



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

RAFAEL MAZA BARBOSA

**INCORPORAÇÃO DE HIDROXIAPATITA EM MATRIZES
DE QUITOSANA E XANTANA E LIBERAÇÃO DE
DOXICICLINA EM MEMBRANAS APLICÁVEIS NA
REGENERAÇÃO TECIDUAL E TERAPIA AVANÇADA**

CAMPINAS – SP

2019

RAFAEL MAZA BARBOSA

**INCORPORAÇÃO DE HIDROXIAPATITA EM MATRIZES
DE QUITOSANA E XANTANA E LIBERAÇÃO DE
DOXICICLINA EM MEMBRANAS APLICÁVEIS NA
REGENERAÇÃO TECIDUAL E TERAPIA AVANÇADA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
Química da Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Mestre em Engenharia Química

Orientadora: Ângela Maria Moraes

Prof. Dra. Ângela Maria Moraes

Este trabalho corresponde a versão final da dissertação
defendida pelo aluno Rafael Maza Barbosa e orientado
pela Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes

CAMPINAS – SP

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

B234i Barbosa, Rafael Maza, 1983-
Incorporação de de hidroxiapatita em matrizes de quitosana e xantana e liberação de doxiciclina em membranas aplicáveis na regeneração tecidual e terapia avançada / Rafael Maza Barbosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Regeneração óssea. 2. Terapia. 3. Biomaterial. 4. Células-tronco. 5. Hidroxiapatita. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Hydroxyapatite incorporation in matrices of chitosan and xanthan gum and doxycycline release in membrane applicable in tissue regeneration and advanced therapy

Palavras-chave em inglês:

Bone regeneration

Therapy

Biomaterial

Stem cells

Hydroxyapatite

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ângela Maria Moraes [Orientador]

Américo Bortolazzo Correr

Mariana Altenhofen da Silva

Data de defesa: 17-05-2019

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0797-0563>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8290470583496427>

Folha de Aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado defendida por Rafael Maza Barboza aprovada em 17 de maio de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Profa. Dra. Ângela Maria Moraes (Orientador)

FEQ / UNICAMP

Dra. Mariana Altenhofen da Silva

UFSCAR/ARARAS

Prof. Dr. Americo Bortolazzo Correr

FOP / UNICAMP

ATA da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, José Carlos e Shirlei e minha irmã Maira, pela educação ética e moral que me permitiu tomar as decisões corretas e aprender com as dificuldades encontradas ao longo de minha vida e meu trabalho.

À Janaína Alves, minha companheira durante todo o ciclo das principais conquistas de minha vida, por me apoiar incondicionalmente durante esta fase, pelo amor, carinho e paciência nos diversos momentos em que passamos e, sempre, juntos.

Ao Daniel Navarro, pela mentoria, orientação, pelo compartilhamento de conhecimento, pela amizade, pelas diversas discussões que enriqueceram imensamente meu trabalho e minha visão científica assim como, a parceria e entrega absoluta para conseguirmos sempre a qualidade e legitimidade dos resultados obtidos.

Ao Jefferson Roniere, Juliana Duarte e Tamara, por me darem a tranquilidade e todo o suporte durante esta fase, pela paixão no que fazem, e por cultivarem o amor, dedicação e células tronco.

À Natália, Maurícia e Pâmella, grandes amigas, pela paciência e pelo apoio dedicado a mim diariamente, assim como pelas risadas e situações que nos fazem crescer e nos tornarmos mais fortes a cada dia.

Ao José Ricardo e Walker, pelos ensinamentos, suporte e, principalmente, por acreditar em meu trabalho e fazerem parte da construção de minha carreira.

A Cecília Westin, por toda a parceria ao longo de anos, pela indicação que me proporcionou trilhar este caminho e por toda a dedicação e competência que a torna uma excelente profissional.

Ao pessoal da R-Crio, Juliana, Cássia, Mari, Gabrielle, Helena, Anderson, Marcos, Bárbara, Drielly, Adrielly, Luana, Kelly, Daniela e Mirian, pelo profissionalismo e por acreditarem em nosso esforço e trabalho.

Ao pessoal do lab da DEMBio da FEQ, Monize, Mariana, Renata e Ana, pela disponibilidade e por todo o auxílio durante esta jornada.

Ao Jheison do IME-RJ, pelas imensa ajuda e discussões que me direcionaram ao entendimento de metodologias de análises físico-químicas aplicadas aos biomateriais e a Camila, também do IME-RJ, pelo apoio e disponibilidade em me auxiliar sempre que necessário.

Ao Rubens pelo direcionamento dos ensaios mecânicos e estruturação do trabalho.

Ao LRAC, especialmente ao Adilson, Hugo, Lucélia, Celso e Eliana, pelos ensaios e pela dedicação dispensada.

À Rafaela, a Dra. Karina da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) e a Dra. Wanda por acreditar no trabalho e por me direcionar nos ensaios microbiológicos.

Ao comitê científico do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), pela oportunidade de expor meu trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Dra. Ângela Moraes, por me proporcionar todo o ganho de conhecimento ao longo deste trabalho, pela atenção, direcionamento e pelas diversas oportunidades que surgiram e surgirão.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi a obtenção de uma membrana polissacarídica bioativa com atividade anti-microbiana, capaz de atuar como barreira biológica e estimular o processo de regeneração tecidual. Para tal, foram incorporadas a membranas de quitosana e xantana (QX) produzidas na razão mássica de 1:1, hidroxiapatita (HA) nas proporções de 0,2%, 1,0% e 5,0% e hclato de doxiciclina na concentração de 100 µg/mL. Os biomateriais obtidos foram caracterizados por difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), espectroscopia de fluorescência de raios X (XRF), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microtomografia computadorizada (micro CT), microscopia confocal, espessura e estabilidade em meio aquoso. Foram também avaliadas as propriedades mecânicas de alongamento e tensão no ponto de ruptura dos biomateriais, a proliferação de células-tronco mesenquimais da polpa do dente em contato com as membranas e se ocorria liberação da doxiciclina em concentrações mínimas inibitórias para microrganismos presentes em periodontite. As análises físico-químicas por DRX, FTIR e XRF comprovaram a incorporação do composto cerâmico bioativo pela presença de sua fase cristalina, grupos funcionais e composição química característicos da HA. As análises morfológicas por MEV, microscopia confocal e micro CT indicaram incorporação relativamente homogênea de HA, verificando-se depósitos desta na superfície da membrana, particularmente para a formulação contendo 5,0% de HA. Além disso, foi observado aumento na espessura, na porosidade e na rugosidade superficial das membranas, com a elevação da concentração de HA. Na análise de estabilidade em meio aquoso, não se observou perda de massa significativa em 7 dias, principalmente para a membrana com maior concentração de HA. Todas as amostras apresentaram alta capacidade de alongamento, entre 140 e 152%. A tensão de ruptura para a formulação sem HA foi maior que para as obtidas na presença de 0,2% e 5,0%, cujo resultado foi de 288 kPa, porém este valor não diferiu estatisticamente do observado para a formulação contendo 1% (m/v) de HA. Os resultados do ensaio mecânico indicaram que existe uma relação ideal na adição de HA que pode variar entre 1 e 5% de HA, visto que o valor de 50 kPa foi obtido para a membrana de 0,2% e 83 kPa para a concentração de 5,0%. As células-tronco mesenquimais utilizadas na 8ª passagem apresentaram tempo de duplicação de cerca de 16 horas e velocidade específica de crescimento de 0,044 h⁻¹ e confirmam qualidade adequada para o teste pretendido. O ensaio *in vitro* de viabilidade celular, analisada por meio do indicador metabólico brometo de 2-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), mostrou maior proliferação celular para a membrana contendo 5% (m/v), quando comparada às outras formulações. Este resultado sugere que a adição da hidroxiapatita às membranas pode influenciar nos parâmetros de adesão e proliferação celular. Todas as membranas foram capazes de liberar a concentração mínima de doxiciclina para inibir os microrganismos *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *Porphyromonas gingivalis*. Estes resultados comprovam a bioatividade ocasionada pela adição da hidroxiapatita e da doxiciclina ao complexo polimérico de quitosana e xantana e indicam que este biomaterial pode ser utilizado tanto como barreira biológica, liberando concentração adequada do fármaco, quanto como suporte para aplicação em terapia avançada e regeneração tecidual de lesões periodontais.

Palavras-chaves: regeneração óssea guiada; terapia avançada; biomaterial; células-tronco mesenquimais; hidroxiapatita; doxiciclina; quitosana; xantana; periodontite; tecido ósseo.

ABSTRACT

The purpose of the present work was to produce a polysaccharide-based bioactive membrane capable to act as a biological barrier, with antimicrobial activity and able to stimulate the tissue regeneration process. For that, hydroxyapatite (HA) in the proportions of 0.2%, 1.0% and 5.0% as well as doxycycline hyclate in the concentration of 100 µg/mL were incorporated to chitosan and xanthan gum membranes (CX) produced in the 1:1 mass ratio. The obtained biomaterials were characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), X-ray fluorescence spectroscopy (XRF), scanning electron microscopy (SEM), microtomography (micro CT), confocal microscopy, thickness and stability in aqueous medium. The mechanical properties of elongation and tension strength at break of the biomaterials, the proliferation of dental pulp mesenchymal stem cells in direct contact with the membranes and the release of doxycycline in minimum inhibitory concentrations for microorganisms present in periodontitis were also evaluated. The physico-chemical analyzes by XRD, FTIR and XRF confirmed the incorporation of bioactive ceramic compound by the presence of its crystalline phase, functional groups and chemical composition, characteristics of hydroxyapatite. The morphological analyzes by SEM, confocal microscopy and micro CT indicated relatively homogeneous incorporation of hydroxyapatite powders, with the presence of deposits of the material on the surface of the membrane, particularly for the formulation produced in the presence of HA at 5.0% w/v. In addition, the thickness, porosity and surface roughness values of membrane increased as the concentration of HA increased. In the stability analysis in aqueous medium, no significant mass loss was observed in 7 days, especially for the membrane with higher concentration of HA. All samples showed a high elongation, between 140 and 152%, however the tensile strength at brake was higher in the formulation without HA incorporation, 288 kPa. This value did not differ statistically from that observed for the membrane containing HA 1% (w/v). The results of mechanical test indicated that there is an ideal relationship in the HA incorporation, between 1% and 5% of HA, since the 50 kPa value was obtained for the membrane HA 0.2% and 83 kPa for HA 5.0%. The mesenchymal stem cells used in the 8th passage showed a doubling time of about 16 hours and a specific growth rate of 0.044 h⁻¹, confirming an adequate quality for the intended test. *In vitro* cell viability assay, analyzed by the metabolic indicator 2- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -3,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), showed an increased cell proliferation to the membrane containing HA 5% (w/v), when compared to the other formulations. This result suggests that the incorporation of hydroxyapatite to membranes may influence cell adhesion and proliferation parameters. All membranes were able to release the minimal concentration of doxycycline to inhibit the microorganisms: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *P. gingivalis*. These results confirm the bioactivity from the incorporation of hydroxyapatite and doxycycline to the chitosan-xanthan gum complex, indicating this biomaterial as a biological barrier, releasing adequate concentration of the drug, and as support for application in advanced therapy and tissue regeneration of periodontal lesions.

Keywords: Guided bone regeneration; advanced therapy; biomaterial; mesenchymal stem cell; hydroxyapatite; doxycycline; chitosan; xanthan; periodontitis; bone tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA: Albumina de soro bovino

CaP: Fosfato de Cálcio

CHX: Clorexidina

CNCs: Nanocristais de celulose

CIM: concentração inibitória mínima

CIMB: concentração inibitória mínima para biofilme

DMEM: meio de Eagle modificado por Dubelcco

DRX: Difração de Raio X

e-PTFE: Politetrafluoretileno expandido

FTIR: Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier

HA: Hidroxiapatita

IFN- γ : Interferon γ

IL - 1 β : Interleucina 1 β ;

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT: Brometo de 2- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazólio

n Hap: Nano hidroxiapatita

PEC: Complexo polieletrólito

QX: Quitosana e Xantana

RO: Regeneração Óssea Guiada

RTG: Regeneração Tecidual Guiada

SG: Vidro a base de sílica

UFC: Unidade Formadora de Colônia

XRF: Raio X por Fluorescência

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	Colocação do problema.....	12
1.2	Objetivo	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Tecido ósseo.....	17
2.2	Diagnóstico, prevalência e controle da doença periodontal.....	18
2.3	Biomateriais	23
2.3.1	<i>A evolução das barreiras biológicas.....</i>	<i>23</i>
2.3.2	<i>Complexos polieletrólitos formados por biopolímeros</i>	<i>25</i>
2.3.2.1	<i>Quitosana.....</i>	<i>26</i>
2.3.2.2	<i>Goma xantana.....</i>	<i>28</i>
2.3.3	<i>Hidroxiapatita</i>	<i>31</i>
2.4	Células-tronco mesenquimais do dente	35
2.5	Doxiciclina	37
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Síntese de hidroxiapatita.....	41
3.2	Produção das membranas de quitosana-xantana incorporando ou não hidroxiapatita.....	42
3.3	<i>Incorporação de doxiciclina às membranas</i>	<i>43</i>
3.4	Caracterização físico-química dos biomateriais	44
3.4.1	<i>Difração de raios x (DRX).....</i>	<i>44</i>
3.4.2	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	<i>44</i>
3.4.3	<i>Fluorescência de raios X (XRF)</i>	<i>44</i>
3.4.4	<i>Análise termogravimétrica (TGA).....</i>	<i>45</i>
3.4.5	<i>Análise do aspecto.....</i>	<i>46</i>
3.4.6	<i>Espessura das membranas</i>	<i>46</i>
3.4.7	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	<i>46</i>
3.4.8	<i>Microtomografia computadorizada de raios X (Micro CT)</i>	<i>46</i>
3.4.9	<i>Microscopia confocal a laser.....</i>	<i>47</i>
3.4.10	<i>Análise das propriedades mecânicas.....</i>	<i>47</i>
3.4.11	<i>Capacidade de absorção e perda de massa</i>	<i>48</i>
3.5	Caracterização biológica das membranas.....	49
3.5.1	<i>Preparo das células-tronco mesenquimais de polpa dentária.....</i>	<i>49</i>

3.5.2	<i>Caracterização das células-tronco mesenquimais</i>	50
3.5.3	<i>Ensaio in vitro de proliferação celular</i>	51
3.5.4	<i>Ensaio in vitro de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da doxiciclina</i>	52
3.5.4.1	<i>o dos microrganismos para preparo do inóculo</i>	52
3.5.4.2	<i>Preparo do inóculo</i>	52
3.5.4.3	<i>Preparo da curva padrão de doxiciclina</i>	53
3.5.4.4	<i>Preparo das amostras para o ensaio de CIM e CBM</i>	54
3.5.4.5	<i>Inoculação dos microrganismos e início do ensaio de CIM e CBM</i>	54
3.5.4.6	<i>Determinação da faixa de concentração do fármaco doxiciclina capaz de inibir o microrganismo (CIM) e determinação da faixa capaz de eliminar os microrganismos testes (CBM)</i>	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Caracterização da hidroxiapatita sintetizada	58
4.2	Produção das membranas de quitosana-xantana e quitosana-xantana-hidroxiapatita	63
4.2.1	<i>Difração de raios X</i>	64
4.2.2	<i>FTIR</i>	66
4.2.3	<i>XRF</i>	68
4.2.4	<i>TGA e DTG</i>	69
4.2.5	<i>Análise de aspecto</i>	70
4.2.6	<i>Análise de espessura</i>	71
4.2.7	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	72
4.2.8	<i>Micro CT</i>	78
4.2.9	<i>Microscopia confocal</i>	81
4.2.10	<i>Capacidade de absorção e perda de massa</i>	84
4.2.11	<i>Propriedades mecânicas</i>	87
4.2.12	<i>Caracterização das células-tronco mesenquimais</i>	89
4.2.13	<i>Ensaio in vitro de viabilidade celular analisada por MTT</i>	93
4.2.14	<i>Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de doxiciclina aos microrganismos testados</i>	95
5.	CONCLUSÕES	100
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	102
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 Colocação do problema

A doença periodontal é, geralmente, uma inflamação causada por microrganismos, que acomete a região de inserção do elemento dentário ao osso, afetando também a gengiva e o ligamento periodontal. A sua evolução ocasiona a reabsorção do osso alveolar e, conseqüentemente, a perda do dente, o que leva a várias outras complicações. Desde 2004, através do programa Brasil Sorridente, o governo Brasileiro vem levantando dados sobre a saúde bucal da população. Estes dados servem para mapear e direcionar o tratamento odontológico. As conseqüências da doença periodontal não estão somente associadas à saúde bucal, mas sim a todo o trato digestório. Em estudos que relacionam fatores inflamatórios circulantes com as doenças periodontais, verificam-se que estas doenças podem levar ao câncer oral, esofágico e, até mesmo, ao aumento do carcinoma de língua. Estratégias para a regeneração dos tecidos adjacentes ao dente e, principalmente, a regeneração óssea local com o auxílio de membranas poliméricas podem evitar estas complicações, além da perda do elemento dentário (CHUNG *et al.*, 2016; SFREDDO, MAIER e MOREIRA, 2017).

A regeneração óssea guiada (ROG) e a regeneração tecidual guiada (RTG) são procedimentos cirúrgicos que utilizam diversos tipos de membranas, como barreiras biológicas, com o intuito de direcionar o crescimento de tecido ósseo, epitelial e conjuntivo, restaurando defeitos ósseos locais e restabelecendo a adequada função estética. A ROG é semelhante à RTG, porém possui o foco no desenvolvimento e recuperação de tecidos ósseos, além dos tecidos adjacentes de fixação dos elementos dentários. Na região oral, a ROG é predominantemente aplicada para auxiliar o crescimento do novo tecido ósseo em uma crista alveolar e, por exemplo, permitir a estabilidade biológica de implantes dentários mais rapidamente (NYMAN *et al.*, 1982b; GOTTLOW *et al.*, 1984; JIMBO *et al.*, 2014). Ambas as estratégias de regeneração utilizam membranas produzidas a partir de diferentes tipos de materiais, sendo estas divididas, principalmente, de acordo com o tempo de meia vida de reabsorção no corpo. Estas divisões são enquadradas em dois grandes grupos: membranas não-reabsorvíveis e reabsorvíveis. As membranas não-reabsorvíveis, que podem ser constituídas de compostos como o politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), são barreiras biológicas que exibem excelente biocompatibilidade e demonstram auxiliar, significativamente, a regeneração óssea em estudos clínicos (JIMBO *et al.* 2014). Entretanto, essas membranas rígidas necessitam de uma segunda cirurgia para removê-las, podendo resultar em deiscência dos tecidos moles,

aumentando sua exposição e susceptibilidade a infecções. Em comparação com as membranas não-reabsorvíveis, as bioabsorvíveis, produzidas a partir de materiais naturais ou de polímeros capazes de serem reabsorvidos ou degradados *in vivo*, não requerem posterior remoção cirúrgica. O principal desafio na aplicação clínica das membranas bioabsorvíveis é coincidir o seu tempo de reabsorção com o período de neoformação óssea. A integridade estrutural da membrana deve ser mantida durante o desenvolvimento e a maturação do tecido recém-formado, o que pode variar com o local de sua aplicação. Uma das desvantagens de membranas reabsorvíveis obtidas a partir de materiais como, por exemplo, o colágeno bovino, incluem a potencial transmissão de contaminantes e a resposta inflamatória, além da difícil manipulação durante sua aplicação. O processo de reticulação dos polímeros possibilita a obtenção de membranas mais estáveis, com período de reabsorção entre 4 a 6 meses. Entretanto, os reagentes utilizados como, por exemplo, o glutaraldeído, podem resultar em efeitos citotóxicos aos tecidos adjacentes se permanecerem no material em quantidades residuais, além de aumentar o custo do produto final e a complexidade do processo produtivo.

O desafio de manter a estrutura e o tempo de meia-vida apropriados de membranas projetadas para a neoformação óssea, além de melhorar a adesão celular e a resposta biológica tecidual, deve-se à dificuldade de se obter essas propriedades sem a utilização de reagentes tóxicos durante a produção do biomaterial. Para isso, compostos polieletrólitos, que possuem a capacidade de interagir com produtos da mesma classe, mas de cargas opostas, e com eles formar um compósito polimérico, exibem o potencial de contornar estas limitações, como é o caso da quitosana e da xantana. Estes polímeros podem formar uma membrana estável pela interação entre seus grupos carregados (WESTIN, 2016). Como ambos são polissacarídeos, isso facilita sua degradação pelo corpo, particularmente a da quitosana. Além disso, estes compostos são considerados atóxicos, assim como seus metabólitos.

Neste estudo, para a produção das membranas poliméricas foram empregados polímeros de uso consolidado na literatura, como a quitosana (BELLINI *et al.* 2015a; HERNANDEZ-MONTELONGO *et al.* 2016; BIERHALZ e MORAES, 2016) e a goma xantana (BELLINI *et al.*, 2015a; BIERHALZ e MORAES, 2016). Bellini *et al.*, (2015a) e Westin (2016), desenvolveram membranas de quitosana e xantana porosas em variadas proporções poliméricas, as quais apresentaram bons resultados para adesão e crescimento de células mesenquimais estromais e da polpa do dente de leite. Os resultados alcançados evidenciaram apreciável potencial de uso das membranas de quitosana e xantana em diferentes aplicações, como para o tratamento de lesões de pele e a regeneração do tecido cartilaginoso, sendo este

último com a utilização de células-tronco da polpa dentária diferenciadas em condrócitos. A potencial combinação deste tipo de membrana com agentes capazes de induzir respostas biológicas nas células, como a hidroxiapatita, pode acelerar o processo de regeneração quando na aplicação óssea.

Atualmente, as membranas comerciais atuam somente como barreiras biológicas, não estimulando, por parte do biomaterial, uma resposta celular específica com o intuito de acelerar ou reforçar a regeneração óssea. Isso pode ser alcançado, por exemplo, pelo uso de fosfatos de cálcio, que são conhecidos por sua excelente biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade, demonstrando aumento da atividade celular e a mineralização no interior do defeito ósseo (LEGEROS, 2008; DOROZHKIN, 2013). No presente trabalho optou-se por combinar a membrana de quitosana e xantana densa com uma fase de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita, devido à sua bioatividade e similaridade química com a fase inorgânica do tecido ósseo (MEHDI *et al.*, 2013; LEGEROS, 2008).

O preenchimento efetivo do defeito ósseo pelas células do osso e do ligamento periodontal necessita aproximadamente de 4 a 6 semanas. Para a formação e maturação do tecido ósseo poroso, são necessários aproximadamente 6 meses (WANG *et al.*, 2016). Assim, o controle da concentração de hidroxiapatita em relação às dos polímeros (quitosana-xantana), mostra-se importante para acelerar este processo. Com isso, pode-se estabelecer uma razão ideal visando o comportamento apropriado quanto à dissolução deste compósito e, conseqüentemente, aumentar sua bioatividade, sem acarretar na perda da estabilidade da barreira biológica e, ao mesmo tempo, evitando a indesejada formação de tecido conjuntivo sem a formação óssea. Esta estratégia irá permitir a seleção de um compósito com adequada estabilidade mecânica e estrutural *in vivo*, atendendo assim as necessidades fisiológicas de recuperação óssea. Devido ao longo período durante o qual este material ficará implantado no corpo, particular atenção deve ser dada ao comportamento do dispositivo no que se refere à contaminação por microrganismos e à inflamação local, as quais podem ocasionar a reabsorção óssea e o insucesso da regeneração local.

A incorporação de agentes capazes de controlar e, até mesmo, extinguir a população de contaminantes locais, assim como o processo inflamatório durante e após a cirurgia é desejável para o sucesso da regeneração. A liberação de fármacos de maneira controlada ou sustentada com o intuito de eliminar a infecção por bactérias, por exemplo, torna-se um fator vantajoso comparado à administração sistêmica de antibióticos (BOATENG *et al.*, 2008; LIMA, 2012), dado que aproximadamente 400 espécies de microrganismos podem ser encontradas na

cavidade oral. Dentre elas, cerca de 10 espécies estão ligadas às doenças periodontais, o que as tornam alvos para a aplicação de drogas específicas (JARDIM *et al.*, 2010; LINDHE, 2010). Estas drogas podem ser incorporadas nas membranas em concentrações capazes de eliminar os microrganismos e evitar o agravamento da doença, permitindo que os tecidos adjacentes sejam recuperados.

A doxiciclina é um dos fármacos frequentemente utilizados no tratamento da periodontite. Seu amplo espectro de atuação faz com que este antibiótico seja um dos mais utilizados para este fim. Sua eficácia se dá pela inibição da síntese proteica, sendo que este fármaco atua em microrganismos gram-negativos, gram-positivos e em microrganismos anaeróbicos facultativos (SLOTS e RAMS, 1990; GOODSON, 1994; EICK e PFISTER, 2004). Além da inibição na síntese proteica, a doxiciclina é capaz de inibir a ação de enzimas, como a colagenase liberada por microrganismos, que atua destruindo os tecidos adjacentes e pode agravar a regeneração óssea (CAETANO, 2005; GOLUB *et al.*, 1997; SORSA *et al.*, 2015).

A terapia avançada, ou seja, a incorporação de fatores ou células-tronco aderidas em associação a biomateriais pode ser uma alternativa tanto para a regeneração do local, quanto pela sua capacidade de controlar os eventos adversos que ocorrem na região. Em estudos realizados com células-tronco mesenquimais em camundongos, verificou-se que estas células são capazes de secretar fatores anti-inflamatórios, através de vesículas extracelulares, capazes de diminuir a progressão de osteoartrite (COSENZA *et al.*, 2017). Em outros estudos, verificou-se subpopulações com funções específicas de imunomodulação e homeostase óssea (JAMES *et al.*, 2015) que podem contribuir na regeneração óssea.

As células-tronco mesenquimais da polpa do dente, devido à sua origem e facilidade de coleta, serão utilizadas com o intuito de imunomodular o processo inflamatório ocasionado pelas doenças periodontais, assim como auxiliar na regeneração óssea local. O potencial destas células em se transformar em osteoblastos, tecidos e estruturas dentais como dentina e seu complexo pulpar, corroboram para a utilização destas células no trabalho proposto (SAITO *et al.*, 2015). Destaca-se, ainda, o alto custo dos biomateriais aplicados na área odontológica, particularmente daqueles que apresentam bioatividade de estimulação da regeneração tecidual.

Tendo por base o acima exposto e que a combinação de barreiras biológicas de quitosana com vidros bioativos vem sendo estrategicamente desenvolvida para o tratamento de doenças periodontais, resultando em maior viabilidade de células-tronco mesenquimais, quando comparada, por exemplo, às membranas de quitosana somente (MOTA *et al.*, 2012), explicita-se que o problema a ser focado no presente trabalho refere-se justamente a uma lacuna neste

sentido. Será estudada, portanto, a incorporação de hidroxiapatita em matrizes densas constituídas de quitosana e xantana preparadas na presença ou ausência do antibiótico doxiciclina, com a finalidade de aplicação na regeneração do tecido periodontal.

1.2 Objetivo

O objetivo principal deste trabalho foi a produção de uma membrana compósita polímero-cerâmica incorporando o antibiótico doxiciclina, buscando atender as necessidades relatadas por profissionais da área médica-odontológica, visando a aplicação em lesões periodontais.

Dentre os objetivos específicos deste trabalho, destacam-se:

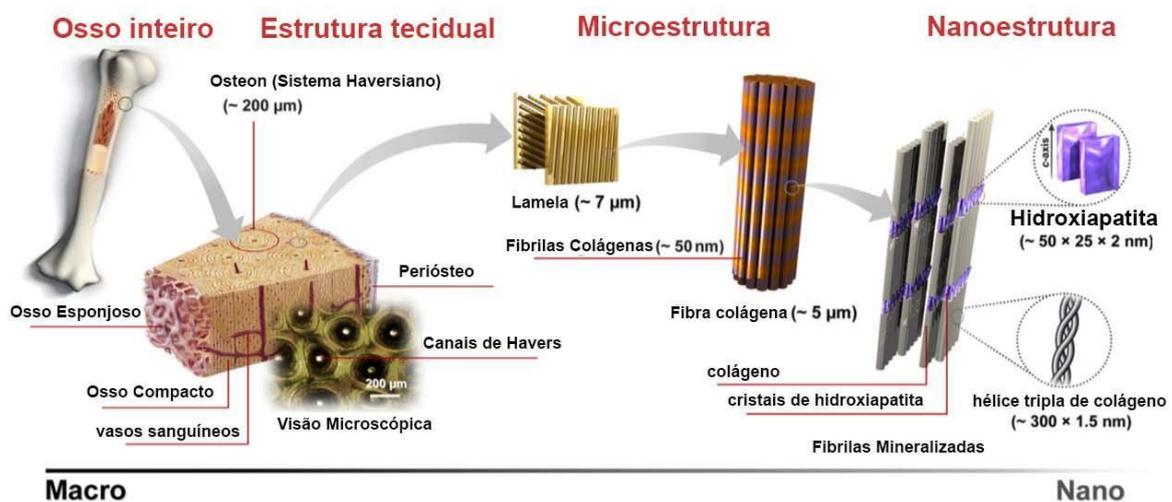
1. Determinar se é possível a incorporação de diferentes concentrações de hidroxiapatita, sem a modificação de sua fase, em membranas compostas de quitosana e xantana;
2. Avaliar as características mecânicas e físico-químicas das membranas produzidas;
3. Avaliar qual ou quais formulações apresentam comportamento adequado frente à adesão e proliferação de células-tronco nas membranas;
4. Analisar a eficácia *in vitro* das membranas intumescidas com doxiciclina, utilizando microrganismos presentes na cavidade oral e tipicamente envolvidos na periodontite, para verificar se a concentração de doxiciclina liberada no meio é suficiente para inibir seu crescimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecido ósseo

A compreensão do tecido ósseo se faz necessária para o desenvolvimento e a aplicação de estratégias em regeneração tecidual ocasionadas por doenças periodontais. O tecido ósseo tem como principal função a proteção e sustentação dos nossos órgãos e de nosso corpo. Devido à presença de sais em sua matriz, acaba se tornando um tecido rígido, porém com diferentes densidades em distintas regiões do osso, dependendo de sua função biológica. Os biominerais e, principalmente, a hidroxiapatita representam a maior parte constituinte de um tecido ósseo (DEIDRE *et al.*, 2006; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). O tecido ósseo também é formado de outro componente majoritário, o colágeno. Este possui, mecanicamente, a função de conferir propriedades elásticas ao tecido ósseo e suas moléculas estão dispostas em fibras helicoidais, como pode ser observado na Figura 2.1 (MEHDI *et al.*, 2013).

Figura 2.1 – Visão esquemática macroscópica a nanométrica da estrutura óssea (adaptada de MEHDI *et al.*, 2013).



O tecido ósseo, dependendo de sua região, é vascularizado e apresenta diferentes tipos de células ósseas. Basicamente, estas células realizam o depósito de componentes minerais (como os fosfatos de cálcio) e orgânicos (como o colágeno) na matriz, além de controlar este depósito pela reabsorção da matriz (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). As células ósseas incluem os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e as células de revestimento. Enquanto os osteoblastos são as células responsáveis pela produção e mineralização da matriz óssea, os osteoclastos se

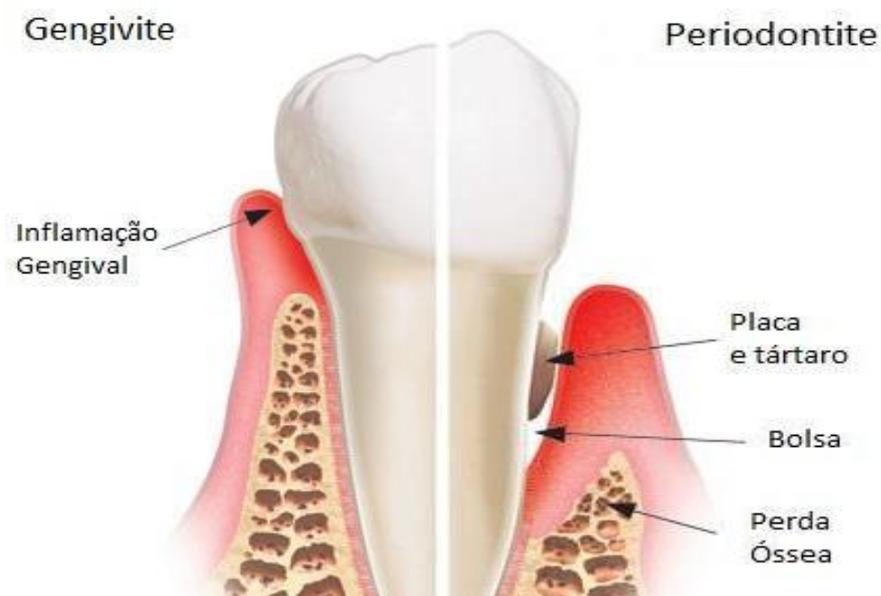
responsabilizam pela manutenção da matriz óssea, induzindo sua reabsorção. Osteócitos são os osteoblastos aprisionados dentro da matriz óssea e reconhecidos como os grandes orquestradores da atividade mineral esquelética, sendo capazes de detectar e integrar sinais mecânicos e químicos para regular a formação e a reabsorção óssea (HAM e CORMACK, 1979; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

No caso de lesões periodontais, além de tecidos ósseos, há também o envolvimento dos tecidos moles circundantes, que devem ser então avaliados como um todo para o sucesso da terapia.

2.2 Diagnóstico, prevalência e controle da doença periodontal

O periodonto é um tecido conjuntivo que envolve todo o elemento dentário e a sua principal função é fixar o elemento dentário ao tecido ósseo. O periodonto é composto por quatro tecidos: a gengiva, que é classificada como o periodonto de proteção; o ligamento periodontal; o cemento e osso alveolar, que constituem o periodonto de sustentação ou inserção (NEWMAN *et al.*, 2012). Enquanto a gengivite é caracterizada pela inflamação do periodonto de proteção, a periodontite é uma doença causada pela inflamação do periodonto de inserção. A etiologia da doença periodontal é geralmente microbiana, mas pode também ser associada a causas hormonais e genéticas, sendo caracterizada pela destruição do tecido periodontal, sendo que sua evolução pode resultar na absorção do osso alveolar e, conseqüentemente, na perda do elemento dentário (Figura 2.2) (LINDHE, 2010).

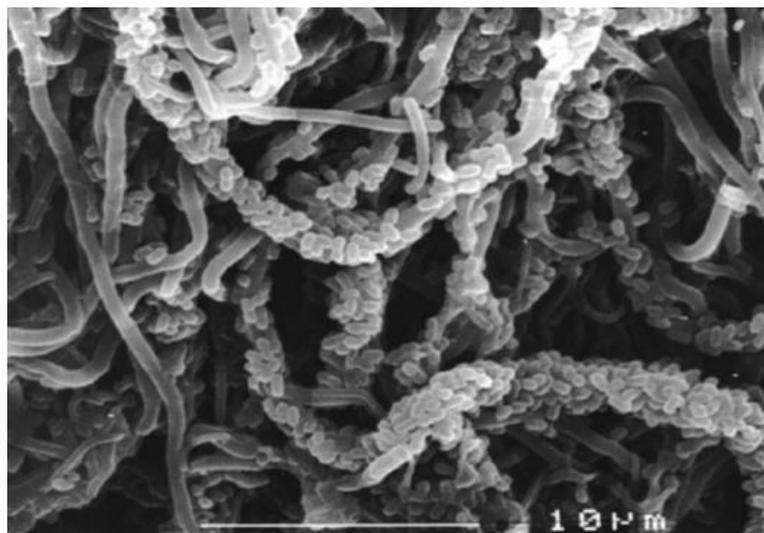
Figura 2.2 – Diferença entre gengivite e periodontite (adaptada de WEINGAERTNER, 2015).



Muitos estudos indicam que a perda do elemento dentário ocorre por mecanismos de defesa do corpo frente à inflamação e infecção relacionados às doenças periodontais. Em resposta aos microrganismos ali presentes, o sistema de defesa do corpo produz uma série de fatores de modulação inflamatória, como o interferon gama (IFN- γ), que resulta em migração de células para a área lesionada. Clinicamente, a gengivite é diagnosticada pela presença de placa bacteriana, bem como por sinais de edema, eritema e sangramento do periodonto de proteção. Além dos sinais da gengivite, na periodontite observa-se perda da inserção conjuntiva, ocasionando um aumento da bolsa periodontal, e a perda óssea alveolar (MEYLE e CHAPPLE, 2015).

Muitos fatores podem ocasionar ou desencadear uma doença periodontal e, conseqüentemente, a perda do elemento dentário. Estes fatores podem variar tanto em relação aos fatores externos ao indivíduo, quanto aos fatores internos, tais como doenças genéticas e alterações hormonais (ALJEHANI, 2014). Dentre os fatores externos, os quais podem ser tratados, a infecção por microrganismos é um importante fator a ser considerado. PASTER *et al.* (2006) estudaram o sequenciamento do material genético dos microrganismos presentes na cavidade oral e identificaram mais de 400 espécies. Dentre elas, algumas espécies encontradas no espaço biológico periodontal podem ser diferenciadas por sua morfologia, conforme exemplificado na Figura 2.3. Neste estudo, notou-se prevalência de células Gram negativas.

Figura 2.3 – Ilustração da presença de diferentes espécies de microrganismos encontradas na cavidade oral (PASTER *et al.*, 2006).



Em um estudo semelhante, realizado no Brasil, foram analisadas amostras de pacientes com periodontite agressiva generalizada (FAVERI, 2008). Os resultados apontaram 110

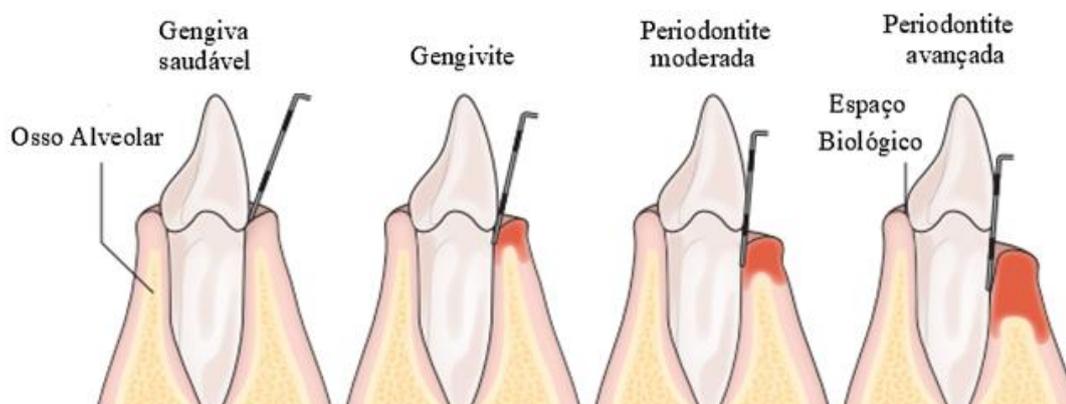
espécies de microrganismos, sendo que cerca de 70 destas eram mais comumente encontradas. Neste estudo, observou-se que a espécie Gram negativa *Selenomonas sputigena* teve maior prevalência em relação a outras espécies. Um estudo correlato realizado por Sassone *et al.* (2008), mas enfocando infecções endodônticas, aponta a presença de outras espécies de microrganismo em amostras de tecidos infectados, como *Fusobacterium nucleatum sp. vincentii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Campylobacter gracilis* e *Neisseria mucosa*. À medida em que a gravidade e a profundidade da lesão da infecção avançam localmente, os tipos de microrganismo podem variar.

