



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

**Tese de doutorado**

**“Desenvolvimento e Avaliação ‘In Vitro’ de Membranas Compósitas de Quitosana, Álcool Polivinílico, Polietileno Glicol e Policaprolactona Triol com Adição de Nanopartículas de Vidro Bioativo para Regeneração Periodontal”**

**Autora: Sandhra Maria de Carvalho**  
**Orientadora: Profa. Marivalda de Magalhães Pereira**  
**Coorientadora: Profa. Maria de Fátima Leite**

**Março de 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Sandhra Maria de Carvalho

**“Desenvolvimento e Avaliação ‘In Vitro’ de Membranas Compósitas  
de Quitosana, Álcool Polivinílico, Polietileno Glicol e Policaprolactona  
Triol com Adição de Nanopartículas de Vidro Bioativo para  
Regeneração Periodontal”**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em:  
Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais  
Área de Concentração: Ciência dos Materiais  
Orientadora: Profa. Marivalda de Magalhães Pereira  
Coorientadora: Profa. Maria de Fátima Leite

**Belo Horizonte**  
**Escola de Engenharia da UFMG**

**2014**

## AGRADECIMENTOS

- Dedico esse trabalho a Deus que sempre me orienta no que faço.
- Aos meus pais Protilde '*In Memoriam*' e José pelo apoio e amor que sempre me deram.
- Ao meu marido Cícero pelo amor, carinho e compreensão. Obrigada por me apoiar em tudo que faço!
- À minha orientadora Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira pela confiança, oportunidade e amizade.
- À minha coorientadora Profa. Dra. Maria de Fátima Leite pelos ensinamentos, e principalmente pelo carinho e amizade.
- Á minha amiga Agda. Obrigada por me ajudar sempre!
- Á minha amiga Carolina, por tornar mais suave e alegre essa jornada.
- A todos os meus amigos da Engenharia Metalúrgica, especialmente, Joyce, Alexandra, Alessandra, Talita, Elke, Breno, Thaís, Cheisy, Cíntia, Bruna, Tadeu, Renata, Luísa, Dickson.
- A todos os meus amigos do laboratório de sinalização de Cálcio e do ICB em especial, Carla, Lídia, Lili, Erika A, Erika G, Camila Campos, André, Pedro, Rodrigo, Jessica, Núbia, Emerson, Taquinho, Gilson, Kelly, Camila Harlen.
- Aos professores do Instituto de Ciências Biológicas, que me ajudaram nesse trabalho me cedendo equipamentos para meus experimentos, especialmente ao Prof. Dr.Rodrigo Resende.
- Aos professores da Engenharia Metalúrgica que me ajudaram nesse trabalho me cedendo equipamentos para meus experimentos, especialmente ao Prof. Dr.Rodrigo Oréfice e Prof. Dr.Herman Mansur.
- Aos funcionários do DEMET: Andréia, Patrícia, Cida, Nelson, Hilda.
- Ao apoio financeiro da CNPQ e CAPES.

*'Tudo parece impossível até que seja feito'*

(Nelson Mandela)

## SUMÁRIO

	<b>Lista de Figuras</b>	<b>v</b>
	<b>Lista de Tabelas</b>	<b>viii</b>
	<b>Lista de notações</b>	<b>ix</b>
	<b>RESUMO</b>	<b>xii</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>xiv</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	Objetivo geral	<b>7</b>
<b>2.2</b>	Objetivos específicos	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	O Tecido Periodontal	<b>8</b>
<b>3.2</b>	Células Tronco do Tecido Periodontal	<b>9</b>
<b>3.3</b>	A Doença Periodontal	<b>10</b>
<b>3.4</b>	A Engenharia de Tecidos na Regeneração Periodontal	<b>12</b>
<b>3.5</b>	Fatores e Genes Associados com a Regeneração Periodontal	<b>15</b>
<b>3.6</b>	Vidro Bioativo	<b>17</b>
<b>3.7</b>	Nanocompósitos	<b>19</b>
<b>3.8</b>	Quitosana	<b>21</b>
<b>3.9</b>	Poli (álcool vinílico)	<b>24</b>
<b>3.10</b>	Hidrogéis	<b>25</b>
<b>3.11</b>	Estratégia para Reticulação de Hidrogéis	<b>26</b>
<b>3.12</b>	Degradação de Hidrogéis	<b>29</b>
<b>3.13</b>	Poli (etileno glicol)	<b>29</b>
<b>3.14</b>	Poli (caprolactona triol)	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Desenvolvimento de Membranas Compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL-T</b>	<b>32</b>
	<b>Contendo Nanopartículas de Vidro Bioativo Nanoparticulado</b>	
<b>4.1.1</b>	Obtenção do Vidro Bioativo Nanoparticulado pelo Método Stöber Modificado	<b>32</b>
<b>4.1.2</b>	Obtenção do Vidro Bioativo Nanoparticulado pelo Método Coprecipitação	<b>33</b>
<b>4.1.3</b>	Estratégia de Escolha das Membranas	<b>34</b>
<b>4.1.4</b>	Confecção das Amostras Escolhidas	<b>37</b>

<b>4.2</b>	<b>Caracterizações das membranas compósitas</b>	<b>37</b>
4.2.1	Análise Macroscópica das Membranas	37
4.2.2	Estudo Morfológico das Membranas por MEV	37
4.2.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho	38
4.2.4	Difração de Raios - X (DRX)	38
4.2.5	Ângulo de Contato	38
4.2.6	Ensaio Mecânicos	39
4.2.7	Análise Termogravimétrica	39
4.2.8	Ensaio de Degradação em Meio de Cultura Celular	39
4.2.9	Estudo da Bioatividade	40
<b>4.3.</b>	<b>Extração e Caracterização de Células do ligamento Periodontal Humano</b>	<b>41</b>
4.3.1	Cultura de Células do Ligamento Periodontal Humano	41
4.3.2	Crescimento Celular	42
4.3.3	Morfologia Celular	43
4.3.4	RT-PCR para genes de Tecido Periodontal	43
<b>4.4</b>	<b>Análise do Comportamento de Células do Ligamento Periodontal Humano em Contato Direto com Nanopartículas de Vidro Bioativo Produzidas pelo Método Stöber</b>	<b>45</b>
4.4.1	Ensaio de Citotoxicidade com resazurina	45
4.4.2	Proliferação celular (BrdU)	46
4.4.3	Atividade da Fosfatase Alcalina	46
<b>4.5</b>	<b>Análise do Comportamento de Células do Ligamento Periodontal Humano em Contato com as Membranas Compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL Contendo Nanopartículas de Vidro Bioativo pelo Método Coprecipitação</b>	<b>47</b>
4.5.1	Ensaio de Proliferação Celular com VBNP em contato direto	47
4.5.2	Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina	48
4.5.3	Proliferação Celular pó BrdU	48
4.5.4	Atividade fosfatase alcalina	49
4.5.5	Morfologia das Células PDLH nas Membranas Compósitas	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterizações das Membranas Compósitas</b>	<b>51</b>
5.1.1	Análise Macroscópica das Membranas	51
5.1.2	Estudo morfológico das Membranas por MEV	51

5.1.3	Espectroscopia na região do infravermelho	52
5.1.4	Difração de RX (DRX)	58
5.1.5	Ângulo de Contato	58
5.1.6	Ensaio Mecânicos	59
5.1.7	Análise Termogravimétrica	62
5.1.8	Ensaio de degradação em meio de cultura celular	66
5.1.9	Estudo da Bioatividade	76
5.2	<b>Caracterização de Células do Ligamento Periodontal Humano</b>	79
5.2.1	Crescimento Celular	79
5.2.2	Morfologia Celular	79
5.2.3	RT-PCR para Genes de tecido Periodontal	80
5.3	<b>Análise do comportamento de células do ligamento periodontal humano em contato Direto com nanopartículas de vidro bioativo Produzidas pelo Método Stöber</b>	81
5.3.1	Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina	81
5.3.2	Proliferação Celular por (BrdU)	82
5.3.3	Atividade da fosfatase alcalina	83
5.4	<b>Análise do comportamento de células do ligamento periodontal humano em contato com as membranas compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL contendo nanopartículas de vidro bioativo Produzidas pelo Método Coprecipitação</b>	83
5.4.1	Ensaio de proliferação e morfologia celulares com VBNP	83
5.4.2	Ensaio de Citoxidade com Resazurina	84
5.4.3	Proliferação Celular por BrdU	85
5.4.4	Atividade da Fosfatase Alcalina	86
5.4.5	Morfologia das Células PDLH nas Membranas Compósitas	88
6	<b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b>	90
7	<b>CONCLUSÕES</b>	104
8	<b>TRABALHOS FUTUROS</b>	105
9	<b>TRABALHOS PUBLICADOS SOBRE ESSE TEMA</b>	106
10	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	111
11	<b>APÊNDICE I</b>	134
12	<b>APÊNDICE II</b>	136
13	<b>APÊNDICE III</b>	137

## LISTA DE FIGURAS

<b>3.1</b>	Esquema do tecido periodontal	<b>8</b>
<b>3.2</b>	Tecido periodontal com gengivite	<b>11</b>
<b>3.3</b>	Doença periodontal	<b>11</b>
<b>3.4</b>	Esquema de possíveis fontes doadoras de células	<b>13</b>
<b>3.5</b>	Desenho esquemático da formação de hidroxiapatita	<b>18</b>
<b>3.6</b>	Imagens de vidro bioativo nanoparticulado	<b>20</b>
<b>3.7</b>	Estrutura química da quitina e quitosana	<b>22</b>
<b>3.8</b>	Estrutura química do Poli (álcool vinílico)	<b>24</b>
<b>3.9</b>	Classificação de hidrogéis com base na natureza da rede polimérica	<b>26</b>
<b>3.10</b>	Classificação de hidrogéis de quitosana	<b>28</b>
<b>3.11</b>	Desenho esquemático das possíveis ligações químicas entre a quitosana, poli (álcool vinílico), poli (etileno glicol), poli (caprolactona) triol e o vidro bioativo nanoparticulado	<b>28</b>
<b>3.12</b>	Estrutura química do PEG	<b>30</b>
<b>3.13</b>	Abertura do anel da $\epsilon$ -caprolactona formando o PCL-T	<b>31</b>
<b>4.1</b>	Ilustração do esquema da síntese do VBNP Stöber	<b>33</b>
<b>4.2</b>	Ilustração do esquema da síntese do VBNP pelo método coprecipitação	<b>34</b>
<b>5.1</b>	Análise macroscópica das membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de VBNP	<b>51</b>
<b>5.2</b>	Estudo morfológico das membranas por MEV	<b>52</b>
<b>5.3</b>	Espectro de FTIR da Quitosana	<b>53</b>
<b>5.4</b>	Espectro de FTIR do Poli (álcool vinílico)	<b>54</b>
<b>5.5</b>	Espectro de FTIR do Poli (etileno glicol)	<b>55</b>
<b>5.6</b>	Espectro de FTIR da Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) triol	<b>55</b>
<b>5.7</b>	Espectro de FTIR do vidro bioativo nanoparticulado	<b>56</b>
<b>5.8</b>	FTIR das amostras compósitas	<b>57</b>
<b>5.9</b>	Difratogramas das membranas compósitas	<b>58</b>
<b>5.10</b>	Análise do ângulo de contato	<b>59</b>
<b>5.11</b>	Curvas Tensão x Deformação das membranas	<b>60</b>
<b>5.12</b>	Módulo de elasticidade das membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado	<b>61</b>
<b>5.13</b>	Tensão máxima das membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de VBNP	<b>61</b>

<b>5.14</b>	Deformação total das membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de VBNP	<b>62</b>
<b>5.15</b>	Curva de TG e DTG da amostra com 0% de vidro bioativo nanoparticulado	<b>63</b>
<b>5.16</b>	Curva de TG e DTG da amostra com 5% de vidro bioativo nanoparticulado	<b>64</b>
<b>5.17</b>	Curva de TG e DTG da amostra com 10% de vidro bioativo nanoparticulado	<b>65</b>
<b>5.18</b>	Curva de decomposição térmica TG das membranas compósitas	<b>65</b>
<b>5.19</b>	Derivada curva de perda massa DTG das membranas compósitas	<b>66</b>
<b>5.20</b>	Curva de degradação das amostras das membranas compósitas	<b>67</b>
<b>5.21</b>	Ensaio de degradação painel I	<b>68</b>
<b>5.22</b>	Ensaio de degradação painel II	<b>68</b>
<b>5.23</b>	Ensaio de degradação painel III	<b>69</b>
<b>5.24</b>	Análise EDS após vinte e quatro horas em PBS das membranas compósitas	<b>70</b>
<b>5.25</b>	Análise EDS após sete dias em DMEM	<b>71</b>
<b>5.26</b>	Análise EDS após vinte e um dias em DMEM	<b>72</b>
<b>5.27</b>	Ensaio de degradação. Microfotografias da região de deposição de sais da amostra com 10% de vidro bioativo	<b>73</b>
<b>5.28</b>	Análise EDS qualitativa da região de deposição de sais da amostra com 10% de	<b>74</b>
<b>5.29</b>	Análise DRX das membranas compósitas	<b>74</b>
<b>5.30</b>	Espectro de FTIR de todas as amostras	<b>75</b>
<b>5.31</b>	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura	<b>76</b>
<b>5.32</b>	Análise EDS após sete dias de imersão em SBF	<b>77</b>
<b>5.33</b>	Análise DRX das membranas compósitas	<b>78</b>
<b>5.34</b>	Crescimento celular medido pelo ensaio Azul de Trypan das células PDLH após três dias de cultura.	<b>79</b>
<b>5.35</b>	Morfologia celular de células do ligamento periodontal humano	<b>80</b>
<b>5.36</b>	RT-PCR para genes do ligamento periodontal humano e de células tronco	<b>81</b>
<b>5.37</b>	Ensaio de resazurina após setenta e duas horas de contato direto	<b>82</b>
<b>5.38</b>	Ensaio de proliferação por BrdU após três dias de contato direto	<b>82</b>
<b>5.39</b>	Atividade da ALP após sete dias de contato direto	<b>83</b>
<b>5.40</b>	Ensaio de Feulgen	<b>84</b>
<b>5.41</b>	Ensaio de resazurina após setenta e duas horas de contato com as membranas	<b>85</b>
<b>5.42</b>	Ensaio de resazurina após sete dias de contato com as membranas	<b>85</b>
<b>5.43</b>	Ensaio de proliferação por BrdU após três dias de contato com as membranas	<b>86</b>
<b>5.44</b>	Atividade da ALP após três dias	<b>87</b>

<b>5.45</b>	Atividade da ALP após sete dias	<b>88</b>
<b>5.46</b>	Morfologia das células PDLH	<b>89</b>
<b>6.1</b>	Desenho esquemático do efeito da diferença de concentração das nanopartículas de vidro bioativo	<b>95</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>4.1</b>	Composições das membranas compósitas	<b>36</b>
<b>4.2</b>	Oligonucleotídeos primers RT-PCR para os genes Periostin, COL $\alpha$ I, OC, ALP, CD166, CD105, RUNX2, F-Spondin, GAPDH	<b>44</b>
<b>5.1</b>	Valores de Tensão máxima de tração, Deformação Específica, Módulo de Elasticidade e Respectiveos Desvios Padrão para amostra com 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado	<b>60</b>
<b>5.2</b>	Índice de degradação das amostras com 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado em função do tempo	<b>67</b>
<b>6.1</b>	Desenho esquemático do efeito da diferença de concentração das nanopartículas de vidro bioativo	<b>95</b>

**LISTA DE NOTAÇÕES**

- (ALP) - Fosfatase alcalina
- (ACP) - Fosfato de Cálcio Amorfo
- (BrdU) - Bromodeoxiuridina (BrdU)
- (MSC) - *Mesenchymal stem cells*
- (CP23) - Proteína derivada do cimento
- (COL  $\alpha$  I) - Colágeno tipo  $\alpha$  I
- (cDNA) - Ácido desoxirribonucléico complementar
- (DMEM) - Meio mínimo essencial Dulbecco
- (DRX) - Difração de raios X
- (DNA) - Ácido desoxirribonucléico
- (DP) - Doença periodontal
- (ECM) - Matriz extracelular
- EDS - *Electron Dispersive Spectrometry*
- (EFSA) - *European Food Safety Authority*
- (FTIR) - *Fourier Transformed Infrared*
- (FDA) - *Food and Drug Administration*
- (GD) - Grau de desacetilação
- (GA) - Glutaraldeído
- (g) - Gravidade(s) força
- (GT) - Giga/ toneladas
- (GAPDH) - Gliceraldeido 3 fosfato de-hidrogenase

(HA) - Hidroxiapatita

(ID) - Índice de degradação

(ICDD) - *International Centre for Diffraction Data*

(LP) - Ligamento Periodontal

(LPpd) - Ligamento periodontal propriamente dito

(EMD) - Matriz derivada do esmalte

(MEV) - Microscopia eletrônica de varredura

(MW) - Massa molar

(MSC) - *mesenchymal stem cells*

(mg) - Miligra(s)

(mL) - Mililitro

(Mm) - Milimolar

( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) - Micrograma(s) por mililitro

( $\mu\text{L}$ ) - Microlitro(s)

( $\mu\text{m}$ ) - Micrômetro(s)

( $\mu\text{M}$ ) - Micromolar

(nm) - Nanômetros

(nM) - Nanomolar

(OP) - Osteopontina

(OC) - Osteocalcina

(PDLH) - Células do ligamento periodontal humano

(PDLSCs) - Células tronco do tecido periodontal

(PBS) - Solução tampão fosfato

(PCR) - Reação em cadeia da polimerase

- (PVA) - Álcool polivinílico
- (PEG) - Poli etileno glicol
- (PCL-T)- Poli (caprolactona) triol
- (p/v) - Peso/volume
- (QUI) - Quitosana
- (RNA) - Ácido ribonucléico
- (RUNX2) - Fator de transcrição relacionada a Runt-2
- (rpm) - Rotações por minuto
- (SG) - Sol gel
- (SFB) - Soro fetal bovino
- (STRO) - *Mesenchymal stem cell marker*
- (TGF $\beta$ ) - Fator de transformação e crescimento beta
- (TEOS) - Tetraetil orto-silicato
- (TEP) - Trietil fosfato
- (UV) - Ultra violeta
- (VB) - Vidro bioativo
- (VBs) - Vidros bioativos
- (VBNP) - Vidro bioativo nanoparticulado
- (W) - Watt(s)

## RESUMO

Várias doenças afetam a integridade do tecido periodontal causando a destruição do tecido conjuntivo e das células. O objetivo da regeneração periodontal é a restauração do periodonto à sua forma e função originais. A engenharia de tecidos usando células do ligamento periodontal humano (PDLH) cultivadas em membranas compostas de polímeros e vidro bioativo (VB) é uma possível estratégia. Sabe-se que o efeito do VB pode ser aumentado em escala nanométrica. As preparações de membranas com base em quitosana (QUI) com outros biomateriais, tais como o álcool polivinílico (PVA), polietileno glicol (PEG), policaprolactona triol (PCL-T) e as nanopartículas de vidro bioativo (VBNP) podem ser promissoras em relação às propriedades mecânicas, proliferação celular e particularmente a adesão celular. Com esse objetivo, nesse trabalho, células PDLH foram extraídas de dentes com indicação ortodôntica para extração. Observou-se a expressão de periostin, osteocalcina (OC), fosfatase alcalina (ALP), colágeno  $\sigma$  I (COL  $\alpha$  I), F-Spondin, CP-23 e fator de transcrição relacionado a Runt- 2 (RUNX2) através de RT-PCR. Além disso, as células expressaram os marcadores de células-tronco CD105 e CD166. Em uma segunda etapa, foram desenvolvidas membranas compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL-T com adição de 0%, 5% e 10% de VBNP. As amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raio X (DRX), ensaios mecânicos, ângulo de contato, ensaio de degradação e bioatividade "in vitro". As membranas com adição de 5% e 10% de VBNP apresentaram aumento significativo da resistência mecânica e diminuição do ângulo de contato. Além disso, houve um aumento significativo na viabilidade celular, proliferação celular e atividade de ALP em células HPDL quando em contato com as amostras contendo VBNP. Os resultados acima indicam que é possível estabelecer uma cultura celular primária a partir de células do ligamento periodontal humano e que provavelmente existem células-tronco mesenquimais nessa cultura. Além disso, sugerem que a introdução de VBNP acrescenta características interessantes nas membranas compósitas criando um adequado ambiente para o cultivo e proliferação de células PDLH, o que, representa um passo promissor para o desenvolvimento de melhores biomateriais para a regeneração periodontal.

Palavras chave: *Regeneração Periodontal, Nanopartículas de Vidro Bioativo, quitosana.*

## ABSTRACT

Several diseases affect the integrity of periodontium causing the destruction of the connective tissue and cells. The biologic goal of periodontal regeneration is restoration of the periodontium to its original form and function. Tissue engineering using human periodontal ligament cells (HPDL) cultured on composite membranes polymer and bioactive glass (BG) is a possible strategy. It is known that the effect of BG can be enhanced in the nanoscale. Preparations of membranes based on chitosan (CHI) with other biomaterials such as polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene glycol (PEG), polycaprolactone triol (PCL-T) and bioactive glass nanoparticles (BGNP) may be promising regarding mechanical properties, cell proliferation and particularly cell adhesion. For this purpose, in this work, HPDL cells were extracted of teeth with orthodontic indication for extraction. It was observed the expression of periostin, osteocalcin (OC), alkaline phosphatase (ALP), collagen  $\sigma$  I (COL I  $\alpha$ ), F-Spondin and RUNX2 by RT-PCR. In addition, the cells expressed stem cell markers CD105 and CD166. In a second stage, composite membranes CHI / PVA / PEG with the addition of 0%, 5% and 10% of VBPN were developed. The samples were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), diffraction of x-ray (XRD), mechanical tests, contact angle, degradation assay and bioactivity test "*in vitro*". Samples with the addition of 5% and 10% VBPN showed a significant increase in strength and decrease in contact angle. Also, there was a significant increase in cell viability, cell proliferation and ALP activity in HPDL cells when in contact with composite membranes containing VBPN. The results described above indicate that it is possible to establish a primary cell culture from human periodontal ligament cells and mesenchymal stem cells probably exist in this culture. Moreover, they suggest that the introduction of VBPN added interesting characteristics in composite membranes creating a suitable environment for the culture and proliferation of cells HPDL, which is a promising step for the development of improved biomaterials for periodontal regeneration.

Keywords: *Periodontal Regeneration, Bioactive glass nanoparticles, chitosan*

## 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é caracterizada por uma inflamação que leva a destruição das estruturas de suporte dos dentes e é a principal causa da perda do elemento dentário. Dados científicos evidenciam a conexão entre as periodontites com o surgimento e agravamento de outras doenças sistêmicas [1-3]. A DP é um caso de saúde pública e o desenvolvimento de terapias efetivas para o tratamento e regeneração do tecido periodontal é uma das metas da comunidade científica na área odontológica [4].

Um dos desafios na terapia regenerativa periodontal é a dificuldade de induzir a regeneração de um complexo aparato composto de tecidos mineralizados como o osso, cemento e de tecidos moles como gengiva e ligamento periodontal. A perda de um desses tecidos pode levar ao comprometimento da função e à perda do elemento dentário [5;6]. Apesar de vários avanços na terapia periodontal, uma completa regeneração das diversas estruturas que compõem o periodonto ainda é impossível [5;7].

A regeneração ideal do tecido periodontal requer a restauração dos tecidos duros e moles na sua arquitetura e funcionalidade. Atualmente existem vários estudos direcionados para a terapia periodontal como a regeneração tecidual guiada, terapia celular, aplicação de fatores de crescimento e proliferação celular. Essas pesquisas também demonstram que o tipo de células que proliferam nas lesões periodontais é que determina se haverá cicatrização ou regeneração. Quando células progenitoras mesenquimais proliferam pode ocorrer uma regeneração coordenada de tecido ósseo, cemento e ligamento periodontal (LP) [8]. Porém, se houver proliferação de células do epitélio oral, fibroblastos ou osteoblastos pode haver crescimento do epitélio juncional, reabsorção óssea ou anquilose respectivamente [7].

Estudos sugerem que o LP consiste de diferentes células em estágios variados e que algumas dessas células quando necessário, podem se diferenciar em cementoblastos, osteoblastos ou fibroblastos do LP [9]. Algumas dessas células exibem características de células estaminais mesenquimais como: (i) potencial de auto renovação e (ii) capacidade de diferenciação em várias linhagens [10]. Esses dados sugerem a importância das células progenitoras mesenquimais do LP na regeneração do tecido periodontal lesionado. Portanto a criação de modelos de estudos envolvendo células do

tecido periodontal sinaliza como uma importante ferramenta para o entendimento de mecanismos para a regeneração periodontal.

Desde que Seo e colaboradores em 2004 isolaram com sucesso células tronco do tecido periodontal ( PDLSCs ) a partir de terceiros molares impactados, muitas pesquisas têm sido realizadas nessa área [10;11]. PDLSCs são consideradas células tronco mesenquimais por causa de sua morfologia, fenótipo e caráter proliferativo, além disso, PDLSCs expressam marcadores de superfície de células tronco, tais como CD73, CD105, CD90, CD45, CD14, CD166 entre outros. Células tronco mesenquimais do tecido periodontal têm demonstrado capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos, condrócitos e células neurais '*In Vitro*' [12]. Entretanto, os mecanismos biomoleculares que comandam a diferenciação dessas células ainda continuam obscuros.

Baseada na teoria contemporânea da engenharia de tecidos, a regeneração periodontal depende de quatro elementos críticos: (i) células; (ii) suporte de um biomaterial; (iii) sinalização molecular adequada e (iv) irrigação sanguínea [13;14]. A área odontológica vem desenvolvendo inúmeros projetos na área da engenharia de tecidos principalmente utilizando cultivos celulares e o desenvolvimento de biomateriais. Isso se justifica já que a perda do elemento dentário pode acarretar problemas como movimento dos dentes remanescentes, dificuldade na fonação e na mastigação, desequilíbrio na musculatura, comprometimento da estética, que pode levar a perda da autoestima [15].

Por essas razões, vários biomateriais têm sido investigados para a utilização na engenharia de tecidos. Alguns destes materiais são denominados matrizes, que são dispositivos utilizados como suportes que promovem a proliferação e o crescimento celulares, fornecendo um ambiente estável ao cultivo celular [16]. Estas matrizes devem sustentar o crescimento celular, e apresentarem propriedades mecânicas condizentes com o tecido a ser reconstruído, induzir respostas celulares mais rápidas ou ainda possuírem intrinsecamente propriedades diretamente relacionadas com a remodelagem dos tecidos vivos [17].

Nos últimos anos, a pesquisa de biomateriais funcionais tem sido dirigida para o desenvolvimento de matrizes. Neste sentido, uma atenção considerável tem sido dada para os biomateriais à base de quitosana (QUI). Este polímero tem sido amplamente

estudado para aplicações industriais baseadas na formação de filmes, fibras e nos estudos de suas propriedades biológicas e mecânicas. A QUI é um polímero obtido principalmente a partir da desacetilação alcalina da quitina a qual é um dos principais constituintes das conchas de crustáceos, dos exoesqueletos de insetos e da parede celular de alguns fungos onde fornece resistência e estabilidade [18-21]. Ela tem propriedades interessantes para aplicação em engenharia de tecidos tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, acelera a recuperação de lesões, reduz o nível do colesterol sanguíneo, estimula os efeitos do sistema imunológico, além de ter se mostrado um composto bacteriostático e fungistático, bem como, os produtos de sua degradação, as glicosaminas, não serem tóxicas em organismos vivos [22].

Na área odontológica, a QUI foi apresentada primeiramente na forma de gel, obtida a partir de diferentes granulações e concentrações do pó da quitosana, e passou-se a avaliar a possibilidade de sua utilização em sítios cirúrgicos ou em terapia periodontal não cirúrgica [23]. Os polímeros de QUI vêm sendo testados com sucesso no tratamento de lesões ósseas periodontais e defeitos ósseos, sucesso esse representado pela neoformação óssea observada histologicamente ou ainda por parâmetros clínicos, como profundidade de sondagem e sangramento à sondagem [24].

Possíveis preparações de matrizes à base de QUI com outros biomateriais, tais como o álcool polivinílico (PVA), polietileno glicol (PEG), policaprolactona triol (PCL-T), colágeno, gelatina, hidroxiapatita (HA) e vidro bioativo (VB) podem ser promissores com relação às propriedades mecânicas e de adesão celular. Uma possível alternativa para se produzir filmes à base de QUI com melhores propriedades pode ser a mistura com polímeros sintéticos como, por exemplo, o PVA. Este é um polímero sintético, não tóxico, solúvel em água, que possui excelente propriedade formadora de filme, além de apresentar excelente transparência, consistência macia quando na forma de membrana. [21;25].

Um grande desafio em relação à QUI consiste em obter um material que resista de forma controlada à degradação em ambiente fisiológico. Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e variar a taxa de degradação deste polissacarídeo utiliza-se a mistura da mesma com reticulantes químicos; que permitem a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal, favorecendo a obtenção de redes [26]. O

glutaraldeído é um agente reticulante normalmente usado na formação de redes de polipeptídios e proteínas devido à reatividade dos grupos aldeídos [27]. Entretanto, sua utilização é muito questionada em relação a sua toxicidade para aplicações biomédicas.

Uma alternativa para substituição de reticulantes químicos é a utilização de polímeros tais como PCL-T e PEG, que têm grupos hidroxila na sua composição e quando adicionados à rede de hidrogel da quitosana são capazes de atuar como agentes de reticulação física e / ou química, através da formação de ligações de hidrogênio e através de ligações covalentes respectivamente. PCL-T e PEG são materiais biocompatíveis e têm sido utilizados em vários produtos aprovados pela *Food and Drug Administration (FDA)*. O PEG é um poliéter flexível, não iônico, e hidrofílico. Este polímero é comumente usado em uma ampla gama de formulações intravenosas humanas, sendo considerado imunologicamente seguro, pois é eliminado do corpo intacto pelos rins. PCL-T é um poliéster semelhante à poli ( $\epsilon$ -caprolactona), entretanto sua massa molar é mais baixa e os três grupos hidroxilas terminais conferem maior caráter hidrofílico a este polímero, tornando-o um bom candidato a agente plastificante. Vários testes '*In vitro*' e '*In vivo*' da sua biocompatibilidade foram realizados, resultando em aprovação pela *FDA* [28].

Outra opção, para melhoria das propriedades físicas e biológicas de filmes de QUI é a introdução de uma fase bioativa utilizando vidro bioativo nanoparticulado (VBNP). Os vidros bioativos (VBs) desenvolvidos nas últimas décadas têm apresentado interessantes propriedades principalmente quando aplicados como alternativa para reparo de partes de tecidos mineralizados. Eles são diversamente utilizados, tanto experimentalmente quanto clinicamente em reconstituições de defeitos ósseos e têm demonstrado estimular a osteogênese [29-32]. Estudos '*In Vitro*' indicam que os VBs são biocompatíveis e bioativos. '*In Vivo*' sua habilidade em se unir ao tecido ósseo é atribuída à formação de uma camada de HA carbonatada sobre a superfície do vidro em contato com fluidos corpóreos e durante a cristalização dessa camada pode ocorrer a mineralização de fibras colágenas, promovendo dessa forma uma firme união entre a interface osso e biomaterial [32;33].

Outra importante característica dos VBs é que quando em contato com fluidos corpóreos ou em soluções fisiológicas eles rapidamente liberam silício, devido a trocas

iônicas com  $H^+$  e  $H_3O^+$ , causando alcalinização do meio. A alteração na concentração de  $H^+$  pode influenciar profundamente o metabolismo celular, pois ocorre um aumento do pH do meio, o que no caso dos osteoblastos e cementoblastos parece ser favorável, pois pesquisas demonstraram aumento da proliferação celular [34-37].

Portanto a introdução de uma fase bioativa utilizando VB em membranas de QUI levando a obtenção de um material compósito pode significar uma proposta promissora para a engenharia de tecidos. Uma alternativa para a introdução da fase bioativa seria na forma de partículas de tamanho nanométrico. Tem sido demonstrado que materiais em nanoescala apresentam uma maior biocompatibilidade e bioatividade [38]. Vários estudos relatam novos sistemas baseados em compósitos biopoliméricos contendo VBNP [38-41]. O aumento da área de superfície específica e volume de poros do vidro bioativo podem acelerar o processo de deposição de HA [42;43].

Considerando que a caracterização de células PDLH e células tronco mesenquimais podem representar novos modelos de estudo dos mecanismos biomoleculares da regeneração periodontal, considerando também que o desenvolvimento de novos materiais e aprimoramento dos já existentes são ferramentas auxiliares importantes para o tratamento de lesões periodontais; o presente trabalho envolveu uma metodologia multidisciplinar entre os Departamentos de Engenharia Metalúrgica e de Materiais e o Departamento de Biofísica e Fisiologia da UFMG.

Dentro deste contexto duas metas motivaram esse trabalho; (i) estabelecimento de protocolo para extração de células PDLH, caracterização e confirmação da presença de células tronco no tecido periodontal; (ii) desenvolvimento e caracterização de uma membrana compósita de QUI / PVA / PEG / PCL-T contendo VBNP, que servisse de matriz para o desenvolvimento de células tronco e células PDLH. Com os resultados obtidos nesse trabalho será possível modular vários parâmetros inerentes ao desenvolvimento das membranas como; degradação, bioatividade, resistência mecânica, análise térmica e hidrofília. Além disso, será possível modular respostas celulares como viabilidade, proliferação, adesão, diferenciação celular e atividade da fosfatase alcalina, que são parâmetros importantes para a utilização dessas matrizes na engenharia de tecidos periodontais, o que ressalta o caráter inovador desse trabalho.

Nesse trabalho em uma primeira etapa foram desenvolvidas membranas compósitas de QUI, PVA, PEG, PCL-T contendo 0%, 5% e 10% de VBNP. Essas membranas foram caracterizadas por MEV, FTIR, DRX, ensaio de tração, comportamento térmico, ângulo de contato, ensaio de degradação e estudo da bioatividade.

Na segunda etapa foram realizadas a extração e cultura de células do ligamento periodontal de dentes humanos com indicação ortodôntica de extração e posterior caracterização por RT-PCR de genes típicos do ligamento periodontal e também de genes marcadores de células tronco mesenquimais periodontais. Na terceira etapa para avaliar o comportamento das células do ligamento periodontal em contato com as membranas desenvolvidas foram utilizadas diferentes técnicas de caracterização citoquímica como viabilidade celular por ensaio de resazurina, proliferação celular por BrdU, técnica histoquímica de Feulgen e ensaio da atividade da fosfatase alcalina.

As variações em relação à maneira de obtenção e caracterização das células do LP e dos tipos de biomateriais pesquisados faz com que os resultados encontrados nos diferentes estudos de engenharia tecidual na área periodontal não sejam tão esclarecedores. Além disso, observa-se que, até o presente momento, a caracterização das células previamente à implantação nos defeitos periodontais não é uma prática comum em todos os trabalhos. Portanto, torna-se necessário a realização de mais estudos no sentido de se fundamentar o real potencial regenerativo desta nova terapia periodontal baseada em células e biomateriais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2. 1. Objetivo Geral**

Desenvolver e caracterizar fisicamente, quimicamente, mecanicamente e biologicamente membranas poliméricas e compósitas desenvolvidas para a colonização com células do ligamento periodontal humano.

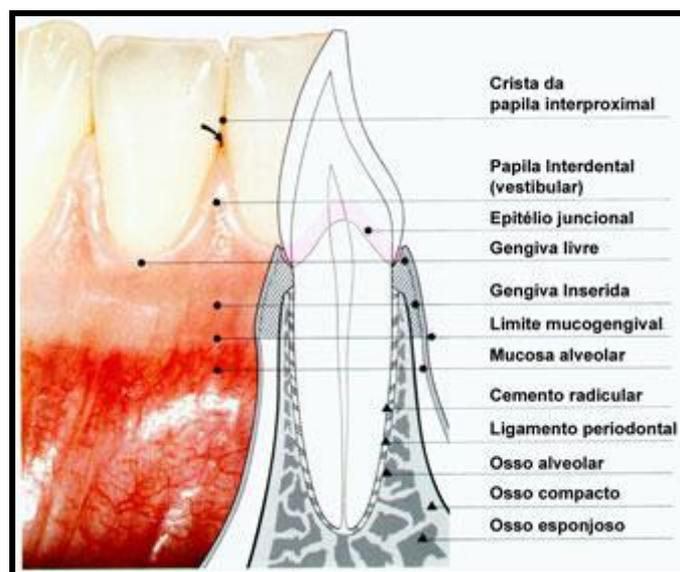
### **2. 2. Objetivos Específicos**

- Desenvolver membranas compósitas com composição, flexibilidade e resistência adequadas para o cultivo e futuro implante de células do ligamento periodontal humano.
- Desenvolver um sistema polimérico de quitosana / PVA / PEG / PCL-T usando nanopartículas de vidro bioativo como fase de reforço
- Caracterizar fisicamente, quimicamente e mecanicamente as membranas desenvolvidas.
- Desenvolver protocolo para o cultivo de células do ligamento periodontal humano (PDLH).
- Analisar a presença de marcadores de células estaminais mesenquimais na cultura de células PDLH.
- Analisar o comportamento de células PDLH em contato com as membranas desenvolvidas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. O Tecido Periodontal

O periodonto é classificado de acordo com características morfofuncionais: o periodonto de proteção que compreende o tecido gengival epitelial e conjuntivo; periodonto de sustentação formado pelo tecido ósseo chamado de osso alveolar; LP formado por fibras colágenas em diferentes direções e o cimento (Figura 3.1).



**Figura 3. 1.** Esquema do tecido periodontal (adaptado de soluções.em.odontologia.com.br).

O ligamento periodontal propriamente dito (LPpd) é uma linha que varia aproximadamente de 0,15 a 0,38mm de espessura entre o cimento e o osso alveolar e possui o importante papel de absorver o impacto de forças durante a mastigação [44]. LPpd é formado por feixes de fibras conectivas e possui vários tipos celulares como: (i) fibroblastos; (ii) osteoblastos; (iii) células endoteliais; (iv) células nervosas; (v) cementoblastos; (vi) células estaminais mesenquimais e (vii) osteoclastos. Geralmente todas as células acima citadas são chamadas de células PDL e é através dessas células que o ligamento periodontal mantém o suporte entre o dente através do cimento e o osso alveolar [45-47]. Os osteoblastos e osteoclastos são encontrados no lado ósseo alveolar do tecido periodontal e os cementoblastos e os restos epiteliais de Malassez na região radicular do dente [48;49]. Células endoteliais criam uma rica rede de vascularização e são encontradas através do tecido periodontal juntamente com fibroblastos, macrófagos, células nervosas e células tronco [50].

### 3. 2. Células tronco do Tecido Periodontal

As células estaminais adultas estão distribuídas em vários tecidos adultos e são responsáveis pela renovação dos tecidos vivos após injúrias, doenças ou envelhecimento [51]. Além disso, possuem capacidade de autorenovação, viabilidade duradoura e potencial multilinhagem, ou seja, se diferenciam em qualquer tipo celular especializado. O corpo humano armazena vários tipos de células progenitoras. Estas células estão presentes em uma variedade de tecidos durante o seu desenvolvimento e podem ser divididas em três grandes grupos: células tronco embrionárias, hematopoiéticas e mesenquimais. As células tronco mesenquimais (*MSC*- do inglês *mesenchymal stem cells*) estão presentes em uma variedade de tecidos durante o desenvolvimento e, em adultos, elas prevalecem na medula óssea [52-54]. Estas células podem ser isoladas, expandidas em cultura e estimuladas para se diferenciarem em osso, cartilagem, músculo, tendões, gordura e uma variedade de outros tecidos conectivos [52;53;55].

As células tronco também estão presentes no tecido periodontal e são requisitadas para a regeneração das estruturas periodontais em resposta a alterações como ferimentos, periodontites e movimentações ortodônticas [10;56;57]. Estudos recentes demonstraram que células PDLH têm a capacidade de se diferenciarem em cementoblastos e osteoblastos ‘*in vitro*’ e de regeneração periodontal ‘*in vivo*’[10]. Além disso, elas exibiram a morfologia de fibroblastos periodontais e expressaram CD90, CD29, C44, CD166, CD105 e CD13 que são identificados como precursores do estroma da medula óssea [58;59]. Portanto células PDLH demonstram propriedades de células tronco mesenquimais [56;60].

Células progenitoras que podem contribuir para a reconstrução do periodonto perdido têm sido associadas com a região paravascular do ligamento periodontal [9]. Estas células exibem características das *MSC*, como auto renovação e capacidade de diferenciação de multi-linhagens [6;10].

Nagatomo e colaboradores (2006) isolaram células do ligamento periodontal de pré-molares e terceiros molares extraídos de humanos a fim de verificar as propriedades de renovação, multiplicação e expressão de marcadores dessas células. Análise revelou que essas células expressavam marcadores de células tronco CD105, CD166, e STRO-1.

Esses resultados sugerem que as células do ligamento periodontal incluem células tronco mesenquimais juntamente com outras células progenitoras [61].

Gay e colaboradores (2007) agruparam células de ligamento periodontal de diversos pacientes, isolaram MSC do LP por citometria de fluxo pelo marcador STRO-1 e avaliaram a capacidade de diferenciação 'in vitro' em linhagem osteoblástica / cementoblástica destas células comparando-as com uma população de MSC da medula óssea pela coloração de vermelho de Alizarina após 48 dias de indução osteogênica. Os autores observaram que a coloração nas células do LP estava isolada em grupamentos celulares, enquanto a coloração nas da medula apresentava-se mais difusa em todas as células cultivadas. Diante deste resultado, os autores sugeriram que tal diferença pudesse ser decorrente da população de MSC do LP isolada para o marcador STRO-1 por citometria de fluxo ser uma população heterogênea enriquecida com MSC ou que a população do LP estivesse em diferente estágio de comprometimento de diferenciação quando comparados com as da medula [62].

Fujii e colaboradores (2008) isolaram e cultivaram três linhagens celulares que expressavam os marcadores celulares RUNX-2, Col I, ALP, OPN, OCN, RANKL, OPG, escleraxina, periostina, Col XII, e  $\alpha$ -SMA mRNA. As células de duas das linhagens se diferenciaram em células osteoblásticas e adipócitos quando cultivadas em meio de diferenciação de linhagem específica. Oito semanas depois, uma das linhagens foi transplantada em ratos imunodeficientes com fosfato  $\beta$ -tricálcio ( $\beta$ -TCP) e formaram estruturas semelhantes ao ligamento periodontal na superfície do  $\beta$ -TCP. Estes resultados sugerem que as células da linhagem do implante de oito semanas eram derivadas das células progenitoras/ células mesenquimais do ligamento periodontal e pode ser bastante útil para estudar a biologia e regeneração do periodonto humano.

### **3. 3. A Doença Periodontal**

A DP é uma condição inflamatória que conduz à destruição progressiva dos tecidos periodontais; osso alveolar, LP e cemento radicular sendo uma das principais causas de perda dos dentes em adultos. A DP é complexa e multifatorial, e a combinação desses fatores que leva a distinção de respostas dos portadores dessa doença [63]. Vários são os fatores que favorecem o desenvolvimento dessa patologia como a idade, tabagismo, alcoolismo, cuidados relativos à saúde oral, dificuldade de acesso aos serviços de saúde

assim como a existência de predisposição genética [64]. Além de afetar os tecidos de suporte dos dentes, atualmente existem evidências que a periodontite crônica tem um risco associado com complicações de ordem sistêmica. É mais prevalente entre os adultos de meia-idade, em países em desenvolvimento e a incidência da doença aumenta com o envelhecimento da população [65;66]. Esta patologia classifica-se em gengivite, limitada à superfície gengival e periodontite, que atinge estruturas mais profundas.

