



Ângela Pinto Borges

**Membranas compósitas colagénio/CaP para
regeneração tecidual guiada**



Ângela Pinto Borges **Membranas compósitas colagénio/CaP para
regeneração tecidual guiada**

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

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me apoiaram e ajudaram até ao fim, especialmente os meus pais, a minha irmã e o Fernando.

O Júri

Presidente

Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira

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

Professor Doutor Francisco Manuel Lemos Amado

Professor associado no Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes

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

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras, a Professora Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes e a Professora Doutora Maria Elizabeth Jorge Vieira da Costa, por todos os conhecimentos transmitidos, disponibilidade, orientação e acompanhamento durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Marlene Maria Tourais de Barros, ao Professor Doutor Nuno Ricardo das Neves Rosa e à Professora Doutora Maria José Serol de Brito Correia, do Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva – SalivaTec, da Universidade Católica de Viseu – Centro Regional das Beiras, por todos os ensinamentos e apoio prestado na realização dos estudos de degradação em saliva.

Aos Doutores Filipe Araújo e Tiago Marques, por todos os esclarecimentos acerca de questões relacionadas com Medicina Dentária.

Aos estudantes do 3º ano de Ciências Biomédicas da Universidade Católica, pela ajuda na realização dos ensaios no SalivaTec.

Às técnicas Ana Sofia Ribeiro, Célia Miranda e Maria João Bastos, do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica, Universidade de Aveiro, pela realização das análises de DRX, BET, Coulter e potencial Zeta.

Às técnicas Marta Ferro e Maria Celeste Azevedo, do CICECO, pelas sessões de SEM/EDS e análises de FTIR respetivamente.

palavras-chave

Estrutura periodontal, Membranas compósitas, Colagénio, Hidroxiapatite, Vidro Bioativo, Bioatividade, Regeneração Tecidual Guiada.

resumo

A conceção de estruturas adequadas para suportar e favorecer o crescimento de tecidos é um dos desafios da engenharia de tecidos. Essas estruturas são materiais geralmente porosos com capacidade de inclusão e proliferação de células capazes de formar novos tecidos ao mesmo tempo que se vão degradando.

Doenças como a periodontite afetam grande parte da população e podem levar à perda da estrutura periodontal, sendo necessário recorrer a este tipo de estratégia para promover a sua regeneração.

O presente trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar membranas para favorecer a regeneração de tecidos em aplicações dentárias.

Foram desenvolvidas membranas compósitas de colagénio contendo fosfatos de cálcio bioativos (hidroxiapatite e vidro) como enchimento, em diferentes percentagens, na forma de estruturas porosas ou prensadas.

Foram caracterizadas as partículas de hidroxiapatite obtidas por precipitação química, as partículas de vidro produzido por fusão e moagem de fritas e as membranas compósitas preparadas com aqueles enchimentos.

Ambos os tipos de membranas apresentaram comportamento bioativo em fluido plasmático sintético. Também se procedeu ao estudo da sua degradação em contacto com saliva humana. A variação da concentração de proteínas na saliva após incubação das várias membranas revelou que, independentemente do tipo e conteúdo do enchimento, o processo de degradação é complexo e depende do tempo de incubação.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem globalmente que qualquer uma das membranas compósitas produzidas tem potencialidades para favorecer a regeneração de tecidos da cavidade bucal.

keywords

Periodontal Structure, Composite Membranes, Collagen, Hydroxyapatite, Bioactive Glass, Bioactivity, Guided Tissue Regeneration.

abstract

The design of appropriate structures to support and foster the growth of tissues is one of the challenges of tissue engineering.

These structures are generally porous materials with ability to support and allow proliferation of cells capable of forming new tissue while they degrade.

Diseases such as periodontitis affect a large percentage of the population and can lead to loss of periodontal structure, being necessary to use this type of strategy to promote regeneration.

This study aimed to produce and characterize membranes to promote tissue regeneration in dental applications.

Collagen composite membranes, containing bioactive calcium phosphates (hydroxyapatite and glass) as fillers, in different percentages have been developed in the form of porous or pressed structures.

The hydroxyapatite particles obtained by chemical precipitation, the glass particles produced by melt-quenching and grinding and the composite membranes prepared with those fillers were characterized.

Both types of membranes exhibited bioactive behavior in synthetic plasma fluid. A study of the membranes degradation in contact with human saliva was also performed. The variation of the proteins concentration in the saliva after different incubation times of the membranes revealed that, regardless of the type and content of the filler, the degradation process is complex and depends on the incubation time.

The results obtained in this work globally suggest that any of the composite membranes produced has the potential to promote the regeneration of tissues of the oral cavity.

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	ii
Abreviaturas	ii
Capítulo 1	1
1. Introdução/Enquadramento.....	3
1.1. Objetivos	4
1.2. Estrutura da tese	4
Capítulo 2	5
2. Revisão da Literatura.....	7
2.1. Estrutura periodontal	7
2.1.1. Fatores que afetam a estrutura periodontal.....	9
2.1.2. Cicatrização periodontal.....	10
2.2. Saliva: Composição e funções	12
2.3. Membranas periodontais	14
2.3.1. Membranas comerciais	16
2.3.2. Soluções em investigação	17
2.4. Colagénio	19
2.5. Materiais Bioativos	24
2.5.1. Vidros Bioativos	25
2.5.2. Fosfatos de cálcio	26
Capítulo 3	31
3. Procedimento Experimental	33
3.1. Materiais e reagentes para preparação das partículas e compósitos	33
3.2. Métodos de Preparação	33
3.2.1. Método de síntese de nanopartículas de hidroxiapatite.....	33

3.2.2. Método de obtenção de partículas de vidro bioativo	34
3.2.3. Método de preparação das membranas compósitas por liofilização.....	34
3.3. Caracterização	37
3.3.1. Fases cristalinas	37
3.3.2. Microestrutura e tamanho de partículas	38
3.3.3. Composição e ligações químicas	39
3.3.4. Área superficial específica	39
3.3.5. Carga superficial das partículas	41
3.3.7. Potencial bioativo	42
3.3.9. Degradação por saliva humana	43
Capítulo 4	47
4. Resultados e Discussão.....	49
4.1 Caracterização das nanopartículas de hidroxiapatite.....	49
4.2. Caracterização das partículas de vidro.....	60
4.3. Caracterização das membranas compósitas obtidas por liofilização	65
4.3.1. Bioatividade das membranas em SBF	73
4.3.2. Testes de degradação em saliva	78
Capítulo 5	83
5. Conclusões e Futuros Desenvolvimentos	85
Referências	87

Índice de Figuras

Figura 1- Esquema representativo da estrutura periodontal. Adaptado de [10].	9
Figura 2- Esquema representativo da composição óssea desde a escala macro à atômica. Adaptado de [14].	9
Figura 3- Esquema explicativo dos diferentes tipos de cicatrização da estrutura periodontal. E: Epitélio gengival; TC: Tecido conjuntivo gengival; O: Osso; C: Cimento; LP: Ligamentos Periodontais. Adaptado de [22].	12
Figura 4- Ilustração representativa da constituição a nível celular, das glândulas salivares. Adaptado de [24].	13
Figura 5- Esquema representativo da colocação de uma membrana periodontal. A:lesão periodontal; B:colocação da membrana; C:formação do coágulo; D:regeneração da estrutura periodontal. 1:oclusão de migração das células gengivais para o defeito periodontal; 2:estabilização do defeito e promoção de espaço para o crescimento de novo tecido; 3:reparação por parte das células provenientes dos tecidos periodontais preservados. Adaptado de [29].	15
Figura 6- Ligaçãõ entre os aminoácidos glicina, prolina e hydroxiprolina. Retirado de [44].	20
Figura 7- Estrutura das fibras de colagénio. Adaptado de [45].	21
Figura 8- Solubilidade de diferentes fases de fosfatos de cálcio a 37°C em função do pH em soluções aquosas. HAp: hidroxiapatite, TCP: Trifosfato de cálcio, OCP: octofosfato de cálcio DCPD: bifosfato de cálcio bihidratado (Bruxite). Retirado de [66].	27
Figura 9- Célula unitária da hidroxiapatite [70].	29
Figura 10- Liofilizador de modelo Lyph Lock 4.5 Labconco. Neste tipo de equipamento as amostras são colocadas na mesma câmara de liofilização.	35
Figura 11- Esquema representativo das fases de preparação das membranas.	36
Figura 12- Classificação IUPAC dos vários tipos de isotérmicas de adsorção de gases. Adaptado de [75].	40
Figura 13- A: Vortex do sobrenadante de saliva resultante da centrifugação. B: Medição da densidade ótica para determinação da concentração de proteínas nas diferentes salivas. C:Incubação de um pedaço de membrana numa das salivas.	45
Figura 14- A: Equipamento de eletroforese SDS-PAGE. B: Leitor de géis de eletroforese.	45
Figura 15- Difractograma referente às nanoparticulas de hidroxiapatite obtidas pelo método de precipitação.	49

Figura 16- Comparação entre o espectro de difração de raios-x da hidroxiapatite obtida por precipitação química (A) e duas hidroxiapatites comerciais (B: Captal® R da Plasma Biotal e C: Merck).	50
Figura 17- Micrografias de SEM, a diferentes ampliações, dos aglomerados de partículas de hidroxiapatite obtida pelo método de precipitação.....	51
Figura 18- Micrografias de SEM das hidroxiapatites comerciais. A: hidroxiapatite comercial da Merck. B: hidroxiapatite comercial Captal® R.	51
Figura 19- Micrografia de TEM das nanopartículas de hidroxiapatite obtidas pelo método de precipitação. A: Ampliação 20000 x, B: Ampliação 30000 x, C: Ampliação 40000 x, D: Ampliação 60000 x.	52
Figura 20- Imagens de TEM de partículas de HAp para diferentes temperaturas de síntese. A: T=35°C; B: T=85°C. Retidado de [71].....	53
Figura 21- Medições efetuadas no programa ImageJ, a= 188 nm, b= 130 nm, c= 28 nm e d= 16 nm.	53
Figura 22- Distribuição granulométrica das partículas precipitadas de hidroxiapatite.....	54
Figura 23- Distribuição granulométrica comparativa entre as partículas de hidroxiapatite obtidas por precipitação química (A) e as partículas de hidroxiapatite comerciais (B: Captal R e C: Merck).	55
Figura 24- Potencial zeta à temperatura ambiente em KCL das nanopartículas de hidroxiapatite precipitada.	56
Figura 25- Isotérmicas de adsorção/dessorção dos pós de hidroxiapatite precipitada.	57
Figura 26- Comparação entre as isotérmicas de adsorção/dessorção das hidroxiapatites comerciais (B e C) e da hidroxiapatite obtida por precipitação química (A).....	58
Figura 27- Espectro de infravermelhos com transformada de Fourier da hidroxiapatite obtida por precipitação.....	59
Figura 28- Espectro de difração de raios-x do vidro bioativo obtido neste trabalho.....	60
Figura 29- Micrografia de SEM das partículas de vidro bioativo obtidas por frita. Medidas por <i>ImageJ</i> de algumas partículas (variação entre 4.9 e 1.1 µm).....	61
Figura 30- Distribuição granulométrica das partículas de vidro obtido por frita.....	61
Figura 31- Potencial zeta a temperatura ambiente em KCL das partículas de vidro obtidas.....	62
Figura 32- Isotérmica de adsorção/dessorção das partículas de vidro.....	63
Figura 33- Espectro de infravermelhos com transformada de Fourier do vidro obtido.....	64
Figura 34- Membranas obtidas por liofilização. A: MHAp5; B: MHAp10; C: MHAp30; D: MHAp_p; E: MVB5; F: MVB10; G: MVB30; H: MVB_p; I: Mpadrão; J: Mpadrão_p; K:	

Membrana Bio-Gide®; L: Jason Membrane®; M: Vista lateral da membrana padrão sem prensagem; N: Vista lateral da membrana padrão prensada; O: Vista lateral da membrana Bio-Gide®; P: Vista lateral da Jason Membrane®;.....	66
Figura 35- Difractogramas de raios-x das membranas MVB5, MVB10, MHAp5 e MHAp10, obtidas por liofilização.....	67
Figura 36- Micrografias de SEM da membrana comercial Jason Membrane. A e B: Vista superior; C e D: Vista inferior. Ampliações (200x e 1500x).	68
Figura 37- Micrografias de SEM da membrana comercial Bio-Gide. A e B: Vista Superior; C e D: Vista inferior. Ampliações (200x e 1500x).	69
Figura 38- Micrografias de SEM das membranas sem enchimento: Mpadrão (A e B) e Mpadrão_p (C e D) a diferentes ampliações (200x e 1500x).	69
Figura 39- Micrografias de SEM das Membranas com enchimento de hidroxiapatite, membrana MHAp5 (A e B), MHAp_p (C e D) e MHAp10 (E e F). Ampliações (200x e 1500x).	70
Figura 40- Micrografias de SEM das membranas com enchimento de vidros, membrana MVB5 (A e B), MVB_p (C e D) e MVB10 (E e F). Ampliações (200x e 1500x).	71
Figura 41- EDS da membrana Padrão (Mpadrão).....	72
Figura 42- EDS das membranas compósitas. A: MHAp5; B: MVB5.....	73
Figura 43- Espectro de difração de raios-x da membrana MHAp5 após os diferentes tempos de imersão em SBF.....	74
Figura 44- Espectro de difração de raios-x da membrana MVB5 após imersão em SBF 1, 3 e 7 dias.....	75
Figura 45- Micrografias de SEM das membranas MHAp5 após imersão de 0 (A e B), 1 (C e D), 3 (E e F) e 7 (G e H) dias em SBF, a diferentes ampliações (200x e 1500x).	76
Figura 46- Micrografias de SEM das membranas MVB5 após imersão de 0 (A e B), 1 (C e D), 3 (E e F) e 7 (G e H) dias em SBF, a diferentes ampliações (200x e 1500x).....	77
Figura 47- Ensaios de incubação em saliva das várias membranas estudadas. Variação com o tempo, da percentagem de proteína presente no meio sobrenadante de cada membrana.	80
Figura 48- Perfil de degradação do colagénio analisado através de eletroforese capilar usando o sistema Experion (BioRad). L: Ladder com uma gama de pesos moleculares de 1.2 a 260 KDa. 1: colagénio utilizado para síntese das membranas. 2: colagénio de membrana após 120h de incubação em saliva.	81
Figura 49- SDS-PAGE dos sobrenadantes das membranas de colagénio após diferentes tempos.....	82

Índice de Tabelas

Tabela 1- Algumas membranas comerciais existentes atualmente no mercado. Adaptado de [31].	17
Tabela 2- Diferentes composições testadas para membranas.....	17
Tabela 3- Características do colagénio favoráveis à sua utilização em membranas periodontais. Adaptado de [30], [46].	21
Tabela 4- Fosfatos de cálcio utilizados em aplicações biomédicas e suas razões Ca/P. Adaptado de [67].	28
Tabela 5- Composição inorgânica de ossos e dentes [64].	28
Tabela 6- Quantidades e tipos de enchimento de cada membrana.....	35
Tabela 7 - Quantidades de enchimento em percentagem de peso.	36
Tabela 8- Caracterizações efetuadas às diferentes membranas.....	37
Tabela 9- Descrição de cada tipo de isotérmica de adsorção de gases, representados na figura 12.....	40
Tabela 10- Concentração iónica no plasma humano e no SBF.....	42
Tabela 11- Ordem, quantidade, fornecedor e pureza dos reagentes usados para a preparação de 1L de SBF.....	42
Tabela 12- Área superficial das hidroxiapatites comerciais (B e C) e da hidroxiapatite obtida neste trabalho (A).....	58
Tabela 13- Diferentes tipos de membranas obtidas e sua composição.....	65
Tabela 14- Valores de concentração de proteína [P] e absorvância (A ₂₆₀ ,A ₂₈₀) obtidos por leitura da densidade ótica.	78

Abreviaturas

HAp - Hidroxiapatite

HCA- Camada de hidroxiapatite carbonatada

e-PTFE- Politetrafluoretileno expandido

d-PTFE- Politetrafluoretileno de alta densidade

PLA- Ácido poliláctico

Ti-e-PTFE- Politetrafluoretileno expandido reforçado com titânio

PGA- Ácido poliglicólico

PCL- Policaprolactona

MMP – Metaloproteinase de Matriz

CaP - Fosfato de Cálcio

rpm - Rotações por minuto

u.a. - Unidades arbitrárias

BET - Brunauer, Emmet e Teller

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

DRX - Difração de raio-X

SEM - Microscopia eletrónica de varrimento (do inglês scanning electron microscopy)

EDS - Espectroscopia de dispersão de energia (do inglês electron diffraction scattering)

SBF – Fluido fisiológico simulado (do inglês Simulated body fluid)

FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

1. Introdução/Enquadramento

Grandes lesões dos tecidos resultantes de traumas ou doenças degenerativas conduzem geralmente à perda dessas estruturas levando a um decréscimo da qualidade de vida. A procura de metodologias para regenerar ou substituir os tecidos danificados tornou-se assim cada vez mais premente [1].

A engenharia de tecidos desenvolve substitutos biológicos capazes de restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos, sendo por isso uma área multidisciplinar que integra vários campos, tais como, medicina, química, física, engenharia e biologia [2].

O periodonto é um conjunto de estruturas que têm como principal função o suporte e nutrição do dente. Existem diversos fatores que podem comprometer estas estruturas, entre os quais, traumas ou doenças tais como, neoplasias, osteomielite e periodontite.

A periodontite é uma doença inflamatória provocada por acumulação de biofilme bacteriano e estima-se que afete cerca de 90 % da população mundial. A consequência mais nefasta é a destruição dos tecidos periodontais responsáveis por fornecer suporte aos dentes na cavidade oral [3], [4].

A regeneração guiada de tecidos, aplicada no tratamento de lesões na cavidade oral, como as provocadas pela periodontite, assenta no pressuposto de que o ligamento periodontal é o tecido que contém as células progenitoras necessárias para a formação de novo osso alveolar, cemento radicular e ligamento periodontal [5].

Neste contexto, surgem as membranas de regeneração para tratamento de defeitos ósseos na cavidade bucal, cuja principal função é servir de barreira entre os tecidos moles e o tecido ósseo, impedindo a migração das células dos tecidos epitelial e conjuntivo gengival (que possuem um crescimento mais rápido) e permitindo a proliferação e crescimento de células que provenham dos ligamentos periodontais e favoreçam a regeneração óssea (que é um processo mais lento) [6].

Existem no mercado vários tipos de membranas para regeneração mas continuam a ser implementadas novas estratégias para ajudar a regeneração periodontal e investigadas soluções alternativas de engenharia de materiais que contribuam para melhorar as existentes.

1.1. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção e caracterização de membranas compósitas de colagénio com enchimentos de fosfatos de cálcio bioativos, para regeneração dos tecidos em aplicações dentárias. Para tal, foram obtidas partículas de hidroxiapatite pelo método de precipitação química e partículas de um vidro bioativo, com a composição molar 25,43% SiO₂ : 32,68% CaO : 10,89% P₂O₅ : 31,00% MgO, usando o método de fusão e vazamento.

Estes materiais foram introduzidos como enchimentos, em diferentes percentagens, nas membranas de colagénio sendo os compósitos obtidos por liofilização.

O estudo centrou-se na influência da percentagem e tipo de enchimento nas características estruturais e de degradação das membranas. Foram efetuados testes *in vitro* de bioatividade em SBF e de degradação em saliva humana.

1.2. Estrutura da tese

Este trabalho está dividido em 5 capítulos. No capítulo 1 apresenta-se o tema, objetivos e estrutura da tese. No capítulo 2 é feita a revisão da literatura. O capítulo 3 contém a descrição detalhada de todo o procedimento experimental, bem como de todas as técnicas de caracterização dos materiais preparados. O capítulo 4 contempla os resultados de caracterização obtidos para os diferentes materiais, bem como a sua análise e discussão. Por fim no capítulo 5 encontram-se as conclusões finais retiradas da interpretação dos resultados obtidos, assim como sugestões de trabalho a desenvolver no futuro.

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1. Estrutura periodontal

A cavidade oral é definida como a primeira parte do trato digestivo, na qual se inicia o processo de digestão através da mastigação. Os lábios, as bochechas e o palato formam os limites da cavidade oral. Nela estão os dentes e a língua, que recebe as secreções das glândulas salivares [7].

O dente pode ser dividido em dois segmentos a coroa e a raiz; a coroa é a porção que se projeta para dentro da cavidade oral e é protegida por uma camada de esmalte altamente mineralizado que a recobre. O interior do dente é constituído por dentina, um tecido mineralizado que tem uma composição química semelhante à do osso. A dentina tem uma cavidade onde se encontra a polpa dentária que consiste num tecido de sustentação especializado contendo fibras nervosas sensoriais. A raiz do dente fica incluída numa crista óssea da mandíbula chamada crista alveolar [8].

A estrutura periodontal é constituída essencialmente por quatro componentes, como esquematicamente representado na figura 1 [9], [10]:

- Ligamentos periodontais;
- Cimento;
- Gengiva;
- Osso alveolar.

Os ligamentos periodontais são constituídos por fibras de tecido conectivo (fibras de Sharpey), responsáveis por ligar o dente ao alvéolo ósseo, são altamente vascularizados e constituídos maioritariamente por colagénio do tipo I. Os ligamentos periodontais promovem a nutrição das células do ligamento e das células circunjacentes do cimento e osso alveolar.

O cimento é um tecido conjuntivo calcificado, não vascularizado que reveste a raiz do dente e a sua principal função é proporcionar um local de ligação para os ligamentos periodontais.

A mucosa oral que cobre a parte superior da crista alveolar é chamada gengiva.

A matriz do osso é constituída por 65% de minerais e 35% de proteínas. A fase mineral é constituída por uma mistura de fosfatos de cálcio, predominantemente hidroxiapatite (HAp). A fase orgânica consiste em 90% de fibras de colagénio do tipo I e os restantes 10% são compostos por vários proteoglicanos e outras proteínas [11]. Na

figura 2 encontra-se um esquema representativo da constituição da matriz óssea desde o nível macro passando pelo microscópico até ao nível atómico.

O osso alveolar difere dos demais ossos por ter origem ectomesenquimal (forma-se a partir de células que migram da crista neural), sofrer intensa remodelação durante o processo eruptivo e estar sob a ação constante de forças mastigatórias. Esta permanente reorganização do tecido ósseo é levada a cabo por diversas células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), que assumem várias formas e funções [12].

Os osteoblastos são as células responsáveis por sintetizar a parte orgânica da matriz óssea (osteóide), ou seja, colagénio, proteoglicanos e glicoproteínas. São capazes de armazenar fosfatos de cálcio levando à mineralização da matriz. Quando estes ficam aprisionados na matriz óssea recém-formada denominam-se osteócitos e ajudam na nutrição do osso.

Os osteoclastos são células fagocitárias capazes de erodir o osso e são de extrema importância juntamente com os osteoblastos no processo de remodelação constante.

Os osteoblastos e os osteócitos derivam de uma célula mesenquimal primitiva chamada célula osteoprogenitora. Os osteoclastos são células fagocitárias multinucleadas derivadas da linhagem celular dos macrófagos monócitos [8].

A um nível macroscópico o osso alveolar possui uma porção interna composta por osso esponjoso ou trabecular, assim denominado por apresentar amplos espaços formados por diversas trabéculas, conferindo ao osso, um aspeto poroso. Possui ainda uma porção externa - osso compacto - que reveste o alvéolo dentário com uma grande dureza e elevada densidade. Organiza-se em forma de finas lâminas concêntricas alinhadas na direção longitudinal do osso, que fazem parte dos denominados sistemas haversianos (ou *osteons*) [13], [14].

As estruturas que formam o periodonto servem de suporte e nutrição para o dente [10].

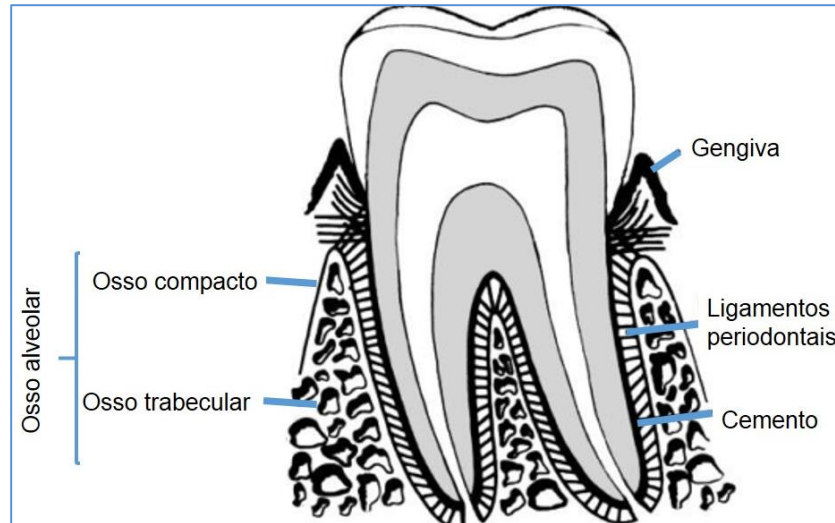


Figura 1- Esquema representativo da estrutura periodontal. Adaptado de [10].

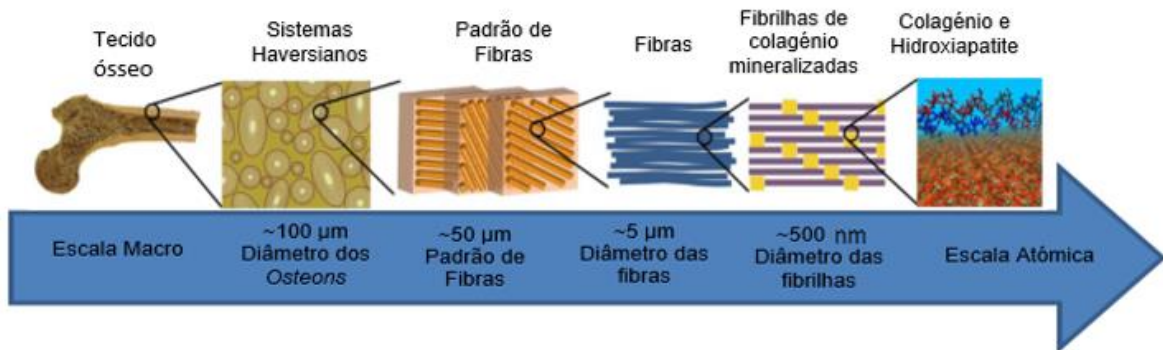


Figura 2- Esquema representativo da composição óssea desde a escala macro à atômica. Adaptado de [14].

2.1.1. Fatores que afetam a estrutura periodontal

Diversos acontecimentos podem levar à perda ou dano das estruturas que suportam o dente, entre os quais, traumas, doenças metabólicas, neoplasia ou processos inflamatórios, tais como, a osteomielite e a periodontite.

A periodontite é uma doença inflamatória do tecido periodontal, causada por microrganismos e acumulação de biofilme bacteriano, o que leva à degradação dos tecidos conectivos e do osso alveolar. É a maior causa de perda de dentes em adultos humanos [3], [4].

Segundo o *National Institute of Dental and Craniofacial Research* os principais fatores potenciadores do desenvolvimento de doença periodontal são: o tabagismo, as

alterações hormonais, doenças como diabetes, certos tipos de medicações e ainda fatores genéticos [15].

A osteomielite engloba um amplo grupo de doenças infecciosas, caracterizadas por infecção bacteriana ou fúngica do osso e / ou medula óssea [16].

A estrutura periodontal também é afetada com a extração de dentes. Com o passar do tempo o osso que suportava o dente (osso alveolar) vai sendo reabsorvido, como consequência da perda de estimulação do osso pelas forças exercidas no dente.

2.1.2. Cicatrização periodontal

Um dos desafios na regeneração do tecido periodontal é a reposição da ligação entre os ligamentos periodontais, as fibras gengivais de colagénio, o cemento e osso alveolar [10].

A cicatrização de feridas em locais não orais é um processo bastante estudado. Após a ocorrência de uma lesão existem danos capilares e consequente hemorragia levando à formação de um coágulo. Este é responsável por proteger temporariamente os tecidos desnudados e servir de matriz provisória para a migração celular. Após a formação do coágulo ocorre uma resposta inflamatória e o coágulo é preenchido por células, maioritariamente neutrófilos e monócitos que são responsáveis por limpar a ferida de bactérias e tecidos necrosados por fagocitose. De seguida ocorre a migração de macrófagos para o local, onde exercem a sua atividade fagocitária mas também têm um papel importante na formação de tecido de granulação, pois segregam citocinas e fatores de crescimento que estão envolvidos na proliferação e migração de fibroblastos e células endoteliais. Os fibroblastos produzem uma matriz de colagénio e as células endoteliais, responsáveis pela angiogénese, migram para a matriz formando uma barreira protetora estruturalmente semelhante ao epitélio original. Finalmente, a maturação da matriz tecidual da ferida é observada juntamente com a contração do coágulo [9], [17].

A cicatrização de lesões nas estruturas periodontais é um processo mais complexo do que aquele que ocorre em outros tecidos do corpo. No processo cicatricial do periodonto, estão envolvidos, tecidos rígidos mineralizados como o osso e o dente e tecidos moles conectivos como os ligamentos periodontais e a gengiva. Assim, para que o processo de cicatrização seja satisfatório, deve ocorrer a interação e regeneração sincronizada de tecidos moles e mineralizados. A cicatrização destas estruturas e todo o processo cicatricial ocorrem num ambiente contaminado, a cavidade oral [17].

Em periodontologia podem distinguir-se dois tipos de cicatrização: regeneração e reparação. O termo regeneração refere-se à restauração completa de todos os tecidos lesados, ou seja, ocorre formação de novo cimento, novo osso alveolar e novo ligamento periodontal. Em comparação, reparação é definido como uma regeneração incompleta. Neste caso, os tecidos danificados são substituídos por tecidos cuja função não é a do tecido original [18]–[20].

Na cicatrização periodontal estão envolvidos quatro tipos de células: do epitélio gengival, do tecido conjuntivo gengival, do tecido ósseo e do ligamento periodontal.