Em 2003, o Ministério da Saúde (BRASIL, Saúde Bucal, 2003) criou o programa Brasil Sorridente, que verifica as condições de Saúde Bucal da população. Através deste programa foi realizado um levantamento para traçar ações para o plano político de saúde bucal da população. As doenças periodontais e suas complicações são indicadores importantes para a continuidade e medida de eficácia das ações implementadas. A evolução da doença periodontal é investigada através da inserção de uma sonda periodontal no espaço entre o dente e a gengiva, denominado de espaço biológico. O grau da doença periodontal é caracterizado pela profundidade de inserção da sonda periodontal, a qual possui uma graduação de profundidade medida tendo por referência a região amelo-cementária do dente. A partir desses valores, o Índice Periodontal Comunitário (IPC) é gerado (BRASIL, Saúde Bucal, 2010). Enquanto os graus mais leves, que estão entre 1 e 3, não precisam de um tratamento cirúrgico, o grau 4 indica que houve perda óssea significativa, ocasionando instabilidade/mobilidade do elemento dentário no alvéolo e a necessidade de tratamento cirúrgico, conforme indicado na Figura 2.4 (KIRCH, 2008).

Um estudo realizado pelo Ministério da Saúde, em 2010, avaliou grupos de indivíduos da faixa etária entre 12 e 74 anos, verificando que 90,1% dos idosos na faixa de 65 a 74 anos apresentaram perda de algum elemento dentário, por inflamação ou infecção, consequência da incidência de doenças periodontais ao longo da vida (BRASIL, Saúde Bucal, 2010).

Estudos indicam que o uso de prótese dentária pode passar de 40% na faixa etária de 35 a 44 anos (BRASIL, Saúde Bucal, 2010). Isto se dá em razão de que, geralmente, quando o paciente busca o serviço odontológico, a situação da lesão já se mostra grave, de forma que são necessárias medidas de caráter invasivo para buscar solucionar o problema. No caso de uma intervenção cirúrgica, a utilização de biomateriais (enxerto ósseo e/ou barreiras biológicas) em conjunto com a técnica de regeneração óssea guiada se faz necessária para o reparo do tecido ósseo perdido e, até mesmo para a instalação do implante dentário que irá substituir o elemento dentário ausente.

Figura 2.4 – Evolução da gravidade de doença periodontal verificada pela profundidade de penetração da sonda periodontal (adaptada de KINANE, STATHOPOULOU e PAPAPANOU 2017).



Alguns dos métodos utilizados são: tratamento a laser (ALAIJAH *et al.*, 2017), cirurgia de enxerto gengival (BHARDWAJ *et al.*, 2018), aumento de coroa clínica (o qual se caracteriza pela retirada de uma pequena parte do tecido da gengiva para recuperação do espaço biológico) (PERSCHBACHE, 2018), procedimentos de redução da bolsa periodontal (a qual também é ocasionada pela perda óssea e aumenta o espaço biológico) (GRAZIANI *et al.*, 2018) e a instalação de implantes dentários (MILLS *et al.*, 2018).

Existe uma estreita relação entre regeneração tecidual guiada (RTG) e regeneração óssea guiada (ROG). A técnica de regeneração guiada começou a ser desenvolvida no meio odontológico para recuperar de tecidos de suporte e do osso alveolar. A RTG visa manter a integridade de elementos dentários, com base nos tecidos que os compõem, afetados por doenças periodontais, que ocasionam a perda do tecido periodontal de inserção pela infiltração e, posteriormente, infecção por microrganismos agressivos presentes.

A utilização da membrana como uma barreira biológica capaz de orientar a reconstrução/regeneração do periodonto de inserção pode corrigir o defeito periodontal e regenerar o tecido ósseo alveolar (NYMAN *et al.*, 1982b). A ROG, possui, dentre outros, o objetivo principal de manter e reconstruir o osso alveolar, após a perda óssea por peri-implantite e pós extração dentária (NYMAN *et al.*, 1982a; GOTTLow *et al.*, 1984). A Figura 2.5 mostra um exemplo da utilização de uma membrana para regeneração tecidual guiada sem a perda do elemento dentário. Neste caso, a membrana funciona como uma barreira para os tecidos adjacentes e permite a recuperação do tecido ósseo e do tecido periodontal.

Para a ROG, quando na instalação de um implante dentário, faz-se necessária a recuperação do alvéolo para a ancoragem do implante e restabelecimento da função mastigatória. Infelizmente, o inadequado crescimento de tecido epitelial e a migração de fibroblastos, devido a fatores de inflamação na região da lesão, fazem com que este tecido periodontal não se regenere e acabe formando um tecido fibroso (WIKESJÖ e SELVIG, 1999; CLARK, 1996). As membranas, atuando como barreira biológicas, impedem esta migração e direcionam o crescimento de tecido ósseo, como apresentado na Figura 2.6 (NYMAN *et al.*, 1982b; GOTTLow *et al.*, 1984).

Figura 2.5 – Utilização de membrana em Regeneração Tecidual Guiada (SAINT LUKE'S HEALTH SYSTEM, 2017).

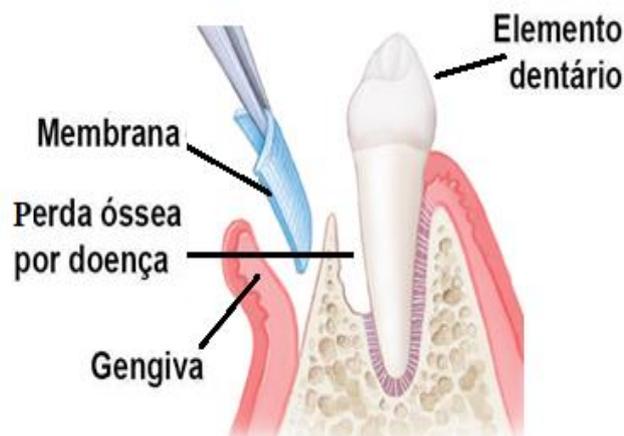


Figura 2.6 – Exemplo de utilização de um tipo de membrana de colágeno comercial (MATRIXDERM®) em regeneração óssea guiada (adaptada de COLLAGEN MATRIX INC. 2017).



A utilização de biomateriais na regeneração de tecidos pode ser aplicada em muitos casos. Com frequência, novos biomateriais surgem com o objetivo de auxiliar as técnicas desenvolvidas ou mesmo como resultado de novas abordagens terapêuticas, visando, por exemplo, acelerar o processo de regeneração, conforme discutido a seguir.

2.3 Biomateriais

Os biomateriais podem ser definidos de diferentes maneiras como, por exemplo, todo material implantável, dérmico ou intradérmico, capaz ou não de liberar substâncias ativas. São também classificados como biomateriais os usados de forma extracorpórea, desde que entrem em contato com algum tipo de fluido biológico. Estes biomateriais podem se apresentar na forma de sólidos, géis, pastas ou líquidos. Quanto à origem, podem ser sintéticos ou naturais. Quanto aos tipos, podem ser classificados em metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015).

O avanço na tecnologia de produção destes biomateriais vem crescendo e ganhando relevância econômica nas últimas décadas. Em nível mundial, o mercado de consumíveis odontológicos deve alcançar mais de 35 bilhões de dólares nos diferentes segmentos de aplicação deste mercado até 2021, com uma taxa de crescimento estimado de 3,3 bilhões de dólares por ano (MARKETS AND MARKETS, 2016). No setor odontológico, considerando as importações em 2018 no Brasil, foram movimentados mais de 22 milhões de dólares entre membranas para regeneração óssea e produtos para enxertia óssea (COMEXSTAT, 2018).

Com a evolução dos biomateriais, as técnicas clínicas para sua utilização vêm sendo também aperfeiçoadas. Estas técnicas estão sendo beneficiadas em vários sentidos como, por exemplo, a não necessidade de uma segunda cirurgia para a remoção de materiais reabsorvíveis e a liberação de moléculas bioativas (HUNG *et al.*, 2010; SPILLER e VUNJAK-NOVAKOVIC, 2013). As técnicas de regeneração tecidual se utilizam destes biomateriais e, desde a década de 80, vêm apresentando bons resultados, principalmente, em se tratando de barreiras biológicas para regeneração óssea.

2.3.1 A evolução das barreiras biológicas

Com os experimentos de Nyman (1982a, b), Gottlow e colaboradores (1984), as membranas para utilização em regeneração tecidual ganharam destaque, principalmente no meio odontológico. Desde então, alguns critérios foram estabelecidos para que estas membranas fossem seguras para utilização em RTG. Portanto, no projeto destes biomateriais,

estes critérios podem ser utilizados para o estabelecimento de atributos a serem atendidos.

A biocompatibilidade do biomaterial é um atributo essencial. O biomaterial não pode ter características tóxicas, não pode ser imunogênico, ou seja, não deve provocar reações imunológicas no organismo e não deve acarretar resposta inflamatória, visto que esta pode ativar alguns mecanismos de absorção do osso alveolar (GOTTLOW, 1993). O biomaterial deve ainda possuir dimensões específicas para servir como barreira para as células indesejáveis e simultaneamente manter o espaço apropriado para a recuperação do osso e ligamento periodontal. O formato das membranas também deve ser observado, pois deve facilitar o manuseio e corte quando na utilização clínica (SAM, 2014).

A princípio, a membrana biológica utilizada era composta por acetato de celulose. Nyman *et al.* (1982b) utilizaram um filtro bacteriano comercial como barreira biológica visando à técnica de regeneração tecidual. Estudos realizados posteriormente com politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) trouxeram também bons resultados (GOTTLOW, KARRING e NYMAN, 1990), porém estes biomateriais ainda requerem uma segunda cirurgia para sua remoção, pois não são reabsorvíveis e nem sofrem dissolução ao longo de seu uso. A evolução das membranas começou a surgir com o intuito justamente de se evitar uma segunda cirurgia para a retirada do biomaterial após a regeneração inicial do local.

A segunda geração de membranas refere-se, portanto, às reabsorvíveis. Nesta geração, existem ainda duas categorias de membranas: as naturais, produzidas a partir de materiais de origem animal ou vegetal, e as sintéticas, que utilizam produtos produzidos a partir de ésteres e ácido lático (SAM, 2014). Dentre as membranas de origem sintética para aplicação na área médica aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration), órgão responsável pela aprovação de produtos para a saúde nos EUA, encontram-se os derivados de poli α -hidróxi ésteres. Neste sentido, Westin, (2016), por exemplo, obteve bons resultados na utilização de PCL (poli- ϵ -caprolactona) para o cultivo de células-tronco de origem dentária. Basicamente, as membranas classificadas como naturais encontradas no mercado são feitas de colágeno do tipo I de origem bovina, como a GenDerm (da empresa Baumer) e a Bio-Gide (da empresa Geistlich Pharma). Diversos profissionais da odontologia reportam bons resultados com o uso destas membranas, mas fatores negativos, como rápida reabsorção e crescimento de células indesejáveis, são frequentemente verificados (SCULEAN, NIKOLIDAKIS e SCHWARZ, 2008; SCHMIDMAIER *et al.*, 2006).

Com as constatações de contaminação por microrganismos e a compreensão dos mecanismos de regeneração envolvidos na recuperação dos tecidos, diversos estudos forma

realizados para atuar nestas frentes, surgindo assim as membranas de terceira geração. Estas membranas, além de funcionarem no direcionamento e crescimento do tecido, passaram a incorporar antibióticos, anti-inflamatórios e fatores de crescimento, tendo sido também alteradas sua porosidade e propriedades de superfície visando melhorar a adesão de determinadas células (HUNG *et al.*, 2010; LIAO *et al.*, 2005; RAJA *et al.*, 2009; BELLINI *et al.*, 2012; WESTIN, 2016).

Diversos métodos ou estratégias para a produção destes biomateriais podem ser combinados, como as baseadas em evaporação de solventes em um molde (*casting*) e sua sublimação (liofilização). Técnicas que exploram a obtenção de matrizes com múltiplas camadas subsequentes (métodos *layer-by-layer*) e a produção de membranas por eletrofiliação também são outras frentes de trabalho (LIAO *et al.*, 2005; TRINCA *et al.*, 2015). A produção de biomateriais pelo uso de matérias-primas capazes de formar complexos polieletrólitos, como a quitosana e a xantana, é um conceito inovador que vem sendo desenvolvido para ser utilizado na incorporação/encapsulação de vários tipos de agentes bioativos, como fármacos, proteínas, agentes indutores e, até mesmo, células-tronco mesenquimais (WESTIN, 2016). Por esta razão, este tema será explorado neste trabalho.

2.3.2 Complexos polieletrólitos formados por biopolímeros

Atualmente, diversos biopolímeros capazes de formar complexos polieletrólitos (PECs) são utilizados na confecção de biomateriais. A quitosana é o composto mais frequentemente empregado como molécula capaz de apresentar múltiplas cargas positivas, enquanto o alginato, a xantana e a pectina são frequentemente utilizados como biomoléculas capazes de assumir cargas negativas dependendo do pH do meio.

Na fase de produção do PEC, algumas estratégias são utilizadas para que estes polímeros realizem interações moleculares entre si. Seleciona-se um valor de pH geralmente intermediário ao pKa dos biopolímeros envolvidos, de forma que uma molécula esteja primordialmente positivamente carregada nesta condição e, a outra, negativamente, para favorecer a ocorrência de interações eletrostáticas entre ambas. A formação de complexos polieletrólitos acontece principalmente por interações iônicas, mas são também observadas ligações de hidrogênio e interações de van der Waals na estabilização dos complexos. Estes complexos geralmente não necessitam de reagentes adicionais (MENG *et al.*, 2010; HOFFMAN, 2002), mas caso seja desejável aumentar a estabilidade do complexo e a coesão da matriz, podem ser utilizados íons multivalentes (como o Ca^{2+}) e reagentes bifuncionais (como o glutaraldeído) para aumentar o

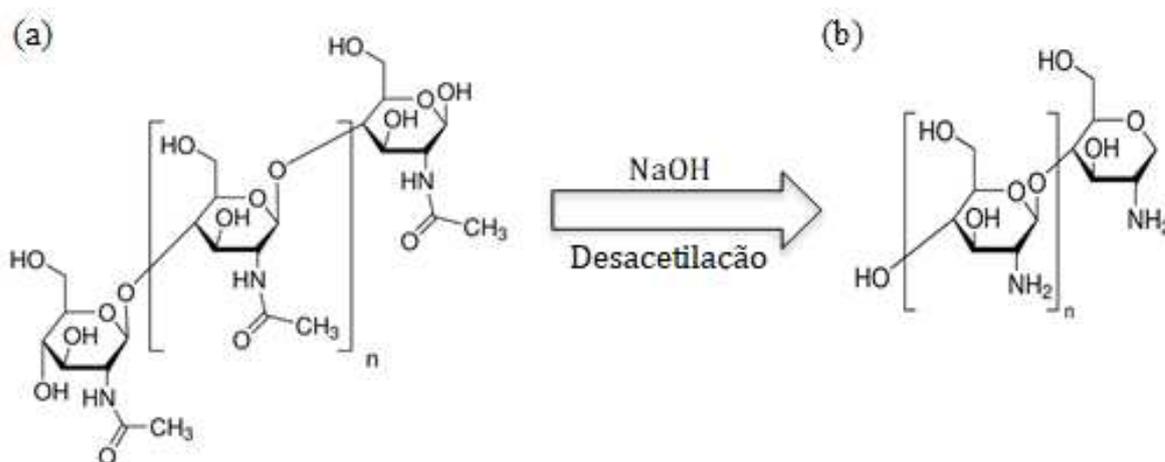
número de interações da matriz mista (LE *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Como os PECs de quitosana e xantana são alvo de estudo neste trabalho, estes biopolímeros serão discutidos a seguir.

2.3.2.1 Quitosana

A quitosana (Figura 2.7) é um biopolímero que pode ser obtido pelo processo de N-desacetilação, em meio alcalino, da quitina extraída do exoesqueleto de crustáceos e da parede celular de fungos. Após a reação de N-desacetilação, a quitina com frequência sofre apreciável redução de sua massa molar, por hidrólise. A quitosana possui uma coloração bege e aspecto granuloso, podendo ser dissolvida em soluções ácidas fracas como as de ácido acético a 2% (v/v) em água, na qual suas cargas protonadas estão propensas à formação de complexos polieletrólitos. Geralmente, é encontrada comercialmente com um percentual de desacetilação de 75%, o que pode alterar principalmente sua solubilidade (RAVI KUMAR, 2000).

Figura 2.7 – Processo de desacetilação da quitina (a) para a obtenção de quitosana (b) – (adaptada, SIGMA-ALDRICH).



A quitosana é considerada atóxica e biodegradável. Estudos de toxicidade indireta com células-tronco mesenquimais em cultura demonstraram sua não toxicidade *in vitro* (ANITHA, *et al.*, 2009). Sua biodegradabilidade é atribuída à ação da lisozima, que está presente em alguns fluidos biológicos, como a lágrima, e em tecidos, como a mucosa. Esta ação se dá pela hidrólise de ligações glicosídicas, como a N-acetil, presente na quitosana, demonstrada na Figura 2.7 (BELLINI *et al.*, 2012; WESTIN *et al.*, 2017). Atualmente, a quitosana também é muito utilizada em formulações cosméticas e na preparação de carreadores de fármacos e genes (ANCHISI, MELONI e MACCIONI, 2007; BOMBALDI de SOUZA, 2014; SHEN *et al.*,

2017).

A produção e os aspectos econômicos da quitosana são fatores que devem ser levados em consideração. Geralmente, a quitosana é oriunda de rejeitos da produção de camarões e de siris, sendo que estes rejeitos representam cerca de 30 a 40 % da massa dos crustáceos. Entre 2005 e 2015 o setor brasileiro de aquicultura cresceu 123%. Na carcinicultura, ou seja, a criação de crustáceos como, por exemplo, o camarão, representa cerca de 12% deste total com uma produção de 3 mil toneladas por ano (EMBRAPA, 2016). Nos últimos 10 anos, a importação de quitosana no Brasil somou mais de 6 milhões de dólares, o que pode ser modificado pela produção nacional do produto decorrente da tecnologia já executada e da capacidade produtiva da quitosana (COMEXSTAT, 2018). Entretanto, no Brasil, os investimentos e esforços nessa área em escala industrial não estão ainda bem consolidados.

O custo com a matéria-prima utilizada na produção de biomateriais de quitosana para a área de engenharia de tecidos é relativamente baixo. Atualmente, o custo do produto para a área de pesquisa, com um grau de desacetilação de 75%, chega a R\$ 9,24 para cada grama (SIGMA-ALDRICH, 2018). A concentração utilizada, normalmente, de 1% (m/v), traz resultados robustos e consistentes (BELLINI *et al.*, 2012; WESTIN *et al.*, 2017). Para fins de comparação, uma membrana de origem bovina para regeneração óssea com dimensões de 20 mm por 30 mm custa entre R\$ 119,0 a 216,00 (DENTAL CREMER, 2019), sendo que para a citada neste trabalho o custo da quitosana incorporada é de aproximadamente R\$ 6,50 para a produção de uma membrana de 110x110mm.

Na área odontológica, a quitosana pode ser utilizada como agente antimicrobiano, dependente de pH ácido e inibidor na formação de placas bacterianas, quando incorporado no creme dental. Busscher *et al.* (2008) realizaram um estudo das propriedades antimicrobianas da quitosana e a adesão de determinados microrganismos do gênero *Streptococcus*, um dos principais causadores da placa bacteriana, o que, conseqüentemente, leva às doenças periodontais, incorporada em um creme dental. Os resultados apresentados foram consideráveis, dada a diminuição da adesão e viabilidade destas células.

Por meio de uma pesquisa envolvendo a adição de quitosana na formulação de cremes dentários, foi verificado que houve uma diminuição na abrasão dos dentes com significativa redução da perda mineral dos elementos (CARVALHO e LUSSI, 2014). Dentre as diversas características na utilização deste polímero, a que mais se destaca é sua aplicação na área de saúde. Sua característica catiônica em pH abaixo de seu pKa (6,5), faz com que seja possível o uso de estratégias que propiciem sua combinação com polímeros aniônicos como, por exemplo,

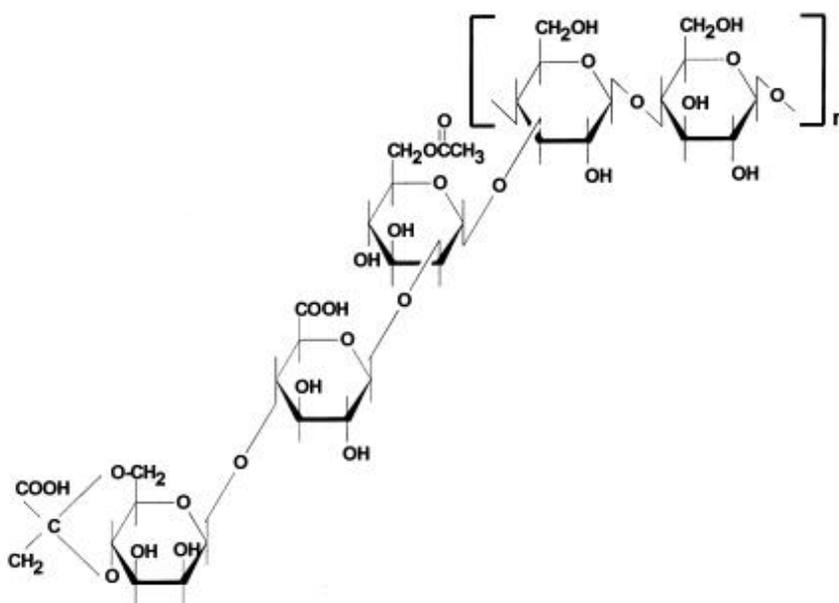
a xantana, de forma a produzir complexos polieletrólitos estáveis e passíveis de uso na ROG e na RTG, sendo uma alternativa ao uso de compostos de origem animal.

2.3.2.2 Goma xantana

A goma xantana é um biopolímero com ampla utilização por diversos tipos de indústrias, como as dos ramos farmacêutico e alimentício. É produzida por fermentação pela *Xanthomonas campestris*.

A estrutura química da xantana vem sendo explorada já há vários anos. Em 1975, Jansson, Kenne e Lindberg propuseram uma estrutura básica para a molécula de goma xantana, e em 1984, Kennedy e Bradshaw avaliaram diferentes percentagem de estruturas do polissacarídeo, de acordo com espécies diferentes do gênero *Xanthomonas ssp*. De caráter aniônico quando acima de seu pKa (igual a 2,9), esta molécula é composta por uma cadeia principal formada por duas unidades de β -D-glicopirranose ligadas na posição 1-4, e por cadeias laterais formadas por duas unidades de d-manose e uma unidade de ácido glicurônico (Figura 2.8).

Figura 2.8 – Estrutura química da goma xantana proposta por Jansson (JANSSON, KENNE e LINDBERG, 1975).



Em pH acima de seu pKa (em torno de 2,9), as carboxilas se ionizam, liberando prótons no meio e resultando na formação de múltiplas cargas negativas. A presença de grupos como o piruvato e o acetato nas porções terminais da manose são as responsáveis por atribuir a esta

molécula cargas, negativas, possibilitando, assim, à molécula interagir com compostos catiônicos, como a quitosana (WESTIN *et al.*, 2017; VEIGA e MORAES, 2012; BECKER, SCHLAAK e STRASDEIT, 2000).

Vários estudos de análise de toxicidade, irritações dérmicas e oculares mostraram que este polissacarídeo não apresenta nenhum tipo de reação adversa. A xantana tem aprovação do FDA como aditivo em alimentos (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000 apud KENEDY e BRADSHAW, 1984), sendo também empregada em vários outros segmentos industriais, como os de fármacos, cosméticos e têxteis, como exemplificado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Exemplos de aplicações da xantana (adaptado de Garcia Ochoa, 2000).

Aplicação	Concentração (% m/m)	Função
Alimentos congelados	0,05 a 0,2	Estabilizar o processo de congelamento e descongelamento
Indústria farmacêutica	0,1 a 1	Estabilizador de cremes e emulsões; Homogeneidade e melhor distribuição dos componentes em formas farmacêuticas específicas
Cosméticos	0,2 a 1	Espessante e estabilizador de shampoos e loções

Apesar de o Brasil ser um dos maiores produtores de cana de açúcar do mundo, sendo a glicose e o álcool utilizados, respectivamente, como substrato e solvente na purificação da xantana, o Brasil importa este polissacarídeo. O Brasil, desde 2008, importou mais de 49 milhões de toneladas de xantana, e gastou cerca de 219 milhões de dólares com esta movimentação (COMEXSTAT, 2018).

Recentemente alguns estudos foram realizados utilizando a xantana na liberação controlada de princípios ativos e na engenharia tecidual. Sua mucoadesividade e intumescimento em determinadas faixas de pH podem favorecer a liberação de fármacos em meio intestinal, oral e ocular (CEULEMANS, VINCKIER e LUDWIG, 2002; HOEPFNER, RENG e SCHMIDT, 2002; RUPENTHAL *et al.*, 2011; LUNGAN *et al.*, 2015). A formação de membranas ou compósitos com ou sem outros componentes na matriz, tornam a xantana uma potencial candidata para a engenharia tecidual em lesões orais. Kumar, Rao e Han (2017)

realizaram um trabalho de revisão, onde elencaram várias aplicações deste polímero na área de engenharia tecidual, conforme indicado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Exemplos de aplicações da xantana em engenharia tecidual (adaptado de KUMAR, RAO e HAN, 2017).

Formulação		Células ou tecido-alvo	Aplicação	Referências
Matriz do Polímero	Outros Componentes			
Xantana	IL - 1 β	Condrócitos	Cartilagem articular	Han <i>et al.</i> , 2012
Xantana	BSA e LYZ	Sem células	Curativo de feridas e tecidos da pele	Bueno e Petri, 2014
Xantana	n Hap	Sem células	Engenharia tecidual óssea	Izawa <i>et al.</i> , 2014
Xantana	SG, CNCs	Osteoblastos	Engenharia tecidual óssea	Kumar <i>et al.</i> , 2017
Xantana e quitosana	CHX	Fibroblastos	Periodontite crônica	Kim <i>et al.</i> , 2016

*IL - 1 β : Interleucina 1 β ; BSA: Albumina de soro bovino; LYZ: Lisozima; n Hap: Nano hidroxiapatita; SG: Vidro a base de sílica; CNC's: Nanocristais de celulose; CHX: Clorexidina

Pode-se notar que muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de melhorar os compostos utilizados e direcionar estes produtos para aplicações específicas. A formação de complexos polieletrólitos ganha destaque devido à facilidade no processo de obtenção do composto final e, particularmente, no que se refere a formulações à base de xantana complexada à quitosana, que dispensam processos de reticulação primária ou secundária com outros compostos químicos. Sua utilização em regeneração óssea na cavidade oral pode se mostrar de extrema eficácia em função de sua não toxicidade e de sua mucoadesividade. Se a este complexo for incorporada hidroxiapatita, a funcionalidade do biomaterial resultante pode ser hipoteticamente aumentada, atribuindo-se a este complexo propriedades mecânicas e biológicas distintas dos originais, inclusive favorecendo seu caráter biomimético no que tange

à aplicação desejada. Este composto é comumente empregado na composição de biomateriais aplicados à regeneração de tecidos ósseos e será discutido a seguir.

2.3.3 Hidroxiapatita

A família das cerâmicas bioativas é constituída pelos fosfatos de cálcio, vitro-cerâmicas e vidros bioativos. A grande atração por esses materiais é devida à sua propriedade de se ligar quimicamente ao tecido ósseo, definida como bioatividade, e otimizar a resposta biológica na interface biomaterial-tecido ósseo (LEGEROS, 2008). A maioria dos materiais cerâmicos, metais e polímeros biocompatíveis não é bioativa, ou seja, não possui a capacidade de se ligar ao tecido ósseo. A resposta tecidual frente a esses materiais é tipicamente a formação de uma cápsula de tecido fibroso na interface com o biomaterial, sendo que a espessura desse tecido está inversamente relacionada ao grau de biocompatibilidade do material (HENCH; POLAK, 2002).

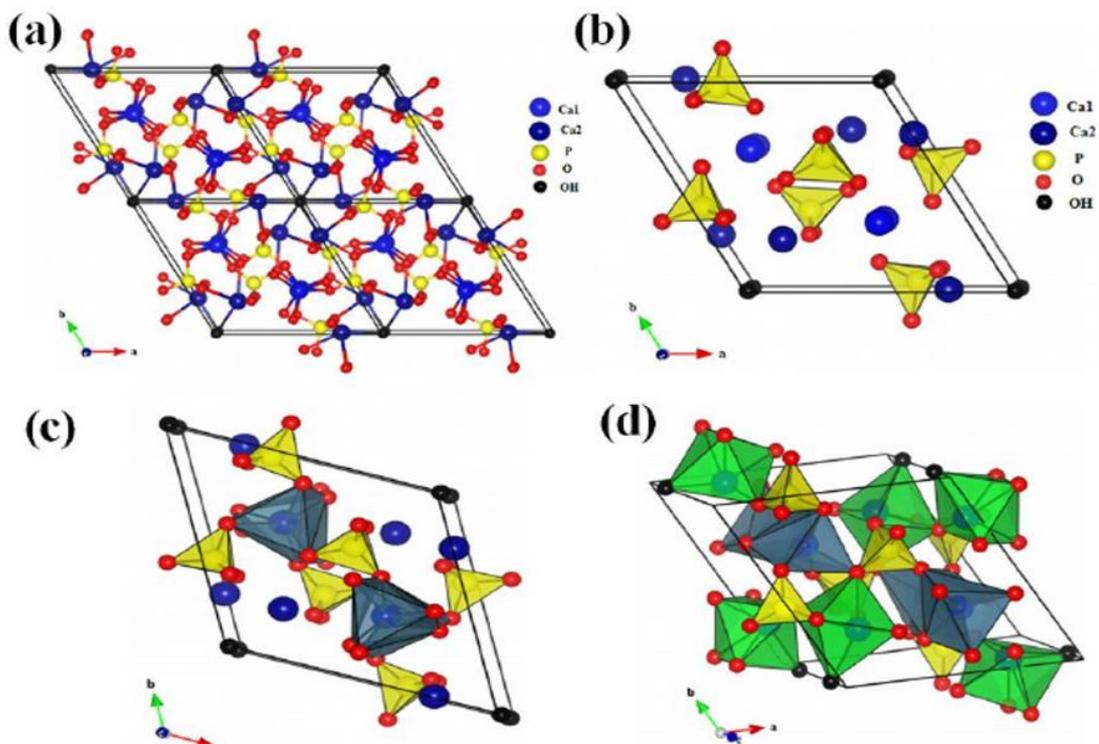
De acordo com as análises químicas e cristalográficas, os fosfatos de cálcio são materiais cristalinos com composição química semelhante à fase mineral do osso (LEGEROS, 2008; DOROZHKIN, 2010). Dentre os fosfatos de cálcio, que se apresentam com variadas razões Ca/P, o de maior interesse e mais explorado para aplicações na área médica é a hidroxiapatita (HA), muito utilizada como enxerto ósseo na forma de grânulos e arcabouços porosos, bem como no recobrimento de implantes metálicos (DOROZHKIN, 2010; NAVARRO DA OCHA *et.al.*, 2017). Estudos indicam que a resistência à fratura na interface entre um material bioativo e o osso pode atingir valores de 15 a 25 MPa, muito superiores à faixa de 0,5 a 2 MPa comumente observada para materiais inertes, como o titânio metálico sem tratamento de superfície (HENCH; ANDERSSON, 1993).

A HA possui uma estrutura cristalina hexagonal e fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Figura 2.9). Portanto, a célula unitária da hidroxiapatita possui 10 íons Ca^{2+} e uma razão molar Ca/P igual a 1,67. Normalmente, o desvio da razão Ca/P para valores abaixo de 1,67 desestabiliza a estrutura cristalina e aumenta a taxa de dissolução/reabsorção do material em meio fisiológico. Assim, a HA com deficiência em íons cálcio se apresenta ligeiramente mais bioativa do que a HA estequiométrica. A maior bioatividade está relacionada à maior dissolução superficial da HA deficiente em cálcio, aumentando a concentração iônica dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} na interface HA-tecido. Estes íons são conhecidos por participarem efetivamente das vias de ativação das células ósseas (DOROZHKIN, 2010).

A síntese dos fosfatos de cálcio pode ser realizada por reações no estado sólido,

precipitação em meio aquoso e vários outros métodos que podem ser empregados para a preparação do pó com morfologia, estequiometria e grau de cristalinidade adequadas para aplicações específicas.

Figura 2.9 – Representação esquemática da estrutura cristalina da hidroxiapatita: (a) projeção da célula unitária da HA de acordo com o plano (001); (b) projeção mostrando o arranjo de octaedros $[\text{Ca}(1)\text{O}_6]$; (c) e (d) projeções indicando as sequências de $[\text{Ca}(1)\text{O}_6]$ octaédricos e de $[\text{PO}_4^-]$ tetraédricos na estrutura da HA (adaptada de FIHRI *et al.*, 2017)



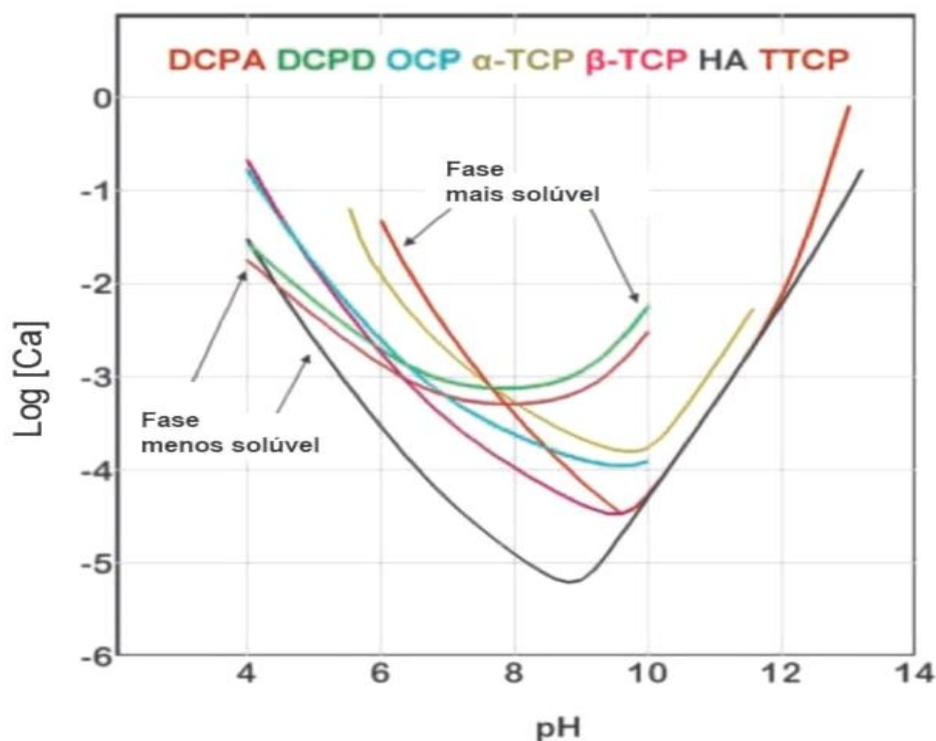
Diversos estudos indicam que as reações no estado sólido produzem HA estequiométrica. Normalmente, este método consiste na homogeneização mecanoquímica dos compostos precursores, em uma razão molar Ca/P igual a 1,67, seguida de tratamento térmico em altas temperaturas, entre 900 e 1100 °C. Entretanto, além de envolver alta temperatura e longo tempo de reação, o método do estado sólido não favorece a produção de partículas nanométricas uniformes (MEHDI *et al.*, 2013).

A técnica mais popular e amplamente pesquisada para a síntese de hidroxiapatita é a da precipitação em meio aquoso, também conhecida como precipitação úmida, química ou aquosa (MEHDI *et al.*, 2013). Este método tem como grande vantagem a possibilidade de sintetizar quantidades relativamente altas do material desejado na ausência de solventes orgânicos. Os métodos de precipitação em meio aquoso incluem a reação entre uma solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e

outra de H_3PO_4 , ocorrendo a precipitação da hidroxiapatita formada pelos sais de cálcio e fosfato.

Os parâmetros importantes para a precipitação em meio aquoso são o pH, a temperatura e o tempo de envelhecimento. As isoterms de solubilidade indicam que a HA é o fosfato de cálcio mais estável em solução aquosa a um pH superior a 4 na temperatura de 37 °C (Figura 2.10) (CHOW, 2009).

Figura 2.10 – Solubilidade dos fosfatos de cálcio e formação de diferentes fases de fosfatos de acordo com o pH (adaptada de CHOW, 2009).



*DCPA= fosfato dicálcico anidro; DCPD= fosfato dicálcico dihidratado; OCP= fosfato octacálcio; α -TCP= fosfato α tricálcio; β -TCP= fosfato β -tricálcio; HA= hidroxiapatita; TTCP= fosfato tetracálcio

A temperatura de síntese pode afetar a composição química, o grau de não-estequiometria e a cristalinidade da hidroxiapatita sintetizada. O grau de cristalinidade do material irá aumentar de acordo com o aumento da temperatura, assim como sua estabilidade química.

