



**Joana Miguel Almeida
Baltazar**

**DEGRADAÇÃO DE MEMBRANAS MODIFICADAS
PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO PERIODONTAL**



**Joana Miguel Almeida
Baltazar**

**DEGRADAÇÃO DE MEMBRANAS MODIFICADAS
PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO PERIODONTAL**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes, Professora associada e da Doutora Maria Elizabeth Jorge Vieira Da Costa, Professora auxiliar do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again. Fail better.

Samuel Beckett

o júri

presidente

Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira

Professor associado com agregação no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado

Professor associado no Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes

Professora associada no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro.
(Orientadora)

agradecimentos

Ao longo deste trabalho tive o apoio de várias pessoas às quais não poderia deixar de agradecer.

Em primeiro, queria deixar um agradecimento especial às minhas orientadoras: Prof. Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes e Prof. Doutora Maria Elizabete Jorge Vieira da Costa, pela disponibilidade e constante apoio que mostraram ao longo da minha dissertação.

À professora Marlene Barros e a toda a equipa do laboratório SalivaTec que proporcionou que eu fizesse uma parte do trabalho experimental em parceria com a Universidade Católica Portuguesa de Viseu.

Ao Eduardo Esteves, à Mónica Fernandes e ao Rafael Esteves, por todo o apoio demonstrado e pelo papel fulcral que desempenharam no meu trabalho.

Um agradecimento muito especial à Ângela Borges pela sua ajuda na introdução ao tema e total disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas.

Ao André Girão, à Ana João Nóbrega e ao Hugo Almeida por me apoiarem incansavelmente ao longo do trabalho.

A toda a equipa técnica do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica pelo imenso apoio demonstrado.

Aos meus amigos pelo apoio incondicional e pelos momentos de distração que me proporcionaram ao longo das pausas de trabalho.

Por fim, mas sem dúvida o agradecimento mais importante, aos meus pais e ao meu irmão que me fizeram acreditar nas minhas capacidades e me proporcionaram chegar até aqui.

palavras-chave

Membranas compósitas, Colagénio, Hidroxiapatite, Bioactividade, Degradação, Regeneração periodontal.

resumo

As doenças ou traumas que provocam a perda tecidual são cada vez mais frequentes e, por isso a necessidade de criação de estruturas capazes de facilitar a regeneração de tecidos tem vindo a aumentar ao longo dos anos.

Em medicina dentária existem inúmeras doenças que provocam a perda da estrutura periodontal e levam à urgência da procura de soluções que promovam a reabilitação dos tecidos afetados.

O presente trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de membranas para regeneração periodontal e o estudo da sua degradação em ambiente fisiológico..

Foram produzidas e caracterizadas membranas de colagénio e membranas compósitas de colagénio com enchimento de hidroxiapatite, produzidas por liofilização e por eletrofiação (*electrospinning*)

As membranas apresentaram potencial bioativo quando imersas em fluido fisiológico simulado, comportamento este que revela elevado potencial do material para a regeneração tecidual bucal.

O estudo relativo ao perfil de degradação das membranas em solução tampão de fosfato (PBS) mimetizando a saliva, revelou que as membranas compósitas obtidas por liofilização e prensagem, foram as que apresentaram uma taxa de degradação maior ao longo do tempo.

De um modo global os resultados revelaram que as membranas modificadas com hidroxiapatite mostram capacidade para aplicação em estratégias regenerativas de tecidos periodontais.

keywords

Composite Membranes, Collagen, Hydroxyapatite, Bioactivity, Degradation, Periodontal regeneration.

abstract

Nowadays, the frequency of diseases or trauma that cause tissue loss is increasing rapidly. Therefore, the need to create structures capable of facilitating tissue regeneration has also been crucial over the years.

In dentistry, several diseases arise that cause the loss of periodontal structure, which lead to the urgency in the conception of solutions that promote rehabilitation of the affected tissue.

The objective of the following study was the production and characterization of membranes for periodontal regeneration and the study of its degradation in physiological medium. Collagen membranes and composite membranes filled with hydroxyapatite were produced by lyophilisation and by electrospinning and then characterized.

The membranes exhibited bioactive behaviour when in contact with simulated body fluid, indicating its high potential for applications in dental tissue regeneration.

The study of the membranes degradation profile in phosphate buffer (PBS) mimicking human saliva revealed that the composite membranes obtained by lyophilisation and pressing showed the higher rate of degradation during time.

Globally, the results obtained in this study showed that the collagen membranes modified with hydroxyapatite have ability to be used in regenerative strategies of dental tissues.

Índice

Índice de figuras.....	iii
Índice de tabelas	vii
Abreviaturas	ix
Capítulo 1	3
Enquadramento.....	3
Objetivos e Motivação	4
Capítulo 2	7
2.1- Estrutura periodontal	7
2.2- Fatores que contribuem para a danificação da estrutura periodontal.....	9
2.3- Cicatrização/ Regeneração periodontal	10
2.4– O papel da Saliva	12
2.4.1 – Constituição	12
2.4.2 – Fluxo Salivar	15
2.5- Metaloproteinases da matriz	16
Metaloproteinases na saliva	16
2.6– Colagénio.....	17
2.6.1- Biossíntese do Colagénio.....	17
2.6.2 -Tipos de colagénio	18
2.7- Fosfatos de Cálcio para aplicações biomédicas.....	18
Hidroxiapatite.....	21
2.8– Membranas Periodontais	22
2.8.1 - Membranas periodontais de Colagénio.....	25
2.8.2- Membranas periodontais de Colagénio com enchimento de Hidroxiapatite.....	26
Capítulo 3.....	31
3.1 – Materiais e reagentes	31
3.2 – Métodos de preparação	31
3.2.1- Síntese das partículas nanométricas de hidroxiapatite	31
3.2.2 – Produção das membranas por liofilização.....	32
3.2.3- Preparação de membranas por Electrospinning	35
Solução polimérica precursora.....	35

Electrospinning.....	35
3.3- Caracterização da matriz e do enchimento das membranas compósitas	36
3.3.1 – Fases cristalinas (Difração de Raio-X, DRX).....	36
3.3.2 – Morfologia e tamanho de partícula (Micrografia electrónica de varrimento e transmissão, SEM e TEM).....	37
3.3.3 – Composição e ligações químicas (Espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier, FTIR)	37
3.3.4 –Área superficial específica (adsorção gasosa)	38
3.3.5 – Carga superficial das partículas	40
3.3.6 – Bioatividade em meio acelular.....	41
3.3.7 – Degradação das membranas por ação salivar	42
3.3.7.1- Solubilização do colagénio	43
3.3.7.2 – Degradação das membranas em PBS.....	45
Capítulo 4.....	49
4.1. Caracterização das nanopartículas de Hidroxiapatite	49
4.2. Caracterização das membranas obtidas por dois processos: liofilização e electrospinning	57
4.2.1 - Estudo da bioatividade das membranas em SBF	67
4.2.2 – Estudo da degradação das membranas.....	70
Perfil de degradação das membranas em pH fisiológico (PBS)	70
Alteração morfológica das membranas ao longo do tempo de incubação em PBS	72
Composição de fases cristalinas das membranas.....	76
Capítulo 5.....	79
5- Conclusões e trabalho futuro.....	79
5.1- Conclusões.....	79
5.2- Trabalho Futuro	80
Referencias.....	81
Anexo A.....	93
Fabricação de membranas por Electrospinning	93
Parâmetros operacionais importantes na síntese de fibras por electrospinning	94
Anexo B.....	97

Índice de figuras

Figura 1- Anatomia da estrutura periodontal. Adaptado de [9].....	8
Figura 2- Representação esquemática da estrutura óssea a várias escalas. Adaptado de [13].....	9
Figura 3- Representação da constituição celular das glândulas salivares. Adaptado de [14].....	13
Figura 4- Esquema de biossíntese do colagénio. Adaptado de [43].	18
Figura 5- Solubilidade de fosfatos de cálcio a 37°C em função do pH em soluções aquosas. HAp: hidroxiapatite precipitada; TCP: trifosfato de cálcio; OCP: octafosfato de cálcio; DCPD: difosfato de cálcio dihidratado [51].	19
Figura 6- Célula unitária da hidroxiapatite [55].	21
Figura 7- Representação da aplicação de uma membrana periodontal. A: lesão periodontal; B: colocação da membrana; C: formação do coagulo; D: regeneração da estrutura periodontal. 1: migração das células gengivais para o defeito; 2: estabilização do defeito e crescimento do tecido ósseo; 3: Reparação dos tecidos periodontais. Adaptado de [24].	23
Figura 8- Liofilizador de modelo Teslar LyoQuest HT 40.	33
Figura 9- Representação esquemática do procedimento de produção de membranas por liofilização.	34
Figura 10- Representação esquemática da configuração do equipamento de electrospinning para produção de membranas.	36
Figura 11- Classificação IUPAC dos vários tipos de isotérmicas de adsorção de gases. Adaptado de [66].	38
Figura 12- Classificação IUPAC dos tipos de histerese. Adaptado [66].....	39
Figura 13- Amostra de colagénio incubado em ácido acético 0.5M, durante 4 dias em banho de gelo.	43
Figura 14- Espectrofotómetro - Nanovue Plus.	44
Figura 15- Reta de calibração traçada de acordo com o método de Micro BCA.	45
Figura 16- Membranas incubadas em agitação permanente num agitador de rolos (roller shaker).....	46
Figura 17- Difractograma de raios-X dos pós de hidroxiapatite precipitada.	49
Figura 18- Microscopia electrónica de varrimento (SEM) dos pós de HAp (150x e 500x).	50

Figura 19- Micrografias em TEM das partículas de HAp (A: 60000x; B: 40000x; C: 30000x e D: 20000x).	51
Figura 20- Micrografias em TEM de partículas de hidroxiapatite precipitada a diferentes temperaturas, 35°C e 85°C [65]......	52
Figura 21- Medições de tamanho de partícula obtidas pelo programa Image J.	53
Figura 22- Representação gráfica da distribuição granulométrica dos pós de HAp.	54
Figura 23- Curva do potencial zeta obtida a temperatura ambiente das partículas de HAp.	55
Figura 24- Isotérmicas de adsorção/ dessorção das partículas de hidroxiapatite quimicamente precipitada.	56
Figura 25- Espectro de infravermelho com transformada de Fourier de HAp.	57
Figura 26- Difratograma de raios-X das membranas obtidas por liofilização (Mpadrão e M30HA).	59
Figura 27- Micrografias em SEM das membranas padrão (A e B) e das membranas com enchimento de HAp (C e D).	60
Figura 28- Micrografias da membrana comercial (Jason Membrane®). (A e B): vista superior e (C e D): vista inferior. Ampliações (200x e 500x).	61
Figura 29- EDS das membranas obtidas por liofilização. A: Mpadrão e B: M30HA.	63
Figura 30- Representação dos espectros de FTIR de colagénio original e das membranas obtidas por liofilização. A: colagénio original; B: Mpadrão e C: M30HA.	65
Figura 31- Micrografias das membranas fibrosas de colagénio obtidas por electrospinning.	66
Figura 32- Difratograma de raios-X das membranas compósitas com enchimento de HAp após imersão em SBF durante 1, 3 e 7 dias.	67
Figura 33- Micrografias em SEM da membrana M30HA incubada em SBF após: 0 dias (A e B); 3 dias (C e D) e 7 dias (G e H).	69
Figura 34- Perda de colagénio para o sobrenadante em cada tipo de membrana.	70
Figura 35- Perda de colagénio em cada tipo de membrana após 7 dias de exposição... ..	72
Figura 36- Micrografias das membranas padrão após a incubação em PBS durante 0, 3, 5 e 7 dias. A: Mpadrão_p (0 dias); B: Mpadrão (0 dias); C: Mpadrão_p (3 dias); D: Mpadrão (3dias); E: Mpadrão_p (5 dias); F: Mpadrão (5 dias); G: Mpadrão_p (7 dias); H: Mpadrão (7 dias).	73
Figura 37- Micrografias das membranas compósitas incubadas em PBS durante 0, 3, 5 e 7 dias. A: M30HA_p (0 dias); B: M30HA (0dias); C: M30HA_p (3 dias); D: M30HA (3	

dias); E: M30HA_p (5 dias); F: M30HA (5 dias); G: M30HA_p (7 dias); H: M30HA (7 dias) 74

Figura 38- Difratoograma de raios-X das membranas compósitas com enchimento de HAp após a incubação em PBS durante 3, 5 e 7 dias 76

Figura 39- Representação esquemática do processo de electrospinning na configuração horizontal. Adaptado de [84] 94

Índice de tabelas

Tabela 1 - Fosfatos de cálcio utilizados na biomedicina e respetivas razões de Ca/P. Adaptado de [52].	20
Tabela 2 - Membranas periodontais existentes nos mercados atuais [59].....	25
Tabela 3 - Designação das membranas produzidas por liofilização e detalhes da preparação.....	33
Tabela 4 - Condições de processamento por electrospinning.....	36
Tabela 5 - Tipos de isotérmicas de gases e descrição.....	39
Tabela 6 - Tipos de histerese representados na figura 13 e descrição.....	40
Tabela 7 - Ordem de adição, fórmula química e quantidade de reagentes utilizados na preparação de SBF.....	41
Tabela 8 - Números de onda representados na figura 27 e ligação atribuída.....	57
Tabela 9 - Membranas obtidas experimentalmente e respetivas composições.....	58
Tabela 10 - Concentrações e volumes a adicionar para a preparação dos padrões diluídos de BSA.	97
Tabela 11 - Reagentes e respectivas quantidades a adicionar para a preparação do Wr.	98

Abreviaturas

BET – Brunauer, Emmet e Teller

BSA – Ácido bicinconínico

BSA – Albumina sérica de bovino (*Bovine serum albumin*)

CaP – Fosfato de cálcio

DRX – Difração de Raio-X

FCG – Fluido crevicular gengival

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GA - Glutaraldeído

HA – Hidroxiapatite

HAp – Hidroxiapatite precipitada

HFP – Hexafluoro propanol

IGA – Imunoglobulinas secretadas

IUPAC – União Internacional da Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

Mpadrão – Membrana padrão de colagénio

Mpadrão_p – Membrana padrão de colagénio prensada

M30HA – Membrana de colagénio com 30% de hidroxiapatite

M30HA_p – Membrana de colagénio com 30% de hidroxiapatite prensada

Mcomercial – Membrana comercial

MCOL – Membrana de colagénio obtida por electrospinning

MMP – Metaloproteinases

PBS – Tampão salino fosfato (*Phosphate Buffer Saline*)

PLA- Ácido polilático

PTFE – Politetrafluoretileno

e-PTFE – Politetrafluoretileno expandido

ROG – Regeneração óssea guiada

RTG – Regeneração tecidual guiada

Rpm – Rotações por minuto

SBF – Fluido fisiológico simulado (*Simulated Body Fluid*)

SEM – Microscopia electrónica de varrimento (*Scanning electron microscopy*)

TCP – Trifosfato de cálcio

TEM – Microscopia electrónica de transmissão (*Transmission electron microscopy*)

TIMP – Inibidores das metaloproteinases (*Tissue innibitor of metaloproteinase*)

u.a – Unidades arbitrária

Wr- Reagente de trabalho (*Work reagent*)

Capítulo 1

Capítulo 1

Enquadramento e Objetivos

Enquadramento

Hoje em dia, são cada vez mais as lesões resultantes de traumas ou doenças que provocam a perda ou danificação de tecidos.

A fim de combater estas perdas, a Engenharia de Tecidos desenvolve substitutos biológicos capazes de regenerar ou recuperar a porção de tecido perdido ou danificado, envolvendo áreas multidisciplinares que vão desde a medicina à engenharia e biologia [1].

As doenças periodontais, as neoplasias, a osteomielite e os hábitos relacionados com o quotidiano humano, tendem a afetar a estrutura periodontal, comprometendo funções como a nutrição e o suporte do dente, que são essenciais para a sua vitalidade [2,3].

Na área da odontologia, a doença periodontal é a causa mais comum das perdas ou danificação da estrutura periodontal. Esta doença, de carácter inflamatório / infeccioso crónico é provocada por acumulação de biofilme bacteriano e afeta os tecidos de suporte do dente.

As estratégias de regeneração de tecidos utilizadas no tratamento de lesões graves na cavidade oral, como as anteriormente referidas, assentam na ideia de que apenas as células provenientes do ligamento periodontal contêm as células progenitoras necessárias para a formação de novo osso alveolar, cemento e ligamento periodontal, uma vez que a migração das outras células (células gengivais, do tecido conjuntivo e do tecido ósseo) para o local com defeito provoca anomalias na regeneração. Se as primeiras células a colonizar forem provenientes destes locais, pode ocorrer reabsorção radicular (células do tecido conjuntivo), reabsorção óssea ou anquilose (células do tecido ósseo) ou pode ser originado um longo epitélio de união [4].

Para favorecer a regeneração é importante garantir a proliferação e maturação das células provenientes do ligamento periodontal [5]. As membranas regenerativas são utilizadas para este efeito, em particular no tratamento de perdas ósseas na cavidade

oral, servindo de barreira entre os tecidos moles e os tecidos rígidos (osso), impedindo a migração das células epiteliais e das células gengivais.

Existem no mercado algumas membranas, mas é ainda necessária a sua otimização a nível da degradação em meio bucal por ação microbiana, de colagenases, pH e é também desejável um estudo mais aprofundado a nível da estabilidade da adesão celular. Neste contexto, é importante, implementar novas estratégias e investigar novas soluções, através da combinação de conhecimentos das áreas de Engenharia de Materiais, Bioquímica e Biomedicina.

Objetivos e Motivação

Em estudos anteriores, realizados no âmbito do projeto de dissertação “*Membranas compósitas colagénio/CaP para regeneração óssea tecidual guiada*”, foram produzidas e caracterizadas membranas compósitas com enchimento de hidroxiapatite e de vidro bioativo, para regeneração de tecidos em aplicações dentárias. A avaliação da sua degradação em meio bucal, principalmente pela ação da saliva produziu resultados exploratórios que era importante aprofundar e sistematizar através da realização de novos ensaios com base num protocolo experimental então elaborado e que se pretendeu otimizar e validar neste projeto.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi preparar membranas periodontais compósitas de colagénio, modificadas com enchimento de hidroxiapatite, com a finalidade de estudar o papel deste fosfato de cálcio e da matriz de colagénio na degradação das membranas, a pH próximo do da saliva (≈ 6.8). A hidroxiapatite nanoestruturada, usada como enchimento, foi obtida por precipitação química.

As membranas poliméricas e compósitas foram produzidas por técnicas de liofilização e de *electrospinning*, sendo comparadas as amostras obtidas pelos dois métodos de fabrico, a nível microestrutural.

Os testes de degradação foram realizados em solução tampão de fosfato apenas com as membranas produzidas por liofilização.

O estudo efetuado centrou-se no efeito do enchimento, da técnica de fabricação, e da estrutura na degradação da membrana a pH salivar.

Para o estudo da influência do meio salivar na degradação das membranas, recorreu-se ao laboratório SalivaTec no contexto da parceria com a Universidade Católica Portuguesa de Viseu.

Capítulo 2

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1- Estrutura periodontal

O periodonto é a designação dada a todos os tecidos envolvidos na fixação do dente ao osso e a periodontologia é a ciência que visa o estudo da doença do periodonto, incluindo o seu diagnóstico, a sua prevenção e o seu tratamento, com o objectivo de alcançar melhorias na saúde humana [1]. Os dentes, juntamente com a língua fazem parte da cavidade oral, considerada a primeira parte do trato digestivo, no qual se inicia o processo de mastigação. As extremidades da cavidade oral são formadas pelos lábios, as bochechas e o palato. É na cavidade bucal que se faz secreção proveniente das glândulas salivares [6].

Todos os dentes, independentemente da sua forma ou função, apresentam os mesmos elementos constituintes [7]. Estruturalmente, o dente é constituído por duas partes: coroa e raiz. O colo dentário, local de inserção do dente na gengiva, permite a união entre ambas as porções sendo considerado por alguns autores o terceiro constituinte estrutural [8]. A coroa é considerada a porção visível, que emerge da gengiva, situada acima do colo dentário, coberta por uma camada de esmalte altamente mineralizado [9]. O interior do dente é constituído por dentina, um tecido mineralizado com composição química semelhante á do osso. Na dentina existe uma cavidade onde se encontra a polpa dentária. A polpa dentária é um tecido de sustentação especializado, constituído por fibras nervosas sensoriais [10]. Subjacente ao colo dentário está a raiz, sendo esta a porção do dente contida no alvéolo dentário sob a linha de inserção gengival. A raiz é envolvida por um tecido conjuntivo duro, o cimento, apresentando a função de ancoragem [8].

A estrutura periodontal é constituída por 4 elementos (figura 1): ligamentos periodontais, cimento, gengiva e alvéolo dentário [5,11].

Os ligamentos periodontais são constituídos por fibras do tecido conjuntivo, também conhecidas por fibras de Sharpey, ligam o dente ao alvéolo dentário. Estes ligamentos apresentam forte vascularização e são constituídos essencialmente por

colagénio do tipo I. São responsáveis por promover a nutrição das células dos ligamentos e das células circunjacentes do cemento e do alvéolo dentário. O cemento, como definido anteriormente, é um tecido conjuntivo duro, não vascularizado que reveste a raiz, promovendo a união dos ligamentos periodontais. A gengiva é considerada a mucosa oral que cobre a parte superior da crista alveolar. Anatomicamente, a gengiva é dividida em duas partes: gengiva marginal e gengiva aderida. A primeira está fortemente adaptada à superfície dentária e a segunda encontra-se firmemente anexada ao periósteo subjacente ao alvéolo dentário. A gengiva aderida permite a defesa da doença periodontal, protegendo o osso subjacente e os restantes tecidos de suporte [8].

A matriz óssea é constituída por 65% de minerais e 35% de proteínas. A parte mineral é constituída por uma mistura de fosfatos de cálcio, onde predomina a hidroxiapatite (HA). Na fase orgânica existem em 90% de fibras de colagénio do tipo I e 10% de proteoglicanos e outras proteínas [12]. Na figura 2, estão representados esquematicamente os constituintes da matriz óssea e sua evolução do estado macroscópico até ao nível atómico [13].

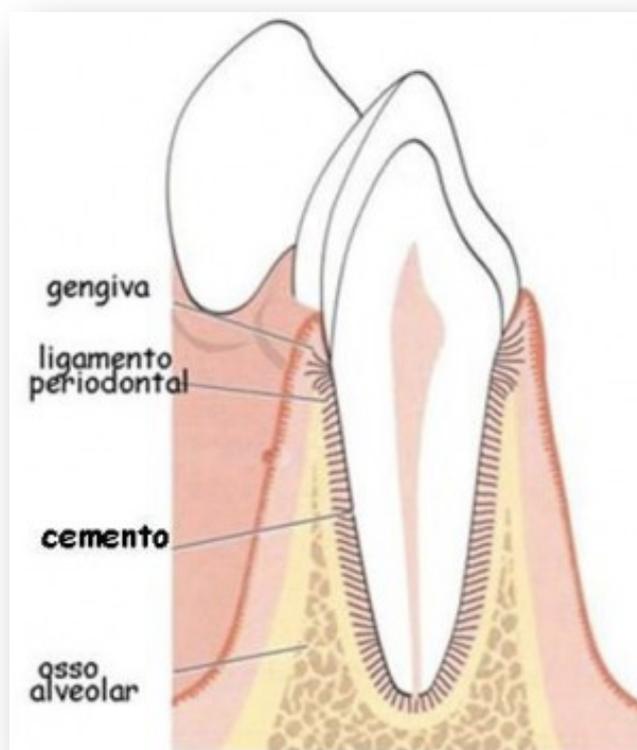


Figura 1- Anatomia da estrutura periodontal.
Adaptado de [9].

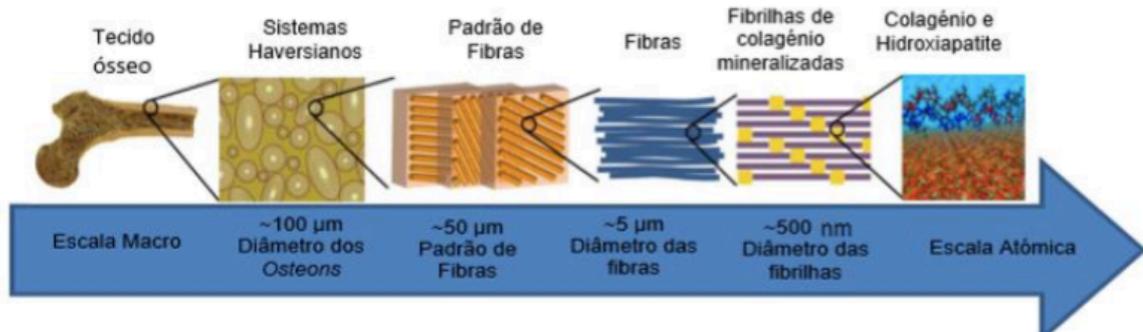


Figura 2- Representação esquemática da estrutura óssea a várias escalas. Adaptado de [13].

O alvéolo dentário forma-se a partir de células que migram da crista neural, tendo origem ectomesenquimal. Esta parte anatômica está sujeita a intensa remodelação durante o processo eruptivo e a ação constante de forças mastigatórias [14]. O osso alveolar é constituído por osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos permitem a síntese da parte orgânica da matriz óssea, isto é, colagénio, proteoglicanos e proteínas e são responsáveis pela mineralização da matriz óssea. Estas células ósseas, ao ficarem na matriz óssea recém-formada denominam-se osteócitos e ajudam a nutrição do osso. Finalmente os osteoclastos são células fagocitárias que permitem a erosão óssea, sendo de extrema importância no processo de remodelação quando em conjunto com os osteoblastos.

Macroscopicamente, o alvéolo dentário é constituído internamente por osso esponjoso ou trabecular, que lhe confere um aspecto poroso. A sua parte externa é constituída por osso compacto, conferindo ao alvéolo elevada resistência [13,15].

Toda a estrutura periodontal assegura a nutrição e o suporte do dente [12].

2.2- Fatores que contribuem para a danificação da estrutura periodontal

A estrutura periodontal pode ser destruída ou apenas danificada pela ação de diversos fatores, entre os quais, traumas, doenças metabólicas, neoplasia, osteomielite e periodontite, doenças que podem dar origem a respostas inflamatórias. A falta de higiene oral é um fator relevante na promoção da destruição da estrutura periodontal.

A periodontite pode ser definida como uma doença que se refere a lesões inflamatórias que afetam o tecido periodontal, causadas por microrganismos e também pela acumulação de placa bacteriana. Estas reações inflamatórias levam à degradação dos tecidos conectivos e do osso alveolar, sendo uma das maiores causas de perda de dentes em seres humanos e um tema ainda em discussão [2,3].