A Gengivite é uma inflamação da gengiva onde, apesar das alterações patológicas não há perda de inserção. É uma situação reversível caso sejam removidos os fatores etiológicos. Entretanto pode evoluir para periodontite caso os fatores não sejam tratados. Apenas 30% dos casos evoluem para periodontite [1] (Figura 3.2).



**Figura 3. 2.** Tecido periodontal com gengivite (adaptado de [www.odontomaxx.com](http://www.odontomaxx.com)).

A Periodontite corresponde a uma situação de inflamação com destruição do periodonto e ocorre como evolução das alterações verificadas na gengivite que progridem até haver destruição do LP e migração apical do epitélio de união [1] (Figura 3.3).



**Figura 3. 3.** Doença periodontal (adaptada de [www.dicasodontologicas.com.br](http://www.dicasodontologicas.com.br)).

### 3. 4. A Engenharia de Tecidos na Regeneração Periodontal

A engenharia de tecidos compõe uma área de pesquisa de grande importância que consiste na utilização de biomateriais como matrizes para dar suporte às culturas de células de maneira a desenvolver tecidos vivos [67]. Na engenharia de tecidos são utilizadas três principais estratégias para o tratamento e regeneração de tecidos lesionados utilizando culturas celulares:

- Injeção e implantação de células do próprio indivíduo ou de um doador compatível, na região lesionada.
- Implantação de um tecido vivo que cresceu anteriormente ‘*In vitro*’ em uma matriz de biomaterial e depois é implantada no sítio lesionado.
- Implantação de matriz de biomaterial degradável com células diretamente no sítio lesionado, que estimulam as células do indivíduo a se repararem.

A fonte de células pode ser o próprio indivíduo (autóloga), de um doador (alógena) ou de indivíduos de espécies diferentes (xenogênica) (Figura 3.4).

A medicina regenerativa dentária resulta da integração de várias áreas apropriadas como biologia celular, genética molecular e engenharia química [68;69]. Recentes avanços na engenharia de tecidos dentários, ciências dos materiais e cultura de células sugerem que num futuro bem próximo a regeneração total de todos os tecidos dentários será possível [70;71].

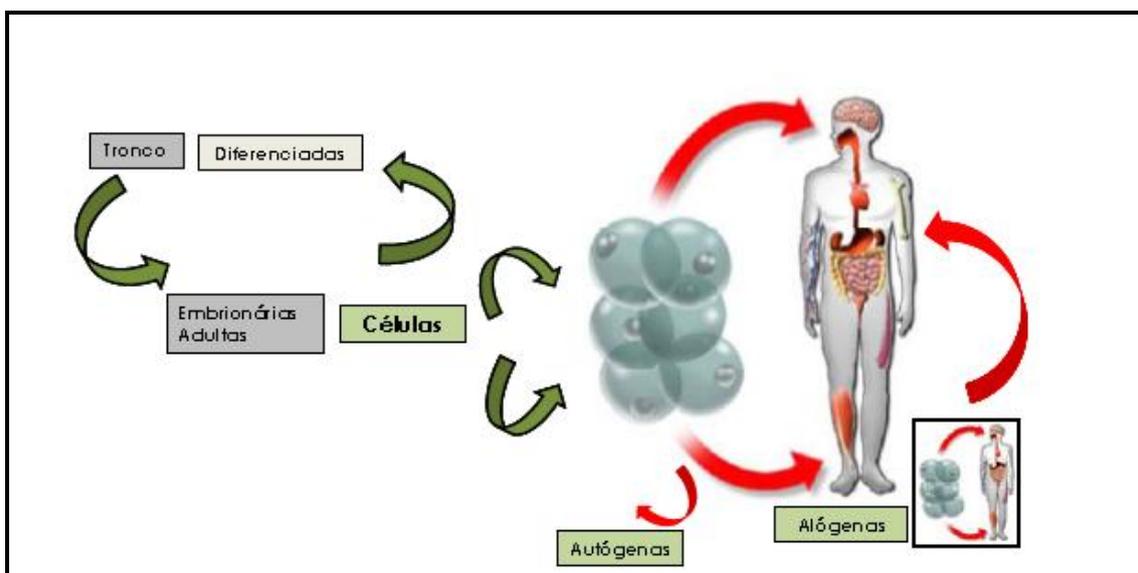
A regeneração das estruturas periodontais lesionadas é a meta na terapia da doença periodontal. Os princípios que regem a regeneração dos tecidos periodontais não são diferentes dos princípios que regem os outros tecidos do corpo. Atualmente existem cinco tipos de terapias usadas em regeneração do tecido periodontal:

- Terapêutica conduzida – uma matriz de um determinado biomaterial guia a regeneração dos tecidos dentro do sítio lesionado. Esse tipo de regeneração se limita a ativar biologicamente fatores de crescimento e células dentro da lesão.
- Terapêutica induzida – uma matriz de um determinado biomaterial guia e induz a regeneração dos tecidos a partir do transporte de um ou mais fatores celulares

que iram recrutar células e elementos vasculares de regiões próximas ao sítio lesionado.

- Terapêutica baseada em células – uma matriz biocompatível contém células progenitoras ou células diferenciadas. Essa matriz é colocada no sítio lesionado e leva à formação de um novo tecido.
- Terapêutica baseada em genes – uma matriz biocompatível contendo um ou mais genes modulam a expressão celular para que haja maturação e regeneração dos tecidos lesionados.
- Terapêutica baseada no RNA – é baseada no princípio do ‘RNA interference’ (RNAi). Essa nova abordagem terapêutica pode ser vista através do princípio de que a expressão de determinados genes prejudiciais á regeneração podem ser silenciados [4].

No nível de desenvolvimento, células ectomesênquimais do folículo dental e papila dentária têm a capacidade de se diferenciarem em fibroblasto periodontal, osteoblasto ou cementoblasto. Porém quando se trata de regeneração ainda não sabemos claramente como essa função é cumprida principalmente pelas células PDLH [72;73].



**Figura 3.4.** Esquema de possíveis fontes doadoras de células.

A terapia regenerativa periodontal com células embora não seja uma prática clínica usual, a sua utilização pode representar um avanço na regeneração de tecidos lesionados pela DP. Com essa finalidade, pesquisas recentes têm focado suas atenções no isolamento e caracterizações de *MSC* e células progenitoras periodontais. Uma das vertentes de pesquisa dessa área é coletar células do LP, cultivá-las '*In vitro*', semear essas células num biofilme e recolocá-las sobre a raiz exposta e através de fatores de crescimento tecidual criar um biocompósito formado por células e um biomaterial [9;63].

Vários estudos surgiram com o objetivo de avaliar o efeito da implantação das células PDL na regeneração dos tecidos de inserção dentária. Esses estudos variam não apenas em relação à fonte e maneira de obtenção das células (provenientes do ligamento periodontal ou coletadas de áreas em cicatrização através de biópsia), como também em relação ao tipo do material carreador utilizado, à associação ou não à regeneração tecidual guiada e ao tipo de defeito periodontal a ser regenerado [74].

Em 2000 Pini Prato e colaboradores relataram o caso de um paciente que necessitou de procedimento cirúrgico periodontal para reposição de mucosa ceratinizada previamente à reabilitação protética. Essa deficiência foi tratada por meio de técnicas de engenharia tecidual, que compreenderam o cultivo primário de fibroblastos gengivais, a partir da remoção cirúrgica de uma biópsia gengival de aproximadamente 2mm<sup>2</sup>. Esses fibroblastos foram cultivados em uma membrana de ácido hialurônico que foi transportada para o sítio receptor do paciente. Os autores conseguiram êxito na obtenção de mucosa ceratinizada, confirmada através da análise macroscópica e histológica [75;76].

Células tronco multipotentes no tecido periodontal foram apresentadas em 2004 por Seo B.M e colaboradores [10] e recentemente estas células foram identificadas em tecidos periodontais em processos regenerativos, indicando que elas contribuem para a regeneração periodontal [4]. Nesse contexto, existem pesquisas que procuram produzir matrizes com biomateriais que possam atender com eficiência sistemas baseados na terapêutica de regeneração com células. Flores e colaboradores em 2008 descobriram que géis de fibrina carregando várias camadas de células servem como sistema de transporte celular [77].

Nakara e colaboradores em 2004 testaram com sucesso matrizes de colágeno semeadas com células do LP em lesões de fenestração periodontal em cães beagle [78]. Grandes avanços têm sido alcançados nas pesquisas com células e matrizes para utilização em regeneração de tecidos periodontais. A medicina regenerativa dentária resulta da integração de várias áreas apropriadas como biologia celular, genética molecular e engenharia química [68;79;80]. Recentes avanços na engenharia de tecidos dentários, ciências dos materiais e cultura de células sugerem que num futuro bem próximo a regeneração total dos dentes juntamente com as estruturas periodontais deixará de ser uma utopia para se tornar uma realidade [70;81].

Em defeitos confeccionados nos pré-molares superiores de ratos imunossuprimidos, Hasegawa e colaboradores (2005) avaliaram o potencial regenerativo das células PDLH obtidas após a extração do terceiro molar de um paciente de 20 anos de idade. As células foram cultivadas em meio contendo ácido ascórbico (50µg/ml) e transplantadas para os defeitos mesiopalatais sem a associação com um material carreador ou uma membrana para regeneração. Quatro semanas depois do tratamento, os defeitos que receberam as células apresentavam fibras imaturas organizadas obliquamente à dentina enquanto que os defeitos controle (que não receberam tratamento) apresentavam várias áreas de anquilose [74;82].

Iwata e colaboradores (2009) realizaram um estudo em cães no qual as células foram caracterizadas, '*in vitro*' antes de serem transplantadas em defeitos infra-ósseos de três paredes. A caracterização foi feita através da avaliação tanto da atividade de fosfatase alcalina como da expressão gênica de alguns possíveis marcadores para células do ligamento periodontal como a sialoproteína óssea, osteocalcina, periostin e microglobulina β2 [74;83]. Dentro deste contexto a engenharia de tecidos vem trazendo novas perspectivas de regeneração das estruturas do LP.

### **3. 5. Fatores e Genes Associados com a Regeneração Periodontal**

Agentes ideais para a regeneração do tecido periodontal são aqueles que promovem migração e adesão celular adequada em locais de cicatrização permitindo posteriormente a diferenciação celular de fibroblastos periodontais, osteoblastos e cementoblastos [84;85].

No final da década de 80, estudos de caracterização “in vitro” mostraram que células derivadas do ligamento periodontal são capazes de sintetizar e expressar a enzima fosfatase alcalina, uma glicoproteína específica encontrada na superfície dos osteoblastos que é liberada durante a osteogênese e é considerada um importante marcador precoce das células em diferenciação osteogênica [86-88].

A Matriz Derivada do Esmalte (EMD) é um extrato de esmalte imaturo de dentes, que tem sido usado em terapias periodontais. A EMD é essencialmente composta pela amelogenina, uma proteína secretada por células de origem epitelial e possivelmente responsável pela interação de células mesenquimais na cementogênese mediando a mineralização sem interferir na proliferação celular. Estudos recentes confirmaram que a amelogenina pode alterar genes associados com cementoblastos, diminuindo a expressão de osteocalcina e aumentando a de osteopontina [89;90]. Esses dois genes estão associados com a maturação fenotípica de osteoblastos e de cementoblastos, além de serem reguladores do crescimento dos cristais de hidroxiapatita [91-93]. EMD regula a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização na matriz de células de tecido periodontal e de osteoblastos de humanos e de roedores [93].

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) têm sido investigadas por suas funções de expressão genética e diferenciação celular no folículo dentário e em células do ligamento periodontal. ‘In vitro’ as BMPs podem regular a expressão de proteínas osteogênicas, incluindo a osteocalcina, osteopontina, a sialoproteína óssea e a fosfatase alcalina. Resultados de experimentos em animais e dados clínicos indicam que as BMPs têm habilidade para estimular a regeneração óssea do tecido periodontal incluindo o cimento acelular [94;95].

Estudos demonstraram que as células do ligamento periodontal possuem propriedades de células cementoblásticas / osteoblásticas, as quais incluem: (i) a capacidade de formar nódulos minerais ‘in vitro’, (ii) a expressão de genes para fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea (iii) modulação de resposta por fatores ósseo/cimento indutivos como o paratormônio [5;74;87;96].

Com o objetivo de determinar a expressão de marcadores pelas células PDLH, Ivanovski e colaboradores (2001) compararam células gengivais com células PDLH e em relação à expressão gênica de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea e

proteínas ósseas morfogenéticas 2 e 4 (BMP-2 e BMP-4). A reação em cadeia da polimerase pela técnica da transcriptase reversa (RT-PCR) revelou que as PDLH apresentaram maior expressão de osteopontina quando comparada às células gengivais. A osteocalcina e a sialoproteína óssea foram expressas somente pelas Células PDLH [97].

Com o objetivo de determinar marcadores de cementoblastos em trabalho anteriores, Carvalho e colaboradores (2011) extraíram células do tecido periodontal de ratos adultos e observaram que essas células expressavam F-Spondin um possível marcador de cementoblastos e esta expressão não foi observada em osteoblastos e fibroblastos gengivais [98].

### **3. 6. Vidro Bioativo**

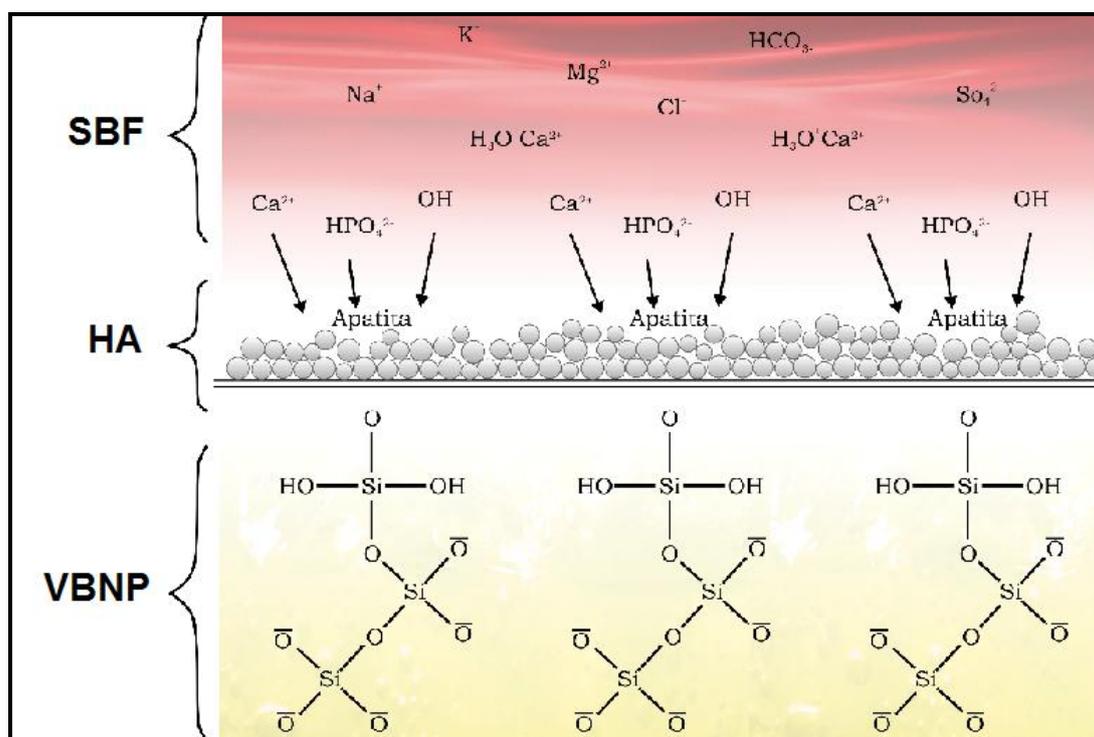
A regeneração de tecidos é baseada no trinômio: cultura de células, fatores biomoleculares e um biomaterial adequado [99]. Vários materiais naturais e sintéticos têm sido pesquisados para o uso adequado em engenharia de tecidos. Entretanto nenhum material pode ser considerado ideal para todos os tipos de tecido, células que crescem em biomateriais frequentemente apresentam diferenças quando comparadas com células crescendo em ambiente natural. Vários princípios devem ser respeitados no projeto e elaboração de construtos para engenharia de tecidos como: biocompatibilidade, degradabilidade do material, adesão celular, propriedades físicas e mecânicas do biomaterial, desenho e forma do biomaterial, enfim todos os parâmetros que possam influenciar a regeneração tecidual [100-102].

Um dos biomateriais mais exaustivamente pesquisados são os VBs. Cerâmicas e vidros são usados há muitos anos em várias indústrias e em produtos da área biomédica como: lentes de contato, fibra óptica de endoscópios, termômetros e também na odontologia como restaurações chamadas de cerâmicas dentárias [32;103]. As biocerâmicas são em geral classificadas quanto à resposta dos tecidos ao material: como bioinertes, reabsorvíveis ou bioativas.

Os VBs apresentam a característica de formar uma ligação com o tecido ósseo e, em alguns casos, com outros tecidos moles. A ligação com o osso está associada com a formação de uma camada de HA carbonatada na superfície do material bioativo. A fase

de HA formada é similar em composição e estrutura à fase mineral do osso e é esta equivalência que é responsável pela ligação interfacial.

As reações que ocorrem até a formação da camada de HCA podem ser resumidas em: (i) lixiviação e formação de grupos silanol (Si-OH); (ii) Perda de sílica solúvel ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) e formação de silanol; (iii) policondensação de silanois para formar um gel de sílica hidratada; (iv) formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfa; (v) cristalização de uma camada de hidroxiapatita carbonatada [99;104;105](Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Desenho esquemático da formação de hidroxiapatita.

Os componentes básicos da maioria dos VBs são  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$  [30]. Os VBs por causa das suas interessantes propriedades do ponto de vista biológico têm sido amplamente pesquisados e relacionados com a cultura de células do tecido ósseo, os osteoblastos [106;107]. Um aspecto que os torna diferentes de outras biocerâmicas é a possibilidade de se controlar suas propriedades químicas e suas ligações com os tecidos, sendo possível obter vidros com propriedades específicas para uma aplicação particular. Estudos relatam que o produto iônico da dissolução de VB exerce um controle genético sobre o ciclo celular dos osteoblastos com uma rápida expressão de genes que regulam a osteogênese e produção de fatores de crescimento [37;106;107].

Valério e colaboradores em 2005 investigaram o comportamento de osteoblastos de cultura primária quando em contato com produtos iônicos da dissolução de VB com 60% de sílica em comparação com fosfato bifásico de cálcio (BCP). Os resultados indicaram um aumento da viabilidade osteoblástica com o uso de VB em comparação com o grupo controle e em relação ao BCP [37]. Carvalho em 2010 investigou o comportamento de cementoblastos de cultura primária quando em contato com produtos iônicos da dissolução de VB com 60% de sílica. Os resultados indicaram um aumento da viabilidade e proliferação de cementoblastos tratados com VB em comparação com o grupo controle [35;36].

Vários trabalhos sobre VBs derivados do método sol-gel (SG) foram publicados incluindo vidros densos, partículas, materiais porosos e 'scaffolds' [108-111]. O processo SG consiste num método físico-químico de síntese de óxidos cerâmicos em que ocorre a evolução de um sol (dispersão líquida de partículas coloidais, que são partículas sólidas de diâmetro inferior a 100nm) para um material poroso, onde partículas maiores interconectam-se para formar uma rede sólida semelhante a uma esponja. Esse processo diferencia-se em relação aos demais pela possibilidade de preparação de géis com o mesmo grau de homogeneidade da solução inicial. Outra vantagem que contribui para o crescente interesse do método SG é a facilidade de modelar os géis, permitindo a obtenção de corpos cerâmicos com formato pré-definido [112;113].

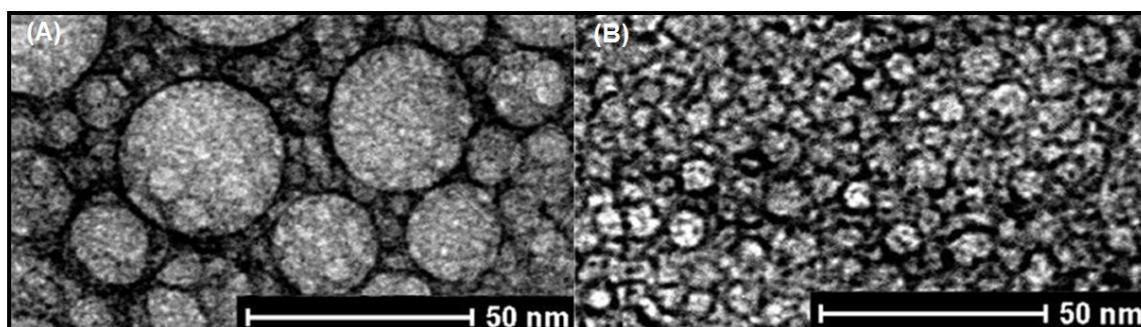
### **3. 7. Nanocompósitos**

Uma abordagem para melhorar as propriedades mecânicas dos VBs é a produção de compósitos, na qual uma fase inorgânica, com dimensões nanométricas, é inserida em uma matriz polimérica. Compósitos de VB / biopolímeros têm sido desenvolvidos com base nessa estratégia [42;43;114;115]. Em comparação com VBs em micro escala, as partículas nanométricas apresentam área superficial milhares de vezes maiores e podem formar uma interface mais coesa em compósitos de matriz polimérica e, portanto, possibilitam o desenvolvimento de materiais com altas performances em propriedades mecânicas. Além disso, estudos demonstraram que materiais em nanoescala apresentaram uma maior biocompatibilidade e bioatividade [38;40;41;114].

Vários artigos foram publicados na área de biomateriais à base de misturas de polímeros naturais e polímeros sintéticos contendo nanopartículas inorgânicas [40;116]. Degirmenbasi e colaboradores verificaram que biocompósitos de HA com PVA e colágeno exibia elevada elasticidade, além de fornecer porosidade interna com poros na faixa de 50-100nm [117].

A tecnologia SG permite a preparação de vidros à baixa temperatura, com estrutura porosa e elevada área superficial. Porém, o tamanho das partículas de vidro obtidas pelo método SG convencional é maior que  $1\mu\text{m}$  [118]. Em geral, nanopartículas tendem a se aglomerar durante a fase de preparação e durante o processo de dispersão na fase polimérica na tentativa de minimizar a energia livre do sistema. Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de modificar a superfície das nanopartículas, para criar um material bioativo com capacidade de dispersão [41;119;120].

Stober e colaboradores em 1968, relataram um método pioneiro para a síntese de nanopartículas esféricas de sílica monodispersas em álcool a partir de alcóxidos de silício na presença de amônia, com tamanhos variando de 50nm a  $1\mu\text{m}$  e distribuição granulométrica estreita [119;120]. Oliveira, em 2011 utilizou com sucesso o método de Stöber para produzir nanopartículas de vidro bioativo no sistema 60%  $\text{SiO}_2$ -36%  $\text{CaO}$ -4%  $\text{P}_2\text{O}_5$  e obter partículas esféricas, monodispersas e bioativas [41] (Figura 3.6). A utilização de nanopartículas de vidro bioativo dispersas em uma matriz polimérica com a criação de um nanocompósito representa uma melhora das propriedades do biomaterial.



**Figura 3.6.** Imagens de vidro bioativo nanoparticulado . (A) e (B) Demonstra a diferença de tamanho das nanopartículas de vidro bioativo (adaptado Oliveira, 2011).

A fase polimérica também desempenha papel importante nas propriedades finais do compósito. Vários polímeros biodegradáveis, naturais ou sintéticos têm sido estudados como suporte para cultura de células. Materiais poliméricos são macromoléculas formadas pela repetição de unidades fundamentais chamadas meros, que dão origem a longas cadeias. O tamanho das cadeias, formadas principalmente de átomos de carbono ou a massa molar é o aspecto principal que confere a este grupo de materiais uma série de características próprias [121].

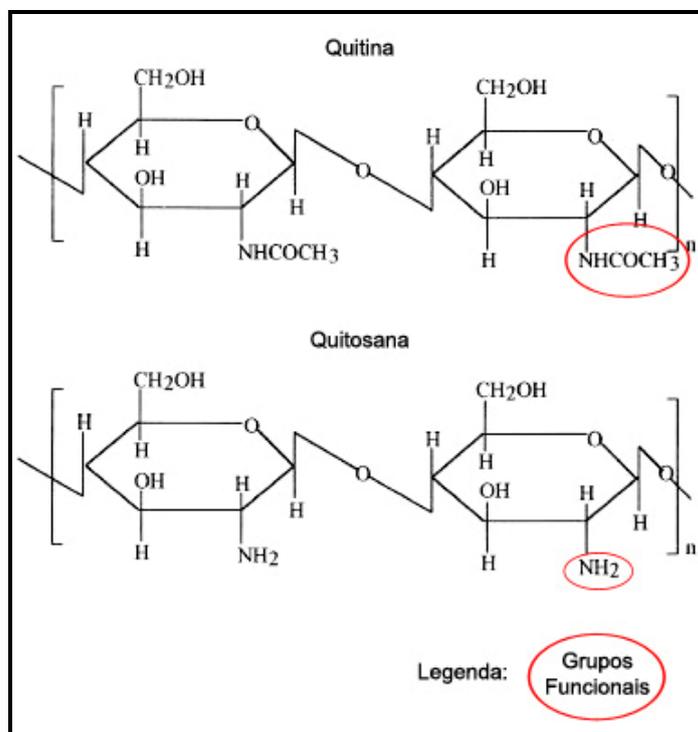
Polímeros têm sido empregados em biomateriais devido às várias características que apresentam e que os tornam muitas vezes essenciais para desempenhar funções específicas nestes materiais. Dentre suas características importantes apresentam-se as propriedades físico-químicas, sua versatilidade estrutural, que permite adequá-los a cada aplicação específica, baixo custo de fabricação, a diversidade de polímeros sintéticos e naturais e a relativa facilidade de obtenção. Estas propriedades os tornam de grande valor em aplicações biomédicas [121-126].

Semelhantemente, biopolímeros degradáveis têm recebido atenção particular, pois reduzem a necessidade de intervenção cirúrgica para sua remoção. Existem várias aplicações para estes tipos de biopolímeros: suturas, dispositivos para liberação de fármacos, fixação de dispositivos ortopédicos, vasos sanguíneos temporários e matriz para engenharia de tecidos. As degradações podem ser originadas tanto da atuação de entidades biológicas como de células, micro organismos, enzimas, como do ataque de espécies iônicas, radicais livres ou água [121;127].

### **3. 8. Quitosana**

A QUI é o principal derivado da quitina, que é o segundo polímero natural mais abundante depois da celulose. Ela é obtida por N-desacetilação em uma extensão variável que é caracterizada pelo grau médio de desacetilação (GD), que representa a porcentagem de grupos  $\text{NH}_2$  livres. Nesta reação a maioria dos grupamentos acetamido ( $-\text{NHCOCH}_3$ ) na quitina, durante a reação de hidrólise alcalina, é transformada em grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) ao longo da cadeia polimérica. Quando o GD da quitina alcança em torno de 50% e se torna solúvel em meio aquoso ácido é chamada de QUI [26]. Apresenta ao longo de sua cadeia grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) na posição C-2, grupos hidroxila primários ( $-\text{OH}$ ) na posição C-3 e grupos hidroxila secundários na posição C-

6. Esses grupos permitem ligações secundárias com a água através de ligações de hidrogênio, o que torna esse polissacarídeo fortemente hidrofílico [128] (Figura 3.7).



**Figura 3. 7.** Estrutura química da quitina e da quitosana (Adaptado de Reis, 2007).

A solubilidade da QUI depende de vários parâmetros, tais como GD, massa molar, concentração do ácido, do biopolímero, entretanto o mais importante dentre todos é o GD. A QUI possui propriedades químicas e biológicas distintas, pois, tem grupos amino e hidroxila reativos capazes de serem submetidos a modificações químicas. Além disso, possui grupos amino que tornam a QUI um dos únicos polieletrólitos catiônicos achados na natureza [26].

A QUI é solúvel em meios aquosos ácidos e quando dissolvida possui alta carga positiva e por isso adere a superfícies carregadas negativamente e agrega-se com compostos polianiônicos. A solubilidade da QUI em soluções de ácidos orgânicos ou inorgânicos cujo pH esteja abaixo de 6 e o mais próximo de 3 é devida ao GD, isso ocorre porque nessa faixa de pH os grupos amino da cadeia do polímero estão protonados e carregados positivamente. Isso leva a repulsão entre as cadeias e a maior solvatação, portanto, quanto mais grupos amino carregados positivamente, maior a

solubilização da QUI no meio e quanto maior o grau de desacetilação maior a quantidade de ácido necessária para a completa solubilização [20;128;129].

Tanto a solubilidade em soluções ácidas quanto à agregação com poliânions atribuem propriedades excelentes a quitosana na forma de gel. Junto com as propriedades biológicas raras que incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade em produtos inofensivos, não tóxicos, fisiologicamente inertes, afinidade notável a proteínas, e propriedades hemostáticas, antitumoral, anticolesterol. A QUI até agora, indubitavelmente, oferece um potencial extraordinário numa larga faixa de aplicações que tendem a crescer rapidamente [26;130-132].

Devido à sua superfície ser hidrofílica ela promove a adesão celular, proliferação e diferenciação e evoca um mínimo de reação imunológica sobre algum implante. Algum processo anti-inflamatório ou reações alérgicas não têm sido observados em humanos sujeitos a aplicação, implantação ou ingestão de quitosana. A habilidade da QUI para suporte e aderência celular é atribuída às suas propriedades químicas. A cadeia principal do polissacarídeo da QUI é estruturalmente similar aos da glicosaminoglicanas, o maior componente da matriz extracelular do osso e cartilagem [133;134].

Na preparação de soluções de QUI, deve-se observar não somente o grau médio de desacetilação, mas também a distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia principal e também da massa molar do polímero. O que se observa na literatura é que em valores médios para GD (60% a 80%) e MW (150kmol/kg a 450kmol/kg) o comportamento da QUI apresenta melhor possibilidade de modulação das propriedades a partir da mistura com outros polímeros e/ou com a reticulação química [135].

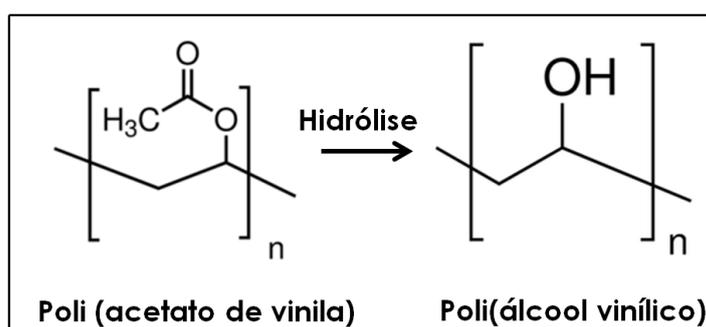
A resistência mecânica e maleabilidade da QUI são limitadas principalmente para aplicação como membranas, por isso a mistura da mesma com outros polímeros é um procedimento utilizado para alterar ou obter as propriedades de interesse. Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e variar a taxa de degradação deste polissacarídeo utiliza-se a mistura da mesma com outros hidrogéis poliméricos sintéticos tais como o PVA bem como, com reticulantes; que permitem a formação de ligações cruzadas para obtenção de redes [21;26].

### 3. 9. Poli (álcool vinílico)

O PVA é um polímero sintético solúvel em água, de grande produção em volume no mundo e por causa de suas propriedades tem sido utilizado em um grande número de aplicações industriais. O grande número de aplicações do PVA levou conseqüentemente a uma variedade de produtos comerciais [127;136;137].

O hidrogel de PVA possui excelente transparência, consistência macia principalmente na forma de membrana, além de apresentar excelente resistência química e também ser biocompatível e degradável. O PVA não é mutagênico, nem genotóxico nem apresenta atividade carcinogênica. Um estudo promovido pelo *European Food Safety Authority* (EFSA) em 2005 indicou que o PVA com massa molar de até 30kg/mol não apresentou evidência de toxicidade nem em 90 dias e nem em 2 gerações de estudos com altos níveis de dosagem administradas (5,000mg/kg dia)[21;25;26;137-139].

O PVA comercial é frequentemente um copolímero de poli (álcool vinílico) e poli acetato de vinila, do qual o álcool está na forma hidrolisada (Figura 3.8). A relação entre o percentual de hidroxilas no copolímero final, após a reação de hidrólise, e o número total inicial de grupos acetila representa o grau de hidrólise (GH) do PVA. Quando o grau de hidrólise está na faixa de 87-89% o PVA é então chamado parcialmente hidrolisado. A outra forma, totalmente hidrolisada, tem um grau de hidrólise de 98-99% [140].



**Figura 3. 8.** Estrutura química do Poli (álcool vinílico).

As duas características importantes do PVA que determinam uma série de propriedades do material obtido são GH e a massa molar. A combinação dessas características influencia a solubilidade, a viscosidade, a resistência mecânica, o poder de dispersão,

adesão em superfícies, flexibilidade e assim por diante. Costa, em 2008 caracterizou filmes de blendas de diferentes proporções de quitosana/PVA reticuladas com glutaraldeído para aplicação na área biomédica [21;26].

Dentre os plastificantes comuns para o PVA temos glicerol, polietileno glicol e poli propileno glicol. A dissolução do PVA, um polímero semicristalino ocorre de forma que na presença de solventes termodinamicamente compatíveis, os cristais do polímero desdobram camada por camada e se juntam à região amorfa adjacente. Esse processo é seguido pela distensão da cadeia na região amorfa, que leva à dissolução do polímero [140].

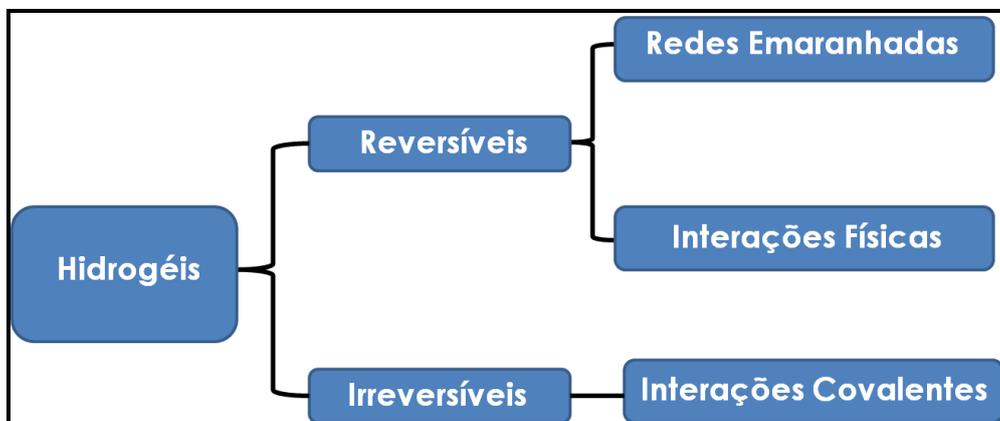
### **3. 10. Hidrogéis**

Segundo Wang e colaboradores (2004) hidrogéis são definidos como redes poliméricas capazes de reter uma quantidade significativa de água dentro de sua estrutura sem se dissolver [141]. Mansur e colaboradores (2004) definem hidrogéis como redes poliméricas tridimensionais hidrofílicas capazes de absorver e reter diferentes quantidades de água ou fluidos biológicos [140]. Dentre as várias propriedades dos hidrogéis, as mais importantes para engenharia de tecidos são as que os habilitam na substituição de delicados tecidos vivos como; hidrofília, expansibilidade, permeabilidade seletiva, e baixa tensão interfacial [141].

Os hidrogéis de PVA e PEG têm sido amplamente explorados como polímeros solúveis em água para numerosas aplicações biomédicas e farmacêuticas devido às vantagens de não toxidez, não carcinogenicidade e propriedades de bioadesão [21;142].

As redes poliméricas dos hidrogéis são baseadas pelo tipo e grau de reticulação entre as cadeias dos polímeros utilizados em sua síntese. Portanto, o grau de reticulação deve ser bem delineado, observando que quanto maior o grau de reticulação apresentado por um hidrogel mais rígida será sua estrutura, e menos intumescimento ocorrerá. Outro parâmetro a ser observado são os grupamentos químicos apresentados pelos polímeros utilizados na rede, pois eles podem interferir na hidrofobia / hidrofília dos hidrogéis [143].

Berger e colaboradores classificam os hidrogéis com base na natureza da rede polimérica em: redes emaranhadas, redes formadas por interações físicas e redes formadas por ligações cruzadas covalentes (Figura 3.6).



**Figura 3. 9.** Classificação de hidrogéis com base na natureza da rede polimérica (Adaptado de Costa 2008).

### 3. 11. Estratégia para Reticulação de Hidrógeis

Uma grande variedade de métodos para estabelecer ligações cruzadas são utilizados para preparar hidrogéis e sistemas nanocompósitos orgânico-inorgânico. Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e variar a taxa de degradação da QUI utiliza-se a mistura da mesma com agentes reticulantes; que permitem a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal, favorecendo a obtenção de redes [128].

A reticulação é um processo baseado na interligação das cadeias mediante a reação das mesmas com uma substância química bifuncional, capaz de gerar uma rede tridimensional polimérica mais rígida, com menor mobilidade das cadeias. A bifuncionalidade é um parâmetro essencial ao processo de reticulação, para que haja a interligação das cadeias dos polímeros. Outro parâmetro importante é a não toxicidade do reticulante [21;128;144].

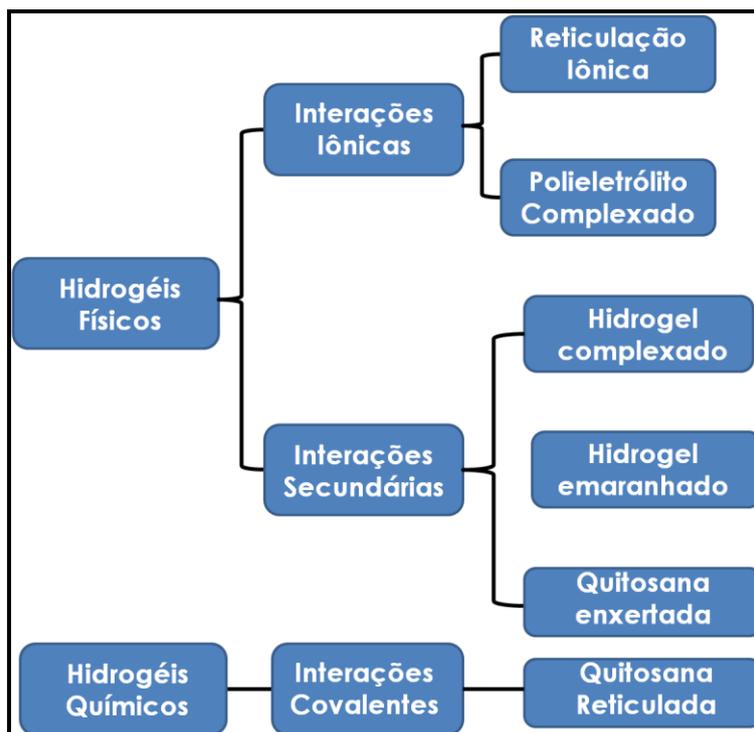
Hidrogéis reticulados são cadeias poliméricas interconectadas por um reticulante que leva a formação de rede tridimensional. Exige-se um número crítico de ligações cruzadas por cadeia para permitir a formação da rede [21;127]. A rede do hidrogel de QUI reticulada pode ocorrer com ela mesma, envolvendo nesse caso unidades

estruturais próprias, mas também pode ser uma rede híbrida polimérica onde a reação de reticulação ocorre entre a QUI e uma cadeia de outro polímero, ou ainda pode ser semi ou totalmente interpenetrada na qual contém um polímero não reagente adicionado a solução de quitosana antes da reticulação [21].

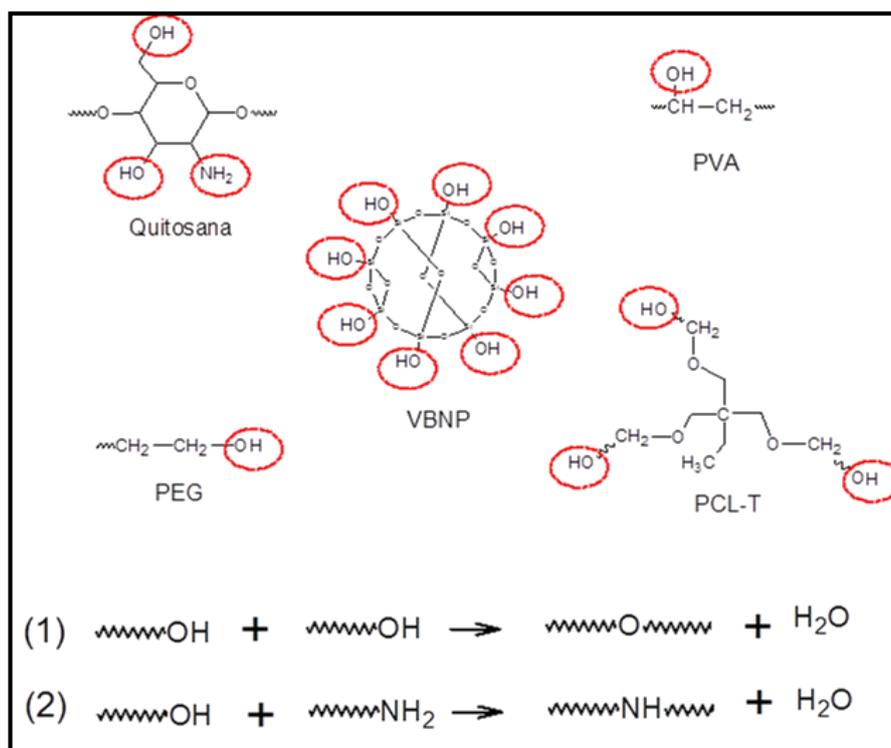
Os agentes mais tradicionalmente utilizados no processo de reticulação química da quitosana são: os aldeídos monofuncionais, ou bifuncionais como o glioxal e glutaraldeído. O glutaraldeído (GA) é uma molécula bifuncional que interage fortemente com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura como é o caso da QUI. Entretanto, a grande maioria dos agentes de reticulação química existentes é tóxica, ou potencialmente tóxica e os seus resíduos precisam ser removidos após a preparação [128;145].

Hidrogéis também podem ser misturados com outros polímeros solúveis em água e submetidos à processos de reticulação física. As misturas de polímeros são produzidas pela mistura física de dois ou mais polímeros existentes. Esta é uma via conveniente para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, que pode combinar as propriedades de vários polímeros já existentes [142]. Uma alternativa, para a substituição do GA é a utilização de polímeros tais como PCL-triol (PCL-T) e PEG de baixo peso molecular, que têm grupos hidroxila na sua composição e quando adicionados à rede de hidrogel da QUI são capazes de atuar como agente de reticulação física através da formação de ligações de hidrogênio.

