



**CATÓLICA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

---

LISBOA · PORTO · VISEU

**DEGRADAÇÃO IN VITRO, CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA,  
FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DE MEMBRANAS DE  
COLAGÉNIO DE ORIGEM BOVINA PARA APLICAÇÃO EM  
MEDICINA REGENERATIVA**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para  
obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária

Por: Yasser Maged Montemor Abu-Hazima

Viseu, 2018





**CATÓLICA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

---

LISBOA · PORTO · VISEU

**DEGRADAÇÃO IN VITRO, CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA,  
FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DE MEMBRANAS DE  
COLAGÉNIO DE ORIGEM BOVINA PARA APLICAÇÃO EM  
MEDICINA REGENERATIVA**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para  
obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária

Por: Yasser Maged Montemor Abu-Hazima

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Doutora Christiane Salgado

Coorientador: Prof. Doutor Tiago Borges

Viseu, 2018



*“However difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at.”*

*-Stephen Hawking*



## Agradecimentos

Agradeço, em especial, ao Professor Fernando Jorge Monteiro pelo voto de confiança durante o desenvolvimento deste projeto no laboratório por ele dirigido, sediado no I3S (Instituto de Investigação e Inovação em Saúde). Agradeço também ao Ricardo Vidal do INEB pela assistência técnica do FT-IR e ao Rui Rocha da CEMUP pelo suporte técnico na SEM.

À Dentsply Sirona Implants pelo financiamento das membranas de colagénio utilizadas no estudo.

À minha orientadora Professora Doutora Christiane Salgado e ao meu coorientador Professor Doutor Tiago Borges por todo o incentivo e suporte científico durante a realização da tese.

À Doutora Célia Morais por toda a ajuda na componente estatística.

Aos meus pais por todo o apoio e confiança e pelo esforço em proporcionar-me todas as condições necessárias durante o meu percurso académico.

A todos os meus amigos de Viseu por me terem acompanhado neste percurso académico e por todos os bons momentos e aventuras que passámos na terra de Viriato.

A todos os meus amigos do “Road to AK”, que apesar de não estarem presentes sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e também pela confiança que demonstraram em mim durante todo este percurso.

:





## Resumo

Introdução: O colagénio tipo I é um material bioreabsorvível dos mais utilizados e estudados na regeneração óssea guiada (*GBR*) devido á sua biocompatibilidade, pois é o componente principal da matriz extracelular (*ECM*) da maioria dos tecidos, realizando a função de um *scaffold* natural por suportar o crescimento celular no interior do tecido conjuntivo, possuindo também uma componente bioativa que modula o comportamento celular e a função tecidual.

Objetivos: O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar duas membranas de colagénio de origem bovina na sua componente morfológica, físico-química e mecânica, comparando os resultados antes e após a sua degradação in vitro durante 8 semanas de modo a verificar a estabilidade dos diferentes materiais.

Materiais e métodos: Neste estudo experimental foram utilizadas 4 membranas de colagénio pré-hidratadas de pericárdio de bovino (grupo I) e 4 membranas de colagénio *SR (reabsorção lenta)* de tendão de bovino (grupo II). Duas membranas de cada grupo foram utilizadas para a realização da microscopia eletrónica de varrimento (*SEM*), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*FT-IR*) e análise dinâmico-mecânica (*DMA*). Após a realização dos testes, as membranas foram descartadas e 2 novas membranas de cada grupo foram utilizadas para imersão no fluido corporal simulado (*SBF*). Após um período de imersão de 8 semanas, as membranas foram removidas da solução e os testes foram novamente realizados.

Resultados: Os resultados obtidos através das análises realizadas não demonstraram diferenças significativas entre as propriedades das membranas antes e após a degradação in vitro, dentro de cada grupo.

Conclusões: Após a degradação por 8 semanas, as membranas de ambos os grupos mantiveram as suas propriedades, sugerindo a manutenção clínica da função barreira de ambas durante o período de tempo estudado.

**Palavras chave:** membranas, colagénio, medicina regenerativa, *GBR*, *GTR*;



## Abstract

Introduction: Type I collagen, as a biomaterial, is one of the most used and studied bioabsorbable material in guided bone regeneration (GBR), due to its biocompatibility, because it is the main component of the extracellular matrix (ECM) of the majority of the tissues, playing the role of a natural scaffold by supporting cellular growth inside of the connective tissue, as well as being a bioactive component that regulates cellular behaviour and tissue function.

Objectives: The main objective of this study was to characterize 2 collagen membranes of bovine origin, in their morphologic, physicochemical and mechanical components, comparing the results before and after their in vitro degradation for 8 weeks, in order to verify the stability of the different materials.

Materials and methods: In this experimental study, 4 pre-hydrated collagen membranes of bovine pericardium (group I) and 4 SR (slow resorption) collagen membranes of bovine tendon (group II) were used. Two membranes of each group were used to perform the scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) and dynamic mechanical analysis (DMA). After these tests were performed, the membranes were discarded and 2 new membranes of each group were immersed in the simulated body fluid (SBF). After a degradation time of 8 weeks, the membranes were removed of the solution and the tests were performed again.

Results: The results obtained from the performed tests did not show significant differences between the properties of the membranes before and after the in vitro degradation, within each group.

Conclusions: After the 8 week degradation, the membranes of both groups preserved their properties, suggesting the maintenance of the barrier role during the studied period of time.

**Key-words:** membranes, collagen, regenerative medicine, GBR, GTR;



# Índice

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>VII</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XI</b>
<b>Índice de tabelas.....</b>	<b>XV</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Periodonto .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Gengiva.....	3
1.1.2. Osso alveolar .....	5
1.1.2.1. Componente química.....	6
1.1.3. Ligamento Periodontal.....	6
1.1.4. Cimento.....	7
<b>1.2. Medicina Regenerativa .....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Colagénio.....	8
1.2.1.1. Estrutura.....	10
1.2.2. Membranas na Medicina Dentária.....	11
1.2.2.1. <i>GBR</i> .....	13
1.2.2.2. <i>GTR</i> .....	15
<b>1.3. Objetivos .....</b>	<b>17</b>
<b>2. Materiais e métodos.....</b>	<b>21</b>
Materiais:.....	21
Métodos:.....	21
<b>2.1. Preparação das amostras .....</b>	<b>21</b>

<b>2.2. Caracterização das membranas .....</b>	<b>21</b>
2.2.1. Microscopia eletrônica de varrimento ( <i>SEM</i> ) .....	21
2.2.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier ( <i>FT-IR</i> )	22
2.2.3. Análise dinâmico mecânica ( <i>DMA</i> ).....	22
<b>2.3. Degradação in vitro .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Análise estatística.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>27</b>
3.1. Morfologia das membranas analisadas pelo <i>SEM</i> .....	27
3.2. Análise das ligações químicas dos materiais pelo <i>FT-IR</i>	29
3.3. Análise das propriedades mecânicas dos materiais	
através do <i>DMA</i> .....	31
<b>4. Discussão .....</b>	<b>35</b>
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>43</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>47</b>
<b>Apêndices .....</b>	<b>55</b>

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Concentração iônica do <i>SBF</i> em comparação com o plasma humano .....	23
---	----

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Diagrama respresentativo das referências anatômicas da gengiva.....	5
<b>Figura 2</b> – Hélice tripla do colagénio.....	10
<b>Figura 3</b> – Príncipeio da <i>GBR</i> .....	15
<b>Figura 4</b> – Imagens obtidas através da Microscopia Eletrónica de Varrimento das membranas do grupo I.....	27
<b>Figura 5</b> – Imagens obtidas através da Microscopia Eletrónica de Varrimento das membranas do grupo II.....	28
<b>Figura 6</b> – Espectro relativo ás membranas do grupo I.....	29
<b>Figura 7</b> – Espectro relativo ás membranas do grupo II.....	30
<b>Figura 8</b> – Módulo de armazenamento ( $E'$ ) em função da frequência (Hz) das membranas do grupo I (8A) e do grupo II (8B). ....	31
<b>Figura 9</b> –Tan $\delta$ em função da frequência (Hz) das membranas do grupo I (9A) e do grupo II (9B). ....	32



## **Lista de abreviaturas**

### **D**

DMA – Análise dinâmico-mecânica (dynamic mechanical analysis)

### **E**

d-PTFE – Politetrafluoroetileno denso (dense polytetrafluoroethylene)

ECM – Matriz extracelular (extracellular matrix)

e-PTFE – Politetrafluoroetileno expandido (expanded polytetrafluoroethylene)

### **F**

FT-IR – Espetroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (Fourier-transform infrared spectroscopy)

### **G**

GBR – Regeneração óssea guiada (guided bone regeneration).

GTR – Regeneração tecidual guiada (guided tissue regeneration)

### **P**

PDL – Ligamento periodontal (periodontal ligament)

### **S**

SEM – Microscopia eletrônica de varrimento (scanning electron microscopy)

SBF – Fluido corporal simulado (simulated body fluid).

SR – Reabsorção lenta (slow resorption)



---

## **Introdução**



# 1. Introdução

---

## 1.1. Periodonto

O periodonto funciona como aparelho de suporte para os dentes em função e na sua relação oclusal (1). As suas funções incluem a inserção dos dentes no osso, selamento entre o dente e o epitélio, absorção de forças oclusais, permitindo pequenos movimentos dentários e para propriocepção (2). Consiste em quatro componentes: a gengiva, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal (*PDL*) (1–3).

### 1.1.1. Gengiva

A gengiva consiste num epitélio de superfície (epitélio escamoso estratificado) e tecido conjuntivo subjacente, designado de lâmina própria (1,3,4). Existem 3 tipos de epitélio presentes: epitélio oral, sulcular e juncional, em que a célula principal é o queratinócito (1,3,4). O epitélio oral reveste a crista, a superfície externa da gengiva marginal e a superfície da gengiva aderida (3). Pode ser queratinizado, paraqueratinizado ou uma combinação de ambos (3). O epitélio sulcular está adjacente ao dente, porém não está aderido à superfície dentária e não é queratinizado (1,3). O epitélio juncional encontra-se na base do sulco e está aderido ao dente ao nível da linha amelocementária (1). Tal como o epitélio sulcular, não é queratinizado (3).

Os componentes principais do tecido conjuntivo (ou lâmina própria) são as fibras de colagénio (60% do volume), fibroblastos (5%), vasos, nervos e matriz (35%) (1,3). Consiste num compartimento celular e um compartimento extracelular, composto por fibras e substância fundamental que ocupa os espaços entre as fibras e as células, designado de matriz extracelular (*ECM*) (3). Esta substância fundamental contém proteoglicanos e glicoproteínas (1,3).

O componente principal da lâmina própria é o colagénio tipo I, e a maioria das fibras estão irregularmente orientadas, no entanto, é possível observar alguns arranjos distintos de fibras (1,3). Estes incluem o grupo dentogengival, circular e transseptal (1,3). As fibras do grupo dentogengival podem dispor-se desde a superfície radicular ao perióstio, da superfície radicular à gengiva e

desde o perióstio à gengiva (1). As fibras circulares percorrem circunferencialmente ao redor do dente na gengiva, sem contactarem com o dente (1). Por fim, as fibras do grupo transseptal inserem-se na superfície radicular de dentes adjacentes (1).

Relativamente ao compartimento celular, as células presentes na lâmina própria são os fibroblastos, mastócitos, macrófagos e outras células imunológicas (4). Como foi referido anteriormente, a célula principal do tecido conjuntivo é o fibroblasto, e desempenha um papel fundamental no desenvolvimento, manutenção e reparação deste tecido (3). Tal como em todo o tecido conjuntivo presente em qualquer parte do organismo, os fibroblastos sintetizam o colagénio e regulam a sua degradação, como também secretam glicoproteínas e glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular (3).

A mucosa oral pode ser dividida em três tipos: mucosa mastigatória (gengiva e a mucosa que recobre o palato duro), mucosa especializada (dorso da língua), e a mucosa de revestimento (restante cavidade oral) (1,3,4).