A importância do tempo de envelhecimento está relacionada ao processo de formação dos fosfatos de cálcio, seguindo a lei de Ostwald (CHOW, 2009). Primeiramente, uma fase de fosfato de cálcio amorfo precipitado irá, progressivamente, se converter em fases metaestáveis (fosfato de cálcio dihidratado ou octacálcico) e, finalmente, em hidroxiapatita. Como comentado anteriormente, em condições de pH fisiológico, a hidroxiapatita é a fase de fosfato

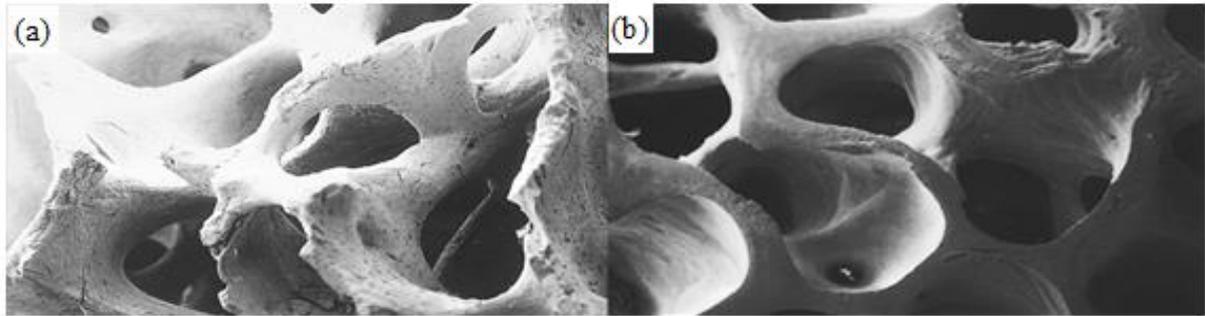
de cálcio mais estável.

Estudos indicam que tempo de envelhecimento prolongado e altas temperaturas favorecem a obtenção de hidroxiapatita estequiométrica, com razão molar Ca/P igual a 1,67, e altamente cristalina. Entretanto, menor tempo de duração de síntese à temperatura ambiente, utilizando reagentes concentrados, resultam em uma razão molar de Ca/P abaixo de 1,67 e em materiais com baixa cristalinidade. Nestas condições, a hidroxiapatita possui características similares às do tecido ósseo, diferentemente da hidroxiapatita sintetizada a altas temperaturas (MEHDI *et al.*, 2013).

A HA é muito utilizada na área odontológica e médica. Existem muitos produtos no mercado que fornecem a HA em grânulos, com a incorporação de β -TCP (trifosfato de cálcio) e até mesmo de colágeno. Estes produtos são utilizados na odontologia, para enxerto ósseo com o intuito de ancoragem em cirurgia para a colocação de implantes dentários. Dentre os produtos disponíveis destaca-se o Geistlich Bio-Oss[®], que é constituído de partículas em torno de 0,25 a 1 mm e apresenta porosidade semelhante à do osso humano, conforme mostrado na Figura 2.11.

Hipoteticamente, a adição de hidroxiapatita a, por exemplo, uma das faces de membranas de PECs de quitosana e xantana poderia agregar bioatividade ao material no que se refere ao acoplamento a tecidos ósseos. A funcionalidade deste biomaterial poderia ser ainda ampliada pela combinação do mesmo a células-tronco, e a combinação destas duas diferentes estratégias seria capaz de levar a tecnologia de produção de membranas à próxima geração. Considerando-se particularmente que o avanço de regulações e normas ligadas à saúde apontam para o uso de terapias avançadas em um futuro próximo, a utilização de células-tronco associadas a biomateriais para uso autólogo pode contribuir ainda mais para este avanço (BRASIL, RDC 214/2018). As células-tronco da polpa do dente, por possuírem potencial imunomodulatório, podem ser uma estratégia extremamente eficaz quando utilizadas juntamente com biomateriais para a terapia de lesões bucais, e por esta razão serão mais detalhadamente discutidas a seguir.

Figura 2.11 – Estrutura porosa do osso humano (a) comparada à de uma partícula de hidroxiapatita comercial Bio-Oss® (b) (GEISTLICH PHARMA, 2018).



2.4 Células-tronco mesenquimais do dente

A polpa do dente tem se mostrado uma das principais fontes na obtenção de células-tronco mesenquimais adultas. Sua obtenção é feita de maneira minimamente invasiva a partir de um elemento dentário durante o processo de reabsorção da raiz (Figura 2.12). Estas células possuem grande capacidade de multiplicação e diferenciação em diversos tecidos, fazendo com que muitas empresas e pesquisadores optem pelo seu armazenamento e estudo contínuo visando sua utilização em diferentes aplicações (BAKOPOULOU, *et al.* 2017; YANG *et al.*, 2017; RODAS-JUNCO e VILLICANÃ, 2017).

Figura 2.12 – Processo de reabsorção da raiz de um elemento dentário decíduo e erupção de um elemento permanente (adaptada de SoriDent®, Permanent Teeth, 2017).



De acordo com a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), as células-tronco mesenquimais são caracterizadas pela adesão ao plástico, por sua capacidade de se diferenciar em tecido adiposo, ósseo e cartilaginoso, por expressar os marcadores CD 105, CD 90 e CD 73, pela baixa expressão dos marcadores CD45, CD34, CD14 e por possuir morfologia fusiforme. (HORWITZ *et al.*, 2005; DOMINICI *et al.*, 2006).

A utilização destas células-tronco em diversas áreas da medicina regenerativa pode trazer uma nova abordagem junto às técnicas de regeneração tecidual guiada.

Estudos relacionados ao potencial de regeneração óssea utilizando células da polpa do dente evidenciam sua capacidade em realizar o depósito de cálcio na matriz extracelular. Seo *et al.* (2008) associaram células-tronco da polpa do dente decíduo a grânulos de hidroxiapatita em um defeito crítico na calvária de camundongos imunossuprimidos. Ao final do estudo, estas células-tronco foram capazes de induzir e formar osso no local.

Uma revisão da literatura foi realizada por Yun-Jong em 2015, com o intuito de verificar as aplicações clínicas das células oriundas da polpa do dente. Os autores apontaram um grande número de estudos referentes à regeneração estruturas do dente como a dentina, porém também foram apresentados artigos que abordaram sua utilização em regeneração de ossos, nervos, músculos, fígado e pâncreas.

Além do potencial em se diferenciar em outros tecidos, recentemente alguns estudos estão sendo realizados para verificar o potencial imunomodulatório de células-tronco mesenquimais. O controle do processo inflamatório pode consistir em uma estratégia atraente para a regeneração do tecido alveolar em casos de periodontite. Zhang *et al.* (2017) estudaram a inibição da diferenciação de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal em ambientes inflamatórios, devido à periodontite, através de regiões não codificantes de RNAs. Neste estudo foi verificado que o processo inflamatório no microambiente da periodontite inibe a diferenciação de células-tronco do ligamento periodontal em células ósseas. Outros estudos mostraram que as células-tronco mesenquimais podem inibir respostas imunológicas de linfócitos T, sendo assim utilizadas em doenças auto-imunes (AGGARWAL e PITTENGER, 2005; RASMUSSEN *et al.*, 2003). Yildirim *et al.* (2016) realizaram um estudo comparativo de células-tronco mesenquimais da cavidade oral, incluindo as células da polpa, e seu efeito imunomodulatório em linfócitos. Obtiveram como resultado a diminuição do número destes linfócitos e a diminuição da concentração de interleucina-4 (IL-4) e Interferon γ (IFN- γ), fatores estes responsáveis pela mediação da inflamação. A utilização de células da polpa do dente em pacientes com pulpite, ou seja, com inflamação na polpa do elemento dentário (que pode ser oriunda de uma periodontite), mostrou-se eficaz em um estudo clínico piloto no qual foram obtidos resultados seguros e eficientes na regeneração da polpa (NAKASHIMA *et al.*, 2017).

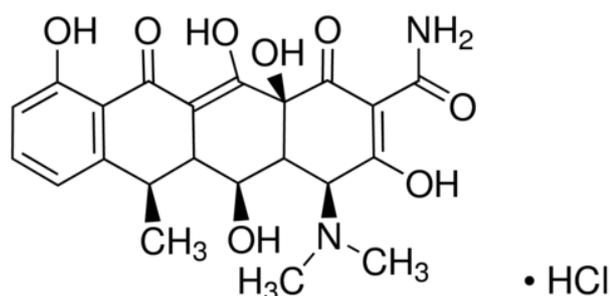
Além do processo inflamatório característico da periodontite e tendo em vista seus agentes etiológicos, como os microrganismos presentes no local, a liberação de compostos bioativos incorporados na matriz pode ser outra estratégia para que a regeneração ocorra de forma mais efetiva. Dentre os compostos bioativos de interesse para aplicação oral destaca-se o antibiótico doxiciclina, discutido a seguir.

2.5 Doxiciclina

Como mencionado anteriormente, a periodontite é uma doença de origem infecciosa, causada por microrganismos, que leva à inflamação e destruição dos tecidos adjacentes e absorção do osso alveolar. Muitos estudos apontam determinados microrganismos causadores da periodontite. Dentre os principais causadores tem-se *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Pophyromonas gingivalis*, *Bacteróides forsythus*, *Treponema denticola*, *Enterococcus faecalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Campylobacter gracilis* (SLOTS e RAMS, 1990; FAVERI, 2008; SASSONE *et al.*, 2008; HENDERSON, WARD e READY, 2010). Pesquisadores e profissionais da área odontológica estudam a utilização da antibioticoterapia sistêmica para o tratamento da periodontite. Dentre os fármacos considerados, a doxiciclina tem se mostrado de grande eficácia no tratamento da periodontite, sendo inclusive eficiente em pacientes portadores de diabetes (ANDRADE, 2013; MOZAFFARI, REZVAN e ASGARTOORAN, 2017).

A doxiciclina (Figura 2.13) é um antibiótico semissintético de amplo espectro pertencente ao grupo das tetraciclinas. Em sua forma de hiclato, possui massa molar de 1025,88 g/mol, pKa igual a 3,3 a 20 °C e ponto de fusão aproximado de 201 °C. É solúvel em água em uma proporção de 50 mg/mL, e pouco solúvel em etanol (PUBCHEM, 2018; SIGMA-ALDRICH, 2018).

Figura 2.13 – Estrutura química do hiclato de doxiciclina (ANVISA, 2010).



Seu mecanismo de ação se dá pela afinidade à subunidade 30S do ribossomo das células bacterianas. Esta subunidade é responsável por receber o RNA mensageiro (mRNA), o qual contém o código genético relacionado à síntese de proteínas. Esta afinidade causa o bloqueio da ligação de RNAs transportadores de aminoácido (tRNA) ao mRNA. O bloqueio desta via impede a ligação dos aminoácidos e, consequentemente, a formação de qualquer proteína das

células bacterianas (NIH, 2018a; ROMEU *et al.*, 2007; PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010).

Seu amplo espectro de ação faz com este antibiótico seja eficaz contra microrganismos gram-positivos, gram-negativos, *mycoplasma ssp.* e anaeróbios facultativos. Sua eficácia inclui os principais causadores de periodontite, como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter gracilis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* e *Fusobacterium nucleatum* (SLOTS e RAMS, 1990; GOODSON, 1994; EICK; PFISTER, 2004). Além de seu efeito sobre os microrganismos, este composto pode também inibir a ação de collagenases e enzimas de microrganismos presentes na cavidade oral de pacientes com periodontite. Estas enzimas podem causar a lise destes tecidos, agravando ainda mais o quadro de inflamação e regeneração local (CAETANO, 2005; GOLUB *et al.*, 1997; SORSA *et al.*, 2015).

Devido à sua lipofilicidade, possui grande absorção sistêmica e atinge grande concentração nos tecidos gengivais. Em um estudo realizado pelo laboratório farmacêutico Galderma nos USA envolvendo 190 pacientes adultos com doença periodontal, utilizando o PERIOSTAT® comprimidos via oral, contendo hiclato de doxiciclina a 20 mg, foi verificado um ganho dos tecidos adjacentes e diminuição da bolsa periodontal (COLLAGENEX PHARMACEUTICALS INC., 1998). A concentração de doxiciclina administrada sistemicamente pode chegar a 8,1 µg/mL nos tecidos gengivais, 4 vezes maior que sua concentração no plasma e 10 vezes maior quando comparada à da eritromicina. Na Tabela 2.3 são apresentadas as diferentes concentrações inibitórias mínimas (CIM, do termo em inglês *minimum inhibitory concentration*) de doxiciclina *in vitro* para microrganismos relevantes em quadros de periodontite (SLOTS e RAMS, 1990).

Eick e Pfister (2004) realizaram um estudo semelhante com algumas das principais cepas de microrganismos causadores de periodontite, observando algumas divergências nos dados em comparação ao estudo de Slots e Rams (1990). O *Actinobacillus actinomycetemcomitans* NTC 9710, apresentou uma concentração (CIM) de 0,125 µg/mL, concentração esta suficiente para também inibir o *Porphyromonas gingivalis*.

Comparando os resultados apresentados na revisão de literatura de Slots e Rams (1990) com a Tabela 2.4, pode se evidenciar certas discrepâncias nos resultados obtidos para o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Em ambos trabalhos não fica evidente a potência do antibiótico utilizado, ou seja, a capacidade ativa do fármaco, o que pode comprometer sua eficácia de atuação frente ao microrganismo. Na comparação dos estudos de Eick e Pfister (2004) e Orit *et al.* (2013), os resultados de 0,125 µg/mL e 0,21 µg/mL, respectivamente,

apresentam concordância, mesmo que para cepas distintas.

Tabela 2.3 – Concentração inibitória mínima (CIM) para inibição de microrganismos de comum ocorrência em periodontite (adaptado de Slots e Rams, 1990).

Microrganismo	CIM de doxiciclina (µg/mL)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	6
<i>Bacteroides gingivalis</i>	1
<i>Bacteroides oralis</i>	3
<i>Bacteroides intermedius</i>	3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2

Majoritariamente, os estudos abordados até o momento indicam o uso do antibiótico como uma terapia adjunta à raspagem do elemento dentário, com o objetivo de eliminar também o biofilme formado pelos microrganismos. Orit *et al.* (2013) estudaram a sensibilidade do microrganismo *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 700685, durante seu crescimento em biofilmes, à amoxicilina em combinação com metronidazol e também à doxiciclina isolada. Os resultados demonstraram que o microrganismo teste foi mais suscetível à doxiciclina. As concentrações de CIM e CIMB (concentrações inibitórias mínimas para células em suspensão e em biofilme, dos termos em inglês *minimum inhibitory concentration* e *minimum biofilm inhibitory concentration*, respectivamente) obtidas estão expressas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – CIM e CIMB dos antibióticos frente ao *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (adaptada de Orit *et al.*, 2013).

Antibiótico	CIM (µg/mL)	CIMB (µg/mL)
Doxiciclina	0,21	2,1
Amoxiciclina/ Metronidazol (1:1)	12,0	20,2

Estes estudos realizados *in vitro* e *in vivo* relatam resultados de grande relevância, comprovando a eficácia da doxiciclina frente aos microrganismos causadores da periodontite,

o que estimula a busca por melhores estratégias para sua administração. Akalin *et al.* (2004) realizaram um estudo com 45 pacientes com periodontite crônica. Estes pacientes foram tratados com doxiciclina sistêmica, administrada por via oral e também por aplicação local na lesão em forma de gel. Os resultados clínicos de análise de profundidade da lesão por sonda periodontal mostraram que a aplicação local da doxiciclina foi mais efetiva.

Lotufo *et al.* (2003) realizaram também uma revisão da literatura sobre a utilização da doxiciclina local e sistêmica. Dentre as vantagens da administração local, foi citada a alta concentração local, a redução dos efeitos colaterais, a ocorrência pouco frequente de interações com outros medicamentos e o menor risco de causar resistência bacteriana.

Atualmente, há no mercado um produto de aplicação local de doxiciclina denominado Atridox®. Um estudo clínico com duração de 9 meses com 831 pacientes com periodontite crônica foi realizado para verificação de sua eficácia. Foi observada alta concentração de doxiciclina na lesão ao final de 7 dias, assim como redução da profundidade de inserção da sonda periodontal (NIH, 2018b).

Como a administração local da doxiciclina tem se mostrado uma estratégia mais eficiente em comparação à sua utilização sistêmica, a incorporação deste antibiótico a membranas porosas de quitosana e xantana pode ser uma excelente estratégia para eliminação *in situ* de microrganismos, diminuição da profundidade de inserção das sondas periodontais e prevenção da ação de collagenases.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, descreve-se os materiais empregados, a síntese de hidroxiapatita, os métodos de produção das membranas de quitosana-xantana-hidroxiapatita e as técnicas e equipamentos utilizados na caracterização dos materiais.

3.1 Síntese de hidroxiapatita

O método de síntese adotado para a obtenção da hidroxiapatita segue a rota de precipitação em meio aquoso (adaptado de NAVARRO DA ROCHA *et al.*, 2013). Esse método envolve reações em solução aquosa entre os precursores do cálcio e fosfato, com controle da temperatura e pH fixados a 60°C e pH 12, respectivamente.

Primeiramente, foram preparadas variadas soluções para a síntese de hidroxiapatita, conforme descrito na Tabela 3.1, sob agitação (agitador magnético VELP, São Paulo, Brasil), empregando água ultrapura (Milli-Q Direct Q 8/16 System). Todo o processo foi realizado em reator Tecnal (modelo Tec – Bio – Flex).

Tabela 3.1 – Soluções precursoras utilizadas na produção da hidroxiapatita.

Nº Solução	Reagente	Fornecedor	Volume ou massa	Diluyente	Volume final (mL)
1	Ácido Lático	Synth	25 mL	H ₂ O	250
2	Hidróxido de Cálcio	Merck	9,64 g	H ₂ O	250
3	Ácido Fosfórico	Merck	5 mL	H ₂ O	250
4	Hidróxido de Potássio	Synth	20,00 g	H ₂ O	250

A solução nº. 1 foi adicionada à solução nº. 2 sob agitação, à temperatura de 25°C a uma vazão de 50 mL/min. Em seguida, a solução nº. 3 foi adicionada à mistura citada acima, a uma vazão de 8 mL/min. A solução precursora foi aquecida a uma temperatura de 60°C. Ao atingir esta temperatura, a solução nº. 4 foi então adicionada à mistura anterior na vazão de 50 mL/min e mantida nestas condições por 3 horas. Ao final, o precipitado foi filtrado com papel de filtro (Qualy, J.Prolab – 80 gramas, 18,5 cm), em sistema a vácuo (DVP, modelo ZA 60S) à 400 mbar. O pó retido foi lavado com água ultrapura para a retirada dos íons de potássio até que se

alcançasse o pH igual a 7 no líquido filtrado. O pó foi congelado em freezer (Analytical, modelo HOTA 20FL) por 24 horas à temperatura de -30°C e, posteriormente, foi liofilizado (Christ, modelo Alpha 1-2) por 48 horas sob vácuo inferior ou igual a 4 mbar. Ao final o pó foi macerado utilizando um gral e pistilo de ágata. O pó foi então transferido para uma peneira granulométrica (A bronzinox, com poro de $150\ \mu\text{m}$, malha de 100 e caixilho inox 5" x 2") e peneirado.

3.2 Produção das membranas de quitosana-xantana incorporando ou não hidroxiapatita

A produção das membranas foi realizada de acordo com o método descrito por Westin (2016), sendo preparados suportes densos na razão mássica de 1:1 de quitosana e xantana. A solução de quitosana a 1% m/v (Sigma-Aldrich, Cat. 448877, 83% de desacetilação), foi preparada em solução composta de 2% v/v de ácido acético glacial (Merck, Cat. 100631000) dissolvido em água ultrapura (Milli-Q Direct Q 8/16 System) e homogeneizada em agitador mecânico (Tecnal, impelidor náutico), com uma rotação de 1000 rpm até verificação de solução amarelada e homogênea. A xantana (Sigma, Cat. G1253) foi dissolvida a 1% m/v em água ultrapura (Milli-Q Direct Q 8/16 System) e homogeneizada em agitador mecânico (Tecnal, impelidor náutico), com uma rotação de 1000 rpm por cerca de 10 minutos, até a verificação da formação de uma solução opaca, esbranquiçada e homogênea. Em seguida, 250 mL de solução de quitosana foram adicionados a 250 mL de solução de xantana com o auxílio de uma bomba peristáltica (Tecnal) a uma taxa de 5 mL/min, temperatura de 25°C , sob agitação constante de 2000 rpm.

Quando requerido, a HA (em concentrações de 0,1, 1,0 e 5,0%) foi adicionada à solução de goma xantana a 1% (m/v) e esta foi misturada à solução de 1% (m/v) de quitosana, de acordo com as formulações apresentadas na Tabela 3.2. As concentrações utilizadas foram baseadas em resultados de testes preliminares. Concentrações acima de 5% de HA (m/v) resultaram em arcabouços não flexíveis apresentando separação de fases. Foram testadas faixas amplas de concentração de HA para facilitar a identificação dos efeitos deste composto nas propriedades das membranas.

Após a mistura, a solução permaneceu em agitação mecânica a 2000 rpm por 5 minutos. A solução apresentou aspecto leitoso e homogêneo, com coloração em intensidade de acordo com a concentração de hidroxiapatita incorporada. Posteriormente, ajustou-se a haste do agitador mecânico para que o impelidor náutico ficasse submerso 2 cm abaixo do menisco da solução, para melhorar a mistura. A solução permaneceu em agitação por 5 minutos e,

posteriormente, alíquotas de 70 mL das soluções foram distribuídas em placas de Petri de 150 x 15 mm² e secas por 5 dias em bancada, para formação do complexo polieletrólito eligação entre as moléculas, sob temperatura de 24°C e umidade de 59% (Incoterm, modelo: 7663.02.0.00).

Tabela 3.2 – Formulação das membranas com diferentes porcentagens de hidroxiapatita (HA). Massa de HA adicionada ao volume de 250 mL de solução de xantana a 1% (m/v) que foi misturada com 250 mL de solução de quitosana a 1% (m/v).

Formulação	HA (% m/v)	Massa de HA (g)
Q ₁ X ₁ HA ₀	0,0	0
Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	0,2	1,0
Q ₁ X ₁ HA ₁	1,0	5,0
Q ₁ X ₁ HA ₅	5,0	25,0

Após a secagem, as membranas foram imersas em 70 mL de uma solução contendo 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Dinâmica – Vod. 60READIN000797), por 24 horas, com o intuito de neutralização do ácido acético residual oriundo da solução de quitosana. Após este período, as membranas foram lavadas com 3 porções de 70 mL de água ultrapura e secas em estufa a 35° C por 24 horas.

As membranas utilizadas em ensaio de cultivo celular foram esterilizadas em uma mistura de gás composta de 30% de óxido de etileno e 70% de dióxido de carbono, com exposição por 8 horas, 40°C e umidade relativa de 30 a 80%. Este processo ocorreu aplicando vácuo por 15 minutos, com posterior entrada da mistura do gás até uma pressão de 0,5 kgf/cm². Ao término deste processo, as amostras foram aeradas por 10 min com ar filtrado.

3.3 Incorporação de doxiciclina às membranas

Posteriormente aos processos de preparo, lavagem, secagem e esterilização das membranas, foi realizada a adição de hclato de doxiciclina (Sigma-Aldrich, cod. D9891), dissolvida diretamente em meio caldo Mueller Hinton (Difco) ph 7.3, a uma concentração final de 100 µg/mL. A incorporação desta solução às membranas foi realizada por intumescimento das membranas preparadas e descritas no item 3.2.

As membranas foram cortadas por punção (*puncher* Ritcher, modelo trepano N6) em múltiplas amostras com 6 mm de diâmetro. Em seguida, 24 amostras de cada formulação, foram

imersas em 2 mL de solução composta de doxiciclina dissolvidas em caldo Mueller Hinton e incubadas a temperatura de 23 °C por 30 minutos. Na sequência, as amostras foram retiradas da solução e transferidas isoladamente para uma placa de Petri estéril de 90 mm de diâmetro para a remoção do excesso de solução de fármaco com papel de filtro estéril. Finalmente, as amostras das diferentes formulações das membranas foram transferidas para placas de 96 poços para os ensaios subsequentes, em quadruplicata.

3.4 Caracterização físico-química dos biomateriais

3.4.1 Difração de raios x (DRX)

Os pós de hidroxiapatita sintetizados por precipitação em meio aquoso e as membranas poliméricas compósitas produzidas foram analisadas por DRX. Para a identificação das fases, foi utilizado um difratômetro (Philips Analytical, modelo X'Pert-MPD). A varredura foi realizada no intervalo $10^\circ < 2\theta < 80^\circ$ com uma fenda incidente 1° e divergente $1/2^\circ$, tempo por passo de 1 segundo e passo de coleta $0,02^\circ$, com uma fonte de cobre ($\lambda=1,54056$) e potência de 40 kV, a 40 mA. Esta análise foi realizada para verificar a pureza da fase de hidroxiapatita produzida e o efeito de sua incorporação às membranas.

3.4.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais foi realizada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). As amostras foram preparadas sob a forma de pastilhas com uma razão mássica (1:100), sendo 1 de amostra para 100 de KBr. Os espectros foram obtidos na faixa de número de ondas entre 4000 e 400 cm^{-1} , em resolução de 4 cm^{-1} e 128 varreduras (FT-IR Prestige-21 Shimadzu).

3.4.3 Fluorescência de raios X (XRF)

Para a determinação da composição química e, principalmente, verificar a razão molar dos elementos cálcio e fósforo (Ca/P) do pó preparado e também de sua incorporação às membranas, a análise por fluorescência de raios X foi realizada. Para isso utilizou-se um equipamento de fluorescência de raios X, Panalytical (modelo Axios 1 kw). As membranas foram recortadas de acordo com o tamanho do porta amostra e analisadas diretamente. Para o pó de hidroxiapatita, o composto foi homogeneizado em almofariz de vidro por 5 minutos e em seguida incorporado a um aglomerante MAXIXWAX® (Oregon cod. 02778E). Foi utilizada uma massa de 2,0g de hidroxiapatita para 0,2 g do aglomerante. Esta amostra foi prensada em

prensa hidráulica (AMEF, modelo AP-25T) com pressão de 20T por 10 segundos. Para quantificação dos resultados foi utilizado o *software* Omniam®. O resultado final obtido no equipamento, refere-se a porcentagem de CaO e P₂O₅ presente na amostra. Para análise das razões molares de Ca/P, ou seja, o cálculo para obtermos o resultado da porcentagem de Ca e P presentes nas frações de CaO e P₂O₅ foram utilizadas as equações abaixo:

$$\%Ca = \frac{(MMCa \times \%CaO)}{MM CaO} \quad \text{(Equação 1)}$$

onde %Ca representa a porcentagem de massa de cálcio presente no CaO; MMCa refere-se à massa molar do cálcio, igual a 40,08 g/mol; e %CaO a porcentagem da massa de CaO detectada pelo equipamento; MMCaO a massa molar de CaO.

$$\%P = \frac{(MMP \times \%P2O5)}{MM P2O5} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde %P refere-se à porcentagem de massa de fósforo presente em P₂O₅; MMP refere-se à massa molar de fósforo, igual a 30,97 g/mol; e %P₂O₅ a porcentagem da massa de P₂O₅ detectada pelo equipamento; MMP₂O₅ a massa molar de P₂O₅.

$$[Ca] = \frac{\%Ca}{MMCa} \quad \text{(Equação 3)}$$

onde [Ca] refere-se à concentração em moles de cálcio presente em CaO e MMCa à massa molar do cálcio, igual a 40,08 g/mol;

$$[P] = \frac{\%P}{MMP} \quad \text{(Equação 4)}$$

onde [P] refere-se à concentração em moles de fósforo presente em P₂O₅ e MMP à massa molar do fósforo, igual a 30,97 g/mol;

$$Ca/P = \frac{[Ca]}{[P]} \quad \text{(Equação 5)}$$

onde Ca/P descreve a razão molar entre cálcio e fósforo.

3.4.4 *Análise termogravimétrica (TGA)*

A estabilidade dos biomateriais produzidos em função de variação de massa com a temperatura ao longo do tempo foi determinada por análise termogravimétrica (TGA). A análise foi realizada em cadinho de alumina com temperatura inicial de 25° C, temperatura final de 1000° C utilizando uma taxa de 10° C/minuto e N₂ com uma vazão de 100 mL/minuto (Mettler

Toledo, modelo TGA/DSC1 – Suíça; balança microanalítica, Mettler Toledo, modelo MX5 – Suíça).

3.4.5 *Análise do aspecto*

As membranas foram inspecionadas visualmente quanto ao aspecto, coloração, homogeneidade, presença de bolhas e fraturas (Iphone 8, câmera dupla 12 MP abertura 1.8).

3.4.6 *Espessura das membranas*

As membranas de quitosana-xantana e quitosana-xantana-hidroxiapatita foram avaliadas quanto à espessura no estado seco e após imersão em 15 mL de solução de PBS 1X e meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco, com baixa concentração de glicose, Sigma–Aldrich, Cat. D5523) suplementado com 10% v/v de soro bovino fetal (Sigma–Aldrich – Cat. F2561), 1% v/v de L-glutamina (Sigma–Aldrich, Cat. 59202C) e 1,1% v/v penicilina/estreptomicina (Sigma–Aldrich, Cat. P4333), por um período de 24 horas a 37 °C. Para tal, foi utilizado um micrômetro digital (Digimess, modelo IP40), em 10 replicatas de amostras com dimensões de 6 cm x 1 cm de diferentes lotes.

Para a análise da espessura das amostras secas, as mesmas foram previamente acondicionadas em um dessecador contendo sílica como dessecante por um período de aproximadamente 24 horas, com o intuito de evitar aumento na espessura pela adsorção de água.

3.4.7 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A análise da morfologia superficial das membranas produzidas foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura (LEO Electron Microscopy/Oxford, modelo Leo 440i). As membranas foram recobertas com ouro por *sputtering* (EMITECH, modelo K450). A espessura final de ouro de aproximadamente 200 Å foi adotada com o intuito de evitar o carregamento das membranas poliméricas e das membranas incorporadas com fosfato de cálcio.

3.4.8 *Microtomografia computadorizada de raios X (Micro CT)*

A análise de Micro CT é um ensaio não-destrutivo que permite a reconstrução da microestruturada das membranas tridimensionalmente. Para esta análise foi utilizado um microtomógrafo Skyscan/Bruker (modelo 1272), pertencente ao Laboratório de Nanotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, com uma resolução nominal de 3,5 µm (2452x1640 pixels), fonte de raios X com energia de 30 kV (160

μA) e um tempo total de aquisição de dados de 6 horas para cada amostra.

As amostras foram cortadas por punção com *puncher* (Ritcher, modelo trepano N6) com 6 mm de diâmetro. Através desta técnica foi possível avaliar quali e quantitativamente o volume e a porosidade no interior das amostras, em estado seco. A reconstrução das projeções em 3D foi realizada a partir da compilação de dados de fatias bidimensionais, utilizando-se os programas NRecon, CTVox e Dataviewer, da SkyScan, enquanto o *software* utilizado para quantificação da região pré-selecionada e binarizada foi o CTanalyser (CTan) da SkyScan.

3.4.9 *Microscopia confocal a laser*

A microscopia de varredura a laser permitiu realizar a imagem topográfica e medidas de rugosidade das membranas quando submetidas à máxima capacidade de absorção aquosa. O laser permitiu a construção de uma imagem em 3D pela varredura no eixo Z em alta resolução no microscópio confocal a laser - *LSCM* - (Keyence, modelo VK-X200), utilizando um comprimento de onda de 408 nm. Antes da realização da análise, as amostras foram imersas em solução PBS 1X e incubadas por 30 minutos a 35 ° C simulando as condições em fluido corpóreo.

Para as imagens obtidas com lente de 20x foi utilizado o número de abertura (NA) de 0.46 e *Z pitch* de 0.5 μm (passo entre cada imagem feita no eixo z).

3.4.10 *Análise das propriedades mecânicas*

Os ensaios de tensão e alongamento na ruptura foram realizados como descrito na norma ASTM D-882. As amostras foram cortadas em um tamanho de 10 cm de comprimento e 2,54 cm de largura. As membranas foram previamente hidratadas de acordo com o tempo máximo para absorção, descrita no método de capacidade de absorção, antes do ensaio, com solução de PBS 1X. A distância entre as garras foi de 5 cm, a velocidade de afastamento foi de 1,0 cm/s com uma carga de 50,0 Kgf. O ensaio foi realizado até a ruptura das amostras. Para este ensaio foi utilizado o texturômetro TA.XT2 (Stable Micro System), empregando-se 8 amostars para cada formulação. Para a análise dos resultados as seguintes equações foram utilizadas:

$$T = \frac{F_m}{A_T} \quad \text{(Equação 6)}$$

onde T refere-se ao valor da tensão em MPa; F_m à força máxima de rompimento em N e A_T a área transversal em mm^2 ;

$$A = \frac{d}{d_i} \times 100 \quad \text{(Equação 7)}$$

onde A é o alongamento na ruptura (%); d a distância das garras no momento de ruptura (mm)

e d_i a distância inicial da garra do equipamento (mm).

3.4.11 Capacidade de absorção e perda de massa

As análises de absorção e perda de massa foram realizadas pela imersão das membranas em 15 mL de solução de PBS e meio DMEM (Sigma–Aldrich, Cat. D5523) suplementado com 10% v/v de soro bovino fetal (Sigma–Aldrich, – Cat. F2561), 1% v/v de L-glutamina (Sigma–Aldrich, Cat. 59202C) e 1,1% v/v penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich, cat. P4333). Antes do ensaio as amostras foram secas em estufa (Tecnal) a 37°C até verificação de massa constante (aproximadamente 48 horas) em balança analítica (SHIMADZU Mod. ATY-224) e, em seguida, foram esterilizadas em uma mistura de gás composta de 30% de óxido de etileno e 70% de dióxido de carbono, com exposição por 8 horas, 40°C e umidade relativa de 30 a 80%. Este processo ocorreu aplicando vácuo por 15 minutos, com posterior entrada da mistura do gás até uma pressão de 0,5 kgf/cm². Ao término deste processo, as amostras foram aeradas por 10 min com ar filtrado.

O ensaio de absorção foi realizado em triplicata, com amostras de tamanho padronizado de 6 x 1 cm. As amostras foram imersas nas soluções descritas e incubadas em estufa (Tecnal) com uma temperatura de 37° C sem agitação. Após o período estabelecido de 24 horas as triplicatas foram retiradas para a medição de sua absorção. Um papel filtro foi utilizado para retirar o excesso de solução antes de registrar a massa, eliminando a solução depositada diretamente na superfície do biomaterial.

Para a análise de perda de massa, as amostras intumescidas foram lavadas com 20 mL de água ultrapura por 4 vezes durante 5 minutos, com o intuito de retirar compostos não ligados às membranas. Estas membranas foram colocadas em estufa (Tecnal) na temperatura de 37° C e secas até obtenção de massa constante.

A capacidade de absorção foi avaliada de acordo com a Equação 9, enquanto que a perda de massa foi avaliada de acordo com a Equação 10:

$$Ab = \frac{M_u - M_s}{M_s} \quad \text{(Equação 9)}$$

onde M_u é a massa do material úmido e M_s a massa do material seco.

$$Pm = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \times 100 \quad \text{(Equação 8)}$$

onde M_i refere-se à massa inicial e M_f à massa final,

3.5 Caracterização biológica das membranas

3.5.1 Preparo das células-tronco mesenquimais de polpa dentária

Para os ensaios *in vitro*, as células-tronco mesenquimais de polpa dentária humana (DPSC) foram cedidas pela empresa R-Crio®, que por sua vez as obteve a partir de uma amostra padronizada adquirida da empresa Lonza (Cod. PT-5025), e armazenadas em criotubos em nitrogênio líquido no banco de células da empresa. Quando necessário, as células foram descongeladas e ressuspensas em meio DMEM (Sigma–Aldrich, Cat. D5523). O conteúdo foi homogeneizado e submetido a centrifugação a 178 g (Sieger, modelo Siruis 4000). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 8 mL de meio DMEM suplementado com 10% v/v de soro bovino fetal (Sigma–Aldrich, – Cat. F2561), 1% v/v de L-glutamina (Sigma–Aldrich, Cat. 59202C) e 1,1% v/v penicilina/estreptomicina (Sigma–Aldrich, P4333). Este conteúdo foi inoculado em garrafa de 75 cm² e as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ (Panasonic, MCO-19AIC UV) até verificação de confluência entre 70 a 80%, por microscopia óptica (Zeiss, modelo Primovert).

Para utilização destas células nos ensaios de caracterização dos biomateriais, a monocamada de células foi lavada com uma solução de DPBS (Thermo Fisher Scientific Cat. 21600010), na proporção de 2 mL de solução para cada 25 cm² de área de crescimento, para a retirada de debris celulares e metabólitos do crescimento celular. Após isto as células foram destacadas utilizando solução Tryple™ Express sem vermelho de fenol (Thermo Fisher Scientific – Cat. 12304013), na proporção de 1,5 mL para cada 25 cm² de área de crescimento e incubada a 37°C por 5 minutos. Esta suspensão foi inativada pelo uso do mesmo meio de cultivo citado acima e submetida a centrifugação a 178 G (Sieger, modelo Sirius 4000). A amostra foi ressuspensada novamente para contagem e análise da viabilidade. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer com azul de tripan, pela mistura de 10 µL da suspensão celular com 10 µL de solução de azul de tripan (Sigma–Aldrich). O cálculo para determinação da concentração e viabilidade das células foi realizado de acordo com as Equações 11 e 12 respectivamente.

$$CCV = \left(\frac{QSE+QSD+QID+QIE}{4} \right) \times FD \times 10000 \quad \text{(Equação 10)}$$

onde CCV refere-se à concentração de células viáveis; QSE ao quadrante superior esquerdo; QSD ao quadrante superior direito; QIE ao quadrante inferior esquerdo; QID ao quadrante inferior direito e FD ao fator de diluição.

$$Viab = \left(\frac{CCV}{CCM} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 11)}$$

onde Viab refere-se à viabilidade e CCM à contagem de células mortas, as quais ficam coradas internamente com o azul de tripan.

3.5.2 Caracterização das células-tronco mesenquimais

Antes da utilização das células para o ensaio de viabilidade celular, as mesmas foram caracterizadas quanto à sua velocidade máxima de crescimento e sua taxa de duplicação. Uma alíquota das células descongeladas foi expandida até a 8ª passagem e utilizada para a verificação do crescimento celular. Um total de 5×10^4 células viáveis foram transferidas em triplicata para 7 placas de 6 poços, contendo 2 mL de meio DMEM (Sigma–Aldrich, Cat. D5523) suplementado com 10% v/v de soro bovino fetal (Sigma–Aldrich, – Cat. F2561), 1% v/v de L-glutamina (Sigma–Aldrich, Cat. 59202C) e 1,1% v/v penicilina/estreptomicina (Sigma–Aldrich, Cat. P4333) por poço. O meio de cultivo foi substituído a cada 72 horas.

As células foram destacadas nos tempos de 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas e contadas em câmara de Neubauer. O processo de destacamento e contagem destas células foi realizado de acordo com o item 3.5.1. Para o cálculo do tempo de duplicação foi utilizada a Equação 13.

$$td = \left(\frac{\ln 2}{\mu_{max}} \right) \quad \text{(Equação 12)}$$

onde t_d refere-se à taxa de duplicação das células e μ_{max} à taxa específica máxima de crescimento, correspondente a inclinação linear da curva de crescimento na fase log.