O tipo de cicatrização que ocorre na estrutura periodontal é definido pelas células que invadem a área lesada. Se a área for repovoada por células epiteliais gengivais, ocorre a formação do chamado epitélio juncional longo. Se as células a proliferar forem as do tecido conjuntivo gengival, ocorre uma adesão conjuntiva podendo também ocorrer reabsorção radicular (redução do comprimento da raiz do dente). Quando as células do tecido ósseo migram para o local, pode ocorrer reabsorção mas também anquilose (fusão óssea). Para que ocorra regeneração, a lesão deve ser invadida por células dos ligamentos periodontais [19], [21], [22]. Na figura 3 encontra-se um esquema representativo dos diferentes tipos de cicatrização do periodonto.

Os eventos associados à regeneração do periodonto são bastante complexos. Embora tenham sido estudados vários procedimentos de regeneração, ainda não foi encontrado nenhum capaz de favorecer a formação de novo cimento, remodelar as fibras periodontais e formar novo osso [10].

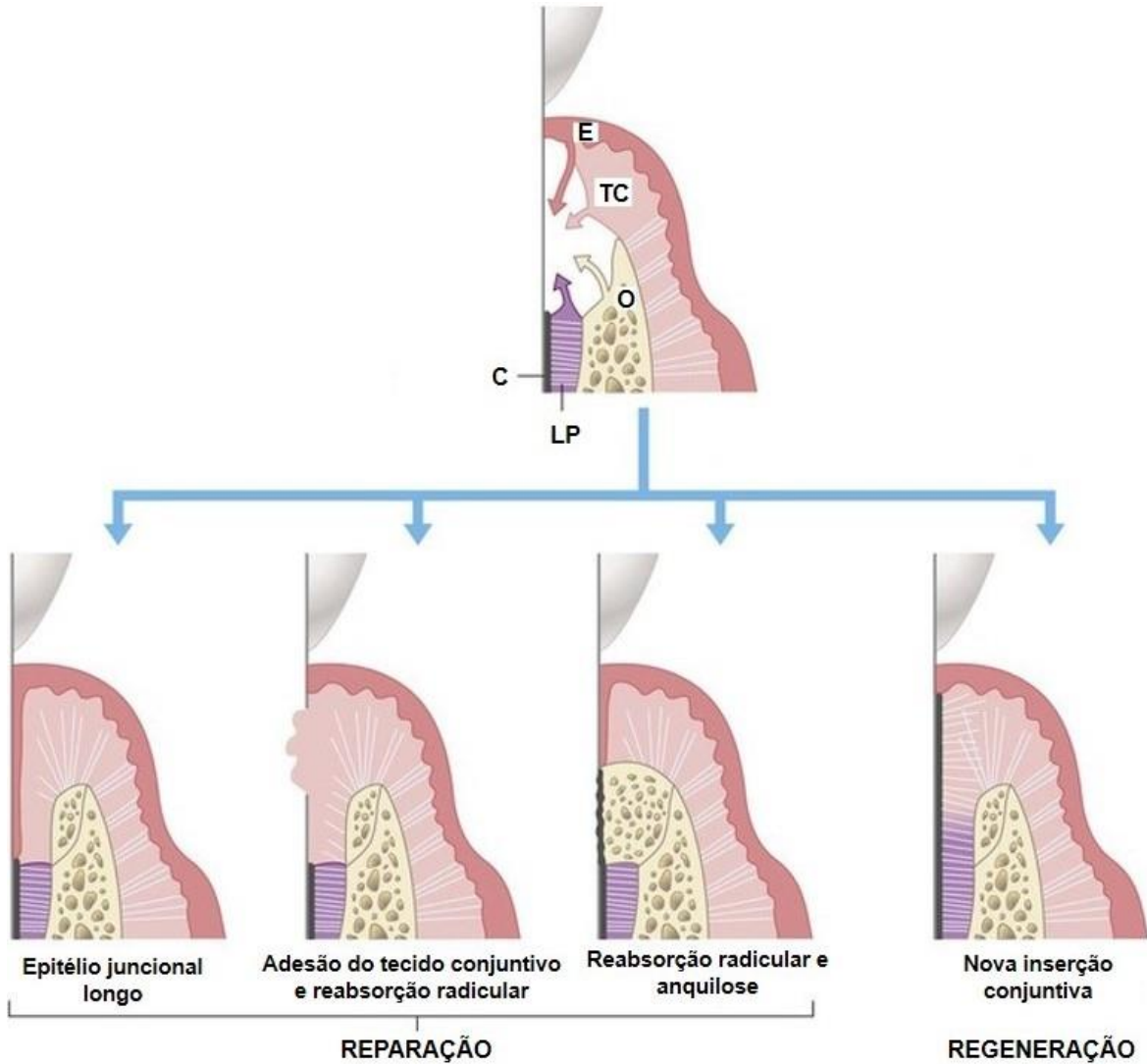


Figura 3- Esquema explicativo dos diferentes tipos de cicatrização da estrutura periodontal. E: Epitélio gengival; TC: Tecido conjuntivo gengival; O: Osso; C: Cimento; LP: Ligamentos Periodontais. Adaptado de [22].

2.2. Saliva: Composição e funções

A saliva é um fluido biológico transparente, ligeiramente ácido com um pH entre 6 e 7, composto por secreções provenientes das glândulas salivares maiores como a parótida, submandibular e sublingual e de glândulas salivares menores como as labiais, bucais, linguais e palatais [23].

Por norma, as glândulas salivares humanas produzem cerca de 1 a 1,5 L de saliva por dia. As células presentes nas glândulas salivares são as células acinares, células do ducto e células mioepiteliais.

As células acinares produzem três tipos de secreções: serosas que são segregadas pelas glândulas parótidas; mucosas, segregadas pelas glândulas menores e mistas (serosa + mucosa), libertadas pelas glândulas sublingual e submandibular [23], [24].

As células do ducto, como o próprio nome indica, encontram-se no ducto e são responsáveis por conduzir as secreções para o exterior. Dentro desta categoria ainda podem ser classificadas em, intercaladas, estriadas e excretoras:

- Intercaladas: são as primeiras do ducto e conectam as secreções acinares à glândula. Não estão envolvidas na modificação dos eletrólitos das secreções.
- Estriadas: são as segundas do ducto e são responsáveis por regular os eletrólitos por reabsorção de sódio.
- Excretoras: são a última porção do ducto por onde a saliva passa antes de atingir a cavidade oral [23], [24].

As células mioepiteliais são responsáveis pela contração das células acinares, de modo a que estas possam excretar as secreções [23], [24].

Na figura 4 é representado um esquema com as diferentes células que constituem as glândulas salivares.

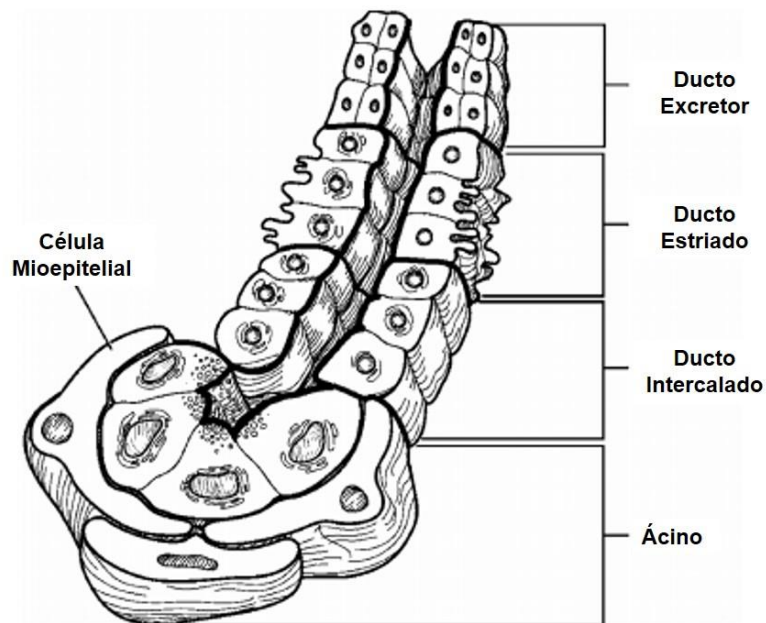


Figura 4- Ilustração representativa da constituição a nível celular, das glândulas salivares. Adaptado de [24].

A saliva é então um fluido exócrino que consiste em aproximadamente 99% de água, contendo uma grande variedade de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, cloro, magnésio, bicarbonato, fosfatos) e imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas e produtos nitrogenados como a ureia e a amônia.

O bicarbonato, fosfato e a ureia atuam como reguladores do pH propiciando à saliva a capacidade de funcionar como tampão.

As mucinas constituem o principal grupo de proteínas da saliva, representando cerca de 45% da quantidade total de proteínas na saliva, desempenhando um importante papel na proteção da cavidade oral.

Os fosfatos de cálcio e proteínas contribuem em simultâneo como fatores moduladores da desmineralização e remineralização.

As imunoglobulinas, proteínas e enzimas providenciam a ação antibacteriana na cavidade bucal [23], [25].

As principais funções da saliva são:

Proteção e lubrificação: forma uma camada seromucosa que recobre os tecidos da cavidade oral protegendo-os contra agentes nocivos.

Diluição e limpeza: favorece a eliminação e diluição de restos de alimentos, limitando a quantidade disponível para os microrganismos formadores de biofilme.

Capacidade de atuar como tampão: Os tampões da saliva neutralizam os ácidos produzidos por microrganismos acidogêneos prevenindo a desmineralização.

Proteção do esmalte: a estabilidade da hidroxiapatite presente no esmalte é conseguida através da presença de cálcio, fósforo e flúor, bem como pelo pH da saliva.

Digestão: é responsável pela digestão do amido, formando o bolo alimentar. Esta ação ocorre maioritariamente devido à enzima α -amilase presente na composição da saliva.

Ação antibacteriana: na saliva encontram-se várias proteínas imunológicas e não imunológicas que possuem capacidades antibacterianas [23], [25], [26].

2.3. Membranas periodontais

O tratamento de defeitos provocados por cirurgias ou por patologias como a periodontite e a osteomielite recorre à utilização de membranas periodontais que têm como finalidade impedir a migração imediata do epitélio para a ferida, permitindo assim que as células progenitoras remanescentes localizadas no ligamento periodontal, osso alveolar adjacente ou sangue povoem a região afetada, criando as condições

necessárias para a total regeneração da estrutura periodontal, com formação de novo osso, ligamentos periodontais e cimento [27].

Para garantir o sucesso deste tipo de membranas é necessário que estas reúnam um conjunto de características, entre as quais [27], [28]:

- Biocompatibilidade;
- Degradação controlada;
- Propriedades mecânicas e físicas apropriadas;
- Resistência suficiente para não colapsar e servir de barreira;
- Capacidade de oclusão de células;
- Integração pelo tecido hospedeiro;
- Facilidade de manuseamento e aplicação.

Na figura 5, encontra-se um esquema representativo da atuação das membranas periodontais ideais no tratamento de uma periodontite.

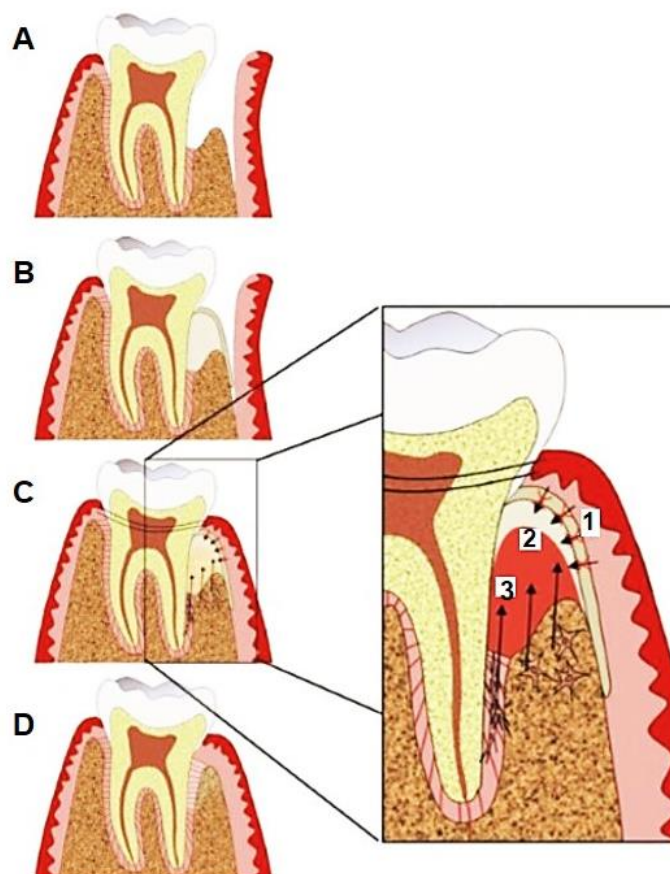


Figura 5- Esquema representativo da colocação de uma membrana periodontal. A:lesão periodontal; B:colocação da membrana; C:formação do coágulo; D:regeneração da estrutura periodontal. 1:oclusão de migração das células gengivais para o defeito periodontal; 2:estabilização do defeito e promoção de espaço para o crescimento de novo tecido; 3:reparação por parte das células provenientes dos tecidos periodontais preservados. Adaptado de [29].

2.3.1. Membranas comerciais

Atualmente existem no mercado diferentes tipos de membranas para dentária, podendo ser não reabsorvíveis ou reabsorvíveis. As membranas reabsorvíveis, devem degradar-se a uma taxa semelhante à de formação de novo tecido periodontal e podem conter materiais naturais ou sintéticos [30]. Dentro das membranas não reabsorvíveis encontram-se as redes e folhas de titânio (*Ti-mesh*), as membranas de politetrafluoroetileno de alta densidade (d-PTFE), expandido (e-PTFE) e expandido reforçado com titânio (Ti-e-PTFE) [31]. Estas membranas mantêm facilmente a sua forma sem colapsar, mas, requerem uma segunda cirurgia para remoção, o que causa maior desconforto para o paciente e maior duração do tratamento [30].

As membranas reabsorvíveis constituídas por materiais naturais contêm principalmente colagénio do tipo I bovino ou tipo I e III de origem porcina, existindo também membranas desenvolvidas a partir de plasma rico em fatores de crescimento provenientes de sangue do próprio paciente [31].

Nas membranas reabsorvíveis sintéticas, alguns dos materiais que têm vindo a ser utilizados são, o ácido poliláctico (PLA), o ácido poliglicólico (PGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e seus copolímeros [27].

A grande vantagem da utilização de membranas reabsorvíveis é não ser necessário efetuar uma segunda cirurgia para remover a membrana, uma vez que esta é absorvida pelo organismo, evitando assim maior custo, desconforto e risco para o paciente. Contudo, estas membranas apresentam como desvantagem o facto de terem propriedades mecânicas mais baixas e não permitirem prever a taxa de degradação e tempo de reabsorção. As membranas reabsorvíveis de PLA e PGA têm caído em desuso, uma vez que provocam resposta inflamatória. As membranas atualmente mais utilizadas são as compostas por colagénio [31]. Na tabela 1 apresentam-se exemplos de membranas comerciais existentes no mercado.

Tabela 1- Algumas membranas comerciais existentes atualmente no mercado. Adaptado de [31].

Material	Nome comercial	Fabricante
Titânio	Frios BoneShields®	Dentsply, Friadent, Germany
Ti-e-PTFE	Gore-Tex-TI®	W.L.Gore & Associates, Inc. USA
e-PTFE	Gore-Tex®	W.L.Gore & Associates, Inc. USA
d-PTFE	TefGen FD®	Lifecore Biomedical, Inc., USA
PLA	EpiGuide®	Kensey Nash Corporation USA
PLGA	Biofix®	Bioscience, Oy, USA
PLCL (<i>DL-lactide-ε-caprolactone</i>)	Vivosorb®	Polyganics B.V, NL
Colagénio tipo I bovino	Bio-mend®	Zimmer, USA
Colagénio tipo I e III porcino	Bio-Gide®	Osteohealth Company, SUI
Plasma rico em fatores de crescimento	PRGF-Endoret®	BTI, Biotechnology Institute, Vitoria, Spain

2.3.2. Soluções em investigação

Uma vez que as membranas disponíveis no mercado ainda apresentam algumas limitações, diversos estudos têm vindo a ser realizados de modo a melhorar as suas propriedades e desempenho.

Têm vindo a ser utilizados principalmente materiais naturais como, colagénio e quitosano, entre outros.

As membranas compósitas são uma grande aposta para este tipo de aplicações e são várias as combinações já criadas. A tabela 2 mostra alguns exemplos das diferentes combinações de materiais que têm vindo a ser desenvolvidas.

Tabela 2- Diferentes composições testadas para membranas.

Membrana	Referência
Quitosano/Trifosfato de cálcio	[32]
Policaprolactona/Carbonato de cálcio	[33]
Poli-e-caprolactona/Sílica	[34]
Ácido poli-DL-láctico/Bioglass®	[35]
Ácido poliláctico-co-glicólico /Fosfato de cálcio	[36]
Ácido poliláctico/beta trifosfato de cálcio	[37]
Quitosano/hidroxiapatite	[38]
Nano-hidroxiapatite/policaprolactona	[39]
Hidroxiapatite nano carbonatada/ Colagénio/ácido polilactico-co-glicólico	[40]
Policaprolactona/colagénio/nano-hidroxiapatite	[41]
Colagénio/sílica	[42]

O quitosano é um material biocompatível e biodegradável, é um polissacarídeo proveniente da desacetilação da quitina, podendo esta ser encontrada no exosqueleto de crustáceos. Por ser um material facilmente encontrado na natureza, torna-se de fácil

obtenção, pelo que tem como principais vantagens o seu baixo custo e abundância. O quitosano altamente desacetilado exibe uma baixa taxa de degradação em meio aquoso e, por isso, é capaz de manter a sua função de barreira durante um período de tempo suficiente para reparação dos tecidos periodontais (4- 6 semanas) [32], [38].

Têm vindo a ser desenvolvidas membranas contendo quitosano e fosfatos de cálcio (hidroxiapatite e trifosfato de cálcio), reportando-se na literatura [38] que a adição de hidroxiapatite nas estruturas de quitosano melhora a sua biocompatibilidade, promovendo a adesão, proliferação e osteodiferenciação de células mesenquimais.

A policaprolactona (PCL) é um polímero amplamente utilizado para aplicações biomédicas devido à sua boa resistência mecânica, flexibilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Este material tem ainda a vantagem de ser facilmente processado na forma de fibras através de eletrofiação, o que permite a fabricação de membranas que promovem uma melhor integração celular. Existem algumas limitações associadas ao uso de PCL na forma de fibras em aplicações para regeneração óssea, devido à sua baixa rigidez, natureza hidrofóbica e baixa bioatividade. A adição de compostos inorgânicos, nomeadamente de fosfatos de cálcio, é uma das formas de ultrapassar estas limitações [33], [34], [39].

Estudos realizados por M.C. Phipps et al. [41] demonstraram que das membranas por eles obtidas através de eletrofiação, a que apresentou melhores condições para adesão celular foi a membrana contendo três camadas distintas PCL/colagénio/Hidroxiapatite comparativamente com as membranas constituídas apenas por colagénio, PCL ou PCL/Hidroxiapatite.

A biodegradação de materiais como o ácido poliláctico (PLA) e ácido poliglicólico (PGA) ocorre devido à quebra das cadeias poliméricas por hidrólise, libertando para o meio, ácido láctico e ácido glicólico. Estes compostos são metabolitos naturais do corpo que são eliminados pelo ciclo de Krebs como dióxido de carbono e água. A maioria dos estudos comparando as membranas de origem sintética com as membranas de colagénio mostram que as membranas de origem sintética possuem melhores desempenhos, mas por outro lado, os produtos de degradação destas membranas de origem sintéticas estão associados a resposta inflamatória [29]. Apesar deste inconveniente, o uso de ácido poliláctico (PLA) tem vindo a ser amplamente estudado para a criação destas membranas. As principais características que tornam este material atrativo para este tipo de aplicação são: elevados tempos de degradação (12-16 meses), boa biocompatibilidade e elevada estabilidade mecânica. Leal et al. [35] produziram uma membrana de ácido poli-DL-láctico/Bioglass®, com duas camadas, uma camada superior

contendo apenas ácido poliláctico e uma inferior contendo partículas de Bioglass®. As membranas foram produzidas por evaporação de solvente (*solvent casting*) e a incorporação de partículas de Bioglass® providenciou uma melhoria nas propriedades mecânicas e de osteoindução. Para além disso verificou-se uma boa proliferação e diferenciação celular em estudos com células de ligamentos periodontais e células da medula óssea humana [29].

S.Liao et al. [40] obtiveram uma membrana compósita de três camadas, hidroxiapatite/colagénio/ácido polilactico-co-glicólico, também pelo método de *solvent casting*. Esta membrana mostrou resultados melhores em termos de proliferação de células osteoblásticas, quando comparada com uma membrana constituída apenas por ácido polilactico-co-glicólico.

Membranas compósitas de colagénio/sílica xerogel, obtidas pela mistura de uma solução de colagénio com sílica xerogel e liofilização com posterior prensagem, mostraram, através de estudos *in vivo* em animais, que as membranas compósitas possuíam melhores capacidades de regeneração óssea [42].

2.4. Colagénio

O colagénio é o principal tipo de fibra encontrado na maioria dos tecidos de sustentação e é a proteína mais abundante do corpo humano. Existem pelo menos 19 tipos diferentes de colagénio identificados com base na sua estrutura, composição de aminoácidos e propriedades físicas [8].

O colagénio do tipo I é encontrado nos tecidos de sustentação fibrosos, na derme, nos tendões, nos ligamentos e nos ossos, num arranjo variável de acordo com a sustentação mecânica necessária [8].

A estrutura fundamental do colagénio de tipo I é uma longa e fina tripla hélice, (300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro) consistindo em duas cadeias α_1 e uma cadeia α_2 polipeptídicas (estrutura secundária). Cada cadeia polipeptídica é formada por vários aminoácidos (estrutura primária) em que a sequência glicina-prolina-hidroxiprolina se repete numa frequência determinada. As ligações entre estes aminoácidos estão representadas na figura 6. As moléculas (tripla hélice, estrutura terciária) associam-se formando as fibrilhas de colagénio que, por sua vez, se agregam em feixes maiores formando as fibras de colagénio (2 a 10 μm de diâmetro) (estrutura quaternária), como representado esquematicamente na figura 7 [43].

O colagénio do tipo I é o maior componente da matriz extracelular e, por isso, a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade, fazem dele um material seguro para uso em diversas aplicações biomédicas.

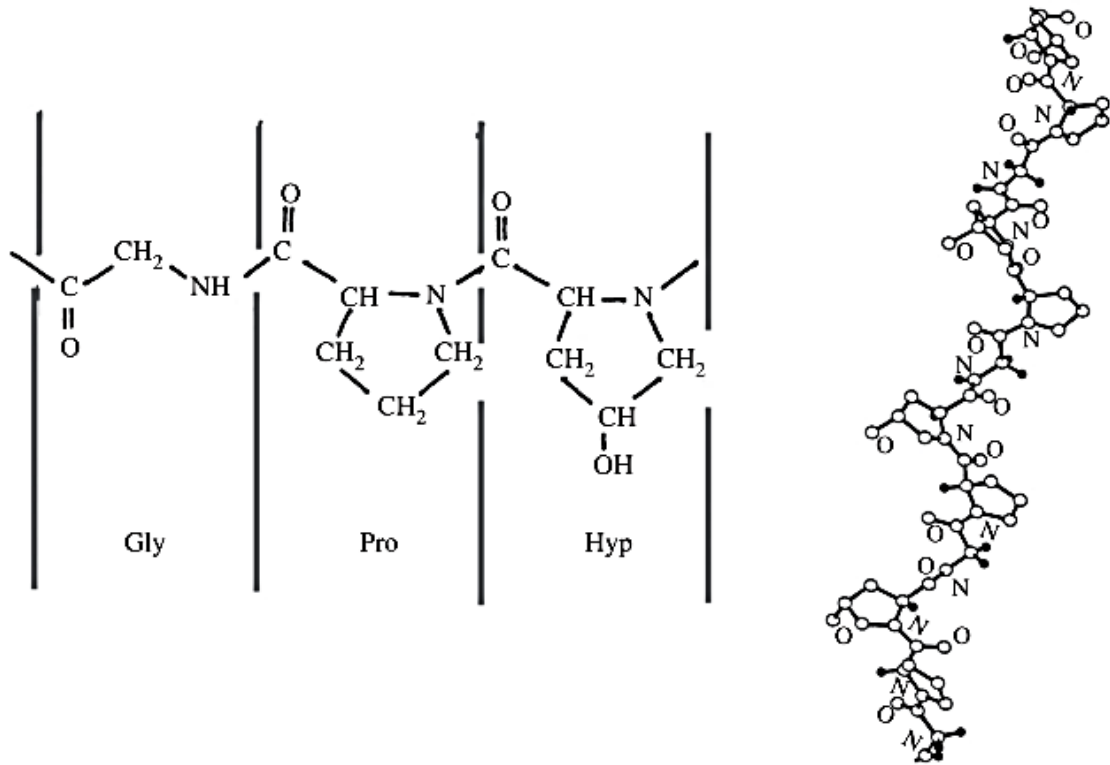


Figura 6- Ligação entre os aminoácidos glicina, prolina e hydroxiprolina. Retirado de [44].

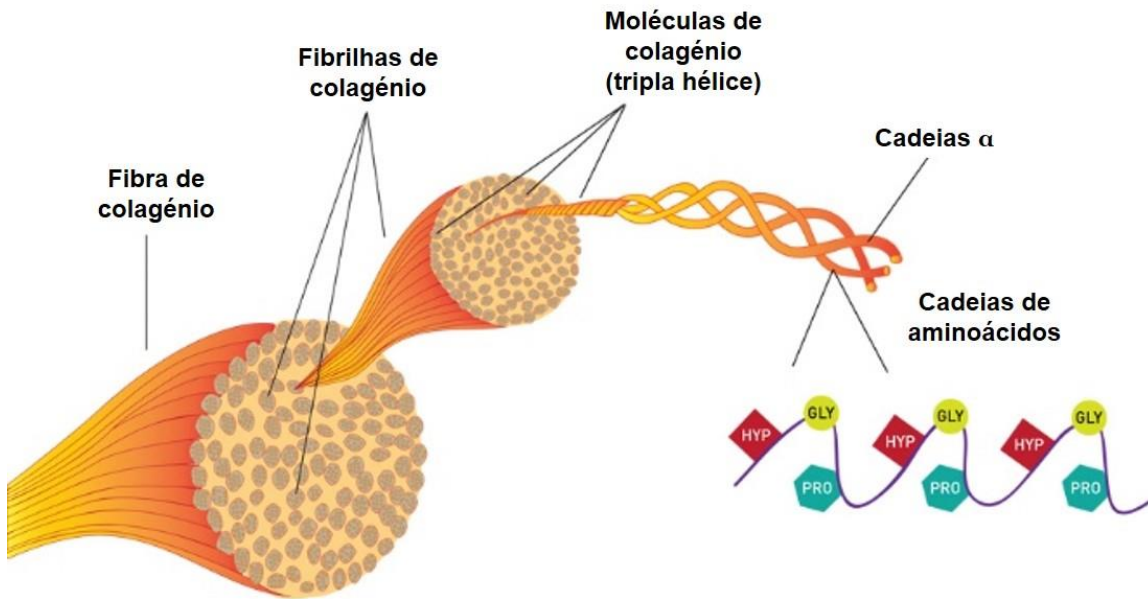


Figura 7- Estrutura das fibras de colagénio. Adaptado de [45].

Uma vez que a estrutura periodontal tem o colagénio como um dos constituintes ele é amplamente utilizado em membranas dentárias. As principais características do colagénio que justificam a sua utilização em membranas periodontais são resumidas na tabela 3.

Tabela 3- Características do colagénio favoráveis à sua utilização em membranas periodontais. Adaptado de [30], [46].

Biocompatível
É um material natural e bem tolerado pelo tecido hospedeiro.
Absorvível
É absorvido completamente, proporcionando um <i>scaffold</i> (suporte) para reparação do tecido lesado.
Função quimiotática
Favorece a migração de células do tecido hospedeiro e a sua ligação, facilitando assim a cicatrização primária o que reduz a probabilidade de exposição e potencial contaminação da membrana. É capaz de atrair e ativar os ligamentos periodontais e as células gengivais (fibroblastos).
Agente hemostático
Facilita a formação de coágulo e estabilização da lesão.
Semipermeável
Permite trocas gasosas e de nutrientes.
Antigenicidade e imunogenicidade
São baixas, o que diminui a possibilidade de rejeição da membrana pelo organismo.

O colagénio pode ser obtido a partir de pele e tendões de animais, o que pode acarretar o risco de transmissão de doenças para humanos, bem como levantar questões de ordem ética e cultural.

Após isolamento e purificação por meio de preparação enzimática ou extração química o colagénio é posteriormente processado de várias formas. A reticulação (*cross-linking*) é um passo importante para retardar a absorção e aumentar a resistência mecânica do colagénio. O reagente químico mais utilizado como agente de reticulação é o glutaraldeído [47], [48]. As reações envolvidas durante a reticulação das proteínas com o glutaraldeído têm vindo a ser amplamente estudadas, mas, o mecanismo destas é muito complexo e continua ainda sem ser totalmente compreendido. De um modo geral, o glutaraldeído reage com os grupos amina das cadeias laterais das moléculas de colagénio, formando uma rede no material, facultando estabilidade mecânica e biológica, reduzindo a absorção de água com conseqüente diminuição da solubilidade. Contudo, uma desvantagem relacionada com o uso do glutaraldeído como agente de reticulação é a sua citotoxicidade, pelo que é necessário garantir que o produto final não contém vestígios deste composto [47], [48].

Dependendo do seu tipo, estrutura, grau de reticulação e tratamento químico, o colagénio tem diferentes efeitos na restauração de tecidos. A maior desvantagem no uso de colagénio em membranas é a sua rápida biodegradação pela atividade enzimática dos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, bem como por vários agentes patogénicos periodontais, tais como o *porphyromonas gengivalis*, capazes de produzir colagenases, que são enzimas capazes de degradar a região helicoidal do colagénio em pequenos fragmentos. A enzima colagenase inicia a reabsorção do colagénio em locais específicos, provocando a desnaturação do colagénio que se transforma em gelatina, posteriormente degradada para aminoácidos por gelatinases e outras enzimas. Em conseqüência verifica-se diminuição da resistência mecânica e posterior colapso da membrana, permitindo a invasão de células indesejadas no defeito ósseo [30], [47], [49].