Berger classificou a QUI de forma especial em relação aos tipos de ligação química / física que a mesma pode ter. Na QUI é impossível definir as fronteiras do emaranhado estrutural da mesma, por isso Berger e colaboradores sugeriram uma classificação mais complexa. Essa classificação é demonstrada na figura 3.10 [21;144;146]. Portanto, de acordo com a classificação de Berger e colaboradores além da ligação física, a reação desejável e possível de acontecer é a reticulação química pela condensação dos grupos OH do PCL-T, PVA, VBNP e PEG com grupos OH e NH<sub>2</sub>, da QUI (Figura 3.11).



**Figura 3. 10.** Classificação de hidrogéis de quitosana segundo Berger (Adaptado de Costa, 2008).



**Figura 3. 11.** Desenho esquemático das possíveis ligações químicas entre a quitosana, poli (álcool vinílico), poli (etileno glicol), poli (caprolactona) triol e o vidro bioativo nanoparticulado. Em (1) e (2) ligações covalentes.

### 3. 12. Degradação de Hidrógeis

A definição de degradação deve ser diferenciada de biodegradação. Biodegradação é quando há colapso de ligações químicas do material devido à ação de organismos vivos que conduzem a mudanças nas propriedades físicas do mesmo (ASTMD-883 / 08-*STANDARD TERMINOLOGY RELATING TO PLASTICS*) [21;125].

O termo degradação se relaciona com o colapso de ligações químicas do material resultante de atividades químicas tais como: dessorção, dissociação, hidrólise, dissolução, oxidação, redução e fotólise. Pode ocorrer também através de atividades físicas que erodem a matriz polimérica devido a: difusão, abrasão, trinca, descamação, quebra mecânica ou combinação de qualquer umas dessas atividades físicas ou químicas [21;147] . Uma das formas mais simples de se avaliar o efeito dessas atividades é através da avaliação da perda de massa que normalmente ocorre por dois fenômenos, a solvatação e a despolimerização da cadeia polimérica [21;147;148].

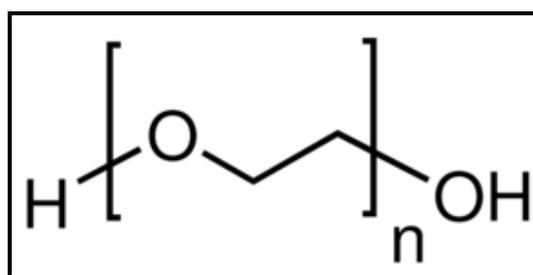
### 3. 13. Poli (etileno glicol)

O PEG é um poliéter diol linear, cuja estrutura química esta representada na figura 3.12. PEG é comumente usado em uma ampla gama de formulações intravenosa humana e farmacêutica veterinária, sendo considerado imunologicamente seguro, pois é eliminado do corpo intacto pelos rins [149;150]. O PEG é uma substância atóxica, por ser quimicamente inerte, e também apresenta poucos riscos ambientais, podendo ser descartado sem tratamento prévio. O PEG é um polímero estável quimicamente, sendo considerado inerte tanto em meio ácido como em meio básico. Devido ao grande número de oxigênios na cadeia polimérica, o PEG tem grande propensão à formação de complexos, podendo inclusive associar-se a eletrólitos em soluções diluídas. É empregado regularmente em cosméticos e como carga em produtos farmacêuticos. [28;151;152].

O PEG é produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares variadas. Aqueles com massas molares mais baixas que 1.000 g/mol são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas molares elevadas, acima de 1.000 g/mol, são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. Podem ser estocados

à temperatura ambiente, embora a 4 °C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada [28;153].

O PEG possui uma variedade de propriedades pertinentes para aplicações biomédicas, como insolubilidade em água a elevadas temperaturas, formação de complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, agente precipitante de proteínas e ácidos nucleicos [28;154].



**Figura 3. 12.** Estrutura química do PEG.

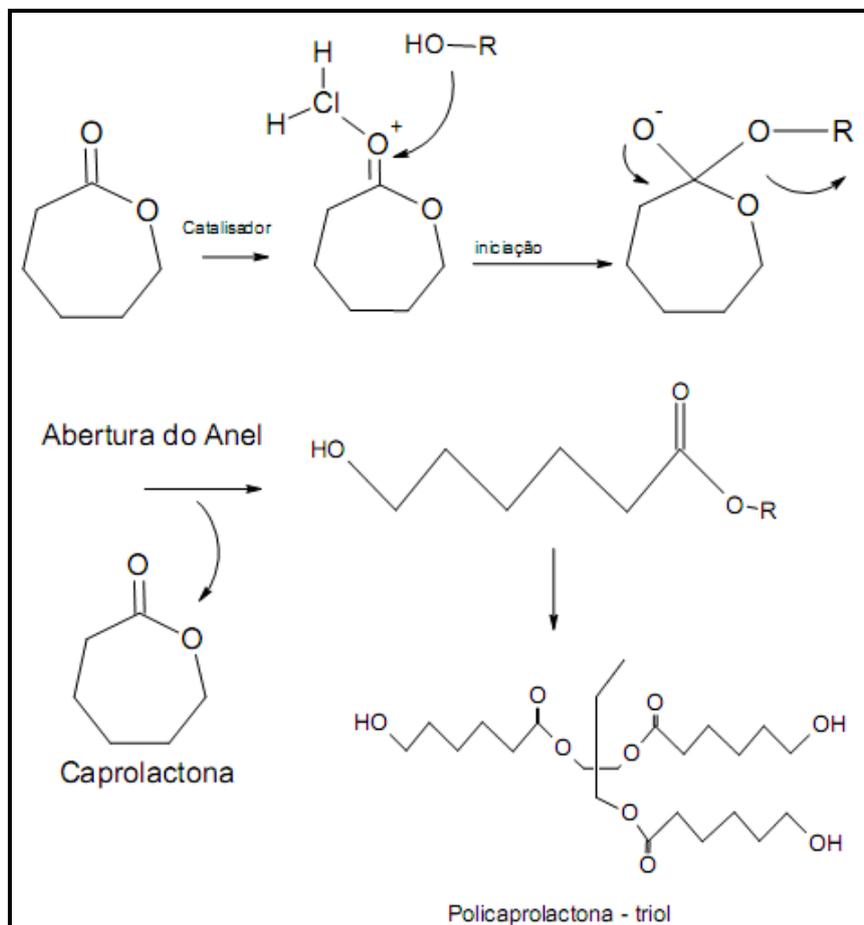
### 3. 14. Poli (caprolactona) triol

A PCL-T é um poliéster semelhante à poli ( $\epsilon$ -caprolactona), de massa molar mais baixa, com três grupos hidroxilas terminais que conferem maior caráter hidrofílico a este polímero [155]. A PCL-T é obtida pela abertura do anel da caprolactona (Figura 3.13) [156].

Duarte em 2009 estudou a obtenção e caracterização de poli (L-co-DL ácido láctico) (PDLA com adição de PCL-T) visando aplicação na área médica. Os resultados dos ensaios mostraram que todas as amostras não apresentavam toxicidade [157]. Devido à sua excelente biocompatibilidade, o PCL-T tem também sido extensivamente investigado como matriz para engenharia de tecido, Um estudo recente demonstrou a viabilidade de usar um compósito com matriz composta de PCL e ácido hialurônico como um potencial substituto do menisco [158].

Compósitos de PCL com cerâmicas à base de fosfato de cálcio também estão sendo investigados como matrizes adequadas para engenharia de tecido ósseo [159]. PCL pode ser utilizado em conjunto com a QUI para a preparação de vários materiais para aplicações biomédicas. Misturas de QUI com PCL foram estudadas não só como membrana, mas também na forma de partículas. Partículas foram obtidas por um

método de emulsão / difusão / evaporação usando uma mistura de PVA e derivados de QUI como estabilizadores. Essas partículas como eram catiônicas formavam complexos estáveis com DNA. Além disso a mistura de QUI /PCL (1 / 1) demonstrou melhores propriedades mecânicas e de suporte para adesão celular [160;161].



**Figura 3. 12.** Abertura do anel da caprolactona formando o PCL-T (Adaptado de Wessler).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4. 1. Desenvolvimento de Membranas Compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL-T Contendo Nanopartículas de Vidro Bioativo Nanoparticulado**

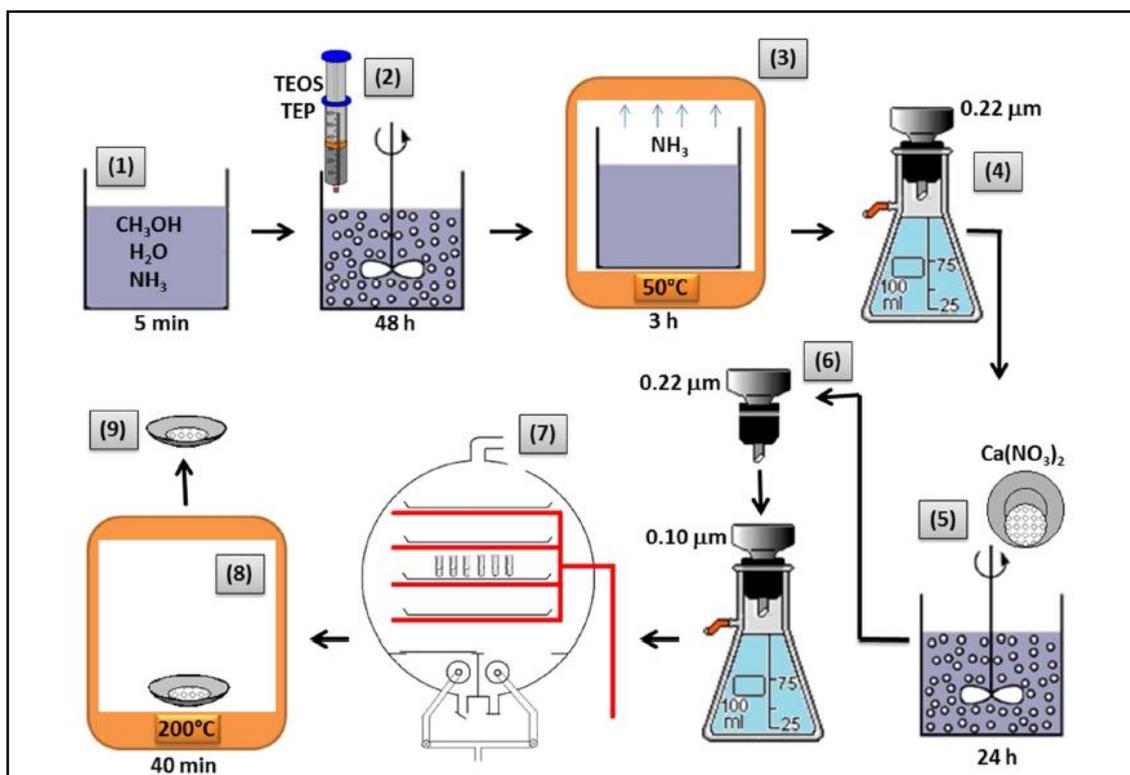
#### **4. 1. 1. Obtenção do Vidro Bioativo Nanoparticulado pelo Método Stöber Modificado**

No projeto inicial a ideia era produzir nanopartículas de vidro bioativo pelo método de Stöber modificado segundo o protocolo de Oliveira (2011), liofilizá-las, tratar termicamente e introduzi-las na forma de pó nas membranas poliméricas [41]. Em estudos anteriores nosso grupo (Oliveira et al, 2011) sintetizou nanopartículas de vidro bioativo pelo método de Stöber modificado e em sua caracterização obtida por microscopia de transmissão obteve partículas de diâmetro médio calculado de  $(19 \pm 9)$  nm, com valores mínimos e máximos de 4 e 70 nm, respectivamente. Entretanto, na síntese das membranas ocorreu aglomeração e as nanopartículas não ficaram homoganeamente distribuídas nas amostras. Então foi utilizada a dispersão, porém o método de síntese foi trocado para o de coprecipitação. O método foi substituído, por que havia o risco de toxicidade para as células, provocado pela maior quantidade de metanol que se utiliza no método de Stöber. No presente trabalho as nanopartículas produzidas por esse método só foram utilizadas nos ensaios iniciais por contato direto em células PDLH, para uma avaliação preliminar da resposta celular ao VBNP.

O procedimento de síntese pelo método de Stöber foi utilizado como esquematizado abaixo (Figura 4.1).

(1) 200 mL de metanol foram misturados com 0,12 mL de hidróxido de amônio a 33% e 5,40 mL de água e agitou-se durante 5 min. Foram adicionados (2), em seguida 5,57 mL de TEOS e 0,56 mL de TEP gota a gota durante 10 min. O sol foi agitado mecanicamente durante 48 horas. (3) O sol formado foi colocado num forno a 50°C, até a completa evaporação do hidróxido de amônio (cerca de 3 h). (4) Em seguida, a dispersão foi filtrada em um Milipore 0,22  $\mu$  m. (5) 3,46 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  foi dissolvido na dispersão e agitada durante 24 horas. (6) As nanopartículas formadas foram filtradas duas vezes em Milipore 0,22 e 0,11  $\mu$  m. (7) A dispersão foi submetida á

liofilização (8). Os pós obtidas foram tratados termicamente a 200°C e 700°C durante 40 min, com taxa de aquecimento de 1°C / min.



**Figura 4. 1.** Ilustração do esquema da síntese do VBNP Stöber (Adaptado de Oliveira, A. R).

#### 4. 1. 2. Obtenção do Vidro Bioativo Nanoparticulado pelo Método Coprecipitação

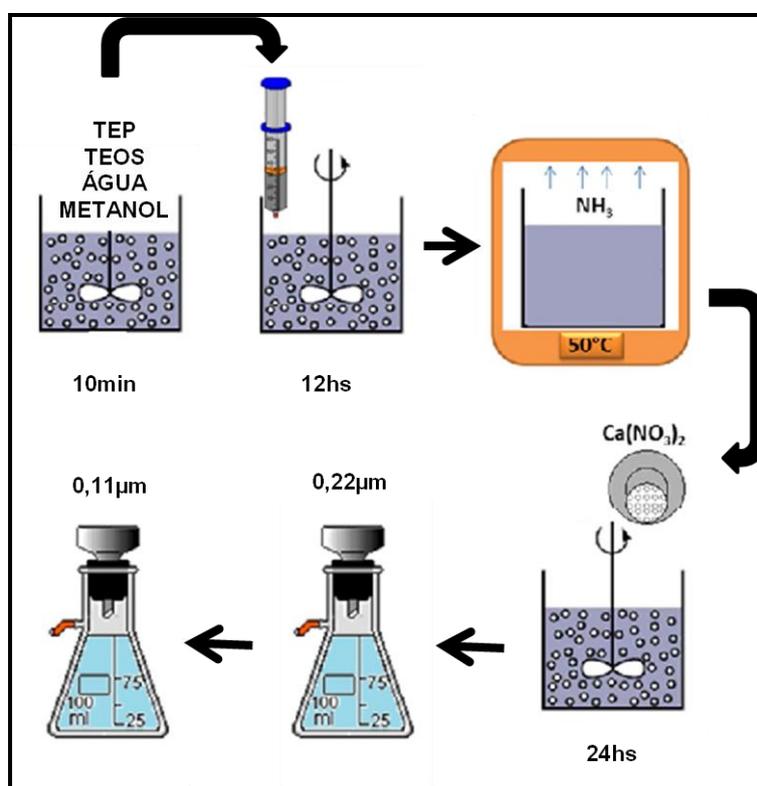
Todos os sais e reagentes usados foram de grau analítico e água Milli-Q foi usada em todas as soluções (18.0MΩ). A dispersão de nanopartículas foi obtida pelo método de coprecipitação [162]. A sequência detalhada da síntese foi:

1. Os precursores foram hidrolisados em condições ácidas:

- inicialmente 5,57 mL tetra-etil-orto-silicato 98% (TEOS) e 0,56mL de trietil-fosfato 99% (TEP) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) foram dispersos em solução de 10 mL de metanol da Synth (Diadema, Brazil) e água (1:2 molar) – (5,7 mL metanol e 4,3ml água). O pH foi ajustado entre 1-2 por ácido nítrico e a mistura mantida sob agitação magnética até a obtenção de um sol transparente por aproximadamente 10 minutos (Figura 4.2).

2. Condensados monodispersos em solução alcalina:

- o sol foi gotejado em 1200 mL de água deionizada e 0,27 mL de hidróxido de amônio da Merck (White House Station, NJ, USA) com agitação mecânica vigorosa. O pH da solução foi ajustado na faixa de 10-12 (agitação mecânica por 12 horas). Em seguida a amônia foi deixada em estufa para evaporar, foi observado se o pH estava em torno de 8, e foi adicionado 3,45g de nitrato de cálcio tetra hidratado. Após, a solução ficou em agitação mecânica por 24 horas, a dispersão obtida foi filtrada em Milipore 0,22 $\mu$ m. e depois novamente filtrada em Milipore 0,11 $\mu$ m. A dispersão de VBNP resultante foi armazenada em geladeira e posteriormente utilizada na síntese das membranas compósitas.



**Figura 4. 2.** Ilustração do esquema da síntese do VBNP pelo método coprecipitação (Adaptado de Oliveira, A. A. R).

#### 4. 1. 3. Estratégia de Escolha das Composições das Membranas

Para a escolha das membranas utilizadas nesse trabalho 20 composições diferentes foram analisadas qualitativamente e macroscopicamente. O primeiro critério de escolha foi baseado na possibilidade de manipulação adequada das membranas em placas de cultura celular. As membranas foram cortadas, esterilizadas por radiação ultravioleta, e

colocadas em placas de cultura de 24 poços cobertas por meio PBS por 24 horas em estufa á 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período o PBS foi trocado por meio DMEM com 10% de SFB e ficavam por quatro dias em estufa á 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

As membranas eram então analisadas macroscopicamente. As amostras que se dissolveram parcialmente ou totalmente foram descartadas. Algumas composições ficaram quebradiças e também foram descartadas. As composições escolhidas e caracterizadas foram as que apresentaram melhor facilidade de uso e que resistiram á manipulação e á incubação com os meios de cultura. As vinte composições estão demonstradas na tabela 4.2.

Foram utilizados os seguintes materiais para confecção das 20 amostras:

- 1- Quitosana de médio peso molecular, grau de desacetilação  $DD \geq 75\%$ .
- 2- Poli (acetato-co-álcool vinílico de vinila) (PVA), grau de hidrólise  $GH = 80\%$ , peso molecular  $PM = 9.000-10.000g / mol$ ; e PVA de  $GH = 87-89\%$ ,  $PM = 13.000-23.000g / mol$ .
- 3- Poli (etileno-glicol) (PEG), pesos moleculares  $300g / mol$ ;  $6.000g / mol$ ;  $20.000g / mol$ .
- 4- PCL-triol (Caprolactona)  $PM = 900g / mol$ .

Todos os materiais são da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

**Tabela 4. 1** Composições das membranas compósitas.

<b>Filme</b>	<b>QUI (%)</b>	<b>PVA (%)</b>	<b>PEG (%)</b>	<b>PCL-T (%)</b>	<b>VBNP (%)</b>
<b>1</b>	45	45**	0	10	0
<b>2</b>	42,5	42,5**	5	5	5
<b>3</b>	45	37**	10 <sup>ooo</sup>	3	5
<b>4</b>	45	40*	10 <sup>oo</sup>	5	0
<b>5</b>	42	30**	20 <sup>ooo</sup>	3	5
<b>6</b>	42	30*	20 <sup>ooo</sup>	3	5
<b>7</b>	45	44**	5 <sup>o</sup>	1	5
<b>8</b>	45	45*	2 <sup>o</sup>	3	5
<b>10</b>	45	44*	5 <sup>ooo</sup>	1	5
<b>11</b>	46	44**	3 <sup>o</sup>	1	5
<b>12</b>	46	45**	3 <sup>oo</sup>	1	5
<b>13</b>	45	44*	0	1	10
<b>14</b>	50	45*	0	1	5
<b>15</b>	45	44**	5 <sup>oo</sup>	1	5
<b>16</b>	44	45*	5 <sup>o</sup>	1	5
<b>17</b>	43	43*	8 <sup>o</sup>	1	5
<b>18</b>	42	42*	10 <sup>o</sup>	1	5
<b>19</b>	39,5	39,5*	10 <sup>o</sup>	1	10
<b>20</b>	44,5	44,5*	10 <sup>o</sup>	1	0

PEG 300<sup>o</sup>; PEG 6000<sup>oo</sup>; PEG 20.000<sup>ooo</sup>; PVA 10.000\*<sup>o</sup>; PVA 23.000\*\*<sup>oo</sup>

Em todas as membranas foram utilizadas soluções de QUI á 2% (w / v), de PVA á 10% (w / v) de PEG á 10% (v / v) e VBNP (0.4g/mL). Todas as membranas ficaram até a secagem total em estufa com circulação à (40+/-2)°C por 96 horas a 40C°.

#### **4. 1. 4. Confeção das Amostras Escolhidas**

As amostras escolhidas foram as de número 18, 19 e 20 demonstradas na tabela 4.2. A QUI foi utilizada sem purificação adicional e preparada em solução de ácido acético 2%. A solução ficou sob agitação mecânica constante durante 48 horas, até a completa solubilização. Após esse período as soluções de QUI, PVA, PCL-T, e VBNP foram misturadas nas proporções citadas na tabela 4.2 e agitadas mecanicamente por duas horas. No caso das amostras com VBNP, inicialmente a dispersão de VBNP foi sonicada por 30 minutos antes de ser adicionada à solução.

A solução resultante foi transferida para placas de Petri de 90 x15 (J.Prolab, São José dos Campos, Brasil) e mantidas em estufa por 96 horas a  $(40\pm 2)^{\circ}\text{C}$ . Após este período, as membranas foram lavadas com água Milli-Q, secadas em estufa com circulação à  $(60\pm 2)^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas e armazenadas com sílica gel para uso posterior. Antes dos ensaios biológicos as membranas foram tratadas por 24 horas com meio PBS para retirada de possíveis resíduos de síntese e armazenamento. Antes dos ensaios físicos as membranas eram secadas em estufa com circulação à  $(60\pm 2)^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

#### **4. 2. Caracterizações das Membranas Compósitas**

##### **4. 2. 1. Análise Macroscópica das Membranas**

Foram realizadas análises visuais qualitativas relativas à homogeneidade ou heterogeneidade das membranas. A espessura das membranas foi obtida com o auxílio de um paquímetro. As membranas foram fotografadas por câmara fotográfica Nikon COOLPIX.

##### **4. 2. 2. Estudo Morfológico das Membranas por MEV**

A morfologia das membranas obtidas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscópio FEI-INSPECT S50 acoplado a microsonda para Espectroscopia por dispersão de energia (EDS – Electron Dispersive Spectrometry) EDAX Genesis, onde foi feita análise química qualitativa. As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 15kV. As amostras foram fixadas com glutaraldeído (2%) e secadas num dissecador a vácuo e foram cobertas com fina camada de ouro por

aspersão usando baixa taxa de deposição, refrigeradas e colocadas à máxima distância do alvo a fim de evitar danos às mesmas.

#### **4. 2. 3. Espectroscopia na Região do Infravermelho**

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (*FTIR*) foi utilizada para caracterizar a presença de grupos químicos específicos nas membranas compósitas. Este método de caracterização auxiliou na investigação da composição química dos compósitos dando-nos informações sobre a estrutura molecular a partir de espectros vibracionais pela absorção de energia para o estiramento (deformação axial) e flexão (deformação angular) das ligações entre átomos de diferentes grupos funcionais. As amostras com 0%, 5%, e 10% de VBNP foram caracterizadas utilizando um espectrómetro FTIR (Thermo scientific Fisher, Nicolet 6700). Amostras de material puro de QUI, PVA, PEG, PCL-T e VBNP foram moídos e misturados cuidadosamente com brometo de potássio, na proporção de 1:5 (Amostra: KBr). O método analítico utilizado foi o de reflectância total atenuada (ATR) que funcionam na faixa de  $600 - 4.000\text{cm}^{-1}$ , usando o acessório *OMNI Smart acessory* e 64 varreduras foram adquiridas a uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  com intervalos de  $2\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de FTIR foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas com grupos químicos. Os filmes foram tratados em estufa com circulação à  $(60\pm 2)^\circ\text{C}$  por 24 hs, antes das análises.

#### **4. 2. 4. Difração de Raios - X (DRX)**

As amostras foram submetidas à análise semiquantitativa por difratometria de raios-X realizada em um equipamento Philips-PANalytical Empyrean, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  e cristal monocromador de grafita, velocidade de varredura  $0,06^\circ 2\theta / \text{s}$ , tempo de contagem 1s, intervalo de varredura de  $4^\circ$  até  $90^\circ 2\theta$ . O método de análise se baseou na comparação dos valores das distâncias interplanares e das intensidades dos picos nos difratogramas das amostras analisadas e uma amostra de referência, utilizando o padrão do banco de dados PDF-2 do ICDD – *International Centre for Diffraction Data*.

#### **4. 2. 5. Ângulo de Contato**

O comportamento hidrofílico / hidrofóbico das membranas compósitas, com 0%, 5% e 10% de VBNP foi estimado através de medições do ângulo de contacto. Ângulos de contato ( $\theta$ ) da água sobre as amostras foram medidos em GA 15 *Contact angle analyzer*

(INEB, Porto, Portugal) em  $(25 \pm 2 \text{ } ^\circ \text{C})$  de temperatura, o método foi o de Laplace - Young. A água foi cuidadosamente gotejada (seringa, 0.5mm, 4 $\mu$ l) nas amostras e os ângulos de contacto foram determinados para 3 minutos. Os valores relatados são a média de quatro medições diferentes.

#### **4. 2. 6. Ensaios Mecânicos**

O ensaio de tração foi realizado para avaliar o comportamento mecânico (tensão máxima de tração ( $\sigma$ ), deformação específica (DE), módulo de elasticidade (E) e tenacidade (T) das membranas obtidas e foi executado em equipamento EMIC DL 3000, utilizando célula de carga de 50N obedecendo as especificações da ASTM D882, a velocidade do ensaio foi de 5mm / min, temperatura ambiente. Os corpos de prova foram utilizados na forma de gravata com razão mínima de 8 entre a largura e a espessura. As amostras usadas foram previamente analisadas e qualquer descontinuidade tal como bolha de ar ou furos foram descartadas.

#### **4. 2. 7. Análise Termogravimétrica**

O estudo do comportamento térmico das membranas foi realizado utilizando a termogravimetria (TGA). A análise foi realizada em Shimadzu TG / DTA DTG-60 utilizando uma massa média de 6,262mg, 7,930mg e 6,198mg para as membranas com 0%, 5% e 10% de VBNP respectivamente. As amostras foram colocadas num porta-amostras de platina e foram aquecidas a uma taxa de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ , a partir de uma temperatura de  $20^\circ\text{C}$  até  $600^\circ\text{C}$  numa atmosfera de  $\text{N}_2$  com uma vazão de  $30 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### **4. 2. 8. Ensaio de Degradação em Meio de Cultura Celular**

Para determinar a taxa de degradação em meio de cultura DMEM e PBS (componentes do meio DMEM e tampão PBS estão no anexo I, II e III respectivamente), amostras em triplicata de membranas compósitas, com 0%, 5% e 10% de VBNP de igual formato foram secadas em estufa com circulação à  $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$  por 24h. Depois, foram pesadas ( $M_0$ ), antes de serem imersas em PBS (pH = 7,4) por 24 horas, após este período as amostras foram imersas em DMEM (pH = 7,4) durante diferentes períodos de tempo (2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 e 21 dias), em estufa 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Após a imersão, as amostras foram cuidadosamente removidas do meio e tratadas em estufa durante 24 horas a  $60^\circ\text{C}$ . Depois, deste período as amostras foram pesadas ( $M_F$ ). O índice de degradação (ID) foi

calculado como indicado na equação  $ID (\%) = (M_0 - M_F/M_0) \times 100$ . Os valores relatados são a média de 3 amostras ( $n = 3$ ). Morfologia estrutural das membranas compósitas foi examinada utilizando microscópio electrónico de varredura a 15kV de intensidade, microscópio FEI-INSPECT S50, acoplado a microssonda para Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS – Electron Dispersive Spectrometry) EDAX Genesis. As análises foram realizadas antes da degradação e nos dias 3, 7, 14 e 21 do ensaio.

As amostras degradadas foram também submetidas a análise semiquantitativa por difratometria de raios-X no vigésimo primeiro dia da degradação. Entretanto as amostras antes de serem analisadas foram imersas em água Milli-Q, esse procedimento foi necessário devido ao grande número de irregularidades nas amostras após a degradação o que dificultou uma análise precisa das amostras.

A análise foi realizada em um Philips-PANalytical Empyrean, utilizando radiação  $CuK\alpha$  e cristal monocromador de grafita, velocidade de varredura  $0,06^\circ 2\theta / s$ , tempo de contagem 1s, intervalo de varredura de  $4^\circ$  até  $90^\circ 2\theta$ . O método de análise se baseou na comparação dos valores das distâncias interplanares e das intensidades dos picos nos difratogramas das amostras analisadas e uma amostra de referência, utilizando o padrão do banco de dados PDF-2 do ICDD – *International Centre for Diffraction Data*.

A espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (*FTIR*), também foi utilizada para caracterizar a presença de grupos químicos específicos nas membranas compósitas após a 21 dias de degradação. Este método de caracterização auxiliou na investigação da composição química dos compósitos após a degradação.

#### **4. 2. 9. Estudo da Bioatividade**

Os testes foram realizados em triplicatas, para cada uma das composições das membranas compósitas (0%, 5% e 10% de VBNP). Os testes de bioatividade foram realizados submergindo as amostras em *Simulated body fluid* (SBF), preparado conforme a norma ISO/FDIS 23317:2007(E). O SBF foi preparado com a dissolução de 7,995 g de NaCl, 0,353g de  $NaHCO_3$ , 0,224g de KCl, 0,228g de  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ; 0,305g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0,227g de  $CaCl_2$  e 0,071 g de  $Na_2SO_4$ , todos da Synth Brasil, em água destilada. As amostras, após serem devidamente cortadas e tratadas em estufa com circulação à  $(60 \pm 2)^\circ C$  por 24h. Após, cada amostra foi colocada dentro de

um tubo falcon de 50mL e foram adicionados 40mL de SBF obedecendo à relação entre a área superficial da amostra ( $A_s$ ) em milímetros quadrados e o volume de solução de SBF ( $V_s$ ) em mililitros dada por:  $V_s = A_s / 10$ . As amostras foram completamente submersas no líquido. Os frascos contendo as amostras foram colocados em banho-maria à  $(37\pm 2)^\circ\text{C}$  por 7 dias. Após o tempo especificado, as amostras foram removidas e lavadas três vezes com água deionizada para remover os minerais adsorvidos. Em seguida, as amostras foram secadas em temperatura ambiente, seccionadas, preparadas e analisados.

A morfologia das membranas obtidas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura, microscópio FEI-INSPECT S50 acoplado a microsonda para Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS – Electron Dispersive Spectrometry) EDAX Genesis, onde foi feita análise química qualitativa. As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 15kV.

As amostras também foram submetidas a análise semiquantitativa por difratometria de raios-X. Entretanto, essas amostras como no caso do ensaio de degradação, também antes de serem analisadas foram imersas em água Milli-Q, esse procedimento foi necessário devido ao grande número de irregularidades nas amostras após a degradação o que dificultou uma análise precisa das amostras. A análise foi realizada em um Philips-PANalytical Empyrean utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  e cristal monocromador de grafita, velocidade de varredura  $0,06^\circ 2\theta / \text{s}$ , tempo de contagem 1s, intervalo de varredura de  $4^\circ$  até  $90^\circ 2\theta$ . O método de análise se baseou na comparação dos valores das distâncias interplanares e das intensidades dos picos nos difratogramas das amostras analisadas e uma amostra de referência, utilizando o padrão do banco de dados PDF-2 do ICDD – *International Centre for Diffraction Data*.

### **4. 3. Extração e Caracterização de Células do Ligamento Periodontal Humano**

#### **4. 3. 1. Cultura de Células do Ligamento Periodontal Humano**

Os experimentos foram realizados utilizando dentes humanos com indicação ortodôntica de extração. Os dentes extraídos foram lavados uma vez em solução Dulbecco's phosphate-buffered salina sem cálcio e magnésio (PBS) (GibcoBRL, NY, USA). Depois foram imersos em 4mL de solução digestiva contendo: 2 mg/mL de

colagenase tipo II (Gibco-Invitrogen Corporation, NY, USA), 0,25% de tripsina (DIFCO Laboratories, MI, USA) em 20 mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, NY, USA) por 30 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida foram feitas mais quatro digestões de 20 minutos cada, em estufa nas mesmas condições citadas anteriormente.

A primeira digestão foi descartada, pois possuía alto conteúdo de hemácias, as quatro últimas digestões foram centrifugadas em 1000g (1440 rpm) por cinco minutos cada. Após a centrifugação as células foram ressuspensas em frascos de cultura T25 (Nunc products, Naperville) criando assim quatro populações celulares que foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura celular utilizado foi o DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, NY, USA) complementado com 1% de PSA (Penicilina, Estreptolisina e Antimicótico) (Gibco BRL, NY, USA) e foi trocado a cada três dias de cultura.

Quando as caixas de cultura atingiram confluência na faixa de 90%, foram tripsinizadas, repicadas e passadas para caixas de cultura T75 criando assim mais três populações de células da primeira passagem. Células da segunda e terceira passagem foram utilizadas nos experimentos.

#### **4. 3. 2. Crescimento Celular**

Para determinar a taxa de crescimento das células PDLH foi utilizada a técnica de exclusão de células não vitais coradas por azul de Trypan (Sigma, Co, USA). As populações de células da segunda passagem, foram plaqueadas inicialmente com  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>3</sup> por poço em placas de 24 poços TPP (Switzerland) e foram sincronizadas por 24 horas com meio DMEM sem soro fetal bovino. Após esse tempo o meio sem soro foi trocado por meio DMEM com soro. O experimento foi realizado em triplicatas e as contagens realizadas após 24, 48 e 72 horas, permitindo estabelecer o crescimento das populações celulares. Células com meio DMEM sem soro também foram utilizadas como controle. As células foram tripsinizadas e contadas.

Para a contagem, foi utilizada 1µL da suspensão celular que foi adicionada a 1µL de azul de Trypan e 8µL de PBS. Esta suspensão celular foi transferida para a câmara de Neubauer com auxílio de uma micropipeta e as células foram contadas, excluindo-se

aquelas que se apresentaram coradas de azul (células não viáveis). Para o cálculo do número de células foi utilizada a equação matemática:  $NC \times D \times 10^4 / \#Q$ , onde NC = número de células vitais contadas; D= diluição da amostra (= 10) e #Q = número de quadrados da câmara de Neubauer (= 4) usados para contagem das células. Os dados foram analisados utilizando o programa Prism software (Prism Software Corporation, Irvine CA, USA).

#### **4. 3. 3. Morfologia Celular**

Para determinar a morfologia celular foi utilizada a técnica histoquímica de Feulgen [163]. As populações de células PDLH da segunda passagem, foram plaqueadas inicialmente com  $1 \times 10^4$  células /  $cm^3$  por poço em lamínulas em placas de 6 poços TPP (Switzerland) e foram sincronizadas por 24 horas com meio DMEM sem soro fetal bovino. Após esse tempo o meio sem soro foi trocado por meio DMEM com soro.

Após 72 horas as lamínulas foram lavadas rapidamente com PBS e fixadas com paraformoldeído 4% por 20 minutos e permeabilizadas com triton [0,5%] diluído em PBS 3X, por 5min. Depois as lamínulas foram hidrolisadas com HCL 1N por 30 minutos em estufa a 65°C, lavadas com água destilada e incubadas com reativo de Schiff por 30 minutos, lavadas com água sulfurosa e depois lavadas com água destilada.

Depois foram incubadas com verde luz por 20 segundos, lavadas com água corrente, desidratadas em álcool 70°, 80°, 90°, 95° e absoluto por 5 minutos, passadas no xilol e montadas. O experimento foi realizado em triplicata (n = 3). As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Nikon, Japão).

#### **4. 3. 4. RT-PCR para Genes de Tecido Periodontal**

O RNA total de células PDLH foram extraídos utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) e o método desenvolvido por CHOMCZYNSKI e SACQUI em 1987, quantificado por espectrofotometria a 260nm (Thermo Spectronic) e armazenado a -80°C até seu uso.

O cDNA foi produzido com o kit First-Strand Cdna Syntesis (Fermentas) de acordo com especificações do fabricante. Foram primeiro misturados 2µg de RNA de cada população celular mais 1µL de oligo (dT) primer e completado o volume para 11 µL de água tratada DEPC. Essa mistura foi incubada por 5 min a 65°C.

Após esse tempo foram adicionados os seguintes componentes: 4 µL de tampão da reação [5X], 1µL de RiboLock RNase inibidor [20u/µL], 2µL de dNTP mix [10mM], 2µL de Transcriptase Reversa [20u/µL]; o volume total foi de 20 µL por amostra. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C, após esse tempo as amostras ficaram 10 minutos a 70° C para desnaturação enzimática.

As amostras foram estocadas a -20°C. Oligonucleotídeos primers RT-PCR para genes humanos do tecido periodontal: Periostin, Cólgeno tipo α I (COL α I), Osteocalcina (OC), Fosfatase Alcalina (ALP), RUNX2, CP-23 e F-Spondin. Para células tronco mesenquimais: CD166, CD105. GAPDH foi utilizado como banda controle. Os Oligonucleotídeos primers foram fabricados para utilização neste protocolo pela (Prodimol Biotecnologia S/A; MG, Brasil). (Tabela 4.2).

**Tabela 4. 2:** Oligonucleotídeos primers RT-PCR para os genes Periostin, COL α I, OC, ALP, CD166, CD105, RUNX2, F-Spondin, GAPDH.

Gen	Sequência (F)	Sequência (R)	(pb)
<b>Periostin</b>	5'-actctttgctcccaccaatg-3'	5'-tgatctcgcggaatatgtga- 3	665
<b>Col α I</b>	5'-cactggtgctaagggagagc-3'	5'-ctccagcctctccatctttg-3'	521
<b>OC</b>	5'-gtgcagagtccagcaaaggt-3'	5'-tcagccaactcgtcacagtc-3'	175
<b>ALP</b>	5'-aagtactggcgagaccaa gc-3'	5'-agagggccacgaagggaact-3'	214
<b>CD166</b>	5'-caagacaaccaaggctgaca-3'	5'-cgcagacatagttccagca-3'	557
<b>CD105</b>	5'-agaggtgcttctggtcctca-3'	5'-agttccacctcaccgtcac-3'	441
<b>RUNX2</b>	5'-gtggacgaggcaagagttca-3'	5'-tggcaggtaggtatggtagtg-3'	638
<b>F-Spondin</b>	5'-ggaattggtccgagaagaagaca-3'	5'-gggtttgttggtgactcat-3'	2141
<b>CP-23</b>	5'-atgggcacatcaagcactga-3'	5'-cccattagtgtcatcctgc-3'	741
<b>GAPDH</b>	5'- gtcagtgggtggacctgacct-3'	5'-aggggtctacatggcaactg-3'	420

A reação de PCR foi realizada com o termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA) utilizando 0.5µL de cDNA, 0.2mM de dNTPs, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mL de Taq DNA polimerase e 0.4M de cada um dos primers específicos citados na tabela anterior para um volume final de 20µL completados com água DEPC. Foi utilizada a técnica de amplificação de GAPDH como sequência de amplificação controle em relação aos genes propostos nesse trabalho. As temperaturas de anelamento foram de 60°C para Periostin, CP-23, F-Spondin, COL α I, ALP, CD166, CD105 e GAPDH, e de 65°C para OC e RUNX2, todos com 30 ciclos.

#### **4. 4. Análise do Comportamento de Células do Ligamento Periodontal Humano em Contato Direto com Nanopartículas de Vidro Bioativo Produzidas pelo Método Stöber**

Todos os testes biológicos foram realizados de acordo com a norma ISO 10993. Em todos os ensaios o material na forma de pó foi esterilizado por radiação ultravioleta por 30 minutos e na forma de membrana por 30 minutos de cada lado.

##### **4. 4. 1. Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina**

As células PDLH foram semeadas ( $1 \times 10^4$  células / cm<sup>3</sup> poço) em placas de 24 poços. As populações celulares foram sincronizadas com meio sem soro durante 24 horas. Após esse período o meio foi trocado por meio com 10% de SFB. Foi utilizado 0,1mg/mL de amostra de VBNP para cada poço tratado. Foram utilizados controles referência com células e meio DMEM com 10% de SFB, controle positivo PBS (2X) e como controle negativo lascas estéreis de eppendorf (0,1mg / mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3). Após 72 horas todo o meio foi aspirado e trocado por 900 µL de meio de cultura com soro em cada poço. Foram acrescentados 100 µL de Resazurina (0,01mg / mL; SIGMA-ALDRICH, em cada poço e incubadas por 16 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram removidos 100 µL de cada poço e transferidos para placas planas de 96 poços e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com dois filtros de 570 nm e 590nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula: Viabilidade celular (%) = (absorbância PDLH em amostras x 100) / (absorbância do controle). Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de viabilidade celular.

#### 4. 4. 2. Proliferação Celular por (BrdU)

Células PDLH de segunda passagem foram tripsinizadas e semeadas ( $1 \times 10^2$  células /  $\text{cm}^3$  por poço) em placas de 96 poços. As populações celulares foram sincronizadas com meio sem soro durante 24 horas, após esse período o meio foi aspirado e trocado por meio com 10% SFB. Foi utilizado 0,1mg/ mL de amostra de VBNP para cada poço tratado. Foram utilizados controles da mesma maneira que no ensaio de resazurina. Após 72 horas as células foram marcadas com 10 $\mu$ L de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, Kit III, Roche) por poço e incubadas por 2 horas a 37°C. Após esse tempo as células foram fixadas por trinta minutos e depois incubadas com 100 $\mu$ L de nucleases por poço, por trinta minutos a 37°C. Em seguida foram adicionados 100 $\mu$ L de anti-BrdU por poço, por trinta minutos e após foram adicionados 100 $\mu$ L por poço de substrato de peroxidase até atingir a cor de fundo verde. Após a incorporação do substrato colorimétrico as amostras foram quantificadas em intervalos de 10 minutos por duas vezes usando o leitor ELISA (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com filtro de 405nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula: proliferação celular (%) = (absorbância PDLH em amostras x 100) / (absorbância do controle). Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de proliferação celular. Os experimentos foram realizados com n = 5 para cada leitura e foram analisados estatisticamente com ajuda do programa PRISM; One Way/ ANOVA/ Bonferroni (GrapHAD, San Diego, CA).

#### 4. 4. 3. Atividade da Fosfatase Alcalina

A análise quantitativa da atividade da ALP foi realizada bioquimicamente usando 5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate - nitroblue tetrazolium (BCIP / NBT) como substrato. Este ensaio baseia-se no princípio de que os cromógenos BCIP e NBT reagem com a fosfatase alcalina, onde o BCIP é hidrolisado e o NBT é reduzido formando um produto azul escuro [164]. O ensaio foi realizado no *pellet* celular após sete dias de cultura celular. As células PDLH de segunda passagem foram tripsinizadas e semeadas ( $1 \times 10^2$  células/ $\text{cm}^3$  por poço) em placas de 24 poços. As populações celulares foram sincronizadas com meio sem soro durante 24 horas, após esse período o meio foi aspirado e trocado por meio com 10% de SFB. Foi utilizado 0,1mg / mL de

amostra de VBNP para cada poço tratado. Após 7 dias a camada de células foi lavada duas vezes com PBS. Em seguida, 200 ml de BCIP-NBT (Invitrogen) preparado de acordo com o protocolo do fabricante foi adicionado a cada poço. Após 2 horas de incubação e foram adicionados 210 µl de HCl a 10% de SDS e incubados durante 18 horas. A densidade óptica foi medida utilizando ADAP 1.6 software espectrofotômetro (Anthos Zenith 200, Anthos Labtec, Salzburg, Suécia), com um filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual da atividade da ALP de acordo com a seguinte fórmula: Atividade ALP (%) = (absorbância PDLH em amostras x 100) / (absorbância do controle). Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de atividade da ALP.

