apresentadas em imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura no aumento de 5000x nas Figuras 12 e 13.

Imagens de superfícies das membranas

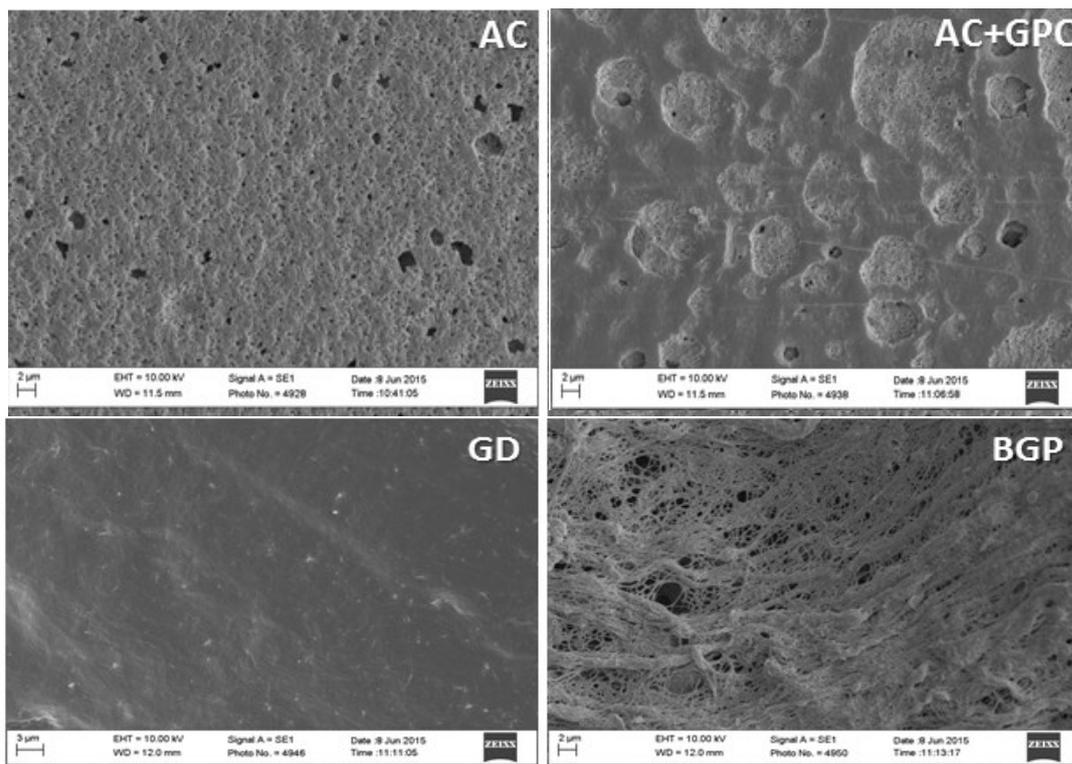


Figura 12: Imagens de superfícies das membranas AC, AC+GPC, GD e BGP. Ampliação de 5000x.