Degradação do colagénio por ação das metaloproteinases de matriz

A saliva humana, tal como referido anteriormente, é um fluido extremamente complexo que provém maioritariamente das glândulas salivares, mas também contém quantidades significativas de componentes não exócrinos tais como, fluído gengival (exsudato inflamatório que pode ser recolhido na margem gengival ou no sulco gengival), microrganismos, células epiteliais provenientes da descamação dos tecidos e proteases bacterianas [23].

O estabelecimento e progresso da doença periodontal envolve quebra do colagénio e de outras proteínas da matriz por proteases libertadas por leucócitos e células dos tecidos, como por exemplo colagenases, metaloproteinases de matriz (MMPs) e hialuronidases, bem como outras enzimas provenientes de bactérias como as produzidas por *Porphyromonas gingivalis* [50].

As metaloproteinases de matriz são um grupo de enzimas dependentes de zinco e cálcio, com capacidade de degradar vários componentes da matriz extracelular, principalmente colagénio, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos. As metaloproteinases são provenientes predominantemente de leucócitos polimorfonucleares. As MMPs com capacidade de degradar o colagénio são as colagenases (MMP -1, -8, e -13) e as gelatinases (MMP -2 e -9)[51].

A expressão e atividade das MMPs nos tecidos adultos é relativamente baixa, mas pode aumentar significativamente em várias condições patológicas podendo levar à destruição dos tecidos [51]. O aumento na concentração de colagenases MMP-8 e gelatinases MMP-9, bem como o aumento da atividade enzimática das MMP-2 e elastase estão relacionadas com o aumento da inflamação periodontal [50]. Reporta-se na literatura [52] que pacientes com casos graves de periodontite apresentaram níveis superiores de MMP-8 na saliva e no fluído gengival, quando comparados com pacientes saudáveis.

De um modo geral, as colagenases dos mamíferos como a MMP-1,-8 e -13 cortam o colagénio num único local, resultando na formação de dois fragmentos distintos. Pelo contrário, as proteases colagenolíticas bacterianas atacam o colagénio em vários locais, produzindo muitos fragmentos de pequenos péptidos [51].

2.5. Materiais Bioativos

Os materiais bioativos incluem fundamentalmente, vidros bioativos, materiais vitro-cerâmicos, vários fosfatos de cálcio e seus compósitos.

Quando um material bioativo é implantado no corpo, ocorre na interface tecido-implante uma série de reações biofísicas e bioquímicas que levam a uma forte ligação com o tecido hospedeiro, denominada fixação bioativa [53].

O conceito de material bioativo foi introduzido por Larry Hench em 1969 aquando da sua descoberta de vidros bioativos. Os vidros desenvolvidos por ele evidenciaram uma ligação física e química forte com o osso. A bioatividade foi então definida, como a capacidade de um material formar na sua superfície uma camada de hidroxiapatite carbonatada (HCA) que promove uma interface de ligação forte com os tecidos vivos pelo facto de ser química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso. [54]–[56]. Embora a bioatividade tenha sido definida para situações de implantes ósseos, o conceito pode estender-se a outros tipos de tecidos.

Uma das formas de testar *in vitro* a bioatividade de um material baseia-se na avaliação da capacidade de formação da camada de HCA na superfície do material, quando introduzido numa solução que simula o fluído corporal, SBF (*simulated body fluid*). Esta solução possui vários iões em concentrações idênticas às encontradas no plasma sanguíneo humano [57].

Os materiais bioativos têm vindo a ser amplamente utilizados na área da medicina dentária. Estes estão disponíveis em vários formatos e composições e são desenhados de modo a atuarem nos tecidos danificados promovendo a sua regeneração ou reparação.

Para o tratamento de defeitos da estrutura periodontal existem, como descrito anteriormente, membranas regenerativas. Contudo, as que estão disponíveis atualmente no mercado não possuem capacidades bioativas, havendo a necessidade de recorrer a enchimentos para o defeito ósseo cumulativamente com o uso da membrana. Nesse sentido, vários investigadores têm estudado a produção de membranas contendo enchimentos que promovam bioatividade. A introdução de partículas à base de fosfatos de cálcio ou partículas de vidro bioativo na matriz destas membranas irá favorecer o crescimento do tecido ósseo, enquanto a matriz funciona como barreira à proliferação, para o interior do defeito, dos tecidos de crescimento mais rápido.

2.5.1. Vidros Bioativos

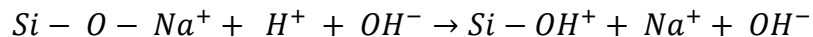
Os vidros bioativos foram os primeiros materiais sintéticos a mostrar capacidade de ligação ao osso, e têm vindo a ser utilizados com sucesso em aplicações de regeneração óssea.

O primeiro vidro bioativo a ser desenvolvido foi o Bioglass 45S5[®], com a composição 45% SiO₂, 24.5% Na₂O, 24.5% CaO e 6% P₂O₅. Novas composições de vidros bioativos têm sido desenvolvidas com introdução de elementos adicionais na rede de sílica, tais como, flúor, magnésio, estrôncio, prata, boro, potássio ou zinco, entre outros, de modo a se obterem as propriedades desejadas que promovem uma melhor regeneração óssea [58].

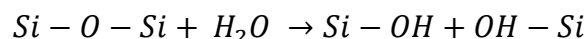
A capacidade dos vidros bioativos se ligarem ao osso está associada à formação de uma camada apatítica que é capaz de se ligar fortemente às fibrilhas de colagénio do osso danificado, adsorver proteínas, incorporar moléculas de colagénio e promover a ligação e diferenciação de osteoblastos [56], [59], [60].

A formação da camada de HCA na superfície de vidros bioativos quando imersos em fluido fisiológico simulado *in vitro*, ou em contacto com fluido corporal *in vivo* resulta de uma série de reações na seguinte sequência [54], [56], [61]:

- 1) Troca rápida entre iões alcalinos do vidro e iões H⁺ existentes na solução:



- 2) Quebra das ligações Si-O-Si e formação de grupos silanol (Si-OH) na interface vidro-solução:



- 3) Condensação e repolimerização de grupos silanol e formação de uma camada superficial rica em sílica-gel desprovida de iões alcalinos e alcalino-terrosos;

4) Migração de iões Ca²⁺ e PO₄³⁻ presentes na rede vítrea para a superfície da camada de sílica gel, através da estrutura bastante aberta do gel, seguindo-se o crescimento de um filme amorfo de CaO-P₂O₅ por incorporação de iões Ca²⁺ e PO₄³⁻ provenientes da solução.

5) Formação de uma camada de hidroxiapatite carbonatada (HCA) por cristalização do filme amorfo com incorporação de aniões OH⁻ e CO₃²⁻ presentes na solução.

Em medicina dentária são várias as aplicações deste material, em diferentes formatos como partículas, scaffolds, ou estruturas densas para diversas aplicações.

Em 1989 surgiu no mercado o ERMI® que consistia num cone feito de Bioglass® destinado à reparação das raízes dos dentes, após extração, fornecendo um local de fixação das próteses. Contudo parecia clinicamente mais vantajosa a utilização de materiais na forma de partículas, que pudessem ser moldados de acordo com os diferentes defeitos ósseos. Assim, em 1993 surgiu o PerioGlass® (NovaBone Products LLC, Alachua, Florida), usado na forma de partículas com uma gama de tamanhos de 90 – 710 μm , para reparação de defeitos ósseos, muitas vezes em conjunto com membranas periodontais. Outros produtos que têm vindo a ser utilizados como enxertos ósseos na forma particulada são o Biogran® (BIOMET 3i, Palm Beach Gardens, Florida) e o BonAlive® (BonAlive Biomaterials, Turku, Finland).

Os vidros bioativos são também utilizados no tratamento da hipersensibilidade dentária, como agente de reparação ativa incorporado nas pastas de dentes. Um exemplo é o Novamin® (NovaMin Technology, GlaxoSmithKline, Florida, UK) com um tamanho de partículas ~18 μm . Estas partículas aderem à dentina formando uma camada de HAp que bloqueia os pequenos túbulos desta, reduzindo assim a sensibilidade [56], [62].

2.5.2. Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio (CaP) são uma família de compostos minerais constituídos por iões Ca^{2+} , iões fosfato (PO_4^{3-}) e ocasionalmente iões hidroxilo (OH^-).

Os materiais à base de fosfatos de cálcio têm vindo a ser amplamente estudados e empregados em aplicações biomédicas para reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como características importantes: semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados; biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis e osteocondutividade [63]–[65].

A formação da camada apatítica *in vivo* nos materiais à base de fosfatos de cálcio deve-se a processos de dissolução e precipitação. A atividade celular como por exemplo de macrófagos e osteoclastos associada a um meio ligeiramente ácido induz a dissolução parcial destes materiais e consequente libertação de iões Ca e P para o meio. Os iões libertados levam à supersaturação do fluído fisiológico causando a precipitação com incorporação de outros iões como CO_3^{2-} , Mg^{2+} , Na^+ , entre outros, do fluído fisiológico resultando na formação de uma camada de HCA na superfície destes materiais. O

enriquecimento do meio com íões Ca e P promove assim a mineralização e formação de novo osso [53], [55].

Uma forma conveniente de classificar os fosfatos de cálcio é através da razão molar entre cálcio e fósforo (razão Ca/P), a qual varia de 0,5 a 2,0. A HAp possui uma razão Ca/P bastante próxima da que é encontrada no esmalte, dentina e osso. A razão Ca/P da HAp é de 1,67 enquanto que no esmalte, dentina e osso é de 1,63; 1,61 e 1,71 respetivamente [64], [65].

A solubilidade dos fosfatos de cálcio influencia a interação destes com o meio e de um modo geral (na gama de pH de interesse), quanto maior a razão Ca/P, menor a sua solubilidade e quanto menor o pH maior a solubilidade. A figura 8 permite avaliar a estabilidade dos fosfatos de cálcio em contacto com soluções aquosas. Verifica-se que para pH acima de 5 a fase mais estável é a hidroxiapatite seguida do trifosfato de cálcio (TCP) e octofosfato de cálcio (OCP). Para pH abaixo de 5 a bruxite (DCPD) é mais estável que a hidroxiapatite. Na tabela 4 encontram-se alguns tipos de fosfatos de cálcio organizados de acordo com a sua razão Ca/P [65].

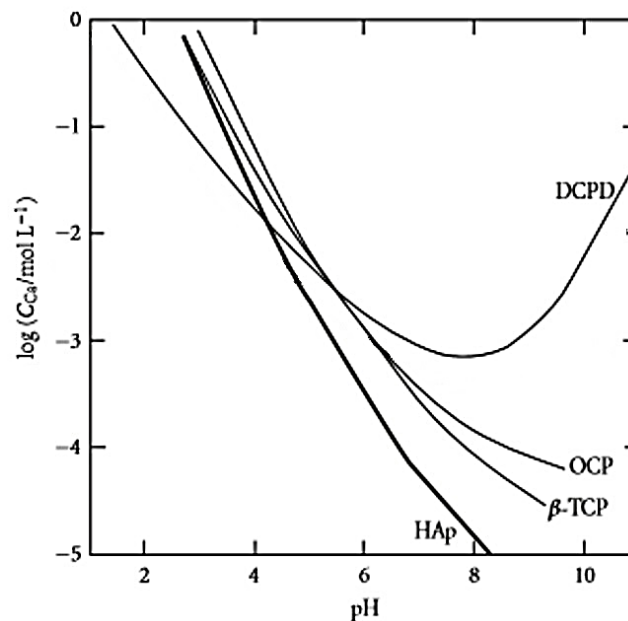


Figura 8- Solubilidade de diferentes fases de fosfatos de cálcio a 37°C em função do pH em soluções aquosas. HAp: hidroxiapatite, TCP: Trifosfato de cálcio, OCP: octofosfato de cálcio DCPD: bifosfato de cálcio bihidratado (bruxite). Retirado de [66].

Tabela 4- Fosfatos de cálcio utilizados em aplicações biomédicas e suas razões Ca/P. Adaptado de [67].

Nome	Fórmula	Ca/P
Tetrafosfato de cálcio (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0
Hidroxiapatite (HAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Trifosfato de cálcio (α,β,γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
Octofosfato de cálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Bifosfato de cálcio bihidratado (Bruxite) (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
Bifosfato de cálcio (monetite) (DCP)	CaHPO_4	1.0
Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5

Tal como referido anteriormente, os ossos e dentes são compósitos naturais formados por moléculas de colagénio ligadas em cadeias lineares arranjadas em fibras. Entre essas moléculas existem pequenos espaços intersticiais regularmente espaçados, onde se encontram nanocristais de compostos inorgânicos, sendo a HAp a mais comum, apresentando ainda outros iões Na^+ , Mg^+ e CO_3^{2-} e em menor quantidade K^+ , F^- e Cl^- . A tabela 5 mostra a composição inorgânica de ossos e dentes em percentagem ponderal.

Tabela 5- Composição inorgânica de ossos e dentes [64].

Elementos	Osso (%)	Dente	
		Dentina (%)	Esmalte (%)
Ca	34	35	37
P	15	16	17
Mg	0.5	1	0.4
Na	0.8	0.4	0.6
K	0.2	0.1	0.2
C	1.5	1.1	0.8
Cl	0.2	Vestígios	0.3
F	0.08	0.03	0.01

Os cerâmicos de fosfato de cálcio possuem variadas aplicações em odontologia, sendo usados para reparação de defeitos ósseos, no aumento e manutenção de cristas ósseas alveolares, na recolocação de raízes dentárias, no revestimento de implantes metálicos, entre outros [65].

Entre os materiais mais comuns para este tipo de aplicações, encontra-se a HAp (sintética ou de origem natural (obtida a partir de coral) ou biológica (a partir de osso bovino) e o trifosfato de cálcio [65].

A hidroxiapatite é o componente mineral em maior quantidade no osso. Está presente nos ossos e dentes e representa 5% do peso total de um indivíduo adulto.

Representa 55% da composição de ossos, 96% da composição do esmalte dentário e 70% da dentina [64].

A sua fórmula química é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, podendo também apresentar-se na forma $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com uma percentagem em peso de 39% de Ca e 18,5% de P, ou seja, próximas das encontradas no esmalte, dentina e osso.

A hidroxiapatite cristaliza em sistema hexagonal. O sistema pertence ao grupo espacial hexagonal $P6_3/m$, com simetria rotacional hexagonal e plano de reflexão e com parâmetros de célula $a=b=9,418 \text{ \AA}$ e $c= 6,884 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ e $\gamma=60^\circ$. A estrutura da hidroxiapatite é formada por um arranjo tetraédrico de fosfatos (PO_4^{3-}), que constituem o “esqueleto” da célula unitária (figura 9). Dois oxigénios estão alinhados com o eixo c e os outros dois estão num plano horizontal. [64], [68].

A HAp a uma escala nanométrica apresenta propriedades únicas. A elevada razão volume-superfície, reatividade e morfologias biomiméticas, fazem da nano-HAp (hidroxiapatite nanométrica) um material de grande interesse para aplicações de engenharia de tecido ósseo [69].

Atualmente existem no mercado vários produtos de hidroxiapatite para enxertos ósseo, de origem natural como o Interpore 200, ProOsteon 200® e ProOsteon 500® (Interpore Int, CA), obtidos com recurso a corais através da conversão de CaCO_3 em HAp, e os de origem sintética, como o Calcitite® e Osteograf® (Ceramed, Co). Existem ainda outras composições resultantes da mistura de hidroxiapatite com outros fosfatos de cálcio como o trifosfato de cálcio. Na Europa, os enchimentos mais comumente utilizados são de apatite proveniente de osso bovino como o Bio-Oss® (Geitslich, Switzerland) e o Endobon® (Merck, Germany)[55].

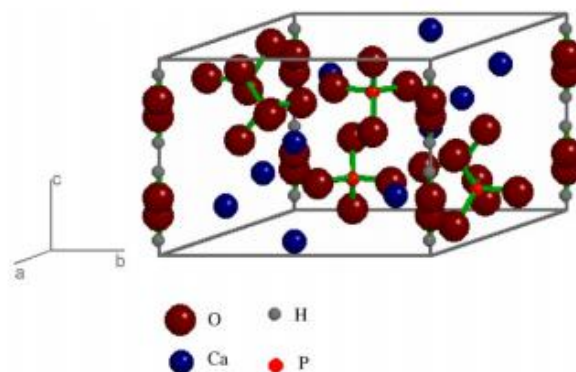


Figura 9- Célula unitária da hidroxiapatite [70].

Capítulo 3

Procedimiento Experimental

3. Procedimento Experimental

3.1. Materiais e reagentes para preparação das partículas e compósitos

Para a Síntese das nanopartículas de hidroxiapatite foram utilizados como reagentes precursores, hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) da Panreac, na forma de uma suspensão a 0.2 M, ácido orto-fosfórico 85% (H_3PO_4) da Merck sob a forma de uma solução diluída de 0.2 M e hidróxido de amónia (NH_4OH) da Sigma-Aldrich diluído 0.1 M.

Na preparação do vidro bioativo foram utilizadas como matérias-primas, SiO_2 da Merck, CaCO_3 e MgO da Sigma-Aldrich e ainda $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ da Fulka.

Para a produção das membranas por liofilização foram utilizados como precursores, colagénio de tendão de Aquiles bovino da Sigma-Aldrich (Collagen from bovine Achilles tendon) e ácido acético diluído 1M. Como enchimento para estas membranas foram utilizadas as partículas de hidroxiapatite e de vidro obtidas.

3.2. Métodos de Preparação

3.2.1. Método de síntese de nanopartículas de hidroxiapatite

O método de síntese de hidroxiapatite empregado foi a precipitação química a temperatura ambiente. Foram preparados 250 ml de uma suspensão com 3,718 g de hidróxido de cálcio, 250 ml de uma solução diluída 0,2 M de ácido orto-fosfórico e 250 ml de uma solução de hidróxido de amónia 0,1 M.

Foram adicionados gota-a-gota (36 gotas por minuto) 150 ml de solução de ácido orto-fosfórico, a 250 ml de hidróxido de cálcio de forma a obter-se a razão Ca/P pretendida (1,67). A mistura foi submetida a agitação através de um agitador mecânico. O ajuste do pH foi feito no final da reação de precipitação, com a adição de 50 ml de hidróxido de amónia. O pH foi ajustado para o valor de 9,45. Esta reação foi levada a cabo com base em trabalhos anteriores [71].

A mistura foi posteriormente submetida a um período de envelhecimento de 4 dias, a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Passado esse tempo, procedeu-se à centrifugação e lavagem com água destilada. Foram realizados 3 ciclos de

centrifugação, de 10 minutos e 10000 rpm. O produto obtido foi colocado na estufa durante dois dias a 37°C. Foi depois desaglomerado com recurso a um almofariz e pilão e armazenado num exsiccador.

3.2.2. Método de obtenção de partículas de vidro bioativo

O método de preparação das partículas de vidro bioativo foi baseado em trabalhos anteriores realizados na Universidade de Aveiro [72], [73]. Estes vidros foram selecionados por apresentarem comportamento bioativo em ensaios *in vitro* em meio celular. A composição molar usada foi a seguinte: 25,43% SiO₂ : 32,68% CaO : 10,89% P₂O₅ : 31,00% MgO.

As matérias-primas necessárias à obtenção de 30 g de vidro bioativo foram pesadas e posteriormente homogeneizadas com o auxílio de 30 ml de álcool etílico em cubas de ágata e num moinho planetário. As misturas foram submetidas a agitação durante 45 min a 250 rpm e seguidamente foram secas a 50°C durante 48 horas.

Após esta etapa as misturas foram fundidas em cadinhos de platina-ródio num forno elétrico, em ar, a 1500°C durante 90 min. Os fundidos obtidos foram vazados para água à temperatura ambiente, dando origem às fritas. Estas foram decantadas e secas a 50°C durante 48 horas. Finalmente foram moídas a seco num moinho de ágata e peneiradas numa tela de 20 µm.

3.2.3. Método de preparação das membranas compósitas por liofilização

Foram produzidos três tipos diferentes de membranas: membranas padrão contendo apenas colagénio, membranas com enchimento de nanopartículas de hidroxiapatite e membranas com enchimento de vidro bioativo.

Para a produção destas membranas fez-se uma suspensão de colagénio de tendão de Aquiles bovino com recurso a uma solução diluída de ácido acético 1M em banho de gelo durante aproximadamente uma hora. Posteriormente foram adicionadas as nanopartículas de hidroxiapatite ou vidro à suspensão de colagénio ficando esta em agitação em banho de gelo durante mais uma hora. Na tabela 6 apresentam-se as diferentes composições e quantidades de reagentes utilizados para a produção das membranas, cujas designações são referidas na última coluna.

Tabela 6- Quantidades e tipos de enchimento de cada membrana.

Quantidade de ácido acético (ml)	Quantidade de colagénio (mg/ml) *	Enchimento	Quantidade de enchimento (mg/ml) **	Membrana
3	12	-	-	Mpadrão
		Hidroxiapatite	5	MHAp5
		Vidro Bioativo		MVB5
		Hidroxiapatite		10
		Vidro Bioativo	MVB10	
		Hidroxiapatite	30	
		Vidro Bioativo		MVB30

*mg de colagénio/ml ácido acético; ** mg de enchimento/ml de colagénio+ ácido acético

Volumes de cerca de 3ml de mistura foram colocados em pequenos moldes e congelados durante 12 horas a -17°C. Seguidamente foram submetidas a um processo de liofilização, durante dois dias, com a finalidade de ser removido todo o solvente, dando origem a estruturas porosas. O processo de liofilização decorreu no equipamento de modelo Lyph Lock 4.5 Labconco (Figura 10), cujas condições nominais são, temperatura de -50°C e pressão de 15×10^{-3} mbar.



Figura 10- Liofilizador de modelo Lyph Lock 4.5 Labconco. Neste tipo de equipamento as amostras são colocadas na mesma câmara de liofilização.

A percentagem em peso de enchimento na membrana (%peso enchimento=massa de enchimento / (massa de enchimento + massa de colagénio)) foi calculada para as várias membranas após liofilização tendo-se obtido os resultados apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Quantidades de enchimento em percentagem de peso.

Membrana	%peso de enchimento
MHAp5	~29%
MVB5	
MHAp10	~45%
MVB10	
MHAp30	~71%
MVB30	

Foram também preparadas as mesmas membranas Mpadrão, MHAp5 e MVB5, e posteriormente submetidas a prensagem (durante 10 min com o auxílio de um peso de 1633 g) para se obterem estruturas menos espessas. O esquema da figura 11 resume todas as etapas de obtenção das diferentes membranas.

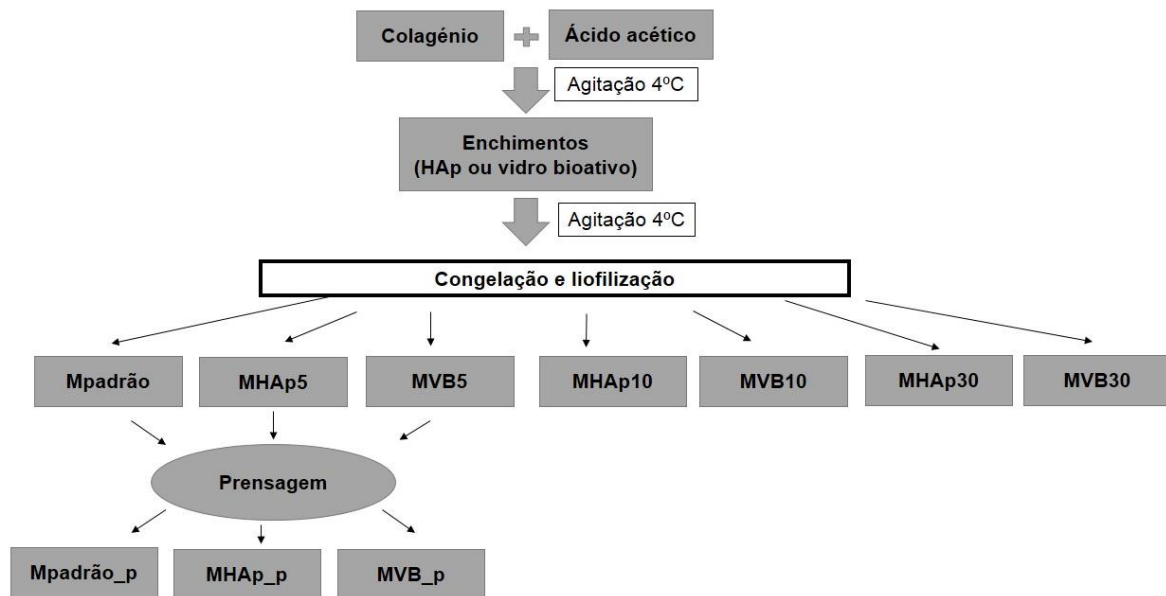


Figura 11- Esquema representativo das fases de preparação das membranas.

Das membranas sem prensagem, as MHAp5 e MVB5 foram submetidas a testes de bioatividade em SBF, as MHAp5, MHAp10, MVB5 e MVB10 foram submetidas a análise por difração de raios-x e microscopia eletrónica de varrimento. Para a análise da degradação em saliva humana foram utilizadas as membranas sem prensagem Mpadrão, MHAp5 e MVB5, bem como as membranas prensadas Mpadrão_p, MHAp_p e MVB_p. A tabela 8 apresenta todos os testes de caracterização realizados às diferentes membranas. Seguidamente serão especificadas as várias técnicas de caracterização utilizadas.

Tabela 8- Caracterizações efetuadas às diferentes membranas.

Membrana	Caracterização			
	Difração de raios-x	Microscopia eletrônica de varrimento	Potencial bioativo	Degradação em saliva humana
Mpadrão		X		X
Mpadrão_p		X		X
MHAp5	X	X	X	X
MHAp_p		X		X
MHAp10	X	X		
MHAp30				
MVB5	X	X	X	X
MVB_p		X		X
MVB10	X	X		
MVB30				

Não foi efetuada a caracterização das membranas MHAp30 e MVB30 por estas não possuírem condições necessárias para manipulação, apresentando um estado deteriorado.

3.3. Caracterização

3.3.1. Fases cristalinas

Difração de Raios-X (DRX)

De modo a identificar as fases cristalinas das diferentes amostras, foi feita uma análise de difração de raios-x através do difractómetro Rigaku Geigerflex D/ Max-SérieC, equipado com um monocromador curvo de grafite, com uma voltagem de 40 kV, uma corrente de 30mA e usando uma radiação emitida $K\alpha$ ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$).

3.3.2. Microestrutura e tamanho de partículas

Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A morfologia das partículas de vidro bioativo e da HAp bem como a das membranas foi avaliada através de um microscópio eletrónico de varrimento, HITACHI modelo S-4100 provido de um sistema de emissão de eletrões com um filamento de tungsténio com potencial de aceleração de 10 kV e resolução máxima de 15 Å.

Para a preparação das amostras para análise no microscópio fixou-se fita de carbono de dupla face num porta-amostras de alumínio sobre a qual se dispersou uma pequena quantidade de pó ou colou as membranas. Ambas as amostras foram revestidas com um filme fino de carbono depositado no equipamento EMITECH K950.

Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)

Uma vez que as partículas de hidroxiapatite obtidas se encontram na gama dos nanómetros, foi necessário recorrer à microscopia eletrónica de transmissão para observação da morfologia e tamanho destas. O equipamento utilizado foi o microscópio eletrónico de transmissão de energia filtrada EF-TEM de 200kV, marca JEOL, modelo 2200FS, de alta resolução.

Para a preparação das amostras fez-se uma suspensão das partículas de HAp em etanol na qual se mergulhou a grelha para posterior análise.

A análise dos tamanhos de partícula e da distribuição granulométrica, das partículas de HAp e de vidro bioativo foi feita num equipamento Coulter LS Particle Size Analyser 230. Uma vez que os pós de HAp se apresentavam muito agregados, foram realizadas duas análises granulométricas numa das quais se usou um desfloculante para tentar contrariar a agregação das partículas.

3.3.3. Composição e ligações químicas

Espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR)

Este método analisa as mudanças na intensidade de um feixe de infravermelhos em função do seu comprimento de onda (200 a 4000 cm^{-1}) quando interage com a amostra, sendo que a intensidade de cada pico pode ser relacionada com o modo de vibração de uma ligação química específica.

A base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético é a lei de Lambert-Beer. Para medidas de absorvância de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se:

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-\epsilon bc}$$

$$A = -\ln(T) = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

$$A = \epsilon bc$$

Onde T é a transmitância, A é a absorvância, I_0 e I , intensidade da radiação que incide e que emerge da amostra respetivamente. A absortividade molar é dada por ϵ e a concentração molar das espécies químicas é dada por C [74].

Os espectros de absorção no infravermelho (FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy) foram registados num espectrofotómetro de marca Bruker, modelo Tensor 27, com uma resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans. Estes foram adquiridos na gama dos 4000 a 500 cm^{-1} , utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) com as amostras de hidroxiapatite ou vidro bioativo. Os ensaios foram realizados no laboratório de análises do departamento de Química da Universidade de Aveiro.

3.3.4. Área superficial específica

A determinação da área superficial específica das nanopartículas de hidroxiapatite foi efetuada através de adsorção gasosa. O método consiste em fazer passar um fluxo de uma mistura de gases (azoto e hélio) sobre a amostra, a uma temperatura próxima do ponto de ebulição do azoto. As partículas da amostra adsorvem à superfície uma camada molecular de azoto. Chama-se isotérmica de adsorção à relação, a temperatura

constante, entre a quantidade de gás adsorvido na superfície do material e a pressão parcial a que ocorre. É normalmente representada como a quantidade adsorvida em função da pressão relativa (p/p^0), em que p_0 é a pressão de saturação da substância adsorvida à temperatura do ensaio.

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), as isotérmicas de adsorção são classificadas em seis tipos diferentes, estando cada tipo de isotérmica associado a um determinado mecanismo de adsorção [75]. Na figura 12 apresentam-se os vários tipos de isotérmicas de adsorção de gás.