No adulto, a gengiva saudável reveste o osso alveolar e a raiz dentária até um nível, um pouco coronal em relação à linha amelocementária (3). Está firmemente aderida ao osso e é contínua com a mucosa alveolar não queratinizada, que está localizada apicalmente e não está aderida ao osso alveolar. (1,2). A separação entre estes dois tecidos é claramente demarcada, por uma linha chamada linha mucogengival (1,4). Não existe linha mucogengival no palato, pois a gengiva é contínua com a mucosa palatina (1,3). Na figura 1 estão ilustradas as diferentes estruturas da gengiva.

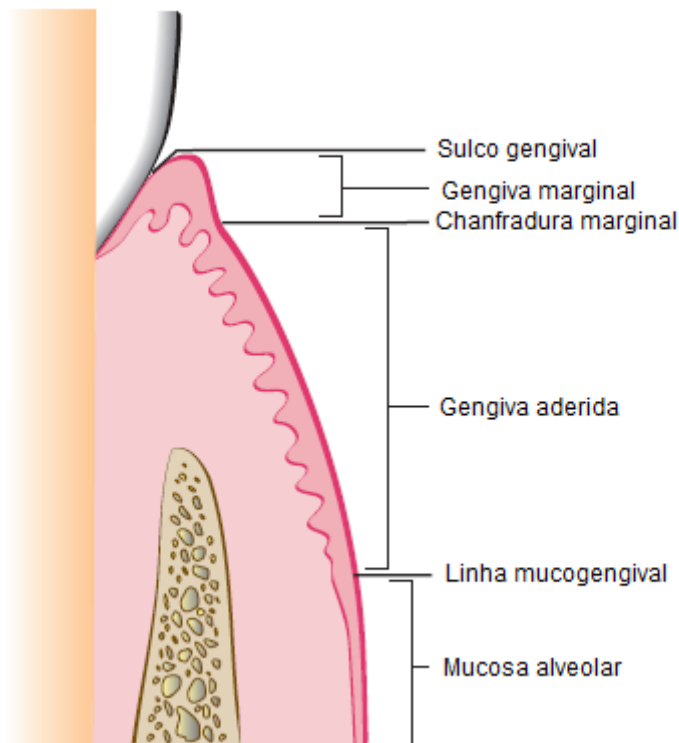


Figura 1 – Diagrama representativo das referências anatômicas da gengiva, adaptado de *Michael Newman et al. 2015*.

### 1.1.2. Osso alveolar

A apófise alveolar é o tecido ósseo da maxila e mandíbula, onde estão presentes os alvéolos onde se inserem os dentes (1,3,4). Consiste na cortical externa, na parede alveolar interna (lâmina dura) e osso trabecular entre as duas paredes (1,3,4). O osso cortical é altamente calcificado e desempenha principalmente funções de estrutura e proteção, enquanto que o osso trabecular é menos calcificado e possui uma maior área de superfície, o que lhe permite ser metabolicamente ativo (5). A apófise alveolar desenvolve-se e remodela-se aquando da formação e erupção dentária, logo é uma estrutura dependente do dente. Deste modo, o seu tamanho, forma, localização e função determina a morfologia alveolar (3).

O tecido que reveste a superfície externa do osso designa-se perióstio e o tecido que reveste as cavidades ósseas internas designa-se de endóstio (3,6). O perióstio tem um papel importante no crescimento e reparação óssea e tem um impacto no seu suprimento sanguíneo (6). O perióstio consiste em duas diferentes camadas, uma externa colagenosa rica em fibroblastos, vasos

sanguíneos e nervos, e uma camada interna composta por osteoblastos rodeados por células osteoprogenitoras, que têm potencial para se diferenciarem em osteoblastos, tendo portanto influência na formação e reparação óssea (3,6–8). O endósteo é composto por tecido conjuntivo e células com potencial osteoblástico (6). É composto por duas camadas, a camada osteogénica (interna) e a camada fibrosa (externa) (3).

#### 1.1.2.1. Componente química

O osso é composto por 50-70% matriz mineralizada, 20-40% matriz orgânica, 5-10% água e <3% lípidos (9,10). O conteúdo mineral é principalmente a hidroxiapatite, e a porção orgânica é maioritariamente formada por colagénio e proteínas não-colagenosas (9). Tal como a gengiva, o osso consiste num compartimento celular e um compartimento extracelular, em que os osteoblastos, juntamente com os osteócitos, osteoclastos, células do suprimento neurovascular e células do periósteo, endósteo e medula constituem a componente celular do osso (10,11).

A matriz extracelular é uma estrutura complexa e organizada que fornece suporte mecânico e exerce uma função essencial na homeostasia do osso (11). Esta matriz secreta diversas moléculas que interferem com a atividade das células ósseas, tendo por consequência a participação na remodelação óssea (11). É composta predominantemente por colagénio tipo I, proteínas não colagenosas (como a osteocalcina, osteonectina, osteopontina e fibronectina) e proteoglicanos (11–13). A porção mineral do tecido ósseo, como referido acima, é a hidroxiapatite, que se apresenta na forma de cristais dispostos ao longo das fibras de colagénio e da substância fundamental (5). A matriz extracelular não é apenas um *scaffold* para as células, mas também funciona como reservatório de fatores de crescimento e citocinas (9,10,12).

#### 1.1.3. Ligamento Periodontal

O ligamento periodontal (*PDL*) é o tecido conjuntivo responsável pela adesão do dente ao osso alveolar, e é contínuo coronalmente com o tecido conjuntivo gengival (1,2,14). As suas funções incluem a absorção e dissipação das forças oclusais exercidas nos dentes durante a função, permitindo que as forças sejam distribuídas adequadamente pelo osso alveolar, em adição a



funcionar como um órgão sensorial necessário para o posicionamento correto da maxila e mandíbula durante a mastigação (1,2,15).

Semelhante aos outros tecidos conjuntivos, o *PDL* consiste em fibras de colagénio (maioritariamente tipo I) juntamente com a componente celular, vasos sanguíneos e nervos incluídos na substância fundamental (2,14,15).

As fibras de colagénio são divididas em 2 tipos principais: as fibras intersticiais, que estão dispostas aleatoriamente ao longo do *PDL* e suportam os vasos e nervos, e as fibras principais, que são muito mais densas e dispõem-se desde o cimento da superfície radicular ao osso, inserindo o dente firmemente no alvéolo (14). Este último tipo de fibras designa-se Fibras de *Sharpey* (14). Estas fibras também podem ser divididas pela sua posição e orientação (1). Os 6 grupos são o transseptal, horizontal, alveolar, oblíquo, apical e radicular (1,16).

Relativamente á componente celular, as células presentes neste tecido incluem os osteoblastos, cementoblastos, osteoclastos, células estaminais multipotentes, remanescentes epiteliais (restos epiteliais de Malassez) e fibroblastos, sendo este último o componente celular mais abundante (1,2,17). Uma vez que o *PDL* contém uma grande variedade de células, desempenha uma função importante na cicatrização (1).

#### 1.1.4. Cimento

A camada fina de cimento que reveste a dentina radicular é um tecido importante para a manutenção da saúde periodontal pois é onde se inserem as fibras do *PDL* (14,16). Existem 2 tipos de cimento: o cimento celular, que se encontra no terço apical da raiz, contém cementoblastos e cementócitos (cementoblastos aprisionados nas lacunas da matriz que secretam) e normalmente sobrepõe-se ao tipo acelular, localizado nos 2 terços cervicais e que não possui células (14,16).

A composição do cimento assemelha-se à do osso, com 50% matriz mineral (hidroxiapatite) e 50% matriz orgânica (maioritariamente colagénio tipo I) (15). Quase todas as proteínas não colagenosas identificadas no cimento também se encontram no osso (15).

## 1.2. Medicina Regenerativa

Durante mais de três décadas, a investigação periodontal tem tentado desenvolver regimes terapêuticos clínicos capazes de regenerar os tecidos periodontais com boa previsibilidade e a extensa evidência clínica demonstrou que a regeneração representa o resultado mais favorável relativamente à reparação periodontal (18).

A Medicina Regenerativa é uma área interdisciplinar que implica a substituição ou regeneração de células, tecidos ou órgãos, com o objetivo de recuperar ou estabelecer a função normal, e é considerada uma nova fronteira na investigação biomédica (19–22).

Os materiais usados na Medicina Regenerativa podem ser classificados como naturais (como o colagénio) ou sintéticos (como o ácido poliglicólico) (19,23). O biomaterial ideal deve ser biocompatível e biodegradável ao mesmo tempo que o processo regenerativo ocorre, sem produzir produtos tóxicos que alterem o crescimento tecidual e/ou causem a indução do processo inflamatório (19). Também devem apresentar porosidade, que permite a troca gasosa e de nutrientes, bem como eliminação dos produtos metabólicos (19).

Vários biomateriais encontram-se em diferentes estágios de desenvolvimento, com alguns já a serem utilizados clinicamente, alguns em testes pré-clínicos e outros a serem desenvolvidos em laboratório (23). Progressos recentes sugerem que a engenharia de tecidos poderá ter uma aplicação clínica mais ampla no futuro e pode representar uma opção terapêutica viável para pacientes que beneficiem das vantagens de uma vida mais longa proporcionada pela regeneração dos tecidos danificados (23).

### 1.2.1. Colagénio

A regeneração periodontal foi uma das primeiras áreas a alcançar a aplicação terapêutica das tecnologias de medicina regenerativa (18). Uma abordagem promissora tem sido aquela de utilizar polímeros naturais, que por si só são capazes de favorecer o crescimento celular (21). Destes polímeros, o colagénio é o mais comumente usado, pois é o maior componente estrutural da *ECM* dos tecidos vivos (21,24).

Como referido anteriormente, a *ECM* fornece suporte físico aos tecidos ao ocupar os espaços intercelulares, funcionando não só como um *scaffold* natural por suportar o crescimento celular, mas também como uma componente bioativa que modula o comportamento celular e função tecidual (9–12,24). Esta versatilidade inspirou vários investigadores a desenvolver biomateriais com estrutura e bioactividade semelhantes ao colagénio, especialmente ao colagénio tipo I (24).

O termo “colagénio” deriva do termo grego para “cola” (*kolla*) e foi inicialmente utilizado para descrever o constituinte do tecido conjuntivo que produzia gelatina após ebulição (25).

O colagénio é uma proteína estrutural abundante em todos os animais que desempenha um papel dominante em manter a integridade estrutural e biológica da *ECM* e é altamente dinâmico, passando por remodelação constante a fim de desempenhar funções fisiológicas adequadas (24,26,27). Por isso, o objetivo ideal da regeneração de tecidos é recuperar tanto a integridade estrutural como o próprio processo dinâmico inato de remodelação da *ECM* natural, restabelecendo especialmente a rede de fibras de colagénio sob a qual ocorre o processo de regeneração fisiológica (24).

Até à data, 28 tipos de colagénio foram identificados, sendo os tipos I, II, III e V os tipos principais que constituem o colagénio do osso, cartilagem, tendão, pele e músculo, sendo o tipo I o mais comum (21,24,26,27).

O colagénio de origem animal, especialmente o tipo I, é reconhecido como um dos biomateriais disponíveis mais úteis e nos dias de hoje é utilizado como *scaffold*, promovendo a migração celular, cicatrização de lesões tecidulares e a sua completa regeneração, mas também pode ser usado na cirurgia cosmética e no transporte e libertação controlada de fármacos (24,27). O colagénio pode estar associado a outros polímeros, tais como o quitosano ou a elastina, o que influencia as propriedades químicas e mecânicas (21). O colagénio também pode ser facilmente modificado através de reticulação (*cross-links*) ou da inclusão de moléculas biológicas, criando uma grande variedade de materiais, com propriedades mecânicas e biológicas adaptadas à sua utilização específica (27,28).

Os principais problemas do colagénio incluem o preço de fabrico (devido aos procedimentos morosos e complexos de isolamento e purificação), seleção

cuidadosa das condições de processamento para evitar a desnaturação e o intumescimento in vivo, devido á hidrofiliçidade do colagénio (27).

### 1.2.1.1. Estrutura

Apesar de todos os tipos de colagénio diferirem em certos aspetos estruturais e distribuição tecidular, todos são proteínas triméricas compostas por 3 polipéptidos, designados de cadeias  $\alpha$  (21,25,29). Cada cadeia está enrolada numa hélice *left-handed*, que por sua vez, através de pontes de hidrogénio, formam a hélice tripla *right-handed* (21,29,29).