Estas células também foram caracterizadas pelo ensaio de imunofenotipagem em equipamento BD Accuri C6, com os marcadores CD 105 (BD, Cat. 561443), CD 73 (BD, Cat. 550257), CD 90 (BD, Cat. 555596) e CD 45 (BD, Cat. 347464) antes da utilização nos ensaios para determinar a pureza das células. Após o destacamento das células, 5 μ L do reagente CD 105, 20 μ L dos reagentes CD 45 e CD 73 e, 2 μ L do reagente CD 90, foram adicionados a $1,0 \times 10^5$ células viáveis, em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de *Stain Buffer* (BD, cod. 554656). As amostras foram incubadas por 30 minutos a 24 °C ao abrigo da luz. Após este período, os tubos foram centrifugados a 100 G por 5 minutos (Sieger, modelo Sirius 4000). O sobrenadante foi descartado, a amostra foi ressuspensa com 0,5 mL de *Stain Buffer* e os tubos foram analisados em citômetro de fluxo (BD, Accuri C6) para obtenção dos histogramas de marcação celular.

3.5.3 Ensaio *in vitro* de proliferação celular

A proliferação das células-tronco mesenquimais na presença das membranas foi determinada através do ensaio de conversão do sal brometo de 2- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich) em cristais de formazan. As células viáveis possuem a capacidade de reduzir metabolicamente o sal de MTT pela ação de desidrogenases, presentes na mitocôndria das células, em cristais coloridos insolúveis em meio aquoso. Neste ensaio foram empregadas células mesenquimais da polpa dental (LONZA, código PT-5025).

As membranas foram cortadas com *puncher* (Ritcher, modelo trepano N6) para a obtenção de amostras com 6 mm de diâmetro e estas foram distribuídas em placas de 96 poços. O meio de cultivo utilizado em todo processo foi composto por meio basal DMEM (Sigma-Aldrich, Cat. D5523) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, Cat. F2561), 1% v/v de L-glutamina (Sigma-Aldrich, Cat. 59202C) e 1,1% v/v penicilina/estreptomicina (SIGMA-ALDRICH, Cat. P4333). O ensaio foi realizado em quadruplicata e foram testadas ambas as faces das membranas. As membranas foram colocadas nos poços e, em seguida, foram dispensados 0,2 mL do meio citado acima, sobre as membranas. As placas foram incubadas por 24 horas a uma temperatura de 37 °C em incubadora (Panasonic, MCO-19AIC UV). Após este período, o meio processado pelas células foi retirado e substituído pela mesma quantidade supracitada de meio fresco. Em seguida, as células foram inoculadas com uma concentração de $4,0 \times 10^4$ células por poço.

Após períodos definidos (24, 48 e 72 horas a partir da inoculação das células), 0,02 mL de solução de MTT a uma concentração de 0,5 mg/mL dissolvida em PBS 1X (Sigma-Aldrich, Cat. D5773), foram adicionados aos poços. As amostras foram incubadas a 37° C por 4 horas (Panasonic, MCO-19AIC UV). As membranas foram retiradas e transferidas para outra placa, com o intuito de obter apenas o resultado das células aderidas. Foram adicionados 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) para a dissolução dos cristais. As placas foram incubadas em estufa (Tecnal) na temperatura de 37° C por 40 minutos. Após este período, o líquido sobrenadante foi transferido para nova placa e as absorbâncias analisadas em espectrofotômetro (Promega, modelo Glomax E8032) a 560 nm. Para o controle positivo, a inoculação das células foi realizada diretamente. Para o controle negativo, as células não foram inoculadas, apenas os reagentes adicionados.

3.5.4 Ensaio *in vitro* de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da doxiciclina

Para a determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima da doxiciclina, o teste *in vitro* foi realizado utilizando cepas de *Porphyromonas gingivalis* W83, *Streptococcus oralis* ATCC 10557 e *Streptococcus salivarius* ATCC 7073. Os testes foram executados de acordo com o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). O objetivo deste ensaio foi verificar a liberação do composto em concentração eficaz e capaz de inibir ou eliminar o microrganismo. Anteriormente ao ensaio, as cepas foram reativadas em placas contendo meio ágar para posterior obtenção de células viáveis visando o preparo do inóculo. A metodologia utilizada para cada etapa do ensaio é descrita a seguir.

3.5.4.1 Cultivo dos microrganismos para preparo do inóculo

A cepa de *P. gingivalis* foi cultivada em placas de ágar triptona de soja 7% (m/v) (TSA - Tryptic Soy Agar; Difco), enriquecido de extrato de levedura 0,2% (m/v), (Yeast Extract; Difco) sangue de carneiro desfibrinado a 7% (v/v), 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich) e 1 µg/mL de menadiona (Sigma-Aldrich). As placas foram mantidas em cabine de anaerobiose (Don Whitley, Shipley), com atmosfera de 90% de CO₂ e 10% H₂ à 37° C por 48 h.

Para o crescimento do *Streptococcus oralis* ATCC 10557 e do *Streptococcus salivarius* ATCC 7073, foi utilizado o meio ágar cérebro-coração (BHI ágar - Brain Heart Infusion Agar- Difco). As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ à 37 °C, por 24 h (Sanyo, Japan).

As células obtidas nesta etapa foram utilizadas na produção do inóculo.

3.5.4.2 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo de *P. gingivalis*, uma unidade formadora de colônia (UFC) foi retirada com o auxílio de uma alça microbiológica estéril e inoculada em meio caldo TSB-BHI suplementado, composto por caldo triptona de soja 1,55% (m/v) (TSB- Tryptic Soy Broth, Difco), caldo cérebro-coração 1,48% (m/v) (BHI - Brain Heart Infusion, Difco), extrato de levedura 0,2% (m/v) (Yeast Extract; Difco), 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich) e 1 µg/mL de menadiona (Sigma-Aldrich). A suspensão foi mantida neste meio por 18 h em condições de anaerobiose com atmosfera de 90% de CO₂ e 10% H₂ à 37 °C. Após esse período, a suspensão celular teve sua densidade óptica ajustada com meio de cultura fresco de modo a se obter uma suspensão com absorvância de 0,5 no comprimento de onda de 660 nm (Biochrom® Asys UVM340 - Microplate Reader). Nestas condições, uma suspensão com concentração final de 1

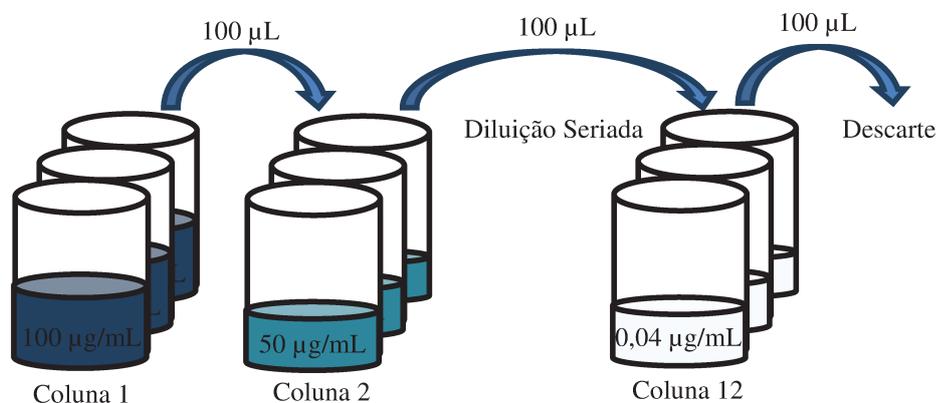
x 10⁵ UFC/mL foi obtida.

Da mesma maneira citada acima, as cepas de *Streptococcus* foram cultivados em caldo Mueller-Hinton (MHB- Mueller Hinton Broth – Difco) pela inoculação de uma única UFC, e incubados à 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Esta suspensão inicial teve sua absorvância ajustada para um intervalo de 0,08-0,1 no comprimento de onda de 625nm (concentração de 1,5 x 10⁸ UFC/mL) utilizando como diluente caldo Mueller-Hinton (MHB- Mueller Hinton Broth - Difco) para uma concentração final de 1 x 10⁵ UFC/mL (CLSI, 2006).

3.5.4.3 Preparo da curva padrão de doxiciclina

Após o preparo dos inóculos dos diferentes microrganismos, foi preparada a curva padrão de doxiciclina na faixa de 0,04 a 100,0 µg/mL, através de micro-diluição seriada em placa de cultivo de 96 poços. Para isso, uma solução padrão estoque foi preparada pela dissolução de 100 µg do fármaco em 1,0 mL de meio caldo Mueller Hinton (Difco) em pH 7,3. A curva foi preparada em triplicata pela adição de 200 µL/poço desta solução aos 3 primeiros poços da placa na coluna 1, obtendo-se uma concentração final de 100 µg/mL. Os conteúdos dos poços foram homogeneizados e em seguida foram retirados 100 µL/poço e dispensados sequencialmente em outros 3 poços da segunda coluna da placa contendo 100 µL de meio em cada poço. Este processo foi repetido até a décima segunda coluna, e nesta última, foram descartados 100 µL de solução de cada poço, para que seus volumes totais fossem equivalentes aos dos restantes. Como controle negativo do teste (CNT), foram adicionados a 6 poços 200 µL/poço de meio caldo Mueller Hinton sem a adição do antibiótico. O preparo do controle positivo do teste (CPT) foi semelhante ao do negativo, porém com a adição do inóculo. A Figura 3.1 evidencia o processo de diluição seriada para ao preparo da curva padrão de doxiciclina. Para o preparo da curva padrão do microrganismo *P. gingivalis*, o meio de cultivo utilizado foi o caldo TSB-BHI suplementado.

Figura 3.1 – Esquema de diluição seriada em placa de 96 poços para obtenção da curva padrão de doxiciclina.



3.5.4.4 Preparo das amostras para o ensaio de CIM e CBM

Para a verificação da liberação do fármaco contido nas membranas em concentrações capazes de inibir ou eliminar os microrganismos testes, amostras de 6 mm de diâmetro das membranas incorporadas com doxiciclina, conforme descrito no item 3.3, foram dispostas em placas de 96 poços em quadruplicata e para cada formulação (uma amostra de 6 mm por poço). Cada poço continha 100 µL de caldo Mueller Hinton, de forma similar à curva padrão após o recebimento do inóculo, descrito no item 3.5.4.5 abaixo. Estas amostras foram previamente intumescidas em solução contendo o fármaco doxiciclina dissolvida em meio caldo Mueller Hinton com uma concentração de 100 µg/mL. Para o controle negativo, amostras não contendo o antibiótico foram inoculadas em caldo Mueller Hinton e incubadas por 30 minutos na temperatura de 23°C, conforme condições das membranas testes. Para as membranas utilizadas para o microrganismo *P. gingivalis* foi empregado o caldo TSB-BHI suplementado.

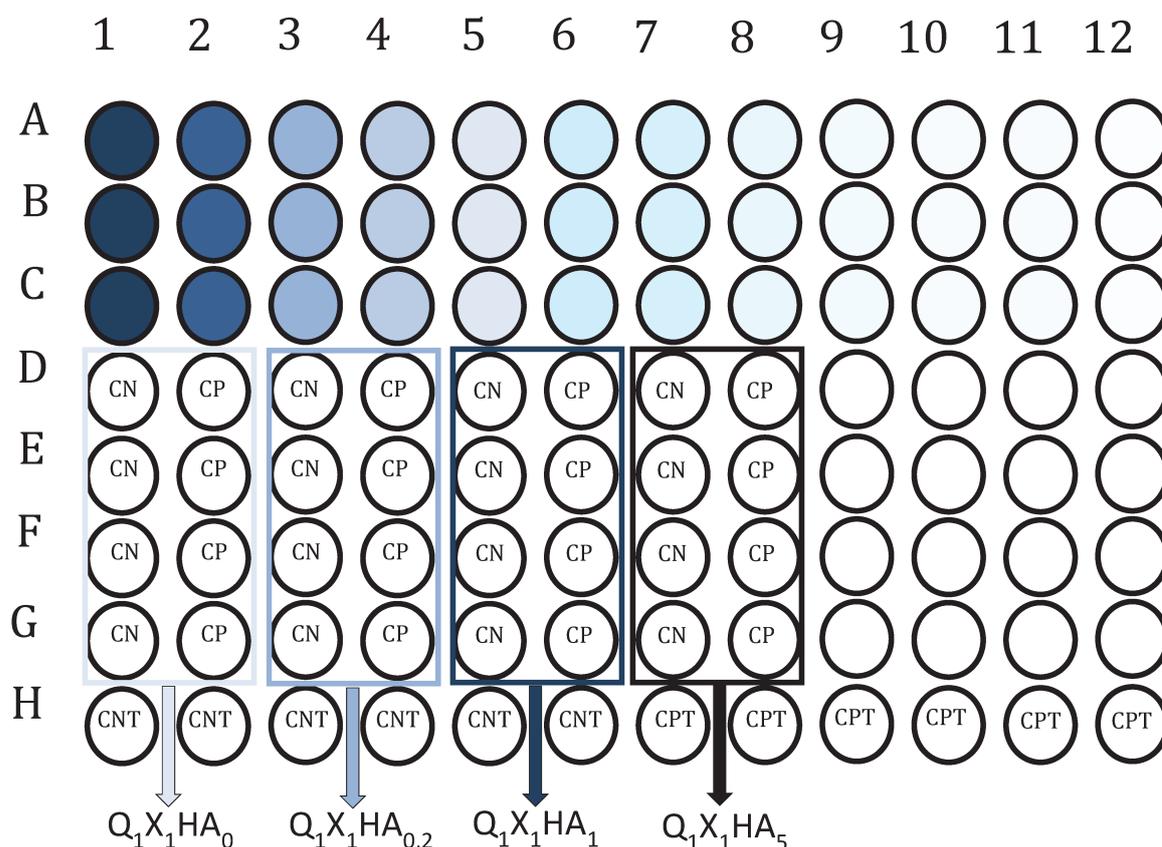
3.5.4.5 Inoculação dos microrganismos e início do ensaio de CIM e CBM

Após o preparo do inóculo e disposição das membranas testes nas placas de 96 poços, iniciou-se os testes inoculando-se os microrganismos em 3 placas, uma para cada tipo celular. Alíquotas de 100 µL de cada suspensão de inóculo foram dispensadas nas triplicatas da curva padrão (Figura 3.2 - Linhas A, B, C; Colunas de 1 a 12), a qual já continha 100 µL de meio com a concentração do fármaco doxiciclina descrita no item 3.5.4.3. Ao final, a concentração de cada ponto da curva foi diluída na proporção 1:2 obtendo-se uma faixa de concentração de 0,02 a 50,0 µg/mL. O mesmo procedimento de inoculação dos microrganismos ocorreu com as membranas. O volume de 100 µL do inóculo foi dispensado diretamente às membranas que

continham o fármaco doxiciclina (CP) e às membranas que não continham o fármaco incorporado (CN), para as formulações Q₁X₁HA₀, Q₁X₁HA_{0,2}, Q₁X₁HA₁ e Q₁X₁HA₅. O mesmo ocorreu para o controle positivo do teste (CPT). Para o controle negativo do teste (CNT), foi utilizado apenas o meio de cultivo caldo Mueller Hinton para os microrganismos *S. salivarius*, *S. oralis* e caldo TSB-BHI para *P. gingivalis*. Na Figura 3.2 é apresentada a distribuição das amostras em cada placa após o preparo.

As placas com os microrganismos *S. salivarius*, *S. oralis* foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ (Sanyo, Japan). Para o microrganismo *P. gingivalis*, a placa foi incubada com atmosfera de 90% de CO₂ e 10% H₂ à 37° C por 48 horas (Don Whitley, Shipley). Após este período as placas foram retiradas da incubação e analisadas conforme descrito no item que se segue.

Figura 3.2 – Distribuição do material em teste na placa de 96 poços: curva padrão de doxiciclina, membranas e os controles do teste. CN – refere-se às membranas sem incorporação de doxiciclina; CP – refere-se às membranas com a incorporação de doxiciclina; CNT – refere-se ao caldo Mueller Hinton sem adição do inóculo; CPT – refere-se ao meio caldo Mueller Hinton com a adição do inóculo.



3.5.4.6 *Determinação da faixa de concentração do fármaco doxiciclina capaz de inibir o microrganismo (CIM) e determinação da faixa capaz de eliminar os microrganismos testes (CBM)*

Após o período de incubação das placas foi realizada a análise da absorbância do meio contido nos poços. Primeiramente, as membranas foram retiradas com o auxílio de uma pinça estéril, de todos os poços. As mesmas foram pressionadas contra a parede dos poços para retirada do excesso de meio absorvido. Em seguida as placas foram analisadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 620 nm (Biochrom® Asys UVM340 - Microplate Reader). A determinação da faixa de concentração capaz de inibir o microrganismo foi determinada pela comparação dos resultados da densidade ótica das formulações e da curva padrão, em relação ao controle negativo do teste (CNT). A faixa foi determinada quando não

houve diferença estatística entre estes resultados.

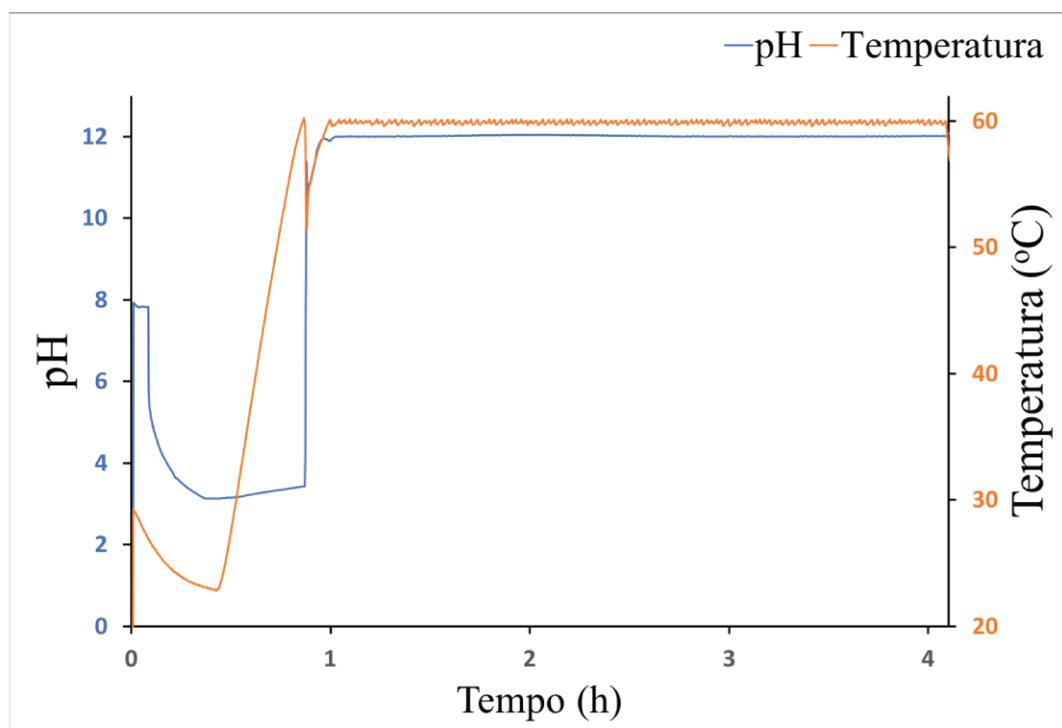
Para o ensaio de determinação da concentração bactericida mínima, após a análise das absorbâncias, foram retiradas alíquotas de 10 µL do conteúdo de todos os poços. Estas alíquotas foram aplicadas diretamente sobre a superfície de placas previamente identificadas, contendo meio de cultivo ágar. Para o microrganismo *P. gingivalis*, o cultivo foi realizado em placas de ágar triptona de soja 7% (m/v) (TSA - Tryptic Soy Agar; Difco), enriquecido de extrato de levedura 0,2% (m/v) (Yeast Extract; Difco), sangue de carneiro desfibrinado a 7% (v/v), 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich), 1 µg /mL de menadiona (Sigma-Aldrich) e incubadas com atmosfera de 90% de CO₂ e 10% H₂ à 37° C por 48 horas (Don Whitley, Shipley). Para os microrganismos *S. oralis* e do *S. salivarius*, foi utilizado o meio ágar cérebro-coração (BHI, Difco). As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ à 37 °C, por 24 h (Sanyo, Japan). A faixa de concentração capaz de eliminar o microrganismo foi determinada pela não detecção de crescimento celular em nenhuma das replicatas analisadas. Qualquer crescimento em apenas uma replicata foi descartada como a faixa de concentração bactericida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da hidroxiapatita sintetizada

O pó de hidroxiapatita foi obtido pelo método de precipitação em meio aquoso e descrito no item 3.1. A Figura 4.1 demonstra o controle de duas variáveis importantes, o pH e a temperatura, durante o processo de síntese da HA. Após a mistura dos reagentes, evidenciado na Figura 4.1 entre o tempo 0 e 1, os parâmetros da síntese foram fixados em 60°C e pH igual a 12. Estas variáveis, quando não controladas, podem gerar diferentes fases do composto, assim como alterar sua razão molar Ca/P desejável (estequiométrica), igual a 1.67 (RAYNAUD *et al.*, 2002).

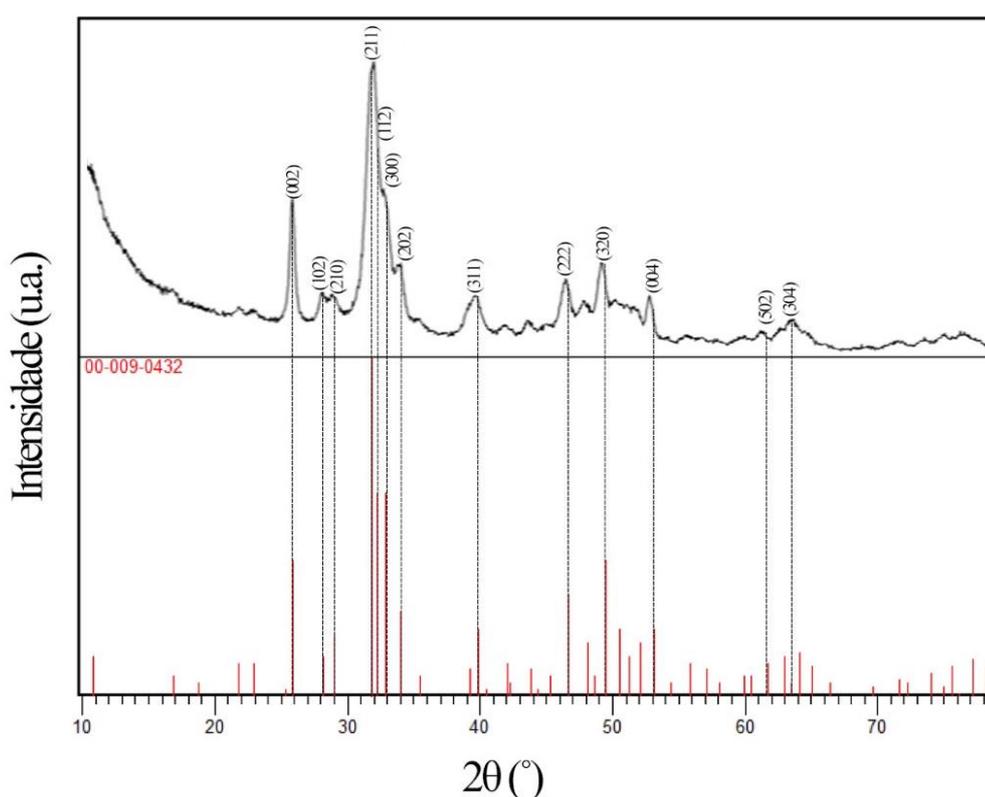
Figura 4.1 – Variação do pH e da temperatura durante o todo o processo de preparo das soluções de cálcio e fósforo e, posterior, controle desses parâmetros para a síntese da hidroxiapatita a 60 oC e pH 12 durante 3 horas.



O resultado da análise de cristalinidade do pó obtido na síntese pode ser verificado na Figura 4.2. O difratograma apresentou picos característicos de hidroxiapatita com cristalinidade de baixa a média, similar ao padrão da fase mineral do osso humano (DOROZHKIN, 2013). O resultado abrange os picos característicos do plano estrutural cristalino da hidroxiapatita,

compreendendo os oito principais picos de posição angular entre 25° e 50°, indexados aos planos entre (002) e (320), conforme a ficha JCPDS 09-0432 (2007). Assim como observado no presente trabalho, métodos de precipitação em meio aquoso que utilizam baixas temperaturas produzem material com baixa cristalinidade e características similares às do tecido ósseo, diferentemente das sínteses que ocorrem em altas temperaturas (MEHDI *et al.*, 2013).

Figura 4.2 – Difratoograma da HA em pó obtida pela síntese por precipitação em meio aquoso, apresentando os picos característicos da fase hidroxiapatita e seus referentes planos cristalinos entre parênteses.



Os grupos funcionais da hidroxiapatita foram identificados por FTIR e os resultados estão indicados na Figura 4.3. De acordo com a fórmula química da hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e os resultados obtidos, pode-se observar as bandas na região de 960 cm^{-1} , relacionadas ao grupo funcional PO_4^{3-} (ν_1)*, 1040 cm^{-1} , descrito como PO_4^{3-} (ν_3)** e bandas nas regiões de 560 a 604 cm^{-1} , correspondentes ao grupo funcional PO_4^{3-} (ν_4 *** (RAYNAUD *et al.*, 2002; DESTAINVILLE *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2006; FROST *et al.*, 2014; LIANG *et al.* 2016). Na região de 3561 cm^{-1} , pode-se observar uma banda característica de grupos OH^- , porém nas regiões entre 3600 a 4000 cm^{-1} , nota-se grande absorção de água, devido à não realização de tratamento térmico e a característica higroscópica do material neste estado (MEEJOO *et al.*,

2006; HAN *et al.*, 2006).

Figura 4.3 – Resultado da análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier do material obtido na síntese por precipitação em fase aquosa. *(v1): alongamento vibracional simétrico; **(v3): alongamento vibracional assimétrico; *** (v4): alongamento angular.

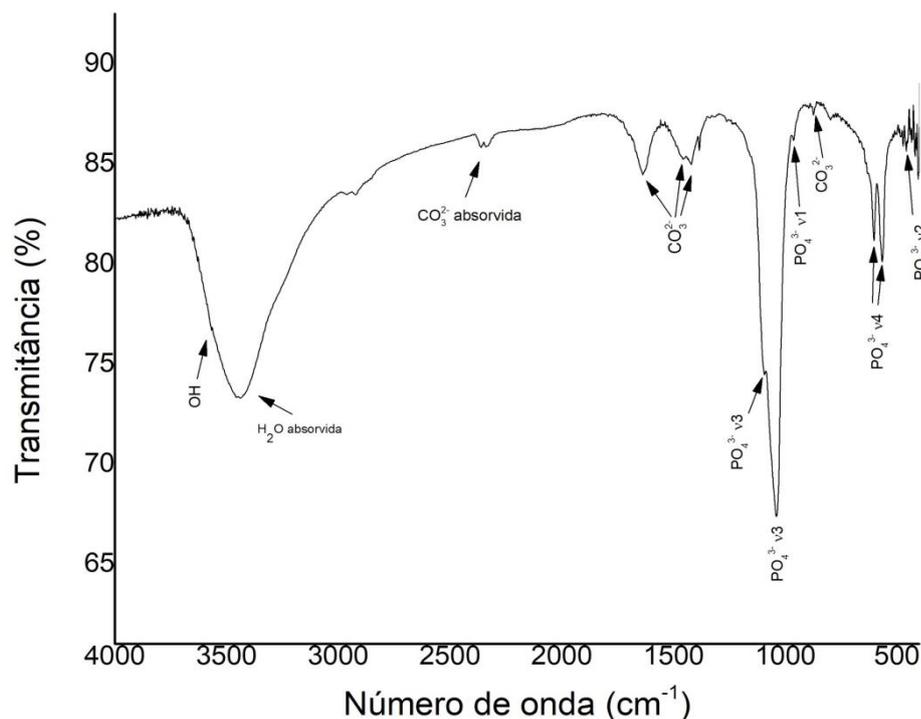


Tabela 4.1 - Valores de porcentagem (%) em massa e de concentração ([]) em massa molar obtidos para a HA sintetizada após análise de XRF.

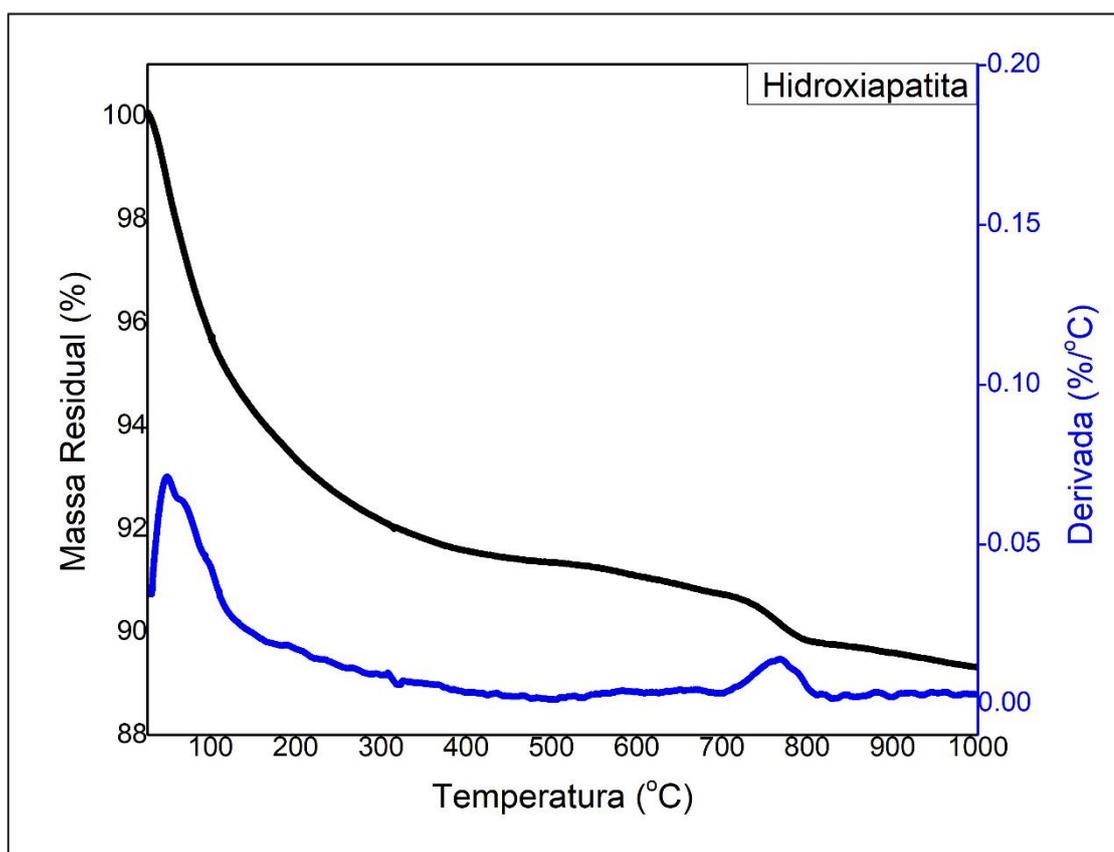
Material	CaO (%)	[Ca]	P ₂ O ₅ (%)	[P]	Razão Molar Ca/P
Pó de Hidroxiapatita	56,079	1,0001	43,163	0,6103	1,6442

Através da análise por fluorescência de raios X (XRF), pode-se observar a correta relação de Ca/P do material cerâmico sinterizado. A razão molar Ca/P igual a 1,64 foi verificada (Tabela 4.1), sendo próxima da relação estequiométrica característica da hidroxiapatita (igual a 1,67). A literatura indica que a precipitação de fosfatos de cálcio em meio aquoso, como a realizada neste trabalho, pode levar a composições estáveis de hidroxiapatita na faixa de razão molar Ca/P entre 1,5 e 1,75 (LEGEROS, 2008). Fases mais solúveis podem ser obtidas de

acordo com o pH e temperatura no momento da síntese. Quanto menor a razão molar de Ca/P, menor é a sua estabilidade em solução fisiológica, devido à proporção de cálcio presente na molécula. A bruxita por exemplo, que possui razão molar Ca/P igual a 1, é sintetizada em pH abaixo de 6,5 o que faz com que esta molécula seja instável em ambiente fisiológico, quando comparada com a hidroxiapatita estequiométrica (BOHNER, 2001; DOROZHKIN, 2008; GIOCONDI *et al.*, 2010; NAVARRO DA ROCHA, *et al.*, 2018).

Os resultados da análise termogravimétrica estão mostrados na Figura 4.4, representando a variação de massa com a temperatura e a curva de sua derivada, assim como as reações e transformações de fases originadas resultantes.

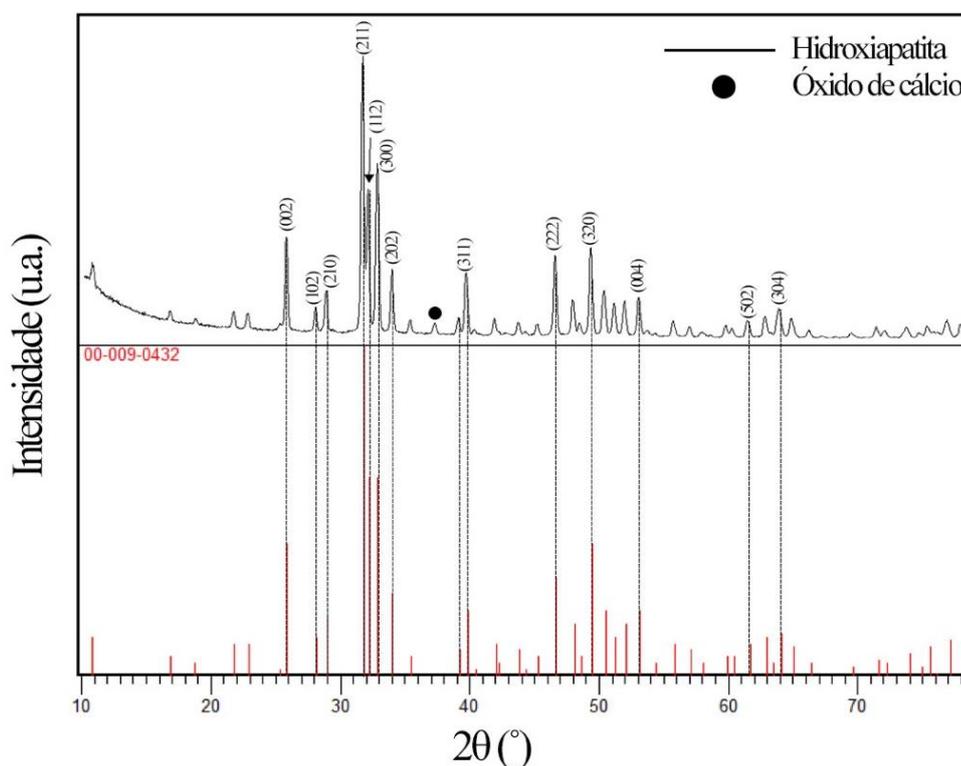
Figura 4.4 – Análise termogravimétrica da HA obtida.



Foi possível observar três estágios da curva TGA durante o tratamento térmico até 1000°C, com uma consequente perda de massa total de, aproximadamente, 10%. Em baixas temperaturas (<150°C), a evaporação do solvente fisicamente adsorvido na superfície da hidroxiapatita, que normalmente é a água, provocou a primeira perda de massa do pó sintetizado. O segundo estágio da curva TGA, entre 150 °C e 700 °C, pode estar relacionado à

vaporização de água estrutural e ao processo de cristalização da hidroxiapatita. A água estrutural é irreversivelmente perdida entre 200 e 400 °C, e estudos demonstram a contração da rede cristalina durante o aquecimento (LIAO *et al.*, 1999; TONSUAADU *et al.*, 2011). A literatura indica que o terceiro estágio, a partir de 700 °C, pode estar relacionado com a decomposição da hidroxiapatita, com possível desidroxilação da hidroxiapatita e formação da fase fosfato tricálcico (β -TCP), e descarbonatação dos grupos CO_3^{2-} presentes na amostra. Entretanto, para a verificação do descrito em literatura sobre a decomposição do terceiro estágio, foi realizada a análise por DRX em parte do pó de hidroxiapatita sintetizado após o tratamento térmico à 1000°C. O difratograma na Figura 4.5 indica que, além do aumento na cristalinidade, evidenciado pela ocorrência de picos estreitos e intensos, a decomposição da hidroxiapatita ocorreu somente em uma pequena fração de CaO, não havendo a presença de outra fase de fosfato de cálcio (como, por exemplo, o β -TCP).

Figura 4.5 - Análise de difração de raios X da HA obtida após o tratamento térmico à 1000°C.