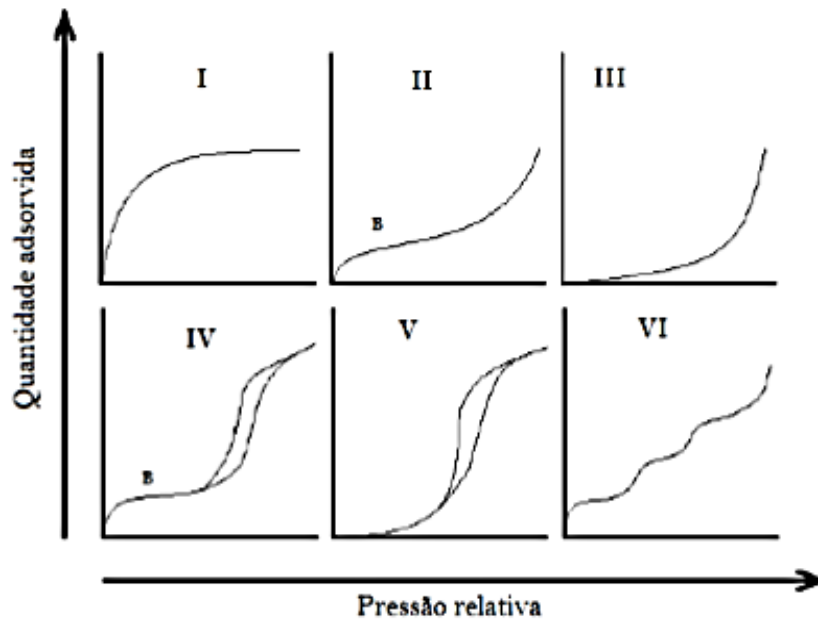


Figura 12- Classificação IUPAC dos vários tipos de isotérmicas de adsorção de gases. Adaptado de [75].

Os detalhes sobre cada tipo de classificação são indicados na tabela 9.

Tabela 9- Descrição de cada tipo de isotérmica de adsorção de gases, representados na figura 12.

Tipo	Descrição
I	Característica de sólidos microporosos com baixa superfície externa. Apresenta um patamar correspondente ao preenchimento dos microporos.
II	Associada a materiais não porosos onde o ponto B corresponde à formação de monocamada.
III	Pouco comum e está associado a uma adsorção mais baixa que o tipo II.
IV	Apresentada por materiais mesoporosos.
V	Apresentada por materiais micro e mesoporosos, nos quais a adsorção é baseada numa fraca interação gás/sólido.
VI	Está associada a superfícies uniformes não porosas e traduz um mecanismo de adsorção em multicamada.

A área superficial específica de um material define-se como sendo a área da superfície de uma partícula sólida por unidade de massa, usualmente expressa em m^2g^{-1} . O método utilizado para a determinação da área superficial específica foi o proposto por Brunauer-Emmet-Teller (B.E.T) e a base matemática deste é a equação:

$$\frac{\frac{P}{P_0}}{V_{ads} \times \left[1 - \left(\frac{P}{P_0}\right)\right]} = \frac{1}{V_m \times C} - \frac{(C - 1)}{V_m \times C} \times \frac{P}{P_0}$$

em que é P a pressão a que ocorre o ensaio, P_0 a pressão de vapor de saturação, V_{ads} o volume de gás adsorvido à pressão P e V_m o volume necessário para formar a monocamada.

Por esta equação pode determinar-se o volume de azoto adsorvido à superfície de cada partícula. Sabendo o valor de V_m e a área ocupada por cada molécula, pode calcular-se a área superficial específica.

As áreas superficiais específicas dos pós de HAp foram determinadas utilizando o equipamento Micromeritics_Gemini 2370V5.

3.3.5. Carga superficial das partículas

Em qualquer partícula em dispersão, o potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a superfície da partícula dispersa. Este depende das características da superfície das partículas e do meio de dispersão. O potencial zeta das partículas é medido aplicando um campo elétrico através da suspensão. Partículas carregadas dentro da suspensão vão migrar para o eletrodo de carga oposto com uma velocidade proporcional à magnitude do seu potencial zeta. A relação entre a estabilidade da suspensão e o potencial zeta surge da repulsão mútua que ocorre entre as partículas de carga igual. Por esta razão, partículas com elevada carga superficial tendem a manter-se estáveis sem se aglomerar. Quanto maior for o valor de potencial zeta (tanto negativo quanto positivo) maior é a estabilidade [76].

De modo a avaliar a carga elétrica superficial das nanopartículas de hidroxiapatite foi medido o seu potencial zeta num equipamento MALVERN modelo Zetasizer NanoZS. Foram utilizados 4mg de amostra para 10 ml de KCl 10^{-3}M como dispersante. O ensaio foi realizado à temperatura ambiente e para fazer variar o pH foram utilizadas soluções de NaOH e HCl a diferentes concentrações.

3.3.7. Potencial bioativo

A avaliação do potencial bioativo das membranas foi feita através de ensaios *in vitro* em meio fisiológico sintético acelular ou SBF (*Simulated Body Fluid*) no qual as amostras foram mergulhadas e mantidas por vários intervalos de tempo (1, 3 e 7 dias), observando-se, após esses tempos, a superfície das amostras. A formação de uma camada de fosfato de cálcio sobre as amostras após imersão é indicativa de que os materiais são potencialmente bioativos, isto é, apresentam a capacidade de poder promover a ligação ao tecido quando testados *in vivo*. O SBF possui composição e concentrações iônicas idênticas às do plasma humano (tabela 10) e foi preparado de acordo com o procedimento proposto por Kokubo e Takadama tal como descrito na literatura [57].

Tabela 10- Concentração iônica no plasma humano e no SBF.

	Concentração iônica (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma humano	14.2	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	14.2	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5

Os reagentes utilizados para a preparação de SBF são indicados na tabela 11 (por ordem de adição em água desionizada, para 1 litro de SBF).

Tabela 11- Ordem, quantidade, fornecedor e pureza dos reagentes usados para a preparação de 1L de SBF.

Ordem	Reagente	Fórmula química	Quantidade (g) ou (ml)	Fornecedor	Pureza (%)
1	Cloreto de sódio	NaCl	7.996	Panreac	99.5
2	Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	0.350	Riedel-de Haën	99.7
3	Cloreto de potássio	KCl	0.224	Riedel-de Haën	99.5
4	Fosfato de potássio tridratado	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.228	Calbiochem	100
5	Cloreto de magnésio	MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.305	Riedel-de Haën	99
6	Ácido clorídrico	HCl (1M)	40	Panreac	99
7	Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .6H ₂ O	0.548	Fluka	99
8	Sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	0.071	Panreac	99
9	Tris (hidroximetil) – aminometano	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	6.057	Merck	99.8

O pH final desta solução é de 7,4. Após a preparação da solução de SBF, preparam-se as amostras, cortando pedaços de cada membrana com dimensões 10 x 5 x 3 mm³. Os volumes de SBF necessários para os ensaios de bioatividade obtiveram-se a partir da relação, $V_s = S_a / 10$, onde V_s é o volume calculado de SBF em mL, e S_a a área superficial aparente em mm² [57]. Uma vez que cada amostra apresenta uma área superficial média de 190 mm², as amostras foram mergulhadas em 19 mL de SBF em copos de polietileno. Finalmente, os copos foram colocados na estufa a 37°C, durante diferentes tempos de imersão, nomeadamente 1, 3 e 7 dias. Após cada tempo de imersão as amostras foram retiradas e lavadas delicadamente com água ultrapura (Milli Q®), secas na estufa a 37°C e posteriormente colocadas no exsiccador, para subsequentemente serem caracterizadas.

3.3.9. Degradação por saliva humana

O estudo da degradação por saliva das membranas obtidas neste trabalho, foi efetuado no laboratório de investigação interdisciplinar em saliva- SalivaTec da Universidade Católica de Viseu- Centro Regional das Beiras.

Espetrofotometria UV/Visível

A região do espectro de UV/Visível é dividida em três subdomínios: UV próximo (ultravioleta) (185-400 nm), visível (400-700 nm) e IV próximo (infravermelho) (700-1100 nm). A maioria dos espectrofotómetros comerciais abrange a gama de valores de 185 a 900 nm.

A concentração de uma determinada substância em solução pode ser determinada por medição da absorvância a um dado comprimento de onda, aplicando a lei de Lambert-Beer, anteriormente apresentada na análise de espectroscopia por infravermelhos [74].

Eletroforese

A eletroforese é uma técnica capaz de separar moléculas ionizadas sob a influência de um campo elétrico. A mobilidade das moléculas depende do peso molecular, conformação e carga destas. Moléculas com carga negativa migram para o polo positivo e moléculas com carga positiva migram para o polo negativo do equipamento. Moléculas de menor massa migram mais rapidamente que moléculas de

massas mais elevadas. São utilizadas soluções tampão para manter o pH do meio estável, uma vez que as proteínas são substâncias anfotéricas.

Foram efetuados dois tipos de eletroforese: SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis*), em que as amostras são previamente fervidas num tampão contendo SDS e β -mercaptoetanol. O β -mercaptoetanol reduz as pontes dissulfeto que mantêm a estrutura terciária das proteínas e o SDS (detergente aniônico) liga-se à proteína desnaturando-a concedendo-lhe carga negativa. Eletroforese capilar, que devido ao uso de capilares de dimensão reduzida, permite uma melhor separação das proteínas e um tempo de análise mais reduzido [77]

Para este estudo, foram recolhidos 5 ml de saliva de 3 dadores diferentes durante o período da manhã. Posteriormente as diferentes salivas foram centrifugadas durante 2 minutos a 5000 rpm de forma a depositar eventuais resíduos que pudessem comprometer a experiência. Os sobrenadantes resultantes da centrifugação foram então transferidos para novos tubos de recolha e submetidos a vigorosa agitação com vórtex para uma melhor homogeneização das proteínas presentes em cada saliva (figura 13).

Depois da agitação, foi determinada a concentração de proteínas nas salivas através da medição da densidade ótica de cada saliva no equipamento *nanovue plus* (figura 13).

De seguida foi feita a incubação de pedaços das diferentes membranas (MHAp5, MVB5, Mpadrão, MHAp_p, MVB_p e Mpadrão_p) com aproximadamente 6 mg de peso em 600 μ l de cada saliva durante diferentes períodos de tempo (0, 24 e 120 horas) ficando em agitação numa agitadora de rolos (Roller Shaker). Como forma de controlo foram também incubados pedaços de membrana num tampão TRIS (tris hidroximetil aminometano) 0,625 M a pH 6,8, cuja concentração de proteínas também foi determinada. No final de cada período de tempo foi removida uma alíquota de 5 μ l dos sobrenadantes (salivas) em contacto com as membranas que foi novamente sujeita a agitação em vórtex, para nova determinação da concentração de proteínas, a fim de avaliar as alterações produzidas pela eventual degradação das membranas dentárias em contacto com as diferentes salivas.

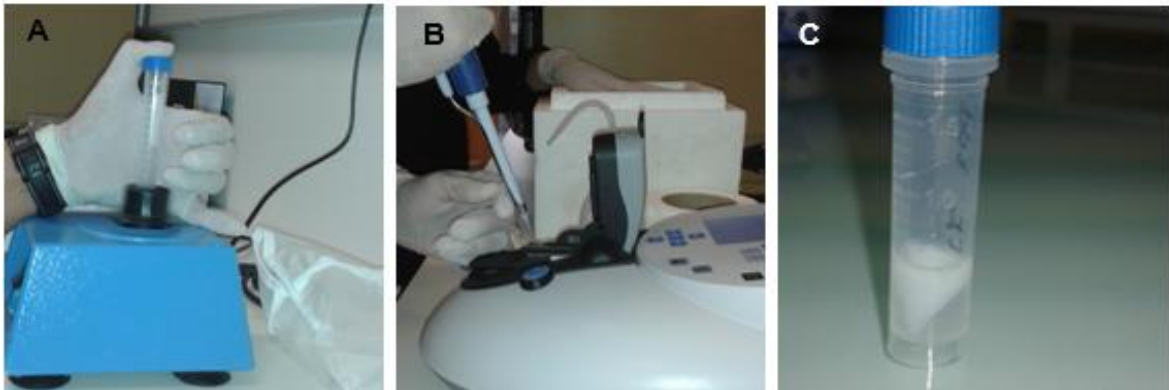


Figura 13- A: Vortex do sobrenadante de saliva resultante da centrifugação. B: Medição da densidade ótica para determinação da concentração de proteínas nas diferentes salivas. C: Incubação de um pedaço de membrana numa das salivas.

Ao fim dos vários tempos de incubação foram também retiradas alíquotas de 17 μ l dos diferentes sobrenadantes aos quais foram adicionados 8 μ l de tampão contendo laemmli e β -mercaptoetanol, como solução desnaturante. Essas amostras foram fervidas a 100°C durante 10 minutos no equipamento Minicycler, para posterior realização de eletroforese SDS-PAGE.

Os poços de eletroforese foram carregados com os 25 μ l de cada amostra, sendo utilizado como padrão o *unstainfree*. Para a síntese de 1l de tampão de corrida foram utilizados 900ml de água milli Q® e 100ml de TRIS/Glycine (SDS buffer 10 x TGS). O processo de SDS-PAGE ocorreu durante 40 min a 150 V e 3.00 A (figura 14). A leitura dos géis foi efetuada num equipamento ChemiDoc (figura 14).

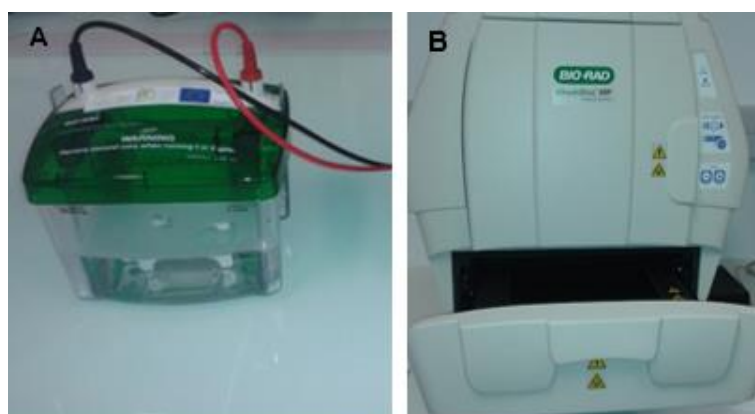


Figura 14- A: Equipamento de eletroforese SDS-PAGE. B: Leitor de géis de eletroforese.

Por fim foi efetuado um gel de eletroforese capilar dos fragmentos de colagénio da membrana padrão (Mpadrão), após imersão em saliva durante 120 horas. Estes fragmentos foram solubilizados em ácido acético 2M em banho de gelo e posteriormente liofilizados e desnaturados com solução desnaturante contendo β -mercaptoetanol. Como forma de comparação foi também realizada eletroforese capilar do colagénio utilizado na preparação das membranas, previamente submetido a condições desnaturantes (solução desnaturante com β -mercaptoetanol e 100°C durante 10 min). A análise foi efetuada usando um sistema de eletroforese automático, o Experion (Biorad) com *chips* de proteína padrão (Experion™ Pro260 Analysis Kit). As amostras foram analisadas de acordo com as especificações técnicas da Biorad.

O perfil das proteínas e a quantificação das bandas foram determinados através do Software, versão 3.20 do Experion™.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização das nanopartículas de hidroxiapatite

As nanopartículas de hidroxiapatite obtidas pelo método de precipitação foram caracterizadas através de DRX, SEM, TEM e FTIR. Foi também analisada a distribuição granulométrica das partículas, a sua área superficial específica e o potencial zeta. Como termo de comparação usaram-se hidroxiapatites atualmente disponíveis no mercado.

Fases cristalinas

De forma a investigar as fases cristalinas presentes foi obtido o espectro de difração de raios-x da hidroxiapatite preparada neste trabalho, que se apresenta na figura 15.

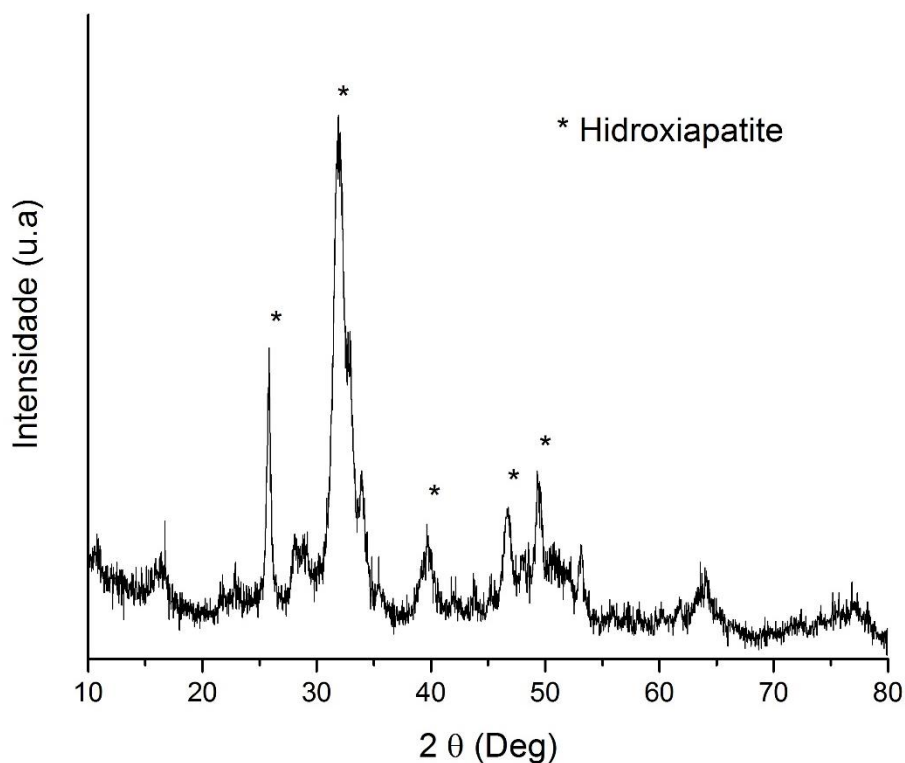


Figura 15- Difractograma referente às nanopartículas de hidroxiapatite obtidas pelo método de precipitação.

Os vários picos referenciados, identificados através das fichas JCPDS#9-432 e JCPDS#1-80-6199, correspondem a hidroxiapatite. Foram identificados alguns picos em ângulos $2\theta = 25,99^\circ$; $31,82^\circ$; $39,56^\circ$; $46,63^\circ$ e $49,34^\circ$ correspondentes aos planos de Miller (002), (211), (130), (222) e (213) respectivamente.

A difração de raios-x realizada a duas amostras de hidroxiapatites comerciais conduziu aos resultados apresentados na figura 16

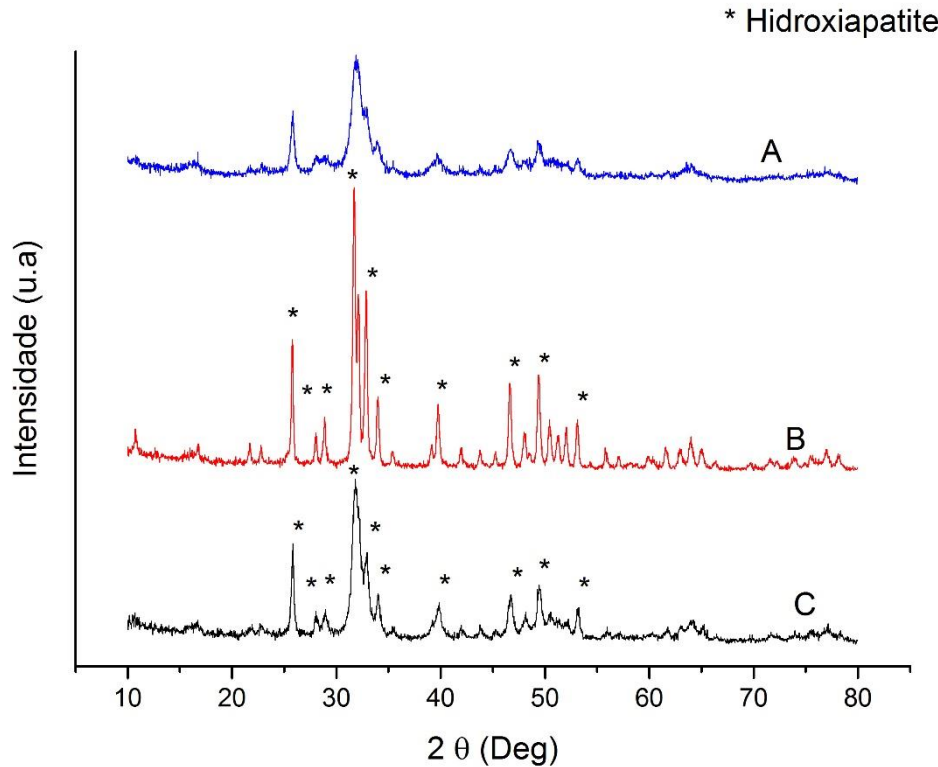


Figura 16- Comparação entre o espectro de difração de raios-x da hidroxiapatite obtida por precipitação química (A) e duas hidroxiapatites comerciais (B: Captal® R da Plasma Biotal e C: Merck).

Os espectros da figura 16 mostram que a hidroxiapatite obtida neste trabalho é muito semelhante à hidroxiapatite comercial C da Merck (ref.2196), apresentando picos de difração idênticos. A hidroxiapatite comercial Captal® R apresenta picos de difração ligeiramente mais estreitos e alongados mas nos mesmos ângulos 2θ que as demais. Por comparação entre os três espectros de difração conclui-se que a hidroxiapatite Captal® R apresenta-se num estado mais cristalino que as restantes.

Morfologia e tamanho de partícula

Para a análise morfológica das partículas obtidas por precipitação química, inicialmente recorreu-se à observação em SEM, tendo-se obtido as micrografias da figura 17.

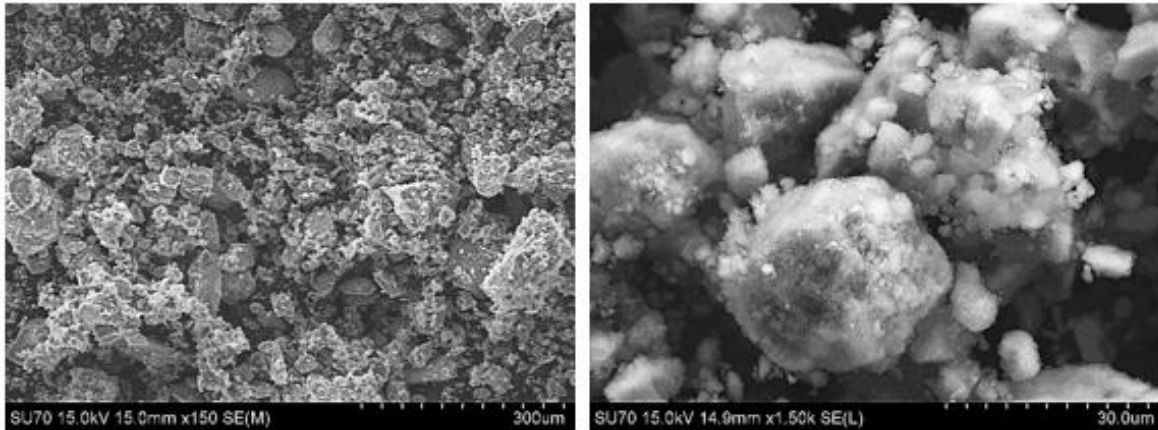


Figura 17- Micrografias de SEM, a diferentes ampliações, dos aglomerados de partículas de hidroxiapatite obtida pelo método de precipitação.

As imagens SEM mostram presença de grandes aglomerados de partículas de pequenas dimensões. Foram também obtidas imagens de SEM das hidroxiapatites comerciais B e C, figura 18, sendo notório que as partículas de hidroxiapatite comerciais apresentam tamanhos bastante reduzidos.

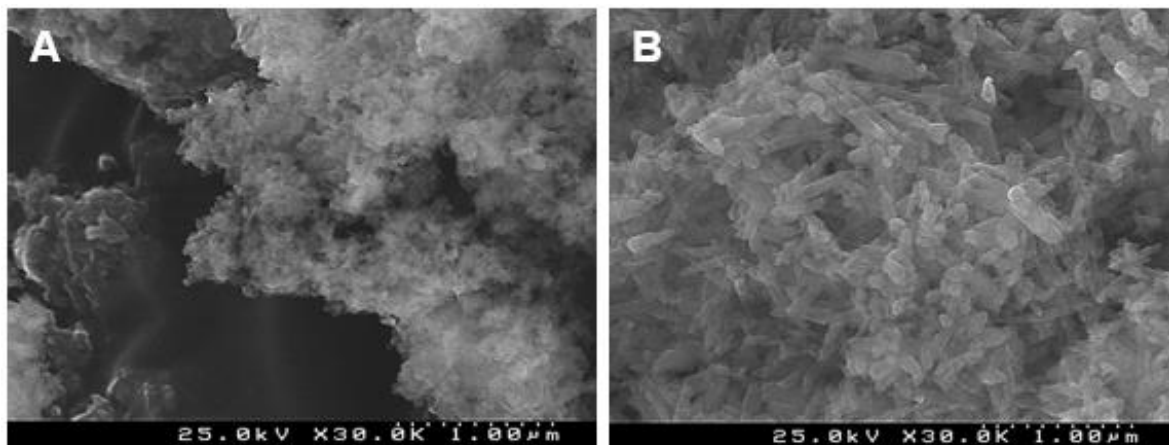


Figura 18- Micrografias de SEM das hidroxiapatites comerciais. A: hidroxiapatite comercial da Merck. B: hidroxiapatite comercial Captal® R.

Dadas as pequenas dimensões das partículas de hidroxiapatite obtidas por precipitação, foi necessário recorrer à análise em TEM para se obterem mais informações acerca da morfologia e tamanho destas. Na figura 19 apresentam-se as imagens TEM das partículas de hidroxiapatite.

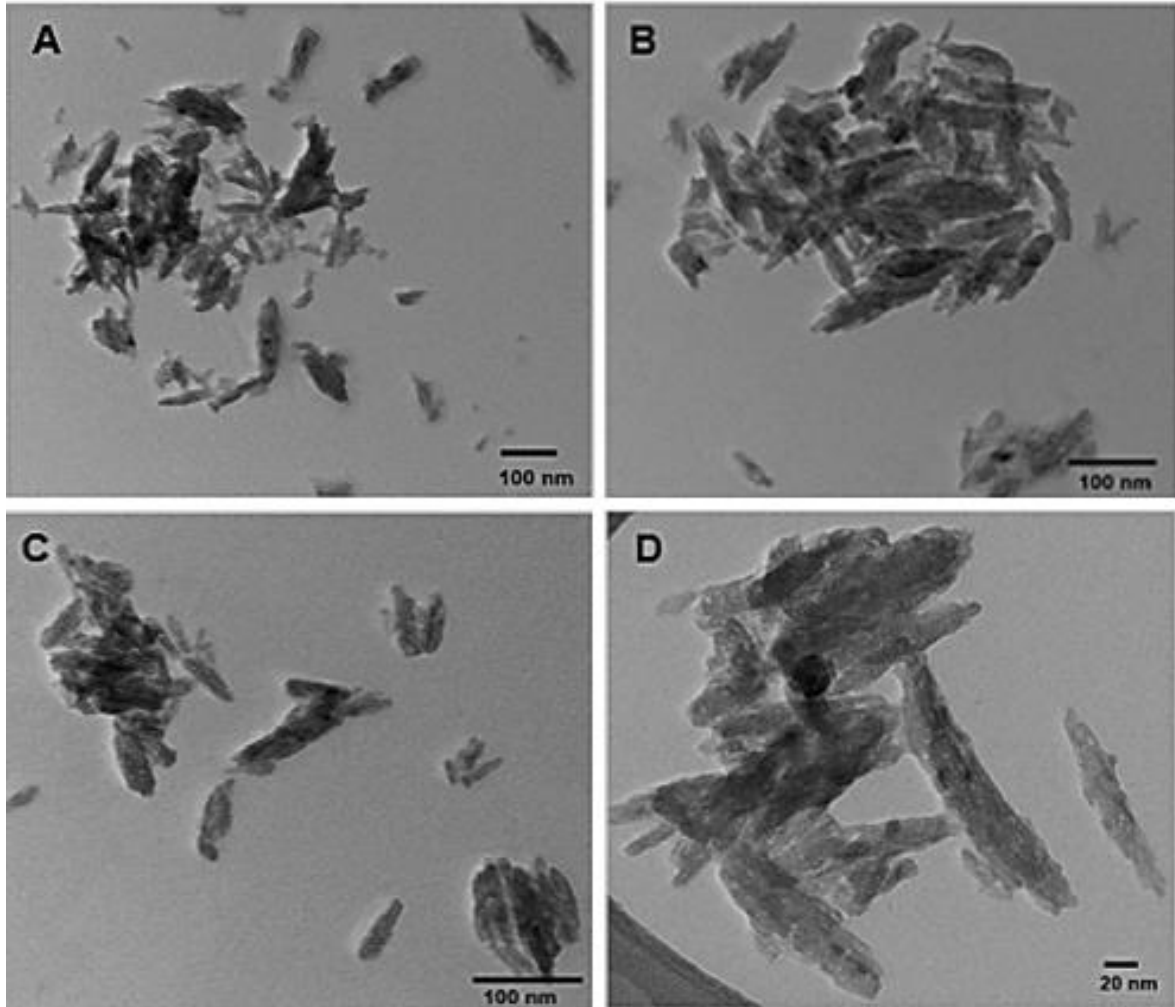


Figura 19- Micrografia de TEM das nanopartículas de hidroxiapatite obtidas pelo método de precipitação (temperatura ambiente $\sim 25^{\circ}\text{C}$). A: Ampliação 20000 x, B: Ampliação 30000 x, C: Ampliação 40000 x, D: Ampliação 60000 x.

As micrografias obtidas por transmissão mostram que as partículas de hidroxiapatite têm um formato alongado e irregular e apresentam alguma porosidade.

A temperatura utilizada durante a síntese de hidroxiapatite influencia a forma das nanopartículas. Imagens de TEM de outros autores mostram que partículas de hidroxiapatite sintetizadas à temperatura de 35°C por este método, com os mesmos reagentes apresentam uma forma e tamanhos muito semelhantes aos obtidos neste trabalho e que com o aumento da temperatura da reação, as partículas passam a ter um formato mais regular, próximo do circular (figura 20) [71].