#### **4. 5. Análise do Comportamento de Células do Ligamento Periodontal Humano em Contato com as Membranas Compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL Contendo Nanopartículas de Vidro Bioativo pelo Método Coprecipitação**

Todos os testes biológicos foram realizados de acordo com a norma ISO 10993

Todas as placas usadas nos ensaios biológicos foram previamente tratadas com 0,67µl / cm<sup>2</sup> por poço de Poli (2 - hidróxi-etil-metacrilato) por 48 horas em estufa a 37°C, para evitar que as células PDLH aderissem à placa e não aderissem na membrana.

##### **4. 5. 1. Ensaio de Proliferação Celular com VBNP em Contato Direto**

Para determinar a proliferação celular foi utilizada a técnica histoquímica de Feulgen específica para DNA. Esse ensaio foi realizado preliminarmente com células PDLH utilizando somente VBNP na forma de partículas. As populações de células PDLH da segunda passagem, foram plaqueadas inicialmente com 1 X10<sup>4</sup> células / cm<sup>3</sup> por poço em lamínulas em placas de 6 poços TPP (Switzerland) e foram sincronizadas por 24 horas com meio DMEM sem soro fetal bovino. Após esse tempo o meio sem soro foi trocado por meio DMEM com soro para a condição controle e com 0,1mg /mL de VBNP para a condição tratada. Após 72 horas as lamínulas foram lavadas rapidamente com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos e permeabilizadas com triton [0,5%] diluído em PBS 3X, por 5min. Depois as lamínulas foram hidrolisadas com HCl 1N por 30 minutos em estufa a 65°C, lavadas com água destilada e incubadas com reativo de Schif por 30 minutos, lavadas com água sulfurosa, depois lavadas com

água destilada. Depois foram incubadas com verde luz por 20 segundos, lavadas com água corrente, desidratadas em álcool 70°, 80°, 90°, 95° e absoluto por 5 minutos, passadas no xilo e montadas. O experimento foi realizado em triplicata (n = 3). As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Nikon, Japão).

#### **4. 5. 2. Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina**

As membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de VBNP foram cortadas com o diâmetro de 8mm e esterilizadas por radiação UV, 30 minutos de cada lado. As membranas foram colocadas em placas de 24 poços com 1mL de PBS a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período o PBS foi descartado e as células PDLH de segunda passagem foram tripsinizadas e semeadas nas membranas (1 X 10<sup>4</sup> células/cm<sup>3</sup> por poço). As populações celulares foram sincronizadas com meio sem soro durante 24 horas. Foram utilizados controles referência com células e meio DMEM com 10% de SFB, controle positivo PBS (2X) e como controle negativo lascas estéreis de eppendorf (1mg/ mL). Foi também utilizado meio DMEM puro com 10% de SFB como controle. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=3). Após 72 e 168 horas todo o meio foi aspirado e trocado por 900 µL de meio de cultura com soro em cada poço. Foram acrescentados 100 µL de Resazurina (0,01mg / mL; SIGMA-ALDRICH, em cada poço e incubadas por 16 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Depois, foram retirados 100µL de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços plana e a quantificação da fluorescência foi feita em Varioskan Reader (Thermo Scientific) com filtro de 570nm a 585nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula: Viabilidade celular (%) = (fluorescência PDLH em amostras x 100) / (fluorescência do controle). Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de viabilidade celular.

#### **4. 5. 3. Proliferação Celular por (BrdU)**

As membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de VBNP foram cortadas com o tamanho de acordo com o poço da placa de cultura e foram esterilizadas por radiação UV, 30 minutos de cada lado. As membranas foram colocadas em placas de 96 poços com 200µL de PBS a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período as células PDLH de segunda passagem foram tripsinizadas e semeadas nas membranas (1 X 10<sup>2</sup> células / cm<sup>3</sup> por poço). As populações celulares foram sincronizadas com meio sem

soro durante 24 horas, após esse período o meio foi aspirado e trocado por meio com 10% SFB. Foram utilizados controles da mesma maneira que no ensaio de resazurina. Após 72 horas as células foram marcadas com 10 $\mu$ L de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, Kit III, Roche) por poço e incubadas por 2 horas a 37°C. Após esse tempo as células foram fixadas por trinta minutos e depois incubadas com 100 $\mu$ L de nucleases por poço, por trinta minutos a 37°C. Em seguida foram adicionados 100 $\mu$ L de anti-BrdU por poço, por trinta minutos e após foram adicionados 100 $\mu$ L por poço de substrato de peroxidase até atingir a cor de fundo verde. Após a incorporação do substrato colorimétrico as amostras foram quantificadas em intervalos de 10 minutos por duas vezes usando o leitor ELISA (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com filtro de 405nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula: proliferação celular (%) = (absorbância PDLH em amostras x 100) / (absorbância do controle). Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de proliferação celular. Os experimentos foram realizados com n = 5 para cada leitura e foram analisados estatisticamente com ajuda do programa PRISM; One Way/ ANOVA/ Bonferroni (GrapHAD, San Diego, CA).

#### **4. 5. 4. Atividade da Fosfatase Alcalina**

A análise quantitativa da atividade da ALP foi realizada bioquimicamente usando 5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate - nitroblue tetrazolium (BCIP / NBT) como substrato. O ensaio foi realizado no sobrenadante e no *pellet* celular nos dias 3 e 7 de cultura celular. As membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de VBNP foram cortadas de acordo com o diâmetro do poço da placa de 24 poços e foram esterilizadas por radiação UV, 30 minutos de cada lado. As células PDLH de segunda passagem foram tripsinizadas e semeadas nas membranas (1 X 10<sup>2</sup> células/mm<sup>3</sup> por poço) em placas de 24 poços. As populações celulares foram normalizadas com meio sem soro durante 24 horas, após esse período o meio foi aspirado e trocado por meio com 10% de SFB. Após 3 e 7 dias o sobrenadante de cada poço foi removido e a camada de células foi lavada duas vezes com PBS. Em seguida, 200 ml de BCIP-NBT (Invitrogen) preparado de acordo com o protocolo do fabricante foi adicionado a cada poço. Após 2 horas de incubação e foram adicionados 210  $\mu$ l de HCl a 10% de SDS e incubados durante 18 horas. A densidade óptica foi medida utilizando ADAP 1.6 software

espectrofotômetro (Anthos Zenith 200, Anthos Labtec, Salzburg, Suécia), com um filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual da atividade da ALP de acordo com a seguinte fórmula: Atividade ALP (%) = (absorbância PDLH em amostras x 100) / (absorbância do controle). Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de atividade da ALP.

#### **4. 5. 5. Morfologia das Células PDLH nas Membranas Compósitas**

Nesse experimento foi utilizada somente a membrana com 5% de VBNP. As amostras foram cortadas de acordo com tamanho da placa de cultura de 6 poços e esterilizadas por radiação UV, 30 minutos de cada lado. As membranas foram colocadas em placas de 6 poços com PBS a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período o PBS foi descartado e as células PDLH de segunda passagem foram tripsinizadas e semeadas nas membranas (1 X 10<sup>4</sup> células / cm<sup>3</sup> por poço). Controles para a microscopia óptica foram utilizados em poços sem membranas e com células PDLH. Para preparação da microscopia eletrônica de varredura foi utilizada a técnica do duplo ósmio com posterior desidratação com graus ascendentes de etanol, secas em ponto crítico, revestidas com 15 nm de ouro e examinadas por microscopia eletrônica de varredura. As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Nikon, Japão). Morfologia das células na amostra com 5% de VBNP foi examinada utilizando microscópio eletrônico de varredura a 15kV de intensidade, microscópio FEI-INSPECT S50.

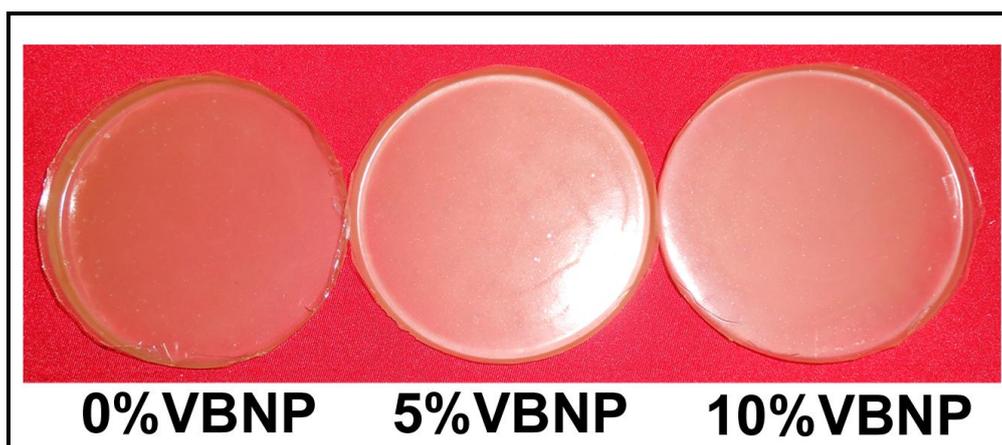
## 5. RESULTADOS

Todos os resultados foram analisados estatisticamente utilizando Software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A significância foi avaliada por meio do teste t Student One-way ANOVA-Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 5. 1. Caracterizações das Membranas Compósitas

#### 5. 1. 1. Análise Macroscópica das Membranas

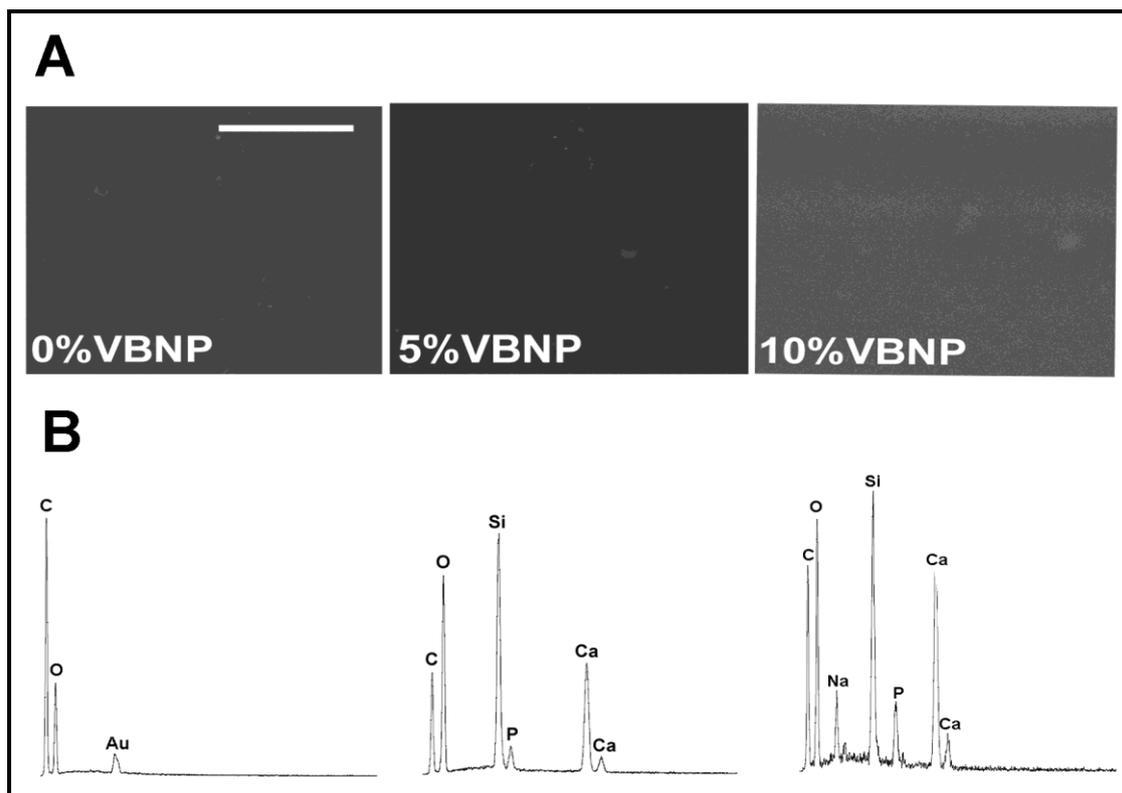
A partir da análise visual, foi possível verificar que os filmes com 0%, 5% e 10% de VBNP apresentavam aspecto semelhante com coloração amarela clara transparente, de espessura variando de 0,280 a 0,090 mm (Figura 5.1).



**Figura 5. 1.** Análise macroscópica das membranas compósitas com adição de 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado.

#### 5. 1. 2. Estudo morfológico das Membranas por MEV

A morfologia das membranas compósitas foram analisadas por MEV, observou-se que as três amostras apresentaram morfologia similar (Figura 5. 2. A). A análise qualitativa por EDS mostrou a presença de Si, Ca, P nas amostras de compósitos com 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado o que comprova a presença qualitativa de vidro nas duas amostras (Figura 5. 2. B)



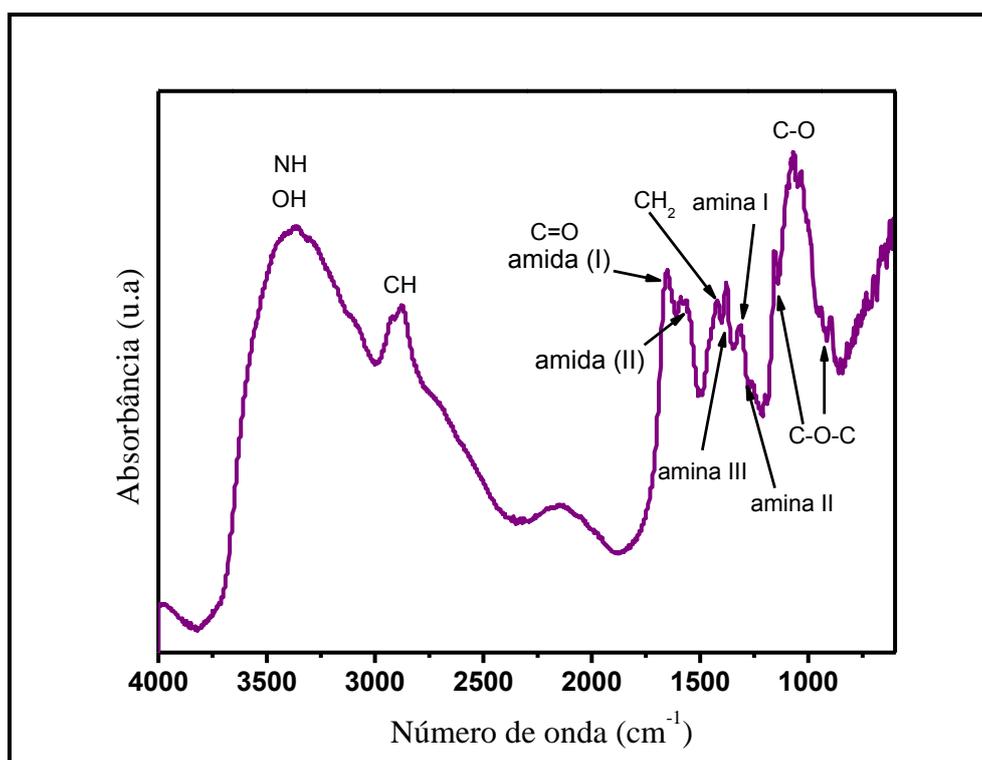
**Figura 5. 2.** Estudo morfológico das membranas por microscopia eletrônica de varredura. (A) Aspecto morfológico das amostras. (B) Análise EDS das amostras (600X, barra = 50  $\mu\text{m}$ ).

### 5. 1. 3. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros das amostras da QUI, PVA, PEG, PCL-T e VBNP foram analisados primeiro separadamente para análise dos polímeros e o vidro bioativo utilizados na síntese das membranas. Posteriormente as membranas compósitas contendo 0%, 5% e 10% de VBNP foram analisadas e comparadas com espectros dos materiais acima citados.

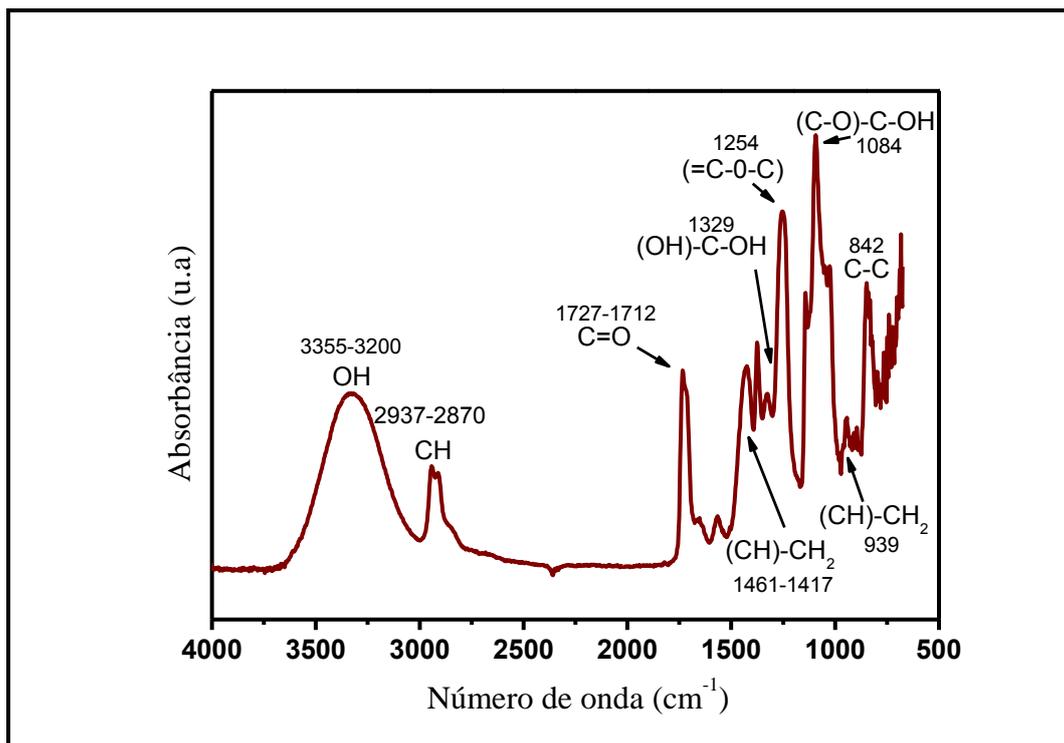
A figura. 5.3 apresenta o espectro de infravermelho da quitosana com GD =75% obtida a partir de uma pastilha de QUI/KBr. A quitosana apresenta bandas características bastante específicas e que facilitam sua identificação quando submetida à espectroscopia no infravermelho. O espectro de infravermelho apresenta um ampla banda de absorção em  $3360\text{cm}^{-1}$ , que está associado ao N-H e ao estiramento O-H. Apresenta para o grupo C-H as bandas características de estiramento em  $2940\text{cm}^{-1}$  (com menor intensidade) e de vibração assimétrica em  $2890\text{cm}^{-1}$  (com maior intensidade). Apresenta também clara deformação angular de  $\text{CH}_2$  (tesoura) na banda de  $1421\text{cm}^{-1}$ .

As fortes vibrações de dobramento da ligação N-H primária, secundária e terciária aparecem nas bandas de  $1319\text{cm}^{-1}$ ,  $1260\text{cm}^{-1}$ ,  $1370\text{cm}^{-1}$  respectivamente. As vibrações correspondentes à estrutura sacarídea (C-O-C) aparecem em  $1160\text{cm}^{-1}$  e  $893\text{cm}^{-1}$ . Também é possível observar a presença das bandas correspondentes ao estiramento de C-O cíclico em  $1060\text{cm}^{-1}$  e  $1020\text{cm}^{-1}$  [21;26].



**Figura 5. 3.** Espectro de FTIR da Quitosana.

A figura 5.4 mostra o espectro típico do PVA. O espectro de infravermelho apresenta uma ampla banda de absorção em  $3344\text{cm}^{-1}$ , que está associada ao estiramento de O-H. Apresenta para a ligação de C-H as bandas de estiramento em  $2939\text{cm}^{-1}$  (com maior intensidade) e em  $2906\text{cm}^{-1}$  (com menor intensidade). Apresenta para a ligação de C=O banda de estiramento em  $1728\text{cm}^{-1}$  que pertence ao grupo acetato encontrado no polímero PVA parcialmente hidrolisado. Apresenta bandas de deformação angular de (CH)-CH<sub>2</sub> em  $1425\text{cm}^{-1}$  e em  $939\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 5. 4.** Espectro de FTIR do Poli (álcool vinílico).

Para o PEG, as absorções características são uma banda intensa em  $1110 \text{ cm}^{-1}$  devida ao estiramento assimétrico C-O-C e bandas relativas ao estiramento C-H a  $2882 \text{ cm}^{-1}$ . Também são observadas as bandas de deformação angular de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> a  $1466$  e  $1340 \text{ cm}^{-1}$  respectivamente [28] (Figura 5.5).

O espectro do PCL-T apresenta as bandas relativas ao estiramento assimétrico do CH<sub>2</sub> em  $2938 \text{ cm}^{-1}$ , ao estiramento simétrico do CH<sub>2</sub> em  $2865 \text{ cm}^{-1}$ , ao estiramento do C=O em  $1728 \text{ cm}^{-1}$ , ao estiramento assimétrico C-O-C em  $1234 \text{ cm}^{-1}$  e à deformação axial assimétrica C(=O)-O em  $1158 \text{ cm}^{-1}$ . A banda larga, observada para a PCL-T em  $3452 \text{ cm}^{-1}$  é relacionada a hidroxilas livres, e um pequeno ombro em  $3247 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída às hidroxilas formando ligações de hidrogênio intramoleculares [28] (Figura 5.6).

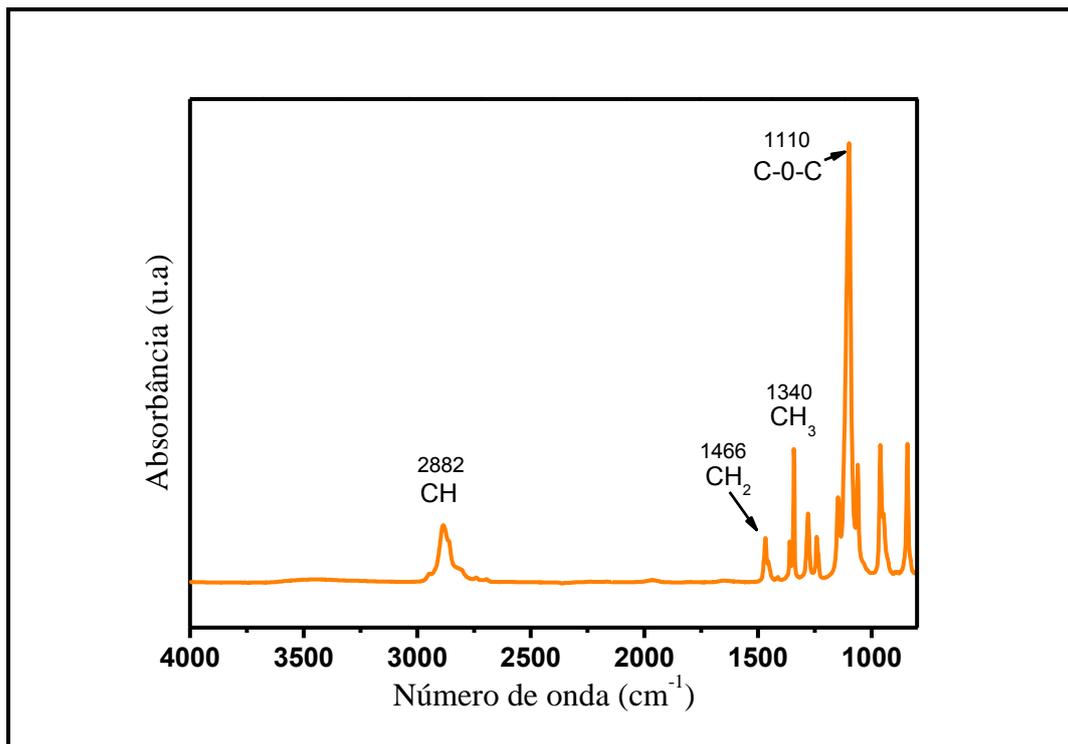


Figura 5. 5. Espectro de FTIR do Poli (etileno glicol).

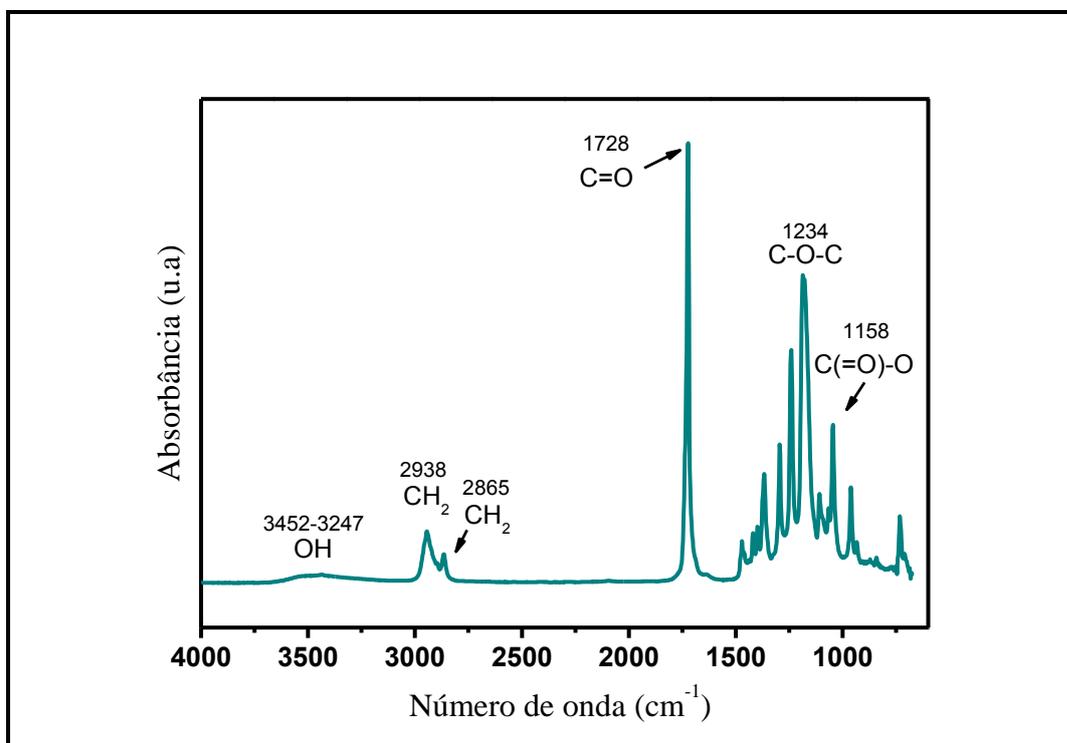
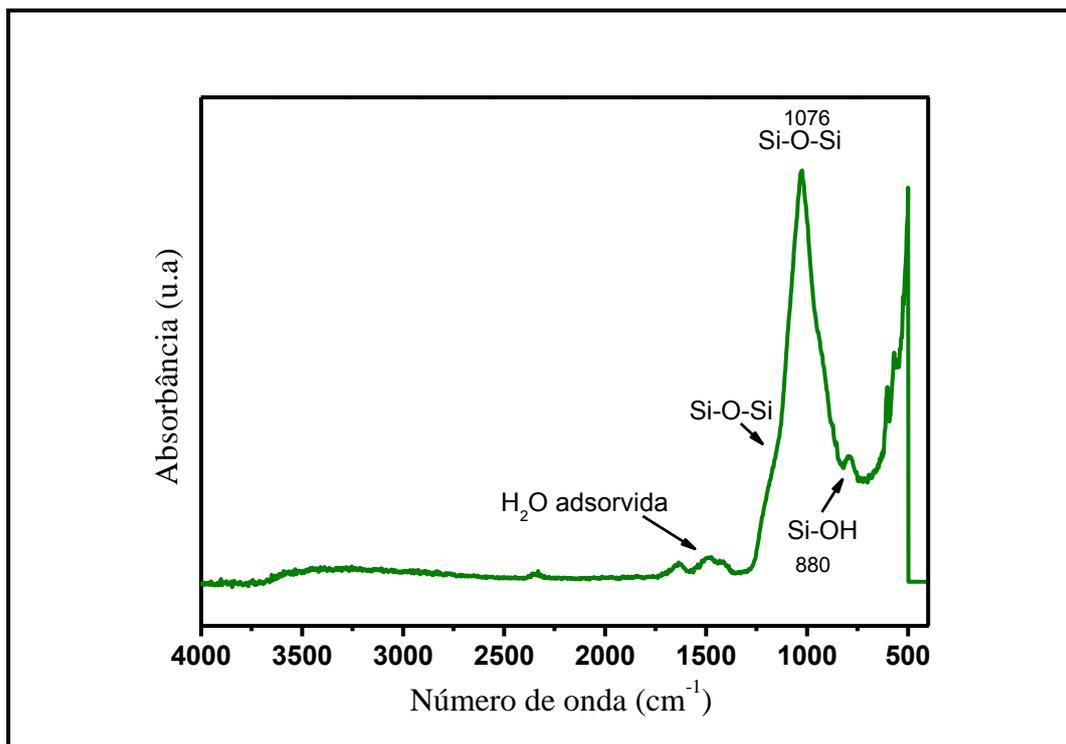


Figura 5. 6. Espectro de FTIR da Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) triol.

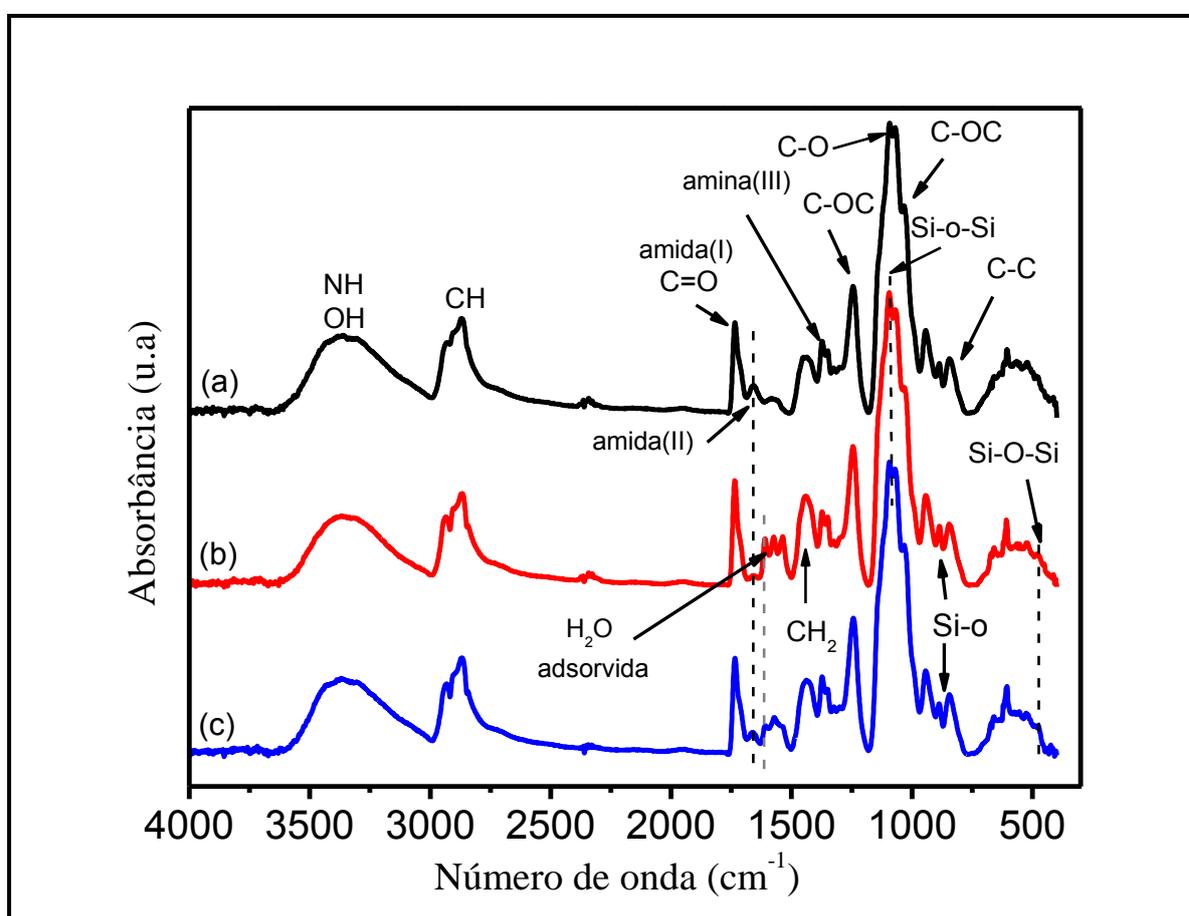
Na Figura 5.7 são apresentados os espectros de infravermelho das nanopartículas de vidro bioativo. Entre 1350 e 850  $\text{cm}^{-1}$  existe uma banda larga que inclui: o estiramento assimétrico do Si-O-Si em 1076  $\text{cm}^{-1}$ , o estiramento de Si-O em  $[\text{SiO}^{-2} / \text{Ca}^{2+}]$  a 960-985  $\text{cm}^{-1}$  e (iv) o dobramento de OH e o estiramento de Si-O em Si-OH a 880  $\text{cm}^{-1}$  [41].



**Figura 5. 7.** Espectro de FTIR do vidro bioativo nanoparticulado.

A figura 5.8 apresenta os espectros das membranas nanocompósitas contendo 0%, 5% e 10% de VBNP. Observa-se na figura as bandas características da quitosana e do PVA em todas as amostras. Para os espectros das três amostras, a banda larga observada entre 3100 e 3600  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída às vibrações de estiramento de diversos grupos hidroxil: estiramento dos grupos O-H superficiais que fazem Ligação de Hidrogênio com as moléculas de água; estiramento CO-H nas cadeias de PEG, PCL-T e PVA; e, para as amostras que contém VBNP, superposição das vibrações de estiramento das ligações SiO-H. O estiramento do grupo C-H pode ser observado entre 2800-2930  $\text{cm}^{-1}$ . A banda de absorção em aproximadamente 1724  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento do C=O dos grupos acetatos do PCL-T e dos acetatos não hidrolisados do polímero PVA.

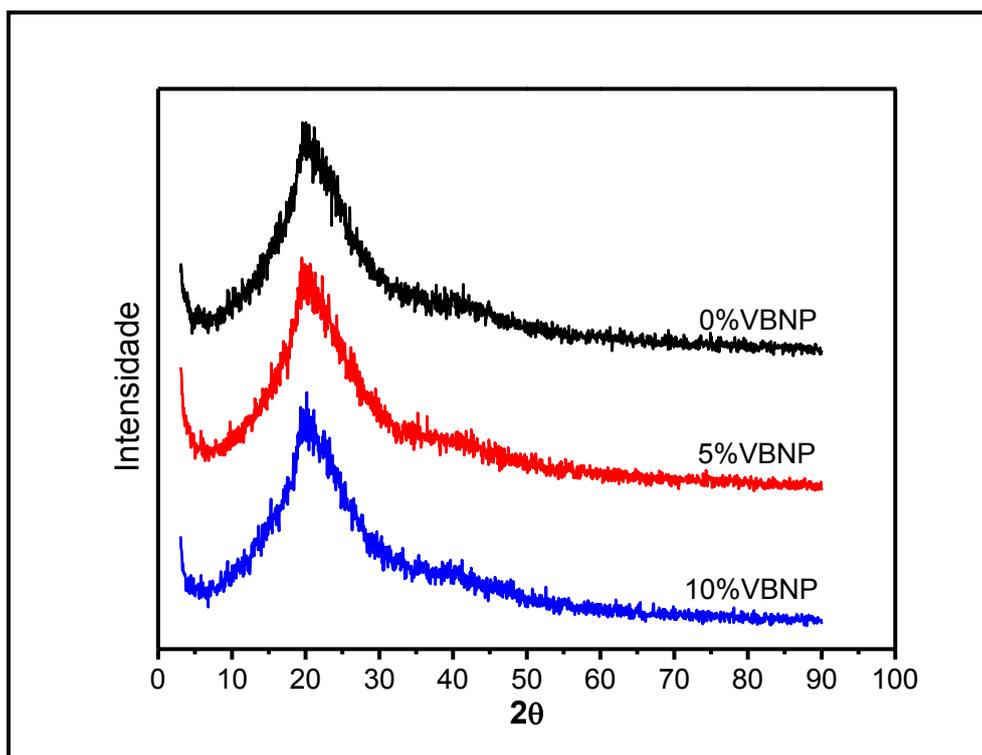
A interação entre as fases orgânica e inorgânica das membranas contendo vidro bioativo pode ser fraca, elas podem partir de interações de van der Waals ou ligações de hidrogênio, ou forte, a partir ligações covalentes. A presença de ligações Si-O-C na faixa de 1000 a 1100  $\text{cm}^{-1}$  é documentada na literatura, correspondendo à ligação covalente entre o vidro e a quitosana, e de ligações Si-O-C em 830  $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo à ligação covalente entre vidro e PVA [28]. No entanto, a presença de bandas sobrepostas de grupamentos de vários materiais, tanto na faixa de 1000 a 1100  $\text{cm}^{-1}$  quanto na faixa de 842 a 760  $\text{cm}^{-1}$  dificultam essa interpretação. A banda de 456  $\text{cm}^{-1}$  que aparece nas amostras com vidro é atribuída segundo a literatura ao estiramento do Si-O-Si [140].



**Figura 5. 8.** Espectro de FTIR das amostras compósitas (a) 0% (b) 5% e (c) 10% de vidro bioativo nanoparticulado.

#### 5. 1. 4. Difração de raios X (DRX)

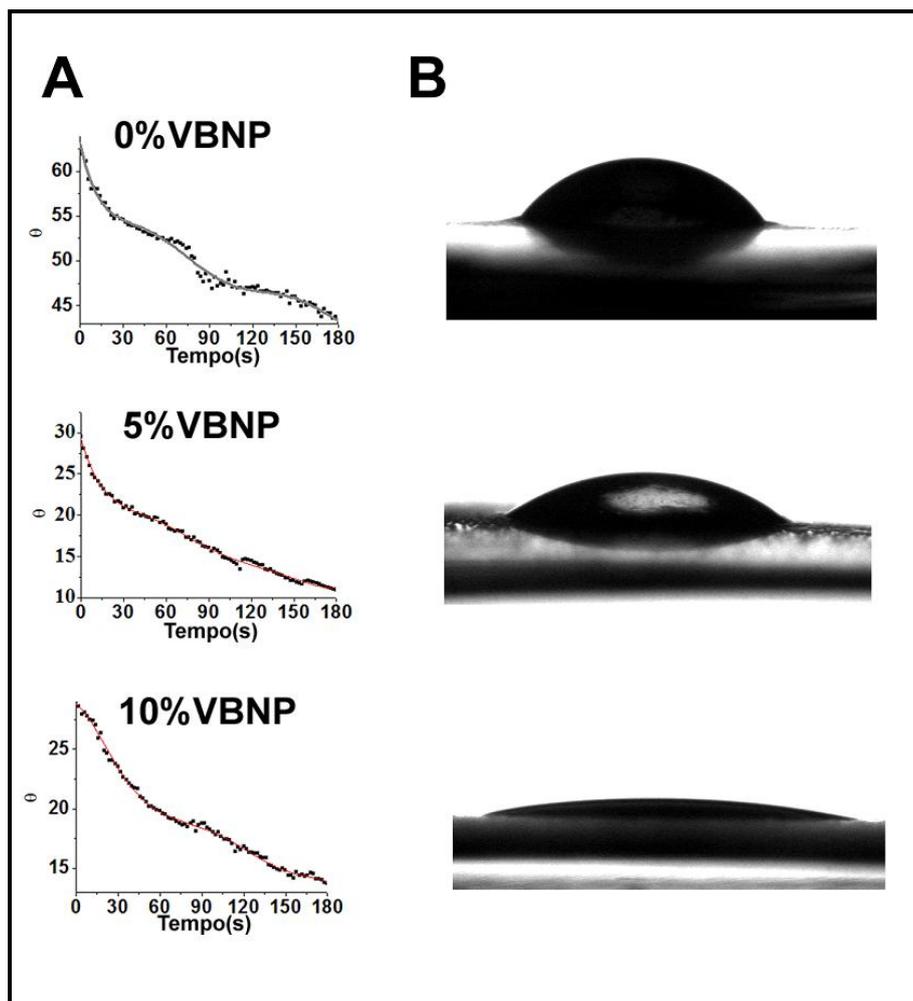
Na figura 5.9 observa-se que os difratogramas das membranas nanocompósitas de QUI / PVA / PEG / PCL com adição de 0%, 5% e 10% de VBNP apresentaram padrões semelhantes de difração. Pelos difratogramas apresentados pode-se considerar que as membranas produzidas são predominantemente amorfas.



**Figura 5. 9.** Difratogramas das membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado.

#### 5. 1. 5. Ângulo de contato

A figura 5.10 mostra os resultados da análise do ângulo de contato das amostras de membranas compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL-T com 0%, 5% e 10% de VBNP. As amostras com 5% e 10% de VBNP apresentaram um comportamento e decréscimo similares do ângulo quando comparadas com a amostra sem adição de VBNP. A membrana com 10% de VBNP apresentou o menor valor do ângulo de contato comparado com as amostras com 0% e 5% de VBNP.