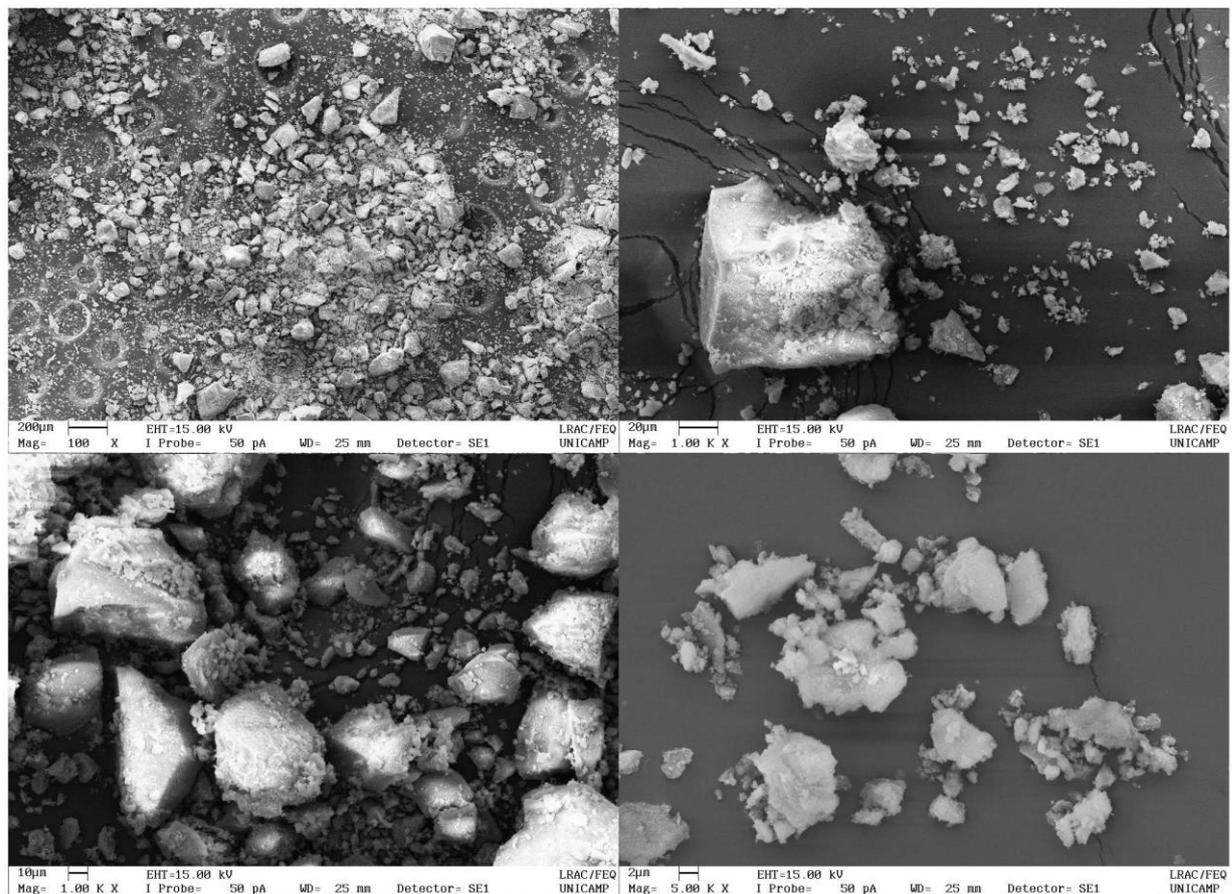


Na análise por MEV, foram verificados diferentes tamanhos de partículas após a passagem do pó em peneira granulométrica com abertura de 150 μm . A partir das micrografias,

na Figura 4.6, foi possível observar diferentes tamanhos de agregados das nanopartículas de hidroxiapatita com morfologia irregular, e alguns da ordem até de 150 μm , compatível com o esperado após o peneiramento. Alguns aglomerados com tamanho próximo a 100 μm apresentaram faces com tamanhos diferentes e alguns blocos pontiagudos. Com o aumento da razão superfície/volume das partículas, observado com a diminuição do tamanho de partícula, as forças eletrostáticas e superficiais tornam-se dominantes, levando à aglomeração do pó obtido (MA e LIM, 2002).

Dependendo de sua aplicação, estes aglomerados podem funcionar como substituto ósseo no decorrer da dissolução da membrana. Para efeito comparativo, ressalta-se que empresa Geistlich Pharma possui em sua linha de produtos o Bio-Oss®, o qual compreende partículas com tamanho entre 250 a 1000 μm . Este produto apresenta baixa taxa de reabsorção e, portanto, ao ser implantado, passa a constituir parte da estrutura óssea final formada.

Figura 4.6 – Aspecto típico do pó obtido na síntese por precipitação aquosa de hidroxiapatita observado por MEV em diferentes magnitudes.



4.2 Produção das membranas de quitosana-xantana e quitosana-xantana-

hidroxiapatita

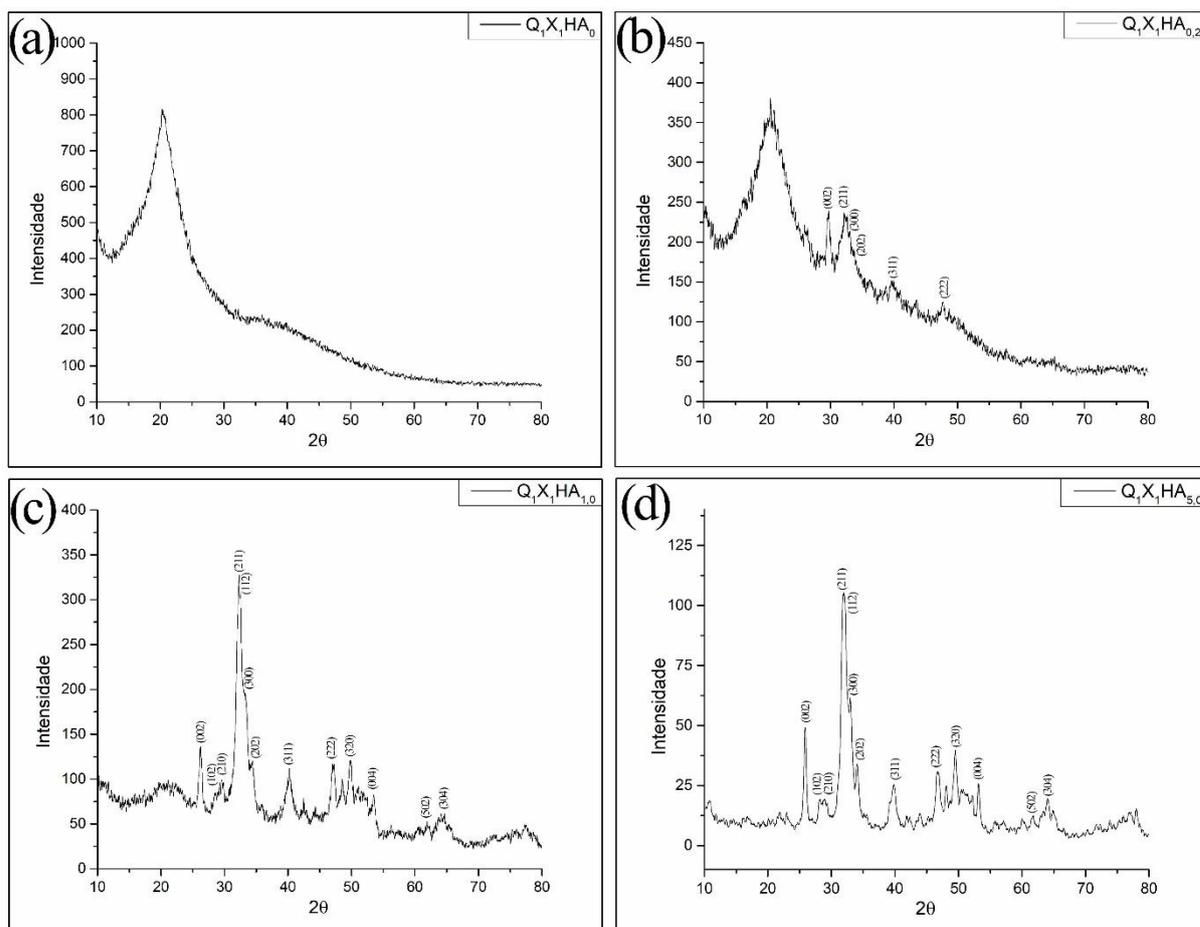
Após a obtenção e caracterização da hidroxiapatita, este composto foi incorporado às membranas de quitosana-xantana em diferentes concentrações. Os resultados das caracterizações realizadas para as membranas produzidas estão detalhados nos itens a seguir.

4.2.1 Difração de raios X

A Figura 4.7 apresenta os difratogramas das amostras quitosana-xantana e quitosana-xantana-hidroxiapatita, após a incorporação de 0,2%, 1% e 5% de hidroxiapatita, respectivamente, à mistura quitosana-xantana. Destaca-se que, se considerar na composição das membranas a massa somente dos polissacarídeos e do pó de HA adicionado, as frações teóricas esperadas de HA na mistura, respectivamente, seriam iguais a 9,1%, 33,3% e 71,4%. Entretanto, como as membranas, em seu processo produtivo, passam por uma etapa de neutralização por imersão por 24 h em solução de bicarbonato de sódio e por três lavagens consecutivas com água ultrapura, as frações finais podem ser menores que o valor esperado se houver perda do material incorporado durante estas fases de neutralização e lavagem das membranas.

Figura 4.7 – Difratogramas de raios X obtidos após análise das membranas: (a) $Q_1X_1HA_0$; (b)

Q₁X₁HA_{0,2}; (c) Q₁X₁HA₁; (d) Q₁X₁HA₅.



Após a análise por DRX, foi verificada a presença de fase amorfa entre 12° e 25° das membranas de quitosana-xantana. Estes resultados também foram encontrados por Westin *et al.* (2017) para suportes baseados em quitosana-xantana. Entretanto, com o aumento gradual do teor de hidroxiapatita na membrana de quitosana-xantana até o valor intermediário, foi possível observar discretos picos de difração referentes à fase hidroxiapatita, entre 30° e 35°.

Os picos estreitos e intensos entre 35° a 80° são referentes ao porta-amostra do equipamento. As análises foram realizadas com as amostras secas, e nesta condição, as mesmas apresentam espessura menor que 0,3 mm, ocasionando a passagem dos raios X pela membrana, atingindo o porta-amostra.

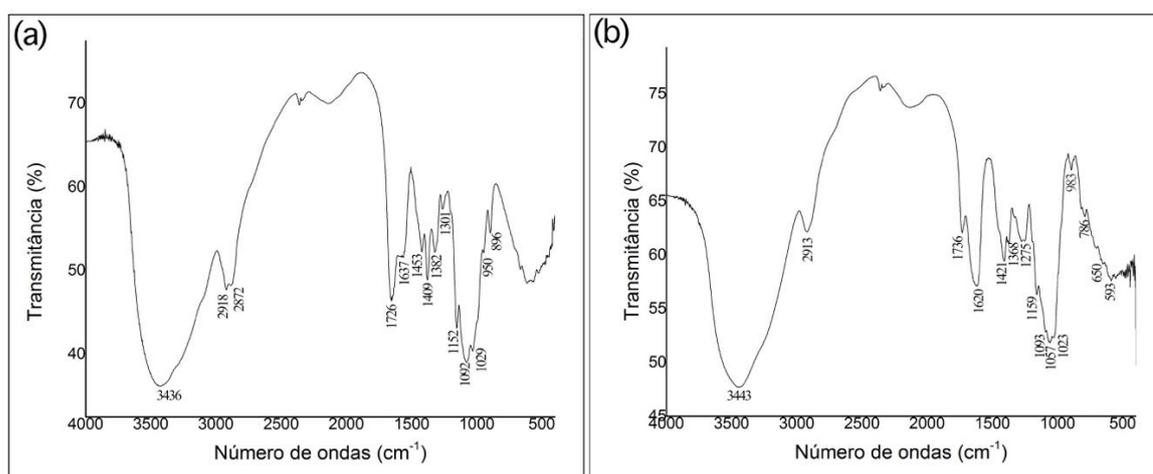
Para a amostra contendo maior fração de hidroxiapatita (71,4% na mistura final), a qual possui espessura maior que 0,5 mm quando seca, o difratograma apresentou o padrão característico de hidroxiapatita com baixa/média cristalinidade, similar ao padrão da fase mineral do osso humano e comparado ao pó obtido e apresentado na Figura 4.1, com picos de difração pouco definidos e alargados (ADAM *et al.*, 2014). Foram verificados também os oito principais picos em 2θ entre 25° e 50°, indexados aos planos entre (002) e (320), conforme a

ficha JCPDS 09-0432, portanto a incorporação do pó ao complexo de quitosana-xantana durante o seu preparo não ocasiona a perda de sua cristalinidade.

4.2.2 FTIR

Os espectros de FTIR das matérias primas utilizadas: quitosana (Figura 4.8a) e xantana (Figura 4.8b) apresentaram as bandas características da quitosana: grupos de amida I (C=O), de amina (δ N-H) e amida II (C-CH₃), em aproximadamente 1730 cm⁻¹, 1630 cm⁻¹ e 1375 cm⁻¹, respectivamente, e da goma xantana: grupo carboxila, C=O, em 1620 cm⁻¹. Além disso, as bandas em aproximadamente 3440 cm⁻¹, 2910 cm⁻¹ e 1090 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações de alongamento da hidroxila (O-H) e, também, aos grupos C-H e -C=O do grupo piruvato da xantana.

Figura 4.8 – FTIR - Espectros obtidos das matérias primas: (a) quitosana e (b) xantana.



As análises por FTIR confirmaram os resultados de DRX das membranas produzidas de quitosana-xantana. Os espectros de quitosana e de xantana demonstraram os grupos funcionais e modos vibracionais característicos das moléculas dos polissacarídeos, e estão apresentados na

Figura 4.9(a). Foi possível observar que a formação do complexo polieletrólito entre os dois polímeros carregados de forma oposta afetou o comportamento do grupo éster da xantana, em torno de 1736 cm⁻¹, demonstrando uma absorção menos intensa em torno de 1724 cm⁻¹ na membrana quitosana-xantana (DEGHAN e MARZUKA, 2014).

Figura 4.9 – FTIR - Espectros obtidos na análise das membranas: (a) $Q_1X_1HA_0$; (b) $Q_1X_1HA_{0,2}$; (c) $Q_1X_1HA_1$; (d) $Q_1X_1HA_5$.

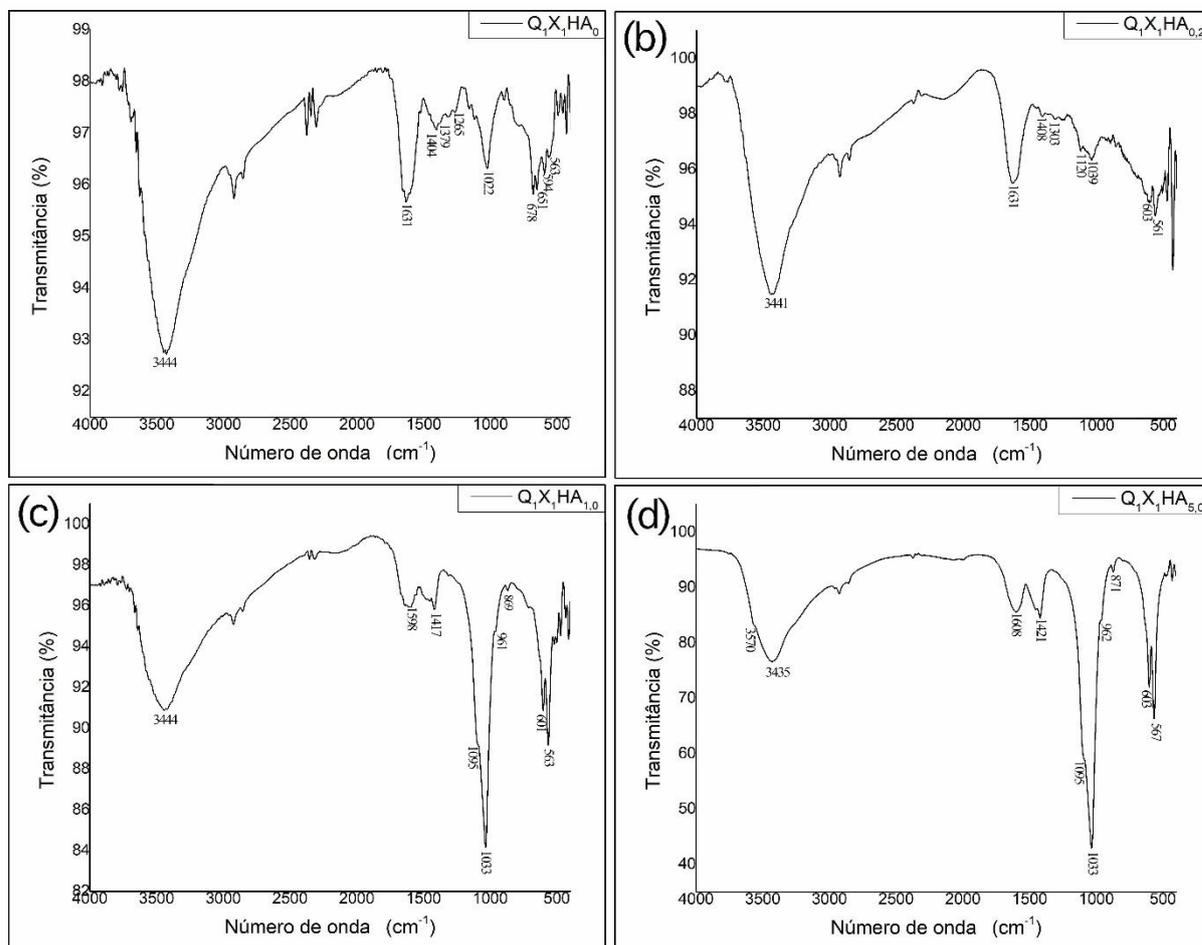


Figura 4.9 (b); (c) e (d), os espectros de FTIR das amostras de quitosana-xantana-hidroxiapatita apresentaram as bandas características da hidroxiapatita, correspondendo aos grupos funcionais fosfatos e hidroxilas. A região $3750\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ apresentou bandas largas, referentes ao estiramento O-H de moléculas de água adsorvidas (MEEJOO *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2006). As bandas em 602 , 563 e 575 cm^{-1} são relativas aos modos de deformação antissimétrica dos fosfatos $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$, a banda de intensidade fraca em 472 cm^{-1} é referente ao modo de deformação $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$ simétrica (SLÓSARCZYK *et al.*, 2005) e a banda aproximadamente em 970 cm^{-1} é devida ao estiramento simétrico dos fosfatos $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$. As bandas mais intensas do espectro de FTIR das membranas quitosana-xantana-hidroxiapatita ocorrem na região situada entre $1097\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ e correspondem à vibração de grupos fosfatos

v3(PO₄³⁻).

4.2.3 XRF

A partir dos resultados obtidos por fluorescência gerada por raios X foi possível obter dados semiquantitativos da composição elementar das membranas de quitosana-xantana e quitosana-xantana-hidroxiapatita. Na Tabela 4.2 é apresentada a composição química em porcentagem dos óxidos de cálcio e fósforo, bem como a fração molar dos elementos cálcio e fósforo. A formulação Q₁X₁HA₀, mesmo sem a incorporação de hidroxiapatita, apresentou a composição química de cálcio e fósforo. Os reagentes utilizados para neutralização como bicarbonato de sódio e a própria quitosana, possuem certo resíduo de cálcio em sua composição, sendo o último extraído de resíduos de caranguejos e camarões.

Tabela 4.2 - Valores em porcentagem (%) em massa e de concentração ([]) em massa molar, obtidos para os compostos por análise de XRF.

Formulação	% CaO	[Ca]	% P ₂ O ₅	[P]	Ca/P
Q ₁ X ₁ HA ₀	4,19	0,0748	4,82	0,06795	1,10
Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	39,13	0,6979	28,05	0,3953	1,77
Q ₁ X ₁ HA ₁	55,94	0,9978	35,04	0,4938	2,02
Q ₁ X ₁ HA ₅	57,34	1,0227	40,57	0,5718	1,79

Os resultados para as demais formulações, indicam um aumento na razão molar Ca/P após o processo de incorporação da hidroxiapatita, nas três diferentes concentrações, à formulação de quitosana e xantana (Q₁X₁HA₀). Apesar dessa alteração na razão molar Ca/P, os resultados de DRX e FTIR não indicaram, aparentemente, a presença de picos de difração referente ao óxido de cálcio e/ou grupos funcionais característicos de uma segunda fase de fosfato de cálcio ácido, como por exemplo, bruxita e monetita (TOUNY; SALEH; 2018).

É possível que o processo de lavagem e a própria quitosana, devido a sua origem, como comentado anteriormente para a formulação de Q₁X₁HA₀, tenham contribuído também para o aumento na razão entre Ca/P nas demais formulações. Outro fator para justificar este aumento seria a utilização do ácido acético adicionado para dissolução da quitosana. A presença de íons H⁺ na solução pode promover a dissolução da hidroxiapatita, por reagirem tanto com os íons PO₄³⁻ quanto com os íons OH⁻, presentes na molécula de hidroxiapatita. Esta reação pode formar compostos solúveis e, por consequência, há liberação de cálcio na solução. Estudos vêm

demonstrando a influência dos grupos carboxilas dos ácidos orgânicos, tais como ácido acético e ácido láctico, formando complexos ionizados que podem realizar ligações entre os grupos funcionais da quitosana com os íons Ca^{2+} disponíveis (YAMAGUCHI *et al.*, 2001). Esta reação ocasionaria um aumento na concentração de cálcio na mistura, aumentando assim a razão molar de Ca/P nas membranas de quitosana-xantana produzidas. Assim, como observado no presente estudo, a razão entre cálcio e fósforo também aumentou com a incorporação da hidroxiapatita nas membranas de quitosana-hidroxiapatita que foram produzidas por Sousa *et al.* (2017).

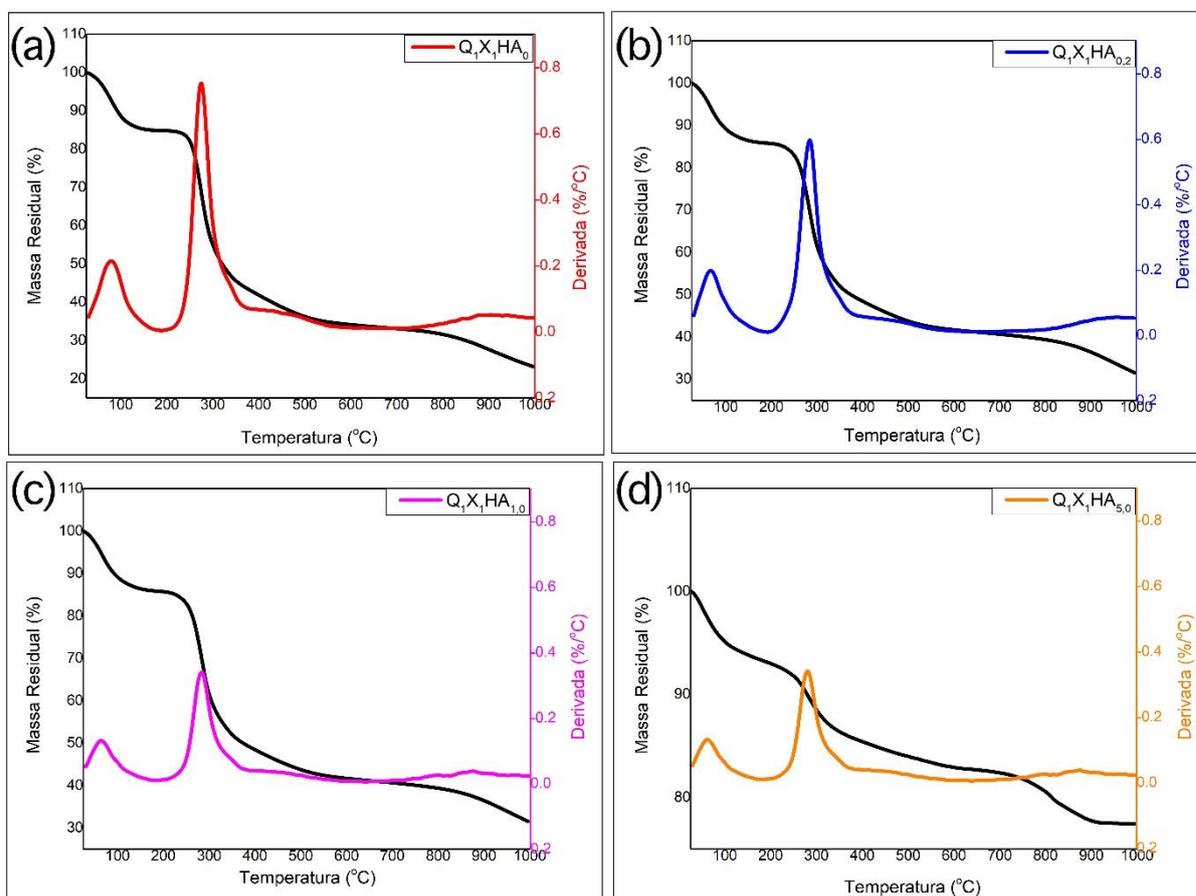
4.2.4 TGA e DTG

A amostra composta apenas pela membrana de quitosana-xantana (Figura 4.10a) e os compósitos quitosana-xantana-hidroxiapatita obtidos pela adição de 0,2% de HA (Figura 4.10b) e 1,0% de HA (Figura 4.10c) apresentaram aspecto semelhante, com perda de massa em três estágios. O primeiro evento térmico apresentou uma taxa relativamente baixa, ocorreu entre 30°C e 120°C. Este evento, representando uma perda de massa de cerca de 13%, foi atribuído à perda de água. O segundo estágio ocorreu no intervalo aproximado de 250°C a 500°C, apresentando taxa máxima por volta de 300°C, de acordo com o pico da derivada da curva (DTG). A perda de aproximadamente 40% de massa neste segundo evento pode estar associada à despolimerização da quitosana e à degradação da cadeia de xantana (WESTIN *et al.* 2017; MARTINS *et al.*, 2012; FARIA *et al.*, 2011). É possível observar uma outra inclinação na curva de TGA dentro deste intervalo, apresentando uma taxa menor. Além disso, nota-se ainda uma discreta colaboração das adições de HA nas formulações de $\text{Q}_1\text{X}_1\text{HA}_{0,2}$ e $\text{Q}_1\text{X}_1\text{HA}_1$, elevando a massa residual de 25% para 35%, aproximadamente, no terceiro estágio, a partir de 700°C. Este evento pode estar associado à decomposição de HA em β -TCP (MEHRANEH *et al.*, 2018).

Para a formulação à qual foi adicionada a maior quantidade de HA foi observado um comportamento distinto na curva de TGA em relação às anteriores (Figura 4.10d). A presença da HA colaborou para a diminuição da degradação térmica do polieletrólito quitosana-xantana, considerando que a máxima perda de massa foi de cerca de 22,5%. Este fato pode estar associado à maior presença de hidroxilas, aumentando as interações entre os grupos funcionais da HA e da membrana. Diferentemente das demais formulações, a adição de HA não apresentou perda de massa acima de 900°C. A derivada da curva indicou apenas discretos picos, representando baixa taxa de perda de massa, por volta de 80°C, 300°C e 810°C, associados à perda de água, e às decomposições da membrana quitosana-xantana e de HA em uma pequena fração de CaO, respectivamente (OTHMAN *et al.*, 2017). Excetos por estes três picos, a DTG

apresentou-se praticamente constante, indicando perda de massa quase contínua.

Figura 4.10 – Análise termogravimétrica e derivada da curva termogravimétrica das membranas produzidas: (a) $Q_1X_1HA_0$; (b) $Q_1X_1HA_{0,2}$; (c) $Q_1X_1HA_1$; (d) $Q_1X_1HA_5$.



4.2.5 Análise de aspecto

A análise visual de aspecto das amostras foi realizada pela imagem macroscópica das membranas preparadas e secas, com o intuito de observar a presença de bolhas e fraturas. Na Figura 4.11 é apresentado o aspecto de formulações com diferentes concentrações de hidroxiapatita incorporada.

Nota-se que à medida em que a concentração de hidroxiapatita incorporada à membrana aumenta, seu aspecto visual passa de translúcido para opaco/branco, quando se compara todas as formulações. A rugosidade superficial da amostra sugere uma relação diferente entre as duas faces das amostras. As faces das membranas que estiveram em contato direto com a placa de Petri, durante o processamento, apresentaram superfície lisa, enquanto que, a face exposta à atmosfera, mostrou maior rugosidade superficial. Além disso, a membrana preparada com concentração de hidroxiapatita de 5% (m/v) apresentou a maior rugosidade superficial aparente

entre os grupos de amostras.

Figura 4.11 – Visão macroscópica das membranas produzidas com diferentes concentrações de hidroxiapatita: (a) $Q_1X_1HA_0$; (b) $Q_1X_1HA_{0,2}$; (c) $Q_1X_1HA_1$; (d) $Q_1X_1HA_5$.



Não foi verificada a presença aparente de bolhas e rachaduras na superfície das membranas. As membranas secas com maior concentração de hidroxiapatita demonstraram fragilidade à manipulação. Todas as membranas quando imersas em solução aquosa por 2 min apresentaram alta flexibilidade na manipulação.

4.2.6 *Análise de espessura*

Durante o processo de lavagem das amostras, verificou-se um aumento considerável nas dimensões das membranas, principalmente naquela composta somente de quitosana e xantana. Esta expansão foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de hidroxiapatita. Na Tabela 4.3 estão indicadas as espessuras das membranas secas e após imersão por 24 horas em PBS com temperatura de 24 °C. Foram observadas diferenças estatísticas nas espessuras de todas as membranas secas e entre três das quatro formulações para as membranas úmidas.

Tabela 4.3 – Valores médios de espessura das membranas secas e úmidas para formulações preparadas com diferentes concentrações de hidroxiapatita.

Formulação	Espessura média (mm)		Variação na espessura após umedecimento (%)
	Membranas secas	Membranas úmidas	
Q ₁ X ₁ HA ₀	0,06 ± 0,01 ^{a,A}	0,38 ± 0,02 ^{b,E}	533
Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	0,25 ± 0,02 ^{c,B}	0,31 ± 0,01 ^{d,D}	24
Q ₁ X ₁ HA ₁	0,29 ± 0,01 ^{e,C}	0,38 ± 0,01 ^{f,E}	31
Q ₁ X ₁ HA ₅	0,52 ± 0,02 ^{g,D}	0,59 ± 0,01 ^{h,F}	11

Letras minúsculas iguais na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios; letras maiúsculas iguais na mesma coluna indica que não há diferença estatística entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Para aplicação em regeneração óssea e tecidual, o efeito de aumento do volume da membrana pode causar a deiscência do local, ou seja, a ruptura da ferida e exposição de seu conteúdo. Kim e Yun (2014) realizaram um levantamento pós-cirúrgico de 115 casos de implante dentário utilizando a técnica de regeneração óssea guiada. Os estudos apontaram que em 19,5% destes casos tiveram complicações devido à deiscência pós-cirúrgica.

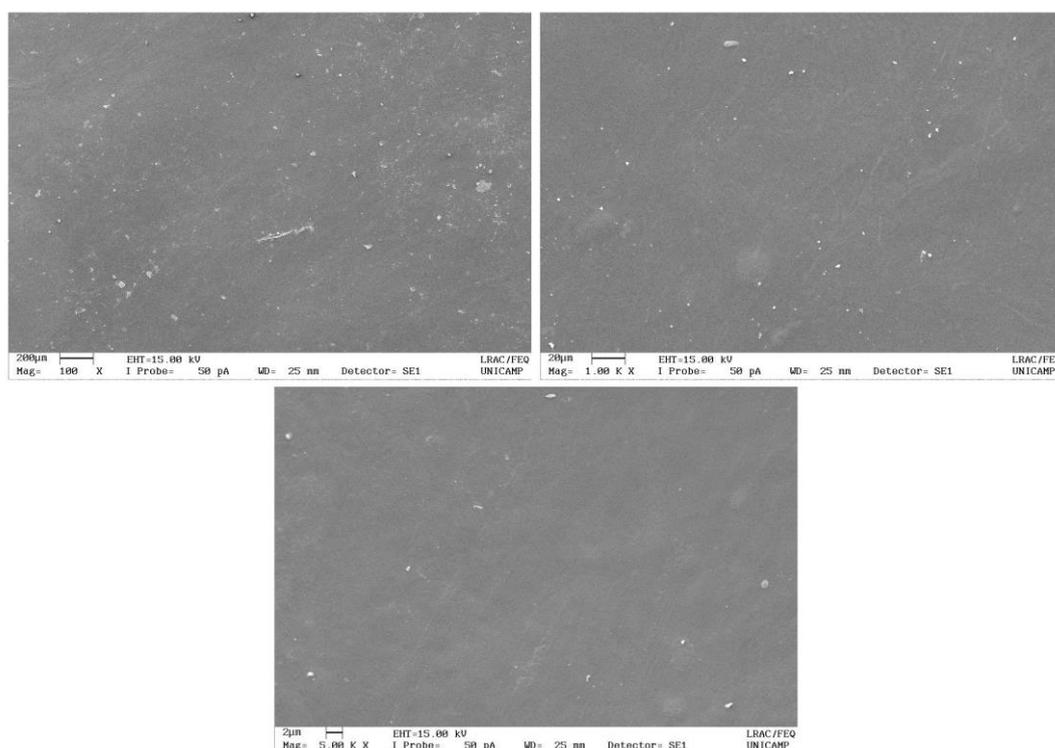
Assim como para a ROG, para a RTG a espessura da membrana também pode influenciar o processo pós-cirúrgico. O tecido adjacente pode não ter um tamanho adequado para se sobrepor à membrana, expondo-a à cavidade oral e comprometendo a regeneração (BASHUTSKI *et al.*, 2011). Apesar de demonstrar um ganho de volume em sua espessura em função da absorção de líquido, os valores obtidos neste trabalho são comparáveis aos de membranas comerciais utilizadas para aplicação odontológica. Ortolani *et al.* (2015) realizaram um estudo comparativo entre membranas de colágeno para regeneração tecidual, observando que as membranas Jason[®], Collprotect[®] e Bio-guide[®] apresentaram espessuras de 0,20; 0,28 e 0,44 mm, em estado seco, respectivamente, e que ocorre aumento da resistência das membranas com o aumento da espessura, devido ao aumento do material por unidade de área. No caso do presente trabalho, o aumento da espessura se deve ao aumento da concentração de HA no material.

4.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Conforme indicado na Figura 4.12, a análise superficial por MEV das amostras de quitosana-xantana mostrou materiais com aspecto liso e uniforme, estando de acordo com os resultados de Westin *et al.* (2017).

A incorporação do pó de hidroxiapatita foi verificada em todas as membranas. Foi possível observar os aglomerados, em forma de blocos com faces não simétricas de diferentes tamanhos, onde esta prevalência varia de acordo com a concentração de incorporação. Para a membrana produzida com 0,2 % (m/v), foi verificada uma distribuição não homogênea (Figura 4.13). Verifica-se a presença de depósitos, blocos e protuberâncias com circunferência arredondada sobre a superfície. Os depósitos são formados por estruturas arredondadas, menores que 15 μm (Figura 4.13). Mehraneh *et al.* (2018), observou estrutura semelhante à aqui descrita, a qual foi identificada como pó de hidroxiapatita nanométrico. Nas Figura 4.14 e Figura 4.15, que correspondem às formulações $\text{Q}_1\text{X}_1\text{HA}_{1,0}$ e $\text{Q}_1\text{X}_1\text{HA}_{5,0}$, pode-se observar a exposição de blocos com face lisa semelhante a placas, sendo ainda bastante visível na primeira formulação a matriz polissacarídica. Blocos maiores são encontrados em sua maioria na composição com $\text{Q}_1\text{X}_1\text{HA}_{5,0}$ (Figura 4.15).

Figura 4.12 – Micrografias eletrônicas de varredura da membrana sem a incorporação de hidroxiapatita ($\text{Q}_1\text{X}_1\text{HA}_0$).



Para as membranas com composição $\text{Q}_1\text{X}_1\text{HA}_{1,0}$, na Figura 4.14, foi verificada a presença de alguns blocos, como encontrado para o pó de hidroxiapatita apresentado neste trabalho, porém encobertos pela camada de polissacarídeos. Não foram encontrados depósitos e estruturas arredondadas aglomeradas com tamanho aproximado de 15 μm , como para a formulação de $\text{Q}_1\text{X}_1\text{HA}_{0,2}$. As protuberâncias arredondadas com algumas rachaduras sobre sua

superfície encontrados nesta formulação, se divergem da formulação de $Q_1X_1HA_{0,2}$, mesmo que em menor quantidade.

As imagens na Figura 4.14 apresentam cristais prolongados e pontiagudos, com direção vertical da face da membrana. As análises de DRX e FTIR não evidenciaram outras fases precursoras da hidroxiapatita. É possível também que os depósitos não observados contendo partículas com tamanho inferior a $15\ \mu\text{m}$, tenham ficado no interior da membrana.

As membranas da formulação $Q_1X_1HA_{5,0}$ possui poucos espaços com superfície lisa aparente como encontrado para a formulação $Q_1X_1HA_0$. São observadas camadas de blocos e aglomerados de diferentes tamanhos sobre a superfície, com dimensões menores que $150\ \mu\text{m}$, assim como partículas de $15\ \mu\text{m}$, porém em menor quantidade.

Figura 4.13 – Micrografias eletrônicas de varredura da membrana contendo hidroxiapatita com formulação $Q_1X_1HA_{0,2}$.