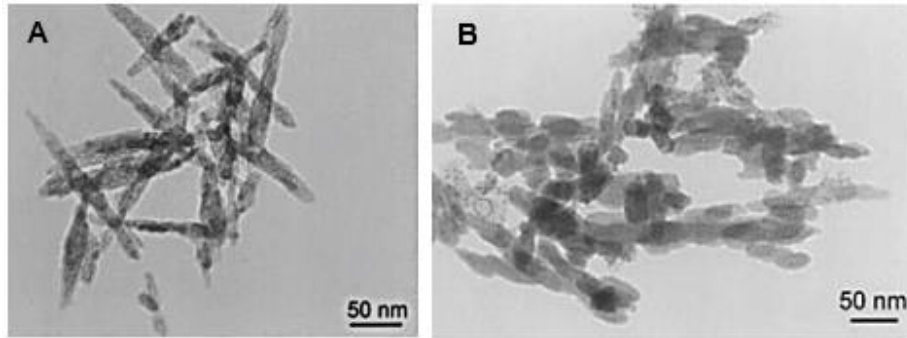


Figura 20- Imagens de TEM de partículas de HAp para diferentes temperaturas de síntese. A: T=35°C; B: T=85°C. Retidado de [71].

O tamanho de algumas partículas de HAp obtidas neste trabalho, foi determinado através de um programa, *ImageJ*. A figura 21 mostra as medições que foram efetuadas em duas das partículas, confirmando-se as suas dimensões nanométricas.

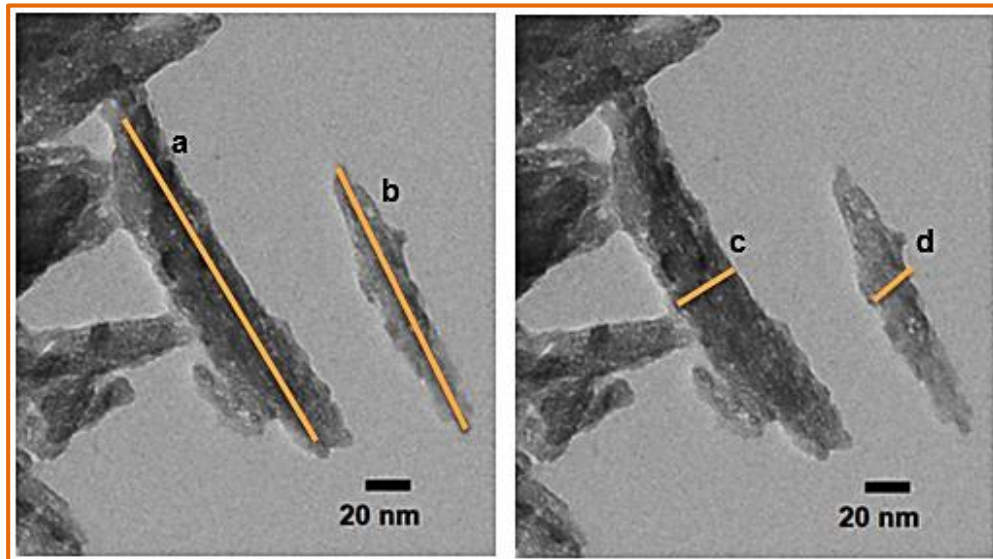


Figura 21- Medições efetuadas no programa *ImageJ*, a= 188 nm, b= 130 nm, c= 28 nm e d= 16 nm.

Conhecidas as dimensões das nanopartículas é possível calcular o factor de forma (*Shape factor*), definido como a razão entre o comprimento e a largura dos nanocristais e é dado pela equação:

$$Fs = \frac{L}{I}$$

em que *F_s* é o factor de forma, *L* o comprimento da partícula (m) e *I* a largura desta (m). Segundo Bouyer et al [71], o *F_s* nas nanopartículas de hidroxiapatite obtidas para este método decresce com o aumento da temperatura de síntese. Para partículas com formato de agulha obtidas a baixas temperaturas obtiveram um *F_s* de 5 enquanto que para

partículas com formato mais homogêneo e maior espessura obtidas a temperaturas superiores o valor de F_s foi de 1,25. Para as partículas obtidas neste trabalho o fator de forma dá valores entre 7 e 8.

Os resultados referentes à análise da distribuição granulométrica do pó de hidroxiapatite encontram-se na figura 22. Este método de análise foi feito de duas formas distintas, uma sem e outra contendo desfloculante.

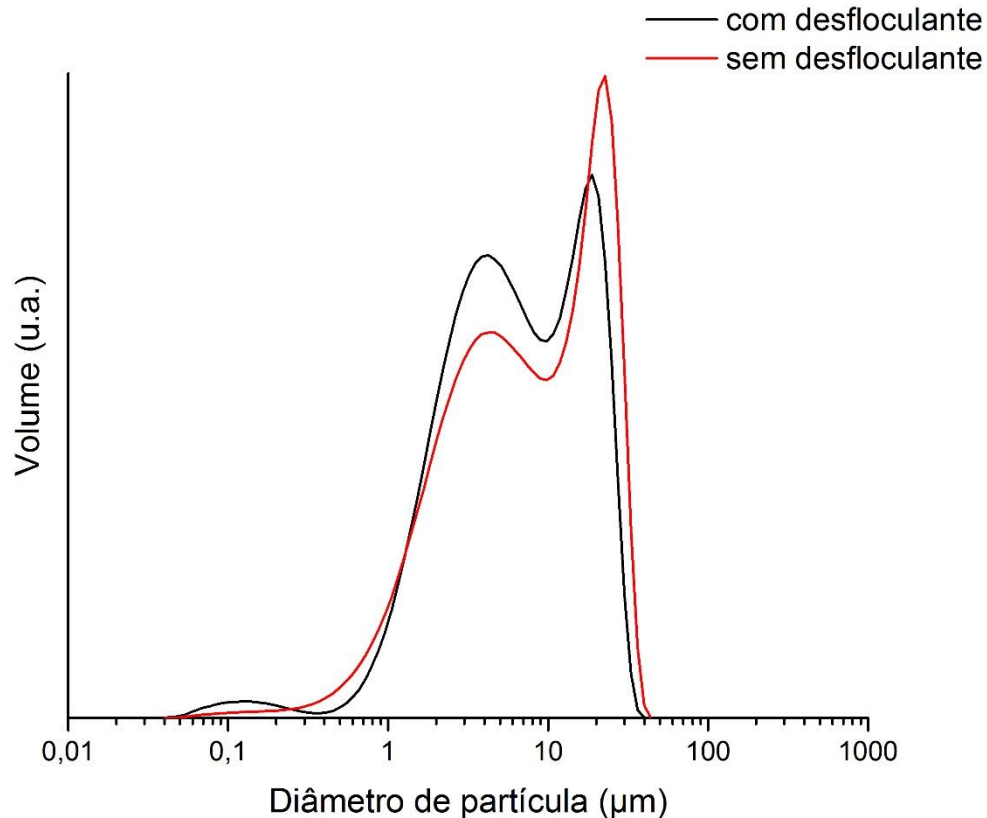


Figura 22- Distribuição granulométrica das partículas precipitadas de hidroxiapatite.

Os gráficos da distribuição granulométrica com ou sem desfloculante traduzem maioritariamente o tamanho dos aglomerados, o que está de acordo com as micrografias de SEM em que se veem grandes aglutinados de partículas de menores dimensões, pelo que os valores obtidos por este método são substancialmente maiores do que os medidos com o auxílio do *Image J*. A análise efetuada sem desfloculante apresenta uma distribuição bimodal com tamanhos de partícula a variar entre 1,625 μm e 26,07 μm , com um valor médio de 11,35 μm , enquanto a análise efetuada na presença de desfloculante apresenta uma distribuição trimodal e valores menores, na gama de 1,705 μm a 21,92

μm , cujo valor médio é de $9,456 \mu\text{m}$. A adição de desfloculante favorece a dispersão das partículas e por esse motivo obtêm-se valores médios de tamanho de partícula inferiores.

A distribuição granulométrica referente às partículas de hidroxiapatite comerciais encontra-se na figura 23.

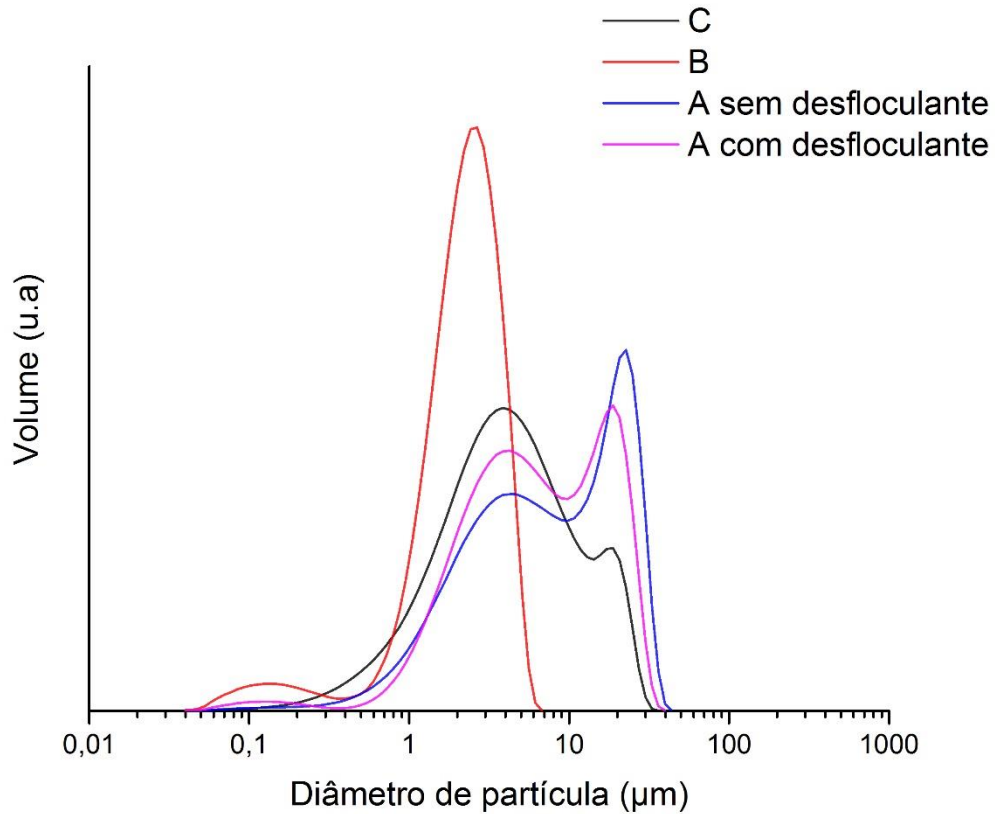


Figura 23- Distribuição granulométrica comparativa entre as partículas de hidroxiapatite obtidas por precipitação química (A) e as partículas de hidroxiapatite comerciais (B: Captal R e C: Merck).

Pela análise da distribuição granulométrica das hidroxiapatites comerciais na figura 23, a hidroxiapatite que aparenta ter tamanhos mais reduzidos é a comercial B, apresentando uma distribuição bimodal com valores a variar entre $0,871 \mu\text{m}$ e $5,613 \mu\text{m}$, cujo valor médio é de $3,012 \mu\text{m}$. A hidroxiapatite comercial C apresenta tamanhos na ordem de $0,992 \mu\text{m}$ a $10,46 \mu\text{m}$ e um valor médio de $4,767 \mu\text{m}$. Contudo, pelas imagens SEM destas amostras, verifica-se que a hidroxiapatite C possui partículas de dimensão menor que a HAp B, pelo que estes resultados podem ser devidos ao elevado estado de aglomeração das partículas de menor dimensão.

No osso natural os cristais de hidroxiapatite são geralmente na forma de agulha ou placa, com tamanhos entre 15-30 nm de largura e 30-50 nm de comprimento [78]. As

partículas de hidroxiapatite que se obtiveram neste trabalho pelo método de precipitação química, apresentam um tamanho e formato próximos dos que se encontram no osso.

Carga superficial

Na figura 24 apresenta-se a curva de potencial zeta referente às partículas de hidroxiapatite precipitada. O ponto isoelétrico destas partículas situa-se em 7,23, sendo este o valor de pH para o qual existe máxima instabilidade. Deste modo, para valores de pH básicos as partículas encontram-se carregadas negativamente tendo maior afinidade para se ligarem a materiais positivamente carregados e para valores de pH ácidos estas adsorvem cargas negativas.

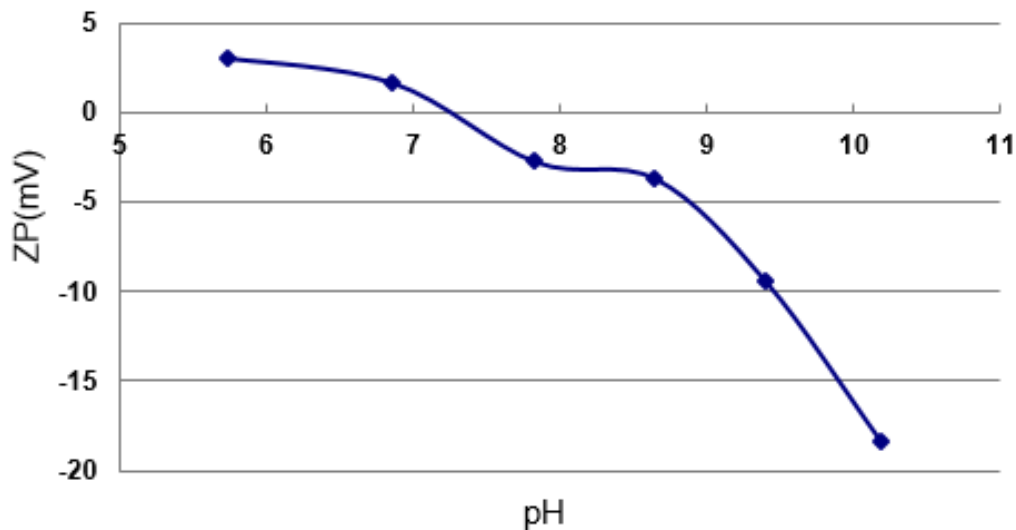


Figura 24- Potencial zeta à temperatura ambiente em KCL das nanopartículas de hidroxiapatite precipitada.

A saliva possui um pH entre 6 e 7, pelo que se presume que quando estas partículas se encontrarem no ambiente da cavidade bucal terão uma carga superficial positiva adsorvendo compostos negativamente carregados. As mucinas constituem o principal grupo de proteínas da saliva e têm um importante papel na proteção da cavidade oral. Estas contêm grupos negativamente carregados, tais como ácido siálico e sulfato apresentando grande afinidade pela hidroxiapatite, sendo um dos principais contribuintes do filme orgânico que se forma sobre as superfícies dos dentes [79]. Deste

modo, é possível que as partículas de hidroxiapatite obtidas neste trabalho possam favorecer a adesão de mucinas à sua superfície.

Isotérmicas de adsorção/dessorção e área superficial

Na figura 25 encontram-se representadas as isotérmicas de adsorção/dessorção dos pós de hidroxiapatite obtidos por precipitação. A isotérmica representada é do tipo IV que indica que este material é mesoporoso. Os resultados do modelo de BET indicam que estas partículas possuem uma elevada área superficial ($112 \text{ m}^2/\text{g}$), como apresentado na tabela 12.

Na figura 26 encontra-se o gráfico das isotérmicas de adsorção/dessorção das hidroxiapatites comerciais em comparação com a hidroxiapatite obtida neste trabalho. Esta parece ser a mais porosa, com base na análise da histerese.

As áreas superficiais das hidroxiapatites comerciais apresentam valores relativamente menores que os da hidroxiapatite precipitada.

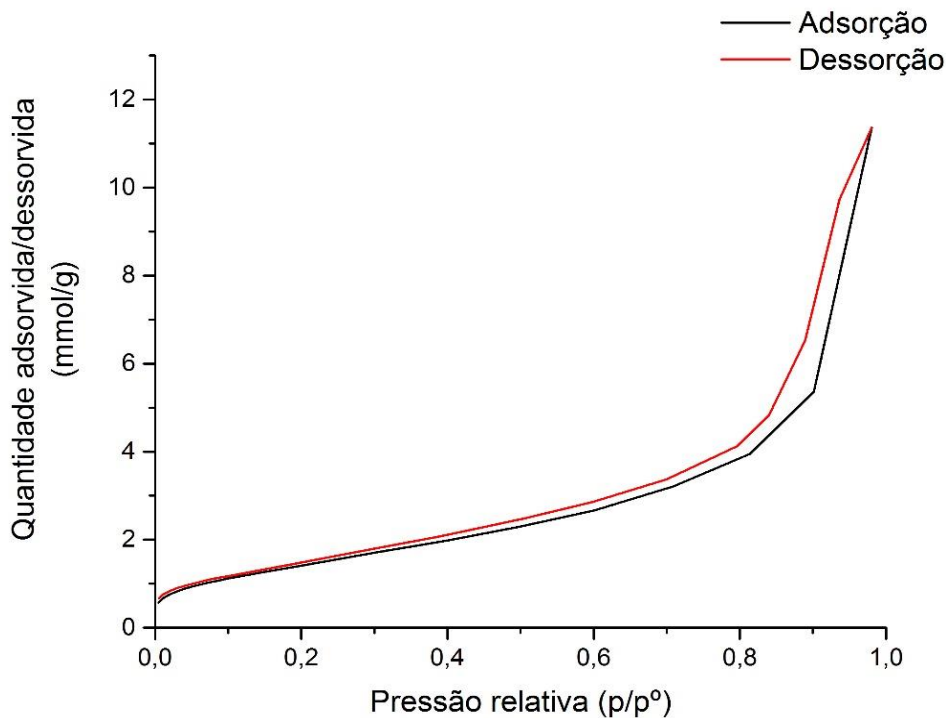


Figura 25- Isotérmicas de adsorção/dessorção dos pós de hidroxiapatite precipitada.

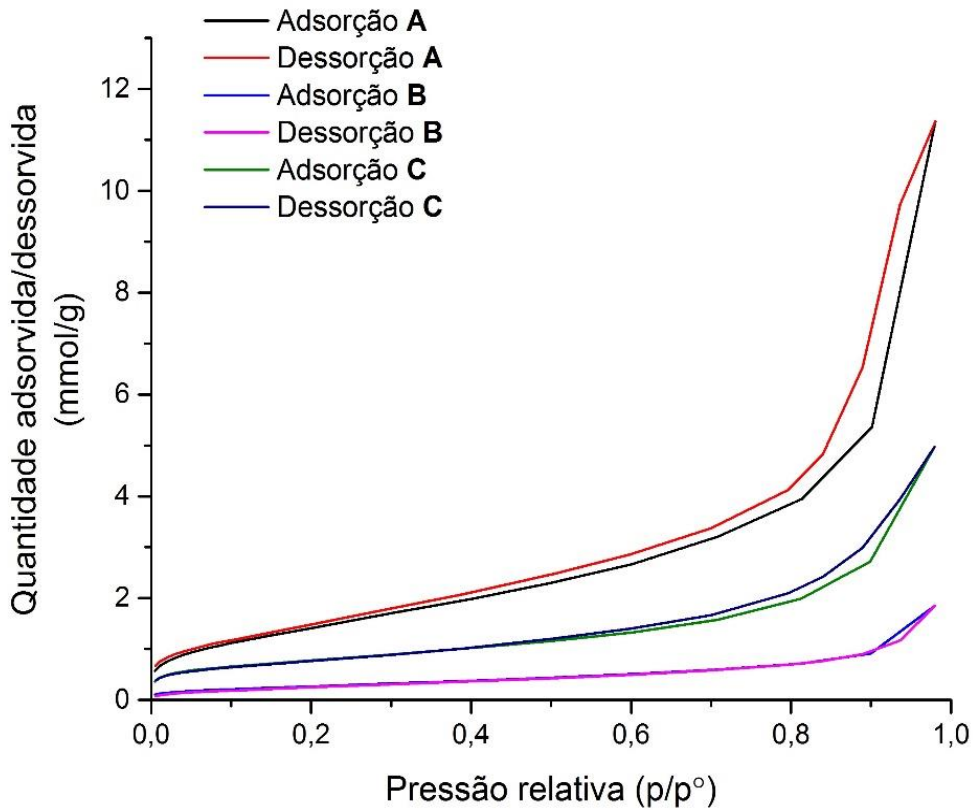


Figura 26- Comparação entre as isotérmicas de adsorção/dessorção das hidroxiapatites comerciais (B e C) e da hidroxiapatite obtida por precipitação química (A).

Reporta-se na literatura [71] que a área superficial das partículas de HAp obtidas pelo mesmo método utilizado neste trabalho, depende da temperatura de síntese. Para valores de temperatura de 25 °C os autores obtiveram áreas superficiais mais elevadas (~75m²/g) do que para síntese a temperaturas mais elevadas (85°C) às quais conseguiram áreas superficiais de ~50m²/g.

Tabela 12- Área superficial das hidroxiapatites comerciais (B e C) e da hidroxiapatite obtida neste trabalho (A).

Área superficial pelo método de BET (m ² /g)		
A	B	C
112	21	61

Composição e ligações químicas

Os resultados relativos ao espectro de infravermelhos com transformada de Fourier realizado a amostras de HAp obtida por precipitação encontram-se na figura 27.

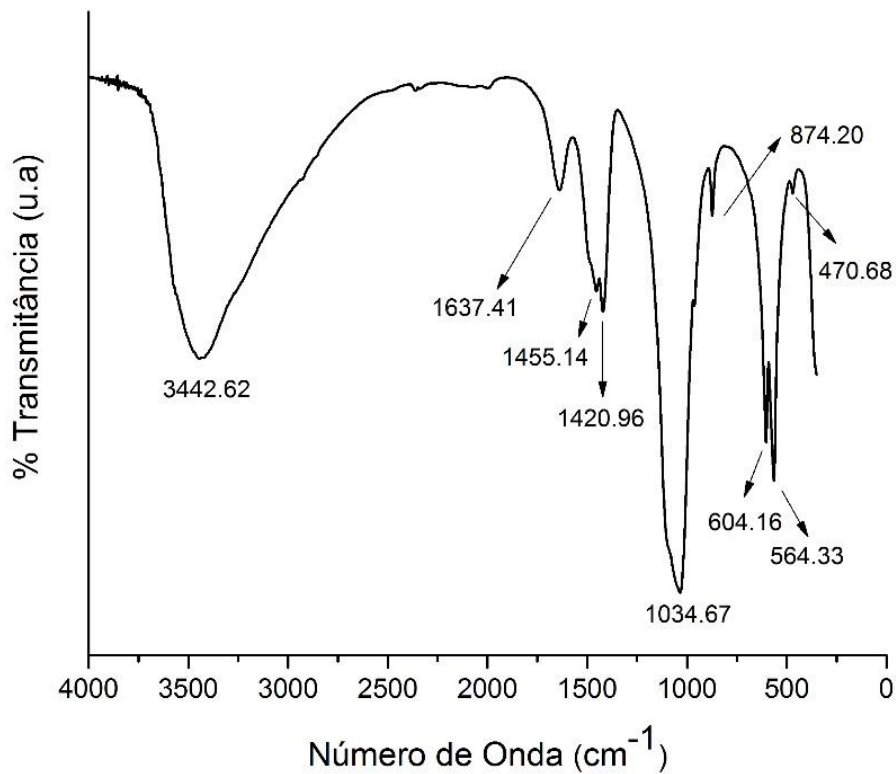


Figura 27- Espectro de infravermelhos com transformada de Fourier da hidroxiapatite obtida por precipitação.

O pico de FTIR presente a 3443 cm^{-1} corresponde ao alongamento e flexão dos grupos hidroxilo (OH^-) [80]–[82]. É detetado um pico a 1637 cm^{-1} que é atribuído à presença de água associada à hidroxiapatite [83]. Os picos a 874 cm^{-1} e na banda de $14221\text{--}1455\text{ cm}^{-1}$ são devido à presença do grupo CO_3^{2-} [81]–[84]. Os valores relativos à presença de PO_4^{3-} são $471, 564, 604, 963$ e 1035 cm^{-1} [81]–[84].

Este processo de obtenção de nanopartículas de hidroxiapatite foi repetido de modo a garantir-se a reprodutibilidade dos resultados, tendo-se obtido partículas sempre com as mesmas características, o que mostra que o método é rápido, fácil e bastante eficaz.

4.2. Caracterização das partículas de vidro

As partículas de vidro obtidas foram caracterizadas através de DRX, SEM e FTIR. Foi também analisada a distribuição granulométrica, área superficial e potencial zeta.

Fases cristalinas

A figura 28 mostra o difractograma de raios-x do vidro obtido por frita, verificando-se que este é globalmente amorfo, não indicando a presença de picos específicos.

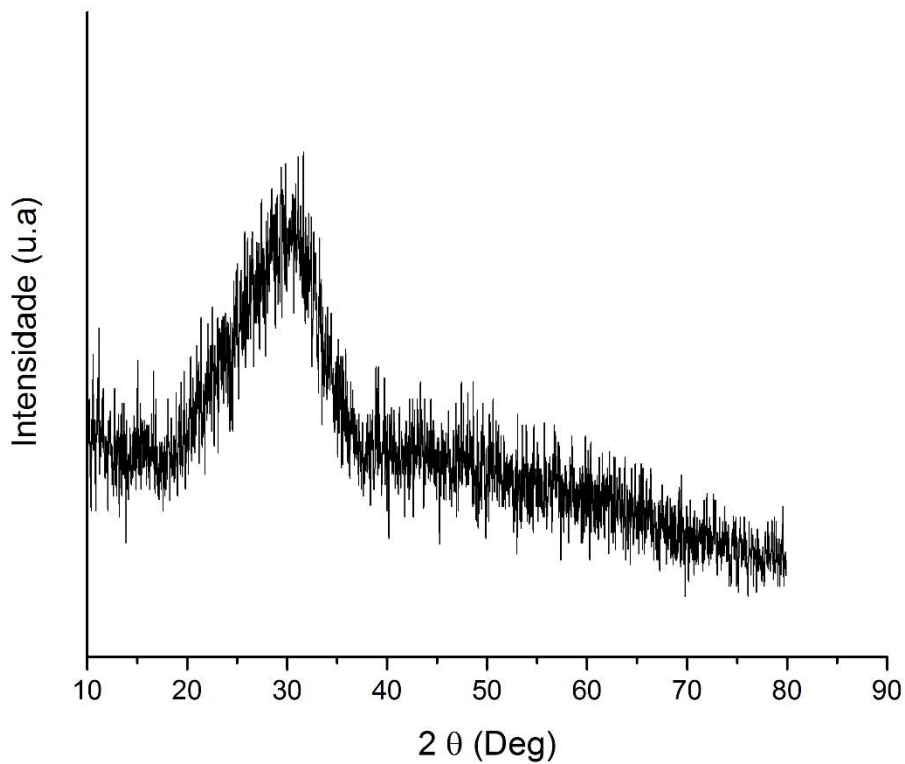


Figura 28- Espectro de difração de raios-x do vidro bioativo obtido neste trabalho.

Morfologia e tamanho de partícula

As imagens de microscopia eletrônica de varrimento revelam que estas partículas apresentam um formato irregular e uma larga distribuição de tamanhos, sendo estes inferiores a 20 μm como se pode ver na figura 29. Foi também medido o tamanho de algumas partículas através do programa *Image J*.

Os resultados referentes à distribuição de tamanhos de partículas (figura 30), estão em concordância com os do SEM, indicando que as partículas de vidro têm um valor médio de tamanho na ordem dos 4,35 μm , a variar entre 0,40 e 11,33 μm , pelo que se conclui que as partículas são maioritariamente menores que 20 μm , respeitando a separação efetuada no procedimento experimental.

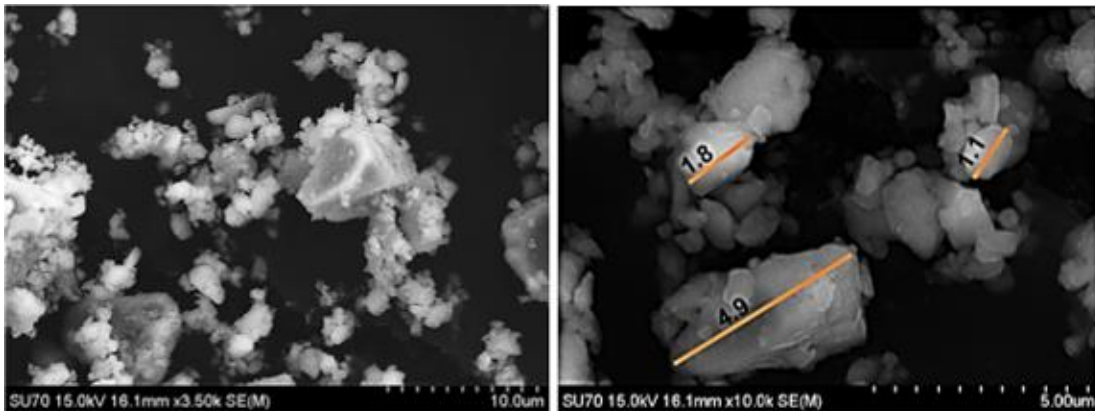


Figura 29- Micrografia de SEM das partículas de vidro bioativo obtidas por frita. Medidas por *ImageJ* de algumas partículas (variação entre 4.9 e 1.1 μm).

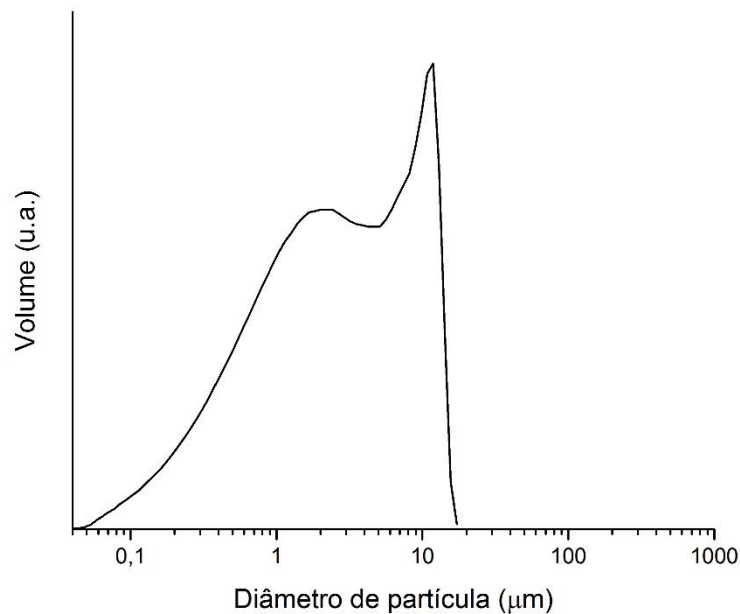


Figura 30- Distribuição granulométrica das partículas de vidro obtido por frita.