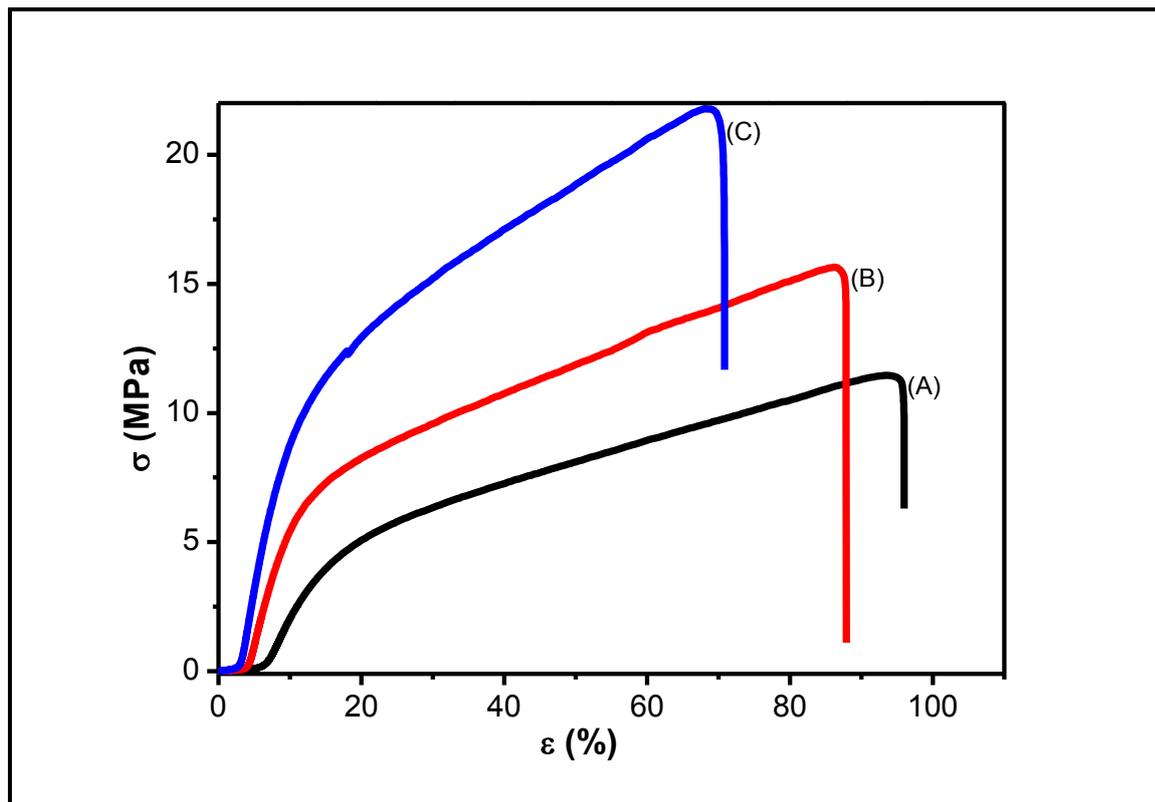


**Figura 5.10.** Análise do ângulo de contato. (A) Gráfico do ângulo de contato em função do tempo. (B) Fotografia da variação do ângulo das membranas em função do tempo.

### 5.1.6. Ensaio mecânicos

A figura 5.11 demonstra as curvas representativas dos ensaios de tração para as amostras de membranas com adição de 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado.

A Tabela 5.1 apresenta os valores médios dos resultados obtidos nos ensaios de resistência mecânica a tração das três amostras.

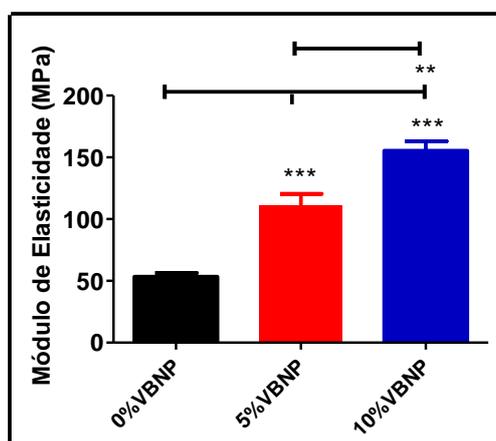


**Figura 5. 11.** Curvas Tensão x Deformação das membranas (A) 0% (B) 5% e (C) 10% de vidro bioativo nanoparticulado.

**Tabela 5. 1.** Valores de Tensão máxima de tração, Deformação Específica, Módulo de Elasticidade e Respetivos Desvios Padrão para amostra com 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado.

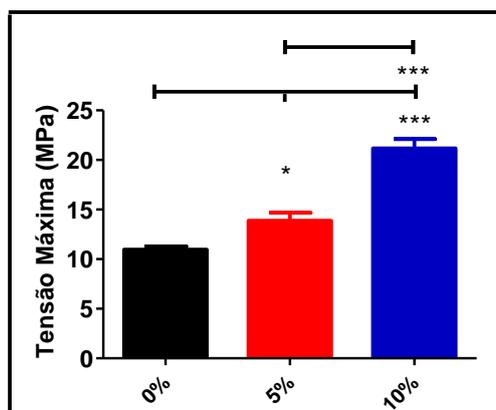
	(σ) Máxima (MPa)		Deformação (%)		(E) Módulo (MPa)	
	Média	d.p	Média	d.p	Média	d.p
0% VBNP	11,04	0,7	96	4	55	6,90
5% VBNP	14,09	1,77	71	15	122	21,19
10% VBNP	21,56	2,12	70	6,6	155	17,13

Observa-se nas figuras 5.11, 5.12 e na tabela 5.1 que houve um aumento significativo do módulo de elasticidade que aumentou de  $55 \pm 3$  MPa na amostra sem vidro para  $122 \pm 9$  MPa e para  $155 \pm 7$  MPa nas amostras com a adição de 5% e 10% de VBNP respectivamente.



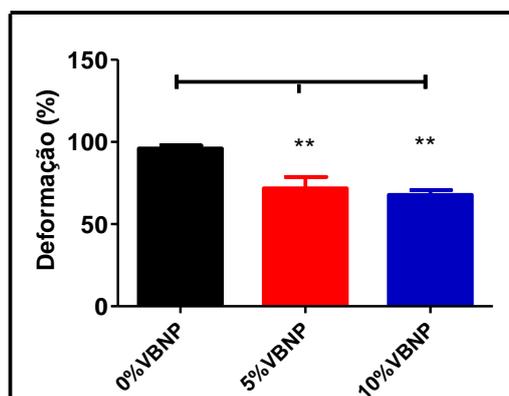
**Figura 5. 12.** Módulo de elasticidade das membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado ( $p < 0,0001$ ,  $n = 5$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism).

Observa-se na figura 5.13 que as amostras com 0% de VBNP apresentaram um valor médio de  $11,04 \pm 0,31$  MPa de tensão máxima; com a adição de 5% de VBNP ela aumentou para  $14,09 \pm 0,79$  MPa e para  $21,56 \pm 0,94$  MPa nas amostras com 10% de VBNP.



**Figura 5. 13.** Tensão máxima das membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado ( $p < 0,0001$ ,  $n = 5$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism ).

A figura 5.14 demonstra diminuição da deformação total das amostras, as amostras com 0% de VBNP que apresentavam  $96 \pm 2\%$  de deformação, após a adição de 5% e 10% de VBNP passaram a ter  $71 \pm 7\%$  e  $70 \pm 3\%$  respectivamente.



**Figura 5. 14.** Deformação total das membranas compósitas com 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado ( $p < 0,001$ ,  $n = 5$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism).

### 5. 1. 7. Análise Termogravimétrica

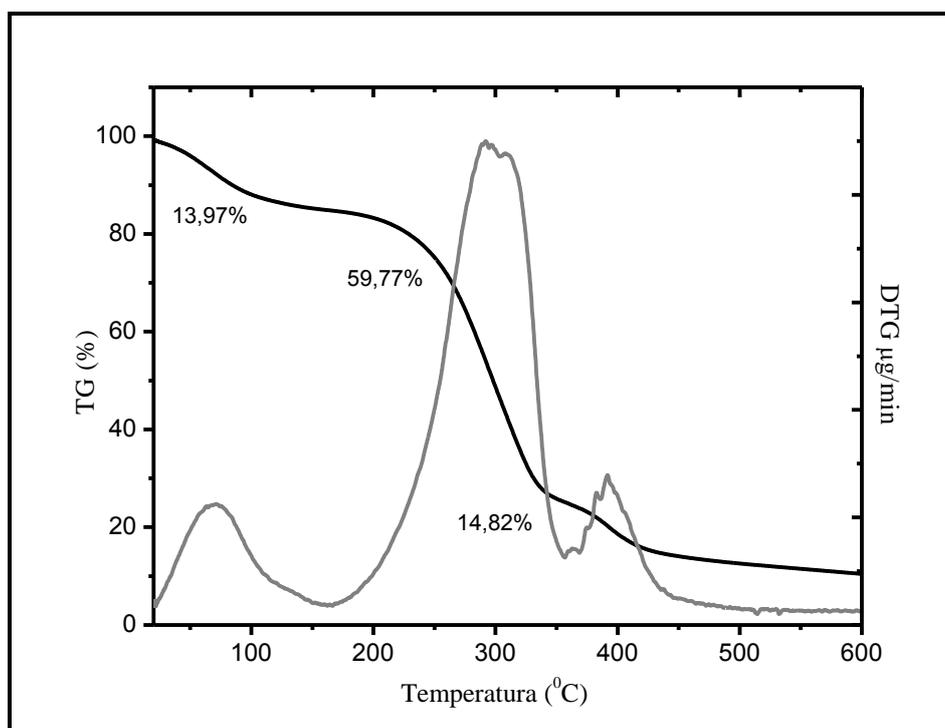
As membranas compósitas foram avaliadas acerca de sua estabilidade térmica através da análise de TG e DTG, cujos resultados são apresentados nas Figuras 5.15; 5.16 e 5.17. As análises de TG mostram que as amostras contendo 0%, 5% e 10% de VBNP apresentaram um perfil de degradação térmica semelhante com três estágios de perda de massa. A análise de cada amostra é descrita abaixo:

A amostra sem vidro apresentou o primeiro decréscimo de massa na faixa de 20 a 150°C. Observa-se pela derivada da curva de perda de massa (DTG) que no primeiro estágio da degradação a taxa máxima de perda de massa foi em 69°C. Esta etapa refere-se à evaporação de água residual presente nas amostras que demonstrou uma perda de 13,97%.

O segundo estágio, na faixa de 150 a 370°C, pode ser atribuído à degradação da cadeia polimérica da quitosana, envolvendo a desidratação, despolimerização e decomposições pirolíticas das estruturas polissacarídeas resultando na formação de água, dióxido de

carbono, metano e amônia [28]. Esta etapa envolve também a desidratação da cadeia polimérica do PVA, acompanhada da formação de alguns produtos voláteis [165]. A taxa máxima de degradação nessa fase é na temperatura de 293°C. Nessa fase também ocorre vaporização do PEG, a literatura cita que a temperatura de início 'onset' da vaporização do PEG, na atmosfera de nitrogênio (N<sub>2</sub>), é por volta de 300°C [166]. Nessa segunda fase houve uma perda de massa de 59,77%.

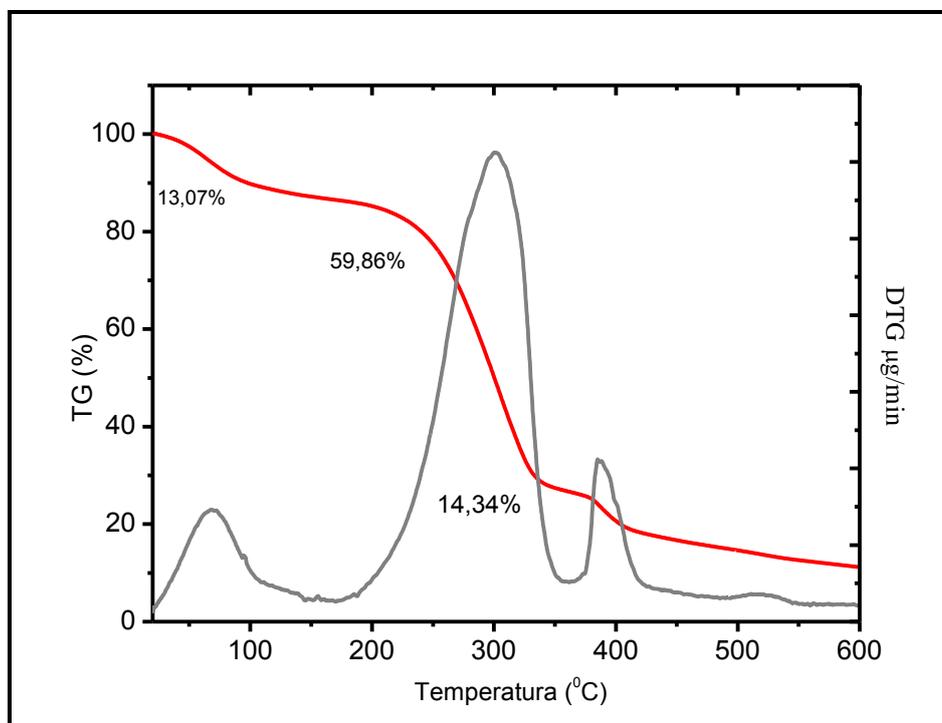
Na terceira fase, na região acima de 370°C ocorre uma perda de massa de 14,82% e refere-se à degradação do PVA, em carbono e hidrocarbonetos. Nessa fase também ocorre de acordo com dados da literatura o início da perda de massa do PCL-T. A degradação máxima nessa fase é em 389°C podendo estar associada à decomposição das ligações éster do PCL-T (Figura 5.14).



**Figura 5. 15.** Curva de TG e DTG da amostra com 0% de vidro bioativo nanoparticulado.

A amostra com 5% de vidro apresentou o primeiro, segundo e terceiro estágios de perda de massa nas mesmas faixas de temperatura que a amostra sem vidro. Observa-se perda de 13,07%, 59,86% e 15,34% de massa respectivamente para as faixas acima citadas. Observa-se pela derivada da curva de perda de massa (DTG) que no primeiro, segundo

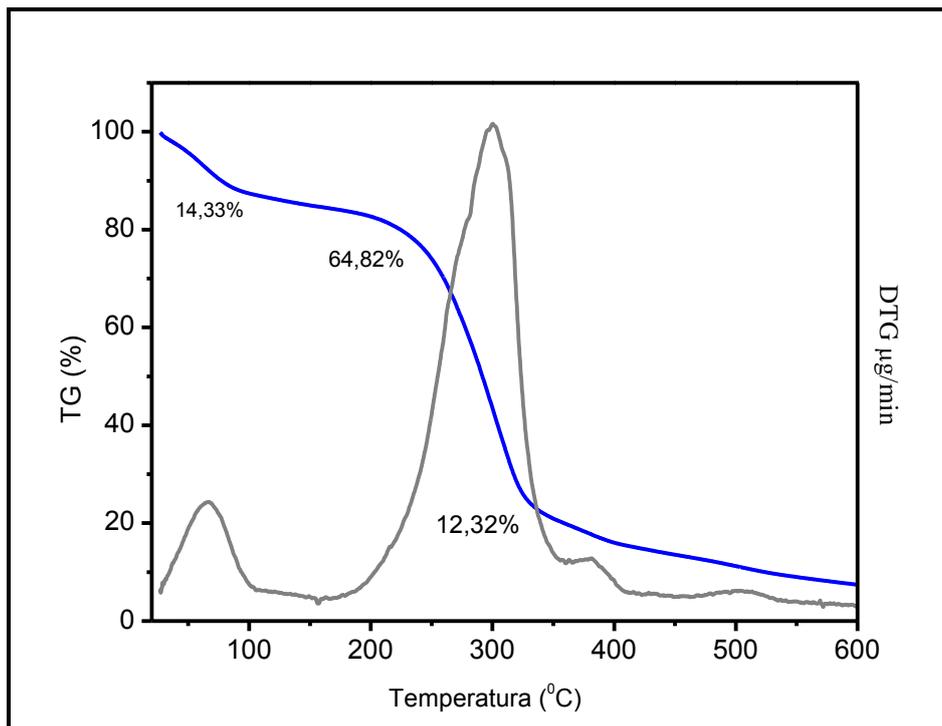
e terceiro estágios da degradação a taxa máxima de perda de massa ocorre à 69, 301 e 386°C respectivamente (Figura 5.16).



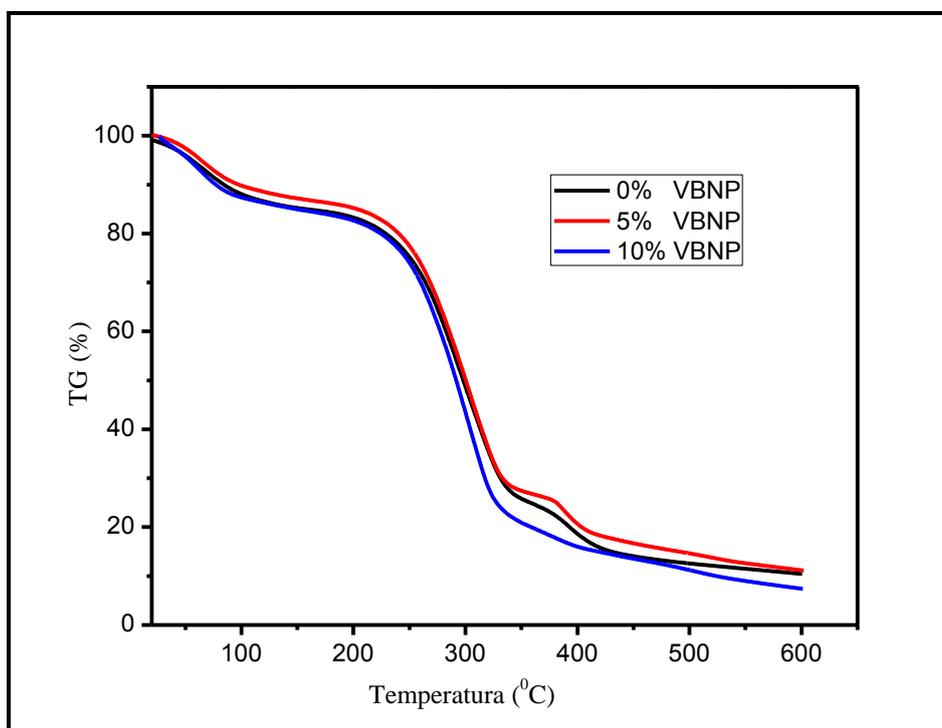
**Figura 5. 16.** Curva de TG e DTG da amostra com 5% de vidro bioativo nanoparticulado.

A amostra com 10% de vidro também apresentou semelhança com as amostras com 0% e 5% de VBNP demonstrando faixas iguais de temperatura no primeiro, segundo e terceiro decréscimo de massa. Observa-se perda de 14,33%, 64,82% e 12,32% de massa respectivamente para as três faixas acima citadas. A temperatura de degradação máxima da primeira fase é 68°C, da segunda fase de perda de massa é 301°C e da terceira fase é 384°C (Figura 5.17).

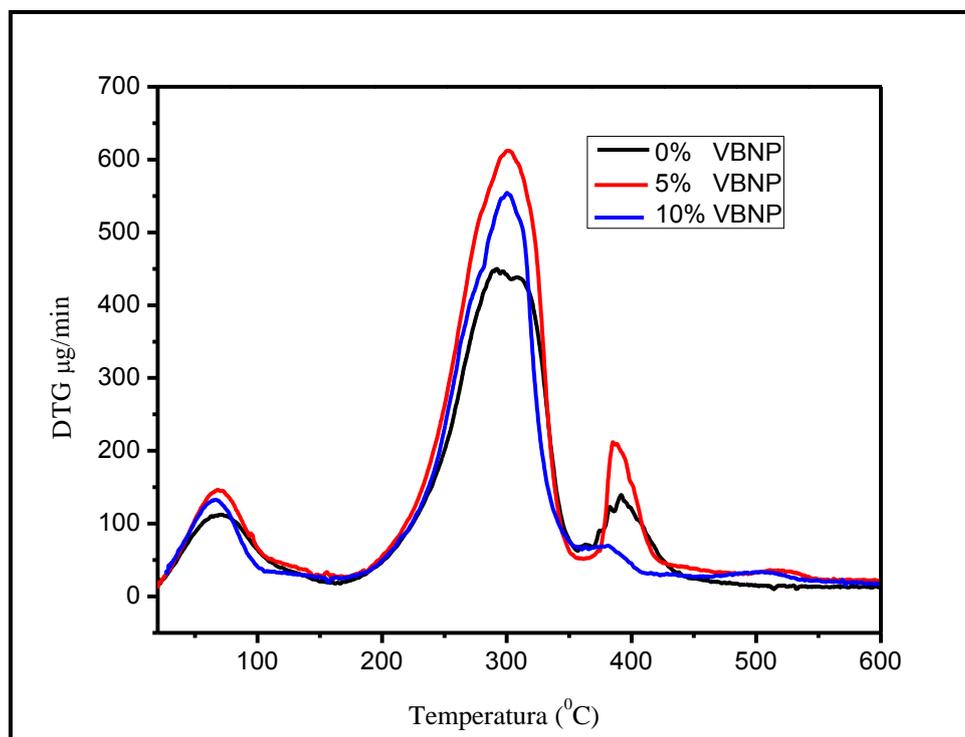
A figura 5.18 demonstra as curvas da análise termogravimétrica (TG) das três amostras de membranas compósitas. A figura 5.19 apresenta a derivada da curva de perda de massa (DTG) das membranas compósitas com 0%, 5% e 10 de VBNP



**Figura 5. 17.** Curva de TG e DTG da amostra com 10% de vidro bioativo nanoparticulado com



**Figura 5. 18.** Curva de decomposição térmica TG das membranas compostas com 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado.

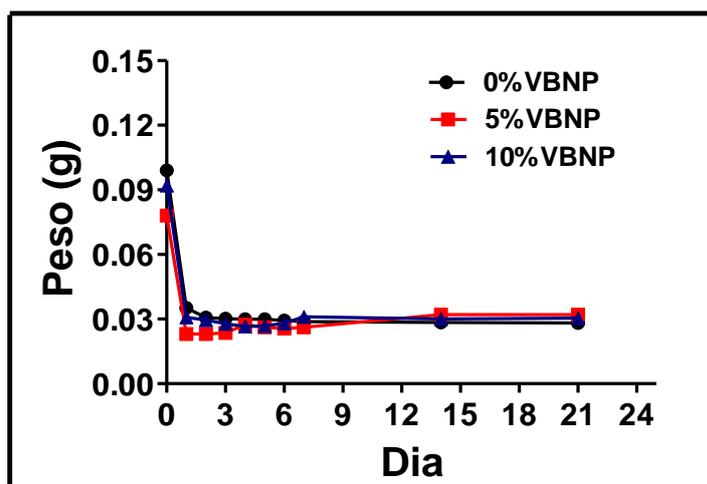


**Figura 5. 19.** Derivada curva de perda massa DTG das membranas compósitas.

### 5. 1. 8. Ensaio de degradação em meio de cultura celular

A figura 5.20 demonstra as curvas de degradação em massa das amostras com 0%, 5% e 10% de VBNP em função do tempo. A tabela 5.2 apresenta o índice de degradação das amostras em função do tempo. Após 24 horas quando as amostras estavam em PBS observa-se que o índice de degradação das três amostras teve valor médio de  $67 \pm 3\%$ . A partir do segundo dia quando as amostras estavam em meio de cultura DMEM observa-se uma redução no índice de degradação de todas as amostras que ficaram com o peso praticamente constante até o vigésimo primeiro dia de degradação.

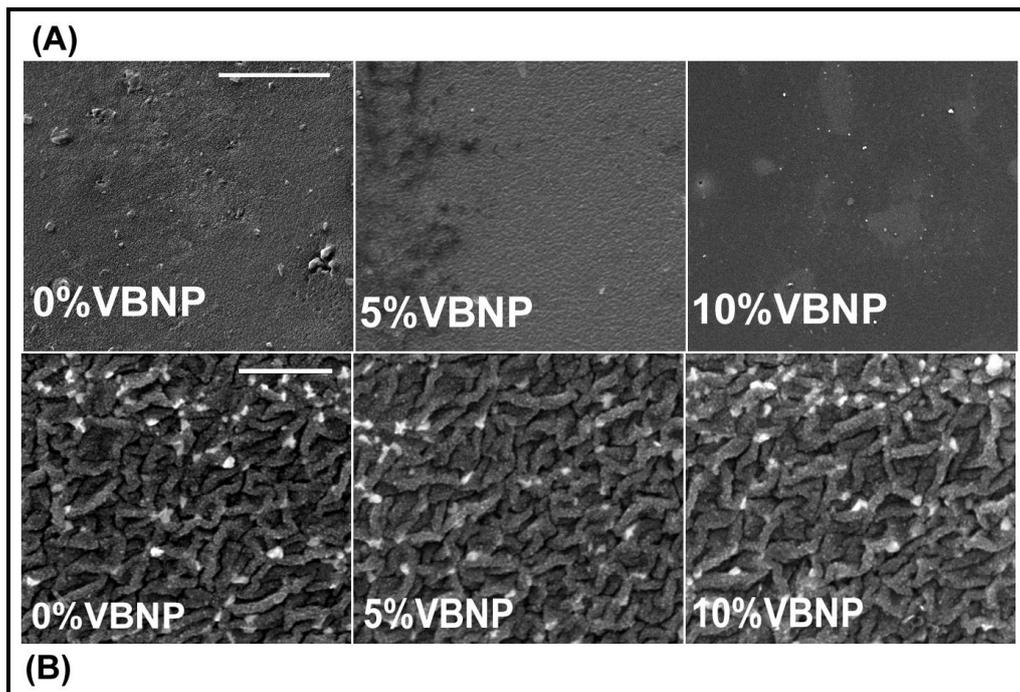
As figuras 5.21 e 22 apresentam as microfotografias do ensaio de degradação obtidas por microscopia eletrônica de varredura. As figuras mostram as mudanças ocorridas na morfologia das amostras a partir do primeiro dia de degradação até o sétimo dia.



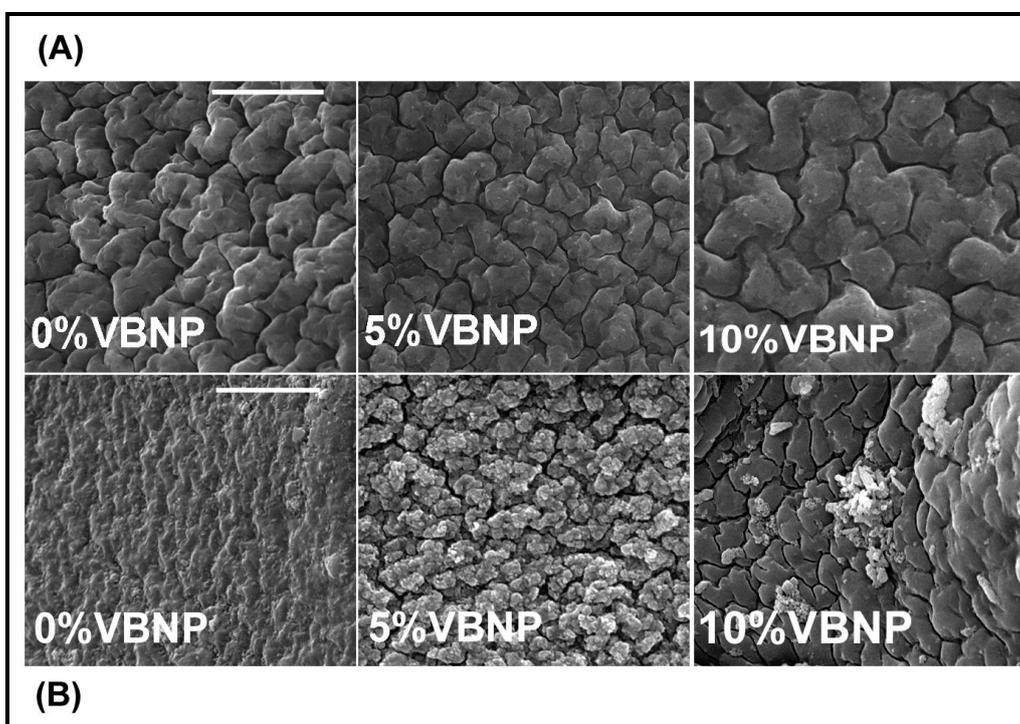
**Figura 5.20.** Curva de degradação das amostras das membranas compósitas.

**Tabela 5.2.** Índice de degradação das amostras com 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado em função do tempo.

<b>DIA</b>	<b>0%VBNP</b>	<b>5%VBNP</b>	<b>10%VBNP</b>
<b>1</b>	<b>64,5%</b>	<b>70%</b>	<b>67%</b>
<b>2</b>	<b>12,8%</b>	<b>0%</b>	<b>42%</b>
<b>3</b>	<b>1,6%</b>	<b>2%</b>	<b>5,8%</b>
<b>4</b>	<b>1%</b>	<b>-16,6%</b>	<b>4,7%</b>
<b>5</b>	<b>-0,17%</b>	<b>4,3%</b>	<b>-1,13%</b>
<b>6</b>	<b>2,2%</b>	<b>2,7%</b>	<b>-4,5%</b>
<b>7</b>	<b>1,7%</b>	<b>-2,75%</b>	<b>-11%</b>
<b>8</b>	<b>1,4%</b>	<b>-2,3%</b>	<b>3,5%</b>
<b>9</b>	<b>0,7%</b>	<b>0,3%</b>	<b>-1,3</b>

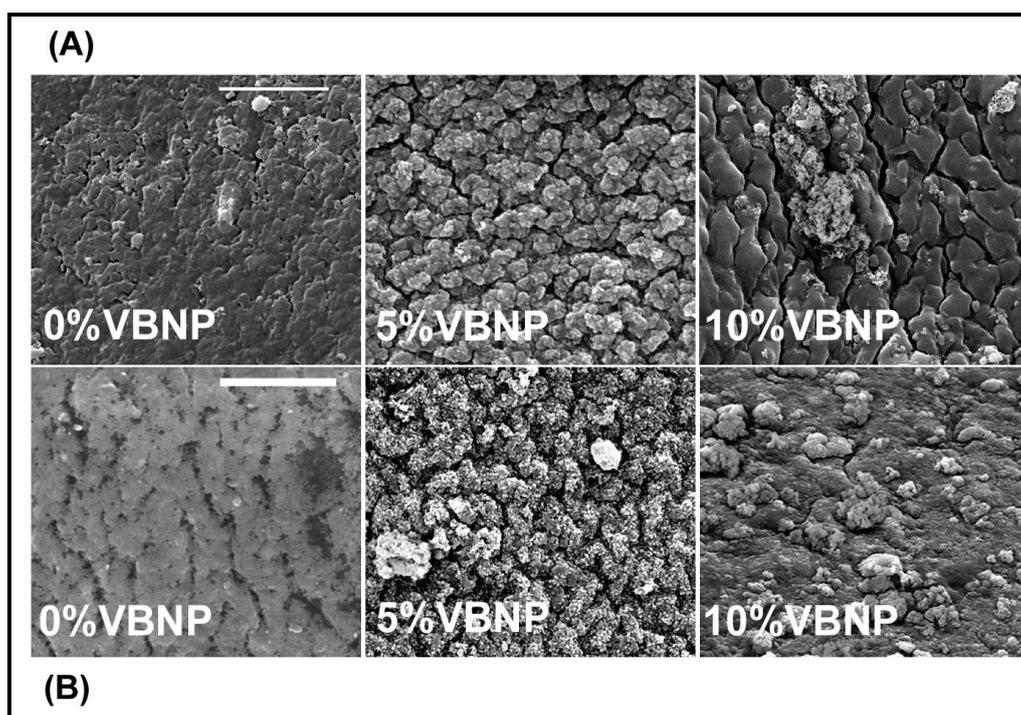


**Figura 5.21.** Ensaio de degradação painel I. (A) Antes da degradação (15Kv, 1000X, barra = 100µm). (B) Após 24 em PBS (15Kv, 10.000X, barra = 10µm).



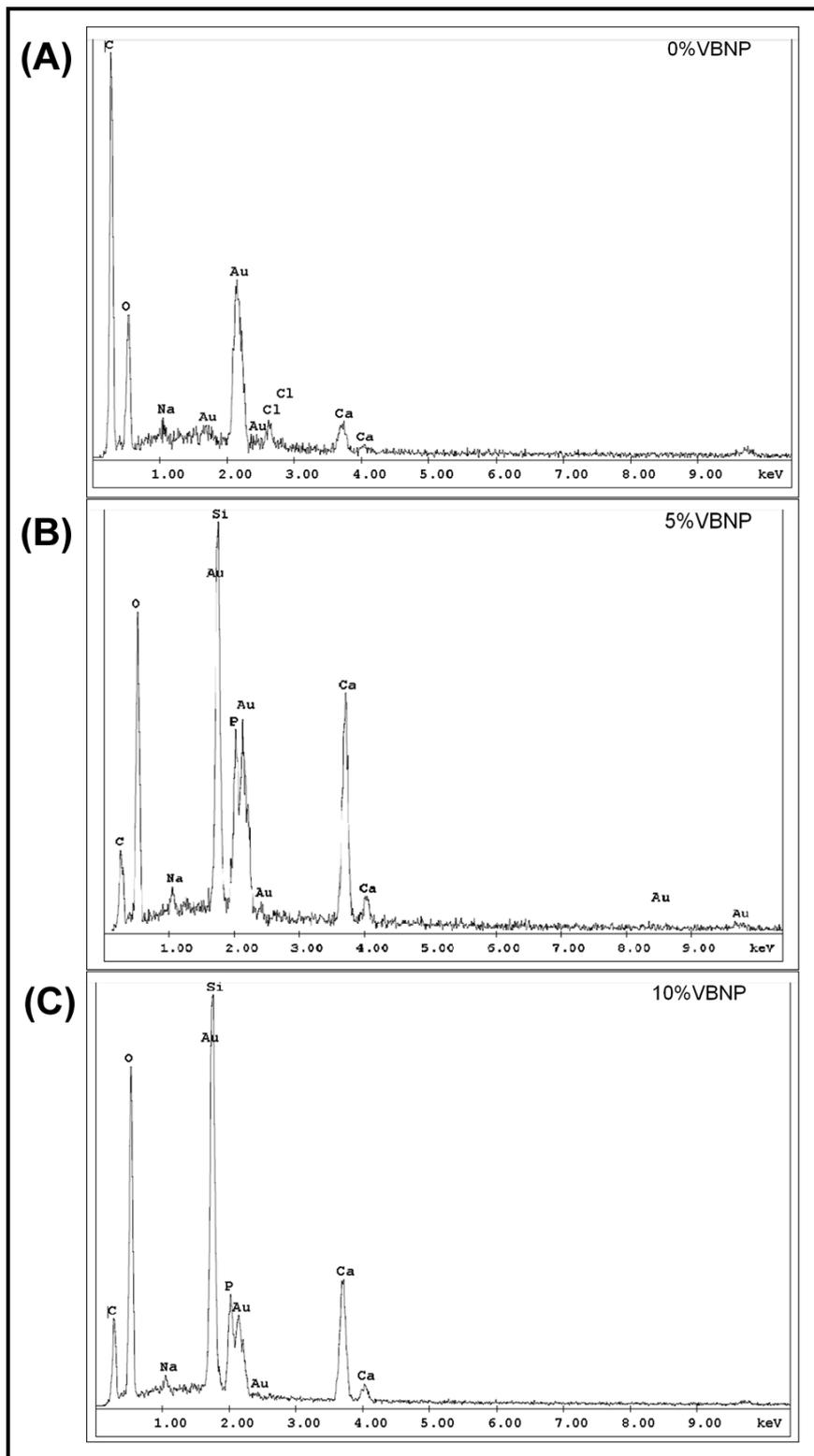
**Figura 5. 22.** Ensaio de degradação painel II. (A) Terceiro dia de degradação em DMEM (15Kv, 20.000X, barra = 5µm). (B) Sétimo dia de degradação em DMEM (15Kv, 20.000X, barra = 5µm).

A figura 5.23 apresenta a microfotografia das três amostras obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura, após quatorze e vinte e um dias de degradação em meio DMEM. Observa-se que todas as amostras apresentam superfícies com irregularidades e as amostras com 5% e 10% de VBNP apresentaram uma maior quantidade de regiões com aspecto semelhante á deposição de sais.

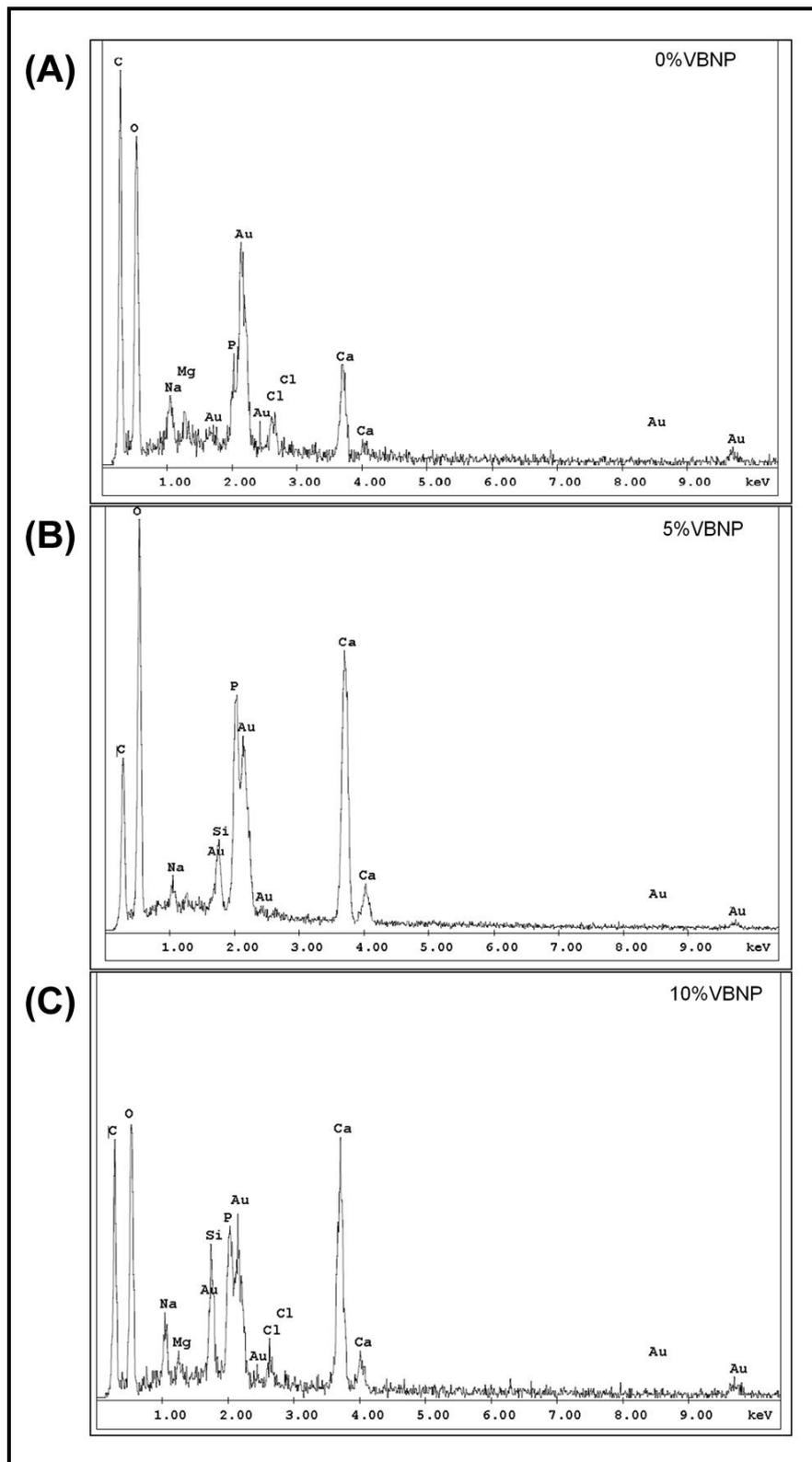


**Figura 5.23.** Ensaio de degradação painel III. (A) Décimo quarto dia de degradação em DMEM (15Kv, 20.000X, barra = 5 $\mu$ m). (B) Vigésimo primeiro dia de degradação em DMEM (15Kv, 20.000X, barra = 5 $\mu$ m).

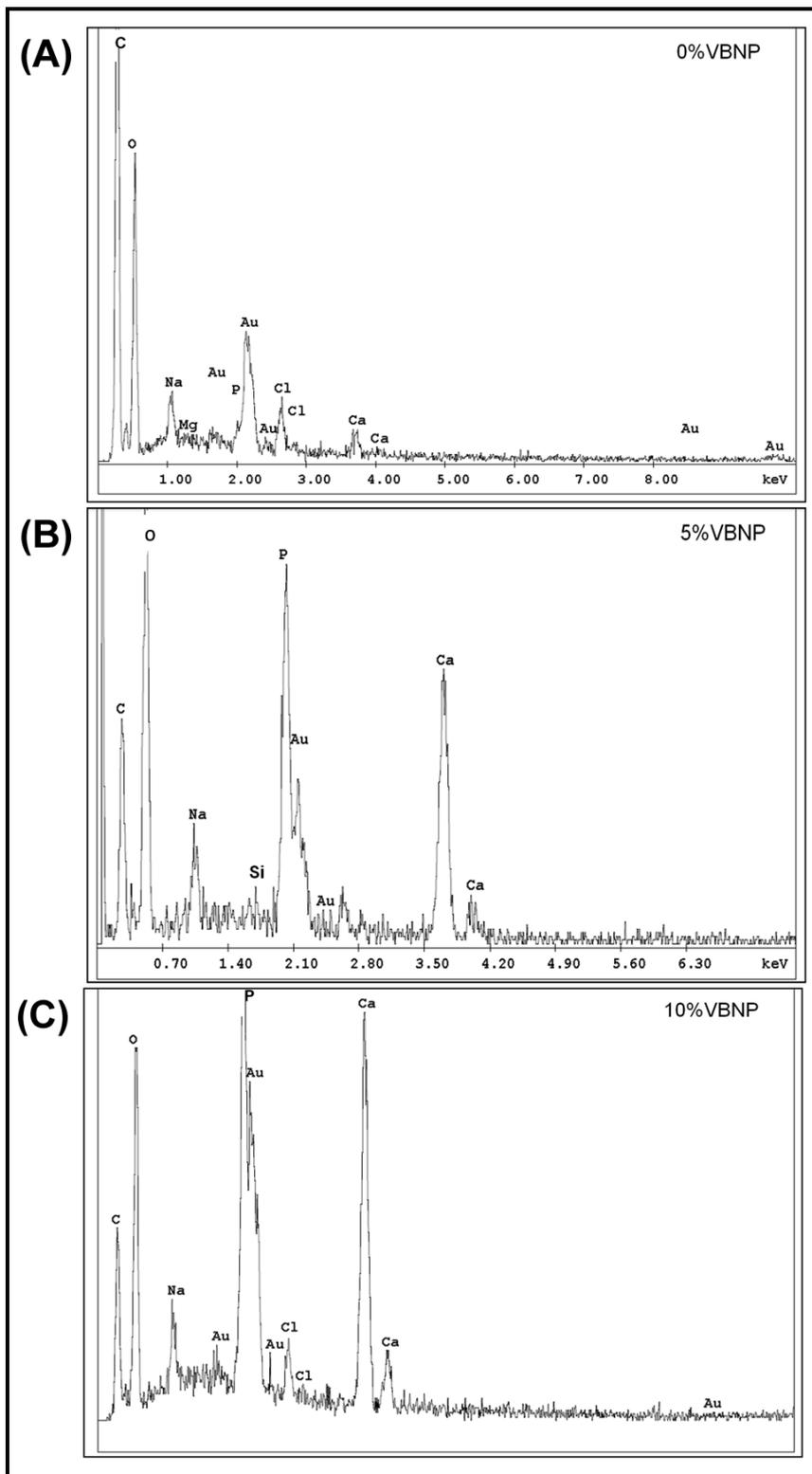
As figuras 5.24 apresenta análise EDS das amostras com 0% e 10% de VBNP após vinte e quatro horas de degradação em meio PBS Na análise EDS qualitativa da amostra com 5% e 10% de vidro observa-se a presença de Si, P, componentes que não aparecem na amostra sem vidro. As figuras 5.25 e 26 apresentam a análise EDS das membranas compósitas no sétimo e vigésimo primeiro dia de degradação respectivamente, agora em meio DMEM. Observa-se nas amostras com vidro a presença de Si, Ca e P, porém com intensidades relativas diferentes das apresentadas no início da imersão. Ocorreu também, um aumento de intensidades relativas dos picos de Ca e P, e diminuição dos picos de Si.