A sequência repetente do colagénio é a Gly-X-Y, em que Gly corresponde ao aminoácido glicina e o X e Y correspondem a qualquer outro aminoácido, mas na maioria das vezes correspondem à prolina e hidroxiprolina (figura 2) (21,25,29).

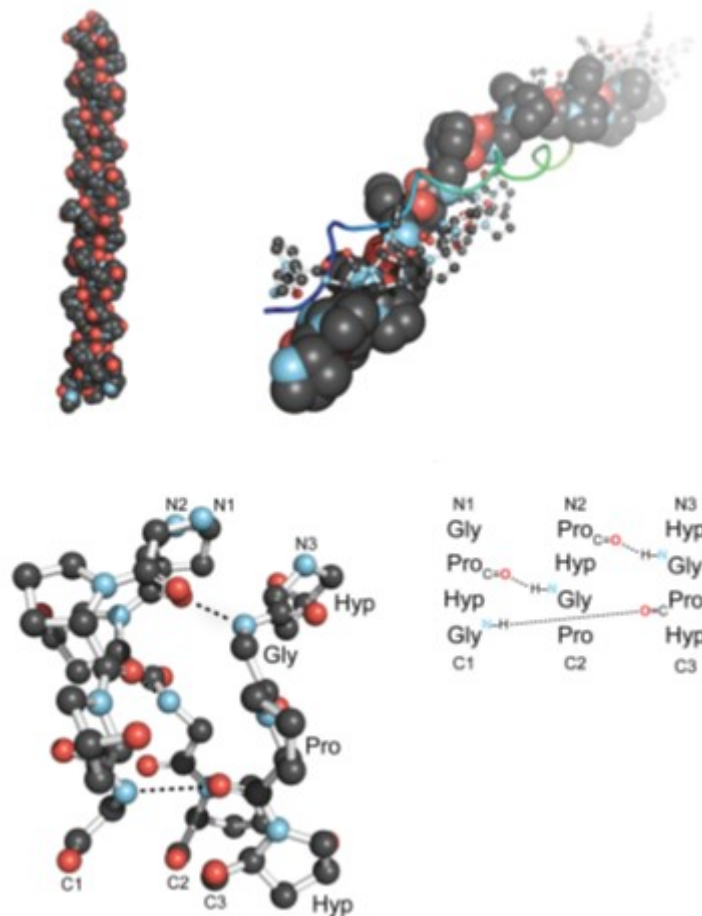


Figura 2 – Hélice tripla do colagénio, *Shoulders MD, Raines RT, 2009.*

A hélice tripla tem 300 nm de comprimento e 1.5 nm de diâmetro, com cada cadeia  $\alpha$  possuindo 1050 aminoácidos. As hélices triplas associam-se em polímeros mais organizados, chamados de fibrilas, que por sua vez agregam-se em feixes maiores, designados de fibras de colagénio (29).

O colagénio é insolúvel e possui uma elevada resistência à tração, o que lhe confere a característica de funcionar como um suporte mecânico para as diversas funções fisiológicas (27,30). A desnaturação do colagénio é um processo irreversível e pode ser obtido após tratamento térmico: uma vez atingida a temperatura de desnaturação (37° para o colagénio de origem bovina), o colagénio é convertido em gelatina (27).

### 1.2.2. Membranas na Medicina Dentária

Várias membranas foram desenvolvidas para desempenhar diversas funções na área da cirurgia oral e periodontal e podem ser classificadas como reabsorvíveis e não-reabsorvíveis (31,32).

As membranas não-reabsorvíveis e especialmente as de politetrafluoretileno expandido (*e-PTFE*) têm sido extensamente estudadas e são consideradas *gold-standard* em procedimentos regenerativos, pelas quais as outras membranas são comparadas (32,33). São biocompatíveis e mantêm a sua integridade estrutural durante o tempo em função (31,32). Possuem propriedades mantenedoras de espaço e de barreira superiores às das membranas reabsorvíveis, pois estas por vezes tendem a colapsar, dependendo do tamanho dos defeitos (32,34). Outras membranas não-reabsorvíveis incluem as de *e-PTFE* reforçadas com titânio, *PTFE* denso (*d-PTFE*) ou malhas de titânio, usadas maioritariamente na cirurgia oral e maxilofacial (32). Uma segunda intervenção cirúrgica é necessária para a remoção destas membranas, sendo esta a maior limitação das mesmas, o que representa um risco para os tecidos recém regenerados, pois a realização de um novo retalho para a sua remoção pode induzir a reabsorção óssea e a diminuição do recobrimento pelo novo tecido, interrompendo o processo de cicatrização (31,32,35). Por fim, a exposição da membrana é a complicação mais frequente, devido à regeneração dos tecidos moles e à não integração da membrana nos mesmos, aumentando o risco de infeção secundária (32,36,37). De acordo com uma revisão sistemática por *Chiapasco e Zaniboni* (38), que estudaram os *outcomes* cirúrgicos em

tratamentos de deiscências e fenestrações peri-implantares, praticamente 20% de todas as membranas de *e-PTFE* resultaram em exposição e consequente infecção.

Devido às limitações das membranas não-reabsorvíveis, foram desenvolvidas as membranas reabsorvíveis, que como o próprio nome indica, oferecem a vantagem de serem reabsorvidas pelo organismo, evitando a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para a sua remoção (31,32). Por esta razão, as membranas reabsorvíveis apelam tanto ao profissional como ao paciente, na medida em que reduzem o risco de morbidade e de dano aos tecidos (31).

No entanto, poderá existir uma variabilidade e falta de controlo na taxa de reabsorção, o que pode alterar significativamente a quantidade de formação óssea (31,32). Outros problemas podem incluir a exposição da membrana ao meio oral, que normalmente ocorre devido a uma deiscência ou necrose pós-operatória causada por um retalho gengival fino a recobrir a membrana, e o aumento da colonização bacteriana no local a regenerar, que está associado a uma diminuição significativa no preenchimento ósseo da lesão (36). Torna-se portanto crucial a realização de consultas de *follow-up* e manutenção da área exposta, pois o controlo e redução da placa é um aspeto determinante do sucesso da terapia regenerativa (36).

As membranas reabsorvíveis tipicamente derivam de polímeros naturais, como o colagénio, ou sintéticos, como o ácido poliglicólico (22,31). Na atualidade, as membranas de colagénio são maioritariamente obtidas dos seguintes tipos diferentes de tecido: tendão, derme, pele ou pericárdio de bovino, suíno ou humano (22,28,39). Usualmente, os tecidos são processados para remoção de toda a componente celular e seus detritos que causem qualquer indução de resposta imunológica após a implantação, ao mesmo tempo que se tenta manter a ultraestrutura 3D e a composição da *ECM* (22). Assim sendo, para assegurar a segurança para uso biomédico, as proteínas de origem animal devem ser purificadas, justificando os métodos complexos e caros de purificação (30). Tais membranas também foram extensivamente estudadas, maioritariamente em animais, mas também em humanos na cirurgia maxilofacial, regeneração periodontal e neuro-cirurgia (32).

As membranas de colagénio têm sido utilizadas em procedimentos de *GBR* (regeneração óssea guiada) e *GTR* (regeneração tecidual guiada) devido à sua biocompatibilidade, capacidade de promover a cicatrização e à ausência de reações adversas aos tecidos circundantes, demonstrando resultados semelhantes aos das membranas não-reabsorvíveis (27,34,40). O termo *GBR* refere-se apenas à estimulação de formação óssea, enquanto que *GTR* refere-se à regeneração do periodonto (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar) (36).

#### 1.2.2.1. *GBR*

Um grande número de membranas foi introduzido para verificação experimental e clínica, demonstrando ampla evidência que a sua aplicação em procedimentos regenerativos, nomeadamente a *GBR*, promove a formação óssea no defeito subjacente, tornando-se portanto uma componente essencial no tratamento (41).

Após extrações dentárias, a resposta normal do rebordo alveolar é a sua reabsorção, tanto na dimensão vertical como horizontal, também com uma diminuição considerável na espessura, logo, a preservação alveolar pós-extração é essencial para a manutenção das dimensões ideais para colocação de implante, no que se refere ao volume e contorno ósseo (28,31,36). Apesar de existirem diversos métodos para a reconstrução óssea, todos eles têm as suas indicações específicas e limitações (32). Tais métodos incluem a *distraction osteogenesis*, que descreve a indução cirúrgica de uma fratura e a separação gradual das duas extremidades para promover a regeneração óssea espontânea entre os dois fragmentos; a osteoindução, que implica a utilização de fatores de crescimento e/ou células osteoprogenitoras que vão encorajar o organismo a formar novo osso; a osteocondução, em que são utilizados enxertos ósseos que atuam como *scaffold* para a formação óssea e a *GBR*, em que é utilizada uma membrana para criar um espaço biológico a ser preenchido com novo osso (31).

A maioria das abordagens osteoindutoras ainda têm uma aplicação clínica limitada e a *distraction osteogenesis* ainda está na fase de desenvolvimento e por vezes deixa tecido cicatricial indesejado (31). Assim, a *GBR* e o uso de enxertos ósseos (osteocondução) ou uma combinação de ambos os procedimentos, representam os métodos mais usados na prática clínica, em

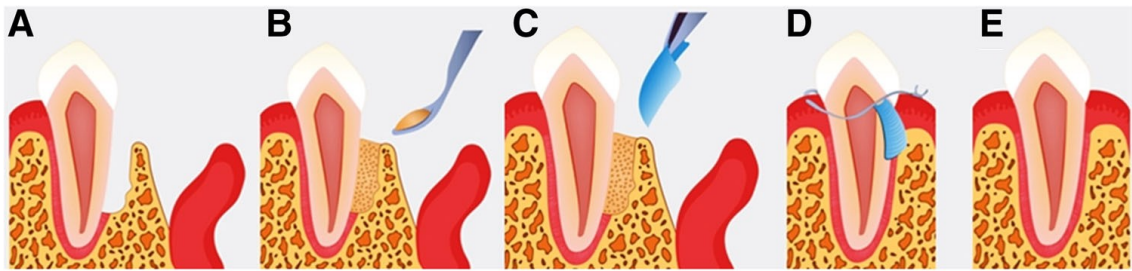
que a *GBR* é relatada como o método mais eficaz e previsível em situações de regeneração óssea peri-implantar (31). Quando o uso de enxertos ósseos é de facto associado a uma membrana de colagénio, o resultado da técnica *GBR* é geralmente favorável e até comparável aos resultados obtidos com membranas não-reabsorvíveis, nomeadamente as de *e-PTFE* (28,40).

O princípio básico da *GBR* envolve portanto, a colocação de membranas físicas (reabsorvíveis ou não-reabsorvíveis) para proteger o coágulo sanguíneo, impedindo a invasão de células do tecido mole circundante que crescem mais rápido que o tecido ósseo, apenas permitindo a migração de células angiogénicas e osteogénicas para o defeito ósseo a regenerar (figura 3) (28,31,36).

As características das membranas utilizadas em procedimentos de *GBR* necessitam de obedecer a critérios específicos, nomeadamente a biocompatibilidade, pois a interação entre o material e os tecidos não deverá afetar o resultado final da regeneração ou a saúde geral do paciente; a manutenção do espaço biológico, pois a membrana deverá possuir resistência suficiente para manter um espaço adequado para a regeneração óssea, ao mesmo tempo de ser maleável para se poder conformar ao defeito a regenerar; impedir a migração celular, nomeadamente dos tecidos moles; integração tecidular, pois este é o aspeto chave em todas as técnicas regenerativas, em que é essencial que exista integração biológica entre a membrana e o tecido hospedeiro; e manuseamento clínico, pois uma membrana que é muito rígida poderá não ser conformada facilmente e os rebordos rígidos poderão perfurar o tecido gengival e posteriormente ocorrer exposição da membrana ao meio oral (31,39).

Quando são utilizadas membranas reabsorvíveis de ácido poliglicólico ou ácido poliláctico, o processo de degradação ocorre maioritariamente por hidrólise, o que cria um meio ácido, que pode ter efeitos negativos na formação óssea (28). Apenas as membranas de colagénio são reabsorvidas por processos catabólicos semelhantes aos processos envolvidos no *turnover* dos tecidos vivos (28). Após a degradação da membrana pelos macrófagos e neutrófilos, o colagénio é reabsorvido através de processos enzimáticos, ocorrendo a sua integração no tecido conjuntivo do retalho gengival (39).