Fonte: O autor

Imagens de fraturas das membranas

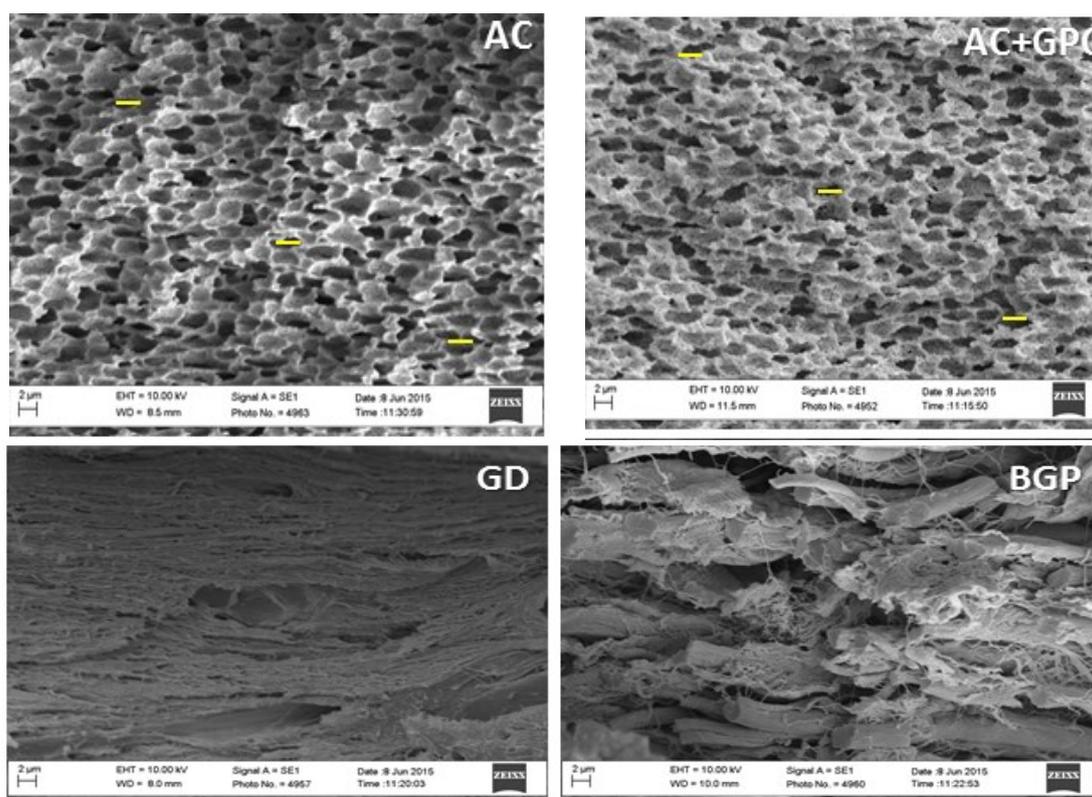


Figura 13: Imagens de fraturas das membranas AC, AC+GPC, GD e BGP. Ampliação de 5000x. (Marcações amarelas: tamanhos dos poros baseados nas escalas fornecidas pelas imagens)

Fonte: O autor

5 DISCUSSÃO

Uma das principais funções das membranas degradáveis e absorvíveis, é a exclusão celular de fibroblastos. Para a obtenção de melhores resultados, diversos fatores devem ser considerados, como a resposta tecidual hidrolítica sobre os compósitos resultantes da degradação ser mínima, reversível e não influenciar negativamente na regeneração dos tecidos (Gottlow, 1993). Convencionalmente, sugere-se estabilidade da membrana para obtenção de melhores resultados (Caton et al., 1976).

Como a celulose provém de fonte renovável, existe grande interesse em explorar seus derivados, assim como suas aplicações (Heinze & Liebert, 2001). É viável o estudo e desenvolvimento de membranas constituídas por glicerofosfato de cálcio e acetato de celulose, pois estas substâncias apresentam características físicas e químicas favoráveis para a RTG.

O tempo total de degradação foi estimado após a construção de gráficos de absorvância em função do comprimento de onda, foram necessárias 2400 horas (100 dias) para as membranas de AC e seus aditivos degradarem completamente, visto que por meio das análises foi possível extrapolar os resultados fornecidos a partir de análises feitas em períodos controlados. Além disso, foi realizado o acompanhamento real das membranas onde foi observado o desaparecimento das amostras no mesmo período de tempo.

Uma das formas de se avaliar a hidrofiliicidade das membranas é através da determinação do ângulo de contato, que por sua vez, é uma medida da molhabilidade da superfície. Materiais hidrofóbicos repelem a água, fazendo com que seu contato com a superfície seja o menor possível, resultando em altos valores de ângulos de contato (Nogueira, 2012). No entanto, a adição de GPC aumentou significativamente a permeabilidade ao vapor de água, cerca de 90%.

As microscopias eletrônicas de varredura obtidas neste estudo permitem uma análise qualitativa em relação às superfícies e regiões transversais das amostras. Por meio das figuras 12 e 13, é possível constatar uma maior homogeneidade nas membranas de AC em termos de porosidade, além disso, maiores poros nas membranas incorporadas por glicerofosfato de cálcio, quando comparados com as membranas comerciais e/ou as membranas de acetato de celulose puro.