Carga superficial

Foi realizado o estudo do potencial zeta para as partículas de vidro, não se tendo encontrado o ponto isoelétrico na gama de pH testado (Figura 31). Contrariamente ao que se verificou no caso da hidroxiapatite, no vidro as partículas encontram-se sempre negativamente carregadas pelo que quando expostas ao ambiente da cavidade bucal com um pH da saliva entre 6 e 7, terão tendência a adsorver cargas positivas.

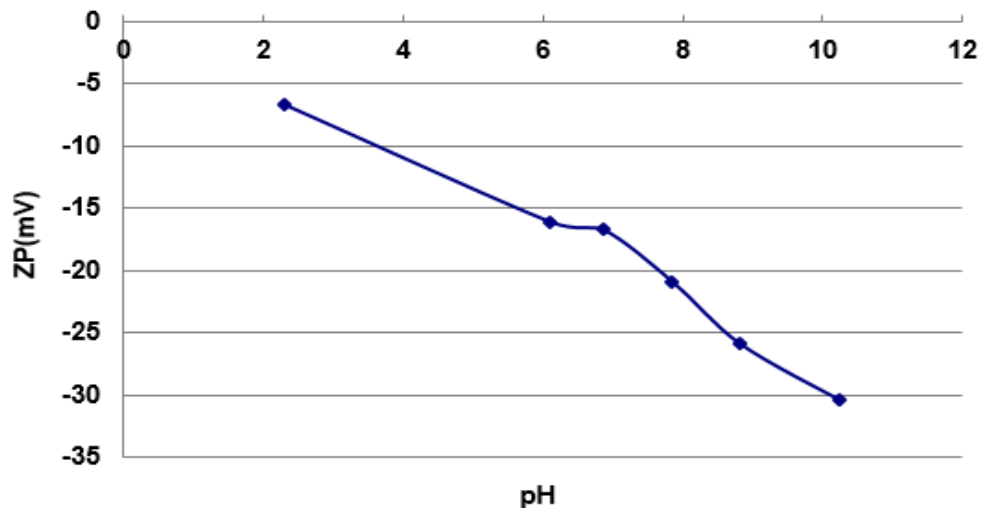


Figura 31- Potencial zeta a temperatura ambiente em KCL das partículas de vidro obtidas.

A adesão é um dos parâmetros que pode influenciar a capacidade das células proliferarem e se diferenciarem e esse conhecimento tem vindo a ser aplicado para produzir materiais com superfícies eletricamente carregadas [85]. Em superfícies negativamente carregadas o número de osteoblastos parece aumentar significativamente [86].

De acordo com Lu et al. [87] a presença de cargas negativas na superfície do Bioglass® *in vitro* contribui para a formação da camada de apatite, e *in vivo*, constatou-se o aumento da proliferação de osteoblastos e crescimento ósseo.

Neste contexto, espera-se que as partículas de vidro bioativo deste trabalho, por possuírem uma superfície negativamente carregada promovam a adesão de osteoblastos e favoreçam o crescimento ósseo, quando expostas ao pH existente na cavidade oral.

Isotérmicas de adsorção/dessorção e área superficial

A figura 32 representa a isotérmica de adsorção/dessorção obtida para as partículas de vidro bioativo, concluindo-se que as mesmas não apresentam porosidade. A quantificação da área superficial pelo método de BET indica que estas partículas apresentam uma área superficial específica relativamente baixa, $7\text{m}^2/\text{g}$.

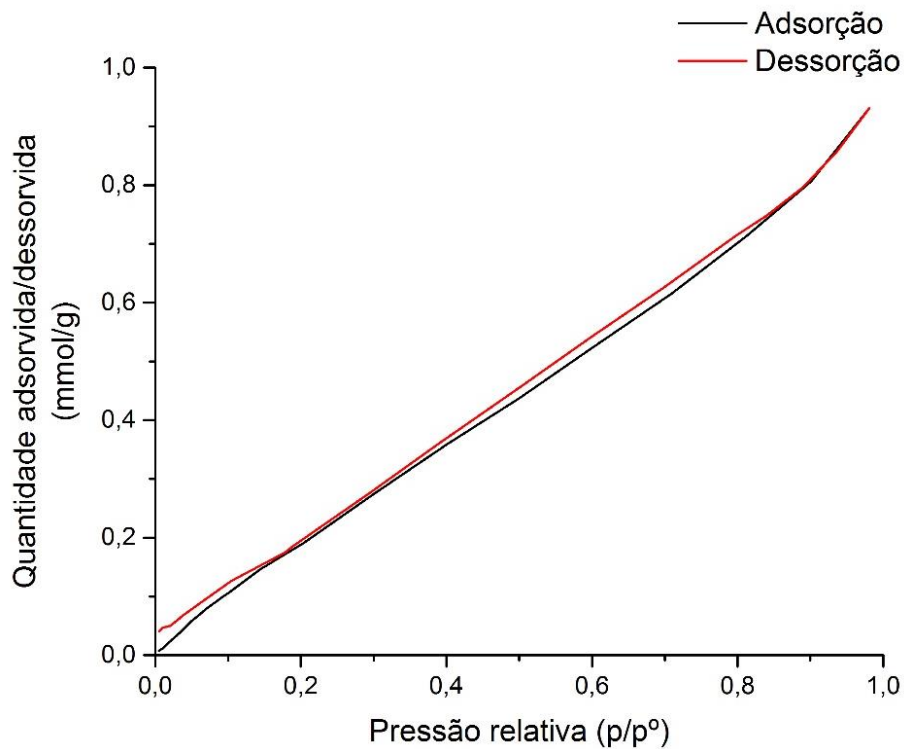


Figura 32- Isotérmica de adsorção/dessorção das partículas de vidro.

Ligações químicas

Foi realizada a espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier ao vidro bioativo. Pela análise dos picos pode concluir-se que os valores a 522 e 563 cm^{-1} , indicam a flexão da ligação P-O [61], [88], [89], a 724 cm^{-1} está presente um pico relativo ao estiramento simétrico da ligação Si-O-Si [88], [90]. Os valores de 950 e 1050 cm^{-1} , correspondem ao estiramento assimétrico da ligação Si-O-Si [61], [88], [90]. Os valores de 1419 e 1508 devem-se à presença de carbonatos de cálcio, resultantes da reação do CO_2 atmosférico com o cálcio presente na superfície do vidro [61], [89]. O valor de 1632 cm^{-1} corresponde à presença de H_2O [61] e, por fim, o pico a 2364 cm^{-1} é referente à presença de CO_2 atmosférico no interior do equipamento [61]. Estes valores estão assinalados no gráfico da figura 33.

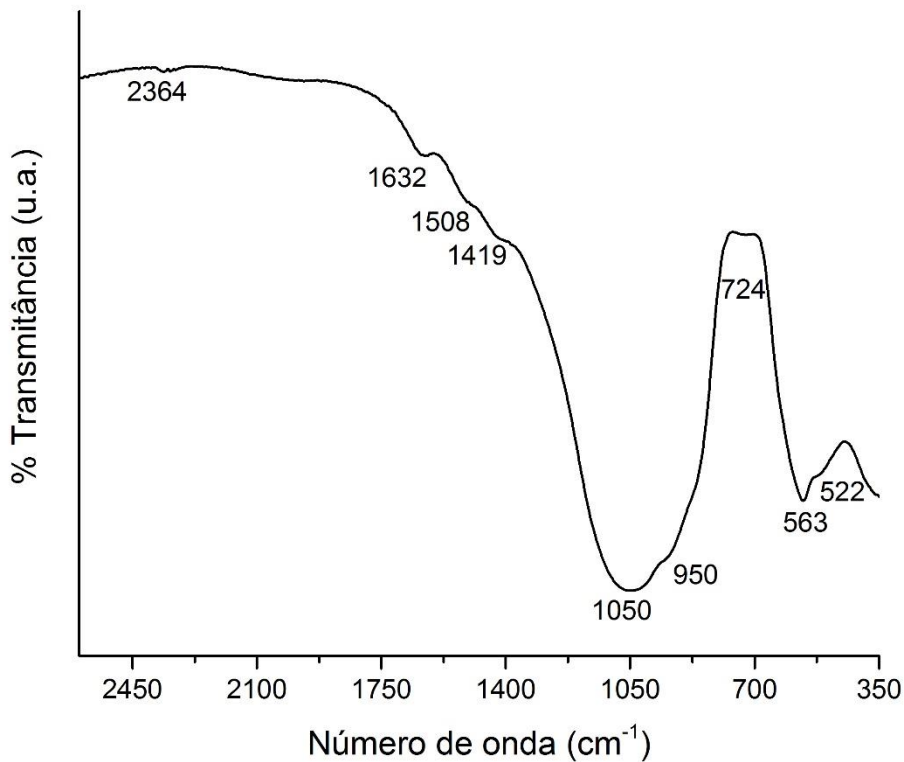


Figura 33- Espectro de infravermelhos com transformada de Fourier do vidro obtido.

4.3. Caracterização das membranas compósitas obtidas por liofilização

No âmbito deste trabalho foram produzidos vários tipos de membranas para regeneração. De acordo com a metodologia apresentada no capítulo 3, as membranas foram preparadas por liofilização, processo pelo qual é possível eliminar o solvente da solução previamente congelada. Todo o processo ocorre sob vácuo.

Foram obtidos dez tipos diferentes de membranas, umas contendo enchimento de nanopartículas de hidroxiapatite e outras contendo partículas de vidro em diferentes percentagens. Posteriormente foram caracterizadas através de DRX e SEM e foram selecionadas para os testes de bioatividade em SBF e de degradação em saliva humana as que se aparentaram menos desintegradas. Foi também caracterizada por SEM e EDS uma membrana comercial, para efeitos de comparação.

A tabela 13 resume todos os tipos de membranas obtidas, das quais posteriormente se apresentarão os resultados de caracterização.

Tabela 13- Diferentes tipos de membranas obtidas e sua composição.

Membrana	Composição	% Enchimento	Prensagem
Mpadrão	Colagénio	-----	Não
Mpadrão_p	Colagénio	-----	Sim
MHAp5	Colagénio+Hidroxiapatite	~29%	Não
MHAp10	Colagénio+Hidroxiapatite	~45%	Não
MHAp30	Colagénio+Hidroxiapatite	~71%	Não
MHAp_p	Colagénio+Hidroxiapatite	~29%	Sim
MVB5	Colagénio+Vidro bioativo	~29%	Não
MVB10	Colagénio+Vidro bioativo	~45%	Não
MVB30	Colagénio+Vidro bioativo	~71%	Não
MVB_p	Colagénio+Vidro bioativo	~29%	Sim

Foram fotografadas (figura 34) as 10 membranas obtidas neste trabalho, bem como duas membranas comerciais, Bio-Gide® e Jason Membrane®, para comparação do aspeto morfológico.



Figura 34- Membranas obtidas por liofilização. A: MHAp5; B: MHAp10; C: MHAp30; D: MHAp_p; E: MVB5; F: MVB10; G: MVB30; H: MVB_p; I: Mpadrão; J: Mpadrão_p; K: Membrana Bio-Gide®; L: Jason Membrane®; M: Vista lateral da membrana padrão sem prensagem; N: Vista lateral da membrana padrão prensada; O: Vista lateral da membrana Bio-Gide®; P: Vista lateral da Jason Membrane®;

As membranas MHAp30 e MVB30 não foram submetidas a qualquer tipo de caracterização, pois como se pode observar nas fotografias, não reuniam condições para poderem ser trabalhadas devido ao elevado estado de deterioração atribuído ao alto conteúdo de enchimento (~71%). As membranas com enchimento que apresentaram melhores condições de manipulação foram as MHAp5 e MVB5.

Efetuuou-se o DRX das membranas MHAp5, MHAp10, MVB5 e MVB10 (Figura 35). A análise do difractograma de raios-x das membranas contendo hidroxiapatite mostra que a fase presente não corresponde à hidroxiapatite mas sim a outro composto de Ca e P- a bruxite. O gráfico das isotérmicas de solubilidade dos fosfatos de cálcio a diferentes pH apresentado no capítulo da revisão da literatura (Figura 8), pode ajudar a explicar o resultado. Com efeito, no processo de preparação das membranas, foi feita uma suspensão em que as partículas de hidroxiapatite foram adicionadas a um meio ácido (colagénio+ ácido acético), de pH aproximadamente 3. Com base na figura 8, para valores de pH inferiores a 5, a fase mais estável é a bruxite (DCPD) [66]. Assim, presume-se que durante o processo de congelação, terá ocorrido um rearranjo dos iões Ca e P para a forma de bruxite. Verifica-se ainda nestas membranas, uma maior intensidade dos picos referentes à bruxite para a membrana com menor percentagem de enchimento, revelando maior cristalinidade.

Nas membranas MVB5 e MVB10 e no colagénio utilizado para a síntese destas, não se detetam picos por serem materiais amorfos.

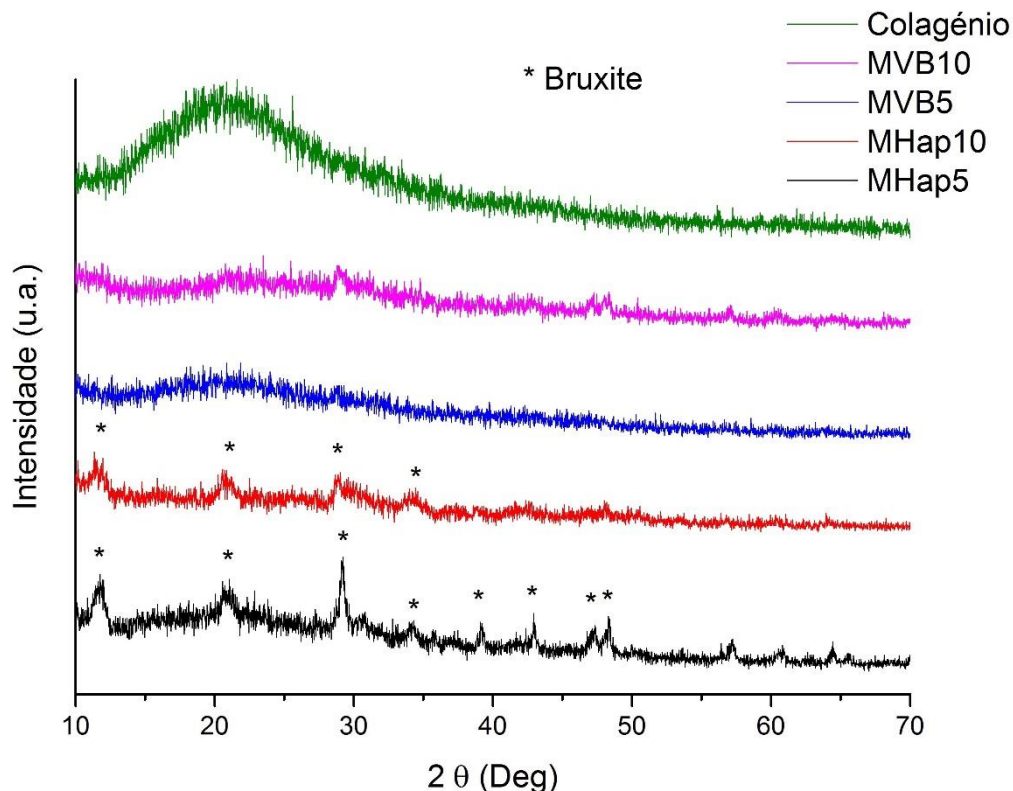


Figura 35- Difractogramas de raios-x das membranas MVB5, MVB10, MHAp5 e MHAp10, obtidas por liofilização.

Também se procedeu à observação por microscopia eletrónica de varrimento das membranas MHAp5, MHAp10, MVB5, MVB10, Mpadrão, Mpadrão_p bem como a dois

tipos de membranas comerciais, Bio-Guide membrane® e Jason Membrane®. (Figuras 36 e 37). A membrana Bio-Guide é constituída por colagénio do tipo I e III porcino. A Jason Membrane® da Botiss é também constituída maioritariamente por colagénio do tipo I e algum colagénio de tipo III de pericárdio porcino. Ambas as membranas comerciais possuem superfícies diferentes de cada um dos lados: o lado superior que deve ficar voltado para a parte gengival apresenta menor porosidade e o lado inferior que ficará em contacto com a parte óssea apresenta um aspeto mais irregular com maior porosidade. A membrana Bio-Guide® apresenta uma estrutura mais densa, que lhe fornece uma maior resistência. Não se conhecem os processos de fabricação destas membranas comerciais, no entanto, a membrana Jason Membrane® é a que mais se assemelha às membranas obtidas neste trabalho pois apresenta um aspeto menos denso. Na figura 38 encontram-se as imagens de SEM da membrana Mpadrão sem prensagem e Mpadrão_p prensada, verificando-se a perda de alguma porosidade nas estruturas prensadas.

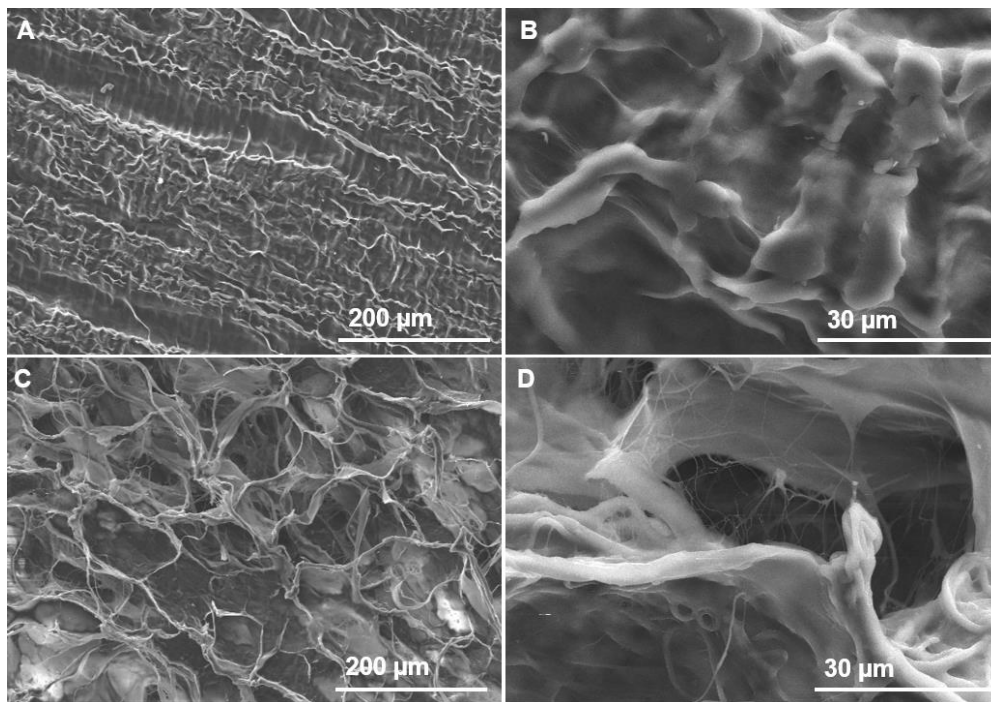


Figura 36- Micrografias de SEM da membrana comercial Jason Membrane. A e B: Vista superior; C e D: Vista inferior. Ampliações (200x e 1500x).

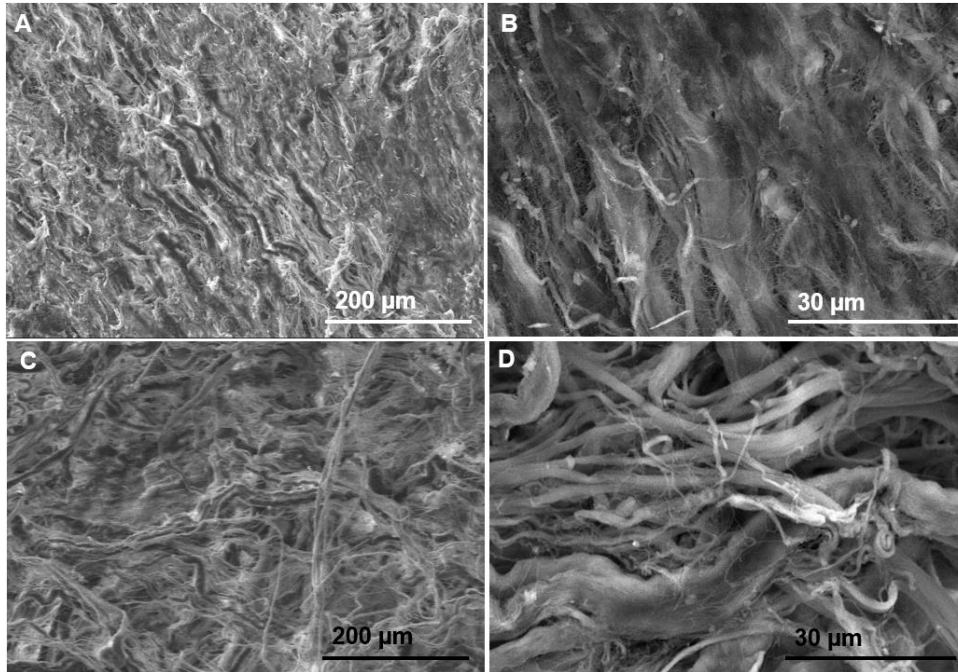


Figura 37- Micrografias de SEM da membrana comercial Bio-Gide. A e B: Vista Superior; C e D: Vista inferior. Ampliações (200x e 1500x).

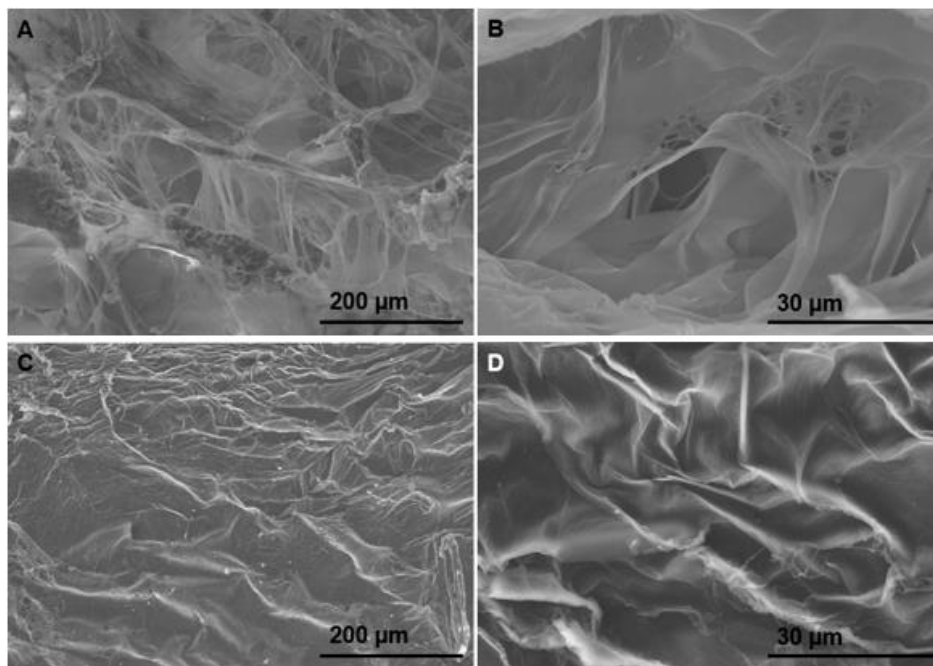


Figura 38- Micrografias de SEM das membranas sem enchimento: Mpadrão (A e B) e Mpadrão_p (C e D) a diferentes ampliações (200x e 1500x).

As imagens de SEM das membranas compósitas (Figuras 39 e 40) mostram a presença de aglomerados de partículas no interior da matriz de colagênio e as membranas compósitas com maior percentagem de enchimento MHAp10 e MVB10 apresentam um aspeto mais desintegrado.

Por comparação das membranas com enchimento com as membranas padrão conclui-se que a adição de partículas é responsável por conferir uma topografia de superfície mais complexa e irregular às membranas. É reportado na literatura que materiais com superfícies mais irregulares permitem uma melhor adesão celular, favorecendo assim a regeneração dos tecidos [91].

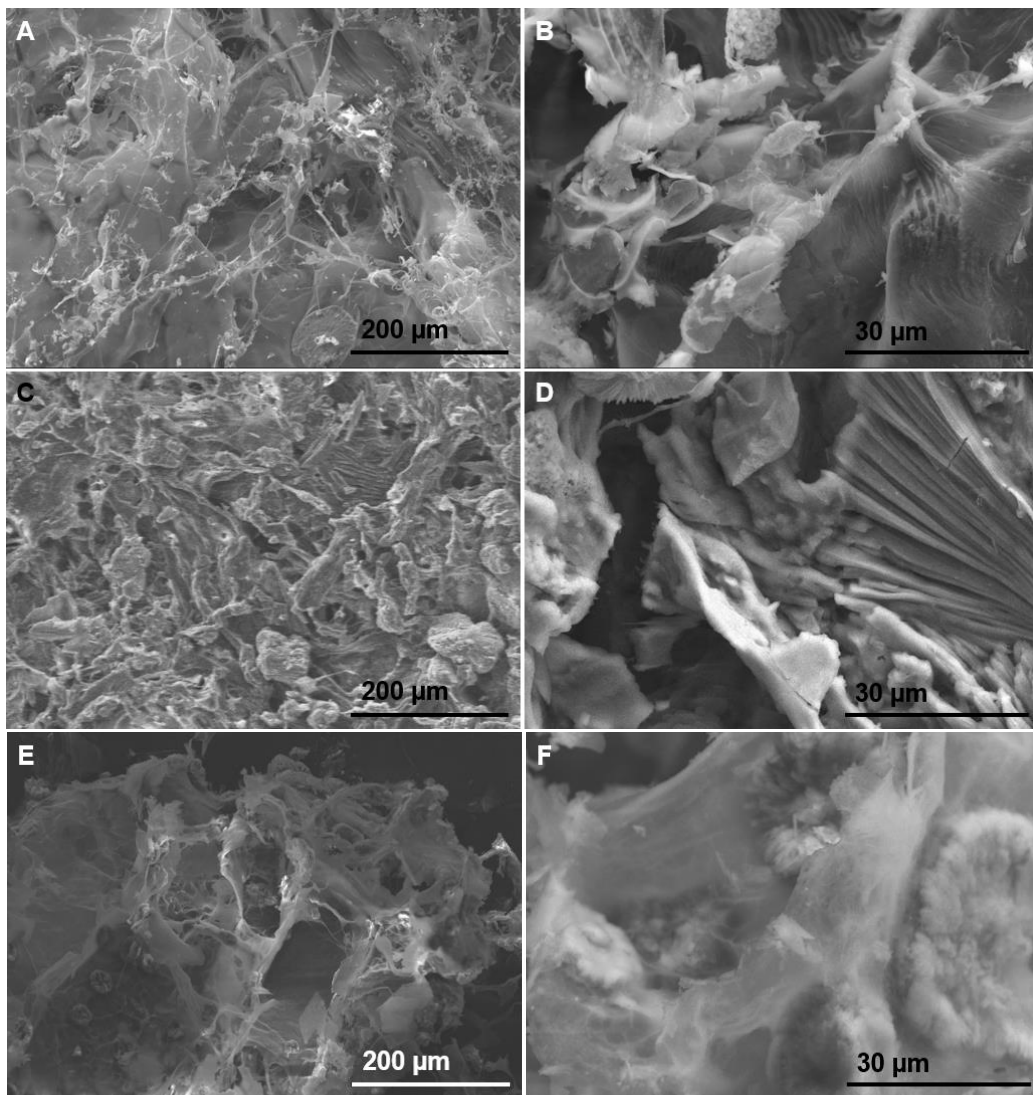


Figura 39- Micrografias de SEM das Membranas com enchimento de hidroxiapatite, membrana MHAp5 (A e B), MHAp_p (C e D) e MHAp10 (E e F). Ampliações (200x e 1500x).

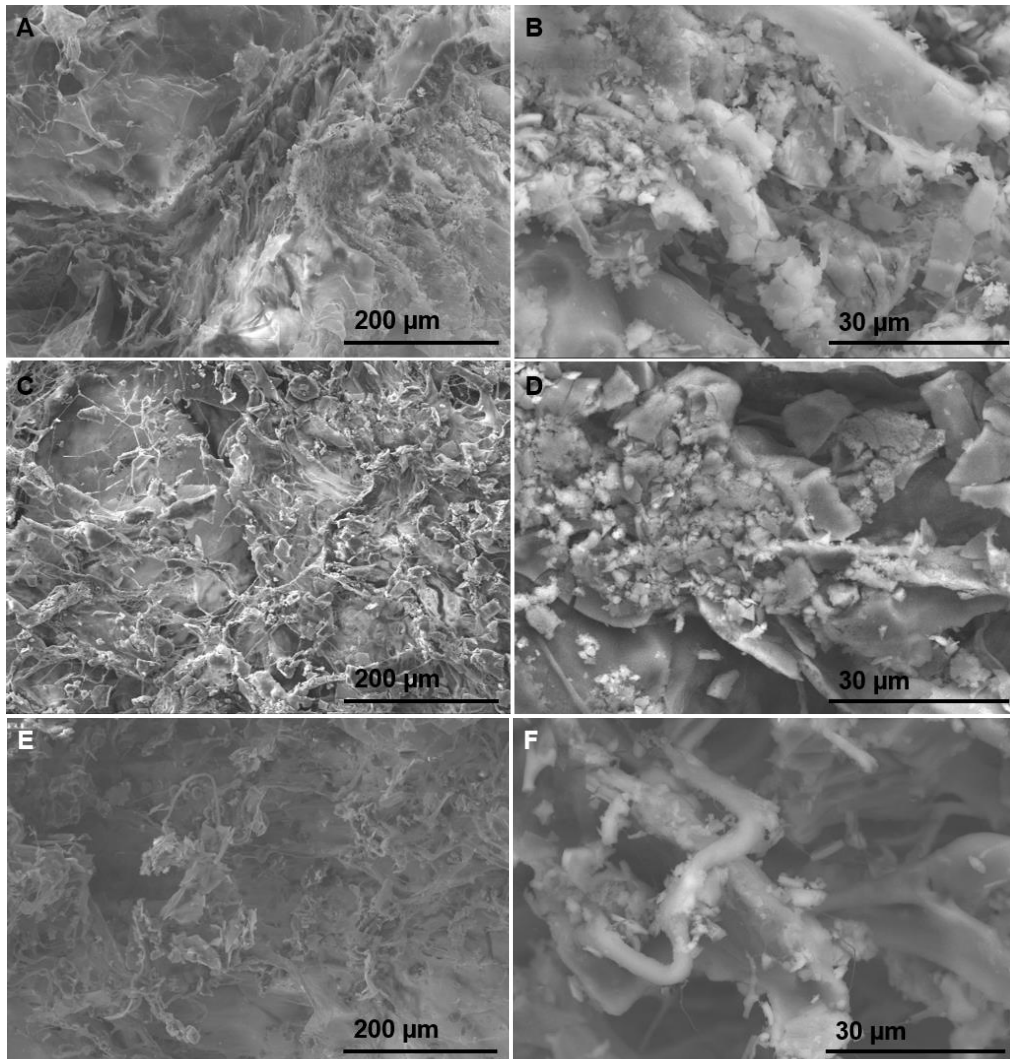


Figura 40- Micrografias de SEM das membranas com enchimento de vidros, membrana MVB5 (A e B), MVB_p (C e D) e MVB10 (E e F). Ampliações (200x e 1500x).

Refere-se na literatura que a função de barreira é melhor conseguida em estruturas de colagénio bastante densas, mas uma elevada densidade torna estas estruturas difíceis de manipular e pode prejudicar a angiogenese [92]. O crescimento de vasos sanguíneos é importante para a nutrição local mas também porque o tecido conectivo de pequenos vasos capilares contém células progenitoras indiferenciadas que podem evoluir para osteoblastos e promover a regeneração óssea. Deste modo, prevê-se que as membranas compostas obtidas neste trabalho possam permitir uma boa vascularização pois as suas estruturas não se apresentam demasiado densas.

Juntamente com a observação por microscopia eletrônica de varrimento, efetuaram-se análises químicas por espectroscopia de dispersão de energia (EDS) a várias amostras para detetar a natureza dos elementos presentes. Os resultados do EDS da amostra padrão encontram-se na figura 41, confirmando-se que os elementos presentes são apenas os correspondentes ao colagénio (carbono, oxigénio e nitrogénio). Foi efetuada a mesma análise às membranas comerciais, não se verificando também a presença de qualquer elemento adicional ao colagénio.

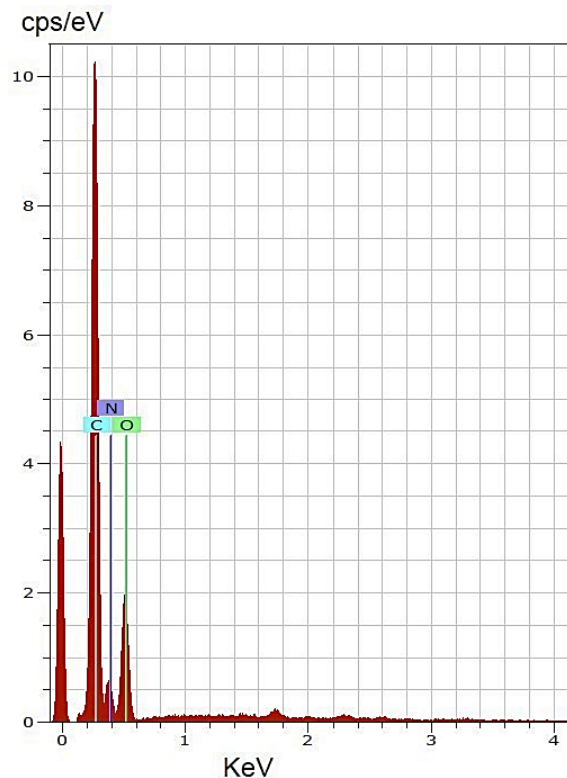


Figura 41- EDS da membrana Padrão (Mpadrão).

Na figura 42 encontram-se os espectros de dispersão de energia das amostras MHAp5 e MVB5. Na amostra MHAp5 encontram-se, para além dos elementos do colagénio (carbono, oxigénio e nitrogénio), cálcio e fósforo e para a membrana MVB5, os elementos magnésio, silício, cálcio e fósforo. Conclui-se que os enchimentos estão presentes na matriz de colagénio e não são detetados outros elementos provenientes de possíveis contaminações.

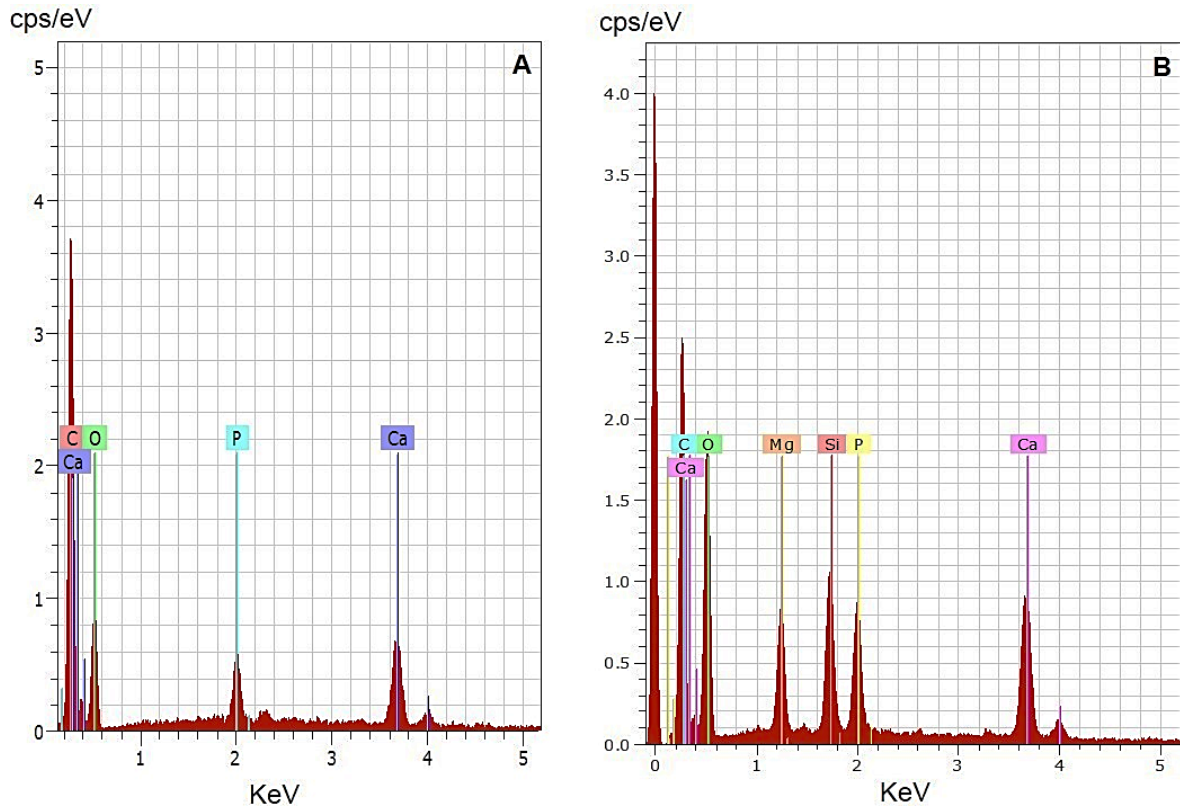


Figura 42- EDS das membranas compósitas. A: MHAp5; B: MVB5.

4.3.1. Bioatividade das membranas em SBF

As membranas MHAp5 e MVB5 foram submetidas a testes em SBF para de determinar o seu potencial bioativo. Tal como referido anteriormente, pedaços de cada um destes tipos de membranas foram imersos em fluido corporal simulado por períodos de tempo de 1, 3 e 7 dias. Após esses períodos as membranas foram lavadas com água milli Q® e secas na estufa a 37°C. Posteriormente, os pedaços de membrana secos foram submetidos a análise de DRX, SEM e EDS, a fim de avaliar a formação de uma camada apatítica nestes materiais, indicadora de uma potencial bioatividade.

Na figura 43 estão representados os espectros de difração de raios-x das membranas compósitas MHAp 5 após os vários tempos de imersão.

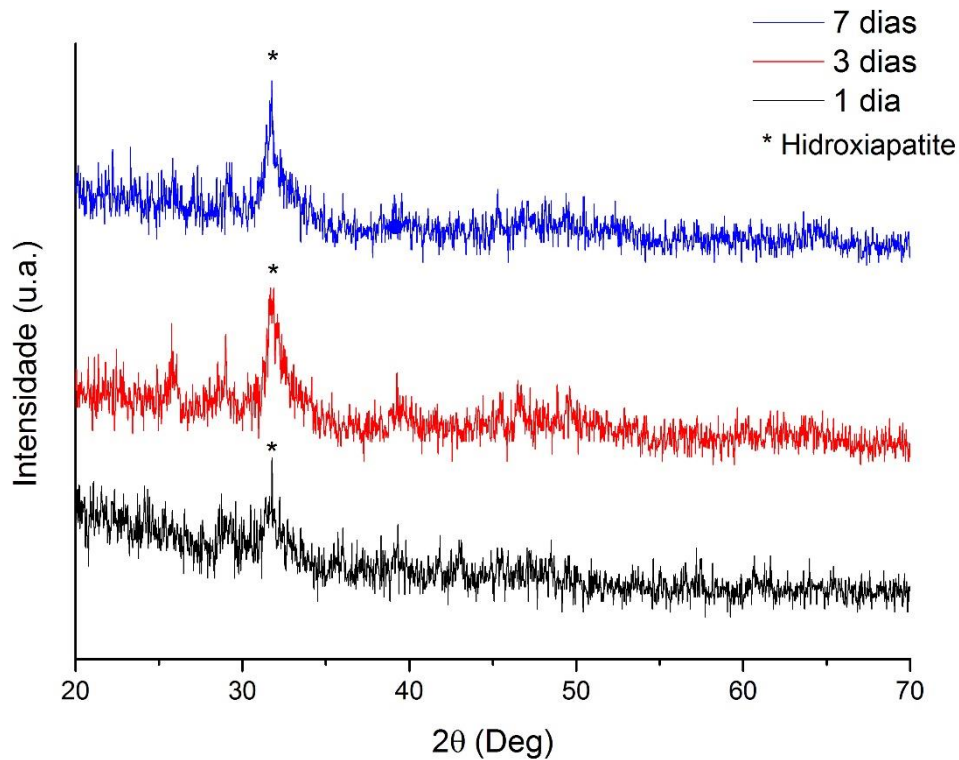


Figura 43- Espetro de difração de raios-x da membrana MHAp5 após os diferentes tempos de imersão em SBF.

O difractograma de raios-x da membrana MHAp5 (figura 42) mostra o aparecimento de um pico correspondente à hidroxiapatite ($2\theta=31,81^\circ$) logo após o primeiro dia de imersão em fluido corporal simulado. Uma vez que a difração de raios-x foi realizada às amostras em Bulk, estes dados indicam que a bruxite formada durante o processo de produção destas membranas, é convertida novamente para a forma de hidroxiapatite durante a incubação. A intensidade do pico correspondente à hidroxiapatite vai aumentando de acordo com o tempo de incubação das amostras, pelo que se presume que esteja a ocorrer a formação de uma camada apatítica à superfície destas membranas.

Quanto aos resultados de difração de raios-x das membranas com enchimento de vidro nos diferentes tempos de imersão em SBF (figura 44), verifica-se o aparecimento de um pico mais intenso após 7 dias de imersão, que corresponde à hidroxiapatite, o que sugere que a camada apatítica nas membranas MVB5 se forma a partir de 7 dias de imersão em fluido corporal simulado.

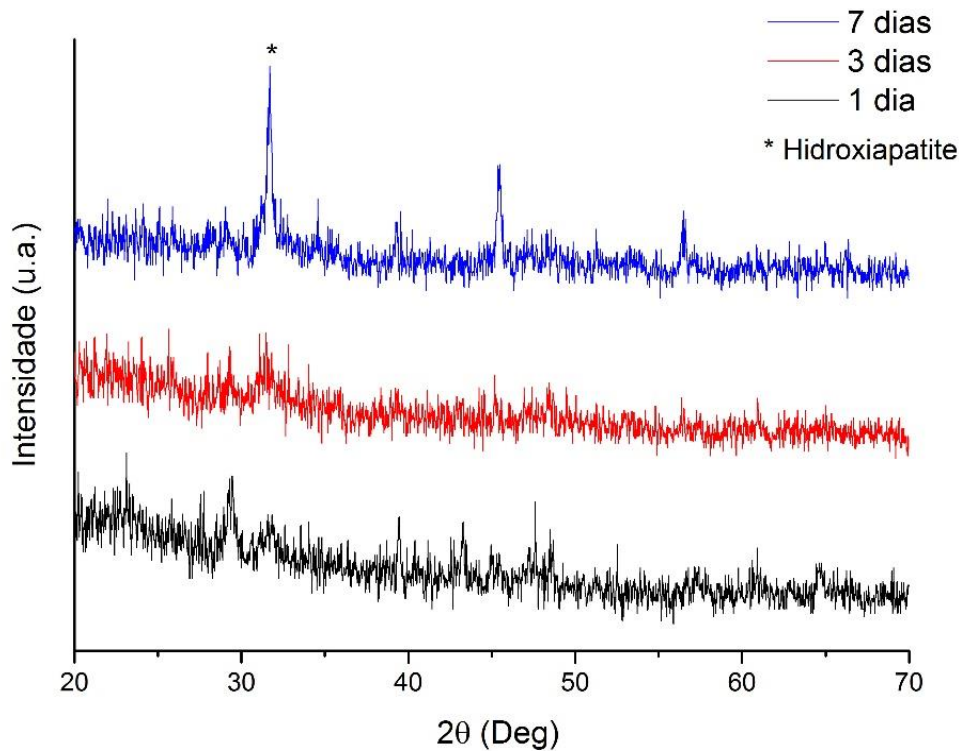


Figura 44- Espectro de difração de raios-x da membrana MVB5 após imersão em SBF 1, 3 e 7 dias.

Após imersão em SBF dos diferentes períodos de tempo, efetuaram-se micrografias de SEM às membranas de modo a avaliar eventuais modificações nas suas superfícies. Observa-se que as membranas perdem alguma porosidade, apresentando uma estrutura mais compacta. É também possível observar a presença de algumas partículas na superfície destas membranas (Figuras 45 e 46), provavelmente correspondentes a depósitos apatíticos, relacionados com a bioatividade das membranas.

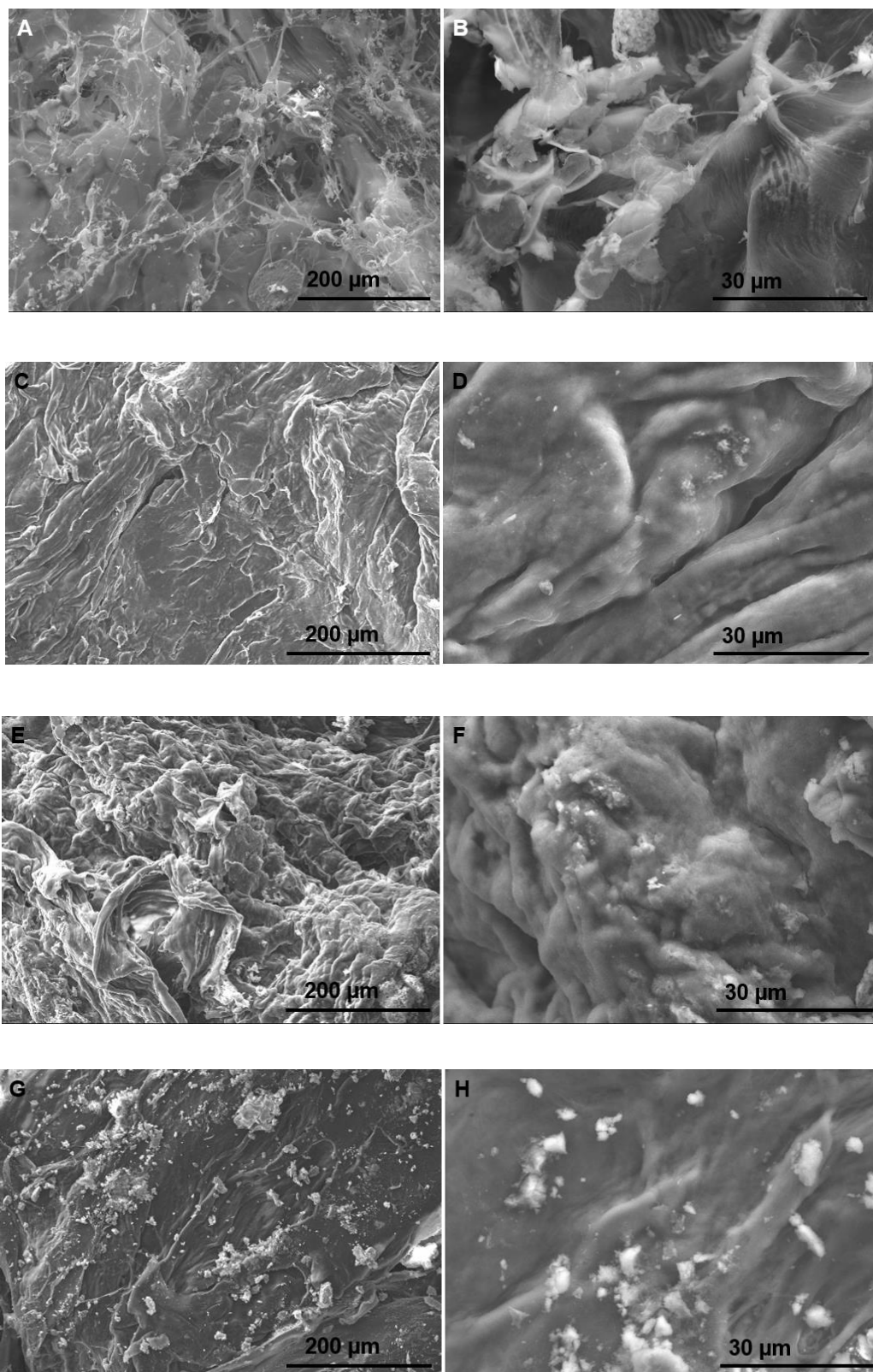


Figura 45- Micrografias de SEM das membranas MHAp5 após imersão de 0 (A e B), 1 (C e D), 3 (E e F) e 7 (G e H) dias em SBF, a diferentes ampliações (200x e 1500x).

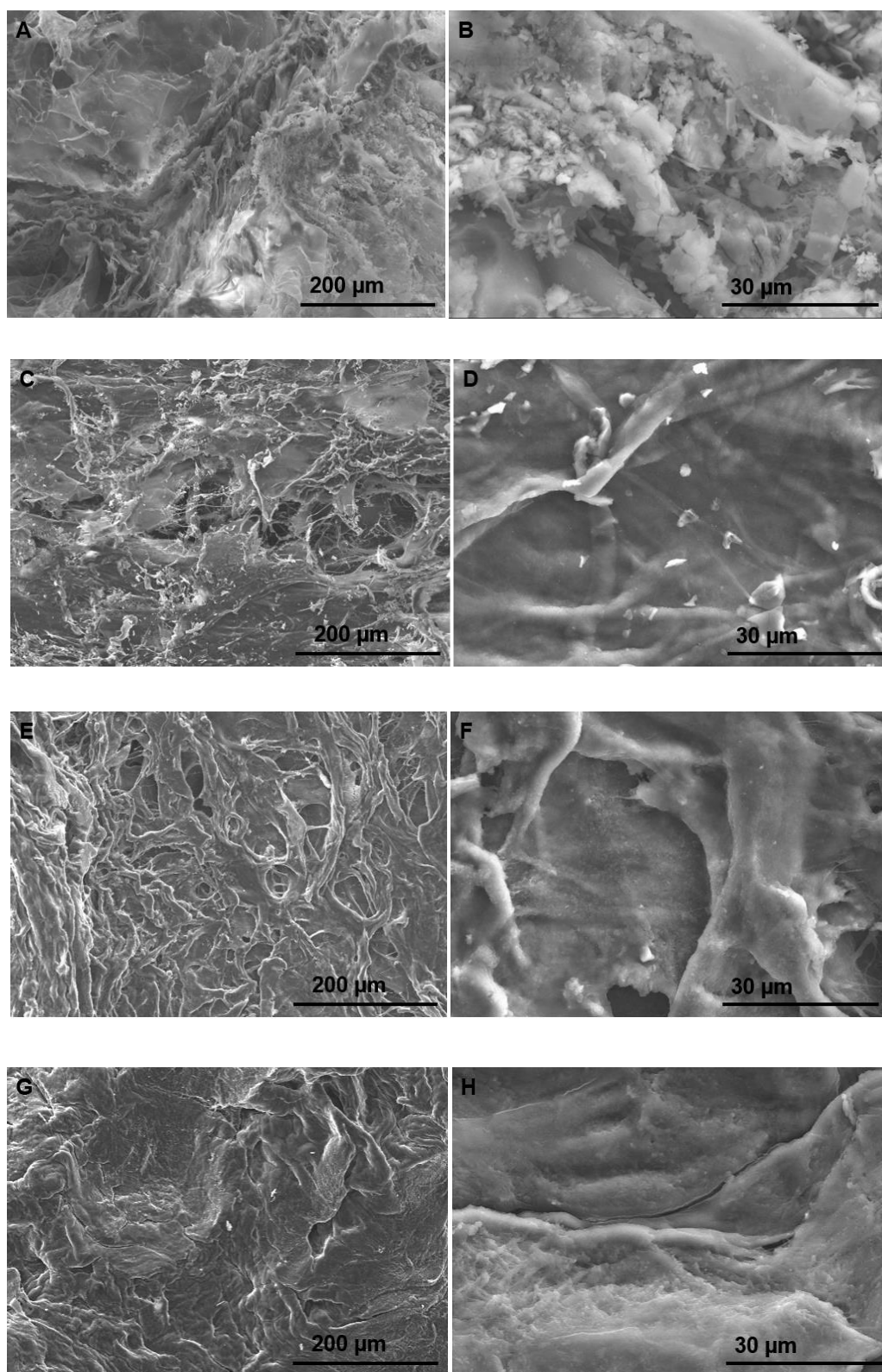


Figura 46- Micrografias de SEM das membranas MVB5 após imersão de 0 (A e B), 1 (C e D), 3 (E e F) e 7 (G e H) dias em SBF, a diferentes ampliações (200x e 1500x).

4.3.2. Testes de degradação em saliva

As membranas MHA_p5, MHA_p_p, MVB5, MVB_p, Mpadrão e Mpadrão_p, foram submetidas a testes de degradação em saliva.

Não são reportados na literatura muitos estudos relacionados com a degradação e comportamento de membranas dentárias em contacto com a saliva. No entanto este tipo de análises é importante, uma vez que o primeiro contacto destas estruturas quando colocadas na cavidade oral é com a saliva e, em determinados casos, pode haver a possibilidade de a membrana ficar exposta e assim ocorrer um contacto direto permanente com o fluido da cavidade bucal.

Liao et al. [93] realizaram um estudo da degradação de uma membrana compósita de PLGA/colagénio/hidroxiapatite incubada em saliva artificial através de medidas de perda de massa e observaram a morfologia destas por SEM após vários tempos de incubação. O material compósito apresentou uma taxa de degradação mais lenta que a membrana de PLGA. Presume-se que seja devido a alterações locais de pH para valores menos favoráveis à degradação pela saliva.

Tal como referido no capítulo do procedimento experimental, foram coletadas salivas de 3 dadores diferentes e foi efetuada uma medição de concentração de proteínas das diferentes amostras, cujos valores se encontram na tabela 14.

Tabela 14- Valores de concentração de proteína [P] e absorvância (A260,A280) obtidos por leitura da densidade ótica.

	Densidade ótica			
	Dador 1	Dador 2	Dador 3	Tampão
A260 (nm)	5,08	3,55	4,82	0,012
A280 (nm)	6,7	4,39	5,94	-0,041
[P] (µg/ml)	4652	3230	3782	4

Após a medição, as diferentes membranas ficaram incubadas em cada uma das salivas durante diferentes períodos de tempo (0, 24 e 120 horas). No final de cada tempo, foi recolhida uma porção do sobrenadante e medidos novamente os valores de concentração de proteína. O gráfico da figura 47 mostra a variação da percentagem de concentração de proteínas no sobrenadante de cada membrana ao longo do tempo calculada através da equação:

$$\text{Variação da percentagem de concentração de proteínas no tempo } x = \frac{[P]_{\text{tempo } x} - [P]_{\text{tempo } 0}}{[P]_{\text{tempo } 0}}$$

em que x representa os diferentes tempos de incubação.

A figura 47, mostra que, após 24 horas de incubação, o sobrenadante da membrana MHAp5 foi o que apresentou o maior aumento de concentração de proteínas seguido de um acentuado decréscimo para as 120 horas. Para a membrana prensada MHAp_p e para as membranas Mpadrão e Mpadrão_p, ocorreu decréscimo da concentração de proteínas ao longo de todo o tempo de incubação, até 120 horas. Nos sobrenadantes das membranas MVB5 e MVB_p verifica-se também um aumento de concentração após as 24 horas e posterior diminuição ao longo do tempo, embora não tão acentuada como a que ocorreu para a membrana MHAp5.

De um modo geral, as membranas prensadas foram menos degradadas que as membranas não prensadas, excluindo o caso das membranas padrão, em que se verificou o contrário. Presume-se que a prensagem, ao produzir a perda de alguma porosidade nas membranas, reduz a área superficial exposta ao fluido oral comparativamente com as membranas sem prensagem. Assim, a quantidade de saliva que entrará em contacto com as membranas prensadas será menor, ocorrendo menor degradação.

O facto de a membrana MHAp5, não prensada, ter como enchimento nanopartículas de HAp pode explicar a sua maior degradação ao fim de 24 horas. Em virtude da sua elevada área superficial específica (112 m²/g) as partículas de HAp são muito reativas e, no processo de degradação das membranas compósitas podem ficar expostas à saliva, favorecendo-se a sua degradação.

A figura 47 mostra também que, para a generalidade das membranas, a concentração de proteínas no sobrenadante decresce acentuadamente após 24 horas de incubação, sendo esse decréscimo particularmente notório no caso das membranas compósitas com enchimento de nanopartículas de HAp. A análise da variação do potencial zeta das partículas de hidroxiapatite com o pH (Figura 24) permite concluir que, na gama de pH habituais da saliva (6 a 7) as partículas de HAp possuem potencial zeta positivo, o que favorece a adesão de proteínas com cargas de superfície negativa. De entre os vários constituintes da saliva, as mucinas aparecem como o grupo de proteínas em maior percentagem e são caracterizadas por apresentarem grupos de carga negativa, tais como ácido siálico e sulfato, com capacidade de ligação à hidroxiapatite e locais de adesão ao colagénio [79]. Deste modo, pode explicar-se a diminuição da concentração de proteínas que ocorreu após a incubação em saliva das membranas de MHAp5 e

MHAp_p. A afinidade de algumas proteínas da saliva com as membranas em estudo pode ser indicativa da sua potencial capacidade de regeneração no ambiente fisiológico em que se inserem. Estudos mais sistemáticos e focados são necessários para ajudar a clarificar o processo de degradação das membranas compósitas.

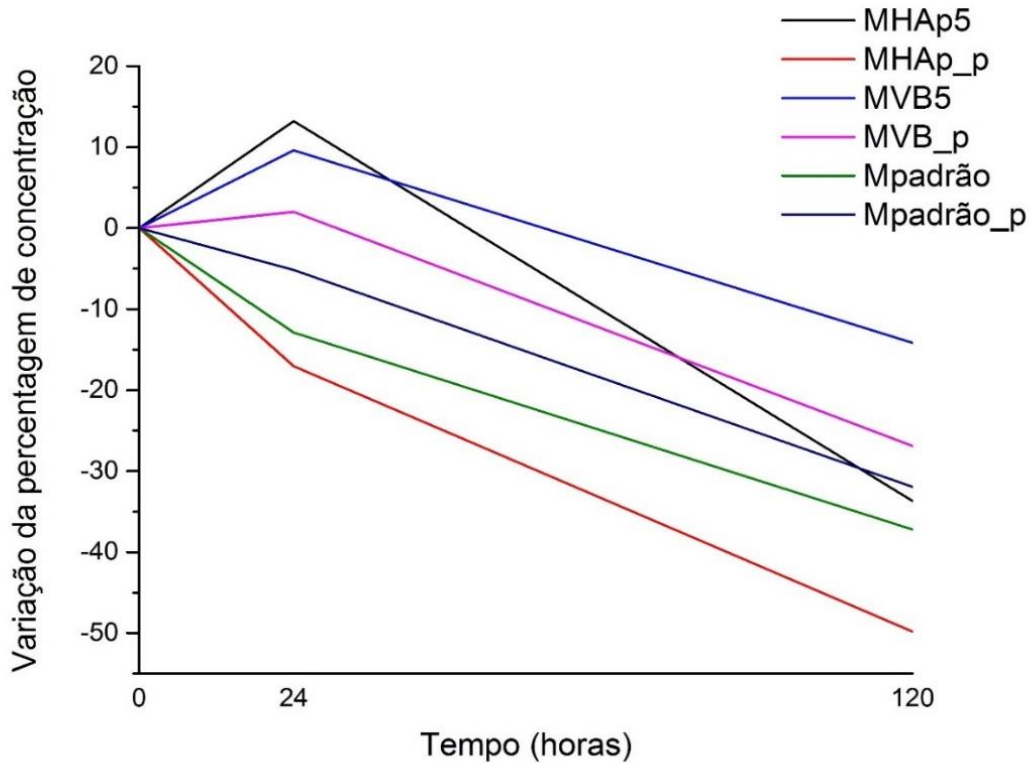


Figura 47- Ensaios de incubação em saliva das várias membranas estudadas. Variação com o tempo, da porcentagem de proteína presente no meio sobrenadante de cada membrana.

De modo a complementar os resultados da concentração de proteínas obtidos pela leitura da densidade óptica do sobrenadante das membranas após os vários tempos de incubação, foi feita a análise da degradação do colagénio das membranas por eletroforese capilar e por SDS-PAGE.

Na figura 48 encontram-se os resultados obtidos por eletroforese capilar para o colagénio utilizado na preparação das membranas, previamente submetido a condições desnaturantes. Apresentam-se também os resultados para o que restou de uma das membranas (Mpadrão) que estiveram incubadas em saliva durante 120 horas, previamente solubilizada em ácido acético 2 M e liofilizada.

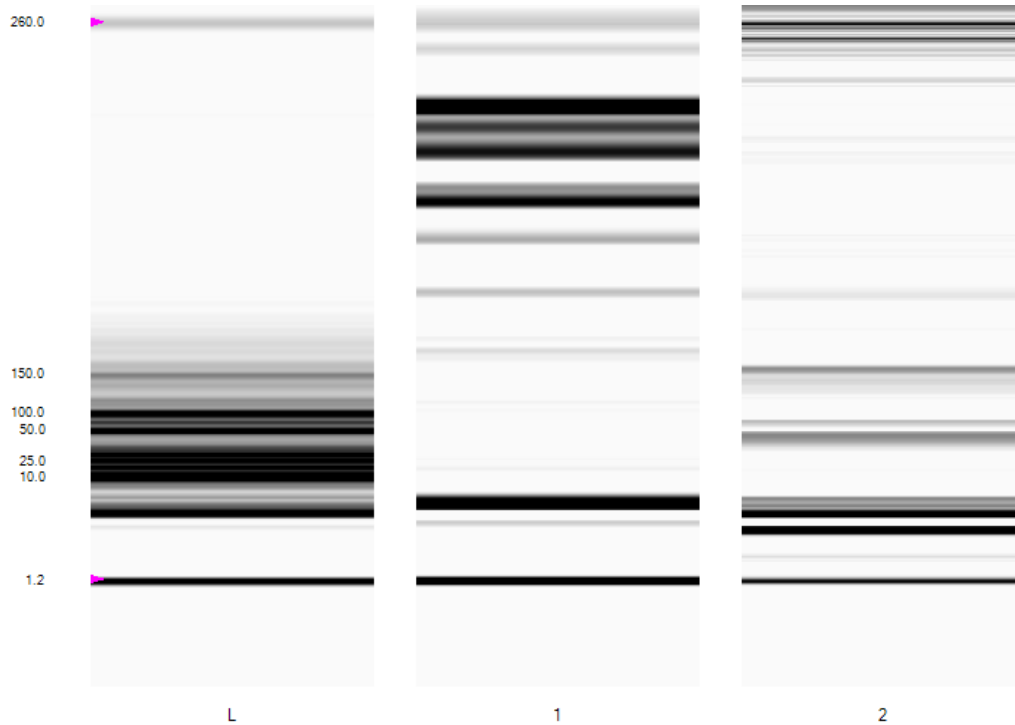


Figura 48- Perfil de degradação do colagénio analisado através de eletroforese capilar usando o sistema Experion (BioRad). L: Ladder com uma gama de pesos moleculares de 1.2 a 260 KDa. 1: colagénio utilizado para síntese das membranas. 2: colagénio de membrana após 120h de incubação em saliva.

Pela análise dos resultados obtidos por eletroforese capilar é possível observar diferenças entre os perfis de degradação do colagénio puro e do colagénio remanescente de uma das membranas incubadas em saliva por 120h.

A primeira coluna, identificada como L, corresponde aos padrões de peso molecular, a coluna 1 ao colagénio puro e a coluna 2 ao colagénio da membrana.

Nos valores de peso molecular próximo de 200 encontra-se o colagénio no seu estado menos degradado. Para os valores de 100 a 50 encontram-se as subunidades do colagénio, ou seja, as moléculas de colagénio separadas nas cadeias alfa. Valores inferiores a 50 correspondem a fragmentos de dimensão muito reduzida [94], [95].

É possível observar a presença de bandas maiores na zona dos 200 para o colagénio puro e maior quantidade de bandas entre 50-100 para o colagénio da membrana após incubação. Conclui-se que o colagénio da membrana possui um estado de degradação mais avançado comparativamente ao colagénio puro.

Na figura 49 estão representados os géis de SDS-PAGE do sobrenadante de cada membrana, após os tempos 0, 24 e 120 h de incubação para cada um dos dadores. Pela análise destes, verifica-se que o colagénio se encontra separado nas suas cadeias alfa e que com o aumento do tempo de incubação em saliva, aumenta a degradação deste, aparecendo bandas mais intensas em valores de peso molecular inferiores.

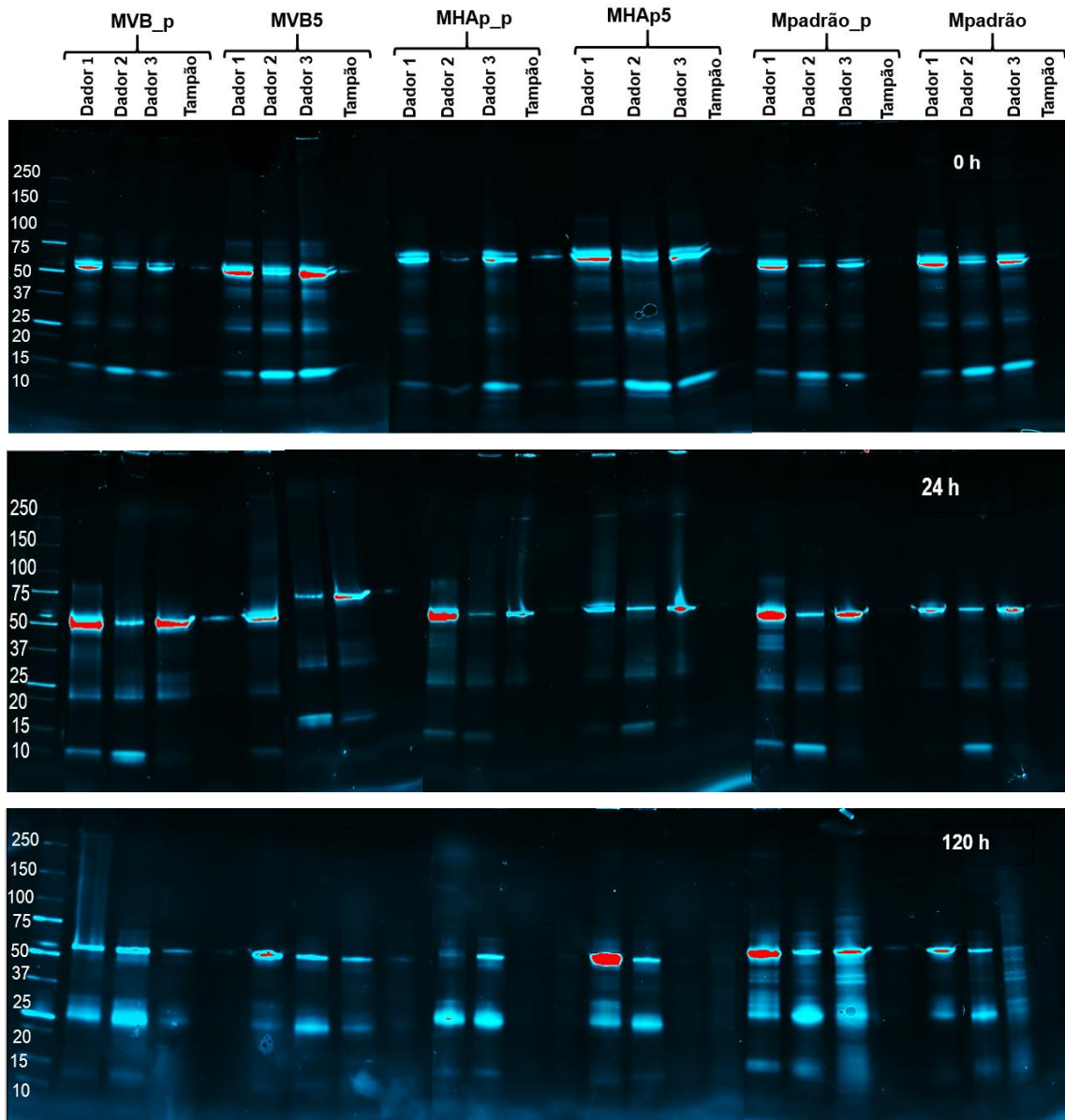


Figura 49- SDS-PAGE dos sobrenadantes das membranas de colagénio após diferentes tempos.

Os dados obtidos pelas análises efetuadas revelam o comportamento destas amostras no ambiente da cavidade oral, em contexto real. As metaloproteínas de matriz (MMPs) são consideradas como um dos constituintes da saliva responsáveis pela degradação do colagénio. Deste modo trabalhos futuros com a incubação destas membranas em MMPs permitirão obter dados mais concretos sobre a atividade colagenolítica da saliva.

Capítulo 5

Conclusões e Futuros Desenvolvimentos

5. Conclusões e Futuros Desenvolvimentos

Este trabalho teve como foco principal a produção de estruturas capazes de regenerar o tecido periodontal. Foram preparadas várias membranas compósitas de colagénio com e sem prensagem, contendo fosfatos de cálcio em diferentes percentagens.

Foi utilizado como matriz para estas membranas o colagénio de tendão de Aquiles e os fosfatos de cálcio preparados para enchimento foram nano partículas de hidroxiapatite e partículas de vidro bioativo.

As nanopartículas de hidroxiapatite foram preparadas por precipitação química e as partículas de vidro foram obtidas por fusão e posterior moagem de fritas.

As partículas de hidroxiapatite obtidas apresentaram um formato semelhante ao que se encontra no osso natural com tamanhos na ordem dos nanómetros (<188 nm) e uma elevada área superficial (112 m²/g). As partículas de HAp apresentaram ainda um ponto isoelétrico em 7,23 o que indica que possuem carga de superfície positiva para pH próximos do pH da cavidade bucal.

Os resultados de caracterização das partículas de vidro mostraram que estas apresentam um tamanho inferior a 20 µm e que possuem um potencial zeta negativo na gama de pH de 2 a 14.

A análise de difração de raios-x das membranas pós-produção, revelou a presença de bruxite, presumindo-se que tenha acontecido a dissolução da hidroxiapatite a pH inferiores a 4, aquando do processo de produção das membranas.

O estudo da bioatividade em fluido plasmático simulado revelou que estas membranas apresentam bioatividade, pois foi possível detetar por DRX a presença de picos referentes a hidroxiapatite após os diferentes tempos de incubação.

A análise do perfil de degradação das membranas em saliva humana revelou que, de um modo geral, as membranas que não foram prensadas estão mais sujeitas a degradação, possivelmente devido ao facto de terem maior área exposta ao fluido oral. As membranas com enchimento de hidroxiapatite são as que apresentam maior degradação ao fim de 24 horas de incubação sendo no entanto esse efeito atenuado para tempos de incubação mais longos (120 horas). Esta atenuação na taxa de degradação parece estar associada à capacidade que as membranas com nanohidroxiapatite possuem de favorecer a adesão de mucinas, formando uma camada à sua superfície que lhes confere proteção.

Como trabalho futuro sugere-se:

- a) Testar outras composições para estas membranas com introdução de outros tipos de enchimentos;
- b) Melhorar as propriedades de degradação destas membranas através de reticulação do colagénio;
- c) Confirmar e estabelecer um protocolo para estudos de degradação das membranas em saliva humana;
- d) Estudar a degradação das membranas por ação de enzimas humanas ou pelo biofilme oral.

Referências

- [1] L. L. Hench, "Biomaterials: a forecast for the future," *Biomaterials*, vol. 19, no. 16, pp. 1419–1423, Aug. 1998.
- [2] R. Langer, "Tissue engineering.," *Mol. Ther.*, vol. 1, no. 1, pp. 12–5, Jan. 2000.
- [3] A. Nanci and D. D. Bosshardt, "Structure of periodontal tissues in health and disease.," *Periodontol. 2000*, vol. 40, pp. 11–28, Jan. 2006.
- [4] B. L. Pihlstrom, B. S. Michalowicz, and N. W. Johnson, "Periodontal diseases.," *Lancet (London, England)*, vol. 366, no. 9499, pp. 1809–20, Nov. 2005.
- [5] S. Ivanovski, "Periodontal regeneration.," *Aust. Dent. J.*, vol. 54 Suppl 1, pp. S118–28, Sep. 2009.
- [6] H.-L. Wang, H. Greenwell, J. Fiorellini, W. Giannobile, S. Offenbacher, L. Salkin, C. Townsend, P. Sheridan, and R. J. Genco, "Periodontal Regeneration," *J. Periodontol.*, vol. 76, no. 9, pp. 1601–1622, Sep. 2005.
- [7] E. Applegate, *Anatomia e Fisiologia*. Elsevier Health Sciences Brazil, 2012.
- [8] B. Young and J. W. Heath, *Wheater's Functional Histology*, Fourth edi. Guanabara koogan S.A, 2000.
- [9] G. Polimeni, A. V. Xiropaidis, and U. M. E. Wikesjo, "Biology and principles of periodontal wound healing / regeneration," *Periodontol. 2000*, vol. 41, no. 24, pp. 30–47, 2006.
- [10] F. Chen and Y. Jin, "Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 15–19, 2010.
- [11] R. Seeley, S. Trente, and P. Tate, *Anatomia e Fisiologia*, 6ª Edição. Lisboa: Lusodidacta, 2005.
- [12] G. Karsenty, "The genetic transformation of bone biology," *Genes Dev.*, vol. 13, no. 23, pp. 3037–3051, Dec. 1999.
- [13] M. M. Stevens, "Biomaterials for bone tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 11, no. 5, pp. 18–25, May 2008.
- [14] A. K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang, and M. J. Buehler, "Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone.," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 1724, Jan. 2013.
- [15] National Institute of Dental and Craniofacial Research, "Periodontal (Gum) Disease: Causes, Symptoms, and Treatments." [Online]. Available: <http://www.nidcr.nih.gov/oralhealth/Topics/GumDiseases/PeriodontalGumDisease.htm>. [Accessed: 17-Jul-2015].
- [16] M. Roy, J. S. Somerson, K. G. Kerr, and J. L. Conroy, "Pathophysiology and Pathogenesis of Osteomyelitis," in *Osteomyelitis*, M. S. Baptista, Ed. InTech, 2012.

- [17] A. Illueca, B. Vera, P. D. G. Cabanilles, V. F. Fernandez, and F. J. G. Loscos, "Periodontal regeneration in clinical practice," *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, vol. 11, pp. E382–92, 2006.
- [18] T. Takata, "Oral wound healing concepts in periodontology.," *Curr. Opin. Periodontol.*, pp. 119–27, Jan. 1994.
- [19] J. Y. Oda and J. de Carvalho, "Cicatrização do periodonto: revisão," *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, vol. 8, no. 2. 22-Apr-2008.
- [20] U. M. E. Wikesjö and K. A. Selvig, "Periodontal wound healing and regeneration," *Periodontol. 2000*, vol. 19, no. 1, pp. 21–39, Feb. 1999.
- [21] A. H. Melcher, "On the repair potential of periodontal tissues.," *J. Periodontol.*, vol. 47, no. 5, pp. 256–60, May 1976.
- [22] L. Rose and B. Mealey, *Periodontics. Medicine, Surgery and Implants*. Elsevier Mosby, 2004.
- [23] S. P. Humphrey and R. T. Williamson, "A review of saliva: normal composition, flow, and function.," *J. Prosthet. Dent.*, vol. 85, no. 2, pp. 162–9, Mar. 2001.
- [24] F. C. Holsinger and D. T. Bui, "Anatomy, Function, and Evaluation of the Salivary Glands," in *Salivary Gland Disorders*, E. N. Myers and R. L. Ferris, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007, pp. 1–16.
- [25] P. D. V De Almeida, a. M. T. Grégio, M. Â. N. Machado, a. a S. De Lima, and L. R. Azevedo, "Saliva composition and functions: A comprehensive review," *J. Contemp. Dent. Pract.*, vol. 9, no. 3, pp. 072–080, 2008.
- [26] S. Mamta, S. Udit, B. Gk, P. Rajesh, and A. Sk, "Oral fluid: Biochemical Composition and Functions: A Review," *J. Pharm. Biomed. Sci.*, vol. 27, no. 14, pp. 508–514, 2013.
- [27] M. Bottino, V. Thomas, G. Schmidt, Y. Vohra, T.-M. Chu, M. Kowolik, and G. Janowski, "Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration a materials perspective," *Dent. Mater.*, vol. 28, no. 7, pp. 703–721, 2012.
- [28] H. Tal, O. Moses, A. Kozlovsky, and C. Nemcovsky, "Bioresorbable Collagen Membranes for Guided Bone Regeneration," in *Bone regeneration*, 2012.
- [29] P. S. Babo, R. L. Pires, R. L. Reis, and M. E. Gomes, "Membranes for periodontal tissues regeneration," *Ciência Tecnol. dos Mater.*, vol. 26, no. 2, pp. 108–117, 2014.
- [30] A. Aurer and K. Jorgic-Srdjak, "Membranes for periodontal regeneration," *Acta Stomatol Croat*, vol. 39, no. 1, pp. 107–112, 2005.
- [31] Y. Zhang, X. Zhang, B. Shi, and R. J. Miron, "Membranes for guided tissue and bone regeneration," *Ann. oral Maxillofac. Surg.*, vol. 1, pp. 1–10, 2013.
- [32] S. M. Kuo, S. J. Chang, G. C. Niu, C. Lan, W. T. Cheng, and C. Z. Yang, "Guided Tissue Regeneration with Use of b -TCP / Chitosan Composite Membrane," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 112, pp. 3127–3134, 2009.

- [33] K. Fujihara, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone / calcium carbonate composite nano-fibers," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 4139–4147, 2005.
- [34] E. Lee, S. Teng, T. Jang, P. Wang, S. Yook, H. Kim, and Y. Koh, "Nanostructured poly (ε-caprolactone)–silica xerogel fibrous membrane for guided bone regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 9, pp. 3557–3565, 2010.
- [35] A. Leal, S. Caridade, J. Ma, N. Yu, M. E. Gomes, R. L. Reis, J. A. Jansen, X. F. Walboomers, and J. F. Mano, "Asymmetric PDLLA membranes containing Bioglass® for guided tissue regeneration: Characterization and in vitro biological behavior," *Dent. Mater.*, vol. 29, pp. 427–436, 2013.
- [36] E. C. Reis, A. Borges, and M. Araújo, "Periodontal regeneration using a bilayered PLGA/calcium phosphate construct," *Biomaterials*, vol. 32, no. 35, pp. 9244–9253, 2011.
- [37] H. Hu, S. Lee, C. Chen, Y. Yang, and J. Yang, "Processing and Properties of Hydrophilic Electrospun Polylactic Acid / Beta-Tricalcium Phosphate Membrane for Dental Applications," *Polym. Eng.*, pp. 2–11, 2013.
- [38] J. Yang, A. Liu, Y. Han, Q. Li, J. Tian, and C. Zhou, "Osteodifferentiation of mesenchymal stem cells on chitosan / hydroxyapatite composite films," *J Biomed Mater Res Part A*, vol. 102, pp. 1202–1209, 2014.
- [39] F. Yang, S. K. Both, X. Yang, X. F. Walboomers, and J. A. Jansen, "Development of an electrospun nano-apatite / PCL composite membrane for GTR / GBR application," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 9, pp. 3295–3304, 2009.
- [40] S. Liao, W. Wang, M. Uo, S. Ohkawa, T. Akasaka, K. Tamura, F. Cui, and F. Watari, "A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite / collagen / PLGA composite membrane for guided tissue regeneration," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 7564–7571, 2005.
- [41] M. C. Phipps, W. C. Clem, S. A. Catledge, Y. Xu, K. M. Hennessy, V. Thomas, M. J. Jablonsky, S. Chowdhury, A. V Stanishevsky, K. Yogesh, and S. L. Bellis, "Mesenchymal Stem Cell Responses to Bone-Mimetic Electrospun Matrices Composed of Polycaprolactone, Collagen I and Nanoparticulate Hydroxyapatite," *PLoS One*, vol. 6, no. 2, pp. 1–8, 2011.
- [42] E. Lee, S. Jun, H. Kim, and Y. Koh, "Collagen – silica xerogel nanohybrid membrane for guided bone regeneration," *J Biomed Mater Res Part A*, vol. 100, pp. 841–847, 2012.
- [43] H. F. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and D. James, *Molecular Cell Biology*, vol. 5. 2008.
- [44] J. Charvolin and J.-F. Sadoc, "About collagen, a tribute to Yves Bouligand.," *Interface Focus*, vol. 2, no. 5, pp. 567–74, Oct. 2012.
- [45] "Pure Gold Collagen® Scientific Research | Anti-Ageing Clinical Proof | Gold Collagen." [Online]. Available: <http://world.gold-collagen.com/skincare-science-and-research/>. [Accessed: 23-Jul-2015].
- [46] H. Wang, M. Modarressi, and J.-H. Fu, "Utilizing collagen membranes for guided tissue regeneration-based root coverage," *Periodontol. 2000*, vol. 59, no. 1, pp. 140–157, 2012.

- [47] D. Rothamel, F. Schwarz, M. Sager, M. Herten, A. Sculean, and J. Becker, "Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat," *clin. oral Implant. Res.*, vol. 16, pp. 369–378, 2005.
- [48] R. Zeeman, "Cross-Linking of Collagen-Based Materials," 1998.
- [49] D. Rothamel, F. Schwarz, A. Sculean, M. Herten, W. Scherbaum, and J. Becker, "Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells," *clin. oral Implant. Res.*, vol. 15, pp. 443–449, 2004.
- [50] K. Thomadaki, J. Bosch, F. Oppenheim, and E. Helmerhorst, "The diagnostic potential of salivary protease activities in periodontal health and disease.," *Oral Dis.*, vol. 19, no. 8, pp. 781–8, 2013.
- [51] T. Sorsa, L. Tjäderhane, and T. Salo, "Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases.," *Oral Dis.*, vol. 10, no. 6, pp. 311–8, 2004.
- [52] T. Ingman, T. Tervahartiala, Y. Ding, H. Tschesche, A. Haerian, D. F. Kinane, Y. T. Kontinen, and T. Sorsa, "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 23, no. 12, pp. 1127–1132, Dec. 1996.
- [53] W. Cao and L. L. Hench, "Bioactive materials," *Ceram. Int.*, vol. 22, no. 6, pp. 493–507, Jan. 1996.
- [54] L. L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 74, no. 7, pp. 1487–1510, 1991.
- [55] R. Z. LeGeros, G. Daculsi, and J. P. Legeros, "Bioactive Bioceramics," in *Musculoskeletal tissue regeneration*, W. Pietrzak, Ed. Humana Press, 2008, pp. 153–181.
- [56] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: from Hench to hybrids.," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4457–86, Jan. 2013.
- [57] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–15, May 2006.
- [58] S. K. Nandi, B. Kundu, and S. Datta, "Development and Applications of Varieties of Bioactive Glass Compositions in Dental Surgery, Third Generation Tissue Engineering, Orthopaedic Surgery and as Drug Delivery System," *Biomater. Appl. nanomedicine*, pp. 69–116, 2011.
- [59] A. Polini, H. Bai, and A. P. Tomsia, "Dental applications of nanostructured bioactive glass and its composites," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 5, no. 4, pp. 399–410, Jul. 2013.
- [60] G. Kaur, O. P. Pandey, K. Singh, D. Homa, B. Scott, and G. Pickrell, "A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 102, no. 1, pp. 254–274, Jan. 2014.
- [61] E. Davim, "Suportes porosos vítreos do sistema Si-Ca-P-Mg para aplicações biomédicas," 2008.
- [62] Z. Abbasi, B. Me, S. Mh, and R. Bagheri, "Bioactive Glasses in Dentistry: A Review," vol. 2, no. 1, pp. 1–9, 2015.

- [63] R. Z. LeGeros, "Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials," *Chemical Rev.*, vol. 108, no. 11, pp. 4742–4753, 2008.
- [64] A. Guastaldi and A. Aparecida, "Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos," *Quim. Nov.*, vol. 33, no. 6, pp. 1352–1358, 2010.
- [65] J. S. Al-Sanabani, A. a Madfa, and F. a Al-Sanabani, "Application of calcium phosphate materials in dentistry.," *Int. J. Biomater.*, vol. 2013, p. 13, 2013.
- [66] L. Wang and G. H. Nancollas, "Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution.," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 11, pp. 4628–69, Nov. 2008.
- [67] A. B. H. Y. and B. C. Şener, *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*. InTech, 2012.
- [68] E. M. Rivera-Muñoz, *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. InTech, 2011.
- [69] H. Shimauchi, E. Nemoto, and H. Ishihata, "Possible functional scaffolds for periodontal regeneration," *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, vol. 49, no. 4, pp. 118–130, 2013.
- [70] N. Y. Mostafa and P. W. Brown, "Computer simulation of stoichiometric hydroxyapatite: Structure and substitutions," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 68, no. 3, pp. 431–437, 2007.
- [71] E. Bouyer, F. Gitzhofer, and M. I. Boulos, "Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 11, no. 8, pp. 523–531, 2000.
- [72] N. A. Almeida, "Efeito da ceramização na reactividade superficial de vidros de Ca-P-Mg-Si," Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2006.
- [73] M. Capela, "Vidros e vitrocerâmicos bioativos e antibacterianos dopados com prata," Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2014.
- [74] F. Rouessac and A. Rouessac, *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, Second Edi. wiley, 2007.
- [75] K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. a. W. Haul, L. Moscou, R. a. Pierotti, J. Rouquérol, and T. Siemieniewska, "REPORTING PHYSISORPTION DATA FOR GAS / SOLID SYSTEMS with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity," *Pure Appl. Chem.*, vol. 57, no. 4, pp. 603–619, 1985.
- [76] Malvern, "Zeta potential theory," *Zetasizer Nano Series User Manual*. pp. 15–1 à 15–12, 2009.
- [77] R. Kuhn and S. Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [78] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y.-Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, and L. B. Gower, "Bone structure and formation: A new perspective," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 58, no. 3–5, pp. 77–116, Nov. 2007.
- [79] D. Vasudevan, S. Sreekumari, and K. Vaidyanathan, *Textbook of Biochemistry for Dental Students: 2nd Edition*, vol. 1. JP Medical Ltd, 2011.

- [80] I. Mobasherpour, M. S. Heshajin, A. Kazemzadeh, and M. Zakeri, "Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method," *J. Alloys Compd.*, vol. 430, no. 1–2, pp. 330–333, Mar. 2007.
- [81] D. N. Ungureanu, N. Angelescu, R. Ion, E. Stoian, and C. Rizescu, "Synthesis and characterization of Hydroxyapatite nanopowders by chemical precipitation method," *J. Nanostructure Chem.*, vol. 4, no. 2, p. 99, 2014.
- [82] L. Berzina-Cimdina and N. Borodajenko, "Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy," *Infrared Spectrosc. – Mater. Sci. Eng. Technol.*, pp. 123–148, 2012.
- [83] T. V. Thamaraiselvi, K. Prabakaran, and S. Rajeswari, "Synthesis of hydroxyapatite that mimic bone mineralogy," *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 19, no. 2, pp. 81–83, 2006.
- [84] C. Santos, P. S. Gomes, J. a. Duarte, R. P. Franke, M. M. Almeida, M. E. V. Costa, and M. H. Fernandes, "Relevance of the sterilization-induced effects on the properties of different hydroxyapatite nanoparticles and assessment of the osteoblastic cell response," *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, no. 77, pp. 3397–3410, 2012.
- [85] M. Amaral, M. . Lopes, J. . Santos, and R. . Silva, "Wettability and surface charge of Si₃N₄–bioglass composites in contact with simulated physiological liquids," *Biomaterials*, vol. 23, no. 20, pp. 4123–4129, Oct. 2002.
- [86] C. Y. Guo, J. P. Matinlinna, and A. T. H. Tang, "Effects of Surface Charges on Dental Implants: Past, Present, and Future," *Int. J. Biomater.*, vol. 2012, pp. 1–5, 2012.
- [87] H. H. Lu, S. R. Pollack, and P. Ducheyne, "Temporal zeta potential variations of 45S5 bioactive glass immersed in an electrolyte solution," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, pp. 80–87, 2000.
- [88] K. M. Ereiba, A. S. Raboh, and A. G. Mostafa, "Characterization of some bioactive glasses based on SiO₂–CaO–P₂O₅–SrO quaternary system prepared by sol–gel method," *Nat. Sci.*, vol. 33, no. 9, pp. 97–105, 2014.
- [89] M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba, and a J. Salinas, "Influence of P₂O₅ on crystallinity of apatite formed in vitro on surface of bioactive glasses," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 46, no. 4, pp. 560–5, 1999.
- [90] J. Serra, P. González, S. Liste, C. Serra, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, H. O. Ylänen, and M. Hupa, "FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 332, no. 1–3, pp. 20–27, Dec. 2003.
- [91] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, and V. Svorcik, "Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants," *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 739–67, Jan. 2011.
- [92] D. Rothamel, R. Torok, J. Neugebauer, T. Flenitz, M. Scheer, M. Kreppel, R. Mischkowski, and J. Zoller, "Clinical aspects of novel types of collagen membranes and matrices: Current issues in soft- and hard-tissue augmentation," *EDI J.*, vol. 8, no. 1, 2012.
- [93] S. Liao, F. Watari, Y. Zhu, M. Uo, T. Akasaka, W. Wang, G. Xu, and F. Cui, "The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite / collagen / PLGA composite membrane in vitro," *Dent. Mater.*, vol. 23, pp. 1120–1128, 2007.

-
- [94] A. Duarte, A. Pereira, A. Cabrita, A. Moir, E. Pires, and M. Barros, "The Characterisation of the Collagenolytic Activity of Cardosin A Demonstrates its Potential Application for Extracellular Matrix Degradative Processes," *Curr. Drug Discov. Technol.*, vol. 2, no. 1, pp. 37–44, Mar. 2005.
- [95] S. Techatanawat, "Type I collagen extracted from rat-tail and bovine Achilles tendon for dental application: a comparative study," *Asian Biomed*, vol. 5, no. 6, pp. 787–798, 2011.