**Figura 3** – Princípio da GBR. A - Defeito periodontal; B - Substituto ósseo colocado no defeito; C - Membrana barreira; D - Membrana colocada e estabilizada sobre o defeito preenchido; E – Regeneração óssea, *Sheikh Z et al. 2017*

#### 1.2.2.2. GTR

A periodontite é uma doença inflamatória crónica que pode levar à destruição dos tecidos periodontais, caracterizado pela perda de inserção clínica (*attachment*) e formação de defeitos ósseos, tais como defeitos infraósseos e de furca, e consequentemente, perda dentária (33,37,42,43). Portanto, a possibilidade de regeneração do tecido periodontal perdido tem sido uma área de bastante interesse nos últimos anos (37). Tradicionalmente, a cirurgia periodontal é realizada com o objetivo de obter acesso às superfícies patológicas e remoção dos fatores etiológicos, resultando num aumento do *attachment* e diminuição da profundidade de sondagem (34,36,40). Tais tratamentos incluem diversas abordagens cirúrgicas, incluindo gengivectomia, o *open flap debridement*, retalho de *Widman* modificado e cirurgia óssea (34,36,40,43). No entanto, este aumento de *attachment* é devido à formação de um epitélio juncional longo, com pouca ou nenhuma formação de tecido ósseo (40,44). Em contraste, a terapia regenerativa permite a reconstrução dos tecidos periodontais, através da utilização de membranas barreira, enxertos ósseos, diversos materiais osteocondutores e osteoindutores, fatores de crescimento e tecnologia celular e genética (34,42,43). Dentro destas técnicas, a *GTR*, por si só ou em combinação com outras técnicas, tem demonstrado bastante sucesso na regeneração dos tecidos periodontais, pois foi verificado que ao excluir as células do tecido mole da loca cirúrgica, é possível ocorrer regeneração significativa, pois o ligamento periodontal possui células mesenquimatosas indiferenciadas com a capacidade de induzir a regeneração do periodonto (34,37,42). Assim, e semelhante ao mecanismo da *GBR*, o princípio básico da

*GTR* envolve a exclusão das células epiteliais da superfície do dente, por meio de uma barreira, permitindo a regeneração do cimento, ligamento periodontal e osso (33,35,36). Como ambas as técnicas partilham mecanismos semelhantes, os critérios das membranas anteriormente referidos para a *GBR* também são partilhados pelas membranas na *GTR* (42).

Identicamente aos procedimentos de *GBR*, a utilização de membranas de colagénio na *GTR* demonstrou resultados semelhantes às membranas não-reabsorvíveis, em relação à diminuição da profundidade de sondagem, aumento de *attachment* e percentagem de preenchimento ósseo e menos complicações pós-operatórias (40). Deste modo, as membranas de colagénio têm sido utilizadas para a regeneração de defeitos infra-ósseos e lesões de furca à mais de 25 anos e a literatura aponta para resultados clínicos mais favoráveis comparativamente às técnicas tradicionais, em que se verificou uma maior redução nas sondagens periodontais, maior ganho de *attachment* e deposição óssea (33,35,36).

Com o desenvolvimento de novos materiais, a *GTR* utilizando membranas de colagénio começou também a substituir as técnicas tradicionais de tratamento de recessões gengivais, nomeadamente o uso de enxertos autólogos, o que evita a morbilidade associada às múltiplas locais cirúrgicas criadas (40,42,44). Apesar de ambas as técnicas resultarem numa diminuição da profundidade da recessão e um aumento do *attachment* para recessões classe I e II de *Miller*, os enxertos conjuntivos subepiteliais são superiores, devido à maior percentagem de recobrimento radicular e tecido queratinizado (45).

### 1.3. Objetivos

A presente monografia tem como objetivo caracterizar qualitativamente e quantitativamente duas membranas de colagénio purificadas de origem bovina para aplicação na medicina regenerativa, no que diz respeito às suas propriedades mecânicas, físico-químicas e morfológicas após degradação in vitro no flúido corporal simulado durante 8 semanas.

#### Hipóteses do estudo:

**Hipótese nula:** Não existem diferenças entre as membranas não-degradadas e degradadas dos dois tipos diferentes de material.

**Hipótese 1:** As membranas degradadas sofreram alterações estruturais significativas quando comparadas com as membrana não degradadas.

**Hipótese 2:** As membranas não degradadas sofreram alterações estruturais significativas quando comparadas com as membrana degradadas.



---

## **Materiais e métodos**



## 2. Materiais e métodos

---

### Materiais:

Neste estudo experimental foram utilizadas 4 membranas de colagénio pré-hidratadas derivadas de pericárdio de bovino (Symbios Pre-hydrated Collagen Membrane 15 x 20 mm Dentsply, Ref. 32905274 – Lot. PRCMA17N2) – Grupo I, e 4 membranas de colagénio não hidratadas derivadas de tendão de bovino (Symbios Collagen Membrane SR 15 x 20 mm, Dentsply, Ref. 32905270 – Lot. O1C1520570) – Grupo II.

Esta proposta de estudo, sob a referência nº I-BI-17-030, foi revista e aprovada pelo Comitê de Revisão Global IIS da Dentsply Sirona Implants, com o financiamento dos materiais acima referidos.

### Métodos:

#### **2.1. Preparação das amostras**

Duas membranas de colagénio de cada grupo (pré-imersão) foram cortadas e separadas em 8 amostras de 15 x 5mm. Seis foram utilizadas para se realizar a média da análise dinâmico-mecânica e as restantes 2 amostras foram utilizadas para se realizar a microscopia eletrónica de varrimento e a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Após a realização dos testes supracitados, as amostras foram descartadas e 2 novas membranas foram utilizadas para imersão no fluido corporal simulado. Após um período de imersão de 8 semanas, as membranas foram removidas do fluido, cortadas em 8 fragmentos e os testes foram repetidos.

#### **2.2. Caracterização das membranas**

##### **2.2.1. Microscopia eletrónica de varrimento (*SEM*)**

A morfologia da superfície das membranas foi observada através de microscopia eletrónica de varrimento (*ThermoFisher Scientific, SEM, FEI Quanta 400FEG, USA*). As amostras foram fixadas com fita de carbono a um suporte de amostras. De seguida, foram revestidas com ouro-paládio em spray (*Bal- Tec: SCD 050, USA*).

### 2.2.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*FT-IR*)

Relativamente à caracterização físico-química, o espectro de cada membrana foi analisado através do *FT-IR*. O *FT-IR* é uma técnica analítica que permite detetar a vibração característica de grupos funcionais moleculares numa amostra (que no caso do colagénio são os grupos amida I, amida II e amida III), sendo possível obter espectros de amostras diversas para serem analisadas em relação às alterações nas ligações químicas (46).

As amostras foram secas por desidratação em soluções com concentrações crescentes de etanol. Cada amostra foi esmagada num almofariz e adicionada a 200mg de brometo de potássio (Kbr) para posteriormente serem comprimidas até finos discos. Cada disco foi observado a uma resolução de  $1\text{cm}^{-1}$  a uma frequência de 400-4000nm com recurso a um espectrofotómetro *FT-IR* (*Perkin Elmer, USA*) e os picos de transmissão foram registados. Em cada espectro obtido, efetuou-se um registo de 100 *scans*.

### 2.2.3. Análise dinâmico-mecânica (*DMA*)

A análise dinâmico-mecânica realizou-se com o intuito de caracterizar o comportamento mecânico das membranas de colagénio sob tensão. Através de ensaios prévios verificou-se que as membranas alteravam permanentemente as suas propriedades viscoelásticas a partir dos 15 Hz. Logo, as amostras foram sujeitas a ciclos de tensão com frequências progressivas na ordem dos 0,1 a 15Hz à temperatura ambiente durante 10 minutos utilizando o equipamento Tritec2000 (*Triton Technology, UK*). Para obtenção dos valores médios foram analisadas 6 amostras, tomando como medida o módulo de armazenamento ( $E'$ ), que expressa a resistência mecânica, e o  $\tan \delta$ , que representa o comportamento viscoelástico do material.

## 2.3. Degradação *in vitro*

O efeito da exposição das membranas ao fluido corporal simulado (*SBF*), foi preparado de acordo com *Kokubo e colaboradores* (47), durante 8 semanas, renovando a solução semanalmente. Este protocolo de preparação do *SBF* difere do original (48) na medida em que no original estão em falta os iões  $\text{SO}_4^{2+}$



que estão presentes no plasma humano (0.5mM) (tabela 1). As membranas foram analisadas antes e após 8 semanas da imersão no *SBF*.

O *SBF* foi originalmente desenvolvido para prever a bioatividade óssea de um material, ao examinar a capacidade da formação de apatite na sua superfície em ensaios in vitro. No entanto, também é utilizado para mimetizar a biodegradação in vivo, sendo essa a vertente que a presente monografia e outros estudos se basearam (49–51).

Tabela 1 – Concentração iônica do *SBF* em comparação com o plasma humano, *Kokubo T, Takadama H. 2006*.

Ion	Ion concentrations (mM)	
	Blood plasma	SBF
Na <sup>+</sup>	142.0	142.0
K <sup>+</sup>	5.0	5.0
Mg <sup>2+</sup>	1.5	1.5
Ca <sup>2+</sup>	2.5	2.5
Cl <sup>-</sup>	103.0	147.8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27.0	4.2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.0	1.0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5	0.5
pH	7.2–7.4	7.40

Nota: A parte experimental foi realizada nas instalações do i3S do Porto

## 2.4. Análise estatística

Os resultados dos testes do *DMA* foram analisados segundo o teste *Wilcoxon* e as diferenças entre as membranas degradadas e não-degradadas foram classificadas como estatisticamente significativas se  $p < 0,05$ . Foi também realizada uma correlação de *Spearman* entre o aumento da frequência de tensão e os valores de  $E'$  e  $\tan \delta$  de cada membrana em cada um dos 2 grupos.

Os resultados do *SEM* e *FT-IR* foram analisados qualitativamente.