**Figura 5.24.** Análise EDS após vinte e quatro horas em PBS das membranas compósitas (A) 0% (B) 5% (C) 10% de vidro bioativo nanoparticulado.

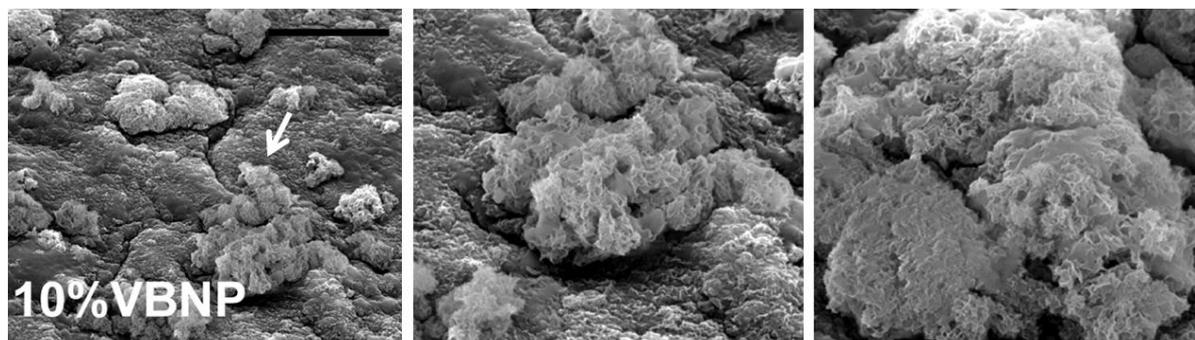


**Figura 5.25.** Análise EDS após sete dias em DMEM (A) 0% (B) 5% e (C) 10% de vidro bioativo nanoparticulado

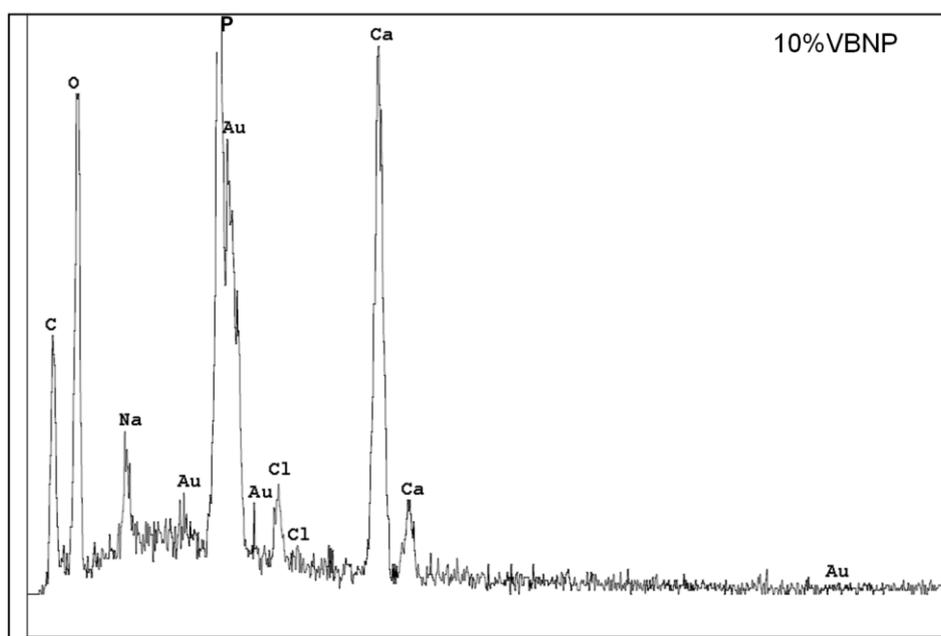


**Figura 5. 26.** Análise EDS qualitativa após vinte um dias em DMEM das amostras 0%, 5% e 10% de vidro bioativo nanoparticulado.

Para analisar as regiões com deposição de sais das amostras com 10% de vidro bioativo foram obtidas microfotografias por MEV e também análise qualitativa por EDS. Essa análise foi feita no vigésimo primeiro dia de degradação. Observou-se nessas regiões pela análise EDS a presença de fósforo e cálcio (Figura 5.27 e 5.28).

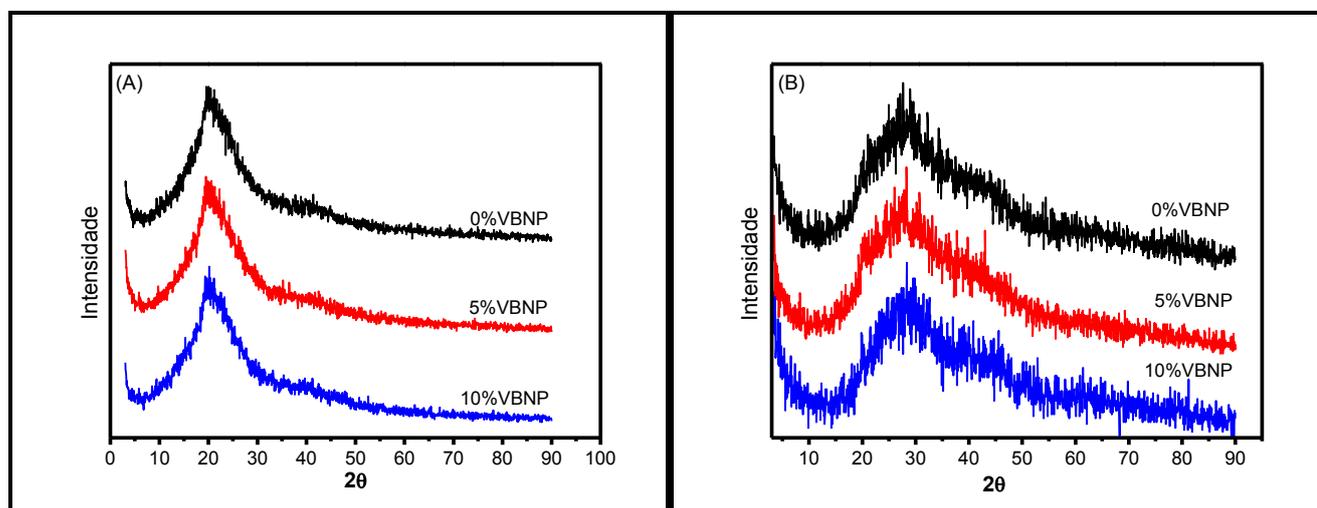


**Figura 5. 27.** Ensaio de degradação. Microfotografias da região de deposição de sais da amostra com 10% de vidro bioativo; a seta demarca a região ampliada e onde foi feito o EDS. (15kv, 20.000X, barra = 5 $\mu$ m).



**Figura 5. 28.** Análise EDS qualitativa da região de deposição de sais da amostra com 10% de vidro bioativo.

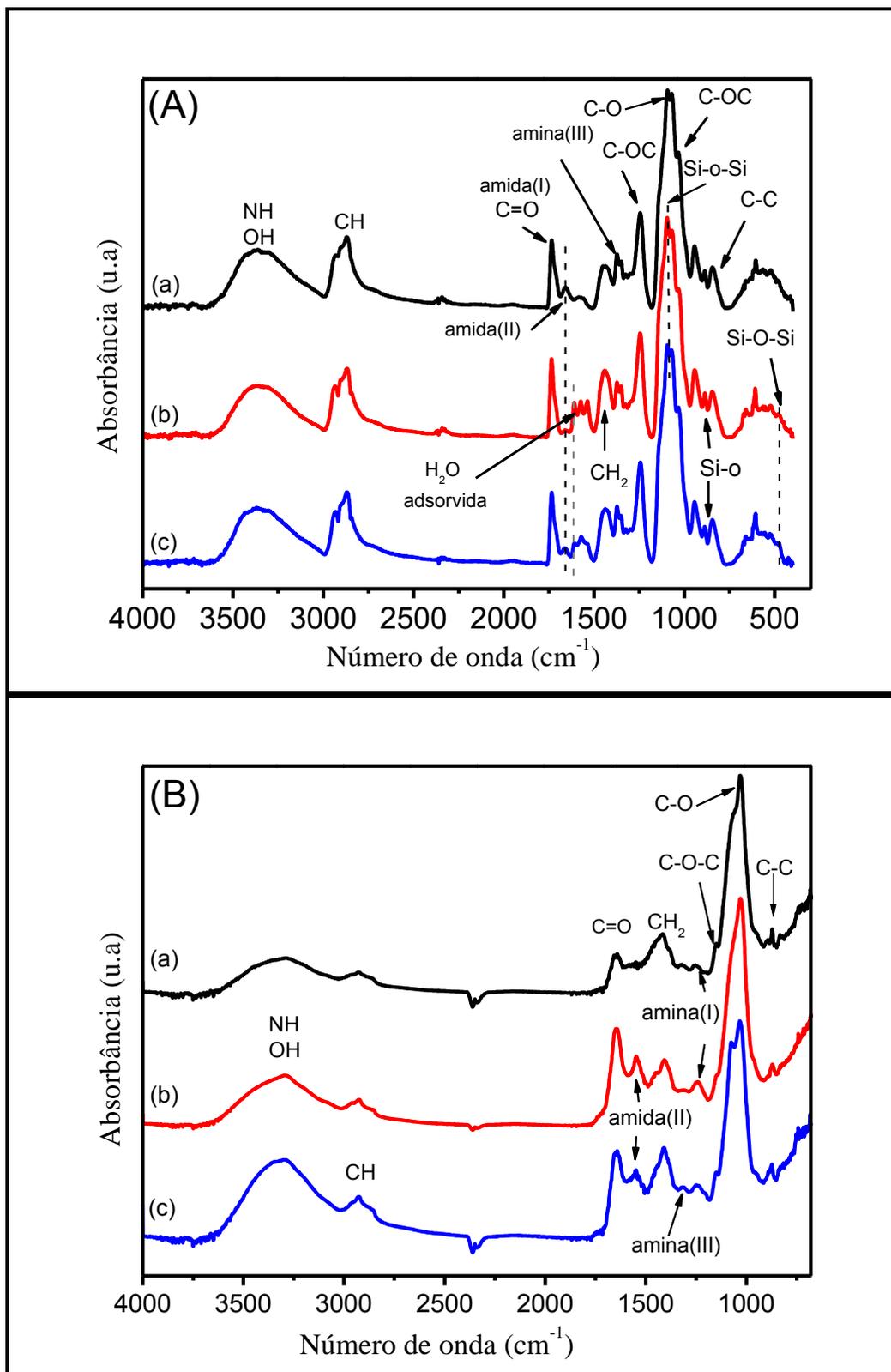
A figura 5. 29 (A) demonstra a análise de DRX das membranas compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL-T contendo 0%, 5% e 10% de VBNP antes do ensaio de degradação e 5. 29 (B) após 21 dias de degradação em meio DMEM. Nas duas figuras em todos os espectros existe a predominância de halos amorfos nas membranas compósitas.



**Figura 5. 29.** Análise de DRX das membranas compósitas. (A) antes da degradação e (B) após vinte um dias de degradação em meio DMEM.

A figura 5.30 apresenta os espectros FTIR das três amostras antes e após vinte e um dias de degradação. Na análise dos espectros após vinte e um dias de degradação a banda observada entre  $3600-3100\text{cm}^{-1}$  atribuída às vibrações de estiramento dos diversos grupos hidroxil já caracterizados na seção 5.2.3 e a do grupo NH apresentam nítida redução na intensidade das bandas nas amostras com 0% e 5% de VBNP. A banda observada entre  $2938-2870\text{cm}^{-1}$  atribuída às vibrações de estiramento dos diversos grupos CH presentes no PVA, QUI, PEG e PCL-T também apresentam redução de intensidade nas três amostras, após a degradação de vinte um dias.

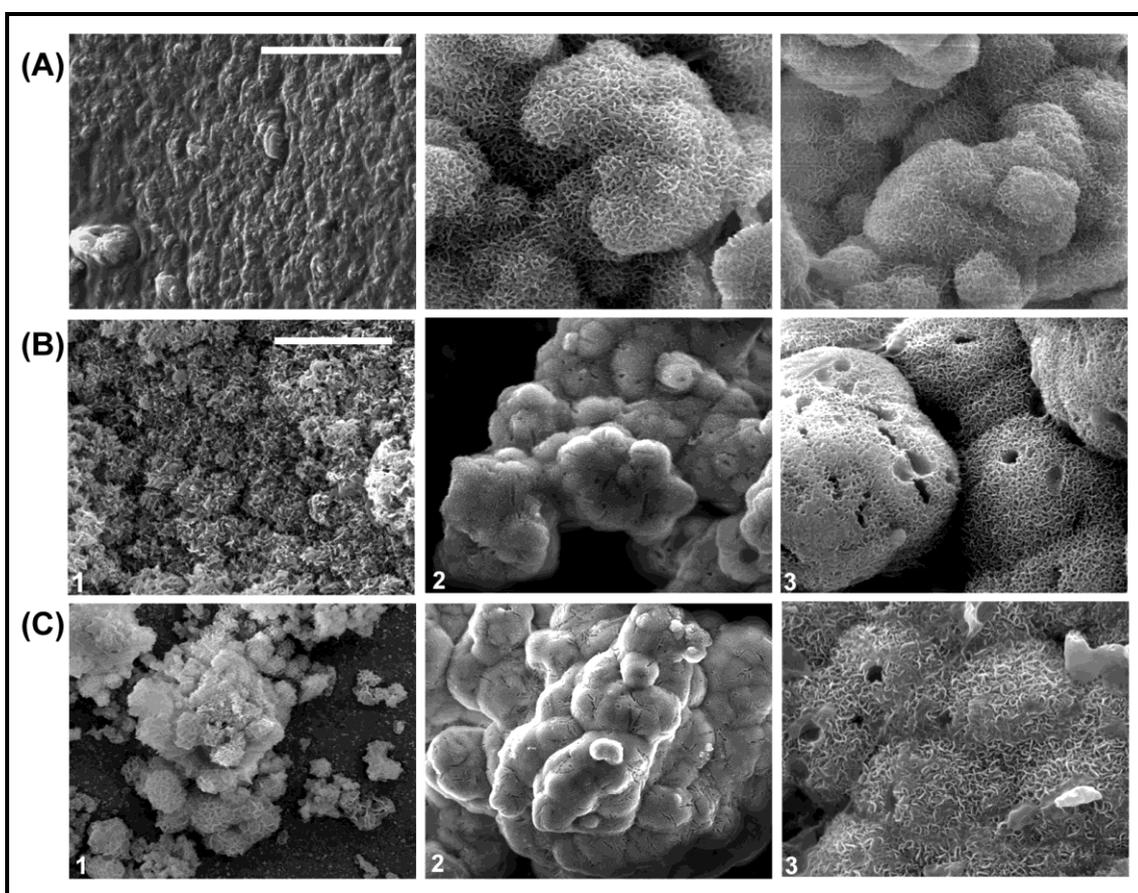
Na banda de absorção atribuída ao acetato em aproximadamente  $1724\text{cm}^{-1}$  e na banda atribuída ao grupo  $\text{CH}_2$  observa-se redução na intensidade das três amostras.



**Figura 5. 30.** Espectro de FTIR de todas as amostras (A) antes da degradação (B) após vinte um dias de degradação em meio DMEM. [(a) 0% VBNP; (b) 5% VBNP; (c) 10% VBNP]

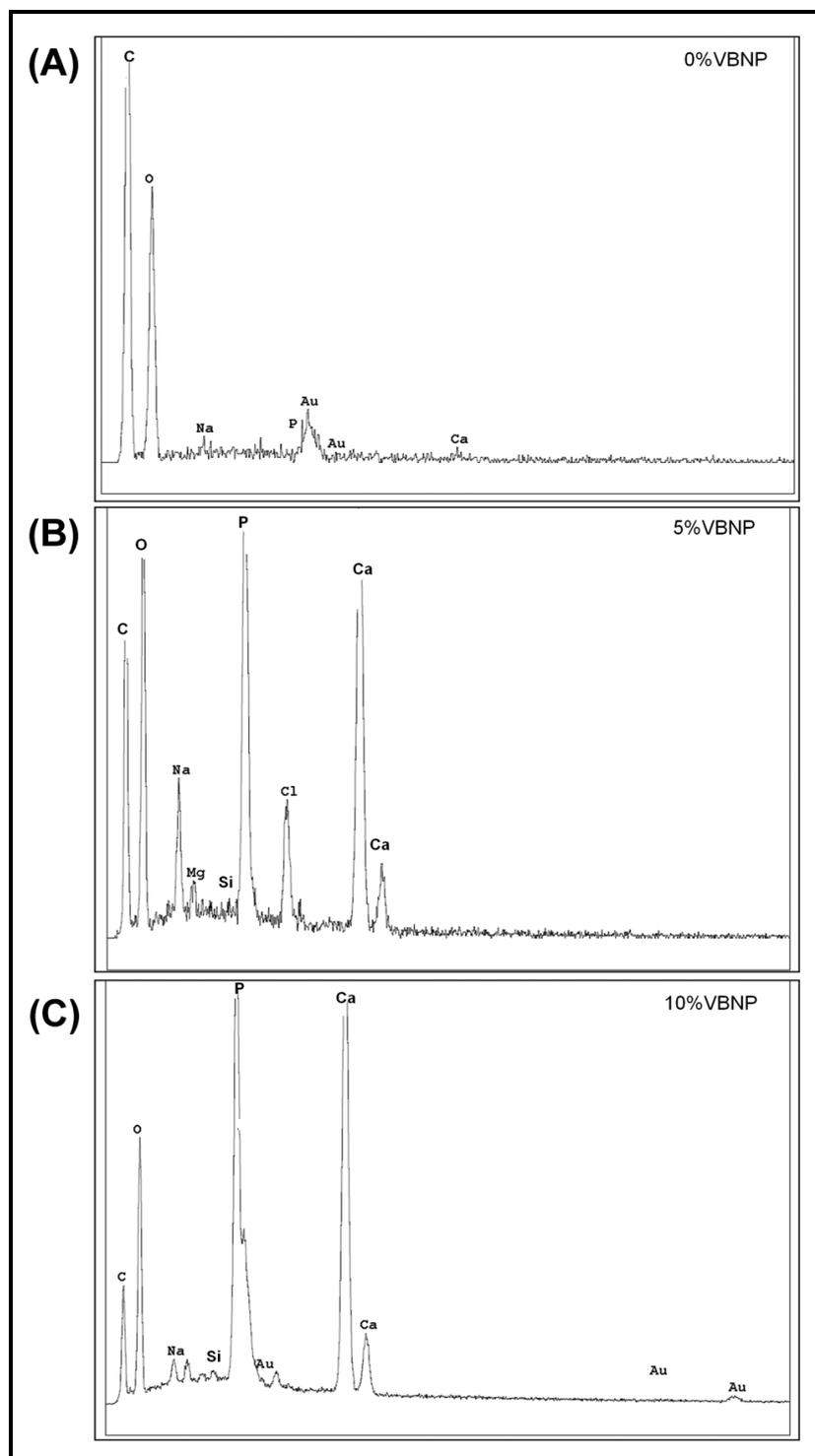
### 5. 1. 9. Estudo da bioatividade

Após a imersão em SBF por sete dias, as amostras compósitas contendo 0%, 5% e 10% de VBNP foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. A figura 5. 31 (A) mostra a formação de estruturas semelhantes á hidroxiapatita nas amostras com 5% e 10% vidro bioativo. Observa-se também que não houve formação dessas estruturas na amostra sem vidro após sete dias de tratamento com SBF. Além disso, as figuras 5.31 (B) e (C) mostram outras estruturas com aspecto de fases de fosfato de cálcio presentes nas amostras com 5% e 10% de VBNP respectivamente.



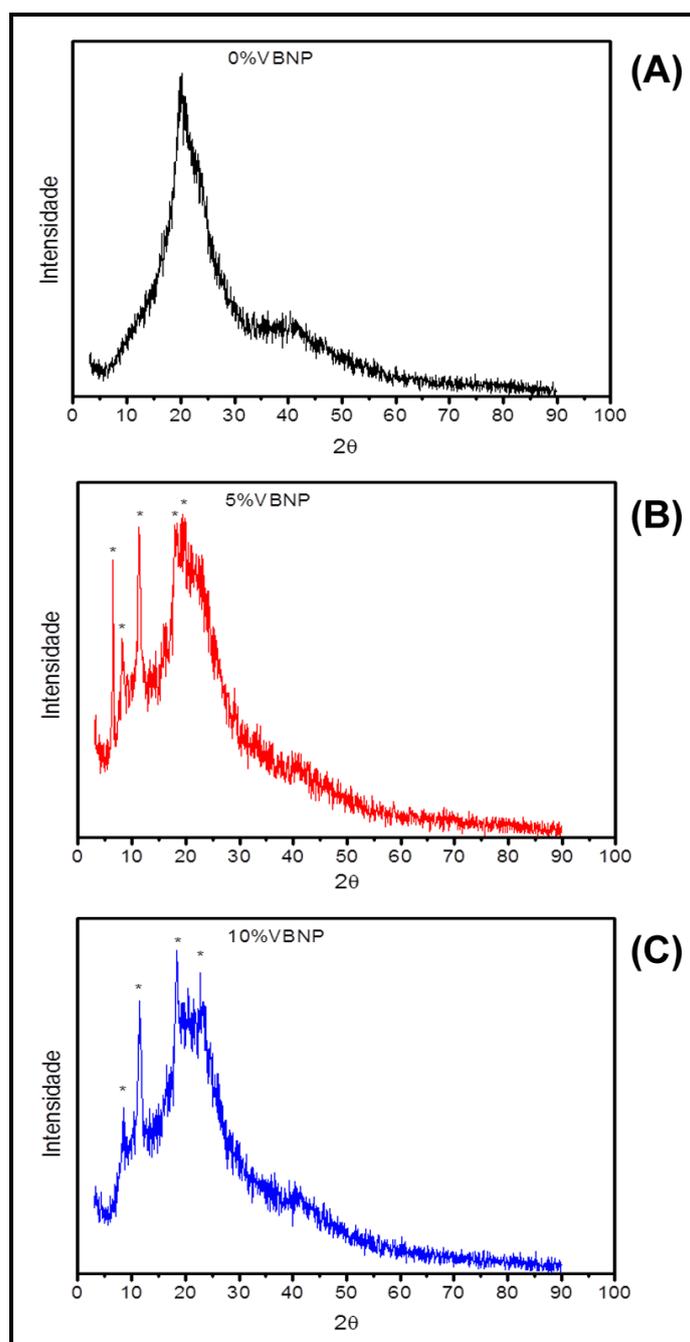
**Figura 5. 31.** Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura. (A) Demonstra a ausência de fases de fosfato de cálcio na amostra sem vidro (primeira á esquerda) e a presença de fases de fosfato de cálcio nas amostras com 5% e 10% de VBNP respectivamente (15kV, 25000X, barra = 20 $\mu$ m). (B) Fases de fosfato de cálcio da amostra com 5% de VBNP (1e 2 = 10.000X, 15kV); (3 = 25.000X, 15kV); (barra = 20 $\mu$ m). (C) Fases de fosfato de cálcio da amostra com 10% de VBNP. (1e 2 = 10.000X, 15kV); (3 = 25.000X, 15kV).

A análise EDS mostrou a presença de Ca, P e Si nas amostras de compósitos com 5% e 10% VBNP e a ausência dos mesmos na membrana sem vidro (Figura 5.32).



**Figura 5. 32.** Análise EDS após sete dias de imersão em SBF. Em (A) amostra com 0%, (B) 5% e (C) 10% de vidro bioativo nanoparticulado.

Os espectros de DRX confirmaram a presença de estruturas cristalinas na superfície das membranas com 5% e 10% de VBNP, entretanto não são picos característicos da HA (Figura 5. 33). Os dados sugerem que houve precipitação de fosfato de cálcio nas membranas com VBNP, entretanto não podemos afirmar quais as fases estão presentes nas amostras analisadas.

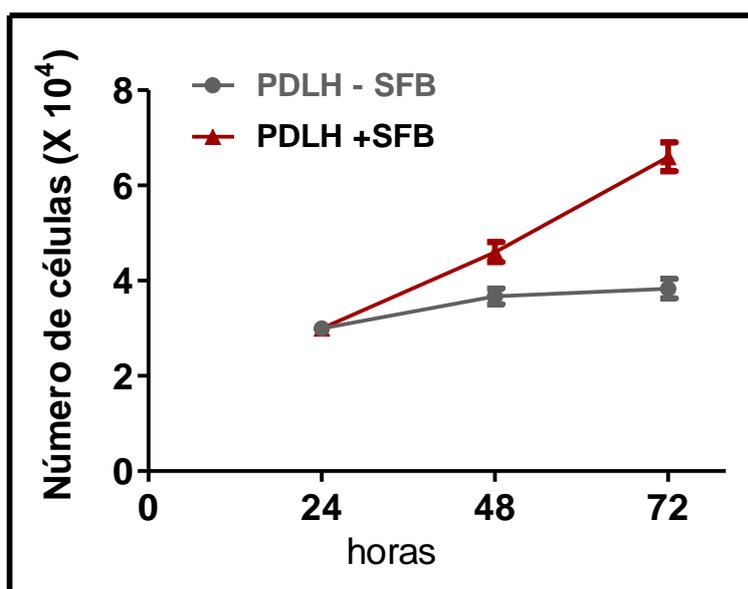


**Figura 5. 33.** Análise DRX das membranas compósitas. Em (A) 0% (B) 5% e (c) 10% de vidro bioativo nanoparticulado após sete dias de imersão em SBF.

## 5. 2. Caracterização de Células do Ligamento Periodontal Humano

### 5. 2. 1. Crescimento Celular

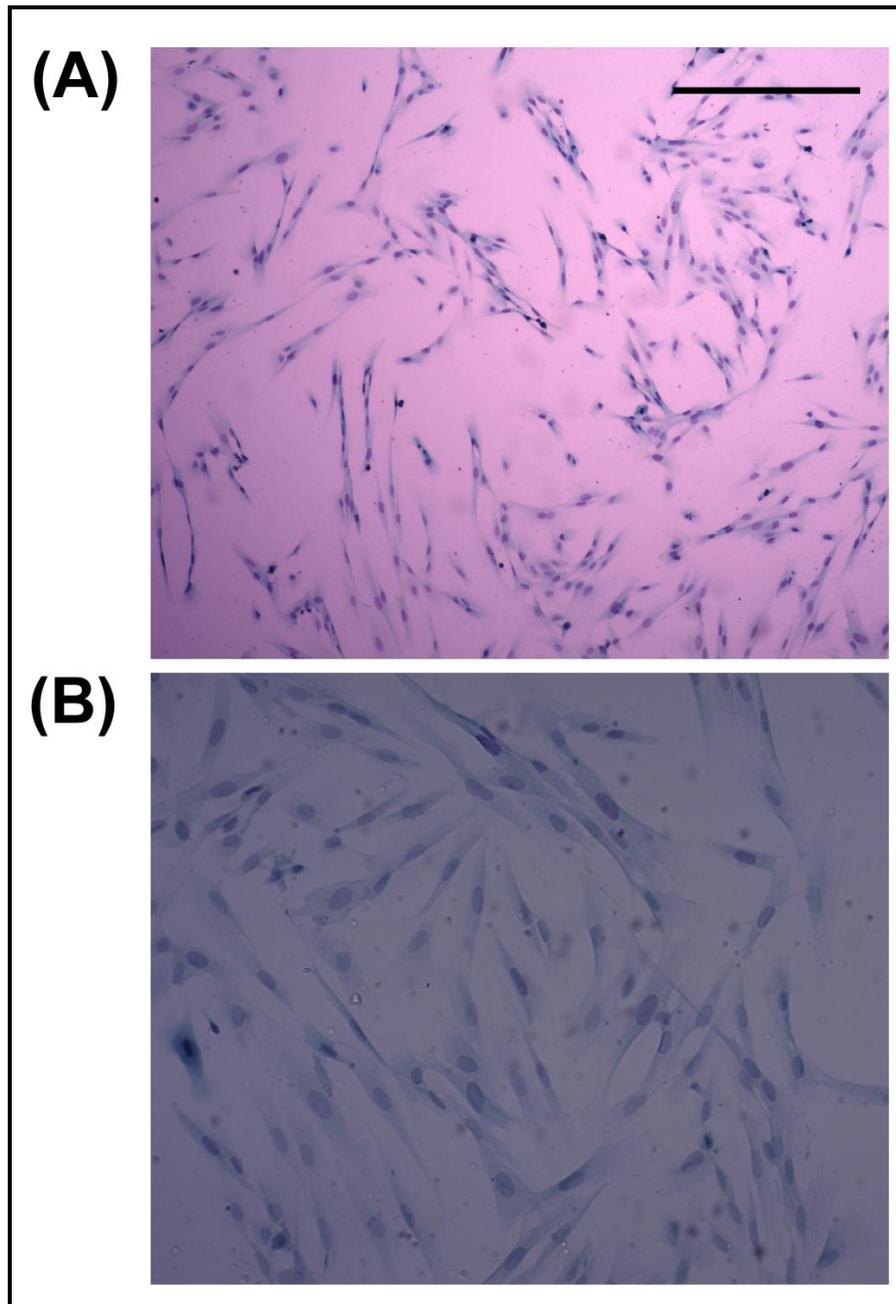
O padrão de crescimento das células PDLH com meio DMEM com soro apresentou um crescimento ascendente como demonstrado na figura 5.34. O padrão de crescimento das células com meio DMEM sem soro apresentou crescimento mínimo e constante.



**Figura 5. 34.** Crescimento celular medido pelo ensaio Azul de Trypan das células PDLH após três dias de cultura.

### 5. 2. 2. Morfologia Celular

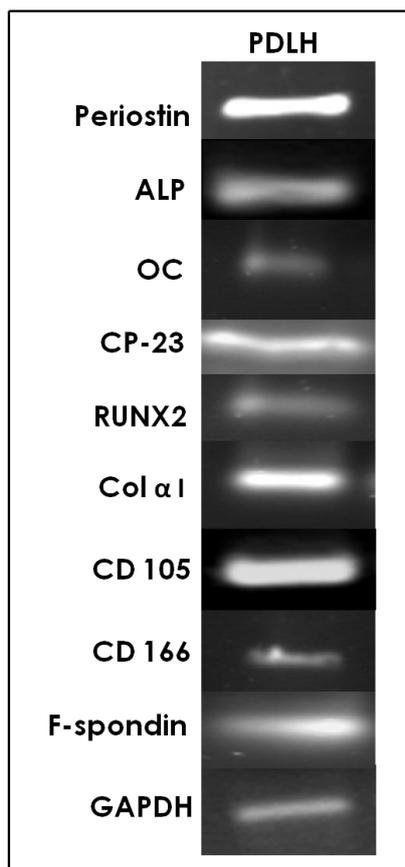
A figura 5.35 demonstra a morfologia das células extraídas da área radicular de dentes humanos e tratadas através da técnica histoquímica de Feulgen após 72 horas de cultura. Em condições de subconfluência a morfologia é condizente com dados encontrados na literatura; as células são indistinguíveis na microscopia óptica com prevalência da morfologia de fibroblastos periodontais, ou seja, células fusiformes, com núcleos centrais e típicos prolongamentos citoplasmáticos [167].



**Figura 5. 35.** Morfologia celular de células do ligamento periodontal humano. (A) aumento = 4X (B) aumento = 10X (Barra = 20 $\mu$ m, n=3).

### 5. 2. 3. RT-PCR para genes de Tecido Periodontal

No estudo presente através do RT-PCR qualitativo pôde se observar à expressão de Periostin, COL  $\alpha$  I, OC, ALP, F-Spondin, CP-23, RUNX, CD166 e CD105. GAPDH foi utilizada como banda controle de amplificação (Figura 5.36).

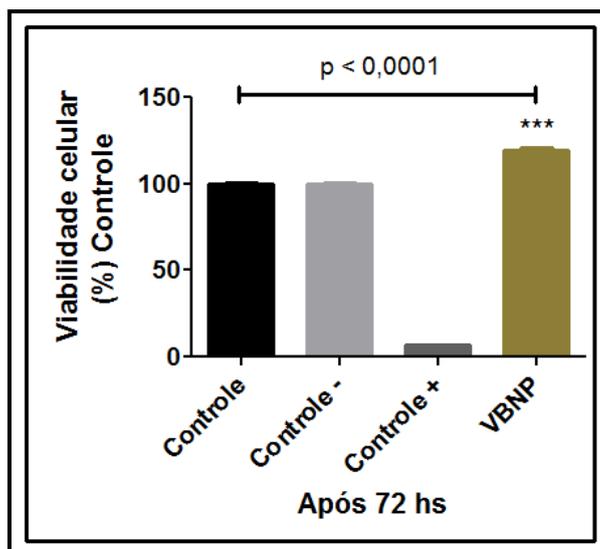


**Figura 5. 36.** RT-PCR para genes do ligamento periodontal humano e de células tronco.

### **5. 3. Análise do comportamento de células do ligamento periodontal humano em contato Direto com nanopartículas de vidro bioativo Produzidas pelo Método Stöber**

#### **5. 3. 1. Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina**

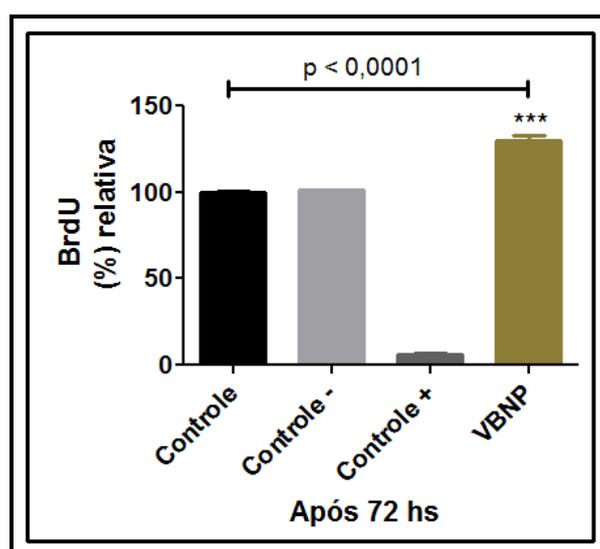
A atividade mitocondrial foi quantificada pelo ensaio de resazurina. Observou-se um aumento de  $20 \pm 2\%$  na viabilidade das células quando em contato direto por setenta e duas horas com VBNP em comparação com o grupo controle ( $p < 0,0001$   $n = 5$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism) (Figura 5.37).



**Figura 5. 37.** Ensaio de resazurina após setenta e duas horas de contato direto com o vidro bioativo nanoparticulado.

### 5. 3. 2. Proliferação Celular por (BrdU)

Na análise pelo ensaio de BrdU observou-se um aumento de  $33 \pm 3\%$  na proliferação das células PDLH quando em contato direto por setenta e duas horas com as nanopartículas de vidro bioativo, em comparação com o grupo controle ( $p < 0,0001$ ,  $n = 5$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism) (Figura 3.38).



**Figura 5. 38.** Ensaio de proliferação por BrdU após três dias de contato direto com o vidro bioativo nanoparticulado.

### 5. 3. 3. Atividade da fosfatase alcalina

Foi observado um aumento na atividade da fosfatase alcalina ALP de  $177 \pm 3\%$  nas células PDLH em contato direto com as nanopartículas de vidro bioativo produzidas pelo método de Stöber quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,0001$ ,  $n = 3$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism) (Figura 3.39).

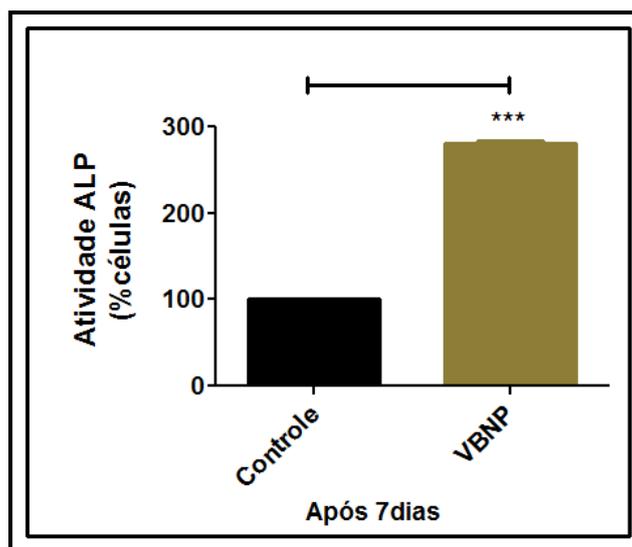
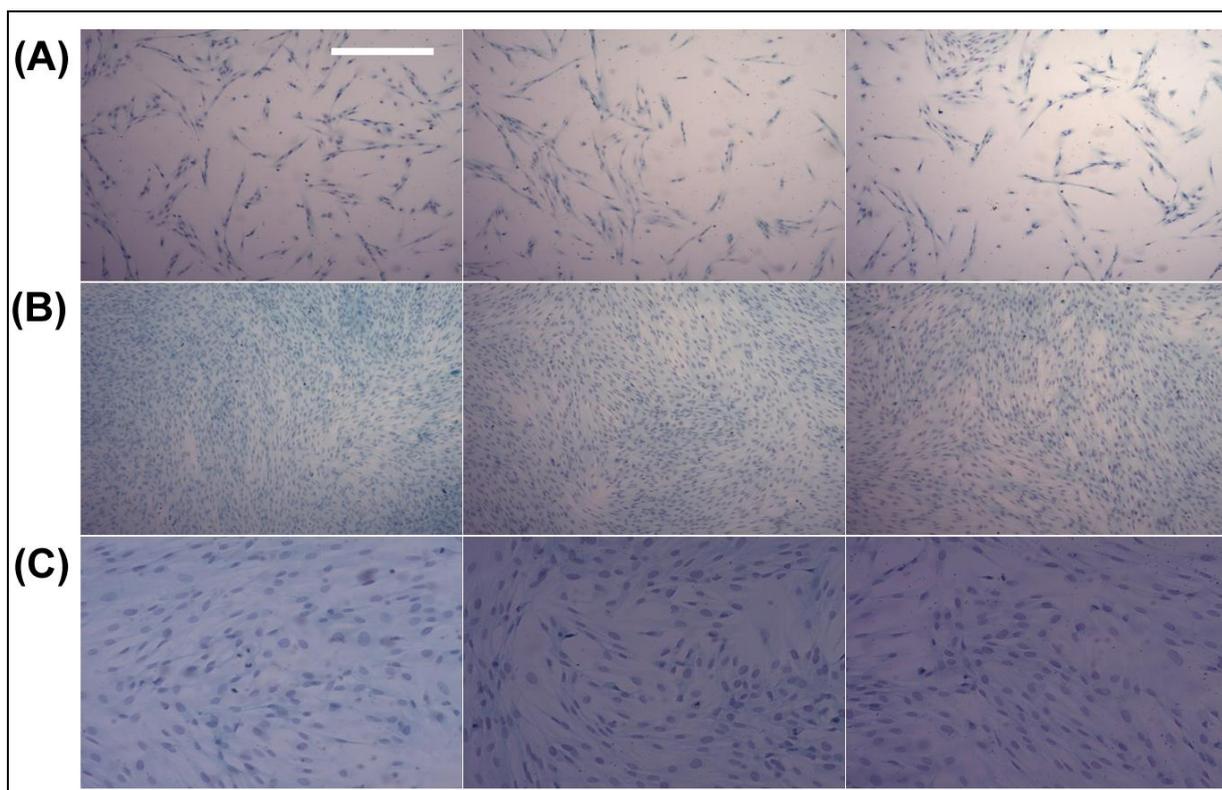


Figura 5. 39. Atividade da ALP após sete dias de contato direto.

## 5. 4. Análise do comportamento de células do ligamento periodontal humano em contato com as membranas compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL contendo nanopartículas de vidro bioativo Produzidas pelo Método Coprecipitação

### 5. 4. 1. Ensaio de proliferação e morfologia celulares com VBNP

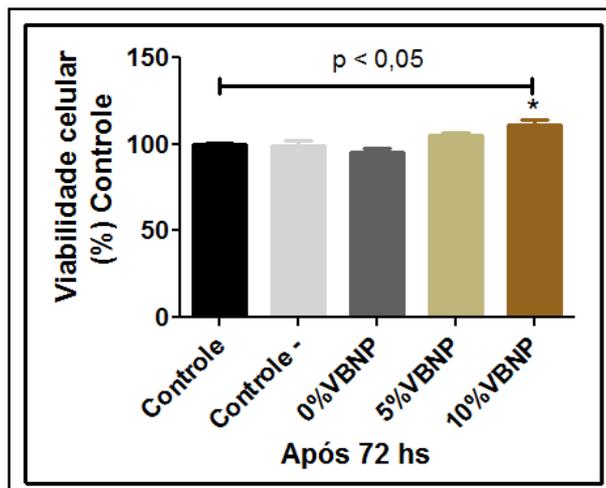
Nesse estudo, para determinar a proliferação celular foi utilizada a técnica histoquímica de Feulgen. Esse estudo foi realizado preliminarmente com células PDLH utilizando somente VBNP na forma de partículas misturadas ao meio de cultura. A figura 5.40 demonstra que após 72 horas de tratamento com VBNP houve aumento do número de células PDLH em comparação com condição controle, os experimentos foram realizados em triplicata. A morfologia das células parece não ter se alterado, demonstrando um emaranhado de células indistinguíveis com predominância de fibroblastos do ligamento periodontal.



**Figura 5. 40.** Ensaio de Feulgen. (A) Condição controle (barra = 20µm, n=3, 4X) (B) Condição tratada com VBNP (N=3, 4X) (C) Condição tratada (10X).

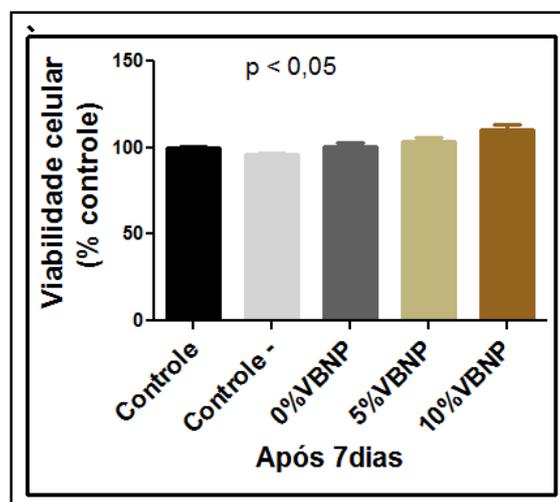
#### 5. 4. 2. Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina

Para avaliar a citotoxicidade das membranas compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL-T contendo 0%, 5% ou 10% de VBNP foi utilizado o ensaio de viabilidade com resazurina. O ensaio foi realizado em dois tempos; a figura 5.41 apresenta os resultados após três dias de contato das células PDLH com as membranas. Observa-se que houve um aumento significativo de  $112 \pm 3\%$  da viabilidade das células semeadas na membrana com 10% de vidro em relação ao grupo controle. As outras amostras não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, entretanto, os resultados demonstraram que as mesmas não apresentaram toxicidade para as células PDLH. (n = 3,  $p < 0,05$  análise estatística: One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism).



**Figura 5. 41.** Ensaio de resazurina após setenta e duas horas de contato com as membranas.

Uma vez que o ensaio de resazurina não é destrutivo, foi realizado um novo teste após sete dias de contato entre as células e as membranas. O gráfico da figura 5.42 apresenta os resultados obtidos a partir desse ensaio. Observa-se que não houve diferença significativa entre a condição tratada e a controle.