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

A existência de poros é importante para a difusão de fluidos sanguíneos, entretanto, os poros devem ser menores do que as células de tal modo que a membrana impeça a passagem de fibroblastos para a área do defeito ósseo. Há poucos relatos na literatura sobre a dimensão exata dos osteoblastos e fibroblastos, no entanto, Alhadlaq e Mao, relataram em 2003,

osteoblastos encapsulados dentro do côndilo mandibular com dimensões de $110\mu\text{m} \times 70\mu\text{m}$. Um estudo recente publicado por Zhou et al. 2015, avaliou a morfologia de fibroblastos em diferentes superfícies e permitiu concluir, por meio de imagens de MEV, o tamanho aproximado de fibroblastos em média $175\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$. Considerando que as células apresentam tamanhos superiores aos poros das membranas mostrados em secção transversal na figura 13, pode-se afirmar a capacidade de exclusão celular das quatro membranas desenvolvidas, visto que os poros medem aproximadamente $2\mu\text{m}$, medidos em relação a escala fornecida pela própria microscopia, destacada por uma barra amarela. Assim, as membranas são capazes de atuar como uma barreira e permitir RTG/ROG. Tais observações morfológicas podem ser diretamente associadas com o processamento da membrana, visto que o solvente evapora mais rapidamente do que o não solvente, resultando em dois efeitos principais: o aumento da taxa de coalescência, o que leva à separação das fases para a formação da matriz, e o aumento da concentração de não solvente na estrutura polimérica, levando à formação de poros. Isto pode também ser uma consequência de diferentes ésteres de acetato utilizados na elaboração das membranas sintéticas, em comparação com as comerciais. Estas características classificam as membranas de AC e aditivos como assimétricas.

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

De forma geral, o aditivo melhorou as características físico-químicas avaliadas. A adição de GPC nas membranas de AC permitiu aumento na resistência física, homogeneidade superficial e aumento na quantidade de poros e não influenciou no tempo de degradação.

6 CONCLUSÃO

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

1. As membranas desenvolvidas neste experimento indicaram propriedades favoráveis para aplicação em RTG.

2. As membranas avaliadas neste estudo apresentaram tempo de degradação suficiente para RTG e degradam mais devagar em relação às membranas comerciais.

3. O GPC apresentou boas propriedades mecânicas, aumento na quantidade de poros e homogeneidade superficial.

4. Por ser de origem sintética, e então, não possuir genética animal, os materiais desenvolvidos possuem capacidade de controle de produção, baixos custos industriais e menor risco biológico a rejeição por fatores genéticos.

5. Dentre as membranas desenvolvidas, a AC+GPC apresentou, de forma geral, melhores características físico-químicas.

REFERÊNCIAS

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

Bonfield, W., Grynblas, M. D., & Tully, A. E. **Hydroxyapatite reinforced polyethylene—A mechanically compatible implant material for bone replacement.** Biomaterials. 1981; (2) 185–186.

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

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

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

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

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

Furie B, Furie BC. **Formation of the clot.** Thromb Res. 2012; 1:44-6.

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

Guimarães SC. **A patologia básica da cavidade bucal.** 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1982.

Habert, A. C.; Piacsek, B. C.; Nobrega, R. **Processos de separação por membranas**. 2006.

Hayashi Y, et al. **Toxicity of dental medicaments on pulp cells in vitro**. I1. The effect of organic phosphates. *Journal of Conservative Dentistry*. 1992; 35, 1033-6.

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

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

Junqueira LC, Carneiro, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10 ed. 2004.

Kaigler, D.; Mooney, D. **Tissue engineering's impact on dentistry**. *J Dent Educ*, Washington, v.65, n.5, p.456-462, jan. 2001.

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

Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. **Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo**. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 85:777-786.

Lynch SE, Genko R, Marx R. **Tissue engineering application in maxillofacial surgery and periodontics**. *Quintessence*, v.5, p.93-112, jan. 1999.

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

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

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

Pospisilová J. **Healing of wounds.** Acta Chir Plast, Praha, v.24, n.4, p.293-303, 1982.

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

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

Sbordone L, Barone A, Ciaglia RN, Ramaglia L, Iacono VJ. **Longitudinal study of dental implants in a periodontally compromised population.** J Periodontol 1999, 70(11): 1322-1329.

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

Slots J, Jorgensen MG. **Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet?** J. Periodontol. 2002;28:298-312.

Tonetti MS, Cortellini P, Carnevale G, Cattabriga M, de Sanctis M, Pini Prato GP. **A controlled multicenter study of adjunctive use of tetracycline periodontal fibers in mandibular class II furcations with persistent bleeding.** J Clin Periodontol. 1995; 25(9): 728-36.

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

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