---

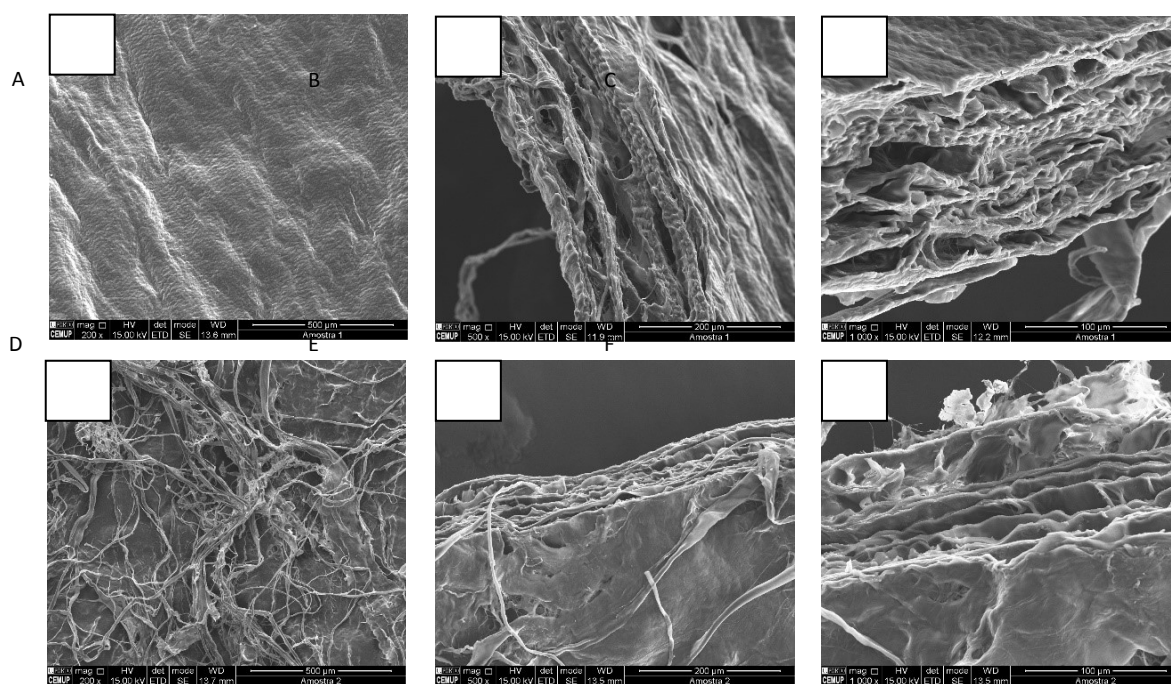
## **Resultados**



### 3. Resultados

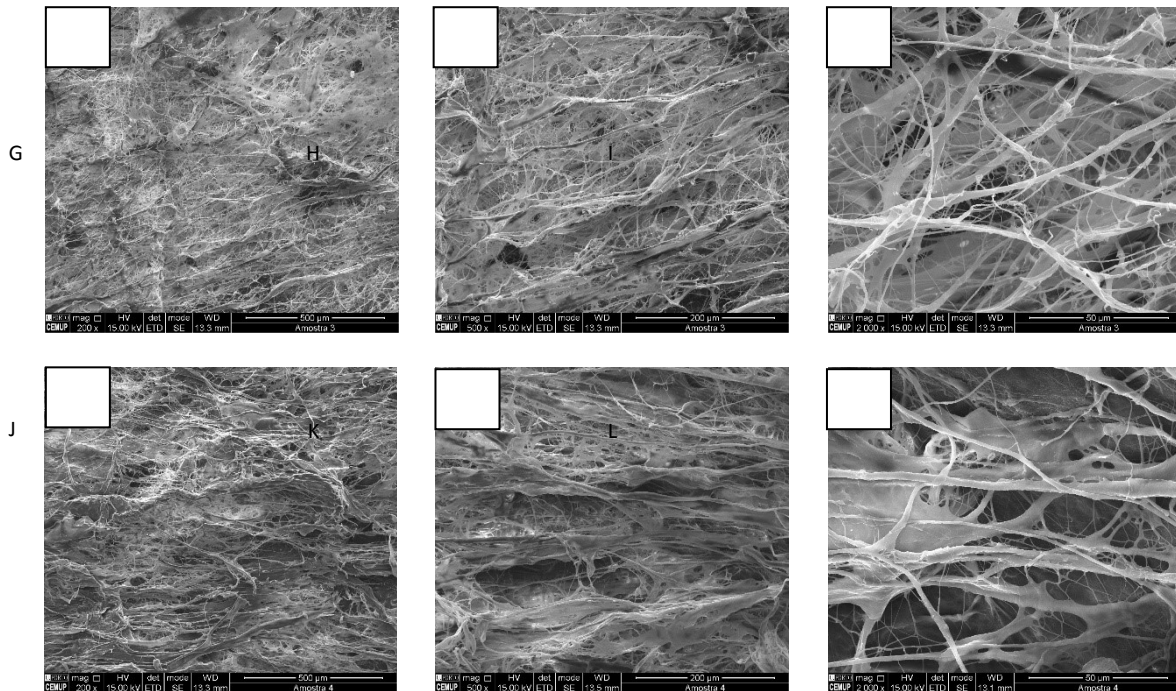
#### 3.1. Morfologia das membranas analisadas pelo SEM

Na figura 4 estão presentes as imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varrimento da membrana do grupo I antes (imagens A, B e C) e depois da degradação no *SBF* (imagens D, E e F). Nas imagens A, B e C é possível observar uma estrutura tridimensional organizada, de fibras de colagénio com uma orientação demarcada, apresentando uma morfologia heteroporosa. Nas imagens D, E e F, em comparação com os materiais não-degradados, já se observa alguma degradação e desorganização das fibras, porém há preservação da estrutura tridimensional.



**Figura 4** – Imagens obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varrimento das membranas do grupo I. A, B e C: membrana não degradada ampliada 200x, 500x e 1000x respetivamente; D, E e F: membrana degradada ampliada 200x, 500x e 1000x respetivamente.

Na figura 5 estão presentes as imagens da membrana de colagénio do grupo II, novamente antes (imagens G, H e I) e após da imersão no *SBF* (imagens J, K e L). Nas imagens G, H e I é possível observar uma estrutura de fibras tridimensional mais densa quando comparada com a membrana do grupo I, apresentando também uma morfologia heteroporosa. Nas imagens J, K e L observa-se que o efeito da degradação no *SBF* foi menos evidente e a estrutura tridimensional e a densidade das fibras permaneceu inalterada.



**Figura 5** – Imagens obtidas através da Microscopia Eletrónica de Varrimento das membranas do grupo II. G, H e I: membrana não degradada ampliada 200x, 500x e 2000x respetivamente; D; E e F: membrana degradada ampliada 200x, 500x e 2000x respetivamente.

### 3.2. Análise das ligações químicas dos materiais pelo *FT-IR*

A percentagem de transmissão (eixo dos Y) da radiação infra-vermelha que passa através das amostras é examinada em todas as frequências (eixo dos X) de uma vez só, e os picos presentes em comprimentos de onda específicos são registados.

A figura 6 representa os espectros das membranas do grupo I. Para a membrana não degradada, o pico  $1628.59\text{ cm}^{-1}$  representa a amida I, o pico  $1539.01\text{ cm}^{-1}$  representa a amida II e o pico  $1235.60\text{ cm}^{-1}$  representa a amida III. Para a membrana degradada, o pico  $1629.40\text{ cm}^{-1}$  representa a amida I, o pico  $1541.95\text{ cm}^{-1}$  representa a amida II e o pico  $1235.29\text{ cm}^{-1}$  representa a amida III.

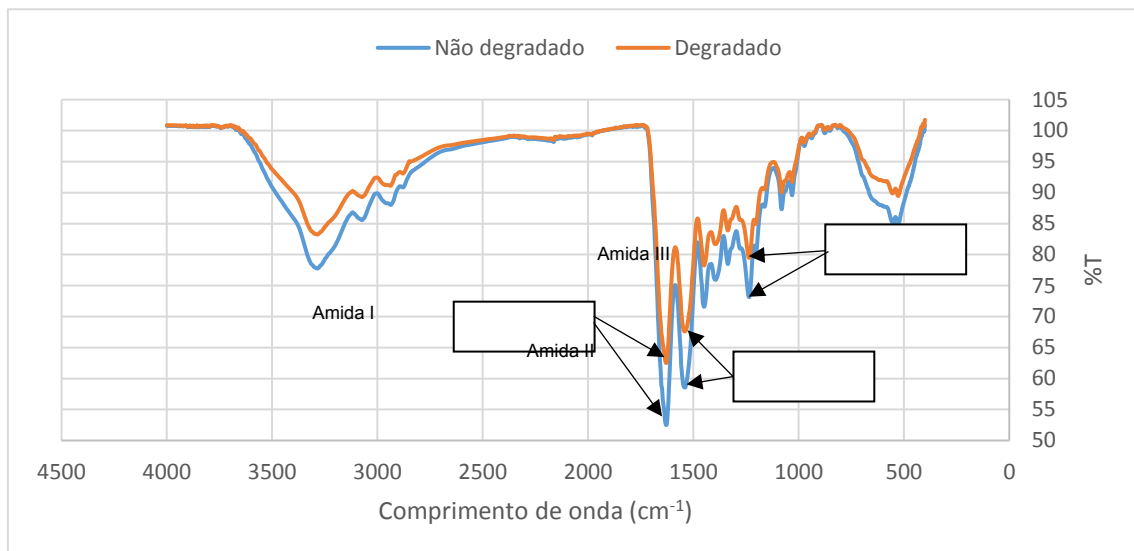


Figura 6 – Espectro relativo às membranas do grupo I.

A figura 7 representa os espectros das membranas do grupo II. Para a membrana não degradada, o pico  $1630.88\text{ cm}^{-1}$  representa a amida I, o pico  $1545.59\text{ cm}^{-1}$  representa a amida II e o pico  $1236.42\text{ cm}^{-1}$  representa a amida III. Para a membrana degradada, o pico  $1633.83\text{ cm}^{-1}$  representa a amida I, o pico  $1544.0\text{ cm}^{-1}$  representa a amida II e o pico  $1235.83\text{ cm}^{-1}$  representa a amida III.

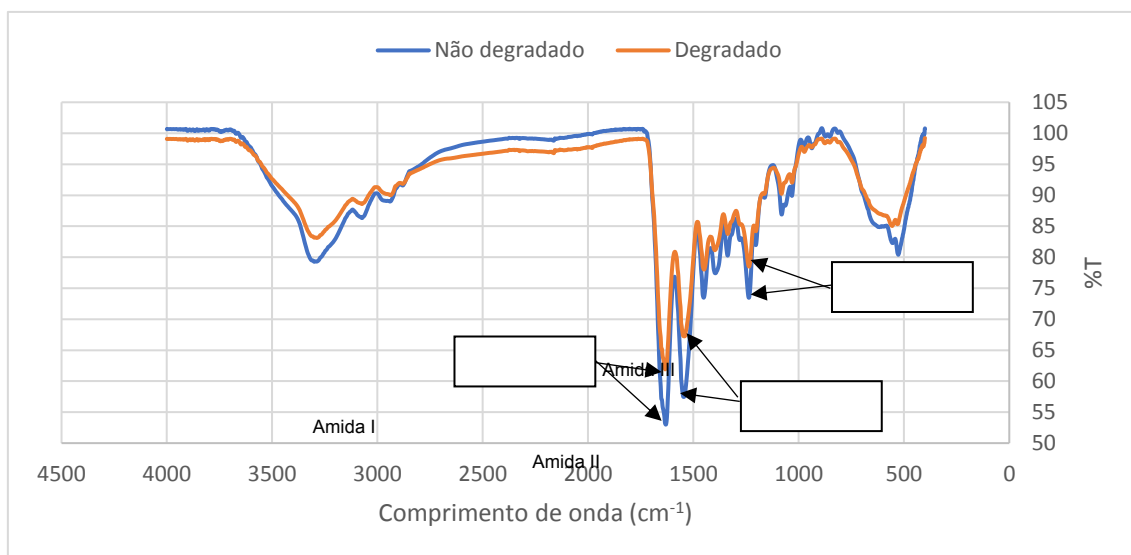


Figura 7 – Espectro relativo às membranas do grupo II.

Pela avaliação de ambos os gráficos, observa-se que os espectros das membranas do grupo I e grupo II, tanto degradadas como não degradadas são semelhantes, mostrando que não há diferenças significativas nas ligações químicas dos materiais antes e após o ensaio em *SBF*. Em adição, nota-se alguma tendência para o aumento da porcentagem de transmissão para as membranas degradadas em ambos os grupos.



### 3.3. Análise das propriedades mecânicas dos materiais através do *DMA*

As figuras 8A e 8B representam a variação do módulo de armazenamento ( $E'$ ) em função da frequência aplicada (0.1 a 15 Hz) das membranas do grupo I e do grupo II, respectivamente. Segundo os gráficos mostrados, é possível observar que em ambos os grupos, as amostras das membranas degradadas apresentam menor  $E'$  do que as amostras não degradadas, em todas as frequências, não apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) (apêndice 1 e 2).