Existem vários fatores relativos ao ser humano e às suas práticas quotidianas que contribuem significativamente para a perda ou danificação da estrutura periodontal. Segundo o *National Institute of Dental and Craniofacial Research* esses fatores são: o tabagismo, as doenças hormonais, a diabetes, certas medicações, higiene oral reduzida e outros fatores genéticos [16].

A osteomielite é uma doença que engloba lesões graves, que se caracterizam por infecções bacterianas ou fúngicas no osso e na medula óssea [8]. Esta patologia também pode estar associada aos fatores anteriormente referidos.

A extração de dentes também pode acelerar a danificação da estrutura periodontal, uma vez que, a prazo, o osso que serve de suporte ao dente (alvéolo dentário) vai sendo reabsorvido, como consequência da perda de estimulação do osso pelas forças exercidas no dente.

2.3- Cicatrização/ Regeneração periodontal

A terapia regenerativa tem a finalidade de reproduzir e reconstruir uma zona anatômica perdida ou danificada, de modo a que a funcionalidade dos tecidos seja recuperada.

A cicatrização periodontal é um processo complexo amplamente estudado nos dias de hoje. Neste processo estão envolvidos tecidos rígidos e mineralizados como o osso e o dente e tecidos conjuntivos moles como o ligamento periodontal e a gengiva. De modo a obter um processo de regeneração favorável é necessário estabelecer, entre estes dois tipos de tecidos, uma interação e regeneração sincronizada [5].

A regeneração após o tratamento periodontal consiste na reconstrução do complexo do suporte do dente, que desapareceu devido a doenças periodontais inflamatórias ou traumáticas [17]. Caracteriza-se pela formação de um novo cimento com enchimento de fibras de colagénio em função com o ligamento periodontal e alvéolo dentário recém formado e a gengiva. [17,18]

A regeneração dos defeitos periodontais é determinada pelo tipo de células que colonizam primeiro a superfície radicular exposta. Esta área pode ser afetada por quatro grupos de células: células epiteliais, ósseas, do tecido conjuntivo e do ligamento periodontal. A reabsorção do tecido periodontal é diferente para cada uma das células que podem estar envolvidas no processo. Se as células forem epiteliais, a cicatrização resultará um longo epitélio de união. Se por outro lado, as primeiras células a colonizar forem do tecido conjuntivo, poderá ocorrer reabsorção radicular. Já as células ósseas, ao serem primordiais podem dar origem a reabsorção óssea ou anquilose, isto é, a fixação rígida entre o osso e os dentes [4].

As células gengivais e as provenientes do alvéolo dentário, são incapazes de criar condições essenciais à regeneração tecidual. *Karring* e seus colaboradores [19], realizaram um estudo que mostrou que o osso alveolar não apresentava capacidade para regenerar novos constituintes da estrutura periodontal, revelando como resultado a ocorrência de anquilose e reabsorção radicular [19]. Do mesmo modo, as células do tecido conjuntivo gengival também parecem provocar reabsorção radicular, não criando condições favoráveis à regeneração periodontal [20]. Num novo estudo, realizado por *Karring* [21], mostrou-se que as células do ligamento periodontal eram capazes de formar nova adesão conjuntiva, e que a proliferação epitelial sob a superfície radicular surgia como barreira a tal formação [21]. Com a introdução dos implantes dentários, já na década de 90, confirmou-se a teoria de que apenas as células provenientes do ligamento periodontal são capazes de criar condições favoráveis à regeneração [4].

A regeneração periodontal apenas é possível quando existe migração e fixação das células do ligamento periodontal na superfície radicular, com proliferação e maturação destas numa inserção fibrosa, organizada e funcionalmente inserida no cimento recém formado. Também é necessário que, paralelamente, ocorra migração, proliferação e maturação das células do tecido ósseo em conjunto com o ligamento periodontal em regeneração. [18]

De modo a contornar esta situação, desenvolveu-se uma nova estratégia de regeneração periodontal: regeneração tecidual guiada. Esta estratégia baseia-se na inserção de uma barreira física entre o tecido conjuntivo do fragmento periodontal e a superfície radicular danificada, impedindo a migração das células epiteliais gengivais e do tecido conjuntivo ao longo da superfície radicular, favorecendo a recolonização do local pelas células do ligamento periodontal, tendo estas, como já referido anteriormente, maior capacidade para regenerar tecido periodontal [21].

2.4– O papel da Saliva

2.4.1 – Constituição

Um dos aspetos que tendem a afetar a regeneração periodontal é a exposição ao meio bucal dos materiais para terapias regenerativas, isto é à degradação destes materiais por ação microbiana, por cologenases e por gelatinases.

A saliva é um fluido oral aquoso, com múltiplas funções, com implicações na saúde humana. Este fluido é constituído maioritariamente por água (99%), incluindo também uma mistura de electrólitos (sódio, potássio, cloro, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfato), proteínas (incluindo enzimas, imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, glicoproteínas da mucosa (mucinas), vestígios de albumina e diferentes polipeptídeos e oligopéptidos) e, em menores quantidades também é constituída por glucose e produtos nitrogenados. Estes componentes funcionam de forma integrada e são responsáveis pelas várias funções atribuídas à saliva [22].

A saliva apresenta pH entre 6 e 7 e pode ter origem nas glândulas salivares maiores como a parótida, submandibular e sublingual, como também nas glândulas salivares menores como as labiais, bucais, linguais e palatais [23,24].

A saliva também pode ser constituída por uma mistura de fluidos orais que incluem as secreções das glândulas salivares, juntamente com vários constituintes de origem não salivar, como o fluido crevicular gengival (FCG), secreções nasais e bronquiais expectoradas, derivados de sangue provenientes de lesões orais, bactérias e produtos bacterianos, vírus, fungos, componentes celulares e restos de alimentos submetidos ao processo de mastigação [22].

Uma pessoa saudável produz, diariamente, cerca de 1 a 1,5L de saliva. As glândulas salivares são constituídas por vários tipos de células como as células acinares, células do ducto e células mioepiteliais, como representado na figura 3 [24].

As células acinares são responsáveis pela produção das secreções serosas, mucosas e mistas, As secreções serosas são produzidas pelas glândulas parótidas, as mucosas são segregadas pelas glândulas menores e as mistas (serosa + mucosa) são libertadas nas glândulas sublingual e submandibular [23,24]

No ducto, são produzidas as células do ducto que são responsáveis por eliminar as secreções para o exterior. Estas células podem ser classificadas em, intercaladas, estriadas e excretoras.

As células mioepiteliais permitem a contração das células acinares, de modo a que estas possam excretar as secreções.

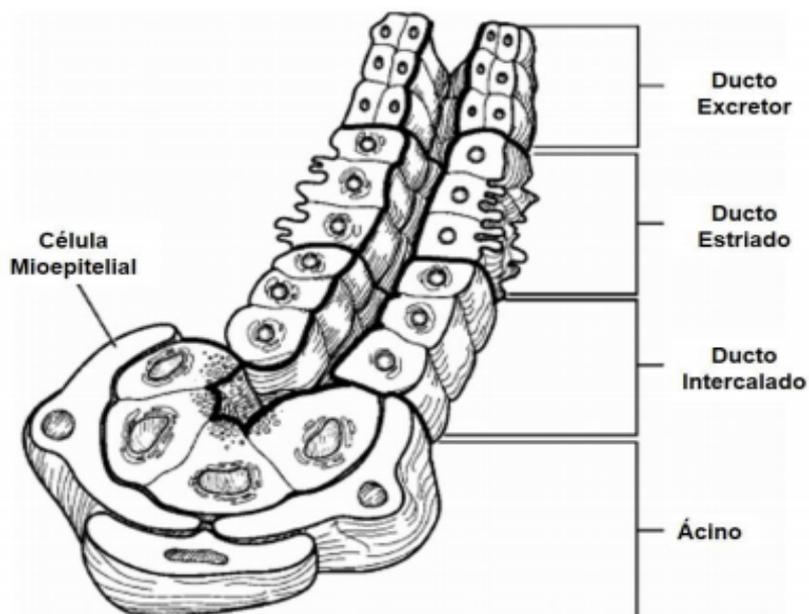


Figura 3- Representação da constituição celular das glândulas salivares. Adaptado de [14].

O bicarbonato, o fosfato e a ureia apresentam-se como reguladores do pH permitindo que a saliva atue como solução tampão.

As mucinas são responsáveis pela proteção da cavidade bucal e representam cerca de 45% das proteínas constituintes da saliva.

Os fosfatos de cálcio e proteínas contribuem simultaneamente na modelação da desmineralização e mineralização .

As imunoglobulinas, proteínas e enzimas promovem a atividade antibacteriana na cavidade bucal [23].

A saliva está envolvida em inúmeras funções, estando estas relacionadas com a sua composição em proteínas. A saliva exerce ações sobre os dentes, a mucosa oral, a comida e os microrganismos que colonizam a cavidade bucal.

De entre as variadas funções da saliva é possível destacar:

1. **Proteção e lubrificação:** protege a cavidade oral através da formação de uma camada seromucosa que recobre os seus tecidos.

2. **Diluição e limpeza:** permite a eliminação dos restos de alimentos, limitando a quantidade existente para os microrganismos formadores de biofilme.
3. **Capacidade tampão:** a capacidade tampão permite à saliva neutralizar os ácidos produzidos por microrganismos acidogéneos prevenindo a desmineralização.
4. **Proteção do esmalte:** a estabilidade da hidroxiapatite presente no esmalte é conseguida através da presença de cálcio, fósforo e flúor e também através do pH da saliva.
5. **Digestão:** permite a formação do bolo alimentar, através da digestão do amido pela enzima α - amilase presente na composição da saliva,
6. **Ação antibacteriana:** produzida essencialmente pelas proteínas imunológicas presentes no fluido salivar [22, 23]

A capacidade tampão é uma função relevante da saliva, uma vez que permite manter o pH constante através de sistemas como: Mucinato/mucina, monofosfato/bifosfato e bicarbonato/ácido carbónico. Podendo variar com a fisiologia de cada indivíduo, a concentração deste último sistema, normalmente, varia de forma proporcional ao fluxo salivar, determinando um pH mais alcalino com o aumento do débito do fluxo salivar [25,26].

Outra das funções com elevada importância é a atividade antibacteriana. Na saliva existem várias proteínas que lhe conferem o papel antibacteriano: lisozimas, lactoferrinas, aglutininas e imunoglobulinas.

As lisozimas têm a capacidade de ativarem as autolisinas bacterianas, capazes de destruir os componentes da parede celular, provocando a sua autólise. São proteínas capazes de alterar o metabolismo da glicose em bactérias sensíveis, contribuindo para a eliminação bacteriana. Para além destas duas importantes funções, as lisozimas são capazes de se ligarem facilmente à hidroxiapatite presente na superfície do dente, conferindo-lhe uma camada protetora.

As lactoferrinas são proteínas existentes na saliva que possuem a capacidade de se ligarem ao Fe, diminuindo o consumo deste elemento por parte das bactérias. Cada molécula é capaz de se ligar a dois átomos de Fe, eliminando o existente nos fluidos e nas áreas inflamadas. Tal facto permite eliminar os danos provocados pelos radicais

livres e também possibilita a diminuição da disponibilidade desse material para consumo dos microrganismos patogénicos, conferindo-lhe efeito bacteriostático.

Quanto às aglutininas, permitem a aglutinação de bactérias por proteínas salivares através da neutralização das cargas negativas da superfície celular. O processo de aglutinação referido, corresponde à ligação de microrganismos às proteínas salivares por interação de cargas elétricas por pontes cálcio ou por ligações das proteínas a receptores específicos das membranas dos microrganismos.

As mucinas também são consideradas proteínas com propriedades antibacterianas que pertencem ao grupo das aglutininas e permitem o controlo da adesão de microrganismos da cavidade oral, protegendo a superfície dentária.

As imunoglobulinas mais abundantes na saliva são as imunoglobulinas secretadas (IgA), capazes de reconhecerem os microrganismos distintos da cavidade oral. Estas proteínas, impedem a invasão de corpos estranhos (antigénios), eventualmente nocivos para o organismo [26-28].

2.4.2 – Fluxo Salivar

O fluxo salivar pode variar com a ação de determinados estímulos : mecânicos, térmicos e químicos.

A nível mecânico, a variação deste fluxo deve-se ao facto do seu aumento ser proporcional ao aumento da força mastigatória. Termicamente, o fluxo salivar está inversamente associado à temperatura ambiente, isto é, quanto maior for a temperatura menor é o fluxo salivar. Já os estímulos químicos relacionam-se com as sensações gustativas e olfativas. Ambas as sensações agradáveis produzidas por alimentos são consideradas o estímulo mais potente do centro salivar, provocando um elevado aumento do fluxo salivar em relação aos outros estímulos mencionados [29, 30].

O fluxo salivar, segundo o modo de produção, pode ser considerado como: estimulado e não estimulado. O estimulado provém, essencialmente, das glândulas parótidas (60-65%) e o fluxo não estimulado é produzido principalmente pelas glândulas submandibulares (71%), com as glândulas parótidas a contribuir com 25% e as sublingual e menores com cerca de 3 a 4% [29,30].

2.5- Metaloproteinasas da matriz

Existem algumas enzimas que são extremamente importantes na remodelação do tecido conjuntivo durante o seu desenvolvimento, homeostase e regeneração. Entre essas enzimas estão as metaloproteinasas da matriz (MMP) e os seus inibidores (TIMP – *Tissue inhibitor of metalloproteinase*). As MMPs são endopeptidases dependentes de cálcio e zinco que funcionam a pH neutro e, coletivamente, são capazes de destruir praticamente todas as moléculas da matriz extracelular. Estas enzimas são provenientes de leucócitos polimornucleares [13]. As MMPs associadas à degradação do colagénio são as cologenases (MMP-1,-8 e -13) e as gelatinases (MMP-2 e -9) [31]. O desequilíbrio entre as MMP e os seus inibidores (TIMP) leva ao colapso da matriz extracelular durante a doença periodontal e consequentemente à degradação das fibras de colagénio inseridas na raiz [32].

As MMPs estão presentes em pacientes saudáveis juntamente com outras proteinasas extracelulares e estão envolvidas em diversos eventos fisiológicos, tais como remodelação óssea, coagulação e quebra de fibrinogénio, regeneração tecidual, regulação de respostas inflamatórias, entre outros. Em situações em que o paciente revela uma patologia associada, as MMPs encontram-se em várias condições inflamatórias que envolvem danificação dos tecidos [33-36]. Na forma ativa, em situações de inflamação periodontal, existem MMPs (MMP1,2,8,9) que provocam a degradação do colagénio, podendo cortá-lo num único local, dando origem a dois fragmentos diferentes ou em vários locais, criando inúmeros fragmentos péptidos [37-40].

Metaloproteinasas na saliva

A saliva é uma mistura de fluidos bastante complexa, podendo conter secreções das glândulas salivares menores e maiores, assim como do FCG (fluido crevicular gengival), secreções bronquiais, células do plasma e sanguíneas, microrganismos, células de descamação do epitélio oral e restos alimentares [41].

As enzimas presentes nesta complexa mistura de fluidos podem ser sintetizadas por microrganismos orais, células do epitélio, pelas glândulas salivares e podem também ter origem no FCG. A existência de metaloproteinasas neste último fluido ou até mesmo na saliva reflete o grau de degradação do colagénio no periodonto e pode ser relevante na detecção da doença periodontal.

Durante a doença periodontal as enzimas proteolíticas MMP-8 e MMP-9 são as mais abundantes e responsáveis pela maioria da degradação do colagénio. Além destas, também são encontradas no FCG a MMP-2 e a MMP-13 [42].

2.6– Colagénio

O colagénio é uma glicoproteína presente em quase todos os tecidos. Esta proteína é um elemento estrutural que confere resistência e suporte ao tecido, participando também nos processos de diferenciação, adesão, migração e proliferação celular. Atendendo ao tipo de órgão ou de espécie de que provém, esta proteína pode exercer atividade antigénica variada [43,44].

A molécula do colagénio é constituída por três cadeias polipeptídicas, denominadas por cadeias alfa(α). Estas cadeias estão conformadas em tripla hélice, estabilizadas por pontes de hidrogénio intercadeia, conferindo à molécula alta estabilidade, rigidez e forma de bastão (figura 4) [43].

Todas as cadeias de colagénio possuem uma sequência característica de aminoácidos, incluindo uma série de repetições da sequência de Glicina-X-Y, no qual X é, normalmente, prolina e Y, hidroxiprolina. As cadeias α , anteriormente referidas, possuem sequências adicionais de 15 a 20 aminoácidos que não fazem parte da tripla hélice, sendo denominadas telopeptídeos, também conhecidos pela extensão não colagenosa da molécula. Essas extensões podem ser, do tipo amina (NH_2) e carboxilo (COOH), apresentando cada uma funções específicas. Segundo a literatura a extensão COOH evidencia informações acerca da tripla hélice, já o domínio NH_2 revela-se importante na regulação final do diâmetro das fibrilas [43].

2.6.1- Biossíntese do Colagénio

O processo de biossíntese do colagénio consiste na libertação da sua forma precursora para a matriz celular por parte das células, normalmente, fibroblastos [32]. Esta forma precursora denomina-se procolágeno e apresenta duas extensões propeptídicas: amino (NH_2) e carboxi (COOH) terminal, que são removidas após a secreção na matriz celular. Este processo resulta numa molécula denominada de tropocolágeno, que se apresenta na forma de tripla hélice, com poucos aminoácidos. No processo de fibrilogénese, há a formação de fibrilas de colagénio, através da agregação

das moléculas de tropocolágeno segundo a orientação cabeça-cauda (figura 4) e também a formação de fibras se, por sua vez, se agregarem em feixes maiores [49,51] .

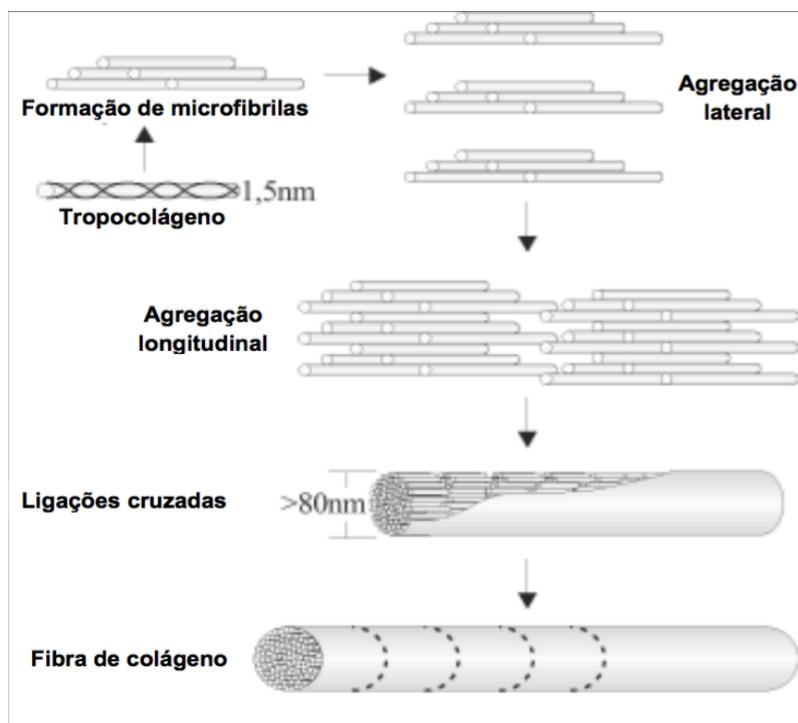


Figura 4- Esquema de biossíntese do colágeno. Adaptado de [43].

2.6.2 -Tipos de colágeno

A família dos colágenos engloba vinte e oito tipos diferentes e ainda mais de 40 cadeias geneticamente distintas [45].

Os tipos de colágeno são classificados segundo as suas propriedades e conformação, podendo ser: colágenos fibrilares (I,II,III,V e X), colágenos associados a fibrilas, com interrupção da tripla hélice (IX, XII, XIV), colágenos que formam lâminas (IV, VII, X), colágenos trans-membranares (XIII, XVII), colágenos que formam fibrilas de ancoragem (VII) e colágenos conhecidos pelo seu clone do DNA, ainda não isolados em nenhum tecido [46].

2.7- Fosfatos de Cálcio para aplicações biomédicas

Os fosfatos de cálcio (CaP) são compostos minerais que aparecem como importantes constituintes de tecidos duros como as estruturas ósseas e dentárias. Estes compostos são fundamentalmente constituídos por íons Ca^{2+} , íons de fosfato PO_4^{2-}

e também iões OH^- . Os materiais à base de fosfatos de cálcio apresentam grande potencial em aplicações na medicina regenerativa devido a características como: bioatividade, biocompatibilidade, semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados, osteocondutividade e ausência de toxicidade [47,48]. Por estas razões continuam a ser objeto de estudo e investigação no campo dos biomateriais e da engenharia de tecidos.

Em ambientes fisiológicos, os fosfatos de Ca sofrem processos de dissolução e de precipitação que levam à formação de uma camada de apatite associada ao potencial bioativo que apresentam. A dissolução destes materiais é induzida pela atividade de macrófagos e osteoblastos num meio ácido, fazendo com que ocorra libertação de iões de Ca e P para o meio. A libertação destes iões provoca uma sobressaturação localizada do fluido fisiológico, dando origem à precipitação sobre a superfície do material, de estruturas apatíticas, com incorporação de iões presentes no fluido fisiológico. Os precipitados mais comuns são de hidroxiapatite carbonatada, que confere ao material potencial para mineralização e formação do osso. [49,50].

A solubilidade dos fosfatos de cálcio é um parâmetro importante neste contexto, e é entre outros fatores influenciado pelo pH e pela razão Ca/P. De um modo geral, a solubilidade diminui com o aumento da razão Ca/P e aumenta com a diminuição do pH. A partir da figura 5 é possível avaliar a estabilidade dos fosfatos de cálcio em contacto com soluções aquosas, verificando-se que o mais estável é a hidroxiapatite para pH superior a 5.

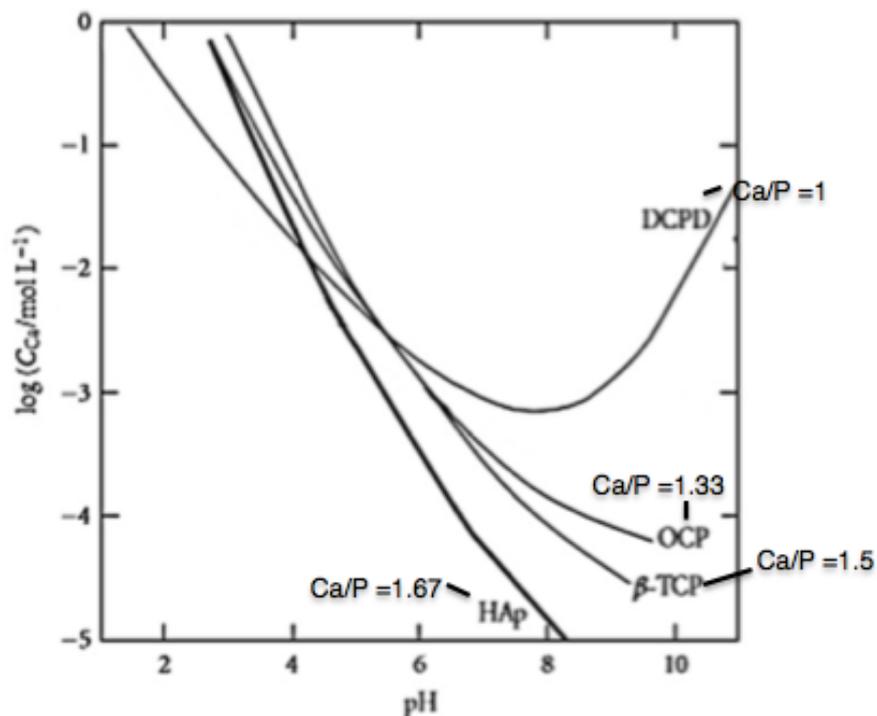


Figura 5- Solubilidade de fosfatos de cálcio a 37°C em função do pH em soluções aquosas. HAp: hidroxiapatite precipitada; TCP: trifosfato de cálcio; OCP: octafosfato de cálcio; DCPD: difosfato de cálcio dihidratado [51].

Como já referido, os fosfatos cálcio são materiais que apresentam forte aplicação na medicina dentária, participando na regeneração ou reparação de tecido ósseo, no restabelecimento radicular, no revestimento de implantes metálicos, entre outros.

Na tabela 1 estão representados alguns dos tipos de fosfatos de cálcio mais utilizados em aplicações biomédicas, organizados segundo a razão Ca/P [52].

Tabela 1 - Fosfatos de cálcio utilizados na biomedicina e respetivas razões de Ca/P. Adaptado de [52].

Nome	Formula	Razão Ca/P
Tetrafosfato de Cálcio (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0
Hidroxiapatite (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Trifosfato de Cálcio (α,β,γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
Octafosfato de Cálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6.5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Difosfato de Cálcio bihidratado (Bruxite)	$\text{CaHPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$	1.0
Difosfato de Cálcio (Monetite)	CaHPO_4	1.0
Fosfato monocálcio monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2.\text{H}_2\text{O}$	0.5

De entre os fosfatos de cálcio apresentados, os mais utilizados na odontologia são a HA, obtida biologicamente ou através de um processo de sintetização, e o TCP [53].

Hidroxiapatite

A hidroxiapatite está presente na composição do osso em elevada quantidade, representando 5% do peso total de um indivíduo humano adulto.

Em odontologia, a hidroxiapatite é o biomaterial mais utilizado designadamente em preenchimentos de cavidades ósseas, originadas por perdas ou fraturas periodontais que necessitam de recuperação a partir da osseointegração e restauração óssea local.

A hidroxiapatite possui uma razão Ca/P (1.67) muito semelhante á que se encontra no esmalte, dentina e osso, respetivamente, 1.63, 1.61 e 1.71 [49, 54]. Constitui 55% da composição do osso, 96% da composição do esmalte dentário e 70% da dentina [47].

A formula química da hidroxiapatite é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)\text{OH}$, podendo também ser apresentada como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. O sistema cristalino em que se insere é cristalino e pertence ao grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, com simetria rotacional hexagonal e plano de reflexão. Apresenta parâmetros de célula $a=b=9,418 \text{ \AA}$ e $c=6,884 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ e $\gamma=60^\circ$.

Estruturalmente a hidroxiapatite é constituída por um arranjo tetraédrico de fosfatos (PO_4^{3-}) (figura 6) [48,50,54].