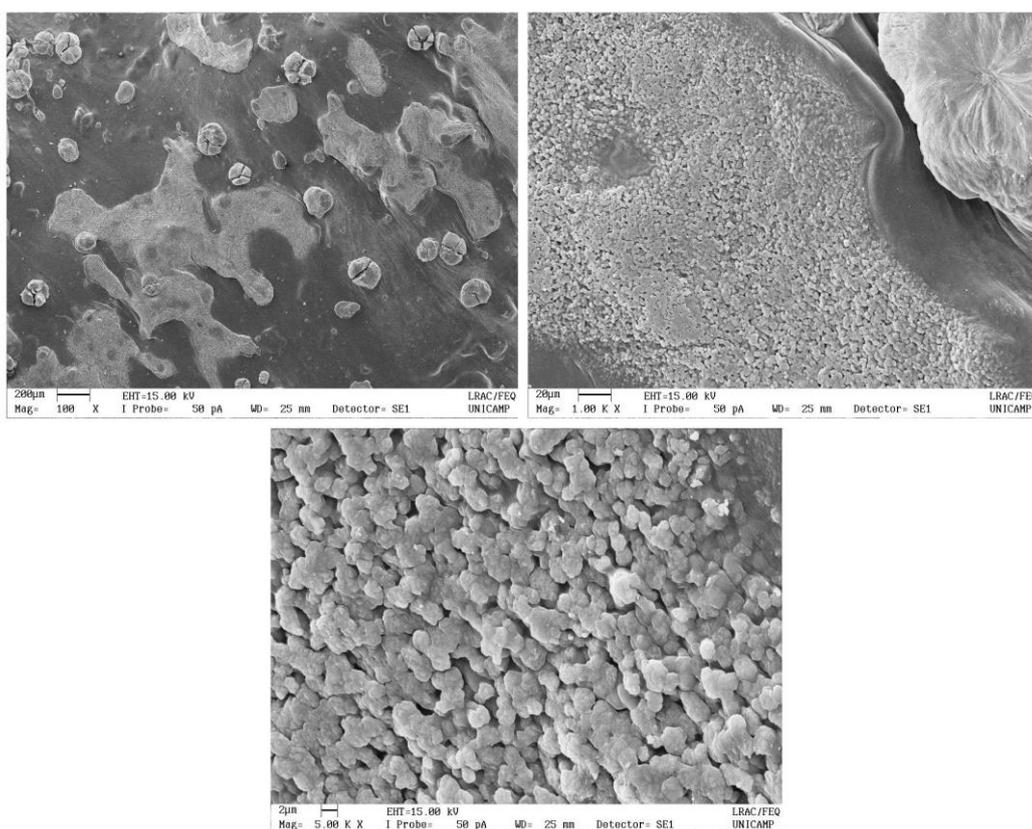
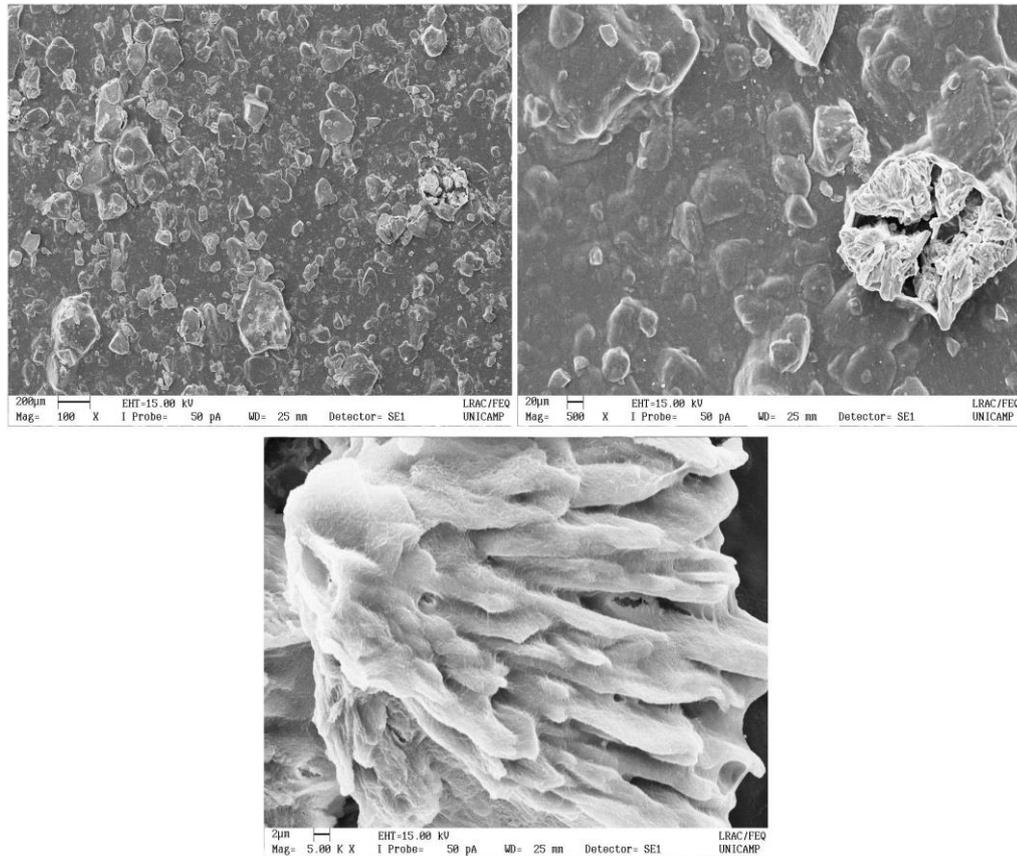
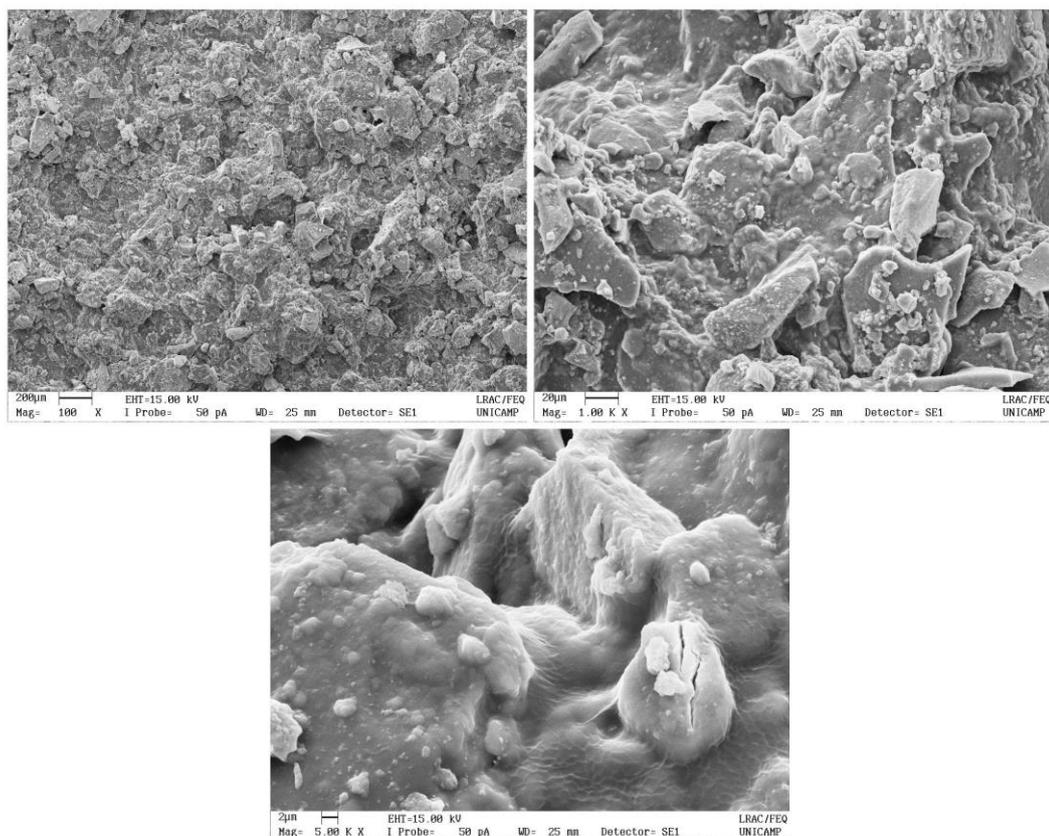


Figura 4.14 – Micrografias eletrônicas de varredura da membrana contendo hidroxiapatita com formulação $Q_1X_1HA_{1,0}$.



A Figura 4.15 mostra uma região parecida com a evidenciada na formulação de $Q_1X_1HA_{0,2}$, onde são encontradas partículas com tamanho inferior a $15\ \mu\text{m}$. Foram observados também certos vales causados pela deposição de blocos sobrepostos e interligados por fina camada de membrana. Nesta formulação, não foram observadas regiões com colunas arredondadas com rachaduras na superfície, como apresentado nas formulações anteriores.

Figura 4.15 – Micrografias eletrônicas de varredura da membrana contendo hidroxiapatita com formulação $Q_1X_1H_{5,0}$.

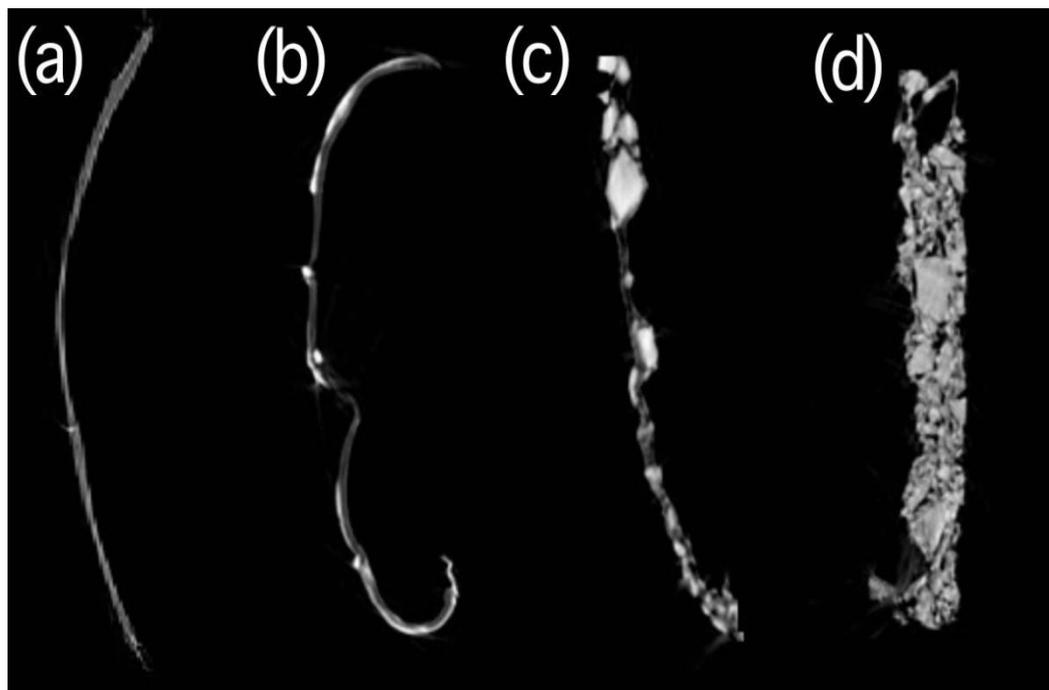


4.2.8 *Micro CT*

Imagens bidimensionais das membranas podem ser observadas na Figura 4.16. A análise por micro CT confirmou os resultados obtidos pela análise de espessura, indicando aumento de espessura das membranas secas de acordo com o aumento da incorporação de hidroxiapatita de 0,2% (Figura 4.16b) para 5% (Figura 4.16d). Além disso, confirmou-se a presença de aglomerados de hidroxiapatita distribuídos não homogeneamente na membrana, como foi observado pela análise de aspecto e por MEV. O comprometimento da homogeneidade na distribuição da HA pode ser resultante da própria distribuição de tamanho das partículas, que tendem a se agregar. A formulação contendo 0,2%, comprova que independentemente do tamanho da partícula, as mesmas possuem uma tendência de aglomeração, confirmando assim o primeiro fator. Para a formulação $Q_1X_1H_{5,0}$ foi possível, ainda, observar a incorporação de partículas pequenas e blocos maiores em toda a espessura da membrana (Figura 4.16 d). Estes blocos maiores, assim como citado anteriormente para o composto Bio-Oss[®], podem fazer parte da constituição óssea no novo osso formado, para a regeneração óssea guiada.

Figura 4.16 – Imagem bidimensional das membranas incorporando hidroxiapatita: (a)

Q₁X₁H₀; (b) Q₁X₁H_{0,2}; (c) Q₁X₁H_{1,0}; (d) Q₁X₁H_{5,0}.



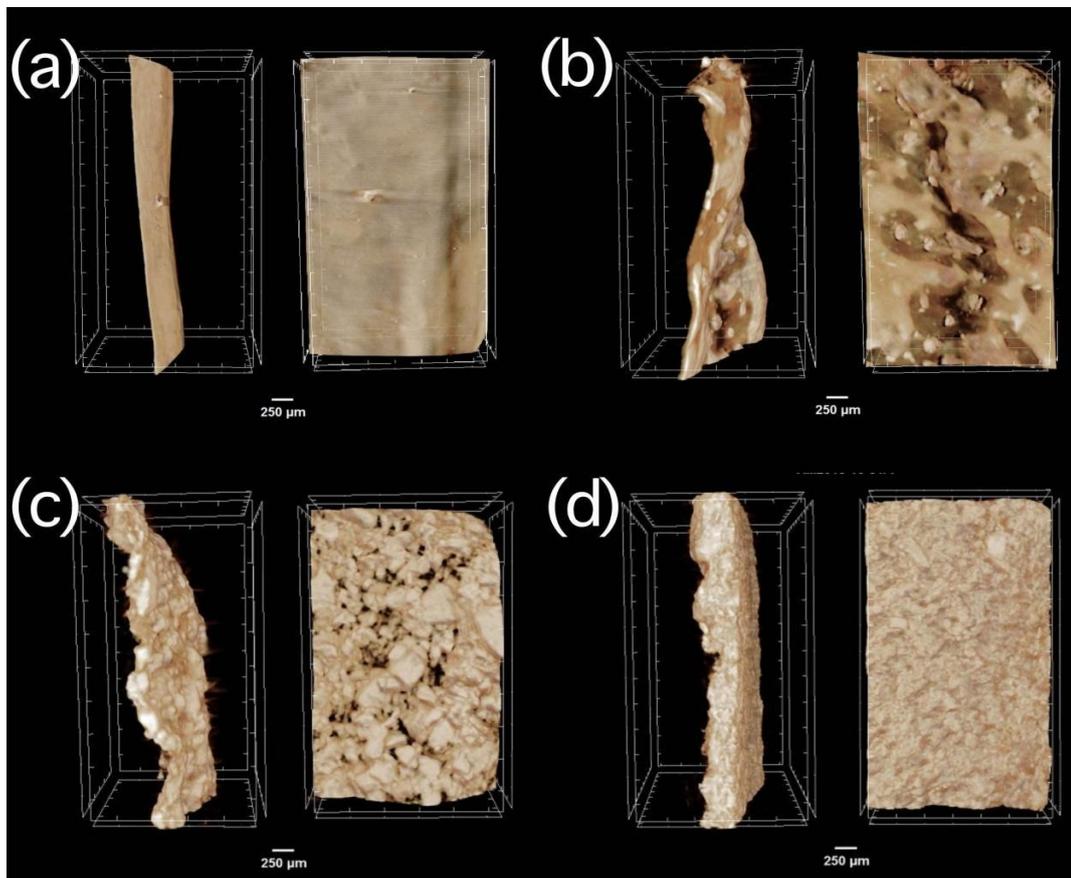
A reconstrução das projeções em 3D foi realizada a partir da compilação das imagens bidimensionais, como pode ser observado na Figura 4.17, demonstrando desde o volume 3D e o aspecto superficial até a porosidade presente nas membranas produzidas. A análise da projeção em 3D indica que a mudança no aspecto visual, de translúcido para opaco, à medida em que ocorre um aumento na concentração de hidroxiapatita incorporada, ocorre devido ao aumento do volume presente de hidroxiapatita em toda a membrana produzida, bem como o aumento da presença dos aglomerados e blocos, anteriormente observados por MEV. A avaliação qualitativa e quantitativa do volume e porosidade no interior das membranas, em estado seco, pode ser observada na Tabela 4.4. O aumento no volume das membranas produzidas, neste caso, foi acompanhado pelo aumento da porosidade até certa concentração de HA incorporada. A formulação de Q₁X₁H_{1,0} mostrou uma relação de porosidade de 0,1% maior, quando comparada com a formulação de Q₁X₁H_{5,0}. A menor espessura e porosidade (abaixo de 10%) está de acordo com o objetivo deste estudo, que foi o de produzir uma barreira biológica para aplicação em regeneração óssea guiada, e é comparável à de membranas comerciais (ORTOLANI *et al.*, 2015). A literatura ainda não apresenta uma posição consensual sobre a melhor porosidade, ou até mesmo se a membrana bioabsorvível precisa ser porosa (MARDAS *et al.*, 2003) para a aplicação na regeneração óssea guiada. Estudos indicam que uma membrana produzida como a deste estudo, com baixa porosidade, ou seja, menor que 10%, possui a principal função de impedir a invasão do tecido mole adjacente ao defeito ósseo, mantendo as

células ósseas e fatores de indução no local para a promover a neoformação óssea (PINEDA *et al.*, 1996). Outros estudos indicam a importância da porosidade, que permite uma adequada vascularização, principalmente em grandes defeitos ósseos (GUGALA e GOGOLEWSKI, 1999). Entretanto, uma porosidade ideal (tamanho e grau de porosidade) ainda não foi definida na literatura, e não se verifica padronização nesse sentido nas membranas comerciais. Destaca-se ainda que os resultados aqui apresentados são referentes a amostras em estado seco. Devido às condições de operação do equipamento, ocorre evaporação do fluido durante a análise, mas nas condições esperadas de uso *in vivo* do biomaterial, pelo contato com fluidos fisiológicos, as membranas sofreriam intumescimento, o que ocasionaria o aumento de sua espessura. Este aumento pode também influenciar a porosidade destas membranas.

Tabela 4.4 – Valores de porosidade para formulações preparadas com diferentes concentrações de hidroxiapatita.

Formulação	Volume (mm³)	Porosidade (%)
Q ₁ X ₁ HA ₀	0,4	2,3
Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	0,8	5,5
Q ₁ X ₁ HA ₁	1,3	8,5
Q ₁ X ₁ HA ₅	2,0	8,4

Figura 4.17 – Imagens tridimensionais das membranas incorporando hidroxiapatita: (a) $Q_1X_1H_0$; (b) $Q_1X_1H_{0,2}$; (c) $Q_1X_1H_{1,0}$; (d) $Q_1X_1H_{5,0}$.



4.2.9 *Microscopia confocal*

A análise confocal permitiu avaliar o aspecto topográfico das membranas e sua rugosidade. Foram obtidos os valores de rugosidade média (R_a) e rugosidade média quadrática (R_q). As análises foram feitas com as membranas úmidas em solução de PBS 1X por 24 horas. Na Tabela 4.5 são mostrados os resultados obtidos para as áreas avaliadas. Ambas as faces da membrana foram analisadas. A identificação F1 (Face 1), corresponde à face da membrana que ficou em contato com a placa de Petri durante a etapa de secagem da amostra. A identificação F2 (Face 2), corresponde à face que ficou em contato com a atmosfera durante a etapa de secagem.

Tabela 4.5 - Resultados de rugosidade obtidos por microscopia confocal.

Formulações	Ra (μm)		Rq (μm)	
	Face 1	Face 2	Face 1	Face 2
Q ₁ X ₁ HA ₀	8,31 ± 1,84 ^{a,A}	8,59 ± 2,88 ^{a,C}	9,97 ± 1,82 ^{a,E}	10,23 ± 3,21 ^{a,G}
Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	8,55 ± 1,53 ^{b,A}	9,30 ± 2,88 ^{b,C}	9,98 ± 1,25 ^{b,E}	11,15 ± 2,22 ^{b,G}
Q ₁ X ₁ HA ₁	6,57 ± 4,59 ^{c,A,B}	17,52 ± 2,65 ^{d,D}	8,03 ± 4,98 ^{c,E,F}	21,23 ± 2,56 ^{d,H}
Q ₁ X ₁ HA ₅	3,42 ± 0,89 ^{e,B}	22,72 ± 10,60 ^{f,D}	4,51 ± 1,05 ^{e,F}	27,78 ± 12,57 ^{f,H}

Letras minúsculas iguais na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios; letras maiúsculas iguais na mesma coluna indica que não há diferença estatística entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A análise da face das membranas voltada para a atmosfera durante a secagem (F2) mostrou que o aumento da concentração de hidroxiapatita a partir de 1% (m/v), ocasionou também seu aumento de rugosidade, porém não houve diferença significativa entre 1 e 5% (m/v) desta adição. Esta relação se mostrou inversa quando comparado a face que ficou em contato com placa (F1), a qual apresentou um decréscimo de sua rugosidade quando do aumento da incorporação de hidroxiapatita nas proporções de 0,2 e 5% (m/v). A afinidade e acomodação entre as moléculas de quitosana e xantana, assim como o tempo longo de secagem, o que pode favorecer ainda mais esta afinidade e acomodação, pode ter ocasionado esta evidência.

Para a face 1, as amostras preparadas nas concentrações de HA de 0,2% (Q₁X₁HA_{0,2}) e 1,0% (Q₁X₁HA₁) tiveram resultado comparáveis ao da membrana controle (Q₁X₁HA₀).

Bombaldi de Souza *et al.* (2019) obtiveram resultado abaixo do apresentado neste trabalho, quando utilizado rugosímetro (Mitutoyo, SJ-210). Para a formulação de quitosana e xantana os resultados foram de $4,94 \pm 1,05$, para rugosidade média (Ra) e $6,24 \pm 1,39$ para rugosidade quadrática (Rq). Estes resultados foram analisados em estado seco, o que deve ser considerado, devido também ao seu potencial de absorção de soluções aquosas.

Figura 4.18 –Imagens tridimensionais da formulação $Q_1X_1H_0$ obtidas por microscopia confocal, com as dimensões analisadas em todos os eixos expressas em micrômetros: (a) Face 1 e (b) Face 2.

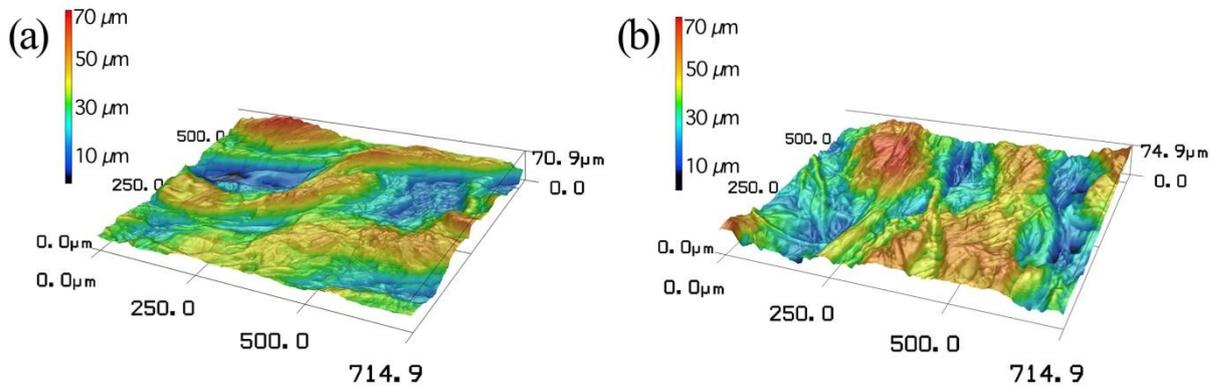
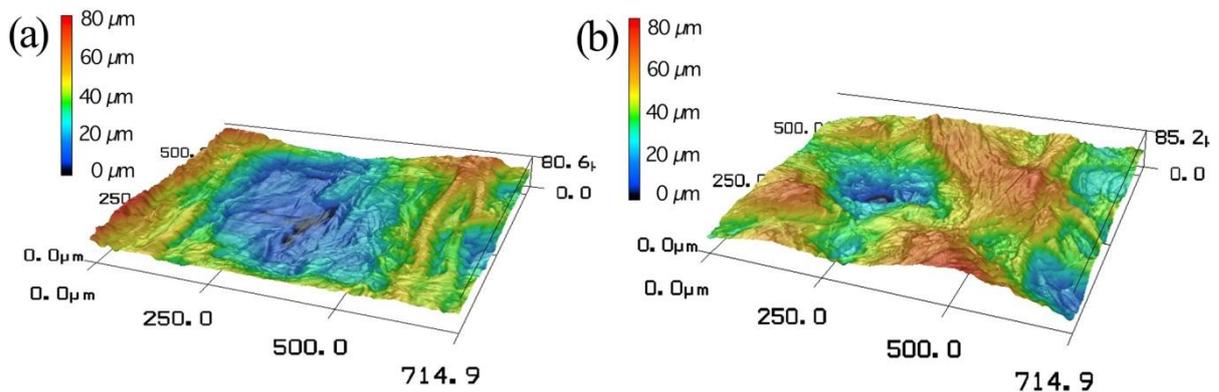


Figura 4.19 – Imagens tridimensionais da formulação $Q_1X_1H_{0,2}$ obtidas por microscopia confocal, com as dimensões analisadas em todos os eixos expressas em micrômetros: (a) Face 1 e (b) Face 2.



Para a amostra da formulação $Q_1X_1HA_5$, todos os valores de rugosidade foram maiores em relação às formulações anteriores, quando observada a face 2. Assim como no MEV, a

Figura 4.21(b) mostra uma região onde é possível observar um pico na escala aproximada de 140 a 200 μm . As condições do complexo polieletrólito, ou seja, as cargas negativas da molécula de xantana e negativa da molécula de quitosana em seus pKa adequados, favorecem a formação da membrana em relação à interação com as partículas de HA incorporadas. Esta reação fez com que as partículas de HA fossem deslocadas para a superfície da membrana, ocasionando assim maior rugosidade em relação às faces.

Figura 4.20 – Imagens tridimensionais da formulação $Q_1X_1H_{1,0}$ obtidas por microscopia confocal, com as dimensões analisadas em todos os eixos expressas em micrômetros: (a) Face 1 e (b) Face 2.

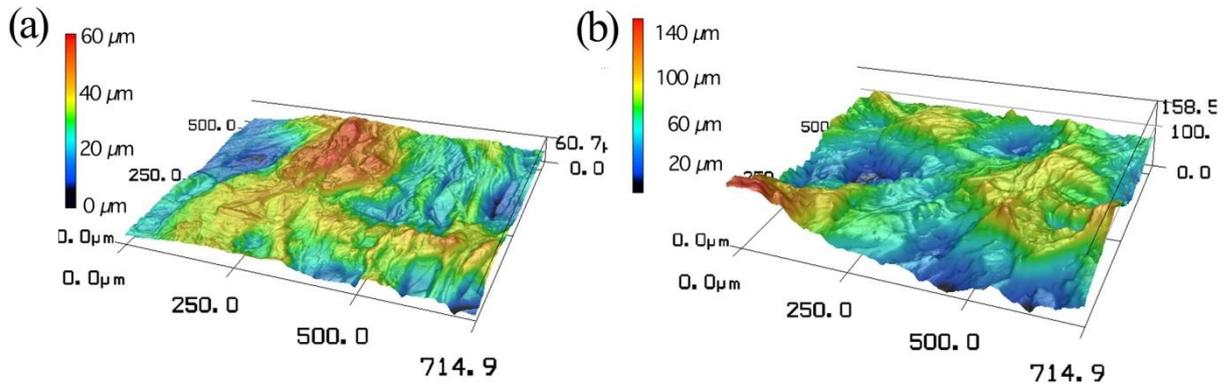
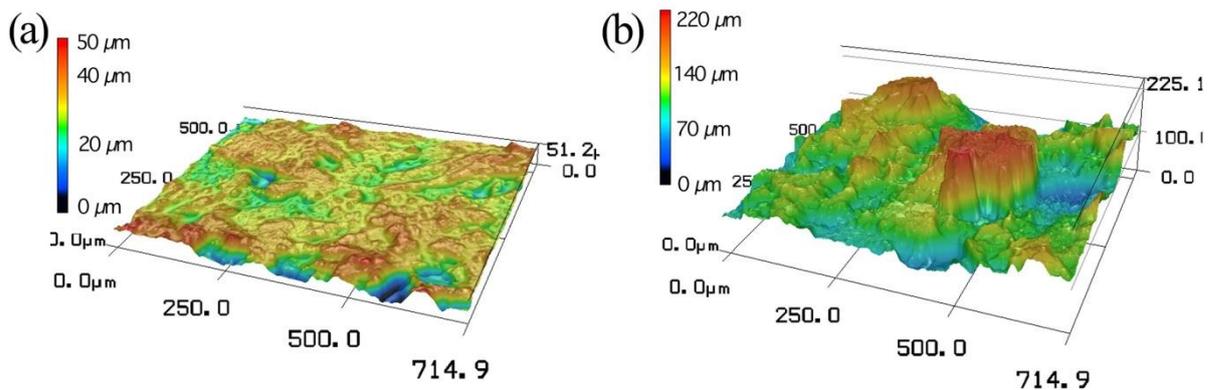


Figura 4.21 – Imagens tridimensionais da formulação $Q_1X_1H_{5,0}$ obtidas por microscopia confocal, com as dimensões analisadas em todos os eixos expressas em micrômetros: (a) Face 1 e (b) Face 2.



Nguyen *et al.* (2016) realizaram uma revisão bibliográfica da importância topográfica e a dimensão de sua escala para a adesão de células do tipo osteoblastos MG63. Foi observado que a locomoção pode ser aumentada quando para materiais com rugosidade nanométrica, porém as adesões focais, essenciais para a locomoção das células, podem ser obtidas pelo aspecto micrométrico de rugosidade. A combinação de nano e micro-escala em biomaterial, assim como sua dureza, no caso de crescimento ósseo, pode favorecer a osteocondução do local.

4.2.10 Capacidade de absorção e perda de massa

Com a observação macroscópica do aumento de volume das membranas após a lavagem, assim como do aumento da espessura, a análise de absorção de diferentes fluidos foi realizada para verificar sua incorporação pela matriz e também seu efeito na estabilidade das mesmas.

Os resultados obtidos para a absorção estão indicados na Tabela 4.6, enquanto os dados referentes à estabilidade, expressos em termos de perda de massa, são mostrados na Tabela 4.7.

Os resultados encontrados na análise de espessura são confirmados pelos dados de absorção de fluidos, sendo atribuídos particularmente à presença dos polissacarídeos, que são capazes de formar ligações de hidrogênio com a solução aquosa. Nota-se que, ao aumentar a concentração de hidroxiapatita nas formulações, sua capacidade de absorção é diminuída para ambos os fluidos. Alguns resultados preliminares obtidos não apresentados neste trabalho, demonstraram que não houve diferença estatística de absorção dos fluidos apresentados na Tabela 4.6, no período de 30 minutos. Para a formulação de quitosana e xantana somente (Q₁X₁HA₀), há ainda uma diferença estatística entre a absorção de PBS e meio DMEM + 10% SFB.

Tabela 4.6 – Valores médios de absorção fluídica após 24 h pelas membranas com formulações preparadas com diferentes concentrações de hidroxiapatita.

Fluido utilizado	Capacidade de absorção (g/g)			
	Q ₁ X ₁ HA ₀	Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	Q ₁ X ₁ HA ₁	Q ₁ X ₁ HA ₅
PBS	5,82 ± 0,38 ^a	4,17 ± 0,18 ^b	2,91 ± 0,10 ^d	1,38 ± 0,03 ^e
DMEM + 10% SFB	7,99 ± 0,39 ^c	4,73 ± 0,06 ^b	3,40 ± 0,48 ^d	1,37 ± 0,03 ^e

Mesma letra na mesma linha ou coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, p<0,05).

Tabela 4.7 – Valores médios de perda de massa de membranas preparadas com diferentes concentrações de hidroxiapatita após o período de 7 dias em contato com diferentes fluidos.

Fluido utilizado	Perda de massa (%)			
	Q ₁ X ₁ HA ₀	Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	Q ₁ X ₁ HA ₁	Q ₁ X ₁ HA ₅
PBS	5,96 ± 2,21 ^a	6,18 ± 5,54 ^a	4,68 ± 1,24 ^a	0,09 ± 0,17 ^c
DMEM + 10% SFB	5,65 ± 1,01 ^a	-0,69 ± 0,74 ^b	-1,48 ± 0,92 ^d	-1,67 ± 1,49 ^c

Mesma letra na mesma linha ou coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, p<0,05).

No estudo de Bellini *et al.* (2015c), esta diferença também é verificada. A capacidade absorptiva da formulação de quitosana e xantana (Q₁X₁HA₀) para o meio de cultivo encontrada no estudo foi de 6,9 ± 0,4 (g/g), ou seja, próxima do valor apresentado neste trabalho de 7,9 ± 0,4 (g/g). Westin *et al.* (2017) obteve resultado superior pela imersão em meio α-MEM + 10% SFB, observando que a formulação de quitosana e xantana foi capaz de absorver 13,2 ± 1,88 (g/g) para membranas porosas.

Estes dados podem ser também comparados ao comportamento de dispositivos de quitosana incorporando hidroxiapatita para aplicação em regeneração óssea. Brun *et al.* (2014) formulou um arcabouço composto de 0,2% (m/v) de hidroxiapatita em quitosana. Esta adição ocasionou um decréscimo de aproximadamente 60% na absorção de meio DMEM + 10% SFB. Em termos comparativos, levando em consideração a formulação apresentada neste trabalho produzida na presença de 0,2% de hidroxiapatita, pode se observar uma variação próxima a 60%, em relação à formulação QX em meio DMEM suplementado.

A formulação de quitosana-xantana sem a adição do composto hidroxiapatita mostrou-se mais estável quando comparada à dos trabalhos de Westin *et al.* (2017) e Bellini *et al.* (2015c). Ambos encontraram valores diferentes entre si, e aproximadamente cerca de 30% acima ao encontrado neste trabalho. Westin *et al.* (2017) relatam uma variação entre 42,3 a 49,8% de perda em ambas as soluções aqui apresentadas, diferentemente dos 34,7% por Bellini *et al.* (2015b). Ambos os trabalhos (Westin *et al.*, 2017 e Bellini *et al.*, 2015b) utilizaram a metodologia de secagem em estufa. Este processo pode acelerar a perda de água e não propiciar tempo adequado para a interação dos polieletrólitos quitosana e xantana.

O processo de secagem utilizado neste trabalho gera membranas com baixa porosidade, atendendo à proposta de utilização final pretendida, de uso como barreira biológica, e também favorecendo a menor absorção das soluções aquosas avaliadas e a consequente estabilidade dos dispositivos nas mesmas, mesmo por períodos prolongados. A perda de massa foi diferente ao se comparar os dados obtidos para os diferentes fluidos utilizados nas formulações contendo hidroxiapatita incorporada. Não houve perda de massa em DMEM + 10% de soro fetal bovino durante o período de incubação. Observou-se certo ganho de massa, porém não significativo. Uma possível explicação para o ganho de massa observado é a própria bioatividade da hidroxiapatita, já que a deposição de sais, como a apatita, e material orgânico presente no fluido, pode ocorrer quando em condições fisiológicas à temperatura de 37°C, causando a adsorção destes elementos à membrana (KOKUBO e YAMAGUCHI, 2010).

Em PBS verificou-se também uma baixa perda de massa (entre 4,7 e 6,2%) para as formulações $Q_1X_1HA_0$, $Q_1X_1HA_{0,2}$ e $Q_1X_1HA_1$, sem diferenças estatisticamente significativas entre si. A formulação de $Q_1X_1HA_5$ contendo 5% (m/v) de hidroxiapatita não apresentou perda de massa significativa. A análise de TGA apresentada neste trabalho também aponta boa estabilidade térmica desta formulação.

Assim, o aumento da concentração de hidroxiapatita no nível mais elevado utilizado neste trabalho sugere que o material seja estável em diferentes situações e, principalmente, em ambiente fisiológico, o que é importante do ponto de vista da aplicação desejada. A recuperação

óssea e a chegada de células para o preenchimento ósseo podem levar até 6 semanas, enquanto a formação do tecido ósseo saudável pode durar até 6 meses, em condições normais (WANG *et al.*, 2016).

4.2.11 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos materiais utilizados em regeneração óssea podem fornecer informações de sua resistência à fratura e rigidez quando submetidas a determinadas condições de manipulação ou utilização. Para sua aplicação na regeneração óssea guiada, o biomaterial deve apresentar apropriada resistência mecânica para suportar os tecidos subjacentes e a exposição à cavidade oral sem sofrer rompimento local (ELGALI *et al.*, 2017). Assim, a avaliação das propriedades mecânicas dos biomateriais foi realizada com o intuito de obter tais informações e verificar se a incorporação de diferentes concentrações de hidroxiapatita resultava em modificações nas mesmas.

Visto que durante o ato cirúrgico as membranas entram em contato com diversos fluidos biológicos, o ensaio foi realizado com amostras totalmente saturadas por PBS 1X. Os resultados alcançados encontram-se sumarizados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Valores médios das propriedades mecânicas das membranas úmidas para formulações preparadas com diferentes concentrações de hidroxiapatita.

Parâmetro	Propriedades mecânicas			
	Q ₁ X ₁ HA ₀	Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	Q ₁ X ₁ HA ₁	Q ₁ X ₁ HA ₅
Alongamento na ruptura (%)	152,44 ± 10,75 ^a	139,79 ± 2,38 ^a	151,72 ± 7,01 ^a	144,99 ± 8,68 ^a
Tensão na ruptura (kPa)	288,17 ± 76,55 ^d	50,51 ± 11,17 ^b	211,59 ± 16,12 ^d	83,28 ± 9,64 ^c

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A capacidade de alongamento das membranas nas condições testadas não apresentou diferença estatística para as diferentes formulações. Estes valores estão acima dos valores encontrados por Westin *et al.* (2017) (igual a 1,85 % ± 0,44, para suportes porosos de quitosana-xantana na proporção de 1:1 m/m), por Bellini *et al.* (2015c) (iguais a 2,0 % ± 0,7 e 2,1 % ± 0,6 para membranas densas e porosas, respectivamente) que analisaram amostras secas, e por Bombaldi de Souza *et al.* (2017), de cerca de 1,7%, para amostras em condição de umidade de 22%. Por outro lado, a comparação dos valores alcançados no presente trabalho com os obtidos por Bombaldi de Souza *et al.* (2017) para membranas de quitosana-xantana úmidas (de cerca

de 45%) demonstrou um maior alongamento para as membranas aqui descritas. Possivelmente, este comportamento está, ao menos parcialmente, atribuído à diferença do procedimento de secagem inicial das membranas, realizado no presente trabalho a 24°C e umidade de 59% ao longo de 5 dias, em contraste com a secagem realizada por 24 h a 37°C por Bombaldi de Souza *et al.* (2017) e do processo de neutralização do material. Estas diferenças podem ter contribuído para uma organização diferenciada das cadeias poliméricas. Além disso, esta propriedade de alongamento demonstra também que o material tem potencial para resistir em condições desfavoráveis, durante o ato cirúrgico e o período pós-operatório.

Quanto à tensão na ruptura, Westin *et al.* (2017) e Bellini *et al.* (2015c) verificaram valores mais elevados, que os observados neste trabalho, para membranas compostas somente de quitosana e xantana, respectivamente $1,33 \pm 0,26$ e $12,7 \pm 2,0$ MPa. Entretanto, como já apontado anteriormente, as amostras estavam secas. Para membranas de quitosana e xantana com 22% de umidade e totalmente úmidas, Bombaldi de Souza *et al.* (2017) encontraram valores de, respectivamente, 9,4 e 0,9 MPa para a tensão no ponto de ruptura, observando que esta propriedade diminui à medida em que a umidade aumenta. O valor de 0,9 MPa ainda assim é mais elevado que o determinado neste trabalho para a mesma formulação $Q_1X_1HA_0$ (0,3 MPa) pois a relação de massa de polissacarídeos por centímetro quadrado nos trabalhos discutidos acima, é significativamente maior que a das membranas aqui produzidas. No presente trabalho, o preparado foi dispensado em placas com o mesmo diâmetro, porém em volumes menores, de, no caso, 70 mL, em comparação aos 250mL nos trabalhos citados. O volume de 70 mL foi escolhido com base em ensaios preliminares realizados, porém não aqui apresentados, nos quais se buscou o compromisso entre o valor de espessura adequado para se obter uma membrana suficientemente coesa, mas idealmente não superior ao dos biomateriais deste tipo já disponíveis no mercado. Para volumes acima de 70 mL, durante a etapa de secagem, foi verificada a formação de uma borda mais densa, com maior concentração de massa nas extremidades. Este fato poderia levar à não homogeneidade do material e interferir nas análises pretendidas.

Comparando-se as três formulações contendo HA, pode-se observar que parece existir um pico máximo na relação ideal de incorporação de hidroxiapatita no que se refere à tensão na ruptura. Os valores de tensão no ponto de rompimento foram estatisticamente equivalentes para as formulações $Q_1X_1HA_0$ e $Q_1X_1HA_1$. Ambas as formulações, quando úmidas, apresentam áreas transversais iguais, conforme espessura apresentada na Tabela 4.3. A capacidade de absorção da membrana de quitosana-xantana está diretamente relacionada ao ganho de área, o que aumenta esta relação. Analisando-se o resultado de XRF para as membranas contendo

hidroxiapatita, foi verificada uma relação de cálcio e fósforo diferente da apresentada pelo pó. Para a membrana contendo 1,0% (m/v) de hidroxiapatita dispersa, esta relação foi de 2,02 Ca/P. Nesta formulação, o cálcio livre poderia interagir com grupos de cargas negativas, presentes na xantana, reticulando as membranas. Estas interações poderiam explicar o resultado observado no ensaio mecânico.