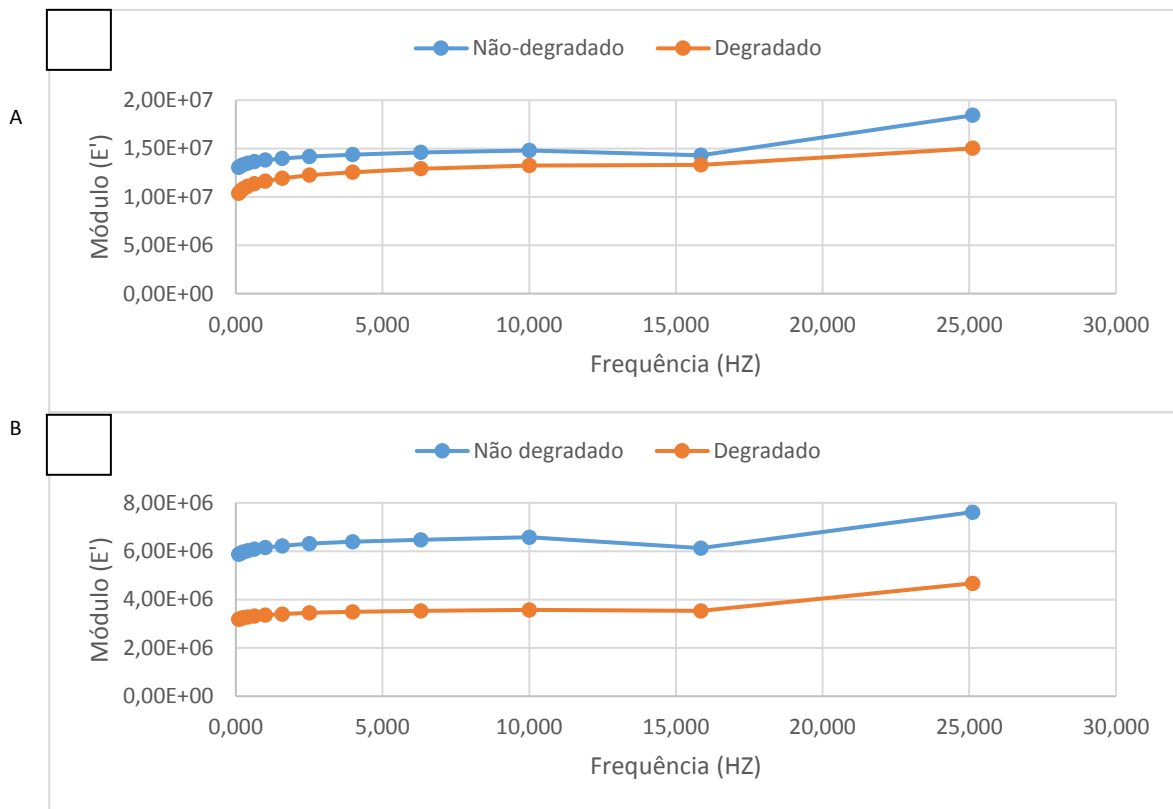
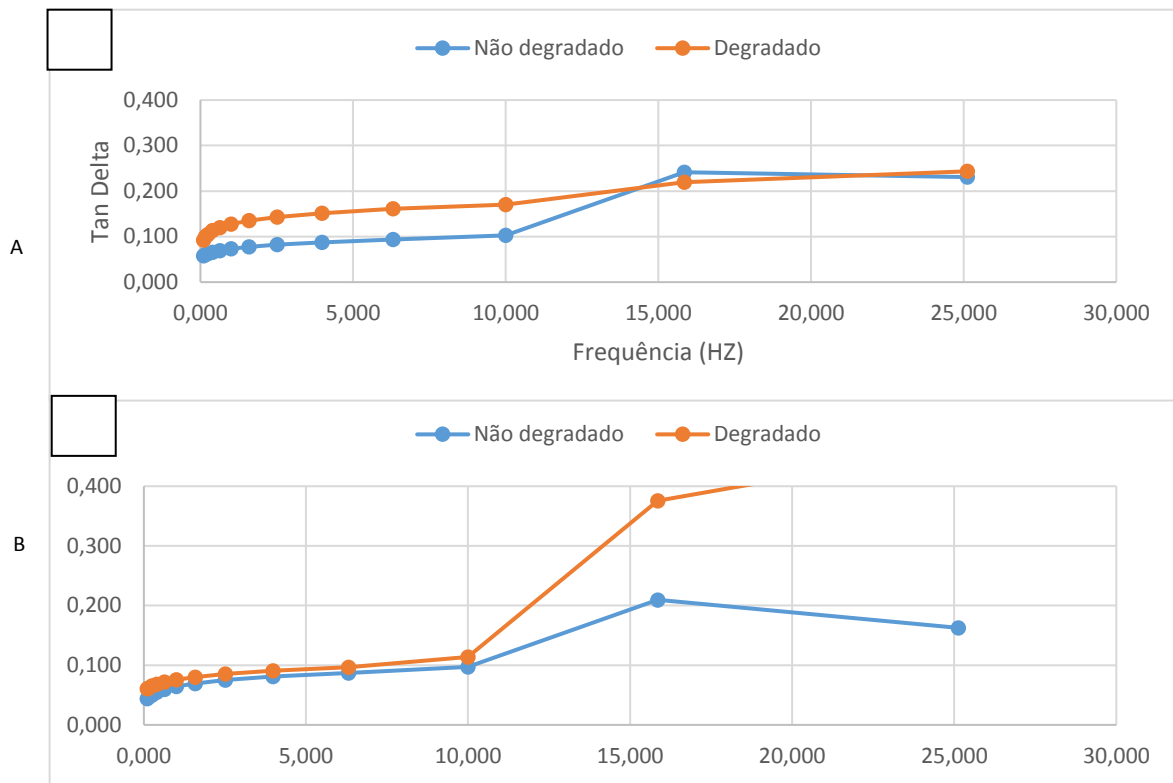


Figura 8 – Módulo de armazenamento ( $E'$ ) em função da frequência (Hz) das membranas do grupo I (8A) e do grupo II (8B).

As figuras 9 representam o  $\tan \delta$  (a razão entre a quantidade de energia dissipada –  $E''$  e a energia armazenada –  $E'$ ) em função da frequência previamente referida, das membranas do grupo I (fig. 9A) e do grupo II (fig. 9B). É possível concluir que o  $\tan \delta$  aumenta nas amostras degradadas de ambos os grupos, não apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) (apêndice 3 e 4).



**Figura 9** –Tan  $\delta$  em função da frequência (Hz) das membranas do grupo I (9A) e do grupo II (9B).

Ao observar as figuras 8 e 9, também é possível notar uma tendência para o aumento dos valores do  $E'$  e  $\tan \delta$  com o aumento da frequência, para as membranas de ambos os grupos.

---

## **Discussão**



## 4. Discussão

---

O *SEM* é comumente utilizado para analisar a morfologia da superfície de diversos materiais, também como quantificar a porosidade dos mesmos, no caso de materiais porosos (30,53,54). Em 2012, Santos e colaboradores (30) utilizaram as imagens do *SEM* para caracterizar colagénio altamente purificado de pericárdio de bovino. Semelhantemente, a análise microscópica realizada na presente monografia evidenciou a presença de uma estrutura tridimensional altamente organizada e heteroporosa, em ambas as membranas, com maior densidade de fibras de colagénio proveniente de tecido de tendão bovino. Resultados similares também foram observados por Techatanawat e colaboradores (55).

Ao analisar as imagens da membrana pré-hidratada, é possível observar que a degradação afetou a sua estrutura (mais evidente nas imagens ampliadas a 200x – A e D), resultando numa membrana com fibras de colagénio menos organizadas, podendo ou não ter resultado numa alteração do tamanho dos poros, que conseqüentemente poderá afetar as propriedades mecânicas da membrana (32). Como esta membrana tem um tempo de reabsorção de 16 semanas, é espectável que após uma degradação de 8 semanas ocorresse alguma alteração estrutural, mantendo na mesma a estrutura tridimensional de fibras. Em relação às imagens da membrana *SR*, não se observa qualquer diferença na estrutura das fibras de colagénio, pois segundo o fabricante, a reabsorção ocorre entre 26 a 38 semanas, sendo espectável que não ocorresse nenhuma alteração estrutural significativa, justificando os resultados da microscopia.

Como referido anteriormente, o *FT-IR* é uma técnica analítica que deteta as vibrações características de grupos funcionais numa dada amostra, que neste caso (colagénio), são os grupos amida (30,46). Estes grupos funcionais, nos organismos vivos, ligam a sequência de aminoácidos para formar a cadeia  $\alpha$  da molécula de colagénio tipo I (30). Os grupos amida I e amida II são os principais grupos funcionais deste espetro, em que a amida I (que se situa entre os comprimentos de onda  $\sim 1700$  a  $\sim 1600$   $\text{cm}^{-1}$ ) está associada á vibração C/O e a amida II (que se situa entre os comprimentos de onda  $\sim 1580$  a  $\sim 1480$   $\text{cm}^{-1}$ ) está

associada á vibração C/N e N/H. (30,46). A amida III é um pico mais fraco no espectro, mas situa-se normalmente na região  $\sim 1350$  e  $\sim 1250$   $\text{cm}^{-1}$  (30,46). Quando o feixe de infra-vermelho passa através da amostra com a frequência correspondente à frequência das vibrações dos grupos funcionais, uma percentagem da radiação é absorvida, sendo registada a percentagem de transmissão que atinge o recetor do equipamento. Conclui-se portanto que as amostras mais complexas e com maior número de grupos funcionais apresentam um espectro também mais complexo e com menor percentagem de transmissão (30).

Ao analisar os resultados obtidos é possível concluir que em ambos os grupos, os espectros das amostras não degradadas é bastante semelhante aos espectros das amostras degradadas, traduzindo-se numa estrutura molecular equivalente. Ambos os gráficos obtidos com os diferentes materiais degradados ou não são também semelhantes aos gráficos mostrados nos estudos de *Santos e colaboradores* (30). No entanto, nos resultados mostrados nas figuras 6 e 7, observa-se algum aumento na percentagem de transmissão nos 3 picos para as amostras degradadas, pois a degradação afetou de certa forma o número de ligações químicas dos grupos funcionais.

Em relação à resistência mecânica, foram realizados ensaios cíclicos de tensão nas membranas de colagénio sob força dinâmico-mecânica de modo a mimetizar as condições fisiológicas in vivo. A análise dinâmico-mecânica é uma técnica adequada para a caracterização mecânica de diversos biomateriais, pois ao alterar as condições de teste é possível mimetizar o ambiente fisiológico (56). *Caridade e colaboradores* (56) também utilizaram esta técnica para caracterizar mecânicamente dois tipos de materiais para medicina regenerativa.

O módulo de armazenamento ( $E'$ ) e o  $\tan \delta$  foram avaliados numa frequência de 0.1 a 15 Hz. O módulo de armazenamento (ou módulo de elasticidade) ( $E'$ ) representa a elasticidade do material e indica a capacidade de armazenar energia durante o processo de deformação (tensão), traduzindo-se na sua resistência mecânica (57). O  $\tan \delta$ , sendo o coeficiente entre o  $E''$  (módulo de perda), e o  $E'$  (módulo de armazenamento), descreve o comportamento viscoelástico do material, ou seja, o seu comportamento viscoelástico antes de ocorrer deformação plástica permanente, sendo um indicador da capacidade do

material perder energia através de rearranjos moleculares e fricção interna (57,58).

Relativamente aos resultados do módulo de armazenamento e dos de  $\tan \delta$  em ambos os grupos, não existe diferença estatisticamente significativa entre os materiais não degradados e os materiais degradados. É portanto possível concluir que, as alterações de estrutura observadas no *SEM* e as diferenças nas ligações químicas dos grupos funcionais nos espectros do *FT-IR* não alteraram a componente elástica e viscoelástica das membranas, verificando-se a manutenção da resistência mecânica após degradação, confirmando a hipótese nula. Apesar disto, a função de manutenção do espaço biológico in vivo (efeito “tenda”), poderá estar afetado de certa forma, sendo este um fator importante, pois como visto anteriormente, é um dos princípios fundamentais das membranas barreira. Se a membrana de colagénio for utilizada na *GBR* sem partículas ou enxertos ósseos subjacente, normalmente resulta na compressão da membrana para o defeito ósseo pelos tecidos moles (36). Para evitar este colapso, é aconselhável a utilização do biomaterial ósseo em conjunto com a membrana de colagénio em procedimentos de *GBR*, obtendo resultados semelhantes às membranas de *e-PTFE* (28,40).

Contrariamente às membranas de colagénio de tendão de bovino, as de pericárdio apresentam pouca evidência relativamente a procedimentos de regeneração óssea na medicina dentária, logo qualquer estudo que avalie as propriedades de tais membranas, no sentido de conhecer o seu potencial regenerativo, tem grande interesse científico (59).