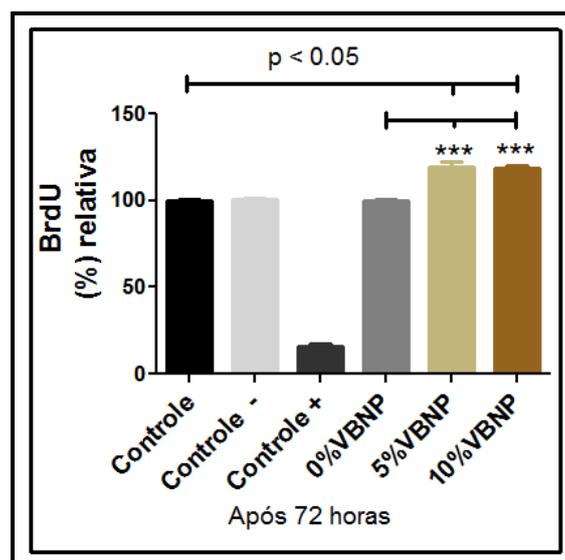


**Figura 5. 42.** Ensaio de resazurina após sete dias de contato com as membranas.

#### 5. 4. 3. Proliferação Celular por (BrdU)

Para analisar a proliferação de células PDLH em contacto com as membranas compósitas contendo 0%, 5% e 10% de VBNP foi utilizada a técnica do BrdU. No gráfico da figura 5.43 observa-se um aumento de  $20 \pm 3\%$  e de  $18 \pm 1\%$  na

quantificação de BrdU nas células em contato com as amostras com 5 e 10% de VBNP respectivamente em comparação com o grupo controle. Células em contato com membranas compostas sem vidro não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle. Também foi observada uma diferença significativa de 20% e 19% entre a amostra sem vidro e as com 5 e 10% de VBNP respectivamente. ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ , Figura 5. 43, One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism).



**Figura 5. 43.** Ensaio de proliferação por BrdU após três dias de contato com as membranas.

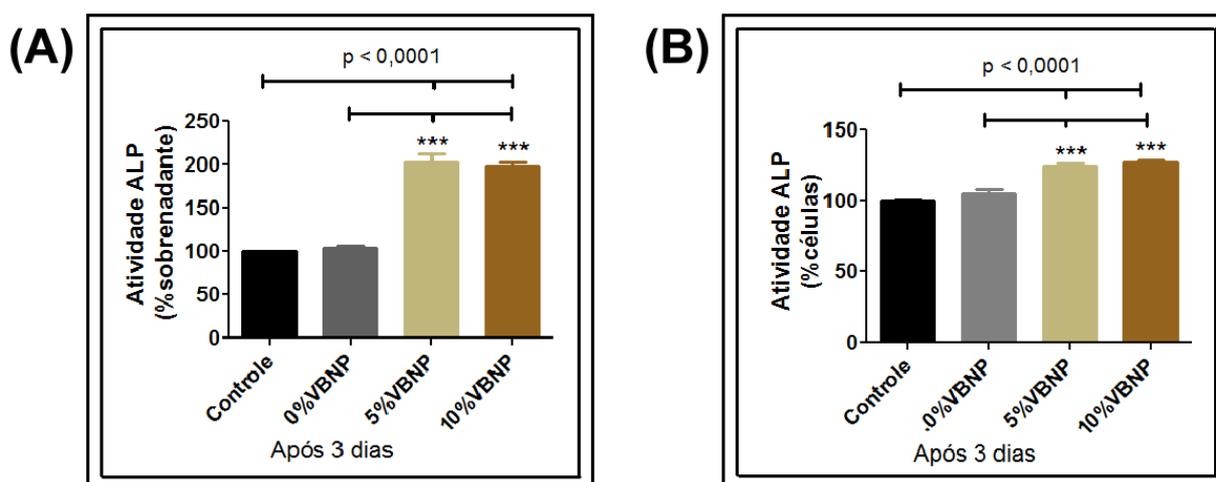
#### 5. 4. 4. Atividade da fosfatase alcalina

Estudos indicam que células PDLH apresentam atividade da ALP, além de ser um importante marcador precoce de diferenciação celular [168]. Por isso, foi analisada a atividade da fosfatase alcalina no sobrenadante e nas células PDLH semeadas em membranas compósitas de QUI / PVA / PEG / PCL-T contendo 0%, 5% ou 10% de VBNP após três e sete dias de tratamento.

Após três dias de tratamento, houve um aumento de  $102 \pm 10\%$  e um aumento de  $98 \pm 5\%$  para a atividade da ALP na análise do sobrenadante de células PDLH em contato com as amostras contendo 5% e 10% de VBNP respectivamente, em comparação com o grupo controle. Membranas contendo 0% de VBNP não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle. Entretanto, houve um aumento significativo de 100% e 95% na atividade da ALP na análise do sobrenadante de células PDLH em contato com as amostras contendo 5% e 10% de vidro respectivamente, em

comparação com o grupo sem vidro bioativo ( $p < 0,0001$ ,  $n = 3$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism ) (Figura 5. 44. A).

A análise da atividade da fosfatase alcalina nas células PDLH é mostrada no gráfico da figura 5. 44. B, observa-se um aumento de  $24 \pm 2,3\%$  e  $27 \pm 1,5\%$  da atividade da ALP nas células em contato com as amostras contendo 5% e 10% de VBNP respectivamente, em comparação com o grupo controle. Membranas compostas contendo 0% de VBNP não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle. No entanto, houve um aumento de 19% e 22% da atividade da ALP de células em contato com membranas compósitas contendo 5% e 10% de VBNP respectivamente, em comparação com o grupo sem vidro ( $p < 0,0001$ ,  $n = 3$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism) (Figura 5. 44. B).

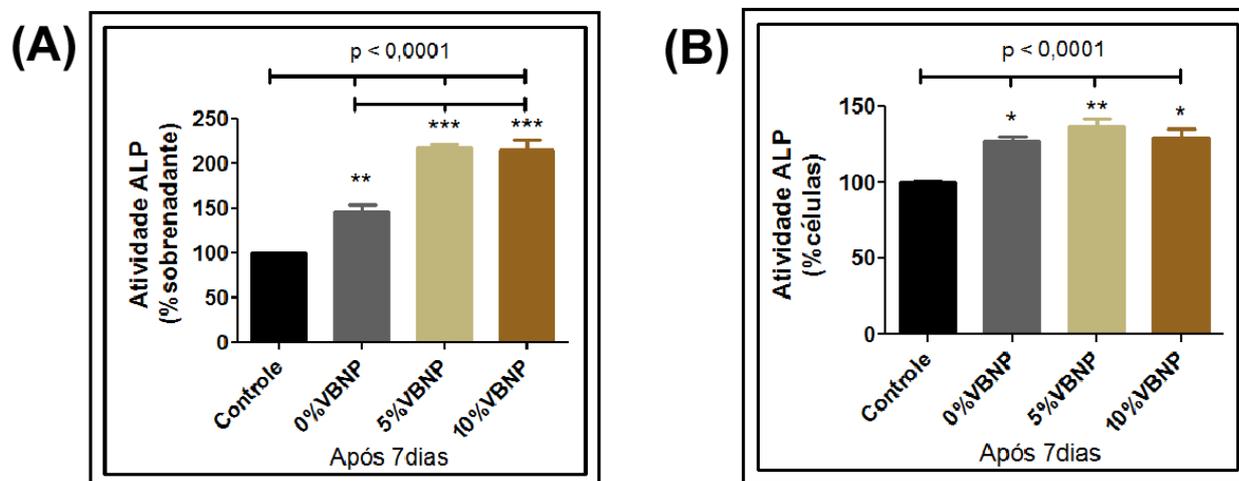


**Figura 5. 44.** Atividade da ALP após três dias. (A) sobrenadante da cultura celular e (B) células do ligamento periodontal humano.

Após sete dias houve um aumento de  $47 \pm 7$ ,  $118 \pm 4\%$  e  $115 \pm 11\%$  na atividade da ALP na análise do sobrenadante das células em contato com as amostras contendo 0%, 5% e 10% de VBNP respectivamente em relação ao grupo controle. Houve também uma diferença significativa de 71% e de 68% das amostras com 5% e 10% de VBNP respectivamente quando comparadas com a amostra sem vidro bioativo ( $p < 0,0001$ ,  $n = 3$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism) (Figura 5. 45. A).

A análise da ALP nas células PDLH apresentou um aumento de  $26 \pm 4\%$ ,  $37 \pm 5\%$  e  $29 \pm 6\%$  da atividade da ALP nas células em contato com as amostras contendo 0%, 5% e

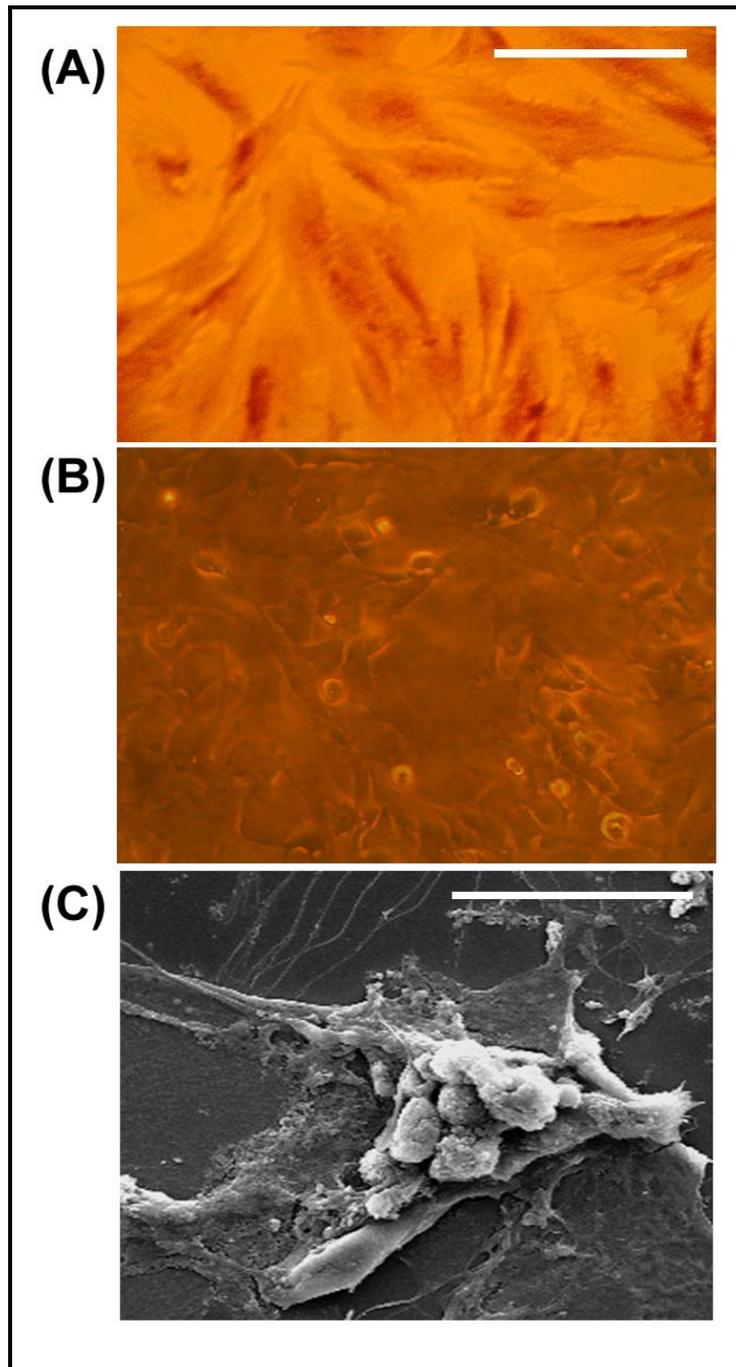
10% de VBNP respectivamente, em comparação com o grupo controle ( $p < 0,0001$ ,  $n = 3$ , One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism) ( Figura 5. 45. B).



**Figura 5. 45.** Atividade da ALP após sete dias. (A) sobrenadante da cultura celular e (B) células

#### 5. 4. 5. Morfologia das Células PDLH nas Membranas Compósitas

A figura 5.46. B apresenta a morfologia das células PDLH na amostra com 5% de VBNP em microscopia óptica e eletrônica de varredura. Observa-se que na amostra existem células aderidas, entretanto, as imagens não permitem visualizar com nitidez a morfologia das mesmas. Nas imagens obtidas por MEV pode-se observar um pequeno número de células aderidas com prolongamentos, que são característicos de fibroblastos do LP.



**Figura 5. 46.** Morfologia das células PDLH. (A) PDLH na placa de cultura imagem de (microscopia óptica, 20X, barra = 20µm) (B) PDLH na membrana com 5% de VBNP (microscopia óptica, 20X) e (C) PDLH na membrana (MEV, 15Kv, 1500X, barra = 100µm).

## 6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Vários biomateriais têm sido investigados na engenharia de tecidos na área odontológica, principalmente visando o desenvolvimento de matrizes que possam servir de suporte celular das várias estruturas que compõem o elemento dentário. Dentre essas estruturas o tecido periodontal se destaca por representar um complexo aparato responsável por dar sustentação e proteção ao elemento dentário na cavidade oral. Por isso a sua total regeneração depende de vários fatores e é orquestrada por processos biológicos que envolvem ações recíprocas de diferentes mecanismos celulares e moleculares. O desenvolvimento de matrizes com a finalidade de cultivar e regenerar células do tecido periodontal é uma ferramenta importante para a contemporânea engenharia de tecidos periodontais.

Nesse trabalho em uma primeira etapa foram sintetizadas membranas compósitas de quitosana, poli (álcool vinílico), poli (etileno) glicol, poli (caprolactona) triol com adição de 0%, 5% e 10% de nanopartículas de vidro bioativo. A escolha dessas amostras foi norteadada pela produção de membranas que reticulassem através das interações entre a rede de polímeros propostos permitindo ainda, a adição de concentrações baixas de vidro bioativo nanoparticulado e que pudessem ser manipuladas facilmente em ensaios *'in vitro'* com células.

A partir da análise visual, foi possível verificar que os filmes com 0%, 5% e 10% de VBNP apresentavam aspecto semelhante com coloração amarela clara e transparente (Figura 5.1). Essa transparência sugere a natureza amorfa da membrana. Polímeros que possuem fase cristalina são normalmente opacos, já que a cristalinidade interfere na passagem de luz. Esses dados podem se confirmados pela análise do difratograma de Raios-X das três amostras (Figura 5.9). O caráter amorfo das membranas é uma indicação que houve reticulação dos polímeros presentes nas amostras não somente através de ligações físicas, mas também através da ligação química pela condensação dos grupos OH do PCL-T, PVA, VBNP e PEG com grupos OH e NH<sub>2</sub>, da QUI. A formação de cristais fica bastante restrita em rede polimérica, causando uma interferência nas fases, resultando em polímeros com caráter amorfo [169;170].

Na análise morfológica obtida por microscopia eletrônica de varredura as três amostras apresentaram aspecto semelhante, entretanto a análise obtida por EDS detectou a

presença de Si, P e Ca nas amostras com 5% e 10% de nanopartículas de vidro o que confirmou a presença qualitativa do vidro bioativo (Figura 5.2. B).

Com o objetivo de se analisar a estrutura química das membranas desenvolvidas, foi realizada a Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Por meio da análise das regiões de absorção nos espectros FTIR associados ao PVA, quitosana, PEG, PCL-T e vidro bioativo nanoparticulado foram realizadas comparações das intensidades buscando identificar as ligações presentes para as membranas com 0%, 5% e 10% de VBNP (Figuras 5.3 á 5.7).

Observou-se que as membranas com 0%, 5% e 10% de VBNP apresentaram bandas características de grupos pertencentes aos polímeros quitosana, PVA, PEG e PCL-T presentes no compósito, entretanto as três amostras apresentaram diferenças entre si (Figura 5.8).

A interação entre as fases orgânica e inorgânica de compósitos contendo vidro bioativo pode ocorrer por ligações de hidrogênio nesse caso consideradas fracas e pode também partir de ligações fortes como a covalente. Nos espectros das membranas com VBNP as ligações de Si-O-C na faixa de 1000 a 1100cm<sup>-1</sup> que correspondem á ligação covalente entre o vidro e quitosana e na faixa de 830 cm<sup>-1</sup> correspondendo à ligação covalente entre o vidro e o PVA não puderam ser visualizadas por causa da sobreposição de bandas nessa região. A banda de 456 cm<sup>-1</sup> que é atribuída segundo a literatura ao estiramento do Si-O-Si aparece somente nas membranas com 5% e 10% de VBNP [140].

Nos espectros das três amostras a faixa de 1740 a 1504cm<sup>-1</sup> as diferenças de intensidade das bandas atribuídas ás ligações da amida secundária sugerem que essas ligações podem estar relacionadas com ligações cruzadas entre o vidro e a quitosana nas amostras com 5% e 10% de VBNP. Observou-se que nessa faixa do espectro as amostras com 5% e 10% de VBNP apresentaram o maior número de diferenças entre si e em relação á amostra sem vidro. A diferença entre as amostras com vidro pode estar associada á diferença de concentração utilizadas nas duas membranas e a área superficial das nanopartículas. Essa diferença entre as amostras com VBNP também aparece na banda atribuída á ligação Si-O-Si em 1076cm<sup>-1</sup> que aparece ligeiramente mais intensa na amostra com 5% de vidro bioativo. Nanopartículas de vidro em

concentrações maiores tendem a aglomerar com mais facilidade e podem atrapalhar a perfeita interação entre a rede polimérica e a fase inorgânica.

Os dados apresentados acima confirmam a incorporação de nanopartículas de vidro bioativo nas membranas propostas. A análise FTIR mostrou-se uma ferramenta útil e interessante para a investigação da relação das estruturas orgânica e inorgânica do nanocompósito proposto nesse trabalho.

Outra importante caracterização realizada foi a determinação do ângulo de contato das três amostras. Alguns fatores inerentes à morfologia da superfície do biomaterial podem ser determinantes para a adesão celular tais como sua porosidade, composição, rugosidade, hidrofobia, hidrofília e carga superficial. As principais propriedades superficiais que química e fisicamente influenciam a adesão celular são a carga superficial, rugosidade e a hidrofobia / hidrofília.

As membranas com 5% e 10% de VBNP apresentaram comportamento semelhante e decréscimo do ângulo de contato quando comparadas com a amostra sem vidro. A membrana com 10% de VBNP apresentou um menor valor do ângulo  $\theta$  quando comparada com a membrana com 5% de vidro, entretanto essa diferença não foi significativa (Figura 5.10).

Estes dados sugerem que as moléculas de água foram facilmente dissolvidas na superfície das membranas compósitas. A diminuição no ângulo de contacto indica que a superfície do compósito tornou-se mais hidrofílica com a adição das nanopartículas de vidro. Esse resultado é explicado pelo caráter hidrofílico das nanopartículas de vidro bioativo, provocado pelo grupo Si-OH e pelo aumento da rugosidade das amostras. Esses resultados são condizentes com a literatura, Bo Lei (2013) e colaboradores conseguiram valores de ângulos contato na faixa de 29 a 37° quando adicionaram 10, 20 e 30% de vidro bioativo nanoparticulado em compósitos de PCL sendo que o PCL puro apresentou valor de 75°.

Foi realizada a análise do efeito da incorporação de nanopartículas nas amostras em relação às propriedades mecânicas, para isso, foram realizados ensaios de tração (Figura 5.11 e Tabela 5.1). Com a incorporação do VBNP houve um aumento significativo do módulo de elasticidade (Figura 5.12) e do limite de resistência observado pelo aumento

da tensão máxima das amostras quando comparadas com a amostra sem vidro (5.13). Esses resultados confirmam a importância da presença das partículas de reforço em compósitos poliméricos e este parâmetro efetivamente afetou as propriedades mecânicas das membranas desenvolvidas. Isto ocorre devido às características estruturais que contribuem para diferentes interações entre as partículas da fase inorgânica e a matriz polimérica.

Segundo a literatura, o aumento do módulo ocorre porque em compósitos poliméricos com fase de reforço inorgânico, quando uma fratura se inicia ela pode se deparar com as partículas de preenchimento. Essa fase de reforço provoca a dissipação de energia, sendo assim será necessária uma energia muito maior para que ocorra a fratura. No caso dessa fase de reforço ser nano particulada a superfície de preenchimento é ainda mais eficiente [40].

Em relação á deformação total as amostras com 0% de VBNP que apresentaram  $96 \pm 1,84\%$  de deformação após a adição de 5% e 10% de VBNP passaram a ter  $71 \pm 6,81\%$  e  $70 \pm 2,92\%$  respectivamente (Figura 5.14). Esses dados são mais elevados que os encontrados por Lemos (2013), que fez um estudo comparativo em membranas compósitas de QUI / PVA reticuladas com glutaraldeído contendo nanopartículas de vidro bioativo, e obteve media de deformação de 22 e 13% para as amostras com 5% e 10% de VBNP respectivamente.

A membrana com 0% de VBNP apresentou um valor médio de tensão máxima de 11,04MPa, um valor próximo ao encontrado por Costa (2008) que obteve resultados de 12,20MPa e 12,70MPa para filmes de quitosana / PVA com 1e 5% de glutaraldeído [21]. Bispo (2009) em seu trabalho com filmes de quitosana / PVA reticuladas com 1% de genipin encontrou valores médios de 9 MPa para tensão máxima [127].

É importante salientar que alguns parâmetros de síntese como o pH da solução, o grau de desacetilação da quitosana, o grau de hidrólise do PVA, o método de secagem das membranas, o protocolo de mistura podem em conjunto influenciar as propriedades mecânicas como relatado na literatura [21;127;172].

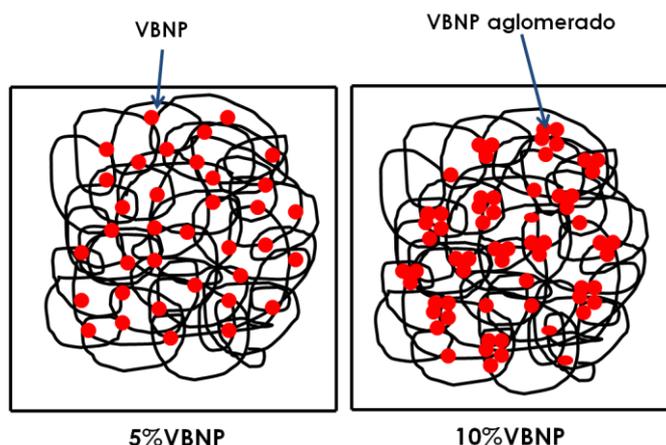
No presente trabalho os resultados dos ensaios mecânicos são adequados para utilização das membranas como matrizes em regeneração periodontal, já que as mesmas são

colocadas geralmente em regiões que não recebem o impacto direto da mastigação. Além disso, o objetivo na regeneração periodontal é a biodegradação das matrizes com posterior substituição dos tecidos lesionados por células e estruturas periodontais saudáveis, que estas sim, cumpririam a função de proteção e sustentação dos dentes na cavidade oral.

A compreensão da degradação térmica de biomateriais compósitos poliméricos constitui, juntamente com as propriedades mecânicas, um aspecto indispensável para o estabelecimento da aplicabilidade dos mesmos. Além de fornecer informações sobre a estabilidade térmica e a composição da amostra, a análise termogravimétrica pode ser utilizada para obtenção de informações a respeito da cinética de decomposição e do tempo de vida útil do material em estudo.

No presente estudo as três amostras apresentaram padrão semelhante de degradação térmica com três estágios de perda de massa, entretanto, com valores de temperaturas máximos de degradação com diferenças significativas na terceira fase. A amostra com 5% de VBNP apresentou melhor estabilidade térmica que as outras duas amostras. A amostra com adição de 10% de vidro apresentou a menor estabilidade térmica, principalmente na última fase (Figuras 5.15 a 5.19).

Esses dados ressaltam novamente a importância do tamanho das partículas e a concentração utilizada das mesmas no compósito. Como já citado anteriormente, nanopartículas em maiores concentrações tendem a se aglomerar e formarem estruturas menos homogêneas. Nesse caso as nanopartículas passam a atuar como defeitos na rede polimérica ao invés de atuarem como reforço. Nesse trabalho a amostra com 5% de VBNP parece ter criado uma rede mais homogênea, por isso, apresentou uma maior estabilidade térmica em relação à outra amostra com 10% de vidro. A figura 6.1 mostra uma representação do que essa diferença de concentração de nanopartículas de vidro bioativo pode provocar na estrutura da membrana.



**Figura 6.1.** Desenho esquemático do efeito da diferença de concentração das nanopartículas de vidro bioativo na estrutura das duas amostras.

A próxima ferramenta de análise utilizada foi o estudo de degradação *'in Vitro'* utilizando meios de cultura celular PBS e DMEM. A degradação de biomateriais pode ser caracterizada pelas alterações das propriedades físico-químicas e mecânicas (desintegração e dissolução) do material depois da implantação em tecidos vivos ou após imersão em soluções fisiológicas. Compósitos biodegradáveis têm a vantagem de permitir a neoformação tecidual à medida que são degradados.

A análise do processo de degradação das membranas compósitas realizada nesse trabalho apresentou uma série de dificuldades em face da complexidade dos materiais utilizados, dos inúmeros eventos envolvidos e dos fatores que interferiram nas diferentes respostas.

O método de estudo da degradação utilizando o ambiente de cultura celular *'in vitro'* foi escolhido como modelo experimental, por que representa uma forma de avaliar o comportamento de degradação de biomateriais de maneira controlada, mimetizando o ambiente *'in vivo'*. Além disso, no presente estudo o meio de cultura DMEM faz parte do protocolo de cultura das células PDLH e o meio PBS foi utilizado por 24 horas para limpeza das possíveis impurezas das membranas desenvolvidas.

Nas primeiras vinte e quatro horas quando imersas em PBS as três amostras apresentaram média de perda de massa de 64,5%, 70% e 67% para as amostras com 0%, 5% e 10% de VBNP respectivamente. Provavelmente ocorreu nas primeiras horas de degradação, a solvatação das ligações físicas do compósito com posterior

despolimerização através da quebra das ligações covalentes. Segundo Costa (2008) a degradação pode ser o resultado de atividades químicas como solvatação, dessorção, dissociação, hidrólise, dissolução, oxidação, redução e fotólise, bem como, atividades físicas que podem erodir a matriz da blenda polimérica tais como difusão, abrasão, trincas, quebra mecânica, ou qualquer combinação dessas atividades físicas e químicas .

A partir do segundo dia as amostras com nanopartículas de vidro apresentaram oscilações de peso e houve um pequeno aumento da massa das mesmas em relação às membranas sem vidro, entretanto, ao final do estudo essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 5.20 e Tabela 5. 2). Em seu trabalho, Costa (2008) obteve aumento significativo no índice de degradação de filmes de PVA com 5% de glutaraldeído nas primeiras 4 horas de ensaio, apresentando depois ligeira redução do mesmo, que permaneceu praticamente constante até às 96 horas de tratamento em *SBF* [21].

As imagens de microscopia eletrônica de varredura e as de EDS explicam os resultados mostrados na figura 5.20 e na tabela 5.2, onde o aumento de peso pode ser explicado pela deposição de sais e / ou possivelmente pela formação de fases de fosfatos de cálcio nas membranas com 5% e 10% de VBNP. A pequena perda de massa está relacionada com a degradação mínima e constante das membranas (Figuras 5.21 até 5.26).

Observa-se também através de análise do EDS que os picos de Si vão diminuindo de intensidade com o passar dos dias do ensaio e ao contrário os de P e Ca começam a aparecer com maior intensidade nas amostras com vidro. Esses dados reforçam a hipótese de que ocorreu a precipitação de fosfato de cálcio a partir da liberação de silício das membranas com vidro para o meio DMEM, com posterior policondensação da camada rica em sílica na superfície das amostras. Porém, esses são dados hipotéticos, já que esse tipo de análise foi qualitativa.

A imagem do DRX não apresentou picos de cristalinidade e não confirma que a fase formada seja a HA (Figura 5.29). Entretanto, a literatura reporta a existência de fosfato de cálcio amorfo (ACP), tal substância ocorre como uma fase transitória durante a formação de fosfatos de cálcio, particularmente HA precipitada, em sistema aquoso [11]. Normalmente, o ACP é a primeira fase que precipita numa solução sobressaturada preparada por mistura de soluções contendo cálcio e fosfato. Os espectros de difração de

raios-X do ACP revelam uma estrutura sem planos de difração. Análises por microscopia eletrônica de transmissão mostram que o ACP é formado por aglomerados de pequenas partículas esféricas amorfas com diâmetros de 20 a 120 nm. A literatura reporta que o ACP apresenta uma estrutura semelhante à da HA, mas como os cristais são muito pequenos esta fase aparece como amorfa. Uma das causas para essa ausência de picos cristalinos na análise de DRX pode ser a presença de ACP na superfície das membranas com vidro bioativo [173-175].

Para verificar alterações na estrutura química das amostras degradadas foi utilizada a análise por espectroscopia na região do infravermelho. Como já dito anteriormente as membranas sintetizadas nesse trabalho representaram enorme desafio por se tratarem de sistemas variados com estrutura multipolimérica e fase inorgânica composta por silicatos contendo cálcio e fósforo.

Na análise dos espectros observa-se que a banda entre  $3550-3200\text{cm}^{-1}$  sofreu nítida redução principalmente nas amostras com 0% e 5% de VBNP após vinte um dias de degradação, sugerindo remoção de água, e despolimerização da rede formada pela QUI, PVA, PEG, PCL-T e do vidro nas membranas compósitas (Figura 5.30). Essa evidência fica marcante, inicialmente pelo processo de erosão e despolimerização que foi demonstrado através da maior perda de massa. Se tomarmos por base que todos os polímeros que fazem parte da rede e também o vidro bioativo apresentam bandas relacionadas à hidroxila é de se esperar a redução ocorrida nessa faixa de ligação após a degradação. Para a amostra com 10% de VBNP a banda entre  $3550-3200\text{cm}^{-1}$  atribuída às ligações OH e NH não apresentou diferença após a degradação.

O estudo da bioatividade *'in vitro'* das membranas compósitas com SBF foi realizado com a finalidade de analisar a bioatividade das membranas desenvolvidas. Após sete dias de contato com SBF as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostraram a presença de estruturas com morfologia semelhantes á HA na superfície das membranas com 5% e 10% de VBNP, houve a confirmação por EDS da presença dominante de P e Ca (Figuras 5.31 e 5.32). A análise da difração de raios-x das amostras confirma a deposição de estrutura cristalina na superfície do compósito, através dos picos obtidos nos difratogramas, mas que não correspondem aos picos característicos da HA (Figura 5.3).

A precipitação de fosfato de cálcio é uma ocorrência de grande importância em processos fisiológicos, e de acordo com as condições do meio, diferentes fases do fosfato de cálcio podem ser obtidas como a hidroxiapatita, fosfato de cálcio di-hidratado ou brushita (DCPD), fosfato tricálcico, pirofosfato de cálcio, vários outros e ainda pode conter fases amorfas e / ou fases cristalinas [41;174;176-178].

Em algumas regiões das membranas com vidro foram observadas através de imagens obtidas por MEV fases de fosfato de cálcio com morfologia diferente da HA e características de DCPD ou brushita (Figura 5.37. A1). Teoricamente a brushita ou DCPD pode se formar com  $\text{pH} = 7,4$  á  $37^\circ\text{C}$ . Isso ocorre em situações que a proporção de cálcio e fosfato inorgânico é igual a 1. Vários pesquisadores investigaram a cinética de dissolução de DCPD [179;180]. Ferreira e colaboradores em seus estudos concluíram que alguns fatores cinéticos podem ter impacto desfavorável sobre a precipitação e o crescimento de HA [181;182]. Nestas condições, a brushita pode existir em equilíbrio metaestável com HA.

Os dados obtidos no estudo de bioatividade sugerem que houve precipitação de fosfato de cálcio nas membranas com vidro bioativo nanoparticulado, entretanto não podemos afirmar quais as fases estão presentes nas amostras analisadas. Uma das causas para essa imprecisão de resultados na análise de DRX pode ser devido ás dificuldades técnicas para se realizar o ensaio, como foi descrito na metodologia.

Desde que Seo e colaboradores (2004) acenaram com a presença de células estaminais nos tecidos periodontais a busca por esse tipo celular se tornou imperativa para as pesquisas relacionadas com a regeneração periodontal [10].

No presente trabalho, para a criação desse modelo de estudo, primeiro foi essencial o estabelecimento de uma cultura celular primária a partir do tecido periodontal humano. Foi importante a opção pelo modelo de cultura primária, pois, sabemos que células imortalizadas apesar de serem importantes na uniformidade de resultados para diferentes estudos podem exibir diferenças morfológicas e moleculares em passagens mais avançadas. No caso de culturas primárias apesar das dificuldades técnicas que existiram ao longo desse trabalho, apresentaram a vantagem de manter as características do rico fenótipo original do tecido periodontal.

O protocolo de extração celular foi o mesmo utilizado em trabalho anterior para extração de cementoblastos [35] e que foi adaptado de Kaneda e colaboradores (2003) [183]. No atual trabalho, foi criada uma população celular chamada de células do ligamento periodontal humano (PDLH) a partir de dentes com indicação ortodôntica de extração, pois, era essencial que os dentes fossem hígidos. A remoção do ligamento periodontal de raízes de dentes saudáveis extraídos por razões ortodônticas é a fonte mais comumente utilizada para obtenção de células do ligamento periodontal em experimentos *'in vitro'* para a engenharia tecidual periodontal. Essa população foi resultante das quatro de um total de cinco digestões celulares utilizando colagenase e tripsina. A primeira digestão foi descartada para diminuir o risco de contaminação com hemácias e bactérias.

Através do ensaio de azul de trypan foi possível determinar o padrão de crescimento das células por três dias. As células PDLH apresentaram padrão ascendente de crescimento. Esses resultados foram importantes para nortear os protocolos e resultados dos experimentos que foram realizados posteriormente com as células PDLH em contato as membranas nanocompósitas desenvolvidas (Figura 5.34).

As células PDLH foram analisadas morfológicamente por microscopia óptica e os dados foram condizentes com a literatura; células indistinguíveis na microscopia óptica com prevalência da morfologia de fibroblastos periodontais, ou seja, células fusiformes, com núcleos centrais e típicos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 5.35) [167].

A próxima etapa foi verificar se essas populações celulares expressavam genes comuns dos vários tecidos que compõem o tecido periodontal. A análise foi feita utilizando RT-PCR qualitativo para genes que caracterizam tecidos mineralizados: fosfatase alcalina, RUNX2 e osteocalcina. Houve a confirmação da expressão dos três genes pelas células PDLH. Proteínas não colágenas ósseas têm múltiplas funções relacionadas com a formação, equilíbrio e reparo de tecidos mineralizados. Estudos têm demonstrado que essas proteínas estão presentes no tecido periodontal e dentário. Evidências indicam que a osteocalcina é expressa quase exclusivamente em tecidos mineralizados, isto é, no cimento, nos ossos e dentes com a função de regular o crescimento dos cristais de hidroxiapatita.

A atividade da fosfatase alcalina é requerida para gerar fosfato inorgânico a partir da hidrólise de pirofosfato inorgânico extracelular que é necessário para a cristalização da hidroxiapatita, além disso, é um importante marcador de diferenciação celular [55;86;87]

A expressão de colágeno  $\alpha$  I também foi encontrada nas células PDLH. Col  $\alpha$  I constitui a parte principal da matriz extracelular de cementoblastos e osteoblastos e também fibroblastos periodontais secretam-na para a formação das fibras do ligamento periodontal.

Foi verificada também a expressão de genes marcadores de cementoblastos: CP-23 e F-Spondin, e as células expressaram os dois genes. Carvalho e colaboradores (2011) investigaram a possibilidade de F-Spondin ser um marcador de cementoblastos [35]. Por último foi verificada a presença de periostin que é expressa preferencialmente no ligamento periodontal e periósteo indicando sua especificidade tecidual. Portanto a expressão dos genes acima citados nessa população celular confirma a presença desses tipos celulares que compõem o tecido periodontal; osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal nas células PDLH (Figura 5.36).

Nesse trabalho se buscava também encontrar evidências de células estaminais e através de análise RT-PCR se confirmou a presença de CD105 e CD166, que são marcadores de células mesenquimais (Figura 5.36). Entretanto estudos futuros ainda serão realizados para análise complexa desses resultados utilizando também anticorpos específicos para esses dois marcadores e também para CD34 e CD45. Entretanto esses resultados representam um importante passo para a futura utilização dessas células na regeneração periodontal.

A literatura reporta que o vidro bioativo aumenta a diferenciação, proliferação, e mineralização dos osteoblastos e induz a diferenciação de células do estroma da medula óssea em osteoblastos [37;55;184]. Carvalho e colaboradores (2011) em seus estudos verificaram que os produtos iônicos de vidro bioativo aumentaram a viabilidade e proliferação de cementoblastos [35].

O efeito significativo que o vidro bioativo tem sobre comportamento de osteoblastos,

cementoblastos e sobre a diferenciação de células tronco sugere que ele pode ter um efeito semelhante nas células PDLH e também nas células tronco mesenquimais presentes no ligamento periodontal, desde que os dois tipos celulares fazem parte do tecido periodontal. Portanto, a próxima etapa desenvolvida nesse trabalho foi a análise do comportamento das células PDLH em contato direto com nanopartículas de vidro bioativo e posteriormente também com membranas compósitas com nanopartículas adicionadas.

Os testes realizados por contato direto com as nanopartículas tiveram como finalidade padronizar os ensaios futuros com as membranas desenvolvidas. Observou-se um aumento de  $20 \pm 1,63\%$ , de  $33 \pm 3,0\%$  e de  $177 \pm 2,9\%$  na viabilidade, proliferação e atividade da fosfatase alcalina das células PDLH quando em contato direto com nanopartículas de vidro bioativo (Figura 5.37 - 5.39). Além disso, no ensaio da análise morfológica foi visivelmente maior o número de células nas lamínulas tratadas com VBNP em comparação com a condição controle (Figura 5.40). Portanto, os dados acima sugerem que as células PDLH têm um comportamento similar ao de cementoblastos e osteoblastos quando em contato com o vidro bioativo.

O próximo passo foi analisar o comportamento das células semeadas nas membranas compósitas com adição de vidro bioativo. Nesse caso foram utilizados dois tempos de tratamento, três dias e sete dias. Foram analisados o comportamento proliferativo, viabilidade celular e atividade da fosfatase alcalina. A partir da viabilidade mitocondrial das células PDLH que foi medida pelo ensaio de resazurina pôde se avaliar a toxicidade das membranas desenvolvidas.

Observou-se que todas as amostras não tiveram efeito tóxico para as células PDLH após três dias de tratamento; somente as células em contato com a amostra com 10% de VBNP apresentaram um aumento significativo da viabilidade após o terceiro dia de tratamento quando comparadas ao grupo controle. Após sete dias de tratamento nenhuma membrana apresentou diferença significativa com o grupo controle (Figuras 5.41 e 5.42). Esses resultados sugerem que os produtos da degradação das amostras não tiveram efeito negativo sobre a viabilidade das células PDLH. Uma vez que o ensaio de resazurina não é destrutivo, foi possível quantificar a viabilidade das células após sete dias. Além disso, o resultado apresentado pela amostra com 10% de VBNP pode

significar uma resposta celular ao efeito bioativo do vidro adicionado á amostra com VBNP.

Já que o ensaio anterior analisa somente a viabilidade mitocondrial das células e podem existir diferenças numéricas dessa organela nas células o próximo passo foi realizar um ensaio que pudesse reproduzir com melhor fidelidade a proliferação celular. Por isso foi realizado o ensaio de BrdU. Com esse método de incorporação de BrdU sintético a fase S da mitose pode ser realmente detectada com o uso de anticorpos específicos anti BrdU.

As células PDLH após três dias de contato com membranas compósitas com 5% e 10% de VBNP apresentaram aumento significativo da proliferação quando comparadas com a condição controle e também com a amostra sem vidro. Esses dados confirmam a resposta bioativa das membranas após adição de VBNP (Figura 5.43).

A avaliação da proliferação e viabilidade celular é uma ferramenta valiosa para analisar culturas celulares em contato com biomateriais, entretanto, sozinha não permite que análises completas sejam realizadas [55]. Por esse motivo nesse trabalho uma técnica complementar, para avaliação do comprometimento celular com o complexo fenótipo das células PDLH foi utilizada, isto é, a avaliação da atividade da fosfatase alcalina. Houve um aumento gradual e significativo da atividade da ALP das células PDLH em contato com as amostras com 5% e 10% de vidro em relação ao grupo controle e em relação á amostra sem vidro (Figura 5.44 e 45).

Os resultados desse estudo demonstraram que as membranas com adição de vidro favoreceram a atividade da fosfatase alcalina e isto de alguma forma pode contribuir para a expressão fenotípica de cementoblastos e osteoblastos desde que nesses dois tipos celulares a ALP é um importante marcador de diferenciação celular. Além disso, segundo a literatura fibroblastos do ligamento periodontal também expressam fosfatase alcalina [88].

Se compararmos a viabilidade celular após sete dias de contato, que permaneceu constante em relação ao terceiro dia de ensaio, com a atividade da fosfatase alcalina nos respectivos dias, podemos supor que talvez esteja ocorrendo um início de diferenciação das células estaminais mesenquimais presentes na população PDLH a partir do sétimo

dia de cultivo. A literatura reporta que células com potencial para diferenciação osteoblástica / cementoblástica são menos proliferativos que subclones sem este potencial [55]. Entretanto análises complementares com tempos mais longos de tratamento precisam ser realizadas para confirmar essa suposição sobre diferenciação celular no presente estudo.

Observou-se nesse estudo que adição de uma concentração maior de VBNP nas membranas compósitas não influenciou na resposta biológica, pois as amostras com 5% e 10% de vidro tiveram respostas semelhantes. Uma provável explicação para esse fato, que já foi citado em tópicos anteriores sobre caracterizações físicas e químicas das membranas desenvolvidas é que a maior concentração de nanopartículas de vidro bioativo pode estar atuando como um defeito nas membranas e dessa forma desfavorece a perfeita interação com o compósito e isso tem consequências negativas nas propriedades do material e na sua resposta biológica.

Isso reforça o princípio que quando se utiliza nanopartículas como reforço em compósitos é necessário modular a concentração utilizada para se obter materiais com melhores propriedades. Por isso as imagens da figura 5.46 só foram realizadas com as células semeadas na amostra com 5% de VBNP.

Juntando todos os resultados observados nesse trabalho podemos concluir que a membrana compósita desenvolvida apresenta propriedades físicas, químicas e biológicas compatíveis ao cultivo de células do ligamento periodontal humano. Além disso, a adição de vidro bioativo nanoparticulado nas membranas teve um efeito positivo em relação á viabilidade e proliferação desse tipo celular. A presença de marcadores de células estaminais mesenquimais nas células PDLH reforça a importância dessa população celular e juntamente com as membranas desenvolvidas abre perspectivas para a sua utilização na regeneração periodontal.

## 7. CONCLUSÕES

Foi estabelecida uma cultura primária estável de células do ligamento periodontal a partir de dentes humanos; que foi chamada de células PDLH.

Estas células foram caracterizadas por marcadores de tipos celulares que fazem parte do complexo tecido periodontal.

Foi comprovada a presença de marcadores de células tronco mesenquimais na população de células PDLH, esse dado abre novas perspectivas para estudos de regeneração periodontal.