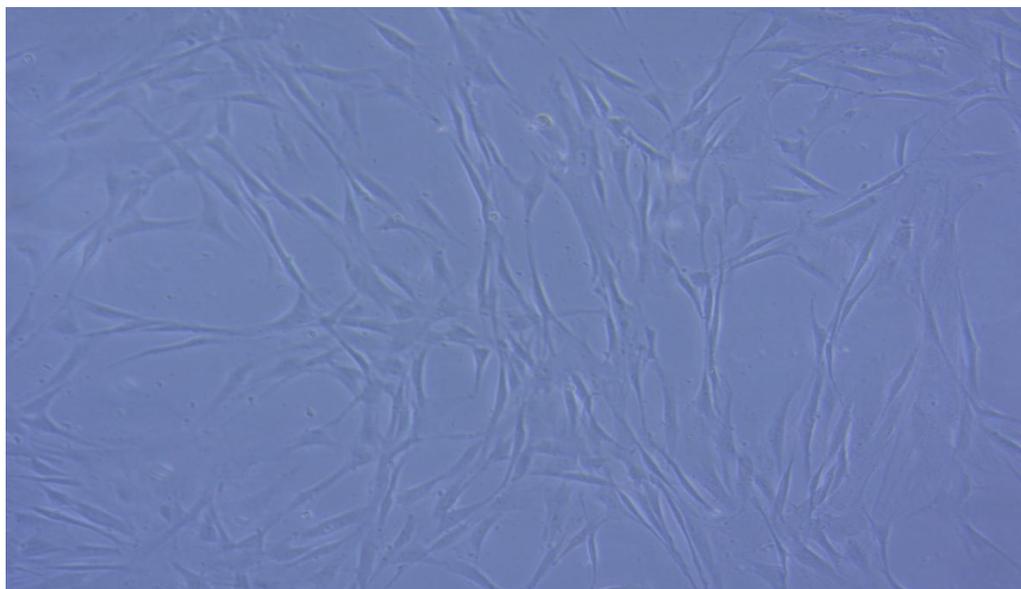
4.2.12 Caracterização das células-tronco mesenquimais

Para a utilização das células-tronco mesenquimais, as amostras foram caracterizadas quanto a sua viabilidade, imunofenotipagem e taxa de duplicação, antes da inoculação direta nas membranas para o ensaio de viabilidade empregando o MTT como indicador do estado metabólico celular.

A morfologia das células na 8^a passagem é mostrada na Figura 4.22, sendo esta típica de células-tronco mesenquimais. As células apresentaram o corpo alongado em formato fibroblastóide e com prolongamentos citoplasmáticos, e viabilidade de 96%. Morfologia semelhante foi obtida por Benício *et al.* (2018) em um estudo comparativo de cultivo primário de células extraídas da polpa dentária em tempos diferentes.

Suchánek *et al.* (2017) obtiveram resultados morfológicamente iguais ao formato fibroblastóide no cultivo de células Neo-natais da polpa do dente de leite. Estes autores verificaram viabilidade igual a 92% destas células quando na 10^a passagem, o que mostra que o dado obtido neste trabalho, igual a 96%, consiste em um bom resultado. A confluência em que as células são coletadas para sua utilização, se muito elevada, pode diminuir esta viabilidade devido ao pouco espaço disponível para a multiplicação celular, à competição pelos nutrientes e à formação de metabólitos como o lactato e o amônio.

Figura 4.22 – Morfologia das células-tronco mesenquimais na oitava passagem, antes de sua utilização nos ensaios *in vitro* (objetiva de 10X).

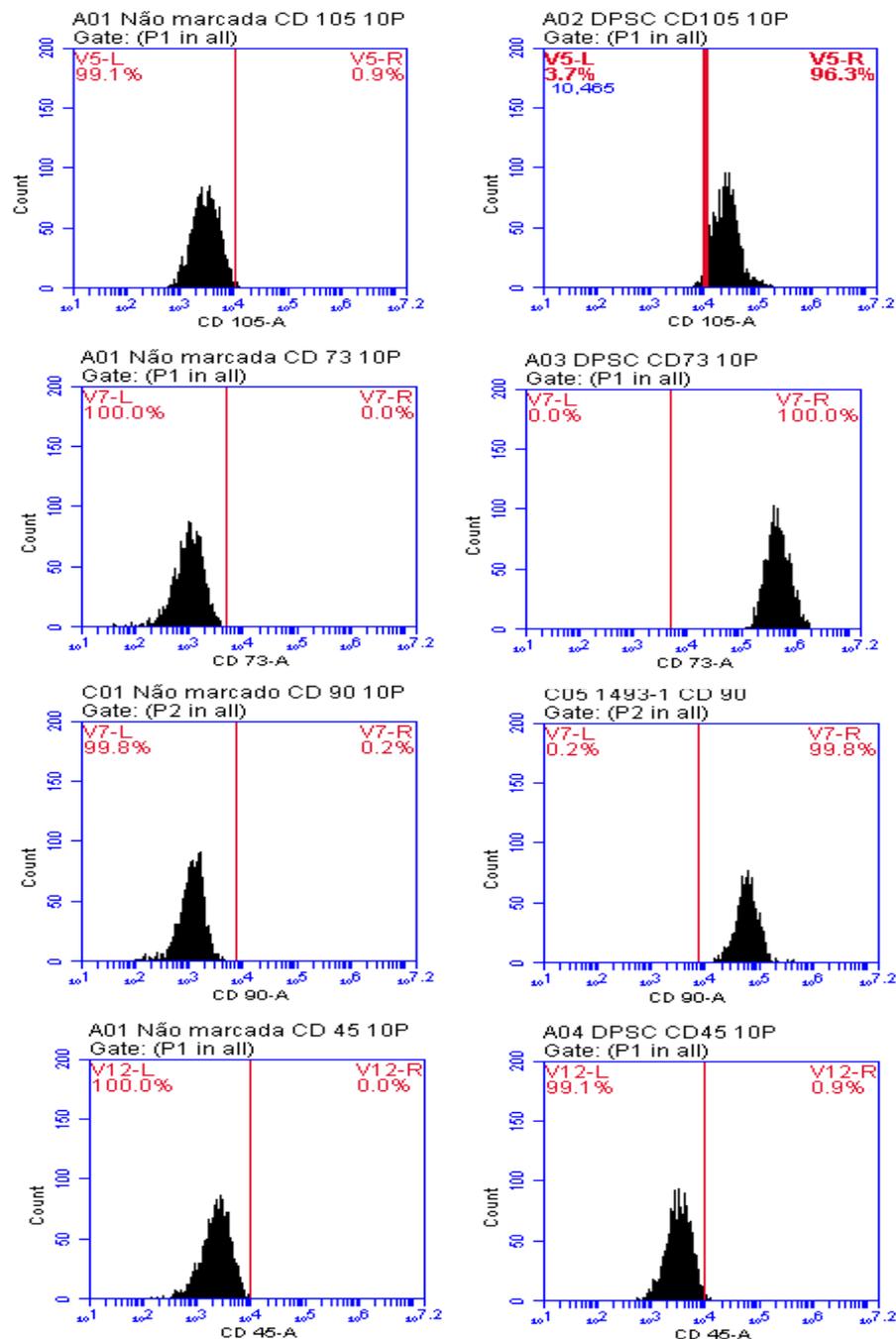


A Sociedade Internacional de Terapia Celular, da sigla em inglês *ISCT*, propôs em 2005 valores específicos de marcadores imunofenotípicos que caracterizam as células mesenquimais (DOMINICI *et.al.*, 2006). Os marcadores selecionados para este trabalho foram o CD 105, CD 73 e CD 90, como marcadores positivos para células mesenquimais, além do CD 45 como marcador negativo. Foi estabelecido pela ISCT que a expressão dos marcadores positivos de superfície celular deve ocorrer em pelo menos 95% da população em estudo e para os negativos, menor que 2%. Na Tabela 4.9 estão compilados os valores obtidos dos marcadores de superfície no presente trabalho e na Figura 4.23, os histogramas de frequência populacional. Observa-se que os resultados obtidos para as células estão na faixa preconizada pela *ISCT*.

Tabela 4.9 – Valores obtidos dos marcadores de imunofenotipagem por citometria de fluxo para a população celular na 8^a passagem.

Caracterização imunofenotípica	Marcador			
	CD 105	CD 90	CD 73	CD 45
Nível de expressão (%)	96,3	99,8	100,0	0,9

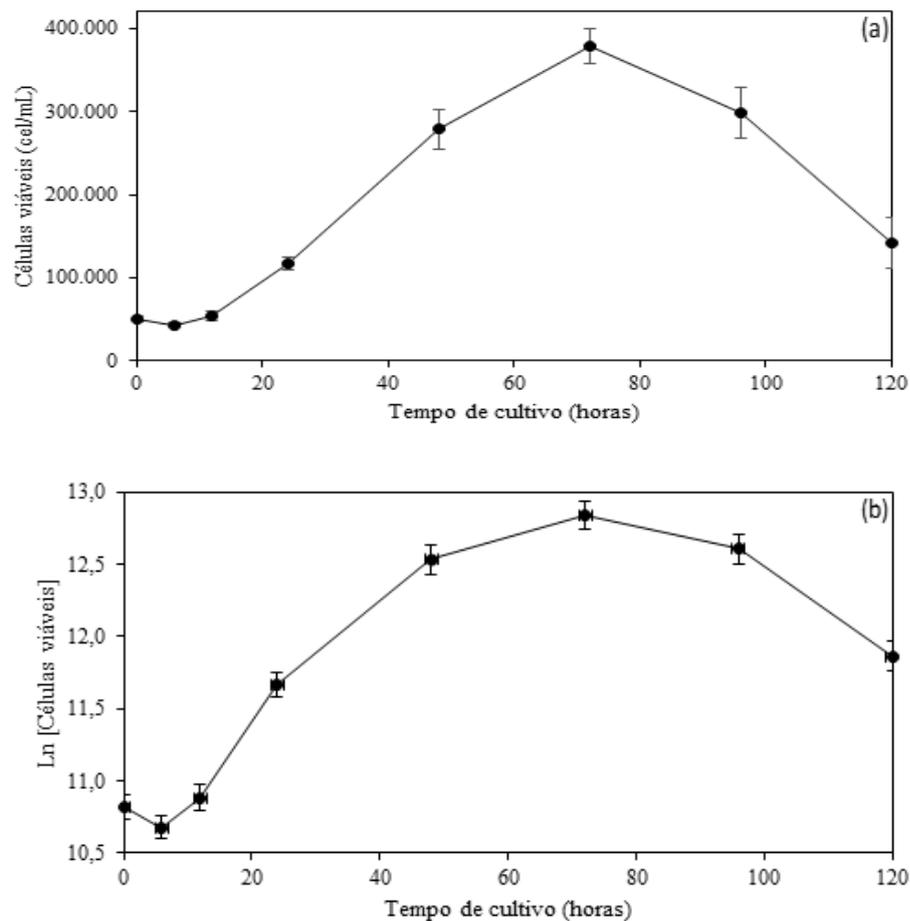
Figura 4.23 – Histogramas obtidos por imunofenotipagem das DPSC analisadas por citometria de fluxo.



Nahid *et al.* (2015) obtiveram valores dentro do especificado pela ISCT para células extraídas a partir do terceiro molar, sendo de 97%, 98%, 98% e nulo respectivamente para os marcadores CD 105, CD 90, CD 73 e CD 45. Suchánek *et al.* (2017), utilizando células neonatais na 5^o passagem, também observaram o enquadramento do preconizado pela ISCT observando valores de 99% para os três marcadores positivos CD 105, CD 90 e CD73, não analisando, entretanto, dados de marcadores negativos.

O momento do destacamento das células da superfície dos frascos de cultivo é importante para a obtenção de células na fase log de crescimento. A padronização da porcentagem de confluência e do tempo de cultivo fornece claros indicativos desta fase. Assim, foi analisada a cinética de crescimento celular, para a determinação da taxa de duplicação e da taxa específica máxima de crescimento celular. As Figura 4.24 (a) e (b) possibilitam a identificação da duração aproximada das fases de adaptação (até 12 h), log (de 12 a 48 h), estacionária (de 48 a 96 h) e de morte (de 96 h em diante) das células cultivadas. A taxa específica máxima de crescimento obtida foi de $0,044 \text{ h}^{-1}$, considerando a fase log entre 12 a 48 horas. A taxa de duplicação foi estimada em 15,57 horas. Estes valores diferem dos encontrados por Westin. (2016), que cultivaram a mesma linhagem de células e observaram taxa específica de crescimento de $0,036 \text{ h}^{-1}$ e tempo de duplicação de 23,1 horas.

Figura 4.24 – Curvas de crescimento das células mesenquimais da polpa do dente obtidas no cultivo *in vitro*: (a); expressa em termos da concentração de células viáveis; (b) expressas como logaritmo neperiano da concentração.



Geralmente, as células de mamíferos apresentam tempo de duplicação aproximada de 24 h, sendo que, em 96% deste período, as células se apresentam na fase de interfase (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2007). Em um artigo publicado em 2010, Baghaban Eslaminejad *et al.* (2010) compararam o crescimento das células de dente de terceiro molar, utilizada também neste trabalho, com células extraídas de dentes decíduos. O tempo de duplicação observado pelos autores foi de 20,79 h. Westin e colaboradores (2016) obtiveram também um valor próximo ao relatado por Baghaban Eslaminejad *et al.* (2010), correspondente a 23,1 horas. A formulação do meio de cultivo e a quantidade de células inoculadas podem estar diretamente associadas à taxa de duplicação das células. Componentes como o soro fetal bovino ou a L-glutamina são de extrema importância para a adesão e multiplicação destas células (BAGHABAN ESLAMINEJAD *et al.*, 2010) e podem fortemente influenciar os parâmetros cinéticos obtidos.

4.2.13 Ensaio *in vitro* de viabilidade celular analisada por MTT

Após a caracterização das células-tronco mesenquimais, foi analisada a viabilidade das células expostas às membranas. As células foram inoculadas diretamente sobre as membranas estéreis previamente fixadas a uma placa de 96 poços, na concentração de $4,0 \times 10^4$ células por poço. A inoculação se deu sobre ambas as faces das membranas, para comparar o efeito da diferença de rugosidade. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas após a inoculação das células e os resultados estão apresentados nas Figura 4.25 e Figura 4.26.

Mesmo verificando-se uma certa tendência de proliferação para as formulações $Q_1X_1HA_{0,2}$ e $Q_1X_1HA_1$, não se observou diferença estatística na proliferação celular em comparação à membrana controle para os tempos testados. Para a formulação $Q_1X_1HA_5$, houve maior proliferação celular quando comparada às outras formulações. Este resultado sugere que a adição da hidroxiapatita às membranas pode influenciar nos parâmetros de adesão e proliferação celular.

Em relação à face menos rugosa, quando as membranas são comparadas nota-se certa equiparidade entre os valores de absorvância obtidos nas primeiras 48 horas. Para formulação com maior concentração de hidroxiapatita, no tempo de 72 horas, nota-se aumento da taxa de proliferação. A análise de rugosidade da face lisa da amostra realizado pela técnica de microscopia confocal, mostra um valor de rugosidade menor em relação a todas as formulações.

Figura 4.25– Ensaio de proliferação direta das células na superfície menos rugosa das membranas de diferentes formulações contendo HA analisada por MTT.

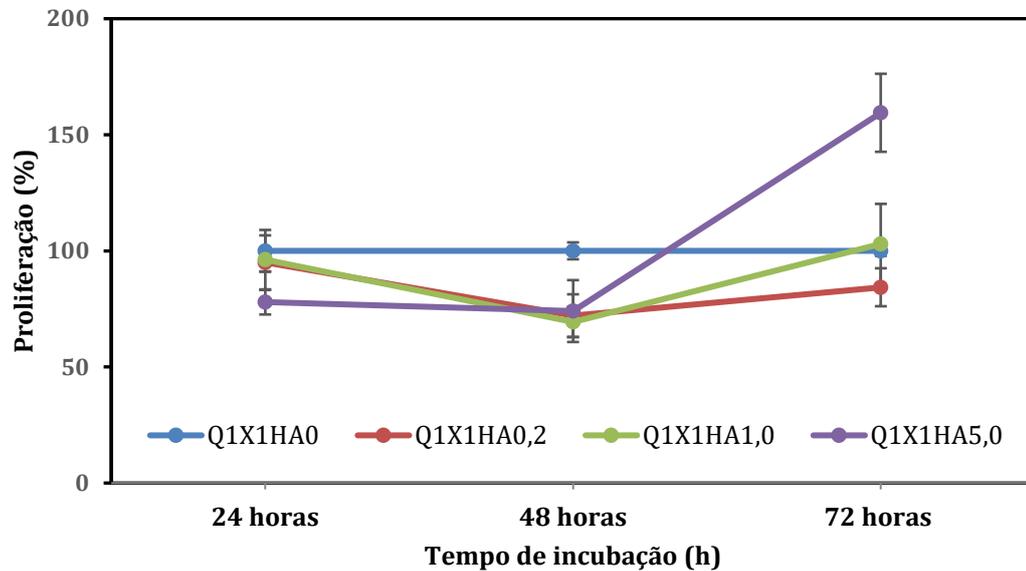
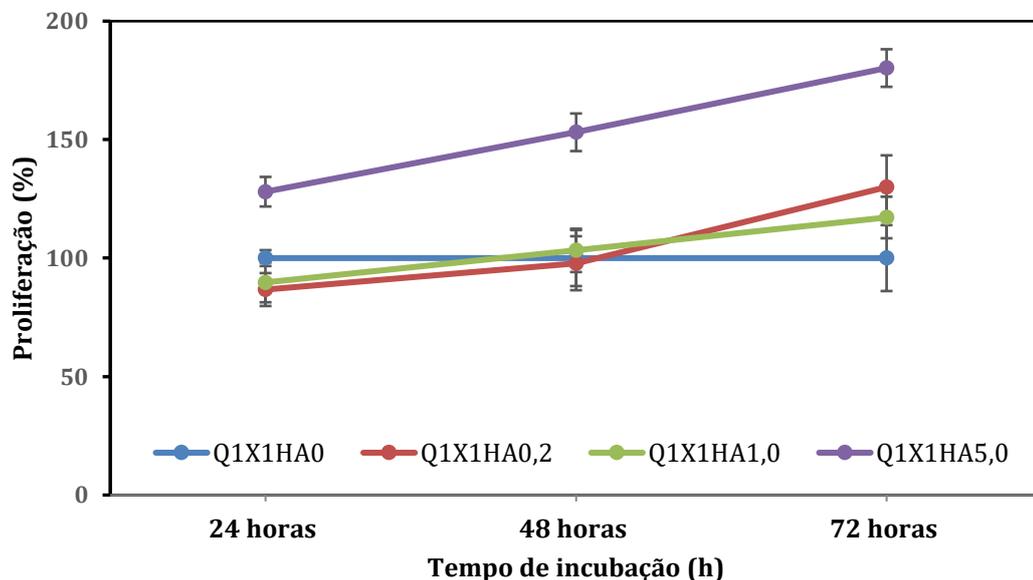


Figura 4.26 – Ensaio de proliferação direta das células na superfície rugosa das membranas de diferentes formulações contendo HA analisada por MTT.



Este resultado confirma para o compósito de quitosana-xantana incorporando hidroxiapatita em alta concentração, que a baixa rugosidade nas primeiras 48 horas está ligada à adesão e posterior proliferação celular, visto a baixa taxa de proliferação apresentada na formulação sem a adição de hidroxiapatita e a alta taxa de proliferação apresentada na face

rugosa da formulação Q₁X₁HA₅. Ainda para a formulação Q₁X₁HA₅, quando comparados os dados absolutos de absorvância, conclui-se que há diferença de proliferação celular relacionando as faces da membrana, nos tempos de 24 e 48 horas, como evidenciado na Figura 4.26. Este resultado sugere que, durante o ato cirúrgico, seria indicado que a fixação da membrana ocorresse usando-se a face menos rugosa em contato com o tecido gengival, evitando-se assim possíveis irritações e inflamações decorrentes da natureza pontiaguda da HA, enquanto a face rugosa deveria estar voltada para o tecido ósseo, aumentando a taxa de proliferação celular.

A rugosidade e a adição de fatores bioativos, como a hidroxiapatita em concentrações próximas ou acima de 5 % m/v, podem estar contribuindo para a proliferação das células-tronco da polpa do dente. Sua bioatividade pode ainda acelerar respostas biológicas, principalmente ligadas à regeneração óssea (LEGEROS, 2008). No estudo de Sofica *et al.* (2017), o perfil de secreção de células-tronco mesenquimais sobre a superfície de titânio recoberto com HA e colágeno combinado com caprolactona (C-PCL) verificou um aumento na liberação de IL-13 and IFN- γ , fatores estes ligados ao potencial imunomodulatório das células-tronco mesenquimais em ambos os biomateriais. Outro fato evidenciado foi a liberação do fator de crescimento vascular endotelial, da sigla em inglês VEGF, o qual é de extrema importância para a vascularização e regeneração local (DUFFY *et al.*, 2013).

4.2.14 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de doxiciclina aos microrganismos testados

A combinação de fatores bioativos e moléculas com efeitos terapêuticos como a doxiciclina, frente a eventos como a periodontite, podem ser um fator a ser explorado no projeto de biomateriais para seu tratamento. Assim, um ensaio exploratório inicial desta característica foi realizado para verificar o potencial das membranas na liberação do fármaco doxiciclina. Após a incubação das placas com os microrganismos testes, as placas foram submetidas a leitura da absorvância em espectrofotômetro, com o intuito de avaliar absorvância ocasionada pelo crescimento dos microrganismos. A curva padrão foi realizada em uma faixa de 0,02 a 50,0 $\mu\text{g/mL}$. A CIM foi considerada pela equiparidade da média dos resultados da leitura de absorvância do controle negativo (CNT), ou seja, o valor de absorvância dado pelo meio de cultivo incubado sem a adição de microrganismo, com relação à média de absorvância da curva padrão e das formulações. Para a determinação da CIM na curva padrão, os valores foram comparados partindo da menor para a maior concentração da curva, até a obtenção do valor não estatisticamente significativo. Para os valores de CBM, o resultado considerado foi o não

crescimento de colônias em nenhuma das 4 replicatas dos inóculos cultivados em placas de Petri contendo meio ágar. As Tabelas 4.10 a 4.12 apresentam os valores de absorvância das amostras (Abs 620), da absorvância do controle negativo do teste (Abs CNT) e da absorvância do menor ponto da curva onde não foi encontrada diferença estatística entre os valores obtidos, comparado com os valores do controle negativo.

Tabela 4.10 – Faixa de liberação do fármaco para Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o *S. salivarius*. Abs 620 = média de absorvância do meio que continha amostras incorporando doxiciclina; Abs CNT = média de absorvância do meio de cultivo utilizado no ensaio sem a presença de doxiciclina e inóculo; Abs CIM [x] = ponto da curva padrão de doxiciclina onde a média da absorvância não foi estatisticamente diferente do valor da Abs CNT.

Formulação	Abs 620	Abs CNT	Abs CIM [0,1]	Faixa do CIM (µg/mL)
Q ₁ X ₁ HA ₀	0,123 ± 0,044 ^a	0,087 ± 0,007 ^a	0,096 ± 0,017 ^a	> 0,04
Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	0,100 ± 0,015 ^b	0,087 ± 0,007 ^b	0,096 ± 0,017 ^b	> 0,04
Q ₁ X ₁ HA ₁	0,099 ± 0,022 ^c	0,087 ± 0,007 ^c	0,096 ± 0,017 ^c	> 0,04
Q ₁ X ₁ HA ₅	0,114 ± 0,026 ^d	0,087 ± 0,007 ^d	0,096 ± 0,017 ^d	> 0,04

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, p<0,05).

Tabela 4.11 – Faixa de liberação do fármaco para Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o *S. oralis*. Abs 620 = média de absorvância do meio que continha amostras incorporando doxiciclina; Abs CNT = média de absorvância do meio de cultivo utilizado no ensaio sem a presença de doxiciclina e inóculo; Abs CIM [] = ponto da curva padrão de doxiciclina onde a média da absorvância não foi estatisticamente diferente do valor da Abs CNT.

Formulação	Abs 620	Abs CNT	Abs CIM [0,1]	Faixa do CIM (µg/mL)
Q ₁ X ₁ HA ₀	0,098 ± 0,008 ^a	0,106 ± 0,019 ^a	0,111 ± 0,008 ^a	≥ 0,02
Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	0,093 ± 0,015 ^b	0,106 ± 0,019 ^b	0,111 ± 0,008 ^b	≥ 0,02
Q ₁ X ₁ HA ₁	0,097 ± 0,008 ^c	0,106 ± 0,019 ^c	0,111 ± 0,008 ^c	≥ 0,02
Q ₁ X ₁ HA ₅	0,109 ± 0,011 ^d	0,106 ± 0,019 ^d	0,111 ± 0,008 ^d	≥ 0,02

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, p<0,05).

Tabela 4.12 – Faixa de liberação do fármaco para Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o *P. gingivalis*. Abs 620 = média de absorvância do meio que continha amostras incorporando doxiciclina; Abs CNT = média de absorvância do meio de cultivo utilizado no ensaio sem a presença de doxiciclina e inóculo; Abs CIM [] = ponto da curva padrão de doxiciclina onde a média da absorvância não foi estatisticamente diferente do valor da Abs CNT.

Formulação	Abs 620	Abs CNT	Abs CIM [0,1]	Faixa do CIM (µg/mL)
Q ₁ X ₁ HA ₀	0,101 ± 0,012 ^a	0,096 ± 0,008 ^a	0,111 ± 0,008 ^a	≥ 0,02
Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	0,111 ± 0,008 ^b	0,096 ± 0,008 ^b	0,111 ± 0,008 ^b	≥ 0,02
Q ₁ X ₁ HA ₁	0,098 ± 0,016 ^c	0,096 ± 0,008 ^c	0,111 ± 0,008 ^c	≥ 0,02
Q ₁ X ₁ HA ₅	0,113 ± 0,010 ^d	0,096 ± 0,008 ^d	0,111 ± 0,008 ^d	≥ 0,02

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (teste de Tukey, p<0,05).

Com base nos resultados obtidos e em comparação aos dados da curva padrão para os microrganismos *S. salivarius* e *S. oralis*, foi possível observar a ocorrência de inibição de proliferação para todas as formulações, assim como efeito bactericida para algumas delas.

Para o *S. salivarius* todas as formulações testadas foram capazes de liberar o fármaco em concentração inibitória de, no caso, valores acima de 0,05 µg/mL. Em um estudo realizado por Sobottka e colaboradores (2012) foi encontrado uma faixa capaz de inibir o crescimento do microrganismo partindo de 0,032 µg/mL, condizente com o encontrado neste trabalho. O resultado de CBM para as formulações Q₁X₁HA₀ e Q₁X₁HA₁, apresentaram efeito superior da concentração bactericida mínima, comparado as demais formulações, onde a liberação do fármaco foi acima de 1,7 µg/mL, conforme dados da Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Faixa de liberação do fármaco para Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Formulações	Concentração Bactericida Mínima		
	<i>S. salivarius</i>	<i>S. oralis</i>	<i>P. gingivalis</i>
Curva Padrão	entre 1,6 e 3,1	entre 3,2 e 6,2	≥ 0,02
Q ₁ X ₁ HA ₀	> 1,7	> 3,2	≥ 0,02
Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	< 1,7*	< 3,2*	≥ 0,02
Q ₁ X ₁ HA ₁	> 1,7	< 3,2*	≥ 0,02
Q ₁ X ₁ HA ₅	< 1,7*	< 3,2*	≥ 0,02

* Apresentou desenvolvimento de UFC em ao menos em uma replicata.

Palma e colaboradores encontraram valores acima dos apresentados nas Tabelas 4.10 e 4.13 para o fármaco doxiciclina. Os valores acima de 0,25 e 8,0 µg/mL foram apontados como CIM e CBM respectivamente. O pesquisador verificou 96 cepas de *S. salivarius* extraídas de crianças com idades entre 2 a 16 meses de vida. Esta variabilidade de resistência pode ser atribuída ao início da formação da microbiota oral, onde o mecanismo genético do microrganismo pode se adaptar para o processo de colonização, principalmente nos primeiros meses de vida (PALMA *et al.*, 2016).

Para o *S. oralis*, assim como para o *S. salivarius*, também foi verificada a inibição do crescimento do microrganismo em todas as formulações. O menor ponto da curva padrão, de 0,02 µg/mL, foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Sobottka *et al.* (2012) obteve o valor de 0,032 µg/mL, quando testado o fármaco doxiciclina para o microrganismo *S. oralis*, mesmo valor ao encontrado para o *S. salivarius*. No caso da liberação do fármaco em concentração capaz de eliminar os microrganismos (CBM), as formulações que continham hidroxiapatita, não apresentaram este desempenho (Tabela 4.13). Apenas a formulação Q₁X₁HA₀ foi capaz de causar efeito equivalente ao da liberação de fármaco em concentração acima de 3,2 µg/mL. Este efeito pode estar ligado a capacidade de absorção para esta formulação, a qual apresenta um valor $7,99 \pm 0,39$ g/g quando colocada em meio de cultivo.

Os microrganismos do gênero *Streptococcus*, como o *S. salivarius* e *S. oralis*, são colonizadores primários da flora oral, causando um ambiente propício para a colonização de microrganismos patógenos (DAROUT, 2014; DÍAZ e KOLENBRANDER, 2009).

Para o microrganismo *P. gingivalis*, a menor concentração da curva padrão também foi capaz de inibir o seu crescimento. Os resultados encontrados na literatura apontam para um CIM próximo ao menor ponto da curva, a qual foi testada neste trabalho. Estudos apontam que o CIM para a *P. gingivalis* entre 0,015 e 0,016 µg/mL (POULET *et al.*, 1999; LEE e LEE, 2019). Não foi verificado o desenvolvimento de nenhuma unidade formadora de colônia no ensaio de CBM referente a esta cepa. Como o controle positivo apresentou crescimento adequado, o ensaio foi validado. Este microrganismo está presente em casos de periodontite e pode agravar esta situação pela formação de biofilmes que, além de causarem danos por si só, podem servir de ponto de ancoramento para outros microrganismos (NAKAYAMA e OHARA, 2017).

Com a comparação dos resultados de CIM e CBM, pode-se sugerir a faixa de liberação do fármaco em concentrações ativas nas condições de tempo e para os microrganismos testes. A Tabela 4.14 evidencia a faixa da liberação do fármaco partindo da concentração de CIM e até a concentração de liberação para o CBM.

Tabela 4.14 – Faixa de liberação do fármaco doxiciclina para as formulações testes.
Correlação dos pontos de CIM e CBM.

Formulações	Faixa de liberação do fármaco (µg/mL)
Q ₁ X ₁ HA ₀	> 3,2
Q ₁ X ₁ HA _{0,2}	0,05 a 1,7
Q ₁ X ₁ HA ₁	1,7 a 3,2
Q ₁ X ₁ HA ₅	0,05 a 1,7

A formulação contendo a fração de 1% (m/v) de HA resultou em liberação do fármaco superior em comparação às formulações Q₁X₁HA_{0,2} e Q₁X₁HA₅. Os resultados de XRF indicaram uma proporção molar entre Ca/P de 2,02. Estudos mostram que a doxiciclina pode formar complexos Ca-Dox ou Ca₂Dox em pH acima de 4,0, justificando assim o resultado obtido para esta formulação (BRIGANTE e AVENA, 2016; LAMBS *et al.*, 1988).

A incorporação de doxiciclina em membranas que serão utilizadas em regeneração tecidual e óssea pode inibir o crescimento de microrganismos característicos da periodontite e auxiliar na regeneração do local. Fatores inflamatórios, como (IL-8, TNF- α e IL-6), também associados à periodontite, também podem ser inibidos pela liberação do fármaco em baixas concentrações (DI CAPRIO *et al.*, 2015).

Kütan *et al.* (2016) analisaram a liberação de doxiciclina incorporada em membranas de colágeno em um estudo *in vivo*. Foram criados defeitos em tibia de camundongos Wistar. Os animais foram separados em dois grupos. Um deles grupos foi tratado com a membrana com doxiciclina e o outro, apenas com a membrana, e ambos foram contaminados com o microrganismo *P. gingivalis*. Os resultados indicaram potencial osteogênico significativo no grupo tratado com a membrana contendo o fármaco, não se observando o crescimento do microrganismo neste grupo e evidenciando que a estratégia de incorporação do fármaco doxiciclina em membranas para aplicação em regeneração tecidual e óssea pode apresentar maior eficácia.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados foi possível obter conclusões acerca da incorporação de hidroxiapatita em diferentes concentrações ao complexo polimérico de quitosana-xantana em um contexto geral, assim como observar as diferenças de resultados alcançados com membranas às quais não foi adicionada a fase cerâmica.

Para a formulação de Q₁X₁HA₀, foi verificada maior resistência mecânica e resultados semelhantes para perda de massa e absorção fluídica, quando comparados ao descrito na literatura. Estes dados sugerem que o processo de secagem com uma taxa lenta pode fazer com que estas membranas se tornem mais resistentes e que apresentem maior tensão de alongamento.

Para as formulações com a adição de hidroxiapatita, não houve modificação da fase do pó de hidroxiapatita após a sua incorporação durante o processo de produção das membranas. As análises de DRX e FTIR demonstraram a cristalinidade e fase característica do composto bioativo, respectivamente.

O aumento da concentração de incorporação de hidroxiapatita à membrana quitosana-xantana não alterou seu alongamento na ruptura.

O ensaio de absorção de fluidos mostrou que as membranas são capazes de absorver quantidades significativas dos líquidos testados, mesmo quando produzidas na presença de alta concentração de hidroxiapatita. Este resultado indica boa capacidade de troca fluídica.

A perda de massa no período observado diminuiu à medida em que se aumentou a concentração de HA, sugerindo apropriada estabilidade para regeneração óssea na presença de membranas com elevada concentração do agente bioativo.

Células-tronco mesenquimais extraídas de polpa de dente mostraram-se capazes de proliferar sobre todos os complexos polímero-cerâmica, sendo que esta capacidade aumentou com o aumento da concentração de hidroxiapatita. A formulação com a maior concentração (5% m/v) obteve resultado estatisticamente maior em relação às demais.

Os resultados do ensaio *in vitro* de CIM demonstraram a capacidade das formulações em liberarem o princípio ativo doxíciclina em concentrações capazes de inibir o crescimento de *S. salivarius*, *S. oralis* e *P. gingivalis*, microrganismos de ocorrência típica em periodontite.

Como conclusão geral, o trabalho indica que deve haver um valor ideal de incorporação dentro da faixa de 1 a 5% (m/v) de hidroxiapatita, considerando-se os resultados mecânicos e biológicos. Levando em consideração a espessura da membrana e sua rugosidade, pode-se

direcionar a membrana preparada na presença de 5% de HA (m/v) para a ROG, e a membrana produzida com 1% de HA (m/v) para a RTG, visto que esta última possui espessura comparável à de membranas comerciais, mesmo em estado intumescido, e apresenta baixa rugosidade, a qual pode provocar um processo inflamatório menos intenso quando de seu contato com a mucosa. A definição do nível ótimo de concentração pode reunir as melhores respostas, assim como, apontar o melhor custo/benefício para a produção de membranas compósitas polímero-cerâmica em escala comercial, tornando-a competitiva para a utilização em ROG, RTG, medicina regenerativa e terapia avançada.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para complementar os resultados aqui apresentados, assim como comprovar algumas hipóteses levantadas, são sugeridos os seguintes direcionamentos:

1. Comparar dados dos ensaios mecânicos e biológicos *in vitro* aqui apresentados com resultados de membranas comercialmente utilizadas para a mesma finalidade.
2. Avaliar uma concentração intermediária de incorporação de HA, entre 1 e 5% (m/v), com o intuito de obter a melhor relação custo/benefício do produto.
3. Verificar a perda de massa da membrana ao longo de 2, 4 e 6 meses, intervalos estes relevantes para a se atingir formação óssea completa.
4. Avaliar o comportamento imunofenotípico (por citometria de fluxo) e genético de reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) e de expressão proteica pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) das células-tronco mesenquimais nos períodos de 7, 14 e 21 dias de cultivo, com o intuito de verificar se a superfície das membranas é capaz de direcionar o crescimento ósseo.
5. Analisar por microscopia eletrônica de varredura (MEV), o aspecto das células aderidas às membranas, para complementar os resultados obtidos no ensaio direto de proliferação celular.
6. Determinar, por técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a concentração do fármaco doxiciclina liberado, assim como a concentração de fato incorporada pelas membranas.
7. Realizar ensaios *in vivo* para a comprovação da segurança e eficácia do biomaterial desenvolvido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, M.; GANZ, C.; XU, W.; SARAJIAN, H-R.; GÖTZ, W.; GERBER, T.; In vivo and in vitro investigations of a nanostructured coating material: a preclinical study. *International Journal of Nanomedicine*. v. 9, p. 975 – 984, 2014.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood*, v. 105, p. 1815–1822, 2005.

AKALIN, F. A.; BALTAÇIOĞLU, E.; SENGÜN, D.; HEKİMOĞLU, S.; TAŞKIN, M.; ETİKAN, I.; FIŞENK, I. A comparative evaluation of the clinical effects of systemic and local doxycycline in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Oral Science*, Tokyo, v. 46, p. 23-35, 2004.

ALAJIAH, F.; MORSI, A.; NASHER, R.; GUTKNECHT, N. Photobiomodulation therapy in the treatment of periodontal disease: a literature review. *Lasers in Dental Science*, p.1-7. 2019.

ALJEHANI, Y. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. *International Journal of Dentistry*, p.1-9, 2014.

ANCHISI, C.; MELONI, M.; MACCIONI, A. Chitosan beads loaded with essential oils in cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, v.29, p.485-485, 2007.

ANDRADE, I. P.; Uso de antibióticos sistêmicos na terapia periodontal: revisão de literatura – Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Odontologia; 2013.

ANITHA, A.; DIVYA RANI, R.; KRISHNA, V.; SREEJA, N.; SELVAMURUGAN, S.V.; NAIR, H.; TAMURA, R.; JAYAKUMAR. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v.78, p.672–677, 2009.

ANVISA. Farmacopéia Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5ª Ed, v.2, p. 1030, 2010.

ASHRI, N.Y., AJLAN, S.A. AND ALDAHMAH, A.M. Dental pulp stem cells: Biology and use for periodontal tissue engineering. *Saudi medical journal*, V.36(12), p.1391, 2015.

ASTM D882-18, Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2018.

BAGHABAN ESLAMINEJAD, M.R.; VAHABI, S.; SHARIATI, M.; NAZARIAN, H.; In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. *Journal of Dentistry*, v. 7(4), p. 185 – 195, 2010.