A membrana de colagénio de pericárdio de bovino utilizada no estudo está a ser comercializada recentemente para a aplicação em Medicina Dentária e possui como característica diferencial entre os produtos já comercializados, o facto de ser pré-hidratada, o que lhe confere uma maior facilidade de utilização, uma vez que possui a característica de ser melhor conformável ao defeito a regenerar. O estudo por *Santos e colaboradores* (30), concluiu que o colagénio purificado de pericárdio de bovino apresenta características semelhantes a uma membrana de colagénio de tecido de tendão bovino já estudada e aplicada clinicamente, sendo considerado um biomaterial promissor em aplicações regenerativas na área da Medicina Dentária (*GBR* e *GTR*) (59–61). Apesar de já existirem alguns estudos, in vitro e in vivo que avaliam a eficácia destas

membranas de colagénio xenogénico, são necessários mais estudos clínicos para se estabelecer o potencial regenerativo destes novos materiais (59).

Apesar das membranas de colagénio bovino apresentarem um perfil regenerativo eficaz, a principal desvantagem continua a ser a rápida reabsorção pelo organismo, resultando numa perda precoce da função de barreira, sendo este o fator crucial nos procedimentos de *GBR* e *GTR* (59). Uma sugestão para futuros estudos *in vitro* poderá ser a observação das alterações morfológicas, físico-químicas e mecânicas após um período de degradação superior a 8 semanas, preferencialmente próximo do tempo de reabsorção afirmado pelo fabricante.

Deve-se salientar que a pequena dimensão das amostras e também a forte correlação entre a frequência e os valores do  $E'$  e de  $\tan \delta$  das membranas não degradadas e degradadas poderiam ter influenciado nos resultados obtidos neste trabalho (apêndice 5). De forma a averiguar esta situação seria necessário obter um maior número de amostras para a realização da análise do *DMA*. Em adição, os resultados e conclusões desta monografia estão limitados à natureza do próprio estudo (*in vitro*), que apesar de ultrapassar os obstáculos éticos de um estudo *in vivo*, não estão sujeitos às variações inerentes ao modelo animal e aos componentes na indução da degradação, como por exemplo a atividade enzimática, presente apenas no organismo vivo. Em consequência, as membranas estudadas e avaliadas *in vitro* poderão não ter as mesmas propriedades e reprodutibilidade numa situação *in vivo*.

Outra sugestão para trabalhos futuros será o estudo da porosidade das membranas, pois é uma característica muito importante para prevenir a penetração excessiva de tecido fibroso para o defeito ósseo e ao mesmo tempo permitir a neovascularização e a formação óssea (31,32). Um material com um tamanho de poros muito aumentado está sujeito a mais contaminações bacterianas, e a remoção cirúrgica destas membranas contaminadas torna-se complicada devido à abundância de crescimento de tecido mole (31). No entanto, se o material possuir tamanho de poros muito pequeno, a migração celular é limitada, o que leva a uma maior deposição de colagénio, formação de tecido avascular, e um impedimento da infiltração e crescimento vascular (31). O tamanho dos poros também vai afetar a capacidade de suporte tecidual do material (31). Um tamanho de poros mais elevado vai inevitavelmente resultar



numa menor área de superfície do biomaterial, o que pode limitar os passos principais iniciais de adesão celular na membrana e diminuir a formação vascular (31).





## Conclusão

## 5. Conclusão

---

Os resultados dos testes realizados permitem concluir que após a degradação por 8 semanas, as membranas não apresentam diferenças significativas quando comparadas antes da imersão no *SBF*, preservando as suas propriedades morfológicas, físico-químicas e mecânicas, confirmando a hipótese nula.

Tais resultados sugerem a manutenção clínica da função barreira dos 2 tipos de membranas em procedimentos regenerativos, durante o período de tempo estudado.





## **Bibliografia**



## Bibliografia

---

1. Palumbo A. The Anatomy and Physiology of the Healthy Periodontium. Em: Panagakos F, editor. *Gingival Diseases - Their Aetiology, Prevention and Treatment* [Internet]. InTech; 2011 [citado 17 de Dezembro de 2017]. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/gingival-diseases-their-aetiology-prevention-and-treatment/the-anatomy-and-physiology-of-the-healthy-periodontium>
2. Hughes FJ. Periodontium and Periodontal Disease. Em: *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* [Internet]. Elsevier; 2015 [citado 18 de Dezembro de 2017]. p. 433–44. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971579000382>
3. Michael Newman. *Carranza's Clinical Periodontology*, 12th Edition. Elsevier Health Sciences; 2015.
4. Lindhe J, Lang NP, Berglundh T, Giannobile WV, Sanz M, editores. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Sixth edition. Chichester, West Sussex ; Ames, Iowa: John Wiley and Sons, Inc; 2015.
5. Bayliss L, Mahoney DJ, Monk P. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surg Oxf*. Fevereiro de 2012;30(2):47–53.
6. Dwek JR. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol*. Abril de 2010;39(4):319–23.
7. Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: Biology and Applications in Craniofacial Bone Regeneration. *J Dent Res*. Fevereiro de 2014;93(2):109–16.
8. Mahajan A. Periosteum: A Highly Underrated Tool in Dentistry. *Int J Dent*. 2012;2012:1–6.

9. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 1 de Novembro de 2008;3(Supplement 3):S131–9.
10. Jayakumar P, Di Silvio L. Osteoblasts in bone tissue engineering. Tanner KE, Dalby MJ, editores. *Proc Inst Mech Eng [H]*. Dezembro de 2010;224(12):1415–40.
11. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res Int*. 2015;2015:1–17.
12. Gentili/snm C, >, Cancedda R. Cartilage and Bone Extracellular Matrix. *Curr Pharm Des*. 1 de Abril de 2009;15(12):1334–48.
13. Reznikov N, Shahar R, Weiner S. Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater*. Setembro de 2014;10(9):3815–26.
14. The healthy mouth. Em: *Restorative Dentistry [Internet]*. Elsevier; 2007 [citado 22 de Dezembro de 2017]. p. 3–11. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780443102462500058>
15. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease\*. *Periodontol 2000*. Fevereiro de 2006;40(1):11–28.
16. Gulabivala K, Ng Y-L. Tooth organogenesis, morphology and physiology. Em: *Endodontics [Internet]*. Elsevier; 2014 [citado 23 de Dezembro de 2017]. p. 2–32. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702031557000011>
17. de Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res*. Dezembro de 2017;52(6):965–74.
18. Shimauchi H, Nemoto E, Ishihata H, Shimomura M. Possible functional scaffolds for periodontal regeneration. *Jpn Dent Sci Rev*. Novembro de 2013;49(4):118–30.

19. Sampogna G, Guraya SY, Forgione A. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. *J Microsc Ultrastruct.* Setembro de 2015;3(3):101–7.
20. Mitchell AC, Briquez PS, Hubbell JA, Cochran JR. Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater.* Janeiro de 2016;30:1–12.
21. Pawelec KM, Best SM, Cameron RE. Collagen: a network for regenerative medicine. *J Mater Chem B.* 2016;4(40):6484–96.
22. Bielli A, Bernardini R, Varvaras D, Rossi P, Di Blasi G, Petrella G, et al. Characterization of a new decellularized bovine pericardial biological mesh: Structural and mechanical properties. *J Mech Behav Biomed Mater.* Fevereiro de 2018;78:420–6.
23. Atala A. Regenerative medicine strategies. *J Pediatr Surg.* Janeiro de 2012;47(1):17–28.
24. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. *Pediatr Res.* Maio de 2008;63(5):492–6.
25. Bhattacharjee A, Bansal M. Collagen Structure: The Madras Triple Helix and the Current Scenario. *IUBMB Life Int Union Biochem Mol Biol Life.* 1 de Março de 2005;57(3):161–72.
26. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem.* Junho de 2009;78(1):929–58.
27. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* Setembro de 2012;8(9):3191–200.
28. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. *Open Dent J.* 16 de Maio de 2014;8(1):56–65.
29. Lodish HF, editor. *Molecular cell biology.* 6th ed. New York: W.H. Freeman; 2008. 1 p.

30. Santos MH, Silva RM, Dumont VC, Neves JS, Mansur HS, Heneine LGD. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. *Mater Sci Eng C*. Março de 2013;33(2):790–800.
31. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res*. Janeiro de 2013;57(1):3–14.
32. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med* [Internet]. Dezembro de 2012 [citado 31 de Janeiro de 2018];10(1). Disponível em: <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-10-81>
33. Becker W, Becker BE, Mellonig J, Caffesse RG, Warriner K, Caton JG, et al. A Prospective Multi-Center Study Evaluating Periodontal Regeneration for Class II Furcation Invasions and Intrabony Defects After Treatment With a Bioabsorbable Barrier Membrane: 1-Year Results. *J Periodontol*. Julho de 1996;67(7):641–9.
34. Lee C-K, Koo K-T, Kim T-I, Seol Y-J, Lee Y-M, Rhyu I-C, et al. Biological effects of a porcine-derived collagen membrane on intrabony defects. *J Periodontal Implant Sci*. 2010;40(5):232.
35. Stoecklin-Wasmer C, Rutjes AWS, da Costa BR, Salvi GE, Jüni P, Sculean A. Absorbable Collagen Membranes for Periodontal Regeneration: A Systematic Review. *J Dent Res*. Setembro de 2013;92(9):773–81.
36. Sheikh Z, Qureshi J, Alshahrani AM, Nassar H, Ikeda Y, Glogauer M, et al. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. *Odontology*. Janeiro de 2017;105(1):1–12.
37. Van Swol RL, Ellinger R, Pfeifer J, Barton NE, Blumenthal N. Collagen Membrane Barrier Therapy to Guide Regeneration in Class II Furcations in Humans. *J Periodontol*. Julho de 1993;64(7):622–9.

38. Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. Setembro de 2009;20:113–23.
39. Bubalo M, Lazic Z, Tatic Z, Milovic R, Magic M. The use of collagen membranes in guided tissue regeneration. *Vojnosanit Pregl*. 2017;74(8):767–72.
40. Bunyaratavej P, Wang H-L. Collagen Membranes: A Review. *J Periodontol*. Fevereiro de 2001;72(2):215–29.
41. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*. Outubro de 2017;125(5):315–37.
42. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu T-MG, Kowolik MJ, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—A materials perspective. *Dent Mater*. Julho de 2012;28(7):703–21.
43. Reynolds MA, Kao RT, Nares S, Camargo PM, Caton JG, Clem DS, et al. Periodontal Regeneration — Intrabony Defects: Practical Applications From the AAP Regeneration Workshop: *Enhancing Periodontal Health Through Regenerative Approaches*. *Clin Adv Periodontics*. Fevereiro de 2015;5(1):21–9.
44. Wang H-L, Modarressi M, Fu J-H. Utilizing collagen membranes for guided tissue regeneration-based root coverage: Root coverage with guided tissue regeneration. *Periodontol 2000*. Junho de 2012;59(1):140–57.
45. Chambrone L, Tatakis DN. Periodontal Soft Tissue Root Coverage Procedures: A Systematic Review From the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol*. Fevereiro de 2015;86(2-s):S8–51.
46. de Campos Vidal B, Mello MLS. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*. Abril de 2011;42(3):283–9.

47. Kokubo T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*. Março de 1991;12(2):155–63.
48. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J Biomed Mater Res*. Junho de 1990;24(6):721–34.
49. Pereira RF, Bártolo PJ. Degradation Behavior of Biopolymer-based Membranes for Skin Tissue Regeneration. *Procedia Eng*. 2013;59:285–91.
50. Barbeck M, Serra T, Booms P, Stojanovic S, Najman S, Engel E, et al. Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components – Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration. *Bioact Mater* [Internet]. Junho de 2017 [citado 16 de Dezembro de 2017]; Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452199X1630055X>
51. Chen Y, Zhang S, Li J, Song Y, Zhao C, Zhang X. Dynamic degradation behavior of MgZn alloy in circulating m-SBF. *Mater Lett*. Setembro de 2010;64(18):1996–9.
52. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. Maio de 2006;27(15):2907–15.
53. Lee S-H, An S-J, Lim Y-M, Huh J-B. The Efficacy of Electron Beam Irradiated Bacterial Cellulose Membranes as Compared with Collagen Membranes on Guided Bone Regeneration in Peri-Implant Bone Defects. *Materials*. 1 de Setembro de 2017;10(9):1018.
54. Chu C, Deng J, Man Y, Qu Y. Evaluation of nanohydroxyapatite (nano-HA) coated epigallocatechin-3-gallate (EGCG) cross-linked collagen membranes. *Mater Sci Eng C*. Setembro de 2017;78:258–64.
55. Techatanawat S, Surarit R, Suddhasthira T, Khovidhunkit SP. Type I collagen extracted from rat-tail and bovine Achilles tendon for dental

application: a comparative study. *Asian Biomed.* 1 de Dezembro de 2011;5(6):787–98.