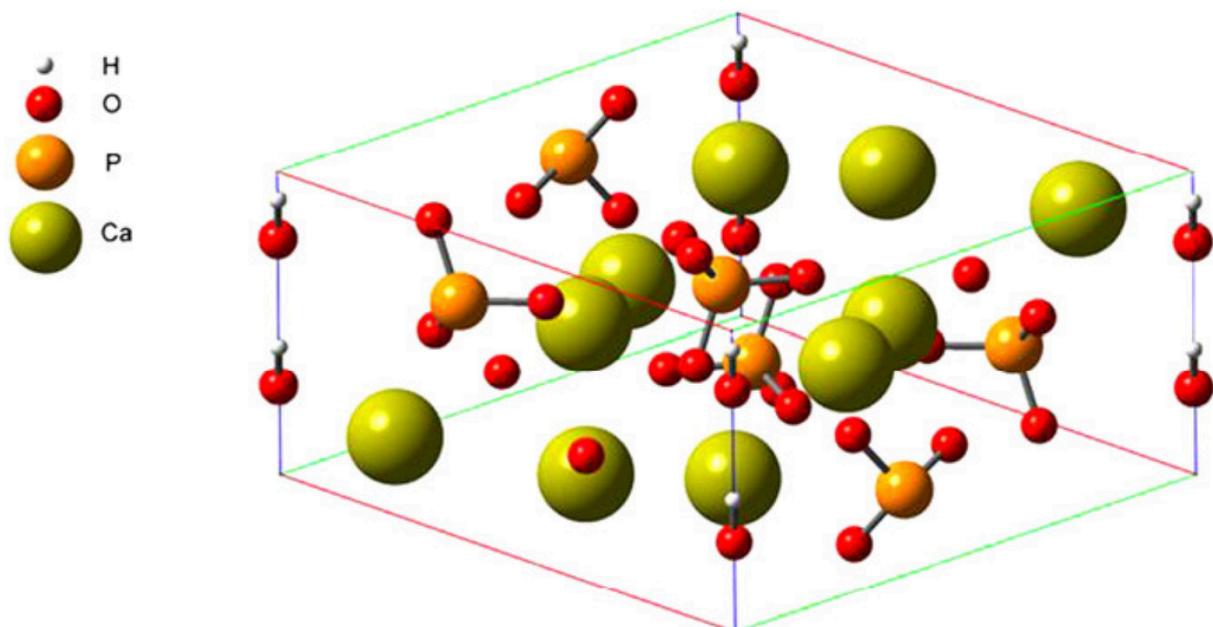


Figura 6- Célula unitária da hidroxiapatite [55].

A opção de utilizar a hidroxiapatite na forma nanométrica é presentemente cada vez mais frequente em trabalhos de investigação. À escala nanométrica a hidroxiapatite

apresenta propriedades que a tornam vantajosa. A elevada razão volume/superfície, reatividade e morfologias biométricas fazem com que revele grande interesse na medicina de regeneração óssea [56].

A hidroxiapatite pode ter origem natural ou ser sintetizada. Comercialmente é possível encontrar marcas de HA com origem natural como, Interpore200, ProOsteon200® e ProOsteon500®. Também se encontra HA, na forma comercial, obtida a partir de corais por conversão de CaCO_3 em hidroxiapatite precipitada. De origem sintética, são mais conhecidas as marcas Calcitite® e Osteograf® [50].

2.8– Membranas Periodontais

No tratamento de patologias como a periodontite e a osteomielite e nas pós cirurgias são geralmente utilizadas membranas periodontais, tendo como finalidade impedir a migração imediata do epitélio para a ferida, fazendo com que as células progenitoras remanescentes localizadas no osso alveolar adjacente, no sangue e no ligamento periodontal se desloquem para a região afetada, criando as condições necessárias para a regeneração periodontal , com formação de novo osso, ligamento e cimento [57].

Na figura 7, está representado um esquema que representa o modo de atuação das membranas periodontais ideais no tratamento de uma periodontite.

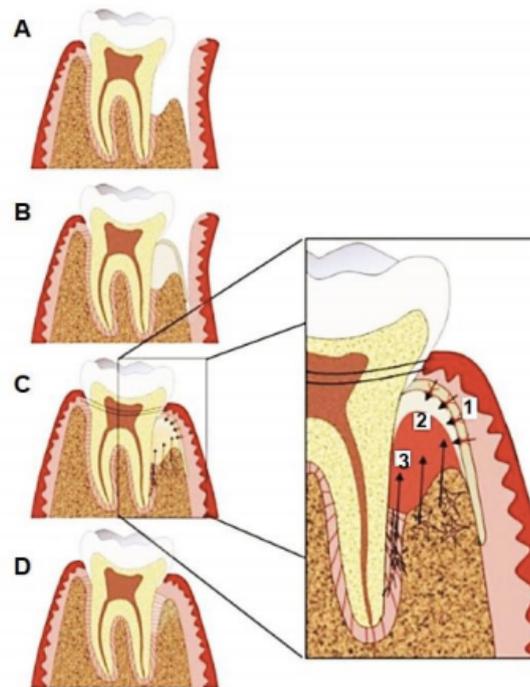


Figura 7- Representação da aplicação de uma membrana periodontal. A: lesão periodontal; B: colocação da membrana; C: formação do coágulo; D: regeneração da estrutura periodontal. 1: migração das células gengivais para o defeito; 2: estabilização do defeito e crescimento do tecido ósseo; 3: Reparação dos tecidos periodontais. Adaptado de [24].

Estão atualmente disponíveis no mercado membranas de regeneração tecidual guiada (RTG) e membranas de regeneração óssea guiada (ROG) podendo ser reabsorvíveis ou não reabsorvíveis. As membranas não reabsorvíveis mantêm a integridade estrutural e as suas características são mantidas ao longo do tempo, sendo necessário recorrer à cirurgia para que possam ser removidas. A recorrência à reabertura cirúrgica pode provocar consequências na regeneração do tecido ósseo, nomeadamente uma diminuição significativa da altura e do volume do mesmo [58].

As membranas não reabsorvíveis mais comuns são de politetrafluoretileno (PTFE) e de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), podendo ser reforçada com titânio. A introdução destas membranas no início dos anos 80, criou uma revolução significativa na terapia reconstrutiva. O PTFE é um polímero de fluorcarbonato inerte e biocompatível e o

e-PTFE, é uma matriz mais complexa organizada tridimensionalmente, constituída por nódulos interconectados por fibrilas, que podem ser fabricados com diferentes porosidades e estruturas [59].

As membranas reabsorvíveis, são constituídas por polímeros que podem ser degradados e os produtos de degradação absorvidos *in vivo* ou eliminados através de vias naturais. A reabsorção é um conceito que se relaciona com a remoção total de material inicial e dos seus subprodutos (com baixo peso molecular), sem efeitos prejudiciais. Alguns exemplos de membranas reabsorvíveis são as membranas de ácido polilático ou poliglicólico, membranas de quitosano e membranas de colagénio, sendo estas ultimas as abordadas no presente trabalho [59].

Este tipo de membranas em virtude da sua exposição ao meio bucal possui elevada taxa de degradação e não requer a reabertura cirúrgica para serem removidas. As membranas reabsorvíveis podem ser classificadas em duas categorias: sintéticas e naturais. As membranas fabricadas com base no colagénio de origem xenógena (provêm de animais) são consideradas naturais. As sintéticas são feitas de poliésteres alifáticos, co-polimeros ácidos. Comparadas com as membranas naturais, as sintéticas apresentam algumas vantagens, como a possibilidade de serem preparadas em condições controladas e as suas propriedades, químicas, físicas e mecânicas poderem ser facilmente alteradas. Apesar disto e também pelo facto das membranas naturais de colagénio se degradarem por ação enzimática, estas são as mais usadas neste tipo de aplicação, uma vez que promovem melhor resposta do tecido (durante a sua degradação) [59].

Na tabela 2, apresentam-se exemplos de membranas periodontais comerciais, atualmente, no mercado.

Tabela 2- Membranas periodontais existentes nos mercados atuais [59].

Material	Nome comercial	Fabricante
Titânio	Frios BoneShields®	Dentsply, Friadent, Germany
Ti-e-PTFE	Gore-Tex-TI®	W.L.Gore & Associates, Inc. USA
e-PTFE	Gore-Tex®	W.L.Gore & Associates, Inc. USA
d-PTFE	TefGen FD®	Lifecore Biomedical, Inc., USA
PLA	EpiGuide®	Kensey Nash Corporation USA
PLGA	Biofix®	Bioscience, Oy, USA
PLCL(DL-lactide-ε-caprolactone	Vivosorb®	Polyganics B.V, NL
Colagénio Tipo I de bovino	Bio-mend®	Zimmer, USA
Colagénio Tipo I e II porcino	Bio-Gide®	Osteohealth Company, SUI

2.8.1 - Membranas periodontais de Colagénio

Na estrutura periodontal o colagénio é um constituinte importante e, por isso, é um material com bastante utilidade na medicina dentária, nomeadamente no fabrico de membranas periodontais [60,61].

A principal vantagem da utilização de membranas de colagénio na RTG, está associada à sua baixa antigenicidade, elevada biocompatibilidade em relação aos outros polímeros naturais e à excelente bioreabsorção controlada promovida por agentes de reticulação . O colagénio permite a estimulação da migração das células do ligamento periodontal para o local da cicatrização. Este tipo de membranas apresenta contudo desvantagens, como a sua reabsorção bastante rápida, a pouca visibilidade quando molhada e a tendência ao colapso em defeitos infra-ósseos com possíveis reações alérgicas locais [60,61].

A taxa de reabsorção das membranas de colagénio é, principalmente controlada, pelo grau de reticulação. Geralmente, quanto maior o grau de reticulação, mais lenta a

degradação das membranas. Ficando estas mais tempo intactas no organismo, disponibiliza-se às células seletivas mais tempo para migrarem para as áreas cirúrgicas, permitindo conseqüentemente a regeneração de extensos defeitos. A reticulação do colagénio com o intuito de prolongar a reabsorção da membrana e aumentar a sua biodurabilidade pode ser promovida por técnicas diversas, tais como a utilização de radiação ultra violeta ou reações com glutaraldeído (GA), agente de referência para a reticulação. O efeito da reticulação pode influenciar significativamente as propriedades físicas e químicas das membranas à base de colagénio através da modificação da estrutura da matriz. Quando utilizado em grandes quantidades o GA pode gerar alguns problemas, como a polimerização dos seus monômeros em solução, resultando um estado de reticulação heterogênea e citotoxicidade [60,61].

Dependendo do tipo, da estrutura, do grau de reticulação e do tratamento químico utilizado no colagénio, este pode apresentar diferentes efeitos na cicatrização/regeneração tecidual. As maiores vantagens estão relacionadas com a possibilidade de modificação das suas propriedades químicas e das características do colagénio em termos de estimulação de osteogénese, bem como das suas propriedades elétricas [60,61]. A remoção do grupo carboxiamida proveniente de resíduos de asparagina e glutamina pela hidrólise alcalina e conseqüente formação dos grupos carboxilo presentes na cadeia α do tropo-colagénio, gerando novos locais de ligação do cálcio, é uma das modificações mais importantes da membrana. Estas modificações não afetam a estrutura de tripla hélice da molécula do colagénio, mas provocam alterações no padrão das microfibras e nas suas propriedades dielétricas. Ocorre uma redução do ponto isoelétrico para 4,6-5,0 comparativamente com o do colagénio nativo que varia entre 6,7-7,1. De modo a inverter esta situação, é necessário sujeitar as membranas a um tratamento alcalino. Em pH fisiológico, estas membranas apresentam-se carregadas negativamente [61,62].

Membranas produzidas com colagénio não mineralizado têm sido usadas na RTG com a finalidade de reparar defeitos periodontais, embora essas membranas sejam pouco resistentes e difíceis de manipular [60-62].

2.8.2- Membranas periodontais de Colagénio com enchimento de Hidroxiapatite

As membranas periodontais atuais apresentam limitações que requerem soluções de modo a criar melhorias a nível das suas propriedades físicas e químicas, e também do seu desempenho.

Uma das soluções para conseguir membranas com resistência mecânica suficiente para suportar o colapso dentro do defeito cirúrgico, sendo esta uma das desvantagens das atuais membranas, seria a utilização de hidroxiapatite como material de enchimento. A utilização do colágeno com a hidroxiapatite permite mimetizar as características do osso, e aumentar o efeito da manutenção do espaço. Estes compósitos apresentam excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, comparativamente com as membranas apenas de colágeno, revelando um grande interesse no campo clínico e mostrando a importância que pode ter a modificação das membranas com hidroxiapatite [28].

Refere-se na literatura (59) que o compósito de hidroxiapatite nanoestruturada/colágeno facilita a regeneração óssea, induzindo células indiferenciadas do sítio do enxerto a transformarem-se em osteoblastos e formar novo osso. O compósito também funciona como fonte de cálcio para aumentar a taxa de mineralização. Neste processo há a deposição de uma camada de apatite sobre os substratos orgânicos [59].

A hidroxiapatite sintética ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é um tipo de fosfato de cálcio que mostra uma grande afinidade com o tecido ósseo e é amplamente usada como um material substituto para o preenchimento de defeitos ósseos. A facilidade de ligação aos substratos é o principal requisito para que a HA possa ser misturada com polímeros orgânicos. A fim de aumentar a interação entre a hidroxiapatite inorgânica e os polímeros orgânicos, podem utilizar-se grupos polares hidrófilos. O grupo carboxilo promove a formação de locais para a nucleação heterogênea de apatite, bem como contribui para uma adesão elevada da camada de apatite com o substrato [59, 60].

A liofilização e a eletrofição (*electrospinning*) são técnicas de processamento que podem ser utilizadas na produção deste tipo de membranas. Alguns autores consideram que as membranas periodontais produzidas por liofilização se apresentam mais aptas a proporcionar a regeneração de tecido ósseo do que as obtidas por outras técnicas [63]. Outros estudos relatam que a produção deste tipo de estruturas por eletrofição lhes confere maior potencial de adesão celular, uma vez que estas membranas se assemelham morfológicamente à matriz extracelular [64]. Ambas as técnicas permitem um controle adequado da porosidade das membranas, sendo este um dos parâmetros de maior importância neste tipo de dispositivos [63,64]

Capítulo 3

Capítulo 3

Procedimento Experimental

3.1 – Materiais e reagentes

Na preparação das partículas de hidroxiapatite utilizaram-se como reagentes precursores, hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) da Panreac sob a forma de uma mistura a 0,2 M, solução de ácido orto-fosfórico a 85% (H_3PO_4) da Merck diluído 0,2 M e hidróxido de amónio da Sigma- Aldrich, 0,1 M.

As partículas de hidroxiapatite sintetizadas foram utilizadas como enchimento das membranas compósitas.

As membranas foram preparadas por duas técnicas: liofilização e *electrospinning*. No desenvolvimento das estruturas por liofilização foram utilizados como precursores, colagénio proveniente do tendão de Aquiles de bovino da Sigma- Aldrich e ácido acético sob a forma de solução diluída 1 M. Na produção das membranas por *electrospinning* foram preparadas soluções utilizando colagénio da pele de bovino (*calf skin*) dissolvido em 1,1,1,3,3,3- Hexafluoro- 2- Propanol (HFP).

3.2 – Métodos de preparação

3.2.1- Síntese das partículas nanométricas de hidroxiapatite

As partículas de hidroxiapatite foram sintetizadas por precipitação química a temperatura ambiente. O procedimento utilizado baseou-se em estudos já realizados em trabalhos anteriormente elaborados [65]. Foram preparadas 3 soluções: 250ml de uma solução com 3,718 g de hidróxido de cálcio, 250 ml de uma solução diluída a 0.2 M de ácido orto-fosfórico e, por fim, 250 ml de hidróxido de amónio, 0.1 M.

O processo de síntese das partículas consistiu na adição de 150 ml da solução diluída de ácido orto-fosfórico, gota-a-gota (aproximadamente 36 gotas por minuto), a 250

ml de hidróxido de cálcio. Durante todo o processo a mistura foi submetida a agitação mecânica.

A fim de ajustar o pH da mistura, no fim da reação, adicionaram-se 50ml de hidróxido de amónia. O pH ajustou-se para 10,2.

Após a obtenção do precipitado, procedeu-se a um período de 4 dias de envelhecimento a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Após este período, recorreu-se ao processo de centrifugação para lavagem das partículas com água destilada. A mistura foi submetida a 3 ciclos de centrifugação com duração de 10 minutos a 10000 rpm.

Por fim, o precipitado obtido foi submetido a secagem durante 3 dias numa estufa a 50 °C.

3.2.2 – Produção das membranas por liofilização

Prepararam-se dois tipos diferentes de membranas por liofilização: membranas padrão, apenas contendo colagénio e membranas compósitas de colagénio com 30% de nanopartículas de hidroxiapatite. A escolha desta percentagem de enchimento resultou de um trabalho anterior no qual se concluiu que membranas com maior quantidade de hidroxiapatite dificultavam o processamento e produziam compósitos de elevada heterogeneidade.

A fim de se produzir as membranas, dissolveu-se o colagénio proveniente de tendão de Aquiles de bovino numa solução diluída de ácido acético 1 M, em banho de gelo, sob agitação, durante aproximadamente uma hora. Para preparar as membranas com enchimento, adicionaram-se as nanopartículas de hidroxiapatite à mistura de colagénio e manteve-se durante mais uma hora, sob agitação, em banho de gelo.

Os reagentes e as respectivas composições e quantidades utilizadas na produção das membranas de colagénio com enchimento, apresentam-se identificados na tabela 3.

Tabela 3- Designação das membranas produzidas por liofilização e detalhes da preparação.

Membranas	Concentração massa de colagénio/ vol. Ácido acético (mg/ml)	Concentração massa de enchimento / vol. Ácido acético + colagénio (mg/ml)
Mpadrão	12	-
M30HA		5
Mpadrão_p*		-
M30Ha_p*		5
* p – Membranas sujeitas a prensagem manual		

Volumes de cerca de 3 ml das soluções finais foram colocados em moldes e posteriormente congelados durante 12 h a $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o congelamento, as amostras foram sujeitas a um processo de liofilização, durante 3 dias, a fim de se obter, através da remoção de todo o solvente, estruturas porosas. O processo de liofilização decorreu no equipamento de modelo Teslar LyoQuest HT-40 (figura 8), cujas condições nominais são , temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão de $30 \times 10^{-3}\text{ mBar}$.

Para se obterem estruturas com espessuras menores, as membranas produzidas foram prensadas manualmente (Mpadrão_p e M30HA_p, na tabela 3), utilizando um peso de 1633 g, durante 10 minutos.



Figura 8- Liofilizador de modelo Teslar LyoQuest HT 40.

Na figura 9 está representado um esquema que resume todo o procedimento utilizado na produção das membranas.

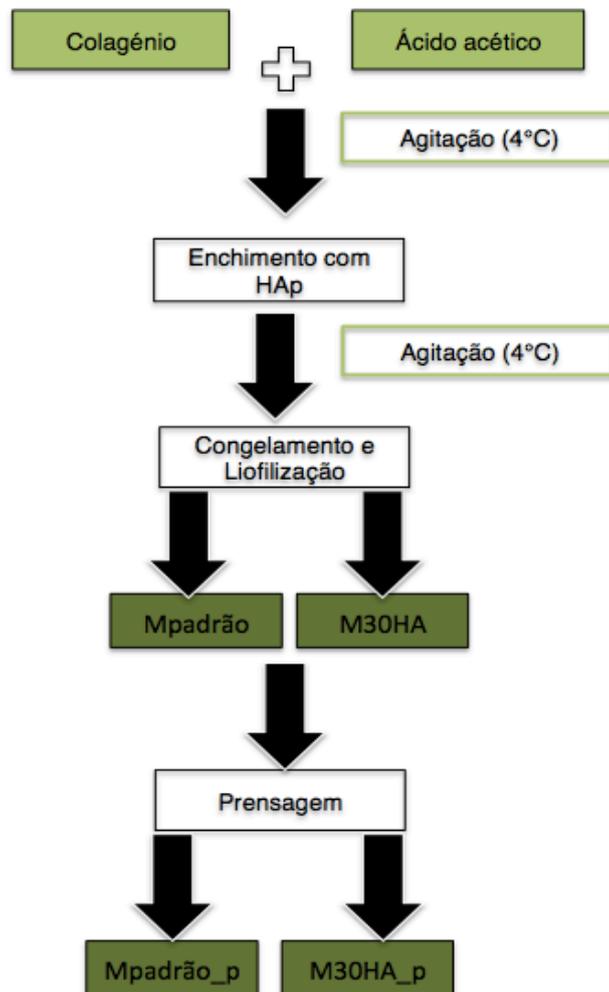


Figura 9- Representação esquemática do procedimento de produção de membranas por liofilização.

As membranas produzidas pelo processo de liofilização foram caracterizadas por difração de raio-X, microscopia electrónica de varrimento e espectrometria de infravermelhos com transformada de Fourier e foi também avaliada a sua bioatividade em meio acelular através de testes de imersão em fluido corporal sintético (SBF). Tanto as membranas expandidas como as sujeitas a prensagem foram submetidas a ensaios de degradação em PBS (Phosphate Buffer Saline), a pH fisiológico.

3.2.3- Preparação de membranas por Electrospinning

Solução polimérica precursora

A solução polimérica utilizada na produção de membranas fibrosas pela técnica de *electrospinning* foi preparada a partir de colagénio (Calf skin, Sigma- Aldrich) liofilizado. O polímero foi dissolvido com o solvente 1,1,1,3,3,3 – Hexafluoro-2- propanol (Sigma- Aldrich), que foi adicionado de modo a conseguir uma viscosidade adequada para a aplicação da técnica. Utilizou-se uma concentração de colagénio de 30 mg/ ml de solvente.

Electrospinning

A produção de fibras foi realizada no equipamento de *electrospinning* do departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica (FLUIDNATEK LE-10). Tratando-se de um equipamento recentemente adquirido e nunca testado para a produção de fibras de colagénio, foi necessário um considerável investimento na optimização das condições de preparação das soluções e dos parâmetros operacionais do aparelho. Por esta razão anexa-se a este trabalho uma descrição mais detalhada sobre o equipamento e os parâmetros relevantes para o seu funcionamento (Anexo A).

A solução polimérica precursora, previamente preparada, foi introduzida numa seringa de 5ml. A seringa foi colocada na bomba infusora do equipamento com um tubo de plástico acoplado à sua saída e uma agulha metálica acoplada à ponta do tubo de plástico (figura 10). A ponta da agulha foi colocada de modo a ficar posicionada perpendicularmente ao eixo do cilindro rotatório, coletor das fibras. À agulha foi conectado um eletródo, de modo a estabelecer-se um campo elétrico entre a agulha e o coletor, a força motriz do processo.

Na figura 10 apresenta-se o equipamento de *electrospinning* utilizado e na tabela 4, um resumo das condições operacionais empregadas para a preparação de membranas fibrosas. As condições foram definidas após vários testes de otimização.

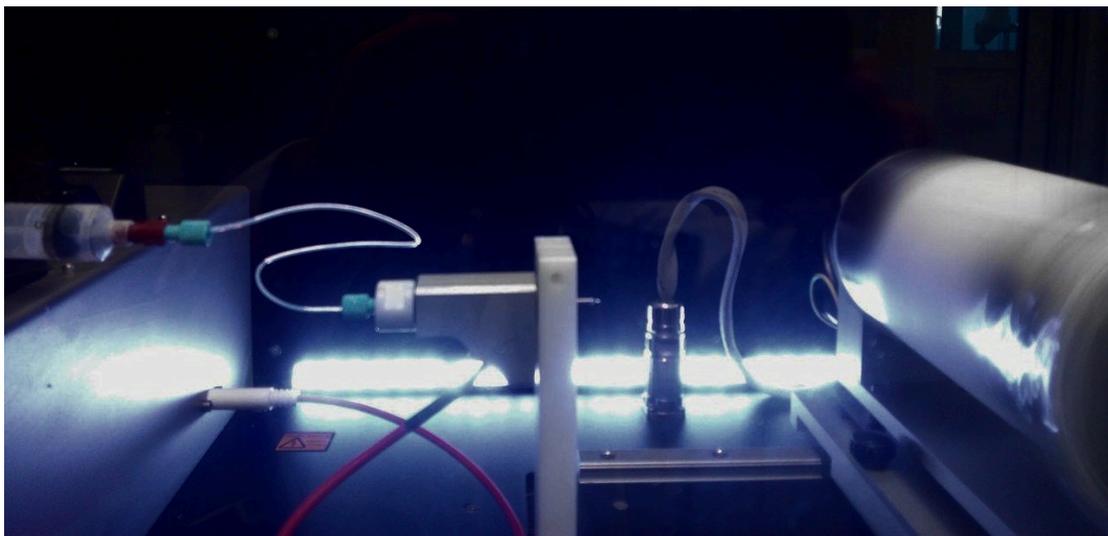


Figura 10- Representação esquemática da configuração do equipamento de electrospinning para produção de membranas.

Tabela 4- Condições de processamento por electrospinning.

Concentração de polímero	30 mg/ml
Voltagem aplicada	20-30 kV
Distância entre a agulha e o coletor	12 cm
Caudal	2500 μ l/h

As mantas de fibras foram depositadas numa folha de alumínio com a qual se revestiu o cilindro coletor com a finalidade de facilitar o processo de remoção das membranas produzidas e também com o intuito de aumentar a condutividade elétrica.

As membranas obtidas foram observadas em microscópio electrónico de varrimento.

3.3- Caracterização da matriz e do enchimento das membranas compósitas

3.3.1 – Fases cristalinas (Difração de Raio-X, DRX)

As fases cristalinas de cada amostra em estudo foram identificadas através de testes de difração de Raio-X utilizando-se o difractómetro Rigaku Geigerflex D/ Max-SérieC, equipado com um monocromador curvo de grafite, com uma voltagem de 40 kV, uma radiação de $\text{K}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) e uma corrente de 30 mA.

3.3.2 – Morfologia e tamanho de partícula (Micrografia electrónica de varrimento e transmissão, SEM e TEM)

A morfologia das partículas de hidroxiapatite obtida por precipitação química, bem como a das membranas produzidas por ambas as técnicas foi observada através de um microscópio electrónico de varrimento, HITACHI modelo S-4100 munido de um sistema de emissão de eletrões com um filamento de tungsténio, com resolução máxima de 15 Å e com um potencial de aceleração de 10 kV.

As amostras a serem observadas foram previamente preparadas. Para isso, fixou-se fita de carbono de dupla face num porta – amostras de alumínio sobre o qual se dispersou uma quantidade mínima de pó e se colaram pequenos pedaços das membranas. Com a finalidade de se aumentar a condutividade eléctrica das amostras, fez-se um revestimento com um filme fino de carbono, utilizando-se o equipamento EMITECH K950.