BAKOPOULOU, A.; APATZIDOU, D.; AGGELIDOU, E.; GOUSOPOULOU, E.; LEYHAUSEN, G.; VOLK, J.; KRITIS, A.; KOIDIS, P.; GEURTSSEN, W. Isolation and prolonged expansion of oral mesenchymal stem cells under clinical-grade, GMP-compliant conditions differentially affects “stemness” properties. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 8, 2017.

BASF, 2006. Pluronic® F127 Surfactant Viscosity as a Function of Temperature & Concentration. Technical Bulletin.

BASF, 2012. Pluronic® F127 Block Copolymer Surfactant. Technical Bulletin.

BASHUTSKI, JILL.; TAE-JU, OH.; CHAN, H.G.; WANG, H.L.; Guided Tissue Regeneration: A Decision-Making Model. *Journal of the International Academy of Periodontology*, v. 7(2), p. 48-55, 2011.

BECKER, T.; SCHLAAK, M.; STRASDEIT, H. Adsorption of nickel (II), zinc (II) and cadmium (II) by new chitosan derivatives. *Reactive Functional Polymers*, v.44, p289–298, 2000.

BELLINI, M. Z.; CALIARI-OLIVEIRA, C.; MIZUKAMI, A.; SWIECH, K.; COVAS, D.T.; DONADI, E.A.; OLIVA-NETO, P.; MORAES, A.M.; Combining xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 29, p. 1155-1166, 2015a.

BELLINI, M. Z.; OLIVA-NETO, P. D.; MORAES, Â. M. Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy. *Brazilian archives biology and Technology*, v. 58, n2, p. 289 – 299, 2015b.

BELLINI, M.Z.; PIRES M.; VASCONCELOS, A.; MORAES, Â.M. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 125, p. E421-E431, 2012c.

BENICIO, D.F.A., PEREIRA, L.O., RODRIGUES DA SILVA, I.C., AZEVEDO, R.B. AND BARRETO BEZERRA, A.C. Culture of human dental pulp cells at variable times post-tooth extraction. *Brazilian Oral Research*, 32, 2018

BHARDWAJ, A., JAFRI, Z., SULTAN, N., SAWAI, M., & DAING, A. Periodontal Flap Surgery along with Vestibular Deepening with Diode Laser to Increase Attached Gingiva in Lower Anterior Teeth: A Prospective Clinical Study. *Journal of natural science, biology, and medicine*, v.9(1), p.72–76, 2018.

BIERHALZ, A.C.; MORAES, Â.M., Tuning the properties of alginate—Chitosan membranes by varying the viscosity and the proportions of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(46), 2016.

BOATENG, J.S., MATTHEWS, K.H., STEVENS, H.N.; ECCLESTON, G.M., Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(8), p.2892-2923, 2008.

BOHNER, M.; Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery; *European Spine Journal*, v.10, p. 114 – 121, 2001.

BOMBALDI DE SOUZA, R. F.; Membranas de quitosana complexada com alginato e xantana: comportamento na presença de diferentes proporções de água e incorporação de eritromicina – Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Química; 2014.

BOMBALDI DE SOUZA, R.F., BOMBALDI DE SOUZA, F.C. AND MORAES, Â.M. Analysis of the performance of polysaccharide membranes in aqueous media as a tool to assist wound-dressing selection. *Journal of Applied Polymer Science*, v.134(40), p.45386, 2017a.

BOMBALDI DE SOUZA, R.F., DE SOUZA, F.C.B., RODRIGUES, C., DROUIN, B., POPAT, K.C., MANTOVANI, D. AND MORAES, Â.M. Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues. *Materials Science and Engineering: C*, v.94, p.364-375, 2019b.

BRASIL, Resolução RDC nº 214, de 07 de fevereiro de 2018, Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e em Pesquisa Clínica. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, publicada no DOU n.36 de 22 de fevereiro de 2018.

BRASIL, Saúde Bucal, 2003: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASIL, Saúde Bucal, 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, 2010.

BRIGANTE, M.; AVENA, M. Biotemplated synthesis of mesoporous silica for doxycycline

removal. Effect of pH, temperature, ionic strength and Ca²⁺ concentration on the adsorption behaviour. *Microporous and Mesoporous Materials*, v.225, p.534-542, 2016.

BRUN, V.; GUILLAUME, C.; MECHICHE ALAMI, S.; JOSSE, J.; JING, J.; DRAUX, F.; BOUTHORS, S.; LAURENT-MAQUIN, D.; GANGLOFF, S.C.; KERDJOUJ, H.; VELARD F. Chitosan/hydroxyapatite hybrid scaffold for bone tissue engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering*, v.24, p.63-73, 2014.

BUENO, V.B.; PETRI, D.F.S. Xanthan hydrogel films: Molecular conformation, charge density and protein carriers. *Carbohydrate polymers*, 101, pp.897-904, 2014.

BUSSCHER, H.J.; ENGELS, E.; DIJKSTRA, R. J.; VAN DER MEI, H.C. Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth *in vitro*. *European Journal of Oral Science*, v.116, p.493-495. 2008.

CAETANO, N. BPR: Guia de remédios. 7ª edição, São Paulo. Editora: Escala, p. 220, 2005.

CARVALHO, T.S.; LUSSI A. Combined effect of a fluoride-, stannous- and chitosan containing toothpaste and stannous-containing rinse on the prevention of initial enamel erosion-abrasion. *Journal of Dentistry*, v.42, p. 450-9. 2014.

CEULEMANS, J., VINCKIER, I., LUDWIG, A. The use of xanthan gum in an ophthalmic liquid dosage form: rheological characterization of the interaction with mucin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 91, p. 1117-1127, 2002.

CHOW L.C. Next generation calcium phosphate-based biomaterial. *Journal of Dental Materials*, v. 28, 2009.

CHUNG, S.D.; TSAI, M.C.; HUANG, C.C.; KAO, L.T.; CHEN, C.H. A populationbased study on the associations between chronic periodontitis and the risk of cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, v.21(2), p. 219-223, 2016.

CLARK, RAF. Wound repair. Overview and general considerations. In: Clark RAF, editor. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 2nd ed. New York, NY: Plenum Press, p. 3-50, 1996.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, v.32, 2006.

COLLAGEN MATRIX INC. MATRIXDERM[®], 2017. Dental regenerative solutions. Disponível em: < <http://collagenmatrix.com/wp-content/uploads/2017/06/Regenerative->

Solutions-Brochure.pdf#matrixderm> Acesso em: 26 jun. 2018.

COLLAGENEX PHARMACEUTICALS INC. PERIOSTAT[®], 1998. Doxycycline hyclate tablets. Bula de medicamento. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2004/50783slr002_periostat_lbl.pdf. Acesso em: 19 jun. 2018.

COMEXSTAT, Importação e exportação geral. Brasil, 2018. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>> NCM: 3006.40.20; NCM: 3006.10.90; 3913.90.50; 3913.90.20. Acesso em: 19 jun. 2018.

COSENZA, S.; RUIZ, M.; TOUPET, K.; CHRISTIAN JORGENSEN, C.; NOËL, D. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Scientific Reports*, v.7, article number: 16214, 2017.

DAROUT, I.A. Oral bacterial interactions in periodontal health and disease. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene*. v. 6(5), p. 51-57, 2014.

DEGHAN, G.M.H.; MARZUKA, M.; Lyophilized Chitosan/xanthan Polyelectrolyte Complex Based Mucoadhesive Inserts for Nasal Delivery of Promethazine Hydrochloride. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. v.13(3), p. 769 - 784, 2014.

DEIDRE, L.B.; BATCHELAR, L.; MELANIE, T; DAVIDSON, M.; DABROWSKI, W.; IAN A. Bone-composition imaging using coherent-scatter computed tomography: Assessing bone health beyond bone mineral density; *Medical Physics*, v. 33, p. 04–15; 2006.

DENTAL CREMER. Membranas para cirurgia, periodontie e regeneração óssea. Disponível em: <https://busca.dentalcremer.com.br/busca?q=membrana-biologica&common_filter%5B1%5D=21821%7C21817>. Acesso em: 05 jul. 2019.

DESTAINVILLE, A.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANTE, D.; LABORDE, E. Synthesis, characterization and thermal behaviour of apatite tricalcium phosphate. *Materials Chemistry and Physics*, v. 80, p. 269 – 277, 2003.

DI CAPRIO, R.; LEMBO, S.; DI COSTANZO, L.; BALATO, A.; MONFRECOLA, G. Anti-Inflammatory Properties of Low and High Doxycycline Doses: An In Vitro Study. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation*, Article ID 329418, 2015.

DÍAZ, P.I.; KOLENBRANDER, P.E. Subgingival Biofilm Communities in Health and Disease. *Revista Clinica Periodoncia Implantologia. Rehabilitation Oral*, v. 2(3), p. 187-192, 2009.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, p. 315-317, 2006.

DOROZHKIN, S.V. Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. Review. *Materials*, v. 6, p. 3840-3942, 2013.

DOROZHKIN, S.V.; Calcium orthophosphate cements for biomedical application. *Journal of Materials Science*, v.43, p. 3028 – 3057, 2008.

DOROZHKIN, S.V.; Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art; *Journal of Functional Biomaterials*, v. 1, p. 22-107, 2010.

DUFFY, A.M.; BOUCHIER-HAYES, D.J.; HARMEY, J.H.; Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: Autocrine signalling by VEGF. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6482/>, 2013.*

EICK, S.; PFISTER, W. Efficacy of Antibiotics Against Periodontopathogenic Bacteria Within Epithelial Cells: An In Vitro Study. *Journal of Periodontology*, v. 75, p.1327-1334, 2004.

ELGALI, I.; OMAR, O.; DAHLIN, C; THOMSEN, P.; Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *European Journal of Oral Science*. v. 125(5), p. 315–337, 2017.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Agricultura brasileira cresce 123% em dez anos, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18797150/aquicultura-brasileira-cresce-123-em-dez-anos>> Acesso em: 19 jun. 2018.

FARIA, S., DE OLIVEIRA PETKOWICZ, C.L., DE MORAIS, S.A.L., TERRONES, M.G.H., DE RESENDE, M.M., DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. *Carbohydrate Polymers*, v.86(2), pp.469-476, 2011.

FAVERI, M., MAYER, M.P., FERES, M., DE FIGUEIREDO, L.C., DEWHIRST, F.E., PASTER, B.J. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 23, p. 112- 118. (2008).

FICHA JCPDS 09-0432. ICDD, PCPDFWIN V2.01, *Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS)-International Center for Diffraction Data (ICDD)*, Newtown Square, PA,

2007.

FIHRI, A.; LEN, C.; VARMA, R. S.; SOLHY, A. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 347, p. 48-76, 2017.

FROST, R. L.; SCHOLZ, R.; LÓPEZ, A.; XI, Y. A vibrational spectroscopic study of the phosphate mineral whiteite $\text{CaMn}^{++}\text{Mg}_2\text{Al}_2(\text{PO}_4)_4(\text{OH})_{28}(\text{H}_2\text{O})$. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.124, p. 243–248, 2014.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GOMEZA, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 549-579, 2000.

GEISTLICH PHARMA. Geistlich Bio-Oss[®], Disponível em: <<https://www.geistlich.com.br/pt/dentistas/substitutos-osseos/bio-oss/beneficios-para-o-usuario/>> Acesso em: 26 jun. 2018.

GIOCONDI, J.L.; EL-DASHER, B.S.; NANCOLLAS, G.H.; ORME, C.A.; Molecular mechanisms of crystallization impacting calcium phosphate cements. *Philosophical Transactions of the Royal Society A Mathematical Physical Engineering Sciences*. v. 368, p. 1937-1961, 2010.

GOLUB, L.M.; LEE, H.M.; GREENWALD, R.A.; RYAN, M.E.; SALO, T.; GIANNOBILE, W.V. A Matrix Metalloproteinase Inhibitor Reduces Bone-type Collagen Degradation Fragments and Specific Collagenases in Gingival Crevicular Fluid During Adult Periodontitis. *Inflammation Research*, v. 46: p. 310-319, 1997.

GONÇALVES, F.; DE MORAES, M.; FERREIRA, L.; CARREIRA, A.; KOSSUGUE, P.; BOARO, L.; BENTINI, R.; GARCIA, C.; SOGAYAR, M.; ARANA-CHAVEZ, V.; CATALANI, L. Combination of Bioactive Polymeric Membranes and Stem Cells for Periodontal Regeneration: In Vitro and In Vivo Analyses. *PLoS One*, v.11, p.e 0152412, 2016.

GOODSON, J. Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, v. 5, p.142-168, 1994.

GOTTLOW, J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. *Journal of Periodontology*, v. 64, p.1157-1165, 1993.

GOTTLOW, J.; KARRING T.; NYMAN S. Guided tissue regeneration following treatment of "recession type defects" in the monkey. *Journal of Periodontology*, v. 61, p. 680-685, 1990.

GOTTLOW, J.; NYMAN, S.; KARRING, T.; LINDHE, J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology*, v.11, p. 494-503, 1984.

GRAZIANI, F.; KARAPETSA, D.; MARDAS, N.; LEOW, N.; DONOS, N. Surgical treatment of the residual periodontal pocket. *Periodontology 2000*, v.76(1), p.150-163, 2018.

GUGALA Z., GOGOLEWSKI S. Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 13: p. 187–195, 1999.

HAM, A. W.; CORMACK, D. H. Histophysiology of cartilage, bone, and joints. Lippincott, Philadelphia, 1979.

HAN, G., SHAO, H., ZHU, X., WANG, G., LIU, F., WANG, F., LING, P. AND ZHANG, T. The protective effect of xanthan gum on interleukin-1 β induced rabbit chondrocytes. *Carbohydrate polymers*, v.89(3), p.870-875, 2012.

HAN, J. K.; SONG, H.Y.; SAITO, F.; LEE, B.T. Synthesis of High Purity Nano-Sized Hydroxyapatite Powder by Microwave-Hydrothermal Method. *Materials Chemistry and Physics*, v. 99, p. 235-239, 2006.

HENCH, L.L.; POLAK, J.M.; Third-generation biomedical materials, *Materials Science*, v. 295, p. 1014-1017, 2002.

HENCH, L; ANDERSSON, O. Bioactive Glasses. In An Introduction to Bioceramics; Hench, L. L., Wilson, J., Eds.; *World Scientific Publishing*: Singapore, p. 41, 1993.

HENDERSON, B.; WARD, J. M.; READY, D. Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans: a triple A* periodontopathogen? *Periodontology 2000*, v. 54, p. 78–105, 2010.

HERNÁNDEZ-MONTELONGO, J.; NASCIMENTO, V.F.; MURILLO, D.; TAKETA, T.B.; SAHOO, P.; DE SOUZA, A.A.; BEPPU, M.M.; COTTA, M.A. Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: An antibacterial surface for *Xylella fastidiosa*. *Carbohydrate polymers*, v.136, pp.1-11, 2016.

HOEPFNER, E.M.; RENG, A.; SCHMIDT, P.C. Fiedler Encyclopedia of Excipients for Pharmaceutical, Cosmetics and Related Areas, 5th ed. Aulendorf: Cantor, p. 1609, 2002.

HOFFMAN, A. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.

54, p. 3-12, 2002.

HORWITZ, E.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; DEANS, R.; KRAUSE, D.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 7, p. 393-395, 2005.

HUNG, L.H.; TEH, S.Y.; JESTERB, J.; LEE, A.P. PLGA micro/nanosphere synthesis by droplet microfluidic solvent evaporation and extraction approaches. *The Royal Society of Chemistry 2010*, v. 10, p. 1820 – 1825, 2010.

IZAWA, H.; NISHINO, S.; MAEDA, H.; MORITA, K.; IFUKU, S.; MORIMOTO, M.; SAIMOTO, H.; KADOKAWA, J. I. Mineralization of hydroxyapatite upon a unique xanthan gum hydrogel by an alternate soaking process. *Carbohydrate Polymers*, v. 102, p. 846-851, 2014.

JAMES, S.; FOX, J.; AFSARI, F.; LEE, J.; CLOUGH, S.; KNIGHT, C.; ASHMORE, J.; ASHTON, P.; PREHAM, O.; HOOGDUIJN, M.; PONZONI, R.A.R.; HANCOCK, Y.; COLES, M.; GENEVER, P. Multiparameter Analysis of Human Bone Marrow Stromal Cells Identifies Distinct Immunomodulatory and Differentiation-Competent Subtypes. *Stem Cells Reports*, v.4, p. 1004-1015, 2015.

JANSSON, P.E.; KENNE, L.; BEWGT LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, v. 45, p. 275-282, 1975.

JARDIM, E.C; MARQUETI, A.C; FAVERANI, L.P.; JUNIOR, E.G.J. Antimicrobial resistance of aerobes and facultative anaerobes isolated from the oral cavity. *Journal of Applied Oral Science*, v. 18(6), p. 551-559, 2010.

JIMBO, R.; TOVAR, N.; ANCHIETA, R. B.; MACHADO, L. S.; MARIN, C.; TEIXEIRA, H. S.; COELHO, P. G. The combined effects of undersized drilling and implant macrogeometry on bone healing around dental implants: an experimental study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 43(10), p. 1269–1275, 2014.

JUNQUEIRA, I. L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica* [12. ed]. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 228, 2013.

KENNEDY, J.F.; BRADSHAW, I.J. Production, properties and applications of xanthan. *Progress in Industrial Microbiology*. v.19, p. 319-371, 1984.

- KIM, J., HWANG, J., SEO, Y., JO, Y., SON, J. AND CHOI, J. Engineered chitosan–xanthan gum biopolymers effectively adhere to cells and readily release incorporated antiseptic molecules in a sustained manner. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.46, pp.68-79, 2017.
- KIM, Y.K.; YUN, P.Y, Risk Factors for Wound Dehiscence after Guided Bone Regeneration in Dental Implant Surgery, *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 36, p. 116 – 123, 2014.
- KINANE, D.F.; STATHOPOULOU, P.G.; PAPAPANOU, P.N. Periodontal Diseases. *Nature Reviews*. v.3, n.17083, 2017.
- KIRCH, W. Encyclopedia of Public Health. New York, NY: *Springer Science+Business Media*. 2008.
- KOKUBO, T.; YAMAGUCHI, S. Novel bioactive titanate layers formed on Ti metal and its alloys by chemical treatments. *Materials*, v.3(1), pp.48-63, 2010.
- KUMAR, A.; RAO, K.; HAN, S. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 180, p. 128-144, 2017.
- KUMAR, A.; RAO, K.M.; KWON, S.E.; LEE, Y.N.; HAN, S.S. Xanthan gum/bioactive silica glass hybrid scaffolds reinforced with cellulose nanocrystals: Morphological, mechanical and in vitro cytocompatibility study. *Materials Letters*, v.193, p. 274-278, 2017.
- KÜTAN, E.; DUYGU-ÇAPAR, G.; ÖZÇAKIR-TOMRUK, C.; DILEK, O.C.; ÖZEN, F.; ERDOGAN, Ö.; ÖZDEMİR, I.; MAY KROACHI, M.; GÜREL, A. Efficacy of doxycycline release collagen membrane on surgically created and contaminated defects in rat tibiae: A histopathological and microbiological study. *Archives of Oral Biology*, v.63, p.15–21, 2016.
- LAMBS, L.; REVEREND, B.DL.; KOZLOWSKI, H.; BERTHON, G. Metal Ion-Tetracycline Interactions in Biological Fluids. 9. Circular Dichroism Spectra of Calcium and Magnesium Complexes with Tetracycline, Oxytetracycline, Doxycycline, and Chlortetracycline and Discussion of Their Binding Modes. *Inorganic Chemistry*, v.27, p.3001-3012, 1988.
- LE, H., QU, S., MACKAY, R.; ROTHWELL, R. Fabrication and mechanical properties of chitosan composite membrane containing hydroxyapatite particles. *Journal of Advanced Ceramics*, v. 1, p.66-71, 2012.
- LEE, S.Y.; LEE, S.Y.; Effects of sub-minimal inhibitory concentrations of antibiotics on the morphology and surface hydrophobicity of periodontopathic anaerobes. *Anaerobe*, v. 55, p. 107

- 111, 2019.

LEGEROS, R.Z., Calcium phosphate-based osteoinductive materials, *Chemical Reviews*, v. 108, p. 4742-4753, 2008.

LIANG, A.; WANG, L.; YONG, X.; DANLIN, Z.; YANG, C.; GUANGHUI, W.; Controlled additive-free hydrothermal synthesis and characterization of uniform hydroxyapatite nanobelts. *Ceramics International*, v. 42, p. 3104-3112, 2016.

LIAO, C.J.; LIN, F.H.; CHEN, K.S.; SUN, J.S.; Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials*. v. 20, p. 1807–1813, 1999.

LIAO, S.; WANG, W.; UO, M.; OHKAWA, S.; AKASAKA, T.; TAMURA K. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials*, v. 26, p.64-71. 2005.

LIMA OLIVEIRA, A.P., DE FAVERI, M., GURSKY, L.C., MESTNIK, M.J., FERES, M., HAFFAJEE, A.D., SOCRANSKY, S.S.; TELES, R.P. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *Journal of clinical periodontology*, v.39(3), p.295-302, 2012.

LINDHE J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

LOTUFO, R. F. M.; KANTORSKI, K. Z.; ZIMMERMANN, G. S. Antibióticos de liberação local e controlada em periodontia: minociclina e doxiciclina - Local antibiotics in periodontal diseases – *RGO*, v.51, p. 419-421, 2003.

LUNGAN, M. A.; POPA, M.; RACOVITA, S.; HITRUC, G.; DOROFTEI, F.; DESBRIERES, J.; VASILIU, S. Surface characterization and drug release from porous microparticles based on methacrylic monomers and xanthan. *Carbohydrate Polymers*, v. 125, p. 323-333, 2015.

MA, J.; LIM, L.; C.; Effect of particle size distribution on sintering of agglomerate-free submicron alumina powder compacts. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 22(13), p. 2197–2208, 2002.

MARDAS, N.; KOSTOPOULOS, L.; STAVROPOULOS, A.; KARRING, T.; Osteogenesis by guided tissue regeneration and demineralized bone matrix. *Journal of Clinical Periodontology*. v. 30(3), p. 176 – 183, 2003.

MARKETS AND MARKETS, 2016. Dental Consumables Market by Product (Implants,

Prosthetics, Orthodontics, Endodontics, Infection Control, Periodontics, Whitening Products, Prophylaxis, Fluorides, Sealants, Splints), End-User (Hospital & Clinic, Academic, Research) - Global Forecast to 2021. Disponível em: < <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/oral-care-products-dental-consumables-market-699.html>> Acesso em: 19 jun. 2018.

MARTINS, A.F.; DE OLIVEIRA, D.M.; PEREIRA, A.G.B.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C.; Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin, *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 51, p. 1127–1133, 2012.

MEEJOO, S.; MANEEPRAKORN, W.; WINOTAI, P. Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating. *Thermochimica Acta*, v. 447, p. 115–120, 2006.

MEHDI, M.; KHORASANI, M-T.; DINPANAH-KHOSHDARGI, E.; JAMSHIDI, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *In Acta Biomaterialia*, v. 9, p. 7591-7621, 2013.

MEHRANEH, T-G.; HOSSEIN, A.; MOHAMMAD, R.G.; Biomineralization behavior of electrophoretic-deposited hydroxyapatite/tetracalcium phosphate biphasic composite. *Applied Surface Science*. v. 458, p. 988 – 995, 2018.

MENG, X.; TIAN, F.; YANG, J.; CHUN-NIAN, H.; XING, N.; LI, F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, p. 1751-1759, 2010.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, v. 69, p.7–17, 2015.

MILLS, M.P.; ROSEN, P.S.; CHAMBRONE, L.; GREENWELL, H.; KAO, R.T.; KLOKKEVOLD, P.R.; MCALLISTER, B.S.; REYNOLDS, M.A.; ROMANOS, G.E.; WANG, H.L. American Academy of Periodontology best evidence consensus statement on the efficacy of laser therapy used alone or as an adjunct to non-surgical and surgical treatment of periodontitis and peri-implant diseases. *Journal of periodontology*, v.89(7), p.737-742, 2018.

MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.; CASTILHO, L.R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Editora Roca, 2008.

MOTA, J.; YU, N.; CARIDADE, S. G.; LUZ, G. M.; GOMES, M. E.; REIS, R. L.; JANSEN, J. A.; WALBOOMERS, X. F.; MANO, J. F. Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration. *Acta Biomaterialia*, v. 8, p. 4173–4180, 2012.

MOZAFFARI, A.; REZVAN BEHBAHANI, M.; ASGARTOORAN, B. Comparison of the effect of non-surgical periodontal therapy with and without systemic Doxycycline on glycemic status and clinical periodontal parameters in type II diabetic patients with chronic periodontitis. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*, v. 8, p. 471-480, 2017.

NAKASHIMA, M.; IOHARA, K.; MURAKAMI, M.; NAKAMURA, H.; SATO, Y.; ARIJI, Y.; MATSUSHITA, K. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Research & Therapy*, v.8, 2017.

NAKAYAMA, M.; OHARA, N. Molecular mechanisms of Porphyromonas gingivalis-host cell interaction on periodontal diseases. *Japanese Dental Science Review*, v.53, p.134-140, 2017.

NAVARRO DA ROCHA D.; CRUZ L. R. O.; DE CAMPOS J. B.; MARÇAL R. L. S. B.; MIJARES D. Q.; COELHO P. G.; PRADO DA SILVA M. H., Mg substituted apatite coating from alkali conversion of acidic calcium phosphate, *Materials Science and Engineering: C*, v. 70, Part 1 p. 408-17, 2017.

NAVARRO DA ROCHA D.; GOBBO L.A.; PRADO DA SILVA M.H. Production and characterization of niobate apatite, *Journal of Materials Research and Technology*, v. 2, p. 24-29, 2013.

NAVARRO DA ROCHA D.; PRADO DA SILVA M. H.; DE CAMPOS J. B.; MARÇAL R. L. S. B.; MIJARES D. Q.; COELHO P. G.; CRUZ L. R. O.; Kinetics of conversion of brushite coatings to hydroxyapatite in alkaline solution. *Journal of Materials Research Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2018.02.002>. 2018.

NEWMAN, M. G; TAKEI, H. H.; KLOKKEVOLD, P. R.; CARRANZA Jr., F. A. Periodontia clínica. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

NGUYEN, A. T.; SATHE, S. R.; YIM, E. K. F.; From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 28(18), 2016.

NIH - National Institute of Health – US National Library of Medicine, Dailymed, Atridox®. Disponível em: < <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=2c718fc7-2921-4d02-b273-784e513f8299>> Acesso em: 19 jun. 2018a.

NIH, National Institute of Health, NCI, National Cancer Institute- Enterprise Vocabulary Services, Disponível em: < <https://ncim->

stage.nci.nih.gov/ncimbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI%20Metathesaurus&code=C0058731> Acesso em: 19 jun. 2018b.

NYMAN, S.; GOTTLOW, J.; KARRING, T.; LINDHE, J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 9, p. 257-65, 1982a.

NYMAN, S.; LINDHE, J.; KARRING, T.; RYLANDER, H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease, *Journal of Clinical Periodontology*, v. 9, p. 290–296, 1982b.

ORIT, O. B.; STUART, G.; DEANNE, V.; GEOFFREY, G.; MICHAEL, N.; ELI, E.; ERIC, C. Antibiotic susceptibility of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 in a biofilm. *Journal of Oral Microbiology*, v. 5, 2013.

ORTOLANI, E.; QUADRINI, F.; BELLISARIO, D.; SANTO, L.; POLIMENI, A.; SANTARSIERO, A. Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. *Ann Ist Super Sanità*, v.51, p. 229 – 235, 2015.

OTHMAN, R.; MUSTAFA, Z.; KIEN, P.T.; ISHAK, N.F.; SHAABAN, A.; MOHD, A.F.N.; Parameters affecting the synthesis of E-tricalcium phosphate powder using a wet precipitation method. *Journal of Mechanical Engineering and Sciences*. v. 11, p. 3197 – 3205, 2017.

PALMA, T.H.; HARTH-CHÚ, N.E.; SCOTT, J.; STIPP, R.N.; BOISVERT, H.; SALOMÃO, M.F.; THEOBALDO, J.D.; POSSOBON, R.F.; NASCIMENTO, L.C.; MCCAFFERTY, J.W.; FALLER, L.; DUNCAN, M.J.; MATTOS-GRANER, R.O. Oral cavities of healthy infants harbour high proportions of *Streptococcus salivarius* strains with phenotypic and genotypic resistance to multiple classes of antibiotics. *Journal of Medical Microbiology*, v.65, p.1456–1464, 2016.

PASTER, B.; OLSEN, I.; AAS, J.; DEWHIRST, F. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*, v. 42, p.80-87, 2006.

PEREIRA-MAIA, E.C.; SILVA, P.P.; ALMEIDA, W.B.; SANTOS, H.F.; MARCIAL, B.L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclina e glicinas: uma visão geral. *Química Nova*, v. 33, p. 700-706, 2010.

PERSCHBACHER, S. Periodontal diseases. *White and Pharoah's Oral Radiology E-Book: Principles and Interpretation*, p.317. 2018.

PINEDA L.M., BUSING M., MEINING R.P., GOGOLEWSKI S. Bone regeneration with

resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.31, p. 385–394, 1996.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: Tipos, Aplicações e Mercado. *Química Nova*, v.200, p.1-15, 2015.

POULET, P.P.; DUFFAUT, D.; LODTER, J.P.; Metronidazole susceptibility testing of anaerobic bacteria associated with periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 26, p. 261 - 263, 1999.

PUBCHEM, 2018. Open Chemistry Database. Doxycycline hyclate. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54686183#section=Top>> Acesso em: 26 jun. 2018.

RAJA, S.; BYAKOD, G.; PUDAKALKATTI, P.; Growth factors in periodontal regeneration. *International Journal of Dental Hygiene*. v. 7, p.82-89, 2009.

RASMUSSEN, I.; RINGD'EM, O.; SUNDBERG, B.; LE BLANC, K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells, *Transplantation*, v. 76, p. 1208–1213, 2003.

RAVI KUMAR, M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, p. 1-27, 2000.

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D.; THOMAS, P. Calcium phosphate apatite with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*, v. 23, p. 1065–1072, 2002.

RODAS-JUNCO, B.; VILLICAÑA, C. Dental Pulp Stem Cells: Current Advances in Isolation, Expansion and Preservation. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 14, p. 333-347, 2017.

ROMEU, G.A.; KANO, E.K.; ROLIM, C.M.B.; SERRA, C.H.R.; FERRAZ, H.G.; PORTA, V. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de doxiciclina em plasma humano. *Rev. Bras. Prom. Saúde*, v. 20, p. 193-198, 2007.

RUPENTHAL, I. D.; GREEN C. R.; ALANY, R. G. Comparison of ionactivated in situ gelling systems for ocular drug delivery. Part 2: Precorneal retention and in vivo pharmacodynamic study. *International Journal of Pharmaceutics*, v.411: p. 78–85, 2011.

SAINT LUKE'S HEALTH SYSTEM, 2017. Periodontal Disease: Guided Tissue Regeneration (GTR), disponível em: <<https://www.saintlukeskc.org/health-library/periodontal-disease-guided-tissue-regeneration-gtr>> Acesso em: 19 jun. 2018.

SAITO, M. T.; SILVERIO, K. G.; CASATI, M. Z.; SALLUM, E. A.; NOCITI JR, F. H.; Tooth-derived stem cells: update and perspectives. *World Journal of Stem Cells*, v. 7, p. 399–407, 2015.

SAM, G. Evolution of Barrier Membranes in Periodontal Regeneration “Are the third Generation Membranes really here?”. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2014.

SASSONE, L.; FIDEL L.; FAVERI, R.; FIDEL, M.; FIGUEIREDO, L.; FERES, M. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. *International Endodontic Journal*, v. 41, p. 508-515, 2008.

SCHMIDMAIER, G.; BAEHR, K.; MOHR, S.; KRETSCHMAR, M.; BECK, S.; WILDEMAN, B. Biodegradable polylactide membranes for bone defect coverage: biocompatibility testing, radiological and histological evaluation in a sheep model. *Clinical Oral Implants Research*, v. 17, p. 439-444, 2006.

SCULEAN, A.; NIKOLIDAKIS, D.; SCHWARZ, F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, v.35, p.106-116, 2008.

SEO, B.; SONOYAMA, W.; YAMAZA, T.; COPPE, C.; KIKUIRI, T.; AKIYAMA, K.; LEE, J.; SHI, S. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Diseases*, p. 428-434, 2008.

SFREDDO, C.S.; MAIER, J.; MOREIRA, C.H.C. Periodontal Condition and Cancer – A Literature Review. *Brazilian Journal of Periodontology*, v. 27, p. 34-39, 2017.

SHEN, J.; LI, J.; ZHAO, Z.; ZHANG, L.; PENG, G.; LIANG, L. Molecular dynamics study on the mechanism of polynucleotide encapsulation by chitosan. *Scientific Reports*, v.7, 2017.

SIGMA-ALDRICH, 2018. Doxycycline hyclate. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d9891?lang=pt®ion=BR>> Acesso em: 26 jun. 2018.

SLÓSZARCZYK, A.; PASZKIEWICZ Z.; PALUSZKIEWICZ C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *J Molecular Structure*, p. 657-661, 2005.

SLOTS, J.; RAMS, T. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *Journal of Clinical Periodontology*, v.17, p.479-493, 1990.

SOBOTTKA, I.; WEGSCHEIDER, K.; BALZER, L.; BÖGER, R.; HALLIER, O.; GIERSDORF, I.; STREICHERT, T.; HADDAD, M.; PLATZER, U.; CACHOVANG, G. Microbiological Analysis of a Prospective, Randomized, Double-Blind Trial Comparing Moxifloxacin and Clindamycin in the Treatment of Odontogenic Infiltrates and Abscesses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.56, p. 2565-2569, 2012.

SOFICA, C.T.; PANAITESCU, C.; MARUSCIA, L.; MARIA, A.S; CRISTEA, M.; PUSCASIU, D.A.; TANASIE, G.; Adhesion and Secretory Profile of Mesenchymal Stem Cells Upon Contact with Some Biomaterials. *Revista de Chimie*. v. 68(9), 2017.

SORIDENT. Permanent Tooth Eruption. Romania, 2017. Disponível em: <<https://www.sorident.ro/en/permanent-tooth-eruption-children.html>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

SORSA, T.; GURSOY, U.; NWHATOR, S.; HERNANDEZ, M.; TERVAHARTIALA, T.; LEPPILAHTI, J.; GURSOY, M.; KÖNÖNEN, E.; EMINGIL, G.; PUSSINEN, P. MÄNTYLÄ, P. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontology 2000*, v.70, p. 142-163, 2015.

SOUSA, F.M.; ALMEIDA, T.G.; CANEDO, E.L.; BARBOSA, R.C.; FOOK, M.V.L. Síntese e Caracterização de Membranas Porosas de Quitosana com Hidroxiapatita Obtida a partir da Casca do Ovo de Galinha. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.12(3). 2017.

SPILLER, K.L.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Clinical translation of controlled protein delivery systems for tissue engineering. *Drug Delivery and Translational Research*, v.5, p. 101–115, 2013.

SUCHÁNEK, J.; NASRY, S. A.; SOUKUP, T.; The Differentiation Potential of Human Natal Dental Pulp Stem Cells into Insulin-Producing Cells. *Folia Biologica*. v. 63(4), p. 121- 131, 2017.

TONSUAADU, K.; GROSS, K.A.; PLŪDUMA, L.; VEIDERMA, M.; A review on the thermal stability of calcium apatites. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. V. 110(2), p.647-659, 2011.

TOUNY, A.H. AND SALEH, M.M. Fabrication of biphasic calcium phosphates nanowhiskers

by reflux approach. *Ceramics International*, v.44(14), pp.16543-16547, 2018.

TRINCA, R.; ABRAHAM, R. G.; FELISBERTI, M. Electrospun nanofibrous scaffolds of segmented polyurethanes based on PEG, PLLA and PTMC blocks: Physico-chemical properties and morphology. *Materials Science and Engineering: C*, v.56, p.511-517, 2015.

VEIGA, I. G.; MORAES, Â. M. Study of the swelling and stability properties of chitosan xanthan membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 124, p. 154 – 160, 2012.

WANG, W.X.; JIANG, N.; WANG, J.W; KANG, X.; FU, G.H; LIU, Y.L. Bone formation in subcutaneous pocket after bone flap preservation. *Clinical Case Reports*, v. 4(5), p. 473–476, 2016.

WEINGAERTNER, E. 2015. Periodontia – Tratamento dos problemas gengivais com periodontistas em São Leopoldo. Gengivite e periodontite. Disponível em: <<http://www.dentalprime.com.br/tratamentos/periodontia-problemas-gengivais-periodontista-em-sao-leopoldo/gengivite-e-periodontite-3/>> Acesso em: 26 jun. 2018.

WESTIN C.B.; TRINCA R.B.; ZULIANI C.; COIMBRA I.B.; MORAES Â.M. Differentiation of dental pulp stem cells into chondrocytes upon culture on porous chitosan-xanthan scaffolds in the presence of kartogenin. *Materials Science and Engineering C*: v.80, p.594-602, 2017.

WESTIN, C.B. Adesão, crescimento e diferenciação de células-tronco mesenquimais dentárias em suportes porosos de quitosana-xantana e PCL projetados para o tratamento da osteoartrite – Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Química; 2016.

WIKESJÖ, U.; SELVIG, K. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000, v.19, p. 21-39, 1999.

YAMAGUCHI, I., TOKUCHI, K., FUKUZAKI, H., KOYAMA, Y., TAKAKUDA, K., MONMA, H; TANAKA, J., Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, v.55(1), p.20-27. 2001.

YANG, H.; LI, J.; SUN, J.; GUO, W.; LI, H.; CHEN, J.; HU, Y.; TIAN, W.; LI, S. Cells isolated from cryopreserved dental follicle display similar characteristics to cryopreserved dental follicle cells. *Cryobiology*, v.78, p. 47-55, 2017.

YILDIRIM, S.; ZIBANDEH, N.; GENÇ, D.; OZCAN, E.; GOKER, K.; AKKOC, T. The

Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. *Stem Cells International*, p. 1-15, 2016.

YUN-JONG P.; SEUNGHEE C.; YOUNG-SEOK P. Regenerative Applications Using Tooth Derived Stem Cells in Other Than Tooth Regeneration: A Literature Review. *Stem Cells International*, v.2, p.1-12, 2015.

ZHANG, Q.; CHEN, L.; CUI, S.; LI, Y.; ZHAO, Q.; CAO, W.; LAI, S.; YIN, S.; ZUO, Z.; REN, J. Expression and regulation of long noncoding RNAs during the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in the inflammatory microenvironment. *Scientific Reports*, v.7, 2017.