56. Caridade SG, Merino EG, Alves NM, Bermudez V de Z, Boccaccini AR, Mano JF. Chitosan membranes containing micro or nano-size bioactive glass particles: evolution of biomineralization followed by in situ dynamic mechanical analysis. *J Mech Behav Biomed Mater.* Abril de 2013;20:173–83.
57. Santawisuk W, Kanchanasavita W, Sirisinha C, Harnirattisai C. Dynamic viscoelastic properties of experimental silicone soft lining materials. *Dent Mater J.* 2010;29(4):454–60.
58. P. Menard K. *Dynamic Mechanical Analysis, a practical introduction.* 2ª. Boca Raton, FL: CRC Press; 2008. 240 p.
59. MDS Periodontology, Chandigarh, India, Gupta DS, Gupta DR. Guided bone regeneration with Pericardium membranes. *IOSR J Dent Med Sci.* 2014;13(11):61–5.
60. Schlee M, Ghanaati S, Willershausen I, Stimmlmayr M, Sculean A, Sader RA. Bovine pericardium based non-cross linked collagen matrix for successful root coverage, a clinical study in human. *Head Face Med* [Internet]. Dezembro de 2012 [citado 26 de Maio de 2018];8(1). Disponível em: <http://head-face-med.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-160X-8-6>
61. Stavropoulos A, Chiantella G, Costa D, Steigmann M, Windisch P, Sculean A. Clinical and Histologic Evaluation of a Granular Bovine Bone Biomaterial Used as an Adjunct to GTR With a Bioresorbable Bovine Pericardium Collagen Membrane in the Treatment of Intra-bony Defects. *J Periodontol.* Março de 2011;82(3):462–70.





# Apêndices



## Apêndice 1

Caracterização do módulo de elasticidade da membrana pré-hidratada por frequência antes e após degradação.

Freq	Membranas	Estatísticas		Teste <i>Wilcoxon</i>	
		Média	Desvio padrão	Estatística teste	Valor de prova
0,100	Membrana pré-hidratada não degradada	1,305E+07	4,031E+06	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	1,038E+07	2,073E+06		
0,158	Membrana pré-hidratada não degradada	1,319E+07	4,060E+06	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	1,061E+07	2,029E+06		
0,251	Membrana pré-hidratada não degradada	1,333E+07	4,093E+06	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	1,084E+07	2,027E+06		
0,398	Membrana pré-hidratada não degradada	1,347E+07	4,113E+06	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	1,109E+07	2,002E+06		
0,631	Membrana pré-hidratada não degradada	1,363E+07	4,128E+06	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	1,134E+07	1,998E+06		
1,000	Membrana pré-hidratada não degradada	1,380E+07	4,153E+06	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	1,164E+07	2,007E+06		
1,585	Membrana pré-hidratada não degradada	1,398E+07	4,176E+06	-1,069	0,285
	Membrana pré-hidratada degradada	1,193E+07	2,019E+06		
2,512	Membrana pré-hidratada não degradada	1,418E+07	4,194E+06	-1,069	0,285
	Membrana pré-hidratada degradada	1,225E+07	2,038E+06		
3,981	Membrana pré-hidratada não degradada	1,439E+07	4,215E+06	-1,069	0,285
	Membrana pré-hidratada degradada	1,256E+07	2,050E+06		
6,310	Membrana pré-hidratada não degradada	1,458E+07	4,221E+06	-1,069	0,285
	Membrana pré-hidratada degradada	1,290E+07	2,093E+06		
10,000	Membrana pré-hidratada não degradada	1,480E+07	4,229E+06	-1,069	0,285
	Membrana pré-hidratada degradada	1,323E+07	2,117E+06		
15,849	Membrana pré-hidratada não degradada	1,431E+07	4,141E+06	-0,535	0,593
	Membrana pré-hidratada degradada	1,330E+07	2,098E+06		
25,119	Membrana pré-hidratada não degradada	1,844E+07	6,248E+06	-1,069	0,285
	Membrana pré-hidratada degradada	1,502E+07	2,433E+06		

Neste apêndice está presente a caracterização do módulo de elasticidade para todas as frequências utilizadas na membrana pré-hidratada nos dois momentos: não degradado e degradado. Verifica-se que os valores médios e de dispersão diminuem entre os dois momentos para a membrana em todas as frequências. Pela aplicação do teste não paramétrico *Wilcoxon* (dada a pequena dimensão das amostras) para a mostras relacionadas conclui-se que a diminuição do módulo de elasticidade na membrana pré-hidratada entre o instante não degradado e o instante degradado em qualquer frequência não apresenta significância estatística.

## Apêndice 2

Caracterização do módulo de elasticidade da membrana SR por frequência antes e após degradação.

Freq	Membranas	Estatísticas		Teste <i>Wilcoxon</i>	
		Média	Desvio padrão	Estatística teste	Valor de prova
0,100	Membrana SR não degradada	5,877E+06	8,457E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,186E+06	3,784E+06		
0,158	Membrana SR não degradada	5,921E+06	8,478E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,217E+06	3,824E+06		
0,251	Membrana SR não degradada	5,964E+06	8,648E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,250E+06	3,864E+06		
0,398	Membrana SR não degradada	6,022E+06	8,754E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,287E+06	3,911E+06		
0,631	Membrana SR não degradada	6,082E+06	8,825E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,323E+06	3,956E+06		
1,000	Membrana SR não degradada	6,149E+06	8,917E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,362E+06	4,004E+06		
1,585	Membrana SR não degradada	6,224E+06	8,987E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,403E+06	4,055E+06		
2,512	Membrana SR não degradada	6,308E+06	9,100E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,448E+06	4,110E+06		
3,981	Membrana SR não degradada	6,393E+06	9,143E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,494E+06	4,168E+06		
6,310	Membrana SR não degradada	6,470E+06	9,228E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,536E+06	4,220E+06		
10,000	Membrana SR não degradada	6,580E+06	9,843E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,572E+06	4,259E+06		
15,849	Membrana SR não degradada	6,130E+06	4,723E+05	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	3,536E+06	4,354E+06		
25,119	Membrana SR não degradada	7,617E+06	2,261E+06	-0.447	0,655
	Membrana SR degradada	4,673E+06	5,262E+06		

Neste apêndice apresenta-se a caracterização do módulo de elasticidade para todas as frequências utilizadas na membrana SR nos dois momentos: não degradado e degradado. Verifica-se que os valores médios diminuem entre os dois momentos para a membrana em todas as frequências e que as dispersões aumentam. Pela aplicação do teste não paramétrico *Wilcoxon* (dada a pequena dimensão das amostras) para as mostras relacionadas conclui-se que a diminuição do módulo de elasticidade na membrana SR entre o instante não degradado e o instante degradado em qualquer frequência não apresenta significância estatística.

## Apêndice 3

Caracterização  $\tan \delta$  da membrana pré-hidratada por frequência antes e após degradação.

Freq	Membranas	Estatísticas		Teste <i>Wilcoxon</i>	
		Média	Desvio padrão	Estatística teste	Valor de prova
0,100	Membrana pré-hidratada não degradada	0,0576	0,0189	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,0919	0,0358		
0,158	Membrana pré-hidratada não degradada	0,0605	0,0202	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,1000	0,0401		
0,251	Membrana pré-hidratada não degradada	0,0624	0,0200	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,1049	0,0424		
0,398	Membrana pré-hidratada não degradada	0,0658	0,0207	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,1132	0,0452		
0,631	Membrana pré-hidratada não degradada	0,0692	0,0209	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,1199	0,0469		
1,000	Membrana pré-hidratada não degradada	0,0733	0,0201	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,1271	0,0489		
1,585	Membrana pré-hidratada não degradada	0,0778	0,0200	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,1350	0,0504		
2,512	Membrana pré-hidratada não degradada	0,0822	0,0195	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,1430	0,0509		
3,981	Membrana pré-hidratada não degradada	0,0870	0,0185	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,1512	0,0519		
6,310	Membrana pré-hidratada não degradada	0,0933	0,0190	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,1609	0,0530		
10,000	Membrana pré-hidratada não degradada	0,1025	0,0176	-1,604	0,109
	Membrana pré-hidratada degradada	0,1704	0,0536		
15,849	Membrana pré-hidratada não degradada	0,2414	0,0984	0,001	0,999
	Membrana pré-hidratada degradada	0,2197	0,0543		
25,119	Membrana pré-hidratada não degradada	0,2307	0,0583	-0,535	0,596
	Membrana pré-hidratada degradada	0,2435	0,0571		

Neste apêndice apresenta-se a caracterização de  $\tan \delta$  para todas as frequências utilizadas na membrana pré-hidratada nos dois momentos: não degradado e degradado. Verifica-se que os valores médios e de dispersão aumentam entre os dois momentos para a membrana em todas as frequências, com exceção das frequências 12 e 13 em que a dispersão diminuiu. Pela aplicação do teste não paramétrico *Wilcoxon* (dada a pequena dimensão das amostras) para a mostras relacionadas conclui-se que o aumento de  $\tan \delta$  na membrana pré-hidratada entre o instante não degradado e o instante degradado em qualquer frequência não apresenta significância estatística.

## Apêndice 4

Caracterização tan  $\delta$  da membrana SR por frequência antes e após degradação

Freq	Membranas	Estatísticas		Teste <i>Wilcoxon</i>	
		Média	Desvio padrão	Estatística teste	Valor de prova
0,100	Membrana SR não degradada	0,0442	0,0016	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,0607	0,0062		
0,158	Membrana SR não degradada	0,0474	0,0013	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,0626	0,0066		
0,251	Membrana SR não degradada	0,0502	0,0031	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,0654	0,0062		
0,398	Membrana SR não degradada	0,0551	0,0028	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,0684	0,0066		
0,631	Membrana SR não degradada	0,0595	0,0022	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,0718	0,0058		
1,000	Membrana SR não degradada	0,0644	0,0022	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,0757	0,0050		
1,585	Membrana SR não degradada	0,0695	0,0021	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,0801	0,0037		
2,512	Membrana SR não degradada	0,0752	0,0023	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,0854	0,0033		
3,981	Membrana SR não degradada	0,0811	0,0027	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,0905	0,0016		
6,310	Membrana SR não degradada	0,0871	0,0059	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,0964	0,0016		
10,000	Membrana SR não degradada	0,0973	0,0101	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,1137	0,0062		
15,849	Membrana SR não degradada	0,2096	0,1476	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,3756	0,2175		
25,119	Membrana SR não degradada	0,1628	0,0615	-1,342	0,180
	Membrana SR degradada	0,4639	0,0663		

Neste apêndice apresenta-se a caracterização de tan  $\delta$  para todas as frequências utilizadas na membrana SR nos dois momentos: não degradada e degradada. Verifica-se que os valores médios e de dispersão aumentam entre os dois momentos para a membrana em todas as frequências, com exceção das frequências 9, 10 e 11 em que a dispersão diminuiu. Pela aplicação do teste não paramétrico *Wilcoxon* (dada a pequena dimensão das amostras) para as mostras relacionadas conclui-se que o aumento de tan  $\delta$  na membrana SR entre o instante não degradado e o instante degradado em qualquer frequência não apresenta significância estatística.

## Apêndice 5

Correlação entre a frequência e os valores de  $E'$  e  $\tan \delta$ .

<b>Variável</b>	<b>Coefficiente de correlação com Frequência</b>
$E'$ da membrana pré-hidratada não degradada	0,897**
$E'$ da membrana pré-hidratada degradada	0,913**
$E'$ da membrana SR não degradada	0,842**
$E'$ da membrana SR degradada	0,906**
$\tan \delta$ da membrana pré-hidratada não degradada	0,938**
$\tan \delta$ da membrana pré-hidratada degradada	0,958**
$\tan \delta$ da membrana SR não degradada	0,889**
$\tan \delta$ da membrana SR degradada	0,953**

\*\*-significativo a 1%.