Como as partículas de hidroxiapatite obtidas se encontram na escala nanométrica, recorreu-se à microscopia electrónica de transmissão para se observar melhor a sua forma e tamanho. Este estudo foi realizado num microscópio electrónico de transmissão de energia filtrada EF-TEM de 200 kV, marca JEOL e modelo 2200FS, de alta resolução.

As amostras foram preparadas mergulhando numa grelha de recolha uma suspensão das partículas de HAp em etanol.

O tamanho e a distribuição granulométrica das partículas de hidroxiapatite precipitada foram avaliados num equipamento Coulter LS Particle Size Analyser 230.

3.3.3 – Composição e ligações químicas (Espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier, FTIR)

O método de espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier, (FTIR), permite a identificação e avaliação de ligações químicas no material, por análise das mudanças na intensidade de um feixe de infravermelhos em função do seu comprimento de onda (200 a 4000 cm^{-1}) quando entra em interação com a amostra, sendo que a intensidade de cada pico pode relacionar-se com o modo de vibração de uma ligação química específica.

Os espectros de absorção no infravermelho foram registados num espectrofotómetro da marca Bruker, modelo Tensor 27, com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans. Foram obtidos espectros na gama dos 400 a 500 cm^{-1} , utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) com as amostras de HAp. Estas análises foram realizadas no laboratório de análises do departamento de Química da Universidade de Aveiro.

3.3.4 –Área superficial específica (adsorção gasosa)

A determinação da área superficial específica das nanopartículas de hidroxiapatite foi realizada através de adsorção gasosa. Este método consiste em fazer passar uma mistura de gases composta por azoto e hélio sobre a amostra, a uma temperatura próxima da do ponto de ebulição do azoto ($-195,8\text{ °C}$). Ao passar esta mistura pela amostra, as partículas adsorvem uma camada molecular de azoto. A temperatura constante, existe uma relação entre a quantidade adsorvida em função da pressão relativa (p/p^0), em que p^0 é a pressão de saturação adsorvida à temperatura a que o ensaio é realizado. Esta relação define as chamadas isotérmicas de adsorção, podendo estas ser, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), classificadas em seis tipos diferentes, cada um determinado por um mecanismo específico de adsorção. Na figura 11 estão representados os seis tipos possíveis deste tipo de isotérmicas e na tabela 5 a descrição.

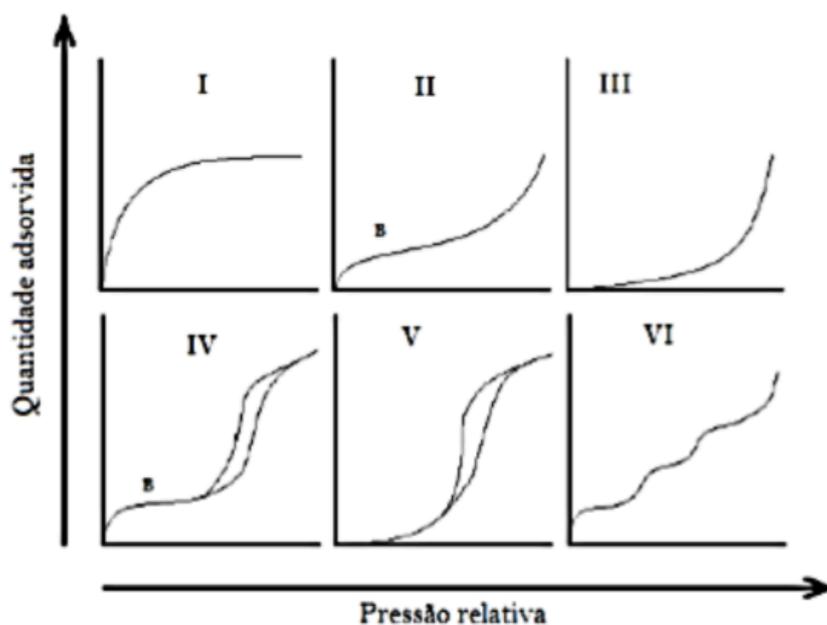


Figura 11- Classificação IUPAC dos vários tipos de isotérmicas de adsorção de gases. Adaptado de [66].

Tabela 5- Tipos de isotérmicas de gases e descrição

Tipo	Descrição/ Ocorrência
I	Isotérmica de Langmuir. Sólidos microporosos com baixa superfície externa.
II	Materiais não porosos. Ponto B, formação da monocamada.
III	Pouco comum e associado a uma adsorção energética mais baixa que a do tipo II.
IV	Materiais mesoporosos.
V	Materiais micro e mesoporosos, adsorção baseada numa interação gás/sólido de fraca intensidade.
VI	Superfícies uniformes não porosas. Mecanismo de adsorção em multicamada.

Nas isotérmicas do tipo IV e V ocorre um fenómeno denominado histerese e pode assumir quatro formas distintas, ilustradas na figura 12 e descritas na tabela 6.

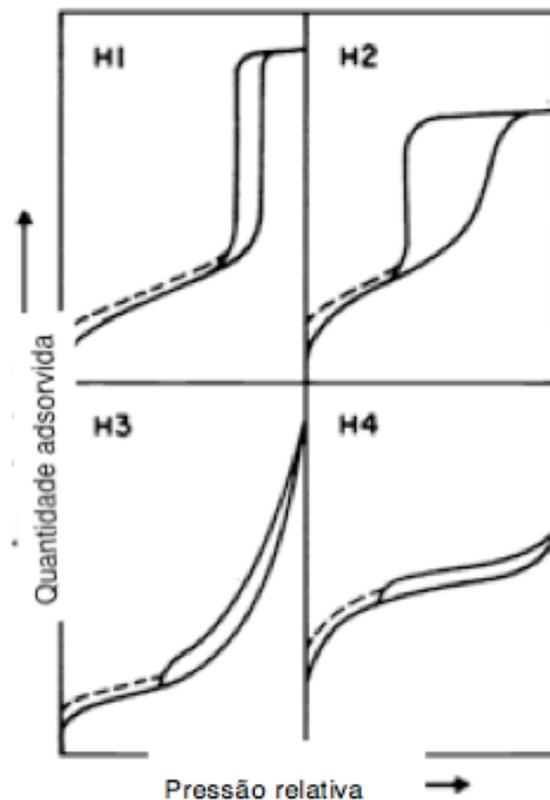


Figura 12- Classificação IUPAC dos tipos de histerese.
Adaptado [66].

Tabela 6- Tipos de histerese representados na figura 12 e descrição.

Tipos	Descrição / Ocorrência
H1	Materiais porosos com aglomerados rígidos e partículas com forma esférica.
H2	Materiais com poros em forma de gargalo (“bottleneck”). Diferentes mecanismos de condensação e adsorção.
H3	Materiais com morfologia em placa, originando poros em forma de fenda.
H4	Materiais com poros estreitos e em forma de fenda.

Modelo de Brunauer – Emmet – Teller (B.E.T)

A área superficial de um determinado material define-se como a área da superfície de uma partícula sólida por unidade de massa, normalmente expressa em m^2g^{-1}

Brunauer- Emmet- Teller (B.E.T) propuseram um método para a determinação da área superficial específica, utilizando como modelo matemático a equação 1:

$$\frac{\frac{p}{p^0}}{V_{ads} \times [1 - (\frac{p}{p^0})]} = \frac{1}{V_m \times C} - \frac{(C - 1)}{V_m \times C} \times \frac{p}{p^0} \quad (1)$$

em que p é a pressão a que ocorre o ensaio, p^0 a pressão de vapor de saturação, V_{ads} o volume de gás adsorvido à pressão p e V_m o volume específico para a formação da monocamada.

Através da equação apresentada é possível calcular o volume de azoto adsorvido à superfície de cada partícula da amostra e sabendo o valor de V_m e a área ocupada por cada molécula é também possível determinar-se a área superficial específica.

Utilizou-se o equipamento Micromeritics-Gemini 2370V5 para determinar as áreas superficiais específicas da hidroxiapatite precipitada.

3.3.5 – Carga superficial das partículas

Em suspensão as partículas dispersas podem apresentar diferentes tipos de carga. O potencial zeta de uma partícula que se encontra em suspensão é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a superfície da partícula dispersa. Este potencial é

dependente das características da superfície das partículas e do meio de dispersão. A fim de se medir o potencial zeta é aplicado um campo elétrico através da suspensão, fazendo com que as partículas carregadas dentro da suspensão migrem para o eletrodo de carga oposta. Em princípio, e independentemente de ser positivo ou negativo, quanto maior for o potencial zeta maior é a estabilidade da suspensão [67].

O potencial zeta das nanopartículas de hidroxiapatite precipitadas foi medido no equipamento MALVERN, modelo Zetasizer NanoZS.

Na preparação das amostras para a análise foram utilizados 4mg de amostra para 10ml de KCl 10^{-3} M como dispersante. Para fazer variar o pH foram utilizadas soluções com diferentes concentrações de NaOH e HCl e o ensaio foi realizado à temperatura ambiente.

3.3.6 – Bioatividade em meio acelular

O potencial bioativo em meio acelular de um determinado material pode ser avaliado através de ensaios de imersão em fluido fisiológico simulado, em que ao longo do tempo se estuda a variação da concentração da solução e as alterações da superfície das amostras. A fim de se preparar a solução SBF, cuja composição é apresentada na tabela 7, recorreu-se ao protocolo proposto por *Kokubo e Takadama* [68]. Utilizaram-se os reagentes indicados na tabela 7:

Tabela 7- Ordem de adição, fórmula química e quantidade de reagentes utilizados na preparação de SBF.

Reagente	Formula Química	Quantidade
Cloreto de sódio	NaCl	7.996mg
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	0.350mg
Cloreto de potássio	KCl	0.224mg
Fosfato de potássio trihidratado	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.228mg
Cloreto de Magnésio	MgCl ₂ .6H ₂ O	0.305mg
Ácido clorídrico	HCl	40ml
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .6H ₂ O	0.548mg
Sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	0.071mg
Tris (hidroximetil) - aminometano	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	6.057mg

Os volumes de SBF necessários para os ensaios de bioatividade foram calculados pela relação [68] – onde, V_s (ml) é o volume e S_a a área superficial (mm^2):

$$V_s = \frac{S_a}{10}$$

Cortaram-se pedaços de cada membrana com dimensões de cerca de $10 \times 5 \times 3 \text{ mm}^3$ e foram mergulhadas em 19ml de SBF (área superficial= 190mm^2) em copos de polietileno. Os copos foram colocados na estufa a 37°C durante os tempos de 1,3 e 7 dias. No fim de cada tempo de imersão, as amostras foram retiradas da estufa e lavadas com água ultra pura (Milli Q®). Posteriormente foram colocadas a secar durante 24 h na estufa a 37°C e finalmente guardadas num exsiccador para serem analisadas.

3.3.7 – Degradação das membranas por ação salivar

O estudo da degradação das membranas por ação do pH salivar foi efetuado em parceria com o laboratório de investigação interdisciplinar em saliva – SalivaTec da Universidade Católica de Viseu – Centro Regional das Beiras.

Atendendo a que o estudo com saliva humana engloba fatores difíceis de controlar, como o crescimento bacteriano, os estudos de degradação foram feitos em solução tampão de fosfato (PBS) com pH 6.8 de forma a mimetizar a saliva e a experiencia na cavidade oral.

Espectrofotometria UV/ Visível

A concentração de uma substância em solução pode ser determinada por medição da absorvância a um dado comprimento de onda, aplicando a conhecida base matemática denominada de Lei de Lambert-Beer, também anteriormente na análise de espectroscopia de infravermelhos.

O espectro de UV/Visível apresenta uma região que pode ser dividida em três subdomínios: UV próximo (185-400 nm), visível (400-700 nm) e IV próximo (700-1100 nm). Os espectrofotómetros comercializados abrangem, na maioria dos casos, comprimentos de onda na gama dos 185 a 900nm.

3.3.7.1- Solubilização do colagénio

Para estudar a degradação das membranas e avaliar o respectivo perfil de degradação, foi necessário primeiramente solubilizar o colagénio puro. Para uma concentração de 2mg/ml, foram incubadas 10 mg de colagénio puro e, posteriormente, adicionaram-se 5ml de ácido acético 0.5M.

A amostra foi colocada em banho de gelo durante 4 dias (figura 13) e seguidamente foi centrifugada durante 2 minutos a 1000 rpm.

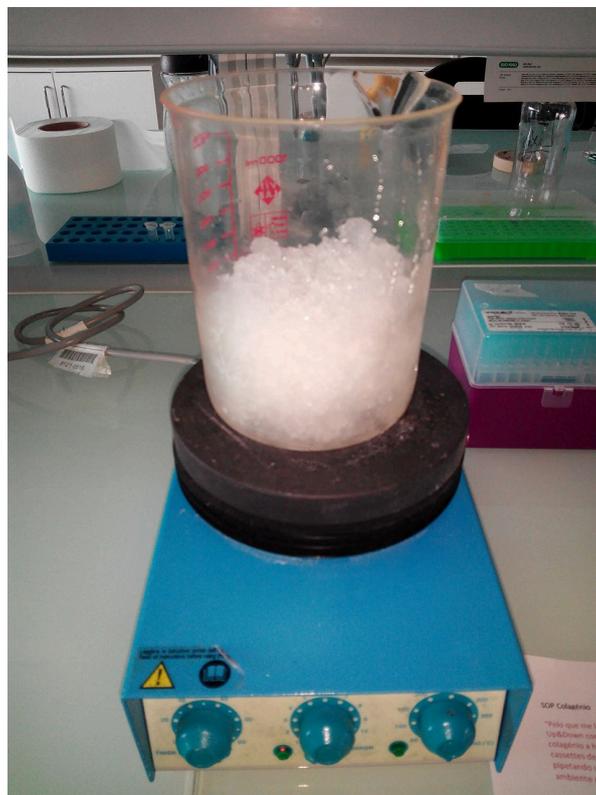


Figura 13- Amostra de colagénio incubado em ácido acético 0.5M, durante 4 dias em banho de gelo.

Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína total (colagénio para a solução) foi determinada recorrendo a um método colorimétrico com ácido bicinconínico (BCA), seguindo o kit comercial de quantificação de proteínas Micro BCA (Anexo B) [69] adaptado à medição em pequenos volumes, recorrendo a um espectrofotómetro (*Nanovue Plus*), representado na figura 14.

Resumidamente, cada amostra foi adicionada ao *working reagent* (Wr) na proporção de 1:1 e incubada em banho maria a 60°C durante 60 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 40 minutos de modo a estabilizar a reação. A absorvância foi lida num espectrofotómetro a 652 nm, utilizando como branco uma solução de Wr com água.

A concentração total das amostras foi calculada através do traçado de uma reta de calibração (figura 15) obtida por diluições sucessivas de albumina sérica bovina (BSA).



Figura 14- Espectrofotómetro - Nanovue Plus.

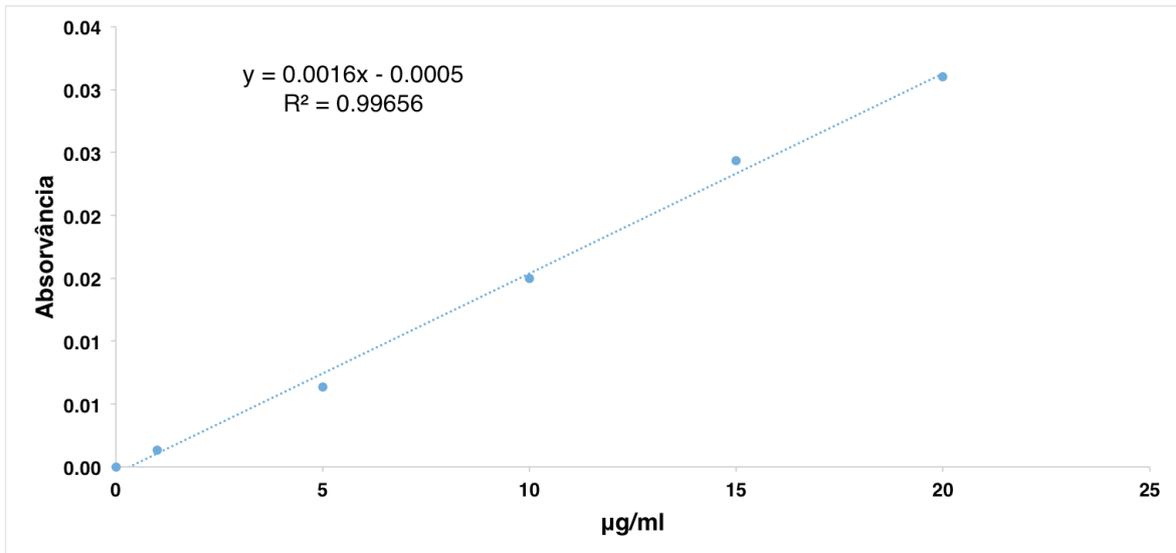


Figura 15-Reta de calibração traçada de acordo com o método de Micro BCA.

3.3.7.2 – Degradação das membranas em PBS

A fim de se estudar o estado do colagénio incorporado nas membranas, procedeu-se à incubação das mesmas em PBS (pH \approx 6.8) durante diferentes períodos de tempo, por forma a mimetizar a degradação em pH salivar.

Foram incubados em 1ml de PBS, pedaços aproximadamente circulares (área = 19 cm^2) das diferentes membranas. A incubação decorreu durante diferentes períodos de tempo (3, 5 e 7 dias) ficando em agitação permanente numa agitadora de rolos (Roller Shaker), como mostra a figura 16.



Figura 16- Membranas incubadas em agitação permanente num agitador de rolos (roller shaker).

No final de cada período de tempo de incubação, as amostras foram submetidas a centrifugação durante 30 segundos e, posteriormente, foram removidas duas alíquotas com 500 μ l do sobrenadante em contacto com as membranas e foram colocadas a congelar a -80 °C. Ao fim dos 7 dias as alíquotas foram descongeladas e sofreram de novo 30 segundos de centrifugação, tendo sido por fim medida a quantidade de proteína libertada para o sobrenadante, recorrendo-se novamente à reta de calibração representada na figura 16, traçada, de acordo com o método micro BCA.

As membranas sujeitas a testes de degradação foram seguidamente estudadas sob o ponto de vista microestrutural e de composição em fases cristalinas, através de, respectivamente, microscopia electrónica de varrimento e difração de raios X.

Capítulo 4

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Caracterização das nanopartículas de Hidroxiapatite

As partículas de hidroxiapatite obtidas pelo método de precipitação química foram caracterizadas por DRX, FTIR, SEM e TEM e submetidas a análises para determinação do tamanho médio de partícula e da distribuição granulométrica, tendo sido também medida a sua área superficial específica e potencial zeta.

Identificação das fases cristalinas

Através da análise do espectro de difração de raios-X do pó precipitado apresentado na figura 17, foi possível identificar e analisar as fases cristalinas presentes.

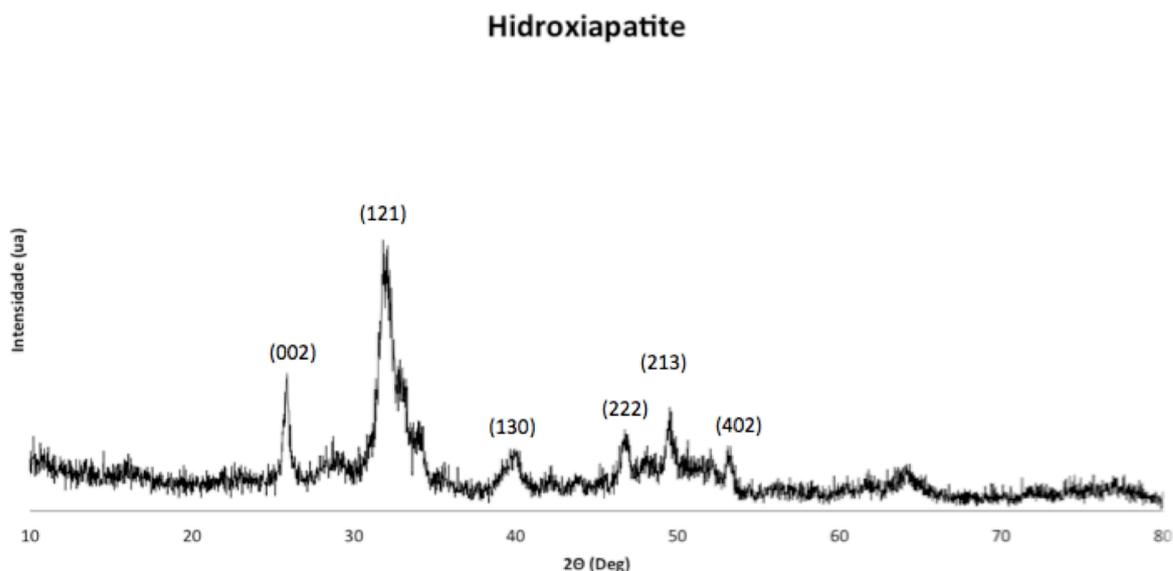


Figura 17- Difratoograma de raios-X dos pós de hidroxiapatite precipitada.

Os picos referenciados foram identificados por comparação com as fichas cristalográficas JCPDS#9-432 e JCPDS#1-80-6199, correspondentes à hidroxiapatite.

Foram identificados picos característicos bem definidos em ângulos $2\theta = 25.82^\circ$, 31.8° , 39.62° , 46.64° e 49.5° correspondentes aos planos de Miller (002), (121), (130), (222) e (213) respetivamente.

Recorreu-se á equação de *Scherrer* (2) para se calcular o tamanho de cristalite:

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda}{B\cos(\theta)} \quad (2)$$

em que D_{hkl} é o tamanho de cristalite, k uma constante que depende da forma das partículas, λ o comprimento de onda de radiação electromagnética, θ o ângulo de difração e B a largura na metade do pico de difração.

O tamanho de cristalite calculado encontra-se na ordem dos 19nm, sendo um valor aceitável para este tipo de partículas [70].

Forma e tamanho de partícula

A morfologia das partículas de hidroxiapatite precipitada foi, inicialmente, analisada por microscopia electrónica de varrimento (SEM), tendo sido obtidas as micrografias representadas na figura 18.

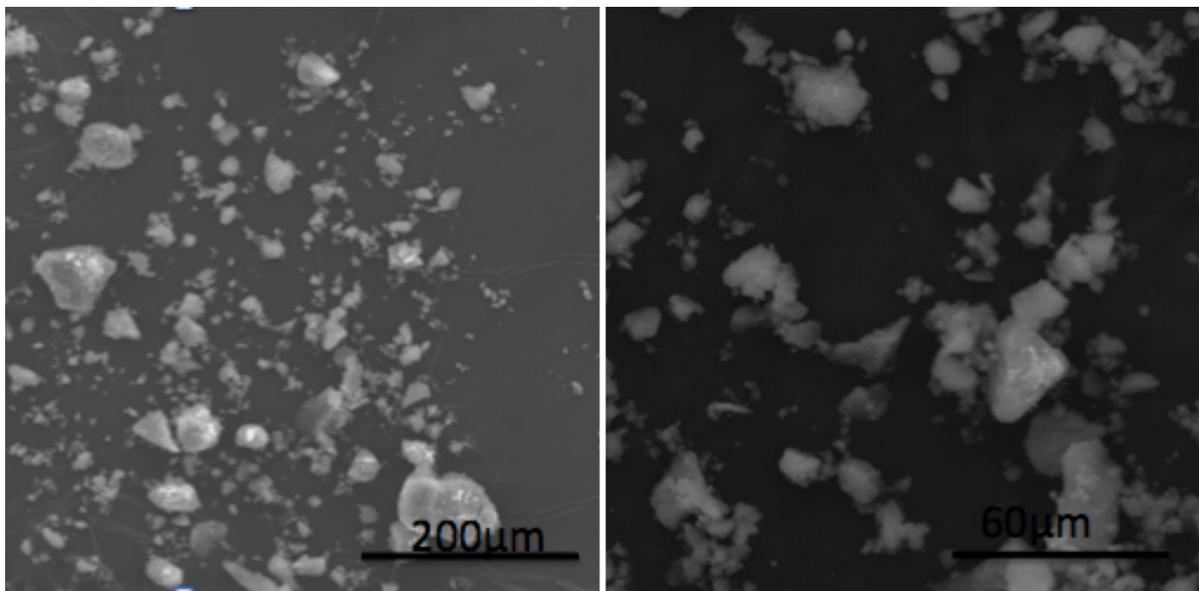


Figura 18- Microscopia electrónica de varrimento (SEM) dos pós de HAp (150x e 500x).

As micrografias apresentadas revelam a existência de aglomerados compostos por partículas de dimensões dificilmente identificáveis através da técnica, suscitando à necessidade de se recorrer à análise em microscopia electrónica de transmissão (TEM) para se obterem informações detalhadas sobre a forma e tamanho das partículas. As imagens em TEM das partículas precipitadas apresentam-se na figura 19.

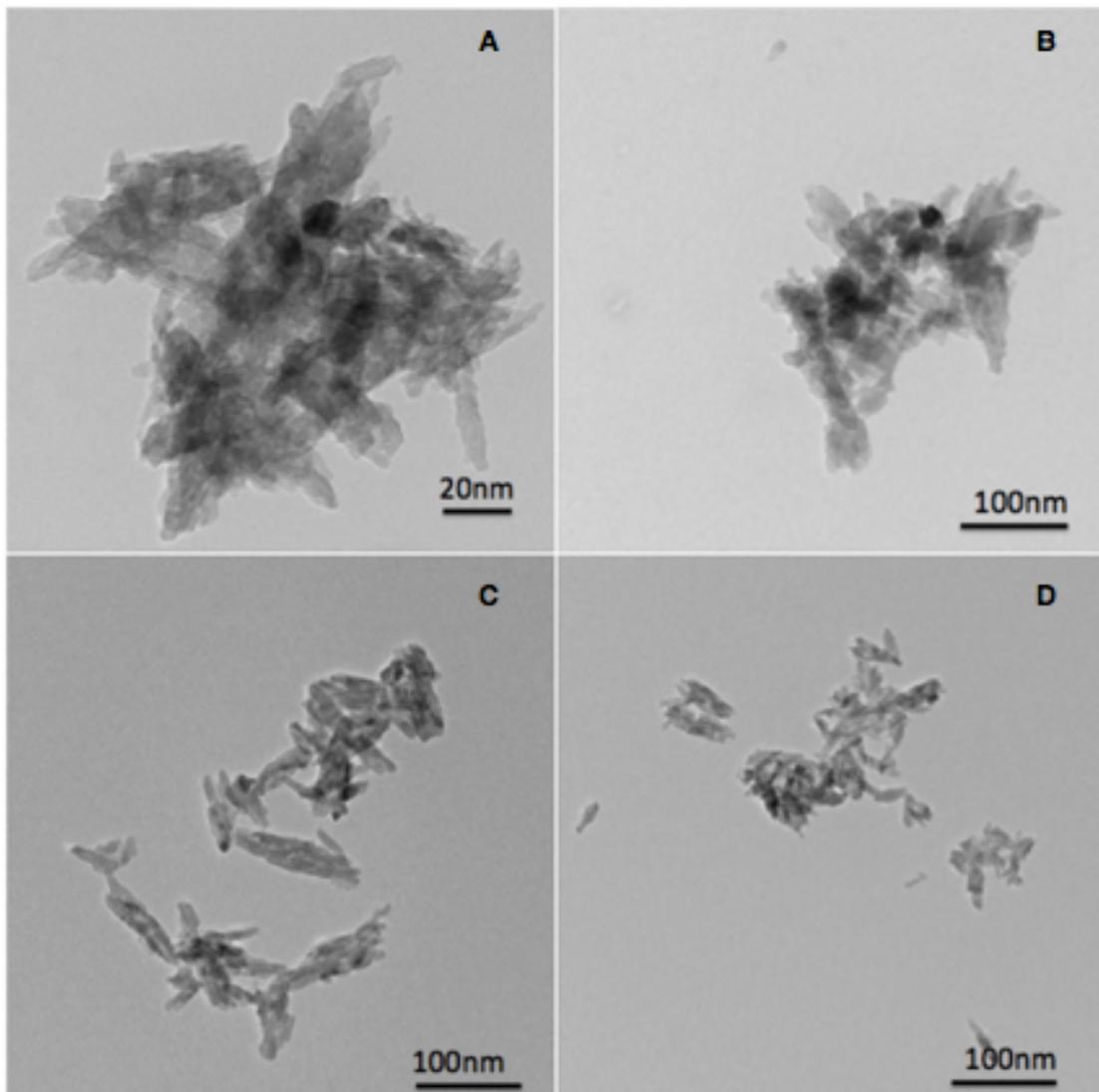


Figura 19- Micrografias em TEM das partículas de HAp (A: 60000x; B: 40000x; C: 30000x e D: 20000x).

As micrografias obtidas por TEM mostram que as partículas de hidroxiapatite precipitada assumem um formato alongado, irregular e com alguma porosidade associada. Este facto pode estar relacionado com a temperatura de síntese, que segundo

alguns autores, é um parâmetro que influencia acentuadamente a morfologia das partículas [69]. Reporta-se na literatura [69] que as nanopartículas sintetizadas a 35 °C podem apresentar formas semelhantes às obtidas neste estudo e que aumentando a temperatura da reação, as partículas começam a adquirir morfologias mais regulares e arredondadas, como ilustrado na figura 20 [69].

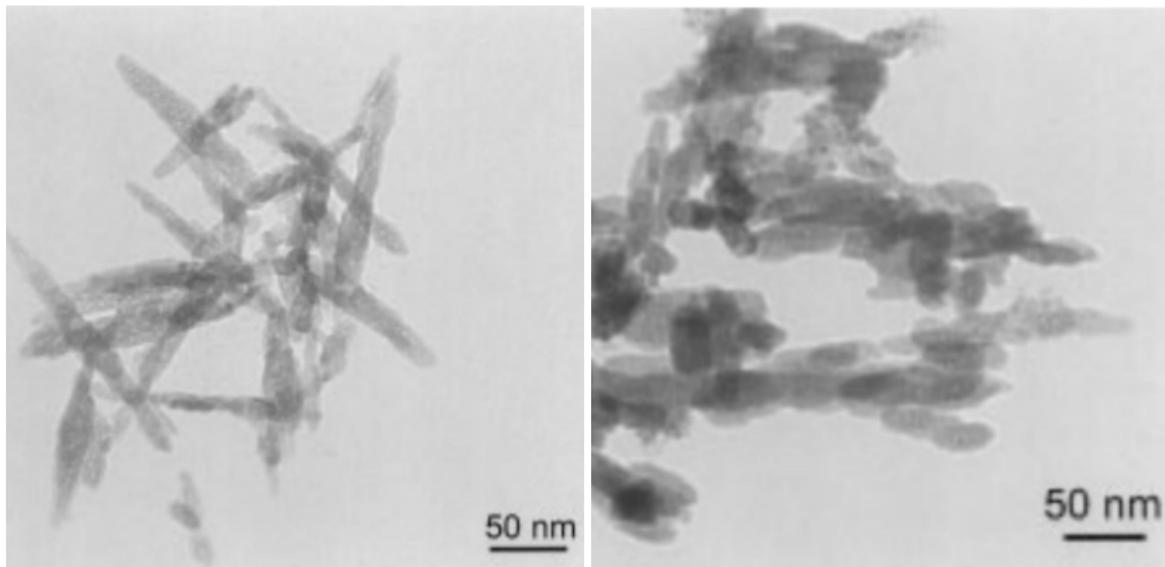


Figura 20- Micrografias em TEM de partículas de hidroxiapatite precipitada a diferentes temperaturas, 35°C e 85°C [65].

Para se determinar o tamanho médio das partículas obtidas neste trabalho utilizou-se o programa *Image J*. A figura 21 mostra as medições feitas em duas partículas aleatórias, permitindo confirmar as suas dimensões nanométricas.

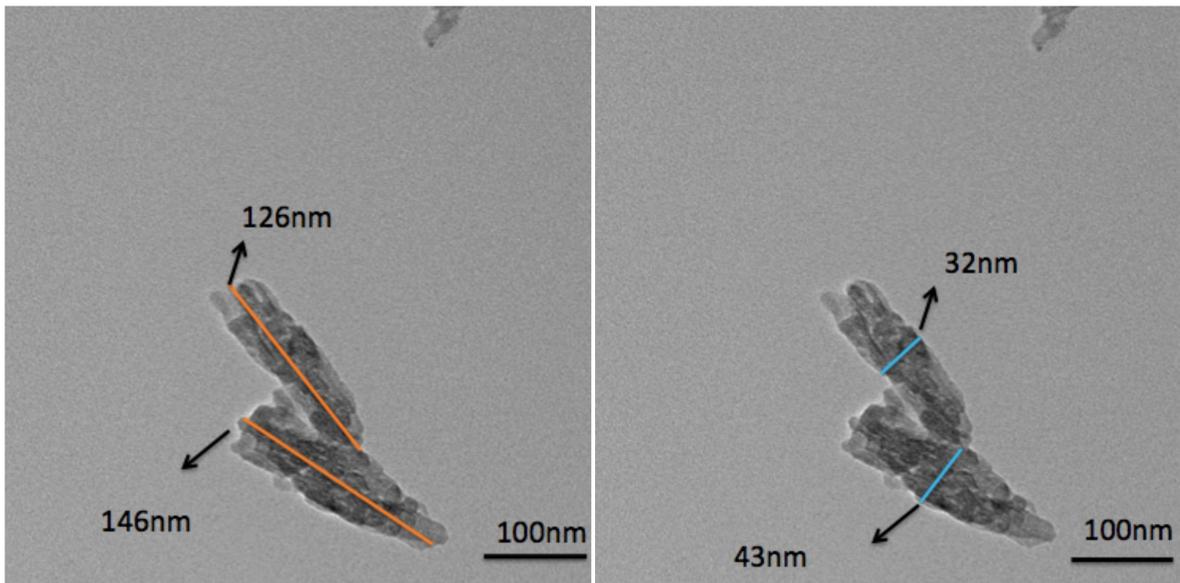


Figura 21- Medições de tamanho de partícula obtidas pelo programa Image J.

Através das dimensões das partículas obtidas é possível calcular o seu fator de forma (*Shape factor*), traduzido como a razão entre o comprimento e a largura como na formula (3) [65]:

$$Fs = \frac{L}{l} \quad (3)$$

em que Fs é o fator de forma, L é o comprimento de partícula e l a largura da mesma. A variação do fator de forma depende da temperatura de síntese e da morfologia da partícula. Este fator assume valores mais baixos à medida que a temperatura de síntese aumenta e é geralmente menor para partículas com formatos mais regulares [65]. As partículas obtidas experimentalmente apresentam valores de Fs entre 3 e 4.

Na figura 22 está representada graficamente a distribuição granulométrica do pó de hidroxiapatite precipitado.

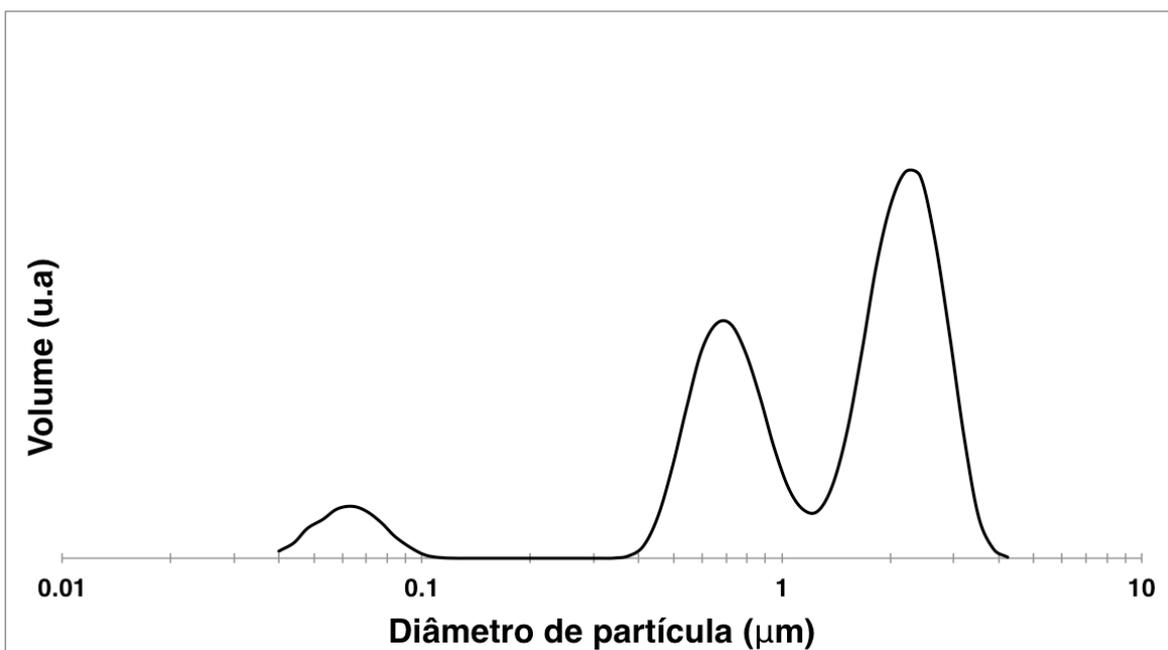


Figura 22- Representação gráfica da distribuição granulométrica dos pós de HAp.

O gráfico de distribuição granulométrica dos pós de hidroxiapatite precipitados mostra a existência de dois máximos relativos, aos quais correspondem tamanhos médios de 0.6 e 2 μm que se atribuem a agregados de partículas em suspensão. Observa-se ainda a existência de um terceiro máximo ao qual corresponde um tamanho médio entre 60 e 70 nm, tamanho este que traduz a dimensão média das partículas que existem individualizadas em suspensão e que está em linha com os resultados de TEM.

Estado de superfície das partículas

Na figura 23 apresenta-se a curva de potencial zeta relativa às partículas de hidroxiapatite precipitada. Analisando a curva observa-se que o ponto de carga zero se situa em 7.1, sendo este o valor de pH ao qual as partículas apresentam carga superficial nula, com elevada propensão para aglomeração. Para valores de pH mais baixos, as partículas apresentam potencial elétrico não muito elevado (aproximadamente 3 mV) e valor positivo ao passo que, quando o valor de pH sobe de 7.1 até cerca de 10, o potencial das partículas decresce acentuadamente, atingindo um valor próximo de -20 mV.

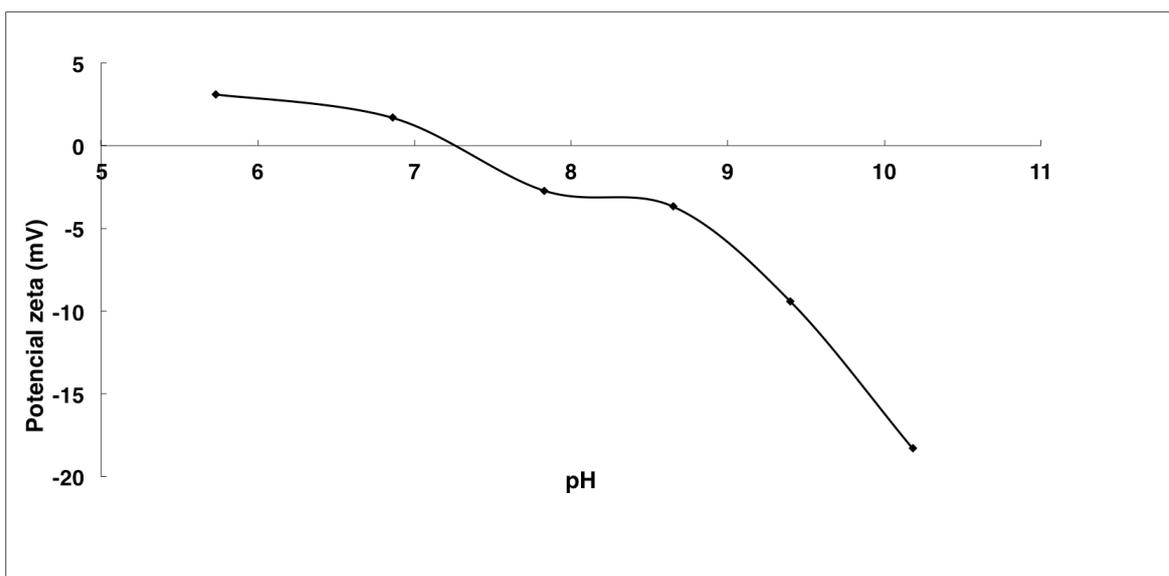


Figura 23- Curva do potencial zeta obtida a temperatura ambiente das partículas de HAp.

Atendendo que o pH da saliva varia entre os valores 6 e 7 é expectável que estas partículas, quando em contacto com a cavidade bucal apresentem carga superficial positiva e propensão para adsorver compostos electricamente carregados com carga negativa. Um dos constituintes importantes da saliva são as mucinas que representam uma população heterogénea de glicoproteínas com origem nas células acinares mucosas das glândulas salivares. As mucinas são constituídas por compostos carregados negativamente, como ácido siálico ($C_{11}H_{19}NO_9$) e ião sulfato que poderão ligar-se electrostaticamente às partículas de HAp carregadas positivamente, participando na formação de uma camada protetora que se forma na superfície do dente. As mucinas possuem propriedades que permitem que atuem como uma barreira física protetora, conferindo lubrificação e proteção antimicrobiana ao dente. Assim, é possível que, na gama e pH da saliva, a hidroxiapatite favoreça a adesão de mucinas á superfície dentária e consequentemente lhe conferira proteção [71].

Isotérmicas de adsorção/ dessorção e área superficial específica

As isotérmicas de adsorção/ dessorção das partículas de hidroxiapatite obtidas pelo método de precipitação química estão representadas na figura 24. As curvas representadas correspondem a uma isotérmica do tipo IV (classificação IUPAC), que são características de materiais mesoporosos. Também é possível, identificar que a histerese

corresponde ao tipo H3, associado a materiais que apresentam morfologia lamelar e poros em forma de fendas.

Com base no método de adsorção de Brunauer, Emmet e Teller (BET), determinou-se para os pós precipitados uma área superficial de 108 m²/g.

A área superficial específica das partículas precipitadas de hidroxiapatite depende, entre outros fatores, da temperatura de síntese [65]. Reporta-se na literatura que as áreas superficiais específicas para temperaturas menores são da ordem dos 75 m²/g, diminuindo para aproximadamente 50 m²/g quando a temperatura de síntese aumenta [65]. Comparativamente a outros tipos de síntese de nanopartículas, o método de precipitação química é simples e permite a produção de partículas com tamanhos reduzidos [72].

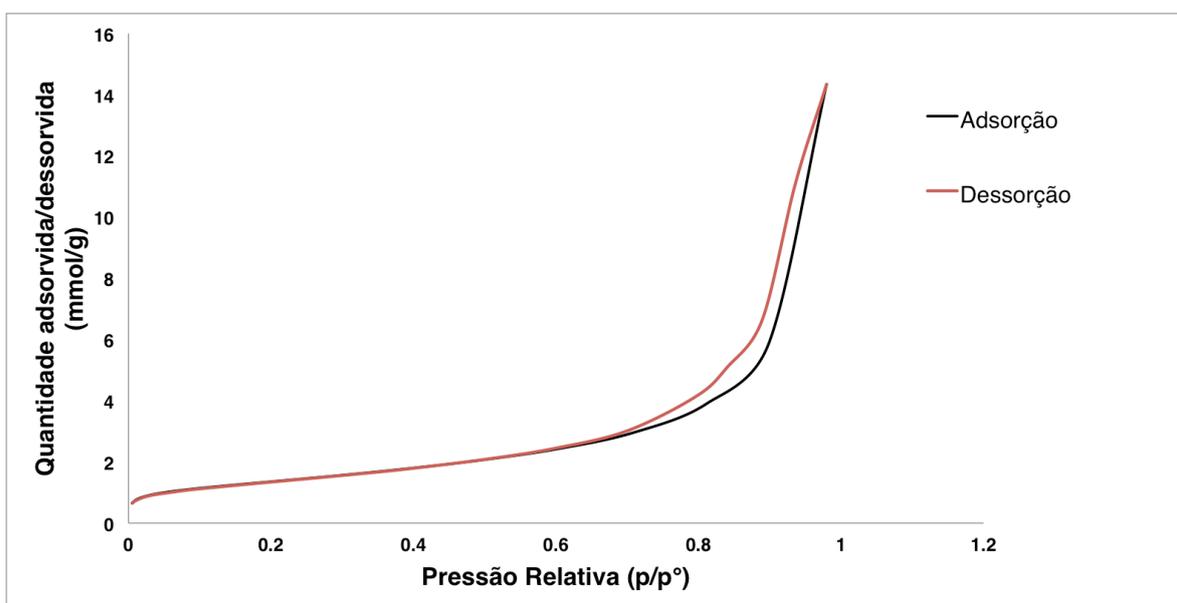


Figura 24- Isotérmicas de adsorção/ dessorção das partículas de hidroxiapatite quimicamente precipitada.

Composições e ligações químicas

O espectro de infravermelhos com transformada de Fourier correspondente às partículas de hidroxiapatite precipitada encontra-se representado na figura 25. Este espectro fornece informação relativa aos grupos moleculares incluídos na célula unitária da estrutura de hidroxiapatite.

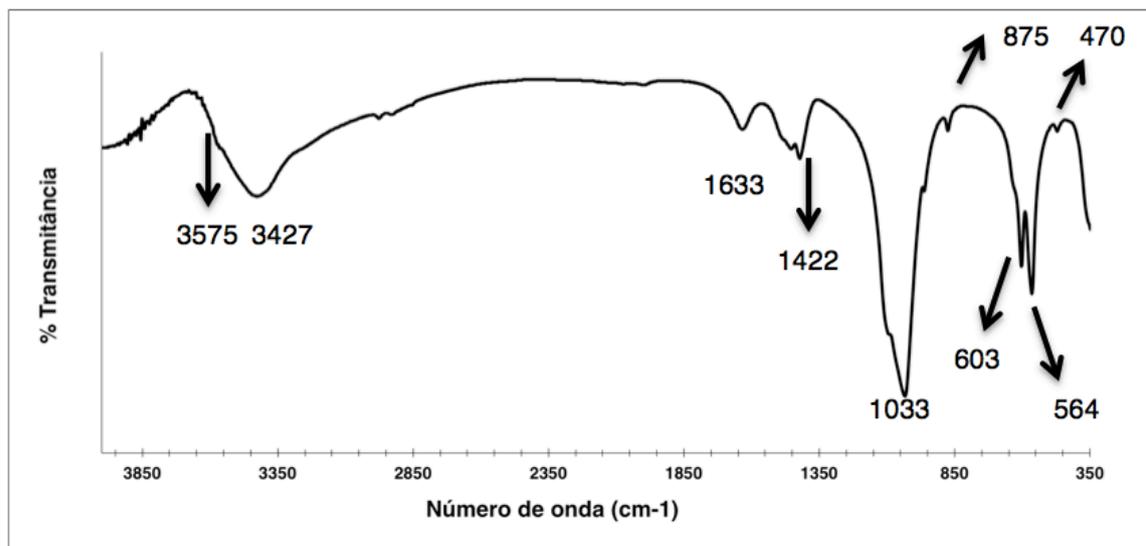


Figura 25- Espectro de infravermelho com transformada de Fourier de HAp.

Os resultados referentes ao espectro apresentado anteriormente estão detalhados na tabela 8, conforme a literatura descreve [70,73-76].

Tabela 8- Números de onda representados na figura 27 e ligação atribuída.

Número de onda (cm ⁻¹)	Ligação
3575 e 3427	Alongamento e flexão dos grupos hidroxilo (OH ⁻) [70,73]
1633	Água associada à Hidroxiapatite [74]
1422 e 875	Grupo CO ₃ ²⁻ [75,76]
1033, 603, 564 e 470	Presença de PO ₄ ³⁻ [75,76]

4.2. Caracterização das membranas obtidas por dois processos: liofilização e electrospinning

No âmbito deste trabalho foram produzidas membranas para regeneração de tecido periodontal por duas técnicas diferentes: liofilização e *electrospinning*, de acordo com os procedimentos detalhados do capítulo anterior.

Foram produzidas por liofilização membranas de colagénio e membranas compósitas de colagénio com enchimento de nanopartículas de hidroxiapatite precipitada.

Recorreu-se à técnica de *electrospinning* para produzir membranas apenas de colagénio. Na tabela 9 estão descritos os vários tipos de membranas produzidas por ambas as técnicas.

As membranas produzidas por liofilização foram caracterizadas por DRX, SEM e EDS, testes de bioatividade em SBF e testes de degradação por ação de pH salivar. As membranas obtidas por *electrospinning* apenas foram caracterizadas a nível microestrutural por microscopia electrónica de varrimento (SEM). Na figura 26 encontram-se as fotografias dessas membranas.

Tabela 9- Membranas obtidas experimentalmente e respetivas composições.

Membranas	Composição	Percentagem de enchimento	Prensagem	Técnica de obtenção
MCOL	Colagénio	-----	✓	Electrospinning
Mpadrão	Colagénio	-----	×	Liofilização
Mpadrão_p	Colagénio	-----	✓	
M30HA	Colagénio + Hidroxiapatite	~ 30%	×	

Caracterização das membranas obtidas por liofilização

As membranas obtidas pelo processo de liofilização, Mpadrão e M30HA, foram sujeitas a DRX e os resultados estão representados na figura 26.

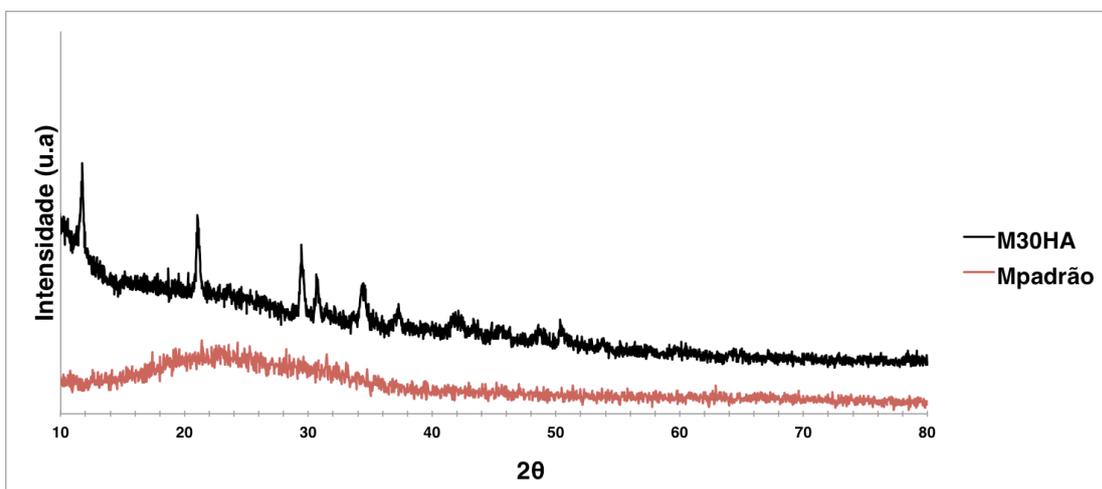


Figura 26- Difratograma de raios-X das membranas obtidas por liofilização (Mpadrão e M30HA).

A análise do difratograma de raio-x da membrana que contém 30% de HAp mostra a presença de picos bem definidos, que denotam a presença de uma fase cristalina. Esta fase presente não corresponde à hidroxiapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$), mas sim à bruxite ($\text{Ca}(\text{HPO}_4)(\text{H}_2\text{O})_2$), de acordo com a ficha JCPDS# 1- 74- 6549. O aparecimento deste composto de Ca e P no compósito pode ser explicado com base no pH a que as membranas são produzidas. No processamento das membranas é feita uma suspensão em que as nanopartículas de hidroxiapatite são adicionadas a um meio ácido (colagénio + ácido acético), com pH é aproximadamente 3. Com base na literatura sabe-se que o pH influencia a estabilidade das fases e para pH inferior a 5, a fase mais estável é a bruxite (DCPD, figura xx, Cap 3). As membranas no processo de liofilização são congeladas e durante esse processo é provável ocorra um rearranjo dos iões de Ca e P, dando origem à bruxite [60,65].

Relativamente à membrana Mpadrão não se verifica a presença de picos no seu difratograma de raios-X, uma vez que esta é apenas constituída por colagénio, considerado um material essencialmente amorfo.

As membranas Mpadrão e M30HA também foram observadas por microscopia electrónica de varrimento (figura 27), juntamente com uma membrana comercial, Jason membrane® (figura 28), que serviu como termo de comparação.

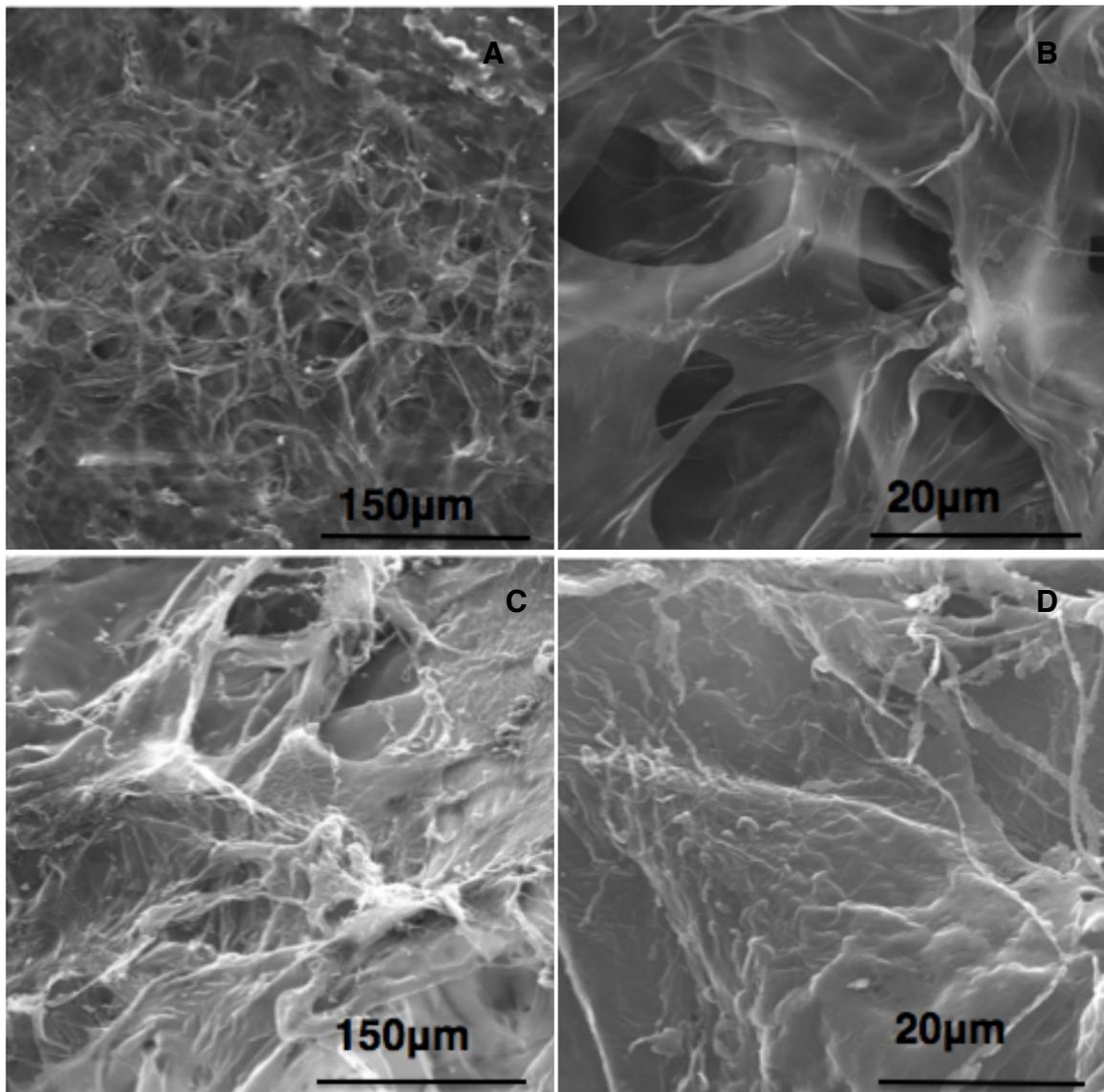


Figura 27- Micrografias em SEM das membranas padrão (A e B) e das membranas com enchimento de HAp (C e D).

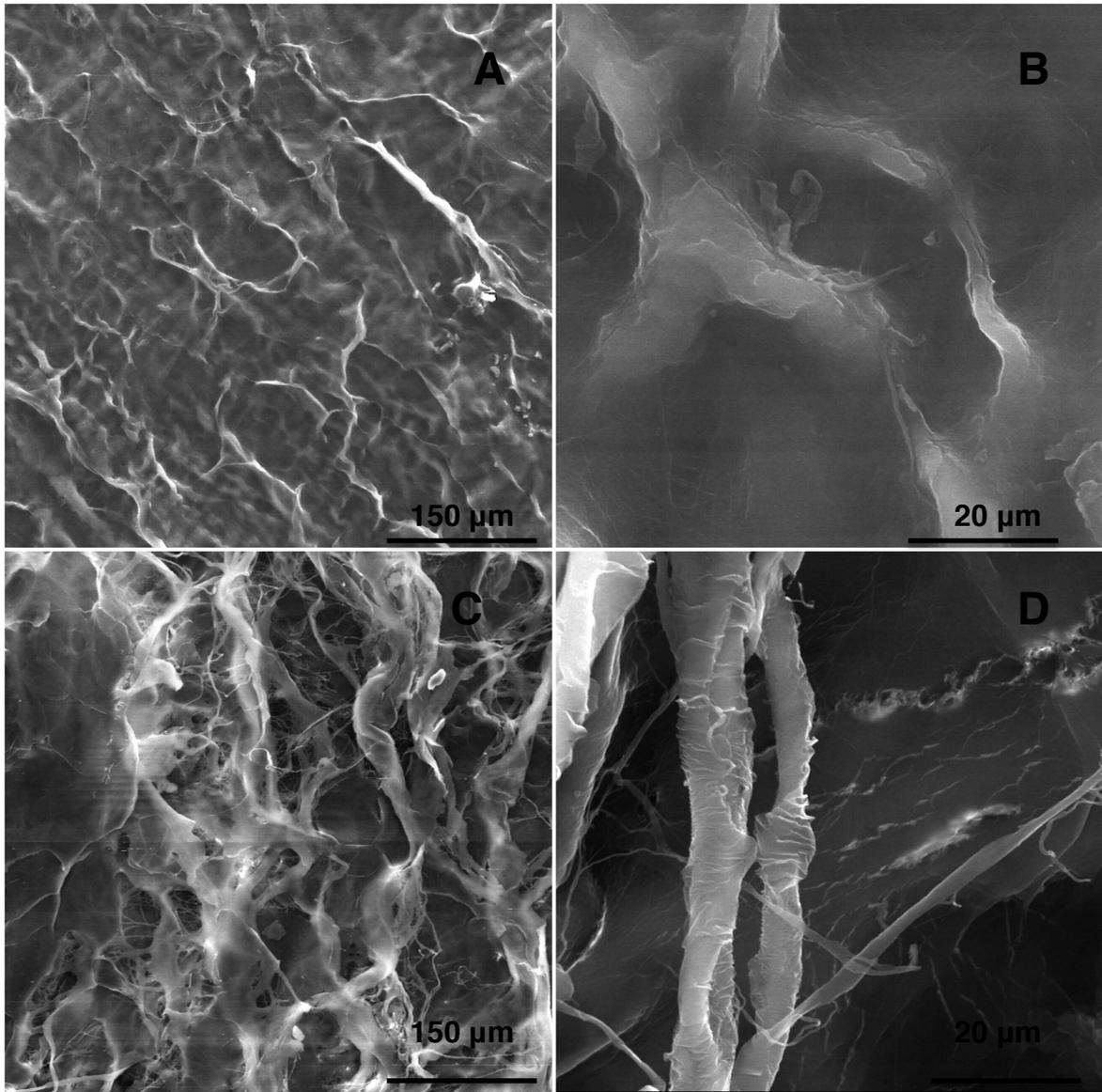


Figura 28- Micrografias da membrana comercial (Jason Membrane®). (A e B): vista superior e (C e D): vista inferior. Ampliações (200x e 500x).

As imagens de SEM relativas as membranas padrão (figura 27 (A e B)) mostram que estas membranas apresentam alguma porosidade. As membranas preparadas com 30% de enchimento (figura 27 (C e D)) para além da porosidade. mostram uma topografia da superfície mais irregular. As superfícies irregulares e porosas são descritas na literatura como favoráveis à regeneração tecidual, uma vez que facilitam a adesão celular. Uma estrutura porosa em materiais à base de colagénio melhora a vascularização e a colonização celular quando em contacto com os tecidos a serem regenerados [77].

Também é reportado na literatura que o tamanho dos poros e a morfologia do material são severamente influenciados pela temperatura de congelação antes do processo de liofilização. No presente trabalho, a suspensão foi congelada a temperaturas inferiores a -17 °C, considerados adequados á precipitação de colagénio e formação de poros [77].

A membrana comercial, Jason Membrane® (figura 28), é constituída por colagénio do tipo I e III de origem porcina. É uma membrana estruturalmente densa, em que as duas faces apresentam superfícies distintas: face superior, que fica voltada para a parte gengival apresenta menor porosidade e a face inferior, que fica em contacto com a parte óssea apresenta-se com superfície mais irregular e com maior porosidade.

As membranas obtidas por liofilização, sem e com 30 % enchimento (Mpadrão e M30HA) foram observadas por microscopia electrónica de varrimento e também se recorreu à análise química por espectroscopia de dispersão de energia (EDS) para se avaliar a natureza dos elementos presentes em cada amostra. Os espectros de dispersão de energia estão representados na figura 29.

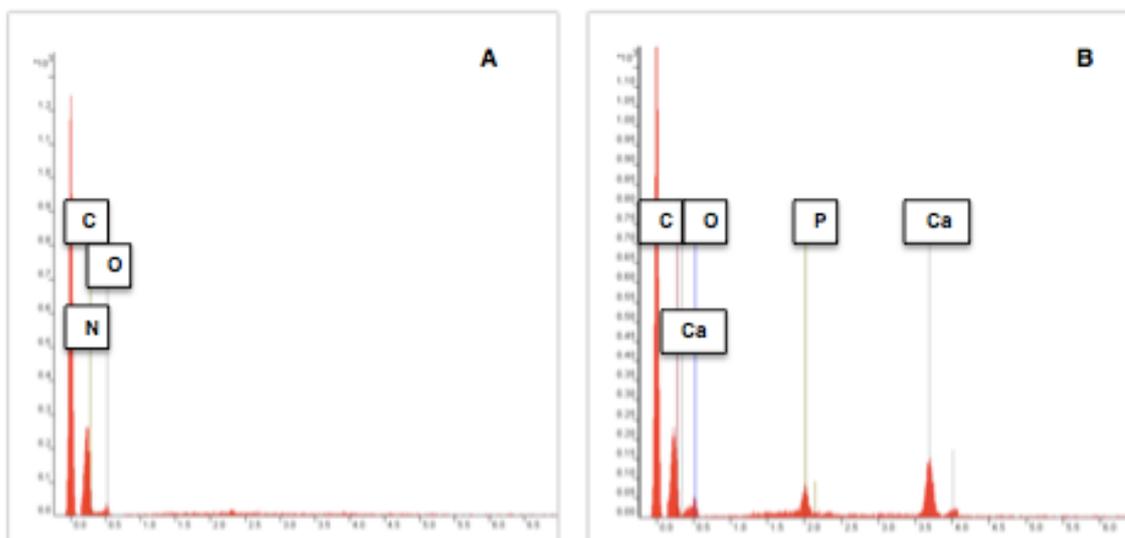


Figura 29- EDS das membranas obtidas por liofilização. A: Mpadrão e B: M30HA.

Na amostra Mpadrão os elementos que se destacam são apenas relativos à presença de colagénio (carbono, oxigénio e nitrogénio). Comparativamente às Mpadrão, as membranas compósitas M30HA apresentam, para além dos elementos relativos ao colagénio, mais dois elementos: o Ca e o P, concordantes com a presença de hidroxiapatite utilizada no enchimento. Não foram detectados outros elementos provenientes de contaminações.

Para complementar a caracterização das membranas e também avaliar as possíveis alterações provocadas na estrutura do colagénio durante o processo de produção das mesmas realizou-se uma análise por espectroscopia FTIR ao colagénio original, de tendão de Aquiles de bovino e às membranas padrão e compósitas com enchimento de hidroxiapatite, estando os resultados representados na figura 30.

Pela análise da figura 30 (A), correspondente ao espectro do colagénio puro, observa-se que as principais bandas representadas são as características desse polímero natural. A 1650 cm^{-1} e a 1558 cm^{-1} encontram-se as bandas relativas à amida I e II. A primeira deve-se ao grupo do carboxilo (C-O) e a segunda é atribuída às vibrações da ligação N-H e ao estiramento C-N [78].

As bandas presentes a 1235 cm^{-1} e a 1450 cm^{-1} referem-se às vibrações no plano da amida III. A 1235 cm^{-1} estas vibrações correspondem ao estiramento C-N. Já a 1450 cm^{-1} as bandas representadas são características dos anéis pirrolidínicos de prolina e hidroxiprolina [78].

Através da relação entre os valores da absorvância a 1235 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} é possível identificar a integridade da tripla hélice do colagénio, devido à manifestação das vibrações no plano da amida III e à estereoquímica dos anéis pirrolidínicos, características, como já foi referido, destes comprimentos de onda [79]. A primeira banda mencionada é sensível a alterações a nível da estrutura secundária do tropocolágeno, embora a segunda seja independente dessa estrutura. Segundo a literatura, quando é mantida a integridade da estrutura da tripla hélice a razão entre as absorvâncias é próxima de um e quando a estrutura se encontra desnaturada esses valores encontram-se próximos de 0.5 [79]. Pelos valores apresentados no espectro relativo ao colagénio puro, presume-se que o colagénio mantém a integridade da sua estrutura helicoidal, visto que a razão entre ambas as absorvâncias é 0.94.

A partir da análise dos restantes espectros (figura 30 (A e B)) é possível observar que os picos de absorção foram mantidos, apenas se verificando mudanças a nível de intensidade em todas as amostras, possivelmente devido ao tratamento em meio ácido e à adição de hidroxiapatite. O facto de não surgirem novos picos nas membranas que contêm HAp na sua composição (figura 30 (C)), indica que não se estabelecem ligações químicas entre o colagénio e este precipitado.

O cálculo da razão entre as absorvâncias a (1235 e a 1450 cm^{-1}) para os restantes espectros indicou que a tripla hélice mantém a sua integridade, uma vez que todos os valores deram próximos de um, sendo de 0.97 e 1.01 para o espectro da Mpadrão e da M30HA, respectivamente.

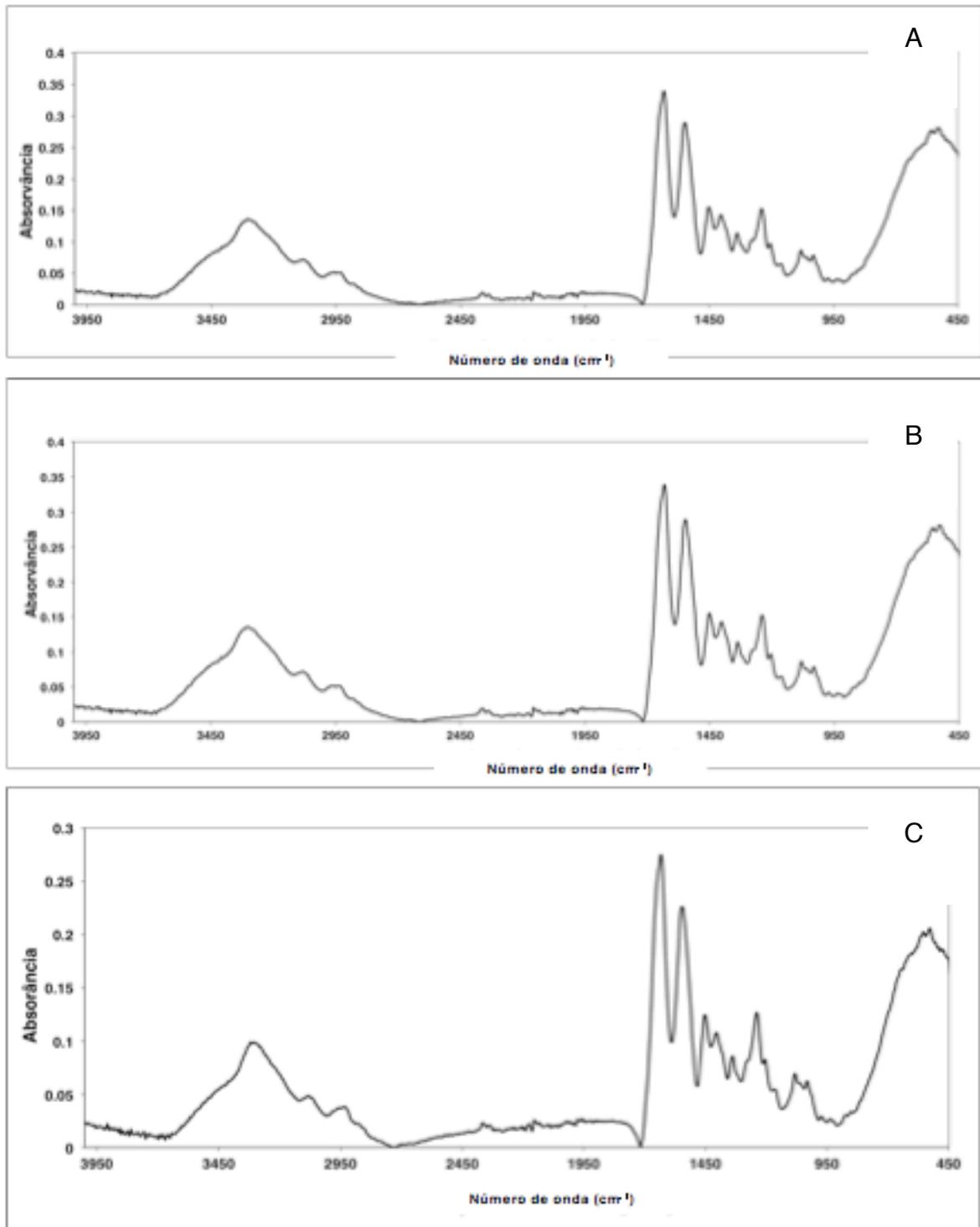


Figura 30- Representação dos espectros de FTIR de colagénio original e das membranas obtidas por liofilização. A: colagénio original; B: Mpadrão e C: M30HA.

Caracterização das membranas obtidas por electrospinning

Na figura 31 encontram-se as imagens SEM das membranas de colagénio (MCOL) obtidas por electrospinning.

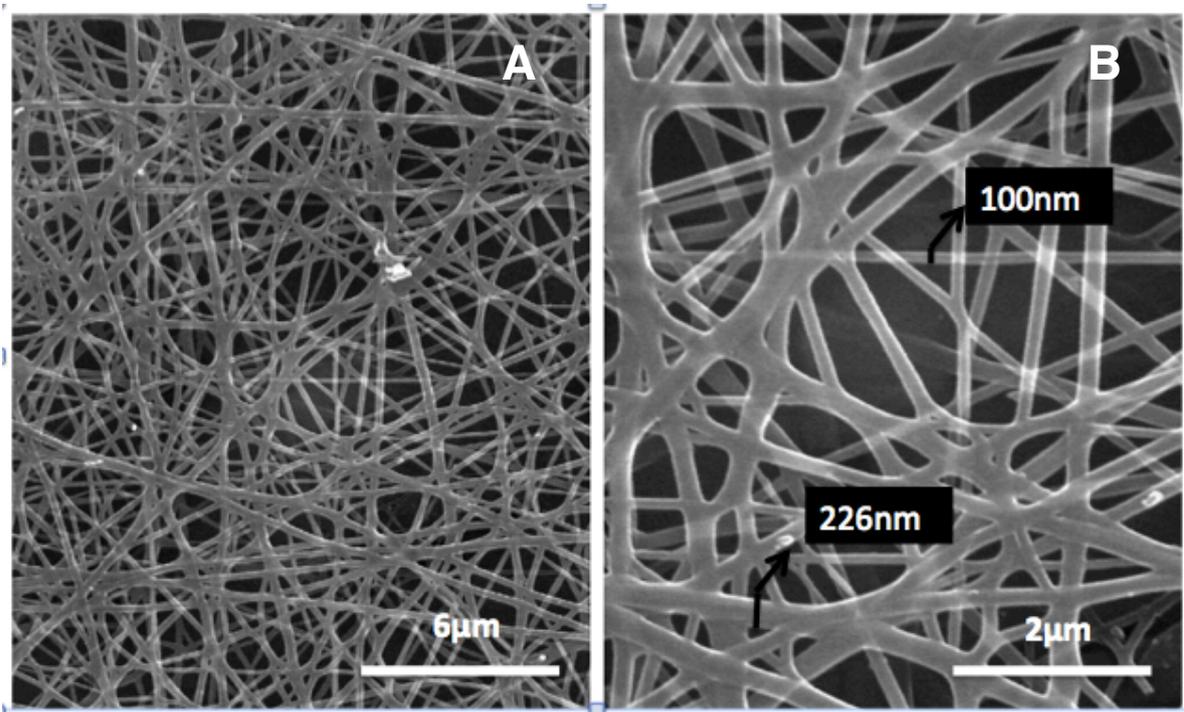


Figura 31- Micrografias das membranas fibrosas de colagénio obtidas por electrospinning.

As imagens revelam a existência de fibras aleatórias com tamanhos distintos e com diâmetros que variam entre os 100 nm e os 226 nm. Reporta-se na literatura [80] que fibras de colagénio (*Calf skin* tipo I) obtidas por eletrofiação apresentam diâmetros entre os 390 e os 200 nm, valores que são próximos dos obtidos no presente trabalho. A figura 31, mostra também que a matriz fibrosa obtida apresenta elevado grau de porosidade, com os filamentos organizados de forma aleatória, mimetizando a estrutura da matriz extracelular, que constitui fatores importantes para adesão, crescimento e proliferação celular [80]. A produção de fibras de colagénio produzidas por esta técnica surge como muito promissora na área da biomedicina, não só devido à biocompatibilidade inerente, que provém do facto de se tratar de um polímero natural, mas também porque é possível produzir filamentos aleatoriamente organizados ou alinhados e espessura nanométrica. Estes filamentos partilham semelhança com a matriz extracelular, sendo importante na regeneração tecidual.

4.2.1 - Estudo da bioatividade das membranas em SBF

As membranas compósitas (M30HA) foram submetidas a ensaios de bioatividade em SBF com a finalidade de se determinar a capacidade de induzirem a precipitação de apatite à sua superfície, o que pode ser indicador do potencial dessas membranas para participarem em reações biológicas específicas.

Como já referido no procedimento experimental, foram cortados pedaços destas membranas e, posteriormente, foram incubados em fluido fisiológico simulado durante períodos de tempo de (1, 3 e 7 dias). No final de cada período, as membranas foram lavadas com água ultra pura e secas na estufa a 37°C para posterior avaliação por DRX, SEM e EDS.

Na figura 32 estão representados os difratogramas de Raio-X das membranas M30HA após os vários períodos de imersão.

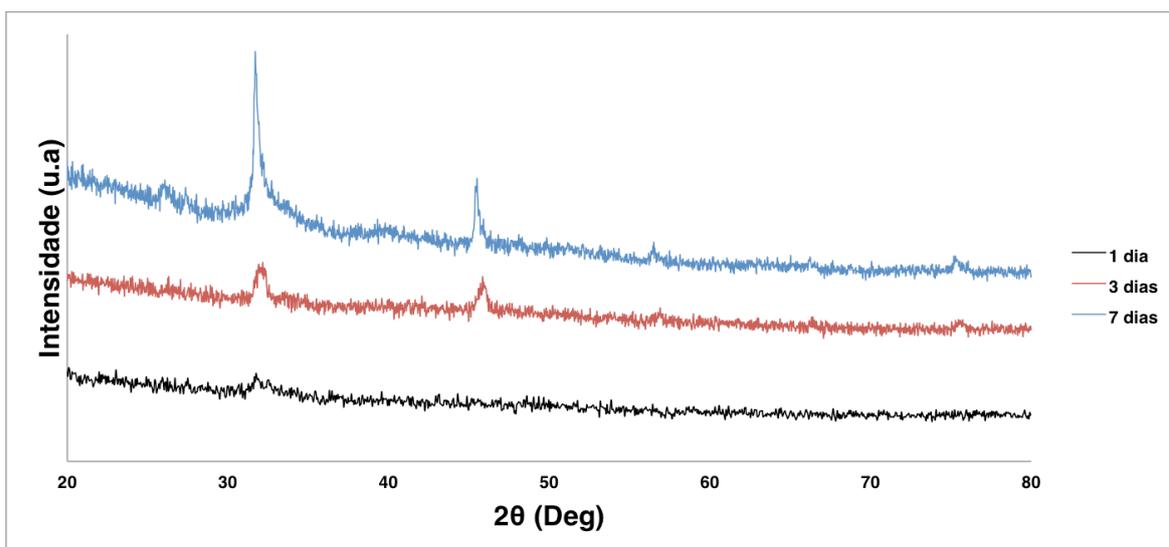


Figura 32- Difratograma de raios-X das membranas compósitas com enchimento de HAp após imersão em SBF durante 1, 3 e 7 dias.

O espectro de difração de raios-X relativo à membrana compósita com 30% de enchimento de hidroxiapatite (M30HA) mostra o aparecimento de um pico correspondente à hidroxiapatite ($2\theta = 32.37^\circ$) após um dia de imersão em SBF. Esse pico verifica-se também ao longo do tempo, e a sua intensidade vai aumentando.

A presença deste pico revela que após a imersão em fluido fisiológico simulado a bruxite, formada durante o processo de produção das membranas, é convertida novamente em hidroxiapatite.

O facto de a presença do pico se verificar ao longo dos vários tempos de incubação indica a formação de um precipitado apatítico na superfície das membranas, indicando a capacidade bioativa do material.

A fim de se complementar o estudo da bioatividade das membranas em meio celular avaliou-se a sua microestrutura por SEM. Na figura 33 estão representadas micrografias das membranas compósitas (M30HA) ao longo dos diferentes tempos de incubação em SBF (0, 1, 3 e 7).

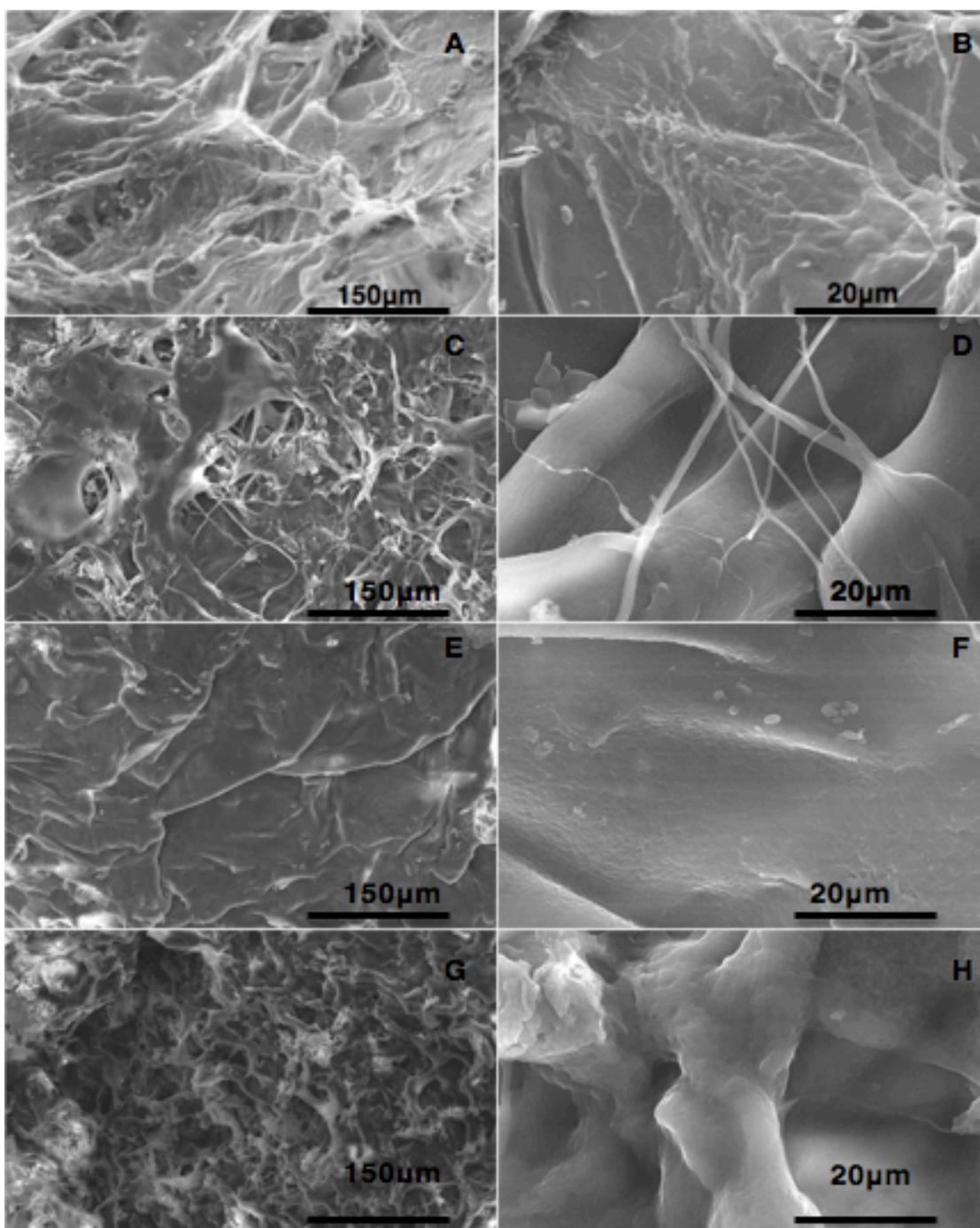


Figura 33- Micrografias em SEM da membrana M30HA incubada em SBF após: 0 dias (A e B); 3 dias (C e D); 5 dias (E e F) e 7 dias (G e H).

A figura 33 mostra que as membranas sofrem alterações a nível microestrutural ao longo do tempo de incubação. A porosidade das amostras aparenta ir reduzindo ao longo do tempo e tornando as membranas mais compactas estruturalmente. Esta evolução está possivelmente relacionada com a formação dos precipitados de apatite na superfície das membranas. Tempos de incubação mais longos seriam necessários para avaliar com maior profundidade a cinética de formação das estruturas apatíticas superficiais indicadoras de bioatividade em meio acelular

4.2.2 – Estudo da degradação das membranas

Perfil de degradação das membranas em pH fisiológico (PBS)

Com a finalidade de se estudar o comportamento das membranas preparadas com e sem enchimento de hidroxiapatite, estas foram incubadas durante 7 dias em PBS com pH próximo do da saliva (pH≈ 6.8). Ao fim de vários periodos de tempo (0, 3, 5 e 7 dias) foi medida a quantidade de colagénio libertado para o sobrenadante. O gráfico representado na figura 34, permite avaliar as quantidades de colagénio perdidas pelas amostras durante o tempo do ensaio.

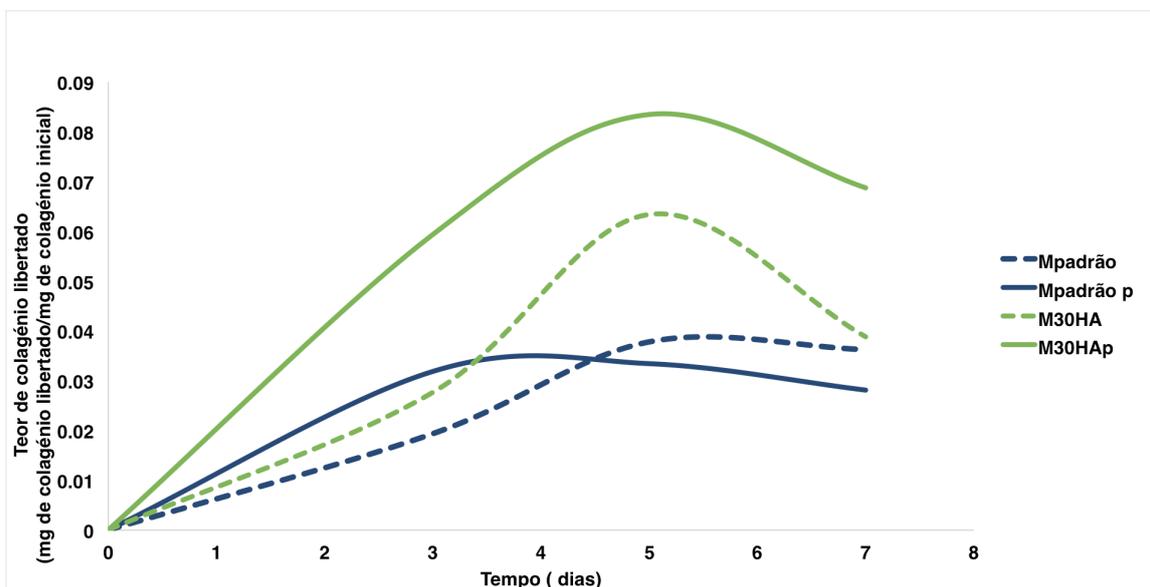


Figura 34- Perda de colagénio para o sobrenadante em cada tipo de membrana.

A análise do gráfico evidencia que as membranas compósitas apresentam sempre maior perda de colagénio do que as suas congêneres, preparadas sem hidroxiapatite: M30HA_p>Mpadrão_p e M30HA>Mpadrão. Este comportamento pode explicar-se admitindo que a presença da hidroxiapatite altera o empacotamento do colagénio na membrana, conferindo maior porosidade à membrana e aumentando o grau de exposição do colagénio ao sobrenadante, facilitando assim a sua degradação [81,82]. A figura mostra também que a curva referente ao compósito prensado apresenta valores de perda de colagénio substancialmente mais elevados do que os observados na curva para o compósito não prensado. Sugere-se que os eventuais danos ao colagénio, resultantes da prensagem se tornem mais acentuados em presença da hidroxiapatite. Tratando-se de um enchimento inorgânico, não deformável, as partículas de hidroxiapatite distribuídas através da matriz polimérica, podem funcionar como pontos de pressão elevada sobre o colagénio, danificando-o.

Por outro lado, os perfis das curvas referentes às membranas prensadas (M30HA_p e Mpadrão_p) são semelhantes entre si, porém diferentes dos perfis das curvas das membranas não prensadas (M30HA e Mpadrão), estas igualmente semelhantes entre si. Observa-se assim que as membranas não prensadas apresentam uma taxa de degradação, constante no tempo até ao 3º dia que, a partir desse momento, aumenta em ambos os casos, atingindo-se valores máximos de perda de colagénio para os dois tipos de membrana (M30HA e Mpadrão) ao fim de 5 dias. Por seu lado, o par de curvas referentes às membranas prensadas (Mpadrão_p e M30HA_p) evidencia uma taxa de degradação constante até ao 3º e 5º dia, respectivamente, sem momentos de aceleração como os descritos para as curvas prensadas. Esta diferença nos perfis das curvas sugere que, no caso das membranas não prensadas, aumento da taxa de degradação ao fim de um certo período pode estar associada ao estabelecimento de um novo contributo que acelere a degradação. Sugere-se que esse contributo possa ser a porosidade pois, uma vez formada, contribuiria para incrementar a superfície de contacto entre meio de degradação e colagénio, acelerando a perda de massa em colagénio.

Ao fim de 7 dias, regista-se uma redução significativa da perda de colagénio para o sobrenadante, em todas as membranas, sendo mais acentuada nas que apresentam hidroxiapatite na sua composição. Esta redução pode ser explicada pela ocorrência de agregados de colagénio que se vão formando ao longo do tempo e que não são quantificáveis como o colagénio em suspensão. A presença de partículas de

hidroxiapatite nas membranas M30HA e M30HA_p faz com que a formação de agregados seja ainda maior provocando uma diminuição mais acentuada de proteína libertada.

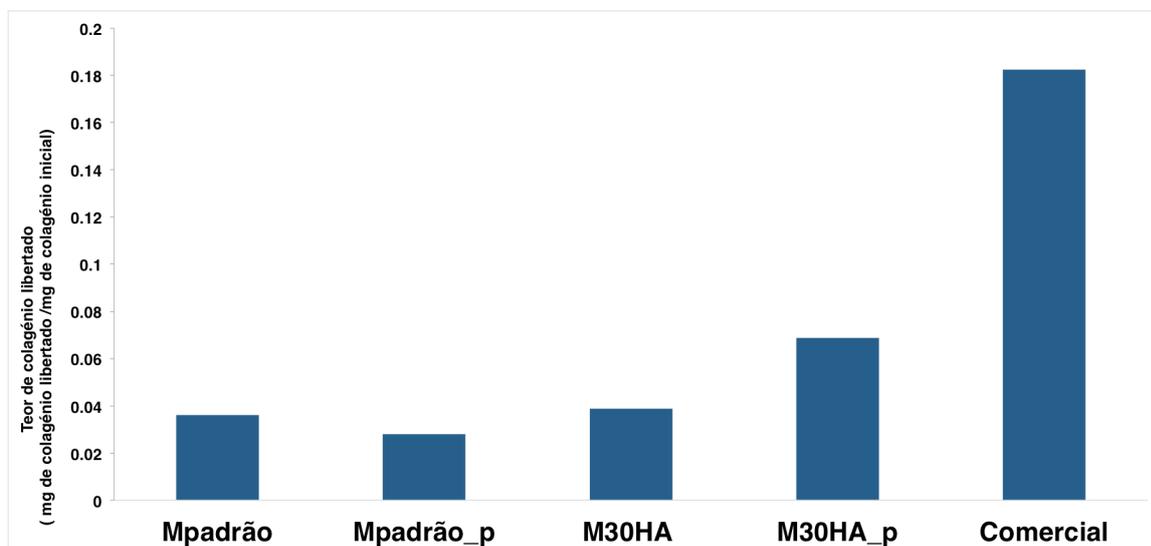


Figura 35- Perda de colagénio em cada tipo de membrana após 7 dias de exposição.

Analisando a figura 35, que representa a libertação de proteína apenas ao fim dos 7 dias, incluindo como comparação a membrana comercial (Jason Membrane®), observa-se que as membranas preparadas experimentalmente apresentam uma taxa de degradação menor do que a da comercial. No contexto do presente trabalho, este pode ser um resultado promissor, indicando que, comparativamente com a membrana comercial, as membranas compósitas com 30% de hidroxiapatite, produzidas por liofilização, por apresentarem uma menor degradação global, poderão garantir um maior tempo de permanência no meio bucal, favorável à regeneração.

Alteração morfológica das membranas ao longo do tempo de incubação em PBS

Ao fim dos vários tempos de incubação, e com a finalidade de se estudarem as alterações morfológicas sofridas pelas membranas, procedeu-se à observação das suas microestruturas por microscopia electrónica de varrimento (SEM).

Nas figuras 36 e 37 estão representadas as micrografias das membranas sem enchimento e com enchimento de hidroxiapatite (prensadas e não prensadas), respetivamente, incubadas durante 0, 3, 5 e 7 dias em PBS. Analisando as micrografias referentes à membrana no tempo 0 de incubação (figura 36 (A e B)) e comparando-as com as restantes, verifica-se que ocorrem algumas modificações a nível da estrutura da

membrana bem como alterações da própria hidroxiapatite presente na constituição das membranas compósitas.

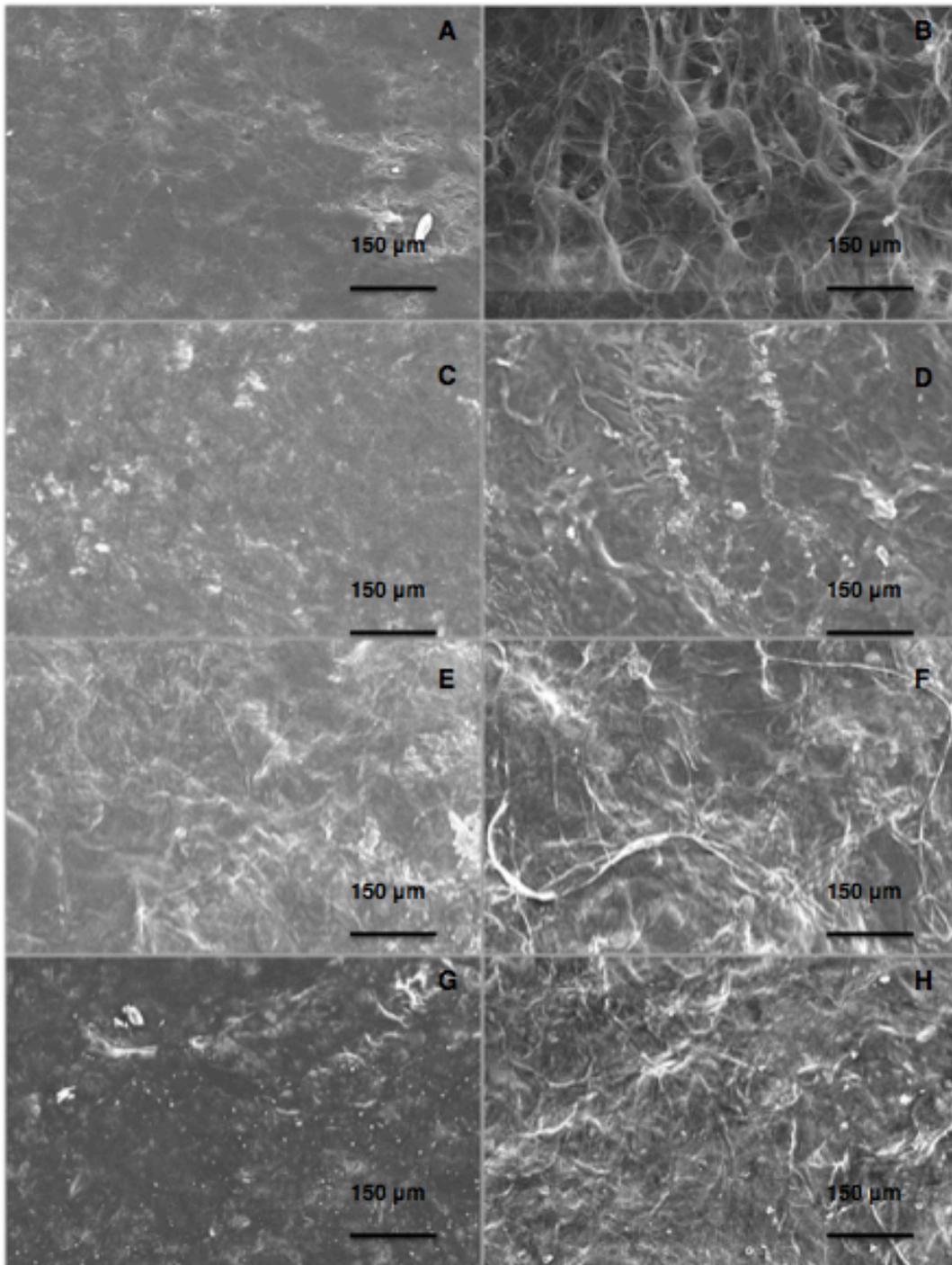


Figura 36- Micrografias das membranas padrão após a incubação em PBS durante 0, 3, 5 e 7 dias. A: Mpadrão_p (0 dias); B: Mpadrão (0 dias); C: Mpadrão_p (3 dias); D: Mpadrão (3dias); E: Mpadrão_p (5 dias); F: Mpadrão (5 dias); G: Mpadrão_p (7 dias); H: Mpadrão (7 dias).

No caso das membranas padrão e pela análise da figura 36 é possível observar que, ao longo do tempo, estas membranas (prensadas e não prensadas) não evidenciam alterações significativas de microestrutura, embora seja claro que as Mpadrão apresentam maior porosidade inicial do que as Mpadrão_p.

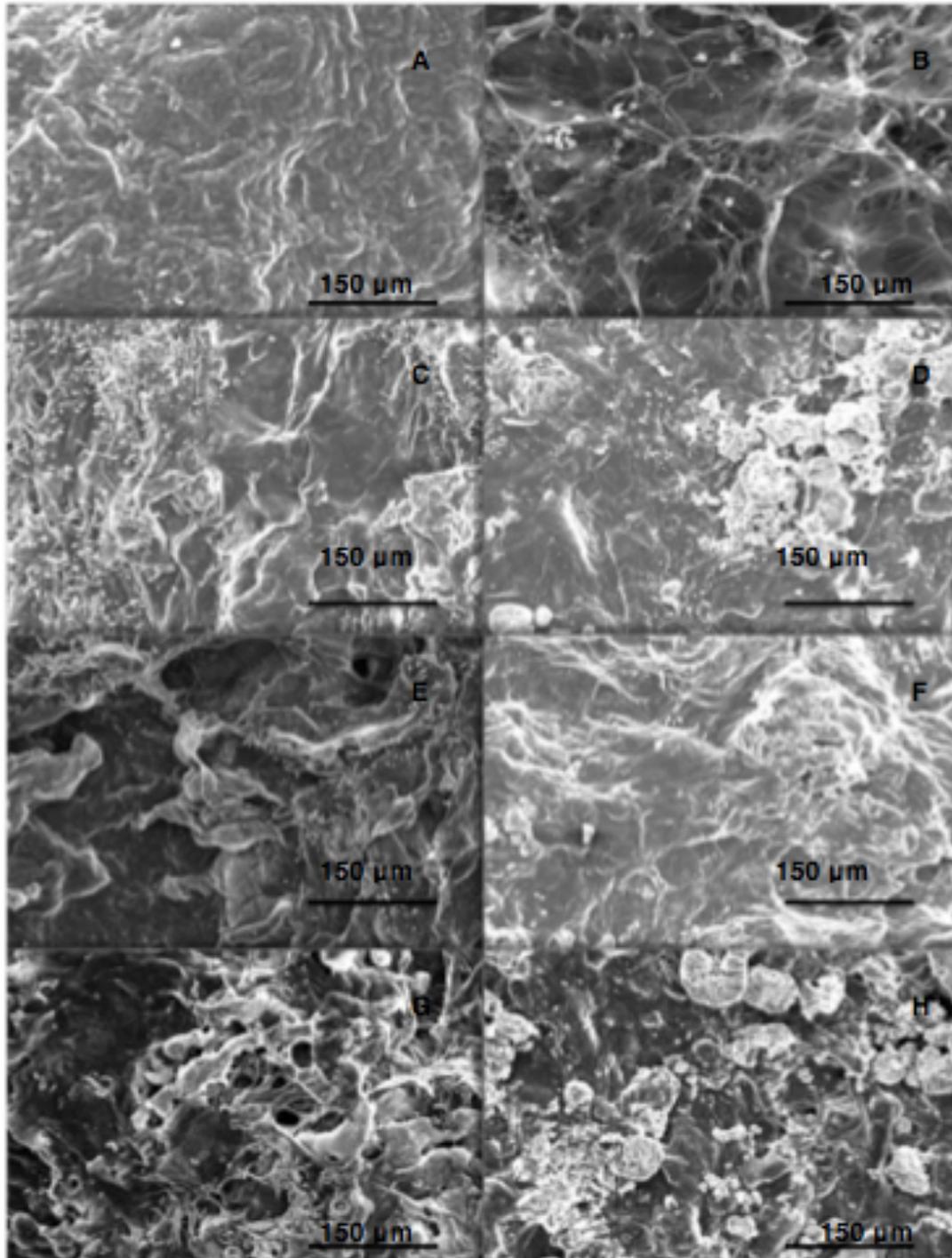


Figura 37- Micrografias das membranas compósitas incubadas em PBS durante 0, 3, 5 e 7 dias. A: M30HA_p (0 dias); B: M30HA (0dias); C: M30HA_p (3 dias); D: M30HA (3 dias); E: M30HA_p (5 dias); F: M30HA (5 dias); G: M30HA_p (7 dias); H: M30HA (7 dias).

A figura 37 mostra que as membranas compósitas, com hidroxiapatite na sua composição, apresentam alterações visíveis na sua microestrutura ao longo do tempo de incubação em PBS.

Comparando com as membranas que não foram incubadas (figura 37 (A e B)), as restantes membranas compósitas, prensadas e não prensadas, evidenciam maior porosidade com o decorrer do tempo. É também observável que, nas membranas não prensadas, a hidroxiapatite sofre alterações significativas. A partir do terceiro dia de incubação, detecta-se a presença de um precipitado (HAp) que cobre praticamente toda a superfície da membrana, sendo este facto mais evidente ao fim de 7 dias. A comparação das micrografias das membranas M30HA_p e M30HA, sugere que as membranas prensadas se degradam de forma mais significativa do que as não prensadas devido à camada de precipitados que se forma na superfície da membrana M30HA. A camada formada contribui para a diminuição da porosidade da membrana, fazendo com que fique menos exposta ao sobrenadante, travando a perda de proteína para o mesmo. Nas membranas prensadas não se observa a reação de precipitação da hidroxiapatite e como se tornam mais porosas ao longo do tempo, compreende-se que se degradem mais do que as não prensadas [81,83].

Composição de fases cristalinas das membranas

As membranas incubadas em PBS foram sujeitas, ao fim de 3, 5 e 7 dias, a análise por difração de raios-X de modo a serem avaliadas eventuais alterações da hidroxiapatite incorporada na membrana compósita (M30HA). Os resultados apresentam-se na figura 38.

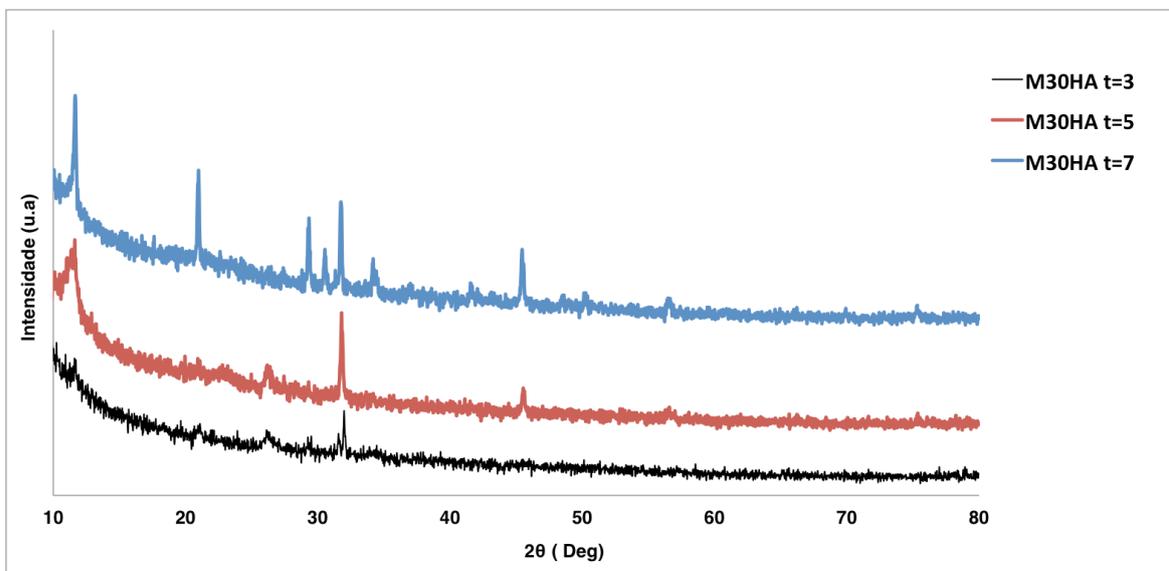


Figura 38- Difratograma de raios-X das membranas compósitas com enchimento de HAp após a incubação em PBS durante 3, 5 e 7 dias.

Os diferentes espectros da figura evidenciam os picos que foram identificados como pertencendo a fosfatos de cálcio, com composição $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Bruxite). Também se observa que a intensidade dos picos vai aumentando com o tempo de incubação.

Comparando estes espectros com os apresentados anteriormente na caracterização das membranas liofilizadas (figura 27), verifica-se a fase que continua dominante é a Bruxite embora com alteração de intensidade dos seus picos.

Capítulo 5

Capítulo 5

Conclusões e trabalho futuro

5- Conclusões e trabalho futuro

5.1- Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo a otimização da produção de estruturas com a capacidade de regenerar tecido periodontal e avaliar a sua degradação em meio bucal.

Preparam-se membranas de colagénio de tendão de Aquiles de bovino (por electrospinning e liofilização) e membranas compósitas com enchimento de nanopartículas de hidroxiapatite, obtida experimentalmente por precipitação química.

As nanopartículas de HA apresentaram uma morfologia semelhante á do osso natural com tamanhos na ordem dos nanómetros ($< 150\text{nm}$) e área superficial específica elevada ($107\text{m}^2/\text{g}$). Observou-se também que as partículas de HAp possuem carga de superfície positiva para pH próximo do da cavidade oral, apresentando um ponto isoelétrico de 7.1.

Durante a produção das membranas com enchimento por liofilização, a hidroxiapatite transforma-se em bruxite devido á sua dissolução a pH inferior a 4, tal facto foi observado através da análise feita por difração de raio-x.

O estudo de bioatividade realizado em SBF revelou que as membranas apresentam capacidade bioativa, uma vez que foi detetada a formação de picos característicos da hidroxiapatite por DRX, após os diferentes tempos de incubação.

A análise do perfil de degradação das membranas revelou que de um modo geral, as membranas que apresentam HAp na sua constituição revelam-se

mais propícias a degradação, visto que apresentam uma elevada área superficial específica que lhes confere maior porosidade em relação às membranas sem enchimento. Relativamente às membranas prensadas e não prensadas, em ambos os tipos de membranas, verificou-se que as prensadas apresentam uma taxa de degradação mais elevada, devido a danos provocados pela prensagem. Todas as membranas a partir do quinto dia sofrem uma diminuição da perda de colagénio para o sobrenadante que se deve à formação de agregados de proteínas que impedem a quantificação. No sétimo dia verifica-se que a membrana que degrada mais é a M30HA_p, facto que é confirmado através da análise de microscopia (SEM), que mostra que estas membranas aumentam significativamente a sua porosidade ao longo do tempo.

Comparativamente à membrana comercial (Jason membrane®), as obtidas experimentalmente apresentam um perfil de degradação em meio bucal mais favorável.

As membranas produzidas por electrospinning mostram-se promissoras na área da regeneração tecidual, uma vez que apresentaram na sua composição fibras na escala nanométrica e morfologia semelhante à da matriz extracelular.

5.2- Trabalho Futuro

Como trabalho futuro sugere-se:

- a) Otimizar o protocolo de diluição do colagénio puro.
- b) Estudar a degradação das membranas por electroforese SDS -PAGE
- c) Estabelecer um protocolo para o estudo da degradação das membranas por ação colagenolítica.
- d) Estudar o potencial das membranas para libertação de fármacos.
- e) Otimizar a produção de membranas periodontais por electrofiação.
- f) Testar a produção de membranas por electrofiação com enchimento de nanopartículas de hidroxiapatite.

Referencias

- [1] R. Langer, "Tissue engineering.," *Mol. Ther.*, vol. 1, no. 1, pp. 12–5, Jan. 2000.
- [2] B. Munksgaard, «Structure of periodontal tissues in health and disease », vol. 40, pp. 11–28, 2006.
- [3] S. Luis, S. De Souza, e V. C. Mariguela, «Periodontal disease : a genetic», vol. 26, pp. 32–38, 2012.
- [4] Tonetti, MS, Prato, GP., « Cortellini, P. Factors affecting the healing response of intrabony defects following guided tissue regeneration and access flap surgery», *J Clin Periodontol*, 23, pp. 548–556, 1996.
- [5] F. Manuel, A. Illueca, P. B. Vera, P. D. G. Cabanilles, V. F. Fernandez, F. José, G. Loscos, F. Manuel, e A. Illueca, «Periodontal regeneration in clinical practice», 2006.
- [6] E. Applegate, *Anatomia e Fisiologia*. Elsevier Health Sciences Brazil, 2012.
- [7] Gerianne, H. Capítulo 1: The Basics. In Perrone, J. R, *Small Animal Dental Procedures for Veterinary Technicians and Nurses (Midwest Book Review)*, pp. 3-21, 2013.
- [8] Whyte, A., Sopena, J., Whyte, J. & Martínez, M. J. (1998). Capítulo 2: Anatomía, Estructura y Nomenclatura Dentaria. In: San Román, F., *Atlas de Odontología en Pequeños Animales*. Edição espanhola, pp.32-3. Espanha: Grass Edicions.
- [9] Lindhe, J., Karring, T. e Lang, NP. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Oxford, UK, Blackwell Munksgaard, 2003.
- [10] B. Young and J. W. Heath, *Wheater's Functional Histology*, Fourth edi. Guanabara

- koogan S.A, 2000.
- [11] F. Chen and Y. Jin, «Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities », *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 15–19, 2010.
- [12] R. Seeley, S. Trente, and P. Tate, *Anatomia e Fisiologia*, 6^a Edição. Lisboa: Lusodidacta, 2005
- [13] A. K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang, and M. J. Buehler, « Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone», *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 1724, Jan. 2013.
- [14] G. Karsenty, «The genetic transformation of bone biology», pp. 3037–3051, 1999.
- [15] M. Stevens, «Biomaterials for bone Materials that enhance bone regeneration have a wealth of potential», *Mater. Today*, vol. 11, n. 5, pp. 18–25, 2008.
- [16] National Institute of Dental and Craniofacial Research, « Periodontal (Gum) Disease: Causes, Symptoms, and Treatments.» [Online]. Available: <http://www.nidcr.nih.gov/oralhealth/Topics/GumDiseases/PeriodontalGumDisease.htm>. [Accessed: 7-Jan-2016].
- [17] Hägi, T. T., Laugisch, O., Ivanovic, A., Sculean, A. Regenerative periodontal therapy, *Quintessence Int*, 45:pp185–192, 2014.
- [18] Lyngstadaas, SP. et al. « Enamel matrix proteins; old molecules for new applications» , *Orthod Craniofac Res*, 12, pp.243–253, 2009.
- [19] Karring, T.; Nyman, S. & Lindhe, J. «Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. » *J Clin Periodontol*; **7**: 96-105, 1980.
- [20] Nyman, S.; Karring, T.; Lindhe, J. & Planten, S. «Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. » *J Clin Periodontol*; **7**: 394-401, 1980.
- [21] Karring, T.; Isidor, F.; Nyman, S. & Lindhe, J. « New attachment formation on the teeth with a reduced but healthy periodontal ligament.» *J Clin Periodontol*; **12**: 51-60,

- 1985.
- [22] Almeida PDV, Grégio AMT, Machado MAN, de Lima AAS, Azevedo LR. « Saliva composition and functions: a comprehensive review. » *J Contemp Dent Pract*;9(3):72–80, 2008.
- [23] S. P. Humphrey e R. T. Williamson, «A review of saliva : Normal composition flow , and function», vol. 85, n. 2, 2001.
- [24] F. C. Holsinger and D. T. Bui, «Anatomy, Function, and Evaluation of the Salivary Glands. in Salivary Gland Disorders, » E. N. Myers and R. L. Ferris, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–16, 2007.
- [25] Ericsson, Y. « Clinical investigations of the salivar buffering action. » *Acta Odontologica Scandinavica*, 17, pp. 131-165, 1959.
- [26] Dowd, F.J. « Saliva and dental caries. » *Dental Clinics of North America*, 43(4), pp. 579-97, 1999.
- [27] Tenovuo, J. «Nonimmunoglobulin defence factors in human saliva. » In *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*. Boca Raton, CRC Press, vol. II, pp. 55–91, 1989.
- [28] Kavanagh, D. A., O’Mullane, D.M e Smeeton, N. « Variation of salivary flow rate in adolescents. » *Archives of Oral Biology*, 43(5), pp. 347-352,1998
- [29] Gray, H. *Anatomy of the Human Body*, Philadelphia, Lea & Febiger, 2000.
- [30] Cummings, C. *Cummings Otolaryngology: Head and Neck Surgery*. 5th Edition, Section two, Salivary glands. Chapter eighty-four. *Physiology of the Salivary Glands* by Ravindhra G. Elluru, pp. 1133-1142, 2011
- [31] T. Salo, «Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases», pp. 311–318, 2004.
- [32] K. Thomadaki, J. A. Bosch, F. G. Oppenheim, e E. J. Helmerhorst, «The diagnostic

- potential of salivary protease activities in periodontal health and disease», n. October 2012, pp. 781–788, 2013.
- [33] Nyberg P, Ylipalosaari M, Sorsa T, Salo T. « Trypsins and their role in carcinoma growth. » *Exp Cell Res.* 2006;312(8):1219-28.
- [34] Kreis T, Vale R. Matrix Metalloproteinases. In: Press OU, editor. *Sternlicht MD, Werb Z Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins.* » 2nd ed. Geneva: Sambrook & Tooze Publication; p. 519-42, 1999.
- [35] Visse R, Nagase H. «Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. » *Circ Res.* 2003;92(8):827-39.
- [36] Nagase H, Visse R, Murphy G. « Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. » *Cardiovasc Res.* 2006 69(3):562-73.
- [37] Pirila E, Maisi P, Salo T, Koivunen E, Sorsa T. « In vivo localization of gelatinases (MMP-2 and -9) by in situ zymography with a selective gelatinase inhibitor. » *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287(3):766-74.
- [38] Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL. «Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque. »*Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(43):15575-80.
- [39] Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. «Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. »*Oral diseases.* 2004;10(6):311-8.
- [40] Sorsa T, Golub LM. «Is the excessive inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) by potent synthetic MMP inhibitors (MMPi) desirable in periodontitis and other inflammatory diseases? That is: 'Leaky' MMPi vs excessively efficient drugs. »*Oral diseases.* 2005;11(6):408-9.
- [41] Uitto VJ. « Gingival crevice fluid – an introduction. »*Periodontal 2000.* 31(1):9-

11,2003

- [42] Avellan NL, Sorsa T, Tervahartiala T, Mantyla P, Forster C, Kempainen P. «Painful tooth stimulation elevates matrix metalloproteinase-8 levels locally in human gingival crevicular fluid. » *J Dent Res.* 84(4):335-9,2005.
- [43] A. P. P. Velosa, W. R. Teodoro, e N. H. Yoshinari, «Colágeno na cartilagem osteoartrótica (*) Collagen in osteoarthrotic cartilage», 2003.
- [44] Prockop, DP, Kivirikko, KL, Tuderman, L, Guzman, NA, «The biosynthesis of collagen and its disorders. » *N. England J. Med*, v. 301, n. 1, p 12-23, 1979
- [45] H. B. Schiller, I. E. Fernandez, G. Burgstaller, C. Schaab, R. A. Scheltema, T. Schwarzmayer, T. M. Strom, O. Eickelberg, e M. Mann, «Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair», pp. 1–19, 2015.
- [46] Darnell, JE, Lodish, H. Scientific American Books ed. *Molecular Cell Biology*. Baltimore. 3. Ed. Baltimore. p. 1124-35, 1995
- [47] R. Z. Legeros, «Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials», pp. 4742–4753, 2008.
- [48] A. Carlos, A. Herrera, D. De Físico-química, I. De Química, U. E. Paulista, R. Prof, e F. Degni, «Revisão», vol. 33, n. 6, pp. 1352–1358, 2010.
- [49] W. Cao and L. L. Hench, «Bioactive materials. » *Ceram. Int.*, vol. 22, no. 6, pp. 493–507, Jan. 1996.
- [50] R. Z. LeGeros, G. Daculsi, and J. P. Legeros, «Bioactive Bioceramics, » in *Musculoskeletal tissue regeneration*, W. Pietrzak, Ed. Humana Press, 2008, pp. 153–181.
- [51] L. Wang and G. H. Nancollas, «Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution.» *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 11, pp. 4628–69, Nov. 2008.

- [52] A. B. H. Y. and B. C. Şener, « A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones. » InTech, 2012.
- [53] J. S. Al-sanabani, A. A. Madfa, e F. A. Al-sanabani, «Application of Calcium Phosphate Materials in Dentistry», vol. 2013, 2013.
- [54] E. M. Rivera-Mu oz, Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges. InTech, 2011.
- [55] E. Menéndez-proupin, S. Cervantes-rodríguez, R. Osorio-pulgar, e M. Franco-cisterna, «Computer simulation of elastic constants of hydroxyapatite and fluorapatite», *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 4, n. 7, pp. 1011–1020, 2011.
- [56] H. Shimauchi, E. Nemoto, e H. Ishihata, «Possible functional scaffolds for periodontal regeneration», *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, vol. 49, n. 4, pp. 118–130, 2013.
- [57] O. Ability, «Hybrid Membranes of PLLA/Collagen for Bone Tissue Engineering: A Comparative Study of Scaffold Production Techniques for Optimal Mechanical Properties and Osteoinduction Ability», n. 4, pp. 408–423, 2015.
- [58] P. S. Babo, R. L. Pires, R. L. Reis, and M. E. Gomes, « Membranes for periodontal tissues regeneration. » *Ciência Tecnol. dos Mater.*, vol. 26, no. 2, pp. 108–117, 2014.
- [59] S. Lee e S. Kim, «Membranes for the Guided Bone Regeneration», vol. 36, n. 6, pp. 239–246, 2014.
- [60] S. Z. Fu, X. H. Wang, G. Guo, S. Shi, M. Fan, e H. Liang, «Preparation and properties of nano-hydroxyapatite / PCL-PEG-PCL composite membranes for tissue engineering applications», pp. 74–83, 2011.
- [61] E. Lee, S. Jun, H. Kim, and Y. Koh, «Collagen – silica xerogel nanohybrid membrane for guided bone regeneration. » *J Biomed Mater Res Part A*, vol. 100, pp. 841–847, 2011.

- [62] M. C. Phipps, W. C. Clem, S. A. Catledge, Y. Xu, K. M. Hennessy, V. Thomas, M. J. Jablonsky, S. Chowdhury, A. V Stanishevsky, K. Yogesh, e S. L. Bellis, «Mesenchymal Stem Cell Responses to Bone-Mimetic Electrospun Matrices Composed of Polycaprolactone , Collagen I and Nanoparticulate Hydroxyapatite», vol. 6, n. 2, pp. 1–8, 2011.
- [63] E. Lee, S. Jun, H. Kim, and Y. Koh, “Collagen – silica xerogel nanohybrid membrane for guided bone regeneration,” *J Biomed Mater Res Part A*, vol. 100, pp. 841–847, 2012.
- [64] M. C. Phipps, W. C. Clem, S. A. Catledge, Y. Xu, K. M. Hennessy, V. Thomas, M. J. Jablonsky, S. Chowdhury, A. V Stanishevsky, K. Yogesh, and S. L. Bellis, “Mesenchymal Stem Cell Responses to Bone-Mimetic Electrospun Matrices Composed of Polycaprolactone, Collagen I and Nanoparticulate Hydroxyapatite,” *PLoS One*, vol. 6, no. 2, pp. 1–8, 2011.
- [65] E. Bouyer, F. Gitzhofer, and M. I. Boulos, “Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 11, no. 8, pp. 523–531, 2000.
- [66] Sing W, Everett H, Haul RAW, Moscou L, Pierotti, R. A. Rouquérol J, Siemieniowska T. “Reporting physiosorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity.” *International Union of Pure and Applied Chemistry*; 54, 1982.
- [67] Malvern, “Zeta potential theory,” *Zetasizer Nano Series User Manual*. pp. 15–1 à 15–12, 2009.
- [68] Kokubo T, Takadama H. “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?” *Biomaterials* ;27:2907–15, 2006.
- [69] H. D. Hill e J. G. Straka, «Protein Determination Using Bicinchoninic Acid in the Presence of Sulfhydryl Reagents ’», vol. 208, pp. 203–208, 1988.

- [70] I. Mobasherpour, M. S. Heshajin, A. Kazemzadeh, and M. Zakeri, “Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method,” *J. Alloys Compd.*, vol. 430, no. 1–2, pp. 330–333, Mar. 2007.
- [71] E. S. Frenkel e K. Ribbeck, «Salivary Mucins Protect Surfaces from Colonization by Cariogenic», vol. 81, n. 1, pp. 332–338, 2015.
- [72] M. Sadat-shojai, M. Khorasani, E. Dinpanah-khoshdargi, e A. Jamshidi, «Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures», *Acta Biomater.*, vol. 9, n. 8, pp. 7591–7621, 2013.
- [73] L. Berzina-Cimdina and N. Borodajenko, “Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy,” *Infrared Spectrosc. – Mater. Sci. Eng. Technol.*, pp. 123–148, 2012.
- [74] T. V. Thamaraiselvi, K. Prabakaran, and S. Rajeswari, “Synthesis of hydroxyapatite that mimic bone minerology,” *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 19, no. 2, pp. 81–83, 2006.
- [75] D. N. Ungureanu, N. Angelescu, R. Ion, E. Stoian, and C. Rizescu, “Synthesis and characterization of Hydroxyapatite nanopowders by chemical precipitation method,” *J. Nanostructure Chem.*, vol. 4, no. 2, p. 99, 2014.
- [76] C. Santos, P. S. Gomes, J. a. Duarte, R. P. Franke, M. M. Almeida, M. E. V. Costa, and M. H. Fernandes, “Relevance of the sterilization-induced effects on the properties of different hydroxyapatite nanoparticles and assessment of the osteoblastic cell response,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, no. 77, pp. 3397–3410, 2012.
- [77] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, and V. Svorcik, “Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 739–67, Jan. 2011.
- [78] M. Chul e J. Tanaka, «FT-IR study for hydroxyapatite / collagen nanocomposite

- cross-linked by glutaraldehyde», vol. 23, pp. 4811–4818, 2002.
- [79] M. Silvester, I. Yannas, M. Forbes, « Collagen banded fibril structure and the collagen platelet reaction». *Thrombosis Research*, v. 55, p. 135-148, 1989.
- [80] K. Su, L. Jeong, G. Lee, B. Seo, Y. Jeong, S. Hong, S. Roh, J. Jin, W. Ho, e B. Min, «Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing», vol. 27, pp. 1452–1461, 2006.
- [81] S. Liao, F. Watari, Y. Zhu, M. Uo, T. Akasaka, W. Wang, G. Xu, and F. Cui, “The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite / collagen / PLGA composite membrane in vitro,” *Dent. Mater.*, vol. 23, pp. 1120–1128, 2007.
- [82] D. Vasudevan, S. Sreekumari, and K. Vaidyanathan, *Textbook of Biochemistry for Dental Students: 2nd Edition*, vol. 1. JP Medical Ltd, 2011.
- [83] M. Ni e B. D. Ratner, «Nacre surface transformation to hydroxyapatite in a phosphate buffer solution», vol. 24, pp. 4323–4331, 2003.
- [84] BHARDWAJ, N., KUNDU, S. C. «Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 325-347, 2010.
- [85] RAMAKRISHNA, S., FUJIHAR, K., TEO, W.-E., LIM, T.-C., MA, Z. « An Introduction to Electrospinning and Nanofibers. Singapore. » World Scientific Publishing Co. Pte Ltd., 382 p, 2005.
- [86] CASPER, C. L., STEPHENS, J. S., TASSI, N. G., CHASE, D. B., RABOLT, J. F. «Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. » *Macromolecules*, v. 37, p. 573-578, 2004.

Anexos

Anexo A

Fabricação de membranas por Electrospinning

A técnica de electrofiação ou *electrospinning* tem recentemente sido alvo de estudo por vários investigadores devido ao grande interesse que apresenta na produção de membranas com elevada porosidade e boa razão área superficial específica/ volume, importantes para aplicações em diversas áreas, incluindo a biomedicina [84].

O Electrospinning é uma técnica de produção de fibras na escala nanométrica que surge em 1934 por Anton Formhals, que patenteou uma montagem para a produção de filamentos poliméricos, aproveitando repulsões eletrostáticas entre as cargas superficiais.

A solução polimérica é carregada numa seringa com uma agulha colocada na sua extremidade. O conjunto seringa-agulha é colocado numa bomba infusora que controla o caudal da solução à saída da agulha. A agulha está ligada a uma fonte de alta tensão que permite que o potencial eletrostático do fluido seja elevado, sendo que quanto maior é este potencial, maior é a carga superficial do líquido.

Existe um campo elétrico aplicado entre a agulha e o coletor fazendo com que uma força elétrica seja induzida na gota, com componentes normais e tangenciais [63]. Quando as forças elétricas superam a tensão superficial do líquido, ocorre a formação do cone de Taylor, sendo este alongado proporcionalmente à quantidade de tensão aplicada. No limite máximo de uma tensão aplicada é projetado um jato da ponta da agulha em direção ao coletor depositando-se neste sobre a forma de fibras (figura 39) [84].

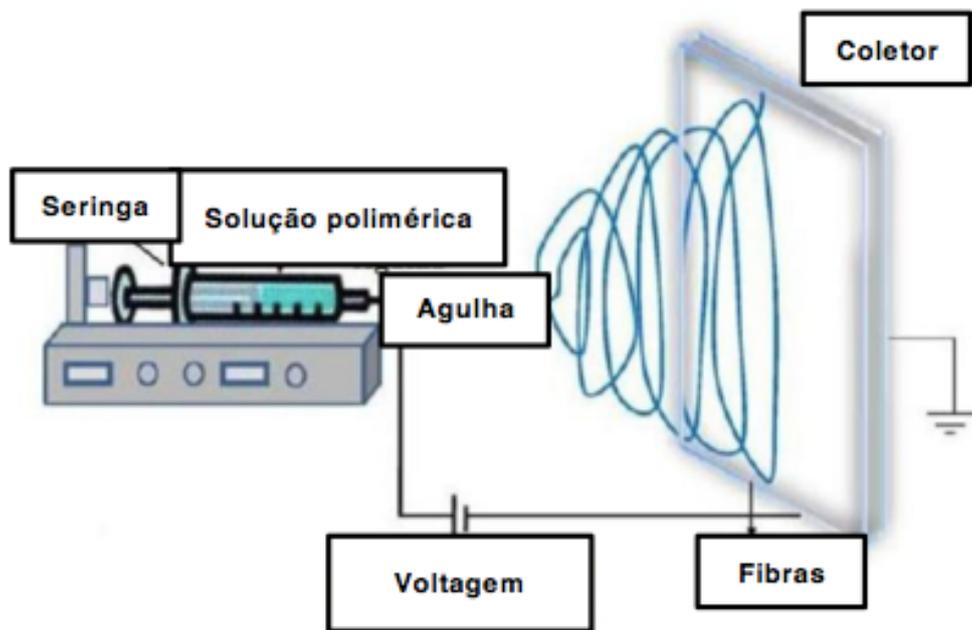


Figura 39- Representação esquemática do processo de electrospinning na configuração horizontal. Adaptado de [84].

Parâmetros operacionais importantes na síntese de fibras por electrospinning

A morfologia das fibras produzidas por electrospinning pode ser influenciada por vários parâmetros que devem ser controlados durante o processo. As superfícies das fibras fabricadas podem ser lisas ou conter poros. Dentre estes parâmetros destacam-se propriedades específicas da solução polimérica que se utiliza: viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica. Também existem parâmetros relativos ao processamento como a voltagem aplicada, a distância da agulha ao coletor e condições ambientais (umidade relativa) [84-86].

Os parâmetros descritos anteriormente são discutidos seguidamente:

- A) Viscosidade:** a viscosidade da solução pode ser alterada usando diferentes massas molares do polímero ou variando a concentração do mesmo em solução. A massa molar, está geralmente associada ao comprimento da cadeia polimérica que pode determinar a quantidade de entrelaçamentos no solvente, afetando assim a viscosidade da solução. Uma viscosidade baixa

provoca geralmente a formação de filamentos quebradiços. Aumentando a viscosidade da solução promove-se o aumento do diâmetro das fibras, visto que se aumenta o número de moléculas que passa simultaneamente pela agulha, gerando-se normalmente fibras mais resistentes e uniformes. No caso de uma viscosidade exageradamente elevada, a ejeção dos jatos de solução pode resultar muito dificultada. A viscosidade é, por isso, um parâmetro que necessita de rigoroso controlo no processamento por *electrospinning* [84].

- B) Tensão superficial:** No processamento por *electrospinning* para que haja formação de uma fibra é necessário que as cargas induzidas na solução polimérica superem a sua tensão superficial. Quando o jato se move em direção ao coletor, as cadeias poliméricas são afetadas, sofrendo estiramento, por um campo elétrico, no entanto existe uma elevada tensão superficial que tende a opor-se á força do campo, provocando a formação de grânulos indesejáveis na estrutura das fibras.
- C) Condutividade elétrica da solução:** Existem factores como o tipo de polímero e o solvente utilizado, que influenciam a condutividade elétrica da solução . No processamento por *electrospinning* a projeção do jato depende da habilidade da solução para carregar cargas que superem a tensão superficial da solução. A condutividade elétrica da solução tem de ser baixa o suficiente para que não ocorra a repulsão das cargas induzidas, fazendo com que o estiramento seja menor e com que o diâmetro das fibras seja maior, evitando a formação de grânulos no interior das fibras [84,85].
- D) Voltagem aplicada:** A voltagem aplicada é um dos parâmetros mais importantes no processamento pela técnica de *electrospinning*, uma vez que induz as cargas necessárias na solução, tornando o processo possível. Em principio, quanto maior for a voltagem aplicada durante o processo, menor será o diâmetro das fibras formadas, atendendo à maior ejeção do

polímero. Uma voltagem elevada provoca maior estiramento do jato, juntamente com uma evaporação do solvente mais rápida, o que pode favorecer a formação de aglomerados. Apesar da variação da voltagem influenciar o diâmetro das fibras, outros fatores poderão ter influência mais significativa que este parâmetro, como sejam a distância da agulha ao coletor e a concentração polimérica [84].

- E) Distância da agulha ao coletor:** A morfologia e diâmetro das fibras também depende da distância da agulha ao coletor, uma vez que é fundamental uma distância mínima entre estes dois componentes para que haja tempo das fibras sofrerem um processo de secagem antes de atingirem o coletor. Se esta distância for muito curta ou muito longa, poderá ocorrer a formação de aglomerados nas fibras [84].
- F) Condições ambientais (humidade relativa):** A temperatura e a humidade são duas condições ambientais que podem influenciar fortemente o processamento por *electrospinning*. A temperatura das soluções poliméricas afeta a viscosidade da solução, verificando-se geralmente que o aumento de temperatura produz um abaixamento da viscosidade. As variações de humidade afetam a formação das fibras porque influenciam as condições de evaporação do solvente. Se a humidade for muito baixa e se o solvente for volátil, a volatilização do solvente pode ocorrer de forma tão repentina que pode ocasionar problemas como entupimento da agulha, cessando o processo de formação de novas fibras [84,86].

Definidas as características desejáveis das fibras (diâmetro e morfologia) e sabendo o par polímero e solvente a ser empregado, todos estes parâmetros devem ser testados para se conhecer melhor a resposta de uma determinada solução polimérica à variação destes parâmetros. Só assim se consegue obter a estrutura das fibras desejada.

Anexo B

Protocolo Micro BCA

1) Preparação dos padrões BSA (Bovine Serum Albumin) diluídos:

- BSA : [BSA] = 200 μ g/ml
- Vfinal (H₂O + BSA) = 0.5 ml
- Vtotal (H₂O + WR + BSA) = 0.2ml

2) Preparação das diluições para a reta de calibração

Foram preparados 18 tubos com as concentrações de BSA apresentadas na tabela 10 e respectivos volumes adicionados.

Tabela 10 - Concentrações e volumes a adicionar para a preparação dos padrões diluídos de BSA.

[BSA] _f (μ g/ml)	V _i * (BSA) (μ l)
0	0
1	2.5
5	12.5
10	25
15	37.5
20	50

Após a preparação de cada tubo, foi adicionado a cada 500 μ l de água ultra pura e, de seguida, retirou-se o V_i de H₂O e adicionou-se o mesmo volume de BSA para se obter a concentração final ([BSA]_f).

3) Preparação do Wr (Work reagent)

Procedeu-se á preparação do Wr para ser adicionado aos tubos preparados anteriormente. Na preparação do Wr foram inseridos nos tubos os reagentes e respectivas quantidades apresentadas na tabela 11, pela ordem indicada.

Tabela 11 - Reagentes e respectivas quantidades a adicionar para a preparação do Wr.

Reagente	Quantidade
A	1ml
B	0.96ml
C	0.04ml

Preparação da amostra de colagénio (2 diluições)

Foram preparadas duas amostras, com diferentes diluições (10x e 100x), utilizando-se o colagénio puro previamente solubilizado em ácido acético.

Amostra diluída 10x – 10 μ l + 490 μ l PBS

Amostra diluída 100x – 10 μ l + 990 μ l PBS

4) Quantificação