Membranas compósitas de QUI / PVA /PEG / PCL-T com adição de VBNP foram desenvolvidas com sucesso com introdução de PEG e PCT-T no compósito que teve um papel positivo na reticulação das mesmas.

As membranas alcançaram um desempenho adequado para a possível aplicação como suporte de cultivo celular para regeneração periodontal.

As nanopartículas de vidro bioativo empregadas como fase bioativa e de reforço cumpriram sua função elevando significativamente os valores de resistência nos ensaios de tração e degradação térmica. Além disso, aumentaram a rugosidade superficial do compósito elevando a hidrofília, o que pôde ser comprovado pela diminuição do ângulo de contato.

Foi possível a partir dos resultados de caracterização compreender a necessidade de modulação dos resultados em relação á concentração ideal de adição de nanopartículas de vidro bioativo.

Os testes biológicos '*in vitro*' realizados com as células PDLH demonstraram aumentos significativos de viabilidade celular, proliferação celular e atividade da fosfatase alcalina tanto pelo contato direto com o vidro bioativo como pelo contato com as membranas nanocompósitas.

## 8. TRABALHOS FUTUROS

1. Validação da presença de células tronco no ligamento periodontal.
2. Avaliação da diferenciação cementoblástica das células tronco mesenquimais do ligamento periodontal.
3. Desenvolvimento de matrizes 3D de quitosana / PVA / PEG / PCL-T / com adição de vidro bioativo nanoparticulado.
4. Desenvolvimento de sistema injetável de quitosana / PVA / PEG /com adição de vidro bioativo nanoparticulado para regeneração de cementoblastos do ligamento periodontal.
5. Testes '*in vivo*' das membranas compósitas.

## 9. TRABALHOS PUBLICADOS SOBRE O TEMA

1. S. M.Carvalho, A.A.R.Oliveira, L.M.Andrade, M.F.Leite, M.M.Pereira. The effect of bioactive glass nanoparticles on the behavior of human periodontal ligament cells. *Dental Materials* 2011; 27: 42-43.
2. Sandhra M.Carvalho, Agda A.R.Oliveira, Camila A.Jardim et al. Characterization and induction of cementoblast cell proliferation by bioactive glass nanoparticles. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2011.
3. Sandhra M.Carvalho, Agda A.R.Oliveira, Elke M.F.Lemos, Marivalda M.Pereira. Bioactive Glass Nanoparticles for Periodontal Regeneration and Applications in Dentistry. *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*. 2013: pp. 299-322.
4. Carvalho, S.M, Oliveira, A. A.R Leite, M.F, Pereira, M. M. Development composite chitosan / peg / pva / pcl containing bioactive glass nanoparticles for periodontal regeneration. *Libro de Trabajos Completos. 3ºTaller de Órganos Artificiales, Bioamateriales e Ingeniería de Tejidos*. 2013: PP. 303-308.



97

## The effect of bioactive glass nanoparticles on the behavior of human periodontal ligament cells

S.M. Carvalho, A.A.R. Oliveira, L.M. Andrade, M.F. Leite, M.M. Pereira

[Show more](#)<http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2011.08.500>

**Objectives:** The biologic goal of periodontal regeneration is the restoration of the periodontium to its original form and function. Bioactive glass is a tissue repairing material used for regeneration in many areas of dentistry. The purpose of this work was to evaluate the effect of bioactive glass nanoparticles (BGnp) on the behavior of HPDL cells isolated from human periodontal tissue.

**Materials and methods:** HPDL cells from third molar teeth with orthodontic indication for extraction were isolated. BGnp were synthesized by modified Stöber method. Tests were performed according to ISO 10993. BGnp were mixed in the medium, with weight-to-solution volume ratio of 0.1 mg/mL. Control cultures and seeded materials were characterized at 72 h for cell viability (Resazurine assay), at 72 h for cell proliferation (BrdU assay), at 72 h for cell cycle (flow cytometry) and alkaline phosphatase (ALP) activity after one-week culture.

**Results:** HPDL cells were incubated with bioactive glass nanoparticles for 72 h and cell viability, ALP activity and cell proliferation rate were evaluated in comparison to control conditions. We observed an increase of  $20 \pm 1.63$  in HPDL cells viability when cells were exposed to bioactive glass nanoparticles, compared with control group by resazurin assay ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). We observed an increase of  $33 \pm 3.0$  in cells proliferation when cells were exposed to bioactive glass nanoparticles, compared with control group by BrdU assay ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). It was observed an increase in ALP activity of  $177 \pm 2.9\%$  in HPDL cells compared with control group ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

**Conclusions:** These results indicate that BGnp induces HPDL cells to proliferate, indicating that it is a potential material to be used for periodontal regeneration through tissue engineering.

Corresponding author.

Copyright © 2011 Published by Elsevier Ltd.

## Characterization and induction of cementoblast cell proliferation by bioactive glass nanoparticles

Sandhra M. Carvalho<sup>1</sup>, Agda A.R. Oliveira<sup>1</sup>, Camila A. Jardim<sup>2</sup>, Carolina B.S. Melo<sup>3</sup>,  
Dawidson A. Gomes<sup>3</sup>, Maria de Fátima Leite<sup>2,4\*</sup> and Marivalda M. Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departments of Metallurgical and Materials Engineering, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, CEP: 31270-901, Brazil

<sup>2</sup>Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, CEP: 31270-901, Brazil

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, CEP: 31270-901, Brazil

<sup>4</sup>Howard Hughes Medical Institute, 4000 Jones Bridge Road, Chevy Chase, MD, USA

### Abstract

Cementum is a mineralized tissue that lines the surface of the tooth root enabling attachment of the periodontal ligament to the root and surrounding alveolar bone. Studies examining the mechanisms involved in the formation of root cementum have been hindered by an inability to isolate and culture the cells required for cementum production (cementoblasts). This study isolated and characterized cementoblast cells derived from rat molar periodontal ligament. It was observed that the isolated cells expressed F-Spondin, a cementoblast marker, while F-Spondin expression was not observed in the cells of other tissues such as gingival fibroblasts and osteoblasts. As expected, the isolated cementoblast cells also expressed osteocalcin (OC), bone sialoprotein (BSP), alkaline phosphatase (ALP), and type I collagen, demonstrating the presence of mineralized tissues genes in cementoblast cells. These cells showed high ALP activity and calcified nodule formation *in vitro*. Since cementogenesis could be a critical event for regeneration of periodontal tissues, this study investigated whether bioactive glass particles could affect the proliferation of cementoblasts since they are known to enhance osteoblast proliferation. It was found that the ionic products from bioactive glass nanoparticles increased cementoblast viability, mitochondrial activity, and induced cell proliferation. Together, these results show the characterization of cementoblast cells from rat molar periodontal ligament. Additionally, it was shown that bioactive glass nanoparticles induced cementoblast to proliferate, indicating that they could be a potential material for use in cement regeneration through tissue engineering. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Received 18 October 2010; Revised 25 February 2011; Accepted 12 July 2011

Keywords cementoblasts; F-Spondin; bioactive glass nanoparticles

### 1. Introduction

Cementum is a mineralized tissue produced by cementoblasts during tooth root formation. It enables the attachment of the periodontal ligament to the roots and surrounding alveolar bone (Kitagawa *et al.*, 2006). During regeneration of tissue after periodontal disease, cementum is thought to play a critical role in the reparative process. Histologically, regenerative periodontal therapy should result in the formation of new cementum, periodontal ligament, and alveolar bone. One major drawback to

understanding the molecular mechanisms that regulate periodontal regeneration is the lack of cementum markers. Several attempts have been made to identify such markers. As a result, recent studies have found new markers for cementum such as cementum-derived attachment protein (CAP) (Arzate *et al.*, 2002), cementum-derived protein (CP-23) (Alvarez-Perez *et al.*, 2006), and F-Spondin (Kitagawa *et al.*, 2006). Although, cementum shares many properties with bone, most notably a remarkable similarity in biochemical composition, it differs from bone in its histological profile by lacking innervation and vascularization and because it has limited remodeling potential when compared to bone (Bosshardt, 2005; Nemoto *et al.*, 2009). As a result, a cementoblast cellular model is important for developing methods that induce cementoblast proliferation. The first section of the current

\* Correspondence to: M. Fatima Leite, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG-CEP, 31270-901, Brazil. E-mail: leitemd@netuno.cc.ufmg.br

# Bioactive Glass Nanoparticles for Periodontal Regeneration and Applications in Dentistry

# 15

Sandhra M. Carvalho, Agda A.R. Oliveira, Elke M.F. Lemos and Marivalda M. Pereira

*Metallurgical and Materials Engineering Department, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil*

## CHAPTER OUTLINE

15.1 Introduction .....	299
15.2 Composition and synthesis of bioactive glass nanoparticles .....	300
15.3 Bioactivity of glass nanoparticles .....	303
15.4 Bioactive glass in dentistry.....	305
15.5 Bioactive glass nanoparticles in periodontal regeneration .....	309
15.6 Bioactive glass nanocomposites .....	312
15.7 Bioactive glass nanocomposite applications in bone regeneration and dental implants .....	314
15.8 The future of bioactive glass nanoparticles in dentistry.....	315
15.9 Conclusions .....	317
Acknowledgments .....	317
References .....	318

## 15.1 Introduction

Bioactive glasses were first developed by Hench et al. in 1969, and represent a group of reactive materials that are able to bond to mineralized bone tissue in physiological environment. Bioactive glasses are widely used in the biomedical area. Early applications of bioactive glasses were in the form of solid pieces for small bone replacement in middle ear surgery [1,2]. Later, several applications of bioactive glasses have been proposed, including the dental field. Recently, bioactive glasses have been widely studied for potential application in tissue engineering and regenerative medicine.

A range of bioactive glasses with attractive properties, like biocompatibility and bioactivity, and synthesized by newer methods have been developed. Various investigations have been undertaken to obtain bioactive glasses in different forms, such as bulk, powder, composites, and porous scaffolds.

DEVELOPMENT OF COMPOSITE CHITOSAN / PEG / PVA / PCL MEMBRANES CONTAINING BIOACTIVE GLASS NANOPARTICLES FOR PERIODONTAL REGENERATION

Carvalho, S.M.<sup>1</sup>, Oliveira, A.A.R.<sup>1</sup>, Leite, M.F.<sup>2</sup>, Pereira, M.M.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Metallurgical and Materials Engineering,

<sup>2</sup>Departments of Physiology and Biophysics, (URFMG).

[Sandhra\\_carvalho@yahoo.com.br](mailto:Sandhra_carvalho@yahoo.com.br)

**ABSTRACT**

The biologic goal of periodontal regeneration is the restoration of the periodontium to its original form and function. Tissue engineering using human periodontal ligament cells (HPDL) cultured on composite membranes polymer/bioactive glass is a possible strategy. For this purpose, 0%, 5% and 10% of bioactive glass nanoparticles (BGNP) were incorporated into chitosan (CHI) / polyvinyl alcohol (PVA)/ polyethylene glycol (PEG) / polycaprolactone (PCL) composite membranes. The materials were characterized using, SEM, FTIR, XRD and *in vitro* bioactivity test. Human periodontal ligament cells HPDL of third molar teeth with orthodontic indication for extraction were isolated and cells were characterized by periodontal tissue markers. The cell viability by Resazurin assay, cell proliferation by BrdU assay and ALP activity assay were used to evaluate the behavior of HPDL cells when in contact with composites membranes. It was observed a significant increase in cell proliferation and ALP activity in HPDL cells when in contact with composite membranes containing bioactive glass nanoparticles. These results together suggest that the developed membranes are potential materials to be used for periodontal regeneration through tissue engineering.

**Keywords:** Periodontium, bioactive glass nanoparticles, chitosan.

**1. INTRODUCTION**

Periodontium is a complex anatomical structure composed of both hard and soft connective tissues. The structures comprising the periodontium include the gingiva, periodontal ligament, cementum and alveolar bone [1]. Several diseases affect the integrity of periodontal structures causing the destruction of the connective tissue matrix and cells, causing the loss of fibrous attachment and the resorption of alveolar bone. These changes often lead to tooth loss [2]. The biologic goal of periodontal regeneration is restoration of the periodontium to its original form and function. Bioactive glass is a tissue repairing material used for regeneration in many areas of dentistry. It is known that the effect of bioactive glass can be enhanced in the nanoscale [3]. Chitosan has interesting properties for tissue engineering applications such as biocompatibility and biodegradability. Preparations of membranes based on chitosan with other biomaterials such as PVA, PEG, PCL and BGNP may be promising regarding mechanical properties and particularly cell adhesion. Therefore, the aim of this study was to develop and to characterize composite membranes CHI /PVA / PEG / PCL containing BGNP and to evaluate the behavior of HPDL when in contact with membranes [4;5].

**2. MATERIALS AND METHODS**

**2.1. Synthesis of composite membranes.**

Nanoparticles dispersion was obtained in the ternary SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system by co-precipitation method [6]. Chitosan (CHI) powder with medium molecular weight, degree of deacetylation DD ≥ 75.0% was used without further purification. Chitosan solution (2%, w/v) were dissolved in 2% of acetic acid solution. Polymers: (I) PVA degree of hydrolysis 98%, molecular weight Mw = 10.000 g/mol, (II) PEG average molecular weight Mw = 6000 and (III) PCL average molecular = 900 all from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) were used in the synthesis of the material. Composite membranes were synthesized in the composition of 44% CHI (2% w) 40%

## References

1. Ricardo Faria Lima, Monica Morado Pinho, Cristina Lima, Ines Faria, Patrícia Santos, Cláudia Bordalo. Associação entre doença periodontal e patologias sistémicas. *Saude Oral* 2006; **22**: 379-390.
2. Mendieta C, Reeve CM. Periodontal manifestations of systemic disease and management of patients with systemic disease. *Curr Opin Periodontol* 1993; 18-27.
3. Amar S, Han X. The impact of periodontal infection on systemic diseases. *Med Sci Monit* 2003; **9**: RA291-RA299.
4. Intini RC. Future approaches in periodontal regeneration: gene therapy, stem cells, and RNA interference. *Dent Clin North Am* 2010; **54**: 141-155.
5. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontal* 2000; **24**: 253-269.
6. Yi Yang, Fabio M.V.Rossi, Edward E.Putnins. Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials* 2010; **31**: 8574-8582.
7. Caton J, Nyman S, Zander H. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *Periodontal* 1980; **7**: 224-231.
8. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regenerationanimal and human studies. *Periodontal 2000* 1993; **1**: 26-35.

9. McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec* 1987; **219**: 233-242.
10. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J ea. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; **364**: 149-155.
11. Tanaka K, Iwasaki K, Feghali KE, Komaki M, Ishikawa I, Izumi Y. Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods. *Arch Oral Biol* 2011; **56**: 380-388.
12. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; **8**: 315-317.
13. Taba M, Jr., Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res* 2005; **8**: 292-302.
14. Zhao Q, Gong P, Tan Z, Yang X. Differentiation control of transplanted mesenchymal stem cells (MSCs): a new possible strategy to promote periodontal regeneration. *Med Hypotheses* 2008; **70**: 944-947.
15. Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000; **71**: 1591-1600.
16. Partridge K, Yang X, Clarke NM et al. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **292**: 144-152.

17. Tamai N, Myoui A, Kudawara I, Ueda T, Yoshikawa H. Novel fully interconnected porous hydroxyapatite ceramic in surgical treatment of benign bone tumor. *J Orthop Sci* 2010; **15**: 560-568.
18. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and application . *Prog Polym Sci* 2006; **31**: 603-632.
19. Venter JP, Kotze AF, Auzely-Velty R, Rinaudo M. Synthesis and evaluation of the mucoadhesivity of a CD-chitosan derivative. *Int J Pharm* 2006; **313**: 36-42.
20. Rinaudo M, Auzely R, Vallin C, Mullagaliev I. Specific interactions in modified chitosan systems. *Biomacromolecules* 2005; **6**: 2396-2407.
21. Ezequiel de Souza Costa Júnior.

Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial. 2008. UFMG.

Ref Type: Thesis/Dissertation

22. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; **57**: 35-52.
23. Spin-Neto R, de Freitas RM, Pavone C et al. Histological evaluation of chitosan-based biomaterials used for the correction of critical size defects in rat's calvaria. *J Biomed Mater Res A* 2010; **93**: 107-114.
24. Akncbay H, Senel S, Ay ZY. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; **80**: 290-296.

25. Lin WC, Yu DG, Yang MC. Blood compatibility of novel poly( $\gamma$ -glutamic acid)/polyvinyl alcohol hydrogels. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006; **47**: 43-49.
26. Ezequiel S.Costa-Júnior, Edel F.Barbosa-Stancioli, Alexandra A.P.Mansur, Wander L.Vasconcelos, Herman S.Mansur. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 2009; **76**: 472-481.
27. Harish Prashanth KV, Tharanathan RN. Crosslinked chitosan--preparation and characterization. *Carbohydr Res* 2006; **341**: 169-173.
28. Luciana P.M. Preparação e caracterização de nanocomósitos de poli(L-ácidolactico) e diferentes argilas organofílicas. 2012. UNIVILLE.

Ref Type: Thesis/Dissertation

29. Hench LL. Ceramics, glasses, and composites in medicine. *Med Instrum* 1973; **7**: 136-144.
30. Hench LL. Bioactive ceramics. *Ann N Y Acad Sci* 1988; **523**: 54-71.
31. Hench LL. Bioceramics and the origin of life. *J Biomed Mater Res* 1989; **23**: 685-703.
32. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med* 2006; **17**: 967-978.
33. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; **295**: 1014-1017.
34. S.M.Carvalho, A.A.R.Oliveira, L.M.Andrade, M.F.Leite, M.M.Pereira. The effect of bioactive glass nanoparticles on the behavior of human periodontal ligament cells. *Dental Materials* 2011; **27**: 42-43.

35. Sandhra M.Carvalho, Agda A.R.Oliveira, Camila A.Jardim et al.  
Characterization and induction of cementoblast cell proliferation by bioactive glass nanoparticles. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2011.
36. Sandhra M.Carvalho, Agda A.R.Oliveira, Elke M.F.Lemos, Marivalda M.Pereira.  
Bioactive Glass Nanoparticles for Periodontal Regeneration and Applications in Dentistry. *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*. 2013: pp. 299-322.
37. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* 2004; **25**: 2941-2948.
38. Ostomel TA, Shi Q, Tsung CK, Liang H, Stucky GD. Spherical bioactive glass with enhanced rates of hydroxyapatite deposition and hemostatic activity. *Small* 2006; **2**: 1261-1265.
39. Noohom W, Jack KS, Martin D, Trau M. Understanding the roles of nanoparticle dispersion and polymer crystallinity in controlling the mechanical properties of HA/PHBV nanocomposites. *Biomed Mater* 2009; **4**: 015003.
40. Agda A.R.Oliveira. Film and foam composites of biodegradable polyurethane and bioactive glass nanoparticles. 97-133. 2011. UFMG.

Ref Type: Thesis/Dissertation

41. Agda Aline Rocha de Oliveira, Dickson Alves de Souza, Luisa Lima Silveira Dias, Sandhra Maria de Carvalho, Herman Sander Mansur, Marivalda de Magalhães Pereira. Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. *BIOMEDICAL MATERIALS* 2013; **8**.

42. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000; **51**: 475-483.
43. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2000; **21**: 1803-1810.
44. Matsumura K, Hyon SH, Nakajima N, Iwata H, Watazu A, Tsutsumi S. Surface modification of poly(ethylene-co-vinyl alcohol): hydroxyapatite immobilization and control of periodontal ligament cells differentiation. *Biomaterials* 2004; **25**: 4817-4824.
45. Palmer RM, Lumsden AG. Development of periodontal ligament and alveolar bone in homografted recombinations of enamel organs and papillary, pulpal and follicular mesenchyme in the mouse. *Arch Oral Biol* 1987; **32**: 281-289.
46. Palmer RM, Lubbock MJ. The soft connective tissues of the gingiva and periodontal ligament: are they unique? *Oral Dis* 1995; **1**: 230-237.
47. Palmer RM, Cortellini P. Periodontal tissue engineering and regeneration: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008; **35**: 83-86.
48. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 2006; **40**: 11-28.
49. Reeve CM, WENTZ FM. The prevalence, morphology, and distribution of epithelial rests in the human periodontal ligament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1962; **15**: 785-793.

50. Matsuo M, Takahashi K. Scanning electron microscopic observation of microvasculature in periodontium. *Microsc Res Tech* 2002; **56**: 3-14.
51. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**: 143-147.
52. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994; **56**: 283-294.
53. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1998; S247-S256.
54. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001; **7**: 259-264.
55. Alexandra Rodrigues Pereira da Silva.

Avaliação da Diferenciação Osteogênica de Células-Tronco Do Tecido Adiposo Humano Cultivadas em Espuma de Vidro Bioativo e Biorreator de Perfusão para Engenharia de Tecido Ósseo . 2012. UFMG.

Ref Type: Thesis/Dissertation

56. Kawanabe N, Murata S, Murakami K et al. Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation* 2010; **79**: 74-83.
57. Kawanabe N, Murata S, Fukushima H et al. Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. *Exp Cell Res* 2012; **318**: 453-463.

58. Trubiani O, Orsini G, Caputi S, Piatelli A. Adult mesenchymal stem cells in dental research: a new approach for tissue engineering. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; **19**: 451-460.
59. Trubiani O, Orsini G, Zini N et al. Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: a morphological report. *J Biomed Mater Res A* 2008; **87**: 986-993.
60. Kawanabe N, Murakami K, Takano-Yamamoto T. The presence of ABCG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **344**: 1278-1283.
61. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2006; **41**: 303-310.
62. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res* 2007; **10**: 149-160.
63. Marchesan JT, Scanlon CS, Soehren S, Matsuo M, Kapila YL. Implications of cultured periodontal ligament cells for the clinical and experimental setting: a review. *Arch Oral Biol* 2011; **56**: 933-943.
64. Martinez AB, Ruiz EF. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Med Oral Patol* 2004; **9**: 92-107.
65. Chen FM, Zhang J, Zhang M, An Y, Chen F, Wu ZF. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials* 2010; **31**: 7892-7927.

66. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal Diseases. *Lancet* 2005; **366**: 1809-1820.
67. Hench LL. Biomaterials. *Science* 1980; **208**: 826-831.
68. Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998; **9**: 749-764.
69. Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 2001; **65**: 456-462.
70. Young MP, Carter DH, Sloan P, Quayle AA. Survey of clinical members of the association of dental implantology in the United Kingdom: Part I. Levels of activity and experience in oral implantology. *Implant Dent* 2001; **10**: 68-74.
71. Young MP, Quayle AA, Sloan P, Carter DH. A survey of clinical members of the Association of Dental Implantology in the United Kingdom. Part III. The use of augmentation techniques in dental implant surgery. *Implant Dent* 2001; **10**: 291-298.
72. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* 2004; **83**: 523-528.
73. Duailibi SE, Duailibi MT, Vacanti JP, Yelick PC. Prospects for tooth regeneration. *Periodontol 2000* 2006; **41**: 177-187.
74. Fabrícia Ferreira Suaid. Avaliação histométrica do efeito do transplante autógeno de células do ligamento periodontal no tratamento de defeitos de furca grau III em cães. 2010. UNICAMP.

Ref Type: Thesis/Dissertation

75. Pini PG, Baccetti T, Giorgetti R, Agudio G, Cortellini P. Mucogingival interceptive surgery of buccally-erupted premolars in patients scheduled for orthodontic treatment. II. Surgically treated versus nonsurgically treated cases. *J Periodontol* 2000; **71**: 182-187.
76. Pini PG, Baccetti T, Magnani C, Agudio G, Cortellini P. Mucogingival interceptive surgery of buccally-erupted premolars in patients scheduled for orthodontic treatment. I. A 7-year longitudinal study. *J Periodontol* 2000; **71**: 172-181.
77. Flores MG, Hasegawa M, Yamato M, Takagi R, Okano T, Ishikawa I. Cementum-periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. *J Periodontal Res* 2008; **43**: 364-371.
78. Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E et al. In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. *Tissue Eng* 2004; **10**: 537-544.
79. Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res* 2006; **21**: 735-744.
80. Kaigler D, Cirelli JA, Giannobile WV. Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering. *Expert Opin Drug Deliv* 2006; **3**: 647-662.
81. Young MP, Sloan P, Quayle AA, Carter DH. A survey of clinical members of the association of dental implantology in the United Kingdom. Part II. The use of augmentation materials in dental implant surgery. *Implant Dent* 2001; **10**: 149-155.

82. Hasegawa M, Yamato M, Kikuchi A, Okano T, Ishikawa I. Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. *Tissue Eng* 2005; **11**: 469-478.
83. Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H et al. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials* 2009; **30**: 2716-2723.
84. Saito M, Narayana AS. Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 1999; **14**: 65-72.
85. Saito M, Handa K, Kiyono T et al. Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res* 2005; **20**: 50-57.
86. Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 1998; **30-31**: 73-82.
87. Piche JE, Carnes DL, Jr., Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 1989; **68**: 761-767.
88. Somerman MJ, Ouyang HJ, Berry JE et al. Evolution of periodontal regeneration: from the roots' point of view. *J Periodontal Res* 1999; **34**: 420-424.
89. Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* 2001; **45**: 695-706.
90. Diekwisch TG, Jin T, Wang X et al. Amelogenin evolution and tetrapod enamel structure. *Front Oral Biol* 2009; **13**: 74-79.

91. Boabaid F, Gibson CW, Kuehl MA et al. Leucine-rich amelogenin peptide: a candidate signaling molecule during cementogenesis. *J Periodontol* 2004; **75**: 1126-1136.
92. Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL et al. Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol* 2003; **74**: 1423-1431.
93. van der Pauw MT, Van den BT, Everts V, Beertsen W. Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor beta1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2000; **71**: 31-43.
94. Kaneko H, Arakawa T, Mano H et al. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 2000; **27**: 479-486.
95. Ripamonti U, Renton L. Bone morphogenetic proteins and the induction of periodontal tissue regeneration. *Periodontol 2000* 2006; **41**: 73-87.
96. Han X, Amar S. IGF-1 signaling enhances cell survival in periodontal ligament fibroblasts vs. gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003; **82**: 454-459.
97. Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2001; **36**: 131-141.
98. Carvalho SM, Oliveira AA, Jardim CA et al. Characterization and induction of cementoblast cell proliferation by bioactive glass nanoparticles. *J Tissue Eng Regen Med* 2012; **6**: 813-821.

99. Pereira MM, Jones J, Hench LL. Bioactive glass and hybrid scaffolds prepared by sol-gel method for bone tissue engineering. *Advances in Applied Ceramics* 2005; **104**: 35-42.
100. Curtis A, Riehle M. Tissue engineering: the biophysical background. *Phys Med Biol* 2001; **46**: R47-R65.
101. Gronthos S, Akintoye SO, Wang CY, Shi S. Bone marrow stromal stem cells for tissue engineering. *Periodontol 2000* 2006; **41**: 188-195.
102. Wong CT, Chen QZ, Lu WW et al. Ultrastructural study of mineralization of a strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) cement in vivo. *J Biomed Mater Res A* 2004; **70**: 428-435.
103. Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 1998; **41**: 511-518.
104. Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998; **19**: 1419-1423.
105. Clupper DC, Gough JE, Embanga PM, Notingher I, Hench LL, Hall MM. Bioactive evaluation of 45S5 bioactive glass fibres and preliminary study of human osteoblast attachment. *J Mater Sci Mater Med* 2004; **15**: 803-808.
106. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **276**: 461-465.
107. Xynos ID, Hukkanen MV, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro:

- implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int* 2000; **67**: 321-329.
108. Li S, Nguyen L, Xiong H et al. Porous-wall hollow glass microspheres as novel potential nanocarriers for biomedical applications. *Nanomedicine* 2010; **6**: 127-136.
109. Gough JE, Jones JR, Hench LL. Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold. *Biomaterials* 2004; **25**: 2039-2046.
110. Marivalda M Pereira, Arthur E Clark, Larry L Hench. Homogeneity of bioactive sol-gel derived glasses in the system SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. *Journal of Material synthesis and processing* 2 1994; **3**: 189-195.
111. Marlene B Coelho, Marivalda M Pereira. Sol-gel synthesis of bioactive glass scaffolds for tissue engineering: effect of surfactant type and concentration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005; **75B**: 451-456.
112. Pereira MM, Jones JR, Orefice RL, Hench LL. Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *J Mater Sci Mater Med* 2005; **16**: 1045-1050.
113. Pereira MM, Clark AE, Hench LL. Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro. *J Biomed Mater Res* 1994; **28**: 693-698.
114. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2000; **21**: 1803-1810.

115. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2001; **22**: 1327-1333.
116. Sionkowska A, Kozłowska J. Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponges as a potential bone substitute. *Int J Biol Macromol* 2010; **47**: 483-487.
117. Degirmenbasi N, Kalyon DM, Birinci E. Biocomposites of nanohydroxyapatite with collagen and poly(vinyl alcohol). *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006; **48**: 42-49.
118. Chen X, Lei B, Wang Y, Zhao N. Morphological control and in vitro bioactivity of nanoscale bioactive glasses. *J Non-Cryst Solids* 2009; **355**: 791-796.
119. Werner Stöber, Arthur Fink, Ernst Bohn. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 26 (1968) 62-69. *J Colloid Interface Sci* 1968; **26**: 62-69.
120. Rao KS, El Hami K, Kodaki T, Matsushige K, Makino K. A novel method for synthesis of silica nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 2005; **289**: 125-131.
121. Orefice RL, Pereira MM, Mansur HS. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações* . 2005.
122. Putnam D, Gentry CA, Pack DW, Langer R. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 1200-1205.
123. Ratner BD, Horbett T, Hoffman AS, Hauschka SD. Cell adhesion to polymeric materials: implications with respect to biocompatibility. *J Biomed Mater Res* 1975; **9**: 407-422.

124. Ratner BD. Characterization of graft polymers for biomedical applications. *J Biomed Mater Res* 1980; **14**: 665-687.
125. Ratner BD, Johnston AB, Lenk TJ. Biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 1987; **21**: 59-89.
126. Jalili K, Abbasi F, Oskoe SS, Alinejad Z. Relationships between the morphology, swelling and mechanical properties of poly(dimethyl siloxane)/poly(acrylic acid) interpenetrating networks. *J Mech Behav Biomed Mater* 2009; **2**: 534-541.
127. Viviane Mota Bispo. Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA . 2009.

Ref Type: Thesis/Dissertation

128. Talita Martins. Síntese e caracterização de hidrogéis de quitosana quimicamente reticulados para aplicação potencial no tratamento tópico de lesões cutâneas . 2013. Cefet MG.

Ref Type: Thesis/Dissertation

129. Rinaudo M, Milas M, Le Dung P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int J Biol Macromol* 1993; **15**: 281-285.
130. Alves NM, Mano JF. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int J Biol Macromol* 2008; **43**: 401-414.
131. Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev* 2004; **104**: 6017-6084.

132. Muzzarelli C, Muzzarelli RA. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. *J Inorg Biochem* 2002; **92**: 89-94.
133. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; **24**: 2339-2349.
134. Elke Margareth Fernandes Lemos. Síntese e Caracterização de Filmes e Matrizes Híbridas e Nanocompósitas de Quitosana e Vidro Bioativo. 2013. UFMG.

Ref Type: Thesis/Dissertation

135. Suzuki D, Takahashi M, Abe M et al. Comparison of various mixtures of beta-chitin and chitosan as a scaffold for three-dimensional culture of rabbit chondrocytes. *J Mater Sci Mater Med* 2008; **19**: 1307-1315.
136. Dias LL, Mansur HS, Donnici CL, Pereira MM. Synthesis and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol-bioactive glass hybrid membranes. *Biomatter* 2011; **1**: 114-119.
137. Bispo VM, Mansur AA, Barbosa-Stancioli EF, Mansur HS. Biocompatibility of nanostructured chitosan/ poly(vinyl alcohol) blends chemically crosslinked with genipin for biomedical applications. *J Biomed Nanotechnol* 2010; **6**: 166-175.
138. Chiellini E, Cinelli P, Imam SH, Mao L. Composite films based on biorelated agro-industrial waste and poly(vinyl alcohol). Preparation and mechanical properties characterization. *Biomacromolecules* 2001; **2**: 1029-1037.
139. Chiellini E, Cinelli P, Ilieva VI, Martera M. Biodegradable thermoplastic composites based on polyvinyl alcohol and algae. *Biomacromolecules* 2008; **9**: 1007-1013.

140. Hermes de Souza Costa. Síntese, Caracterização e Avaliação do Comportamento Degradativo de Híbridos Porosos de Poli (Álcool Vinílico)/Vidro Bioativo. 2010. UFMG.

Ref Type: Thesis/Dissertation

141. Tao Wang, Mahir Turhan, Sundaram Gunasekaran. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polymer International* 2004; **53** : 911-918.
142. Herman S.Mansur, Orefice RL, Alexandra A.P.Mansur. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and pva-derived hybrids by small-angle x-ray scattering and ftir spectroscopy. *Polymer* 2004; **45**: 7193-7202.
143. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; **50**: 27-46.
144. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; **57**: 19-34.
145. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**: 13-36.
146. Berger J, Reist M, Chenite A, Felt-Baeyens O, Mayer JM, Gurny R. Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application. *Int J Pharm* 2005; **288**: 17-25.
147. Zhang H, Neau SH. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 2001; **22**: 1653-1658.

148. Mespouille L, Coulembier O, Paneva D, Degee P, Rashkov I, Dubois P. Novel biodegradable adaptive hydrogels: controlled synthesis and full characterization of the amphiphilic co-networks. *Chemistry* 2008; **14**: 6369-6378.
149. Moghimi M, Moghimi SM. Lymphatic targeting of immuno-PEG-liposomes: evaluation of antibody-coupling procedures on lymph node macrophage uptake. *J Drug Target* 2008; **16**: 586-590.
150. Hamad I, Hunter AC, Szebeni J, Moghimi SM. Poly(ethylene glycol)s generate complement activation products in human serum through increased alternative pathway turnover and a MASP-2-dependent process. *Mol Immunol* 2008; **46**: 225-232.
151. Cid J, Ortin X, Pinacho A, Parra R, Contreras E, Elies E. Use of polyethylene glycol for performing autologous adsorptions. *Transfusion* 2005; **45**: 694-697.
152. Tattini V, Jr., Parra DF, Polakiewicz B, Pitombo RN. Effect of lyophilization on the structure and phase changes of PEGylated-bovine serum albumin. *Int J Pharm* 2005; **304**: 124-134.
153. Ribeiro MZ. Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas. 2001. USP.

Ref Type: Thesis/Dissertation

154. Kao WJ, Lok D, Li J. Preparation of heterodifunctional polyethyleneglycols: network formation, characterization, and cell culture analysis. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001; **12**: 599-611.
155. MEIER MA, KANIS LA, LIMA JC, PIRES ATN, SOLDI V. Poly(caprolactonatriol) as plasticizer agent for cellulose acetate films: Influence of the preparation

procedure and plasticizer content on the physico-chemical properties. *Polym Adv Technol* 2004; **15**: 593-600.

156. Wessler K. Sistemas de P(3HB) E P(3HB-co-3HV) com PCL-T: comportamento de fase, reologia, propriedades mecânicas e processabilidade. 2004. UDESC.

Ref Type: Thesis/Dissertation

157. Duarte M.A.T. Influência da Concentração de PCL-T em Membranas de PLDLA: Estudo In Vitro e In Vivo. 2009. UNICAMP.

Ref Type: Thesis/Dissertation

158. Chiari C, Koller U, Dorotka R et al. A tissue engineering approach to meniscus regeneration in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; **14**: 1056-1065.

159. Mondrinos MJ, Dembzyński R, Lu L et al. Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone-calcium phosphate scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2006; **27**: 4399-4408.

160. Haas J, Ravi K, Borchard G, Bakowsky U, Lehr CM. Preparation and characterization of chitosan and trimethyl-chitosan modified poly-(caprolactone) nanoparticles as DNA carriers. *AAPS PharmSciTech*. *AAPS PharmSciTech* 2005; **6**: 22-30.

161. Sarasam A, Madihally SV. Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005; **26**: 5500-5508.

162. Hong Z, Reis RL, Mano JF. Preparation and in vitro characterization of novel bioactive glass ceramic nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 2009; **88**: 304-313.

163. Kasten FH. Robert Feulgen and his histochemical reaction for DNA. *Biotech Histochem* 2003; **78**: 45-49.

164. Smejkal GB, Kaul CA. Stability of nitroblue tetrazolium-based alkaline phosphatase substrates. *J Histochem Cytochem* 2001; **49**: 1189-1190.
165. Lewandowska K. K. Miscibility and thermal stability of poly(vinyl alcohol)/chitosan mixtures. *Thermochimica Acta*, 2009; **493**: 42-48.
166. Willian Trindade, Alaelson Vieira Gomes, Luís Henrique Leme Louro. Elaboração de uma nova rota de eliminação de ligante da cerâmica de alumina . *C&T* 2013; 71-79.
167. A.M.Chou, V.Sae-Lim, T.M.Lim et al. Culturing and characterization of human periodontal ligament fibroblasts—a preliminary study. *Materials Science and Engineering C* 2002; **20**: 77-83.
168. Basdra EK, Komposch G. Transmission and scanning electron microscopic analysis of mineralized loci formed by human periodontal ligament cells in vitro. *J Orofac Orthop* 1999; **60**: 77-86.
169. Trovati G, Sanches EA, NETO SC, MASCARENHAS YP, CHIERICE GO. Characterization of polyurethane resins by FTIR, TGA and XRD. *Journal of Applied Polymer Science* 2010; **115**: 263-268.
170. Wang T, Hsieh T. Effect of polyol structure and molecular weight on the thermal stability of segmented poly(urethaneureas). *Polymer Degradation and Stability* 1997; **55**: 95-102.
172. RAO Pea. Preparation and performance of poly(vinyl alcohol)/polyethyleneimine blend membranes for the dehydration of 1,4-dioxane by pervaporation: comparison with glutaraldehyde cross-linked membranes. *Separation and Purification Technology* 2006; **48**: 254.

173. Dorozhkin SV. A hierarchical structure for apatite crystals. *J Mater Sci Mater Med* 2007; **18**: 363-366.
174. Dorozhkin SV. Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater* 2010; **6**: 4457-4475.
175. Dorozhkin SV. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomater* 2012; **8**: 963-977.
176. Dorozhkin SV. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomater* 2010; **6**: 715-734.
177. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates in dentistry. *J Mater Sci Mater Med* 2013; **24**: 1335-1363.
178. A.A.R.Oliveira. Síntese e Caracterização de Espumas Híbridas Vidro Bioativo/PVA para Aplicação em Engenharia de Tecidos. 2007.

Ref Type: Thesis/Dissertation

179. Noriko Kanzaki, Kazuo Onuma, Gabin Treboux, Atsuo Ito. Dissolution kinetics of dicalciumphosphate dihydrate under pseudophysiological conditions. *Journal of Crystal Growth* 2002; **235**: 465-470.
180. S.M.Arifuzzaman, S.Rohani. Experimental study of brushite precipitation. *Journal of Crystal Growth* 2004; **267**: 624-634.
181. A.Ferreira, C.Oliveira, F.Rocha. The different phases in the precipitation of dicalcium phosphate dihydrate. *Journal of Crystal Growth* 2003; **252**: 599-611.
182. C.Oliveira, A.Ferreira, F.Rocha. Dicalcium phosphate dihydrate precipitation Characterization and Crystal Growth. *Trans IChemE*, 2007; **85**: 1655-1661.

183. Kaneda T, Miyauchi M, Takekoshi T et al. Characteristics of periodontal ligament subpopulations obtained by sequential enzymatic digestion of rat molar periodontal ligament. *Bone* 2006; **38**: 420-426.
184. Valerio P, Guimaraes MH, Pereira MM, Leite MF, Goes AM. Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams. *J Mater Sci Mater Med* 2005; **16**: 851-856.

## APÊNDICE I

**Composição do meio DMEM (Gibco)** O meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) é amplamente utilizado como meio basal de suporte para o crescimento de diferentes células mamárias.

Os componentes do meio DMEM são:

COMPONENTES	Peso Molecular	Concentração (mg/L)
<b>Aminoácidos</b>		
Glicina	75	30
L-Cisteína	121	62,57
L-Glutamina	146	584
L-Histidina	155	42
L-Isoleucina	131	105
L-Leucina	131	105
L-Lisina	146	146
L-Metionina	149	30
L-Arginina	174	84
L-Fenilalanina	165	66
L-Serina	105	42
L-Treonina	119	95
L-Triptofano	204	16
L-Tirosina	181	104,20
L-Valina	117	94
<b>Vitaminas</b>		
Cloreto de Colina	140	4
D-Calcio pantotenato	477	4
Ácido Fólico	441	4
Niacinamida	122	4
Cloridrato de Piridoxina	206	4
Riboflavina 5'-fosfato Na	478	0.4
Tiamina monofosfato	442	4
i-Inositol	180	7,2

Sais Inorgânicos		
Cloreto de Cálcio (CaCl <sub>2</sub> ) (anidro)	111	265
<u>Nitrato de Ferro III</u>	<u>404</u>	<u>0.10</u>
Sulfato de Magnésio (MgSO <sub>4</sub> ) (anidro)	120	200
Cloreto de Potássio (KCl)	75	400
Cloreto de Sódio (NaCl)	58	6400
Fosfato de Sódio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) anidro	142	125
Outros Componentes		
<u>Glicose</u>	<u>180</u>	<u>1000</u>
Vermelho de Fenol	398	15
Vermelho de Fenol	376.4	15
Piruvato de Sódio	110	110

## APÊNDICE II

### **Composição do Tampão Dulbecco's phosphate-buffered salina sem cálcio e magnésio (PBS 10X).**

Os componentes para 1 litro de PBS são:

NaCl (cloreto de sódio): 80 g (1,37 M)

KCl (cloreto de potássio): 2 g (27 mM)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (hidrogenofosfato dissódico): 11,5 g (81 mM)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (dihidrogenofosfato de potássio): 2g (15 mM)

### APÊNDICE III

As especificações técnicas do soro fetal bovino (SBF) são:

<b>SORO FETAL BOVINO - ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS</b>	
<b>SORO FETAL BOVINO</b>	<b>VALORES PADRÃO</b>
Proteínas Totais	3.5 g%
Albumina	1.8 g/dl
α Globulina	0.1 g/dl
β Globulina	1.3 g/dl
μ Globulina	0.3 g/dl
Glicose	66 mg/dl
Uréia	36 mg/dl
Creatinina	2.9 mg/dl
Hemoglobulina	<10 mg%
pH (25oC)	7,20
Osmolaridade	322 mOsm/Kg.H2O
Esterilidade	Ausencia de Agentes Adventícios (Sabourad e Tioglicolato)
Mycoplasma	Não detectada (Meios: Líquido-U9, sólido A-7)
Anticorpos Ig G	Não detectada (Imunodifusão radial)
Anticorpos Anti-VIA	Não detectada (Técnica de Soroneutralização)
Anticorpos Anti-IBR	Não detectada (Técnica de Soroneutralização)
Anticorpos Anti-BVD	Não detectada (Técnica de Soroneutralização)
Anticorpos anti-BTV	Não detectada (Técnica de Soroneutralização)
Endotoxinas	< 1ng/ml (Teste LAL)
No. de Células Primárias	19 (Cel. de Líquido Amniótico)
No. de Repicagens	10 (Cel. de Líquido Amniótico)
Curva de Crescimento	CHO = 4.6. <sup>10</sup> 4 e 0.7 <sup>x</sup>
Curva de Crescimento	VERO = 3.10 4 e 0.54x