

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
EM MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Cristiane Michele Alves de Oliveira

**PRODUÇÃO DE MEMBRANA BARREIRA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA
GUIADA COM ZEÍNA**

Araraquara/SP

2020

Cristiane Michele Alves de Oliveira

**PRODUÇÃO DE MEMBRANA BARREIRA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA
GUIADA COM ZEÍNA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador(a): Profa. Dra. Eliane Trovatti

Araraquara/SP

2020

O46p Oliveira, Cristiane Michele Alves de
Produção de membrana barreira para regeneração óssea guiada
com
zeína/Cristiane Michele Alves de Oliveira. – Araraquara:
Universidade
de Araraquara, 2020.
60f.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biotecnologia em Medicina
Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Profa. Dra. Eliane Trovatti

1. Regeneração óssea. 2. Zeína. 3. Proteína vegetal. 4.
Propriedades
mecânicas. 5. Membranas reabsorvíveis. 6. Invasão celular.
7. Citotoxicidade. I. Título.

CDU 577.1:66



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGB-MRQM



CRISTIANE MICHELE ALVES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 13 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª ELIANE TROVATTI (Orientadora)
Universidade de Araraquara - UNIARA

Dr. LEANDRO FERNANDES
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Drª KELI REGINA VICTORINO
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

A Deus que nos criou e foi criativo nesta tarefa. Seu fôlego de vida em mim me foi sustentou e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um mundo de possibilidades.

AGRADECIMENTOS

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram esta nova etapa da vida.

À orientadora Prof.^a Dra. Eliane Trovatti, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Obrigado ao meu marido Jorge Luiz Bonadio de Oliveira, que nos momentos de minha ausência dedicados a este estudo, sempre fez entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

A minha cunhada Joyce Cristine Bonadio de Oliveira, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Agradeço a Escola Técnica Coronel Raphael Brandão de Barretos/SP por ter concedido o laboratório de química para a extração da proteína de interesse.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Taxa de mensalidade de pós-graduação.

“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento”.

Frederick Herzberg

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema da estrutura secundária da proteína zeína.....	12
Figura 2 - Estrutura externa e interna do grão de milho.	13
Figura 3 - Percentagem do constituinte total indicado nas estruturas físicas específicas do grão de milho.....	14
Figura 4 - Esquema representativo da estrutura interna do grão de milho	15
Figura 5 - Membranas de barreira para estimular e orientar o crescimento de novo osso alveolar	16
Figura 6 - Reparo ósseo com formação de epitélio juncional.....	18
Figura 7 - Representação do modelo biomecânico de remodelação óssea	20
Figura 8 - Ciclo de remodelação óssea	20
Figura 9a - Preservação do rebordo alveolar após extração dentária.....	21
Figura 9b: Reparo alveolar com membrana de ROG.....	22
Figura 10 - Formação do coágulo sanguíneo após extração dentária e a reabsorção do rebordo alveolar	28
Figura 11 - Processo de extração da proteína.....	35
Figura 12 a - Método de invasão celular	40
Figura 12 b: Esquema do experimento na placa de 96 poços	40
Figura 13 - Representação da extração da proteína	42
Figura 14 - Representação do preparo da membrana.....	43
Figura 15 - Gráfico de FTIR.....	45
Figura 16 - Gráfico representativo da degradação hidrolítica - Amostra não reticulada.....	46
Figura 17 - Gráfico representativo da degradação hidrolítica - Amostra reticulada.....	47
Figura 18 - Gráfico das propriedades mecânicas da membrana reticulada por DMA ..	48
Figura 19 - Ensaio de viabilidade celular com a linhagem celular GM-07492 tratadas com a membrana reticulada de zeína	49
Figura 20a - Representação da membrana ensaios de migração e invasão celular - Imagem ampliada a 100 micrômetro	50
Figura 20b - Representação da membrana ensaios de migração e invasão celular - Imagem ampliada a 200 micrômetro	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comportamento da resistência à tração e alongamento na ruptura das amostras de membrana de zeína reticulada e não reticulada em equipamento DMA ..48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Apud - Expressão latina que significa “citado por”

ATR - Refletância Total Atenuada

BSA - Albumina de soro bovino

CLEMSON - Conselho Consultivo Universitário para Biomateriais

cm - Centímetro

e-PTFE - Politetrafluoroetileno expandido

et al. - Abreviatura em latim usada em citações bibliográficas quando a obra possui muitos autores, indicando nominalmente o primeiro autor

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

g - Grama - unidade de medida de peso

HAp - Hidroxiapatita

in vitro - Expressão latina que designa todos os processos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

mg - Grama (unidade de medida)

Min. abreviatura de tempo em minuto

ml - Mililitro

mm - milímetro – unidade de medida do comprimento

MTT - (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difenil brometo de tetrazolina) Ensaio colorimétrico para avaliar a atividade metabólica celular

NIH - Instituto Nacional de Saúde

PBS - Tampão Fosfato Salino

pH - Potencial Hidrogeniônico, uma escala logarítmica que mede o grau de acidez

[poli (ácido glicólico)] - Copolímeros

[poli (ácido glicólico-co-láctico)] – Copolímeros

poli (ácido láctico) - Ácido poliláctico (polímero)

[poli (metil metacrilato)] - Acrílico (plástico)

[poli (vinil-siloxano)] - Material para restauração dentária

rpm - rotações por minuto

UNIARA - Universidade de Araraquara

USP - Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

NH ₂ - Radical amino	12
COOH (CO ₂ H) - Ácido carboxílico.....	12
α - Alfa.....	14
β - Beta.....	14
γ - Gama.....	14
δ - Delta.....	14
% - Porcentagem.....	13
kDa - Unidade de medida de massa utilizada para expressar a massa de partículas atômicas.....	14
XX - Século 20 a.d	21
Ti - Titânio	22
Cr - Crômio.....	22
Co - Cobalto	22
Mo - Molibdênio.....	22
F-75 - Ligas metálicas a base de cobalto.....	22
°C - Graus Celsius.....	31
cm ⁻¹ - Número de onda	32
°INPM - Fração em massa	32
N - Força de Newton	33
g/L - Grama por litro	33
cm ² - Centímetro quadrado	34
Nm - Nanômetro.....	35
μl - Microlitro.....	35
CO ₂ - Dióxido de Carbono	36
CH ₂ - Grupamento alifático	41
CH ₃ - Grupamentos alifático	41
O-H - Hidroxila.....	41
C ₂ H ₄ O - Acetaldeído.....	41
C ₅ H ₈ O ₂ - Glutaraldeído	41
C = O - Representação química de um grupamento carboxila.....	41
± - símbolo matemático de mais ou menos	45

SUMÁRIO

1 OBJETIVOS	11
1.1 Objetivos específicos	11
2 INTRODUÇÃO	12
2.1 Regeneração óssea guiada.....	16
2.2 Regeneração óssea guiada na odontologia: biomateriais e sua utilização como membranas de barreira	24
2.3 História dos biomateriais e sua utilização na medicina	29
2.4 Classificação dos biomateriais	30
2.5 Propriedades dos biomateriais	32
3 METODOLOGIA	34
3.1 Material e Métodos.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1 Extração, separação e preparo dos filmes de zeína	41
4.2 Cálculo do rendimento	44
4.3 Caracterização da proteína	44
4.4 Degradação hidrolítica in vitro	45
4.5 Propriedades mecânicas (ensaios mecânicos)	47
4.6 Ensaio de citotoxicidade.....	49
4.7 Ensaio e migração e invasão celular in vitro	50
5 CONCLUSÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) consiste em um tratamento para o alcance da regeneração óssea, após extração dentária, para a recomposição do osso e rebordo alveolar, tornando-se possível a colocação de implantes. O tratamento com ROG baseia-se na aplicação de uma membrana de barreira para impedir a invasão celular de tecido mole para dentro da cavidade alveolar, evitando defeitos ósseos. A partir da proteína zeína encontrada no grão de milho, foi confeccionado uma membrana barreira para a ROG. A zeína foi extraída utilizando-se uma metodologia simples de extração com solvente isopropílico sob aquecimento e agitação, purificada e confeccionada em membranas de barreiras, as quais foram caracterizadas quanto às suas propriedades morfológicas, mecânicas, de biodegradação, quanto à sua capacidade de barreira contra invasão celular e ensaios de citotoxicidade. A extração da proteína foi realizada com sucesso, sendo o seu rendimento satisfatório para a utilização em todos os ensaios presentes neste trabalho.

Palavras-chave: regeneração óssea, zeína, proteína vegetal, propriedades mecânicas, membranas reabsorvíveis, invasão celular, citotoxicidade.

ABSTRACT

Guided Bone Regeneration (ROG) consists of a treatment to achieve bone regeneration, after tooth extraction, to recover the bone and alveolar ridge, making implant placement possible. Treatment with ROG is based on the application of a barrier membrane to prevent cellular invasion of soft tissue into the alveolar cavity, preventing bone defects. From the zein protein found in the corn grain, a barrier membrane for ROG was made. The zein was extracted using a simple methodology of extraction with isopropyl solvent under heating and agitation, purified and made in barrier membranes, which were characterized in terms of their morphological, mechanical and biodegradation properties, in terms of their barrier capacity against cell invasion and cytotoxicity assays. The protein extraction was carried out successfully, and its yield is satisfactory for use in all the assays present in this work.

Key words: Bone regeneration, zein, maize protein, mechanical properties, resorbable membranes, cell invasion, cytotoxicity.

1 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é desenvolver uma membrana de barreira para enxertos ósseos dentários a partir da zeína, e avaliar sua citotoxicidade, reabsorção in vitro, propriedades mecânicas e de barreira celular.

1.1 Objetivos específicos

- Extrair a proteína do milho;
- Produzir membrana conforme método já proposto na literatura e sua caracterização;
- Estudar a reabsorção da membrana em condições fisiológicas in vitro;
- Analisar as propriedades mecânicas das membranas por meio de ensaios de tração;
- Realizar o estudo da morfologia do material produzido (a fim de determinar o tamanho dos poros, um parâmetro importante para a não invasão celular, por microscopia ótica);
- Investigar a biocompatibilidade por meio de ensaio de citotoxicidade;
- Observar efeito barreira da membrana através de ensaios de migração celular.

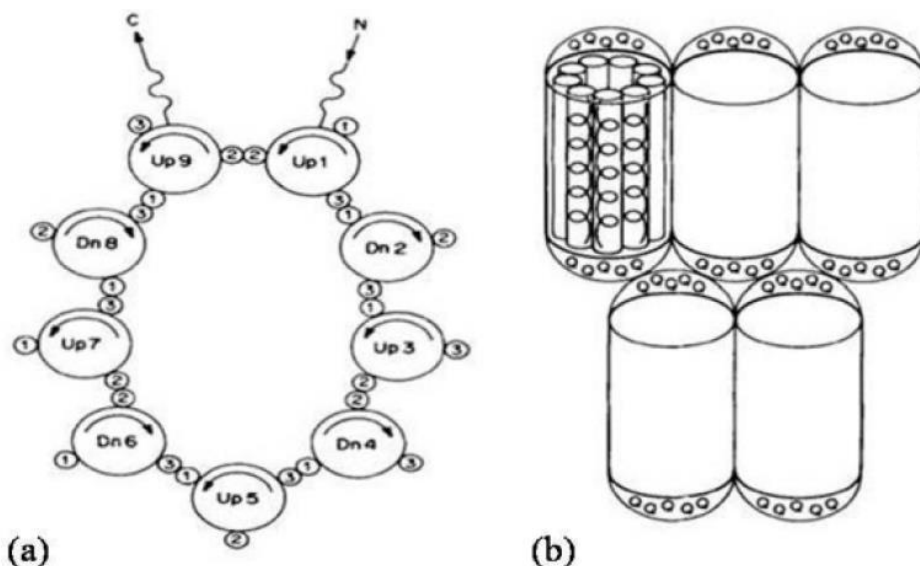
2 INTRODUÇÃO

O presente estudo desenvolveu uma membrana com proteína de origem vegetal conhecida por zeína, com possibilidades biodegradáveis para regeneração óssea guiada (RGO), sendo suas particularidades discutidas ao longo do trabalho. Para melhor entendimento a respeito do tema serão discutidos alguns conceitos e definições acerca da proteína e RGO.

Proteínas derivadas de plantas são de grande interesse por serem renováveis e biodegradáveis, pois oferecem benefícios ambientais sobre os materiais à base de petróleo (BISHARAT et al., 2017).

O uso da zeína para a indústria ainda é pouco conhecida, esta proteína encontra-se no endosperma do milho, com alto teor de aminoácidos apolares, permitindo assim uma estrutura molecular hidrofóbica, solubilizando-se em álcool, possibilitando sua extração, representada na figura 1 (SHUKLA & CHERYAN, 2001 apud PAPALIA; LONDERO, 2015).

Figura 1: Esquema da estrutura secundária da proteína zeína.

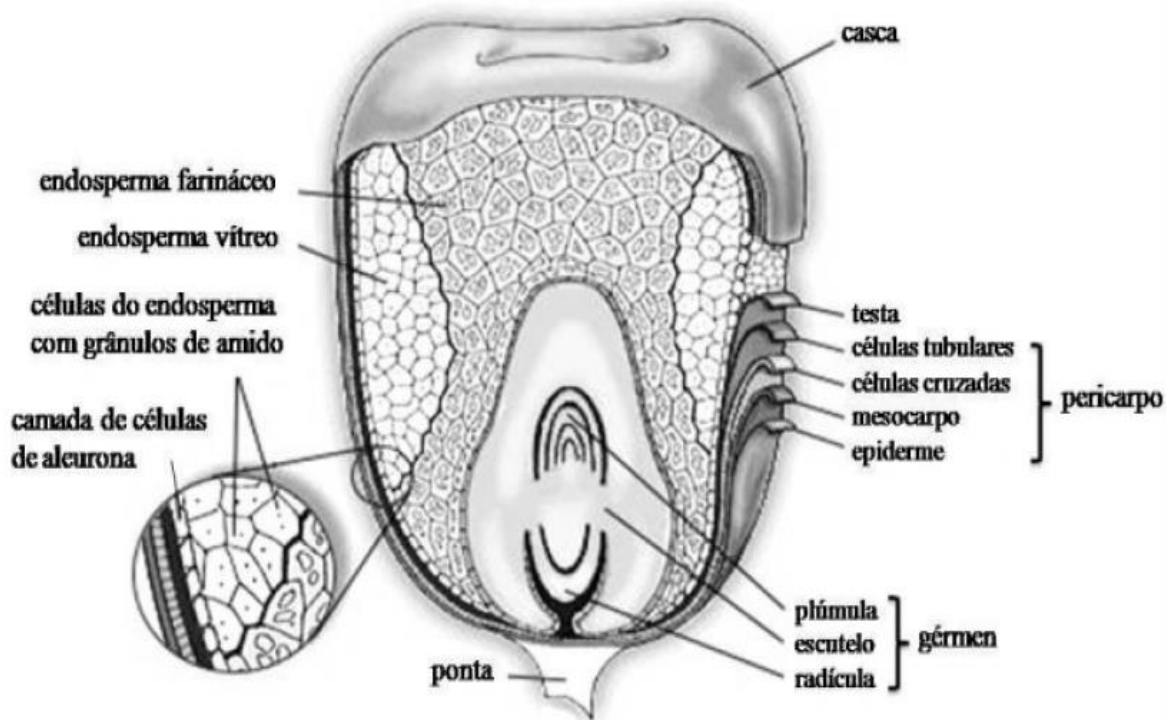


Aminoácidos apolares organizados em estrutura circular repetidos pela união dos segmentos polares (hélices). As nove hélices unidas em figura plana, sendo 'Up' a direção do término NH₂ para COOH da cadeia dos aminoácidos, enquanto 'Dn' indica a direção oposta (a) e arranjo das proteínas através do empilhamento dos planos por interações de resíduos de glutamina, parte polar estendidas nas extremidades da cadeia molecular (b).

Fonte: Argos et al. (1982) apud Papalia e Londero (2015).

O grão de milho é formado por quatro estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo e ponta. Esses arcabouços diferem em sua organização química e estrutura interna (figura 2 e 3). As zeínas estão localizadas na parte externa dos grânulos de amido, em estruturas circulares, com seu centro rico em delta e gama zeína, circundada por alfa zeína (PAES, 2006; ANDERSON & LAMSAL, 2011 apud PAPALIA; LONDERO, 2015).

Figura 2: Estrutura externa e interna do grão de milho.



No endosperma (farináceo e vítreo) e gérmen estão presentes as proteínas de reserva do tipo prolamina, chamada de zeína.

Fonte: Papalia e Londero (2015, p. 553).

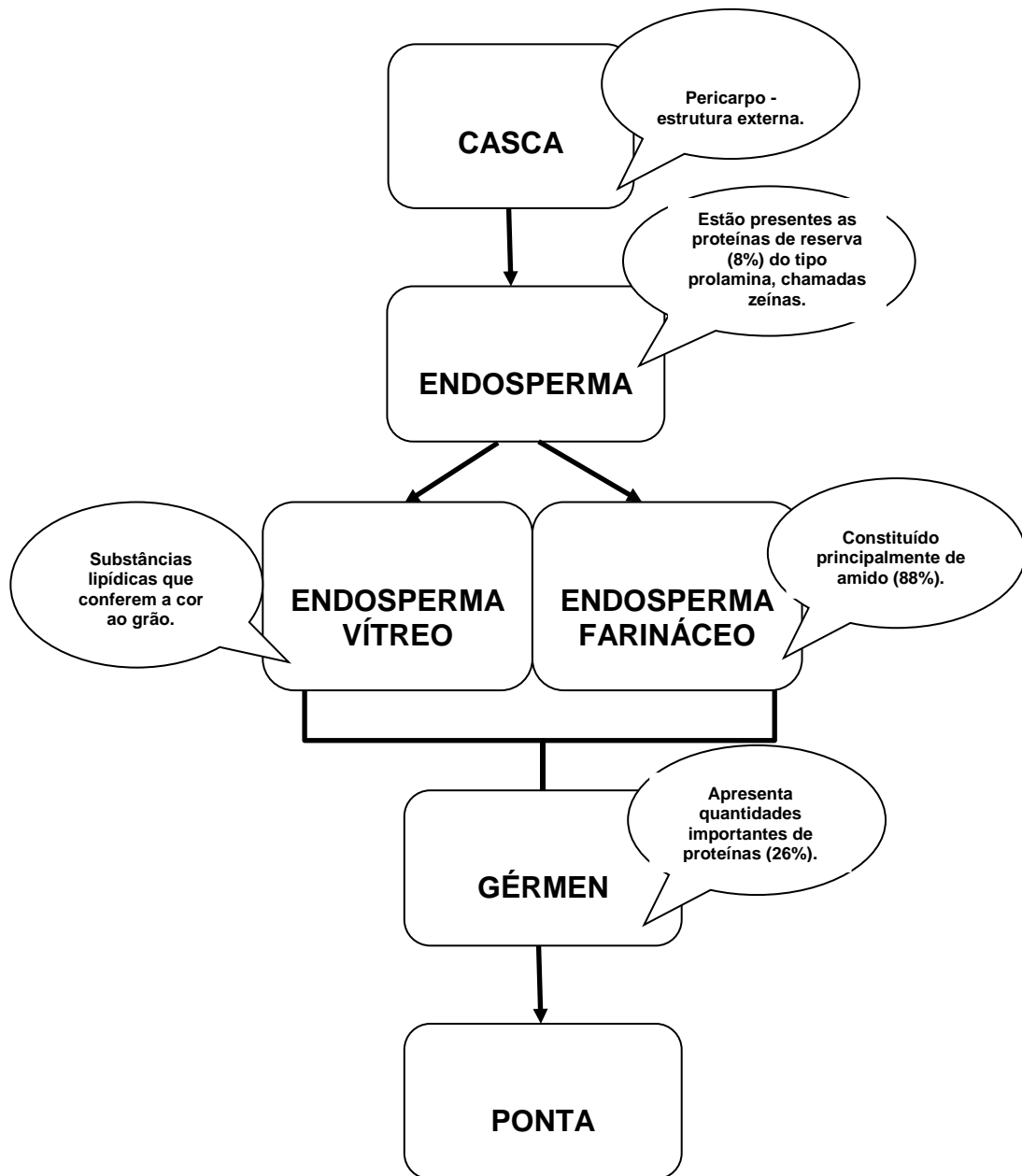
Figura 3: Percentagem do constituinte total indicado nas estruturas físicas específicas do grão de milho.

Fração	% grão	Amido	Lipídeos	Proteínas	Minerais	Açúcares	Fibras ou conteúdo celular
		% da parte (base seca)					
Endosperma	82	98	15,4	74	17,9	28,9	
Gérmen	11	1,3	82,6	26	78,4	69,3	12
Pericarpo	5	0,6	1,3	2,6	2,9	1,2	54
Ponta	2	0,1	0,8	0,9	1,0	0,8	7,0

Fonte: Paes (2006).

Os grãos do milho são, geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variando desde o preto até o vermelho. Seu peso individual varia, em média, de 250 a 300 mg e sua composição média em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra e 4% de óleo. Sendo composição formada por quatro principais estruturas físicas: pericarpo (casca – estrutura externa), endosperma (contém substâncias lipídicas que conferem a cor ao grão, constituído principalmente de amido e de proteínas reserva, do tipo prolamina, chamadas zeínas), gérmen (apresenta quantidades importantes de proteínas - 26%), e ponta as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão (Figura 4).

Figura 4: Esquema representativo da estrutura interna do grão de milho.



Fonte: Adaptada Paes (2006).

Assim como para Bisharat et al. (2017) e também por Papalia e Londero (2015), a zeína representa 60% do total de todas as proteínas encontradas no grão de milho, caracterizada pela sua semelhança em massa molecular, solubilidade em solventes e uma estrutura de quatro subclasses: alfa, beta, gama e delta, sendo a alfa-zeína a mais abundante. Uma propriedade da zeína que é interessante para aplicação na área de biomateriais é sua capacidade em formar filmes, isto é um

material filmogênico. Esta propriedade amplia seu leque de aplicações na área biomédica com demanda por filmes biodegradáveis em condições fisiológicas.

Sendo a zeína é a principal proteína endospermica de armazenamento (usadas no crescimento) do milho. Essa pode ser classificada com base na sua solubilidade e peso molecular em α (19 e 22 kDa), β (17-18 kDa), γ (16 e 27 kDa) e δ (10 kDa). De todos os tipos de zeína, a α -zeína é responsável por 75 a 85% da composição desta proteína, sendo a mais abundante, a γ -zeína é de aproximadamente 20%. A zeína é particularmente rica em aminoácidos hidrofóbicos, mas deficiente em aminoácidos polares ou ionizáveis. Tornando, a zeína pouco insolúvel em água pura, mas solúvel em soluções binárias de álcoois alifáticos de cadeia curta e água, como etanol aquoso (BISHARAT et al., 2017).

2.1 Regeneração Óssea Guiada

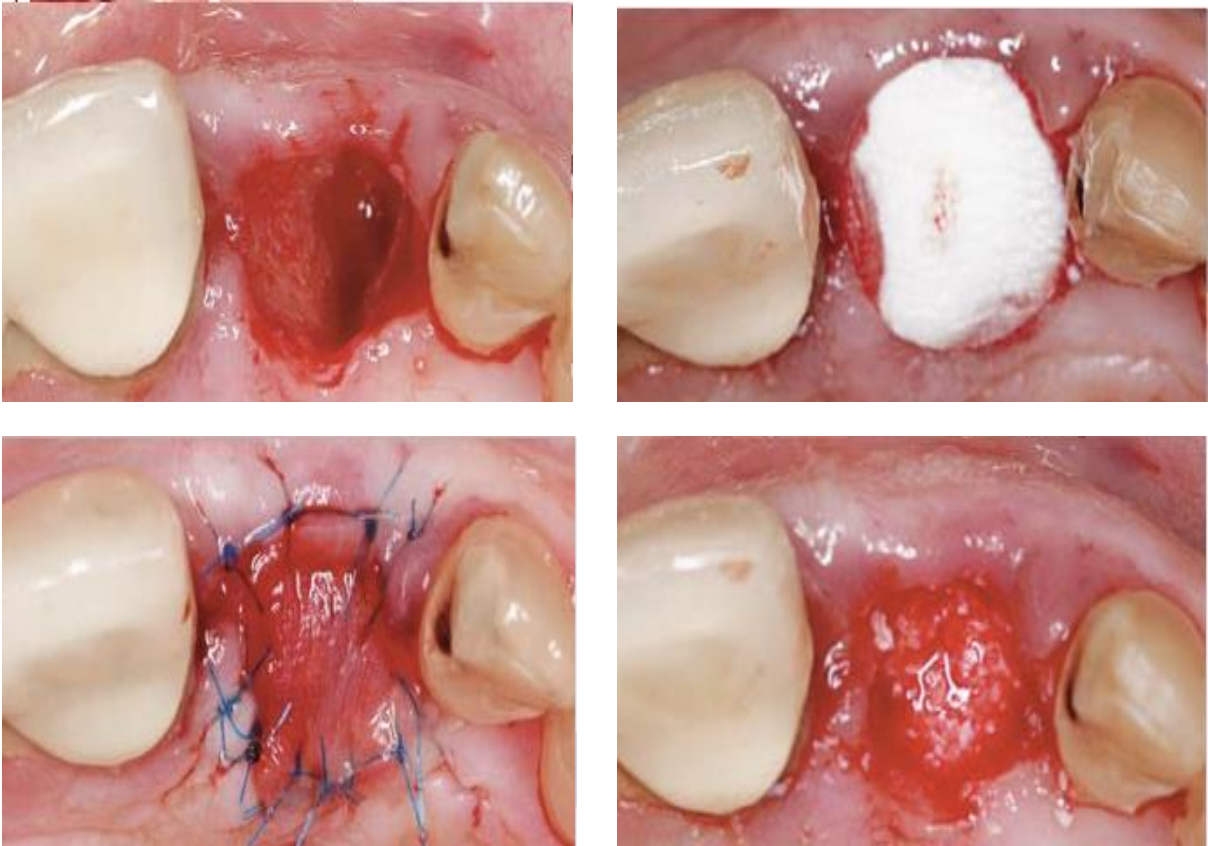
O conceito de ROG foi definido com base em tecidos que se regeneram quando células com esta capacidade povoam o defeito ósseo durante a cicatrização. Desta forma, a restrição mecânica do tecido mole permite que células osteogênicas estimulem a formação de novo tecido ósseo (CORTELLI et al., 2005 apud AYUB, 2011).

A ROG é uma técnica cirúrgica, que se baseia no conceito de osteopromoção com o uso de uma barreira física com o objetivo de impedir a migração de células indesejáveis originárias dos tecidos conjuntivo e epitelial, viabilizando a formação óssea (PEREIRA et al., 2012).

A Regeneração Óssea Guiada é utilizada mormente na região maxilo-facial, baseando-se na aplicação de uma membrana de barreira para evitar o surgimento de defeitos ósseos, não permitindo que tecidos não osteogênicos interfiram na consolidação óssea (figura 5) (TURRI et al., 2016).

Para reparos de defeitos ósseos na cavidade oral, a ROG utiliza materiais enxertados autógeno, sendo este mais utilizado e membranas como barreira por meio de procedimento cirúrgico para estimular e orientar o crescimento de novo osso em locais com defeitos (GEISTLICH FARMA DO BRASIL).

Figura 5: Membranas de barreira para estimular e orientar o crescimento de novo osso alveolar.

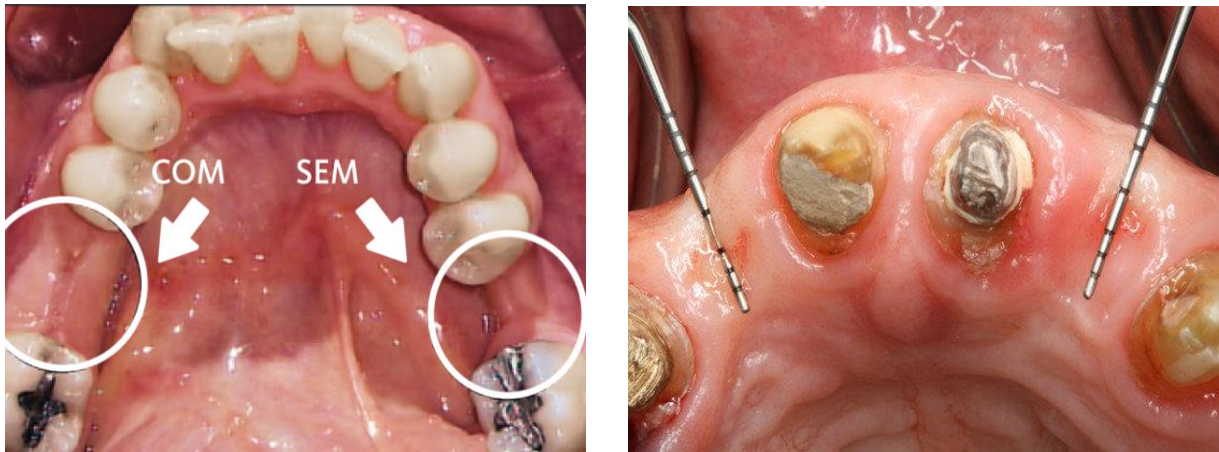


Fonte: Geistlich Pharma do Brasil.

A técnica de ROG é usada, por exemplo, para restaurar osso em caso de defeitos como fenestração ou deiscência do tecido ao redor do implante, para equilibrar imperfeições maiores do maxilar ou para impedir a reabsorção óssea após a extração de dente em alvéolos defeituosos (GEISTLICH FARMA DO BRASIL).

Normalmente quando uma infecção periodontal causa algum dano ao osso alveolar, recorre-se a cirurgia; porém a mesma apresenta apenas melhoras clínicas, visto que muitas vezes no local forma-se cicatriz, havendo assim um reparo com formação de um grande epitélio juncional e não uma regeneração óssea propriamente dita (figura 6) (SCULEAN et al., 2015).

Figura 6: Reparo ósseo com formação de epitélio juncional.



Fonte: Geistlich Pharma do Brasil.

Por mais que a cirurgia dos defeitos ósseos orais seja extremamente pequena e que deixe o menor dano possível, ainda existe a possibilidade de outros fatores internos causarem a reabsorção do rebordo alveolar. Em contrapartida, quanto maior o defeito ósseo, maior e mais complexa também será a cirurgia, necessitando muitas vezes de enxertos autógenos, aumentando assim a morbidade ao paciente (SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010).

Para melhor o entendimento a respeito de como ocorre a RGO, este trabalho fará uma revisão anatômica e fisiológica do tecido ósseo oral, sua formação e seus defeitos.

2.1.1 Revisão anatômica e fisiológica do tecido ósseo oral

O tecido ósseo é uma forma de tecido conjuntivo especializado apresentando uma fase mineral (cristais de fosfato de cálcio) na forma de hidroxiapatita, possuindo uma matriz de colágeno, com característica rígida, vascularizada e frequentemente se encontra em renovação e remodelação (JUDAS; PALMA; FALACHO; FIGUEIREDO, 2012 apud MUSATOVA, 2016).

Apresenta-se em duas formas: o osso trabecular também conhecido por osso esponjoso e o osso cortical formando por uma estrutura densa e sólida, possuindo duas camadas: uma externa, o perióstio, constituído por tecido fibroso conjuntivo, vasos sanguíneos, inervação com finalidade de proteção e nutrição, e o endóstio,

com estrutura membranosa cobrindo o osso cortical, trabecular e os canais sanguíneos (KINI; NANDEESH, 2010; JUDAS et al., 2012 apud MUSATOVA, 2016).

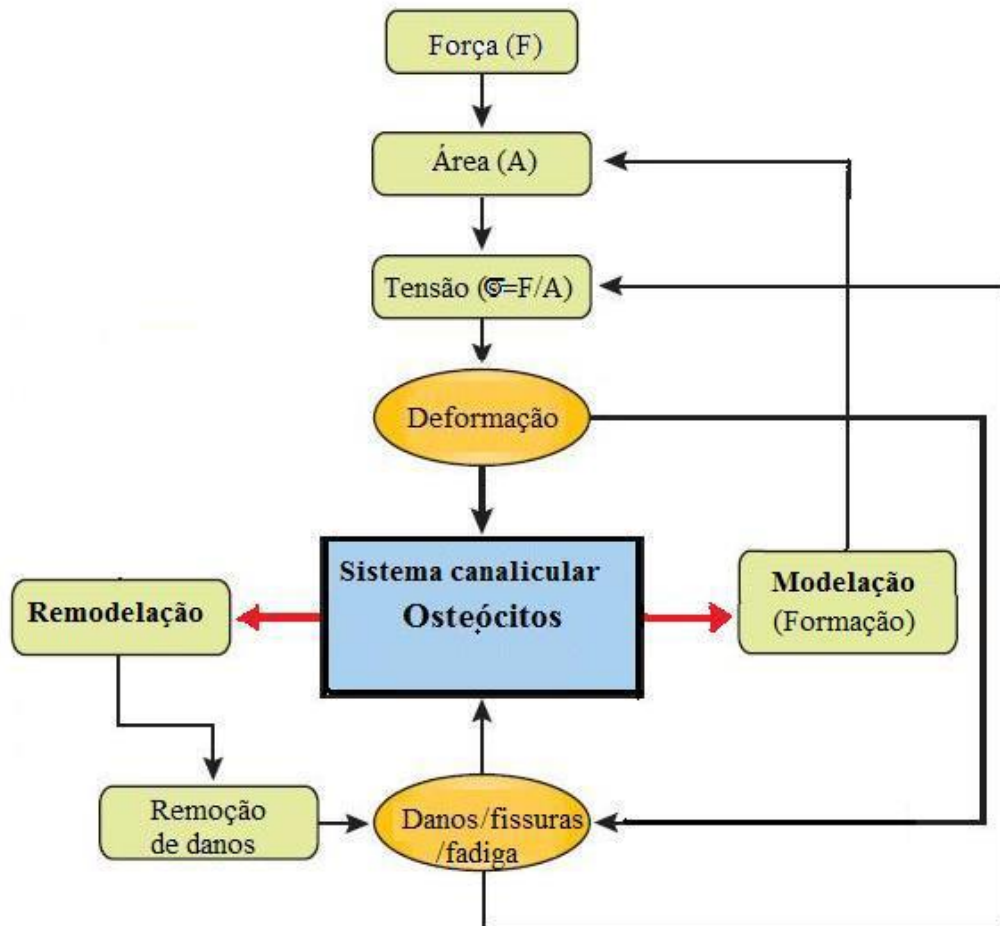
Permanece em constante remodelação, para que esta renovação aconteça é necessário um equilíbrio entre os processos de reabsorção e reposição, possibilitando uma adaptação deste tecido às necessidades fisiológicas, permitindo a substituição de tecidos antigos. A reabsorção óssea é um processo de eliminação de tecidos já existentes pelas células osteoclastos, já a reposição óssea é a formação de tecido novo pelas células osteoblastos (PARRA-TORRES et al., 2013; AMIROUCHE; BOBKO, 2015 apud MUSATOVA, 2016).

Durante toda a vida do indivíduo, o tecido ósseo está sujeito ao processo contínuo de remodelação o 'Turn-over', em que novo osso se forma por meio do mecanismo de reabsorção/deposição (PARRA-TORRES; VALDÉS-FLORES; OROZCO; VELÁZQUEZ-CRUZ, 2013 apud MUSATOVA, 2016).

A neoformação óssea acontece por um processo complexo conhecido por osteogênese (ossificação), em três principais etapas: a síntese da matriz orgânica extracelular, mineralização da matriz e remodelação óssea por meio de processos de reabsorção e reformação. A formação de novo osso acontece por meio da ossificação intramembranosa com deposição de células mesenquimatosas indiferenciadas, sintetizando a matriz orgânica pela diferenciação destas células em osteoblastos, estes produzem osteoides para a mineralização óssea, e a endocondral, onde a cartilagem atua como modelo para a ossificação, células mesenquimatosas indiferenciadas proliferam, condensam e diferenciam-se em condroblastos, tornando-se a matriz cartilaginosa, onde as células pericondrais diferenciam em osteoblastos, produzindo a matriz óssea que será mineralizada (MARQUES, 2010; EMANS; CARON; RHIJN; WELTING, 2012 apud MUSATOVA, 2016).

O crescimento ósseo e suas alterações hipertróficas são acompanhados pelo mecanismo de remodelação, desta forma, quando os estímulos mecânicos são reduzidos, o esqueleto apenas exerce suas funções vitais, e a reabsorção excede a formação de novo osso, tornando-se um tecido com pouca massa. Esse mesmo processo de crescimento ósseo pode ocorrer de maneira contrária, quando o organismo apresenta intenso anabolismo ósseo, com deposição excessiva da massa óssea (figura 7 e 8) (MUSATOVA, 2016).

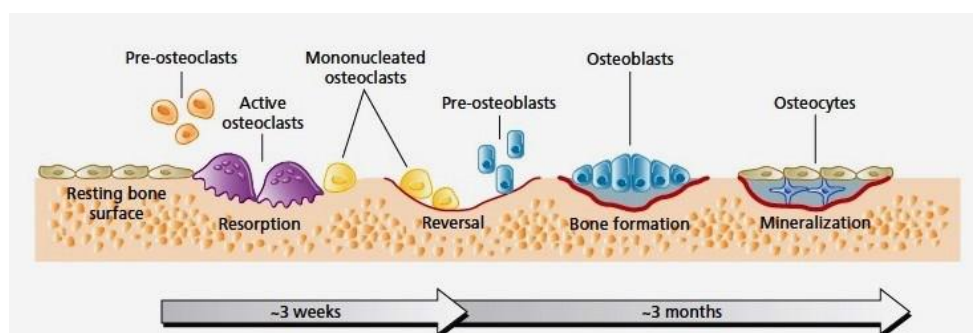
Figura 7: Representação do modelo biomecânico de remodelação óssea.



A aplicação de uma força por unidade de área (tensão) causa a deformação da matriz óssea. Esta deformação é transmitida aos osteócitos que desencadeiam processos de modelação (causando um aumento da massa óssea e da área de aplicação da força), ou remodelação (substituição do tecido ósseo para adaptação funcional ou para remoção dos danos).

Fonte: Musatova (2016, p. 22).

Figura 8:



Fonte: Musatova (2016, p. 23).

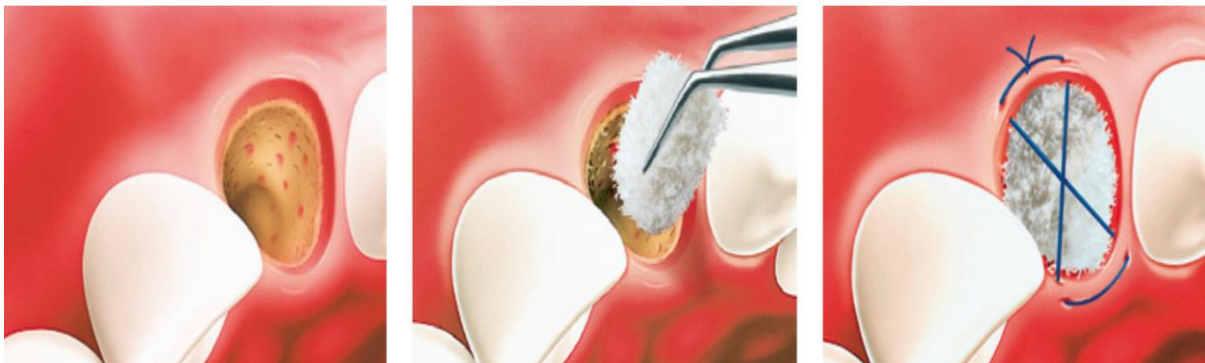
O tecido ósseo e outros tecidos como os mesenquimais e tegumentares, após agressão ou trama não fatal, tendem a reparação, com reconstituição integral do tecido, conservando suas características dimensionais, estruturais e fisiológicas ou a reconstituição parcial, perdendo o formato dimensional e ocorrência de fibrose cicatricial que fechará a ferida, porém sem garantir a mesma eficácia do tecido original (ARAÚJO; LINDHE, 2011; GIANGIULIO, 2014 apud MUSATOVA, 2016).

Lesões traumáticas, anomalias e infecções dentárias, dificultam a formação de novo osso, sendo assim a remodelação óssea pode ser determinada utilizando os enxertos ósseos (REIS, 2015 apud MUSATOVA, 2016).

O osso e o tecido mole alveolar se retraem parcialmente se não forem tomadas contramedidas após a extração de um dente. Comprometendo a estética e o volume ósseo, tornando-se insuficiente para colocação de implante ou formar espaços sob uma ponte dentária (GEISTLICH FARMA DO BRASIL).

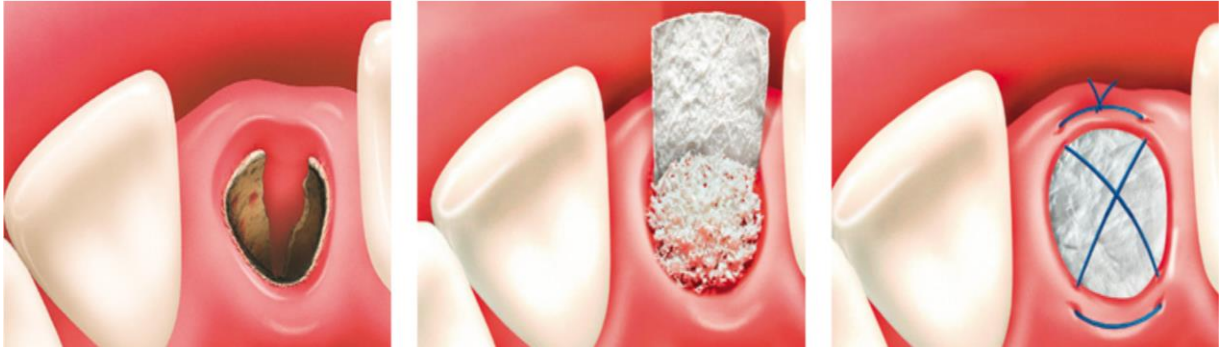
O alvéolo dentário após a remoção de um dente deve ser preenchido imediatamente com algum material, para preservação do volume ósseo (figuras 9a e b) (GEISTLICH FARMA DO BRASIL).

Figura 9a: Preservação do rebordo alveolar após extração dentária.



Fonte: Geistlich Pharma do Brasil.

Figura 9b: Reparo alveolar com membrana de ROG.



Fonte: Geistlich Pharma do Brasil.

Preservando o rebordo alveolar, o volume ósseo pode ser mantido a longo prazo. Para que isto aconteça, o alvéolo é completado com material, exemplo, as membranas para RGO. Estas medidas preventivas possibilitam a colocação de próteses dentárias definitivas sem complicações (GEISTLICH FARMA DO BRASIL).

Para que a RGO aconteça é importante um espaço entre o implante e a membrana, este espaço acontece por meio do recorte da mesma com sua parte interna (rígida) cobrindo totalmente o defeito e sua porção externa (flexível) ultrapassando as laterais do defeito ósseo em aproximadamente de 3 a 5 mm (COSTA et al., 2016).

Evitando o crescimento celular de tecido conjuntivo gengival, o retalho da membrana não pode ser perfurado, seus cantos devem ser arredondados, permitindo uma adaptação com a superfície óssea circundante (COSTA et al., 2016).

As membranas desempenham um papel importantíssimo para a RGO, pois, quando utilizadas, reduzem os possíveis efeitos pós-extração dentária, atuando como barreira, impedindo que o tecido epitelial invada o alvéolo e possibilite a regeneração óssea (BUSER et al., 1996 apud SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010).

Para o sucesso do implante, um dos pré-requisitos é a quantidade de osso nos locais receptores, não só sua altura, mas também uma largura almejada da crista alveolar (COSTA et al., 2016).

Os implantes dentários só são possíveis de serem realizados quando há correção óssea, caso contrário a reabilitação oral estética e funcional do paciente não acontece (VAN DER WEIJDEN et al., 2009 apud SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010).

A literatura traz várias comprovações de que, mesmo em curto ou em longo prazo, o rebordo alveolar é reabsorvido, dificultando assim a reabilitação oral, seja ela estética ou funcional. Dessa forma, a RGO pode ajudar, mantendo a espessura e altura necessária do rebordo para uma reabilitação (IRINAKIS; TABESH, 2007 apud SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010).

Para que o rebordo alveolar possa ser preservado, é necessário a escolha de uma estratégia adequada e uma eficaz manutenção dele. A estratégia acontece por meio da variedade biológica e funcional dos materiais existentes, em combinação com técnicas escolhidas adequadamente para cada caso. A manutenção da saúde periodontal se torna importantíssima para a preservação do rebordo alveolar. Havendo falha na primeira etapa, há necessidade de intervenção cirúrgica (GLOCKER et al., 2014 apud MUSATOVA, 2016).

Desta forma, a regeneração de defeitos ósseos periodontais pode ser corrigida de diversas formas com diferentes técnicas e produtos hoje disponíveis, como: os enxertos e biomateriais, podendo ser associados para o uso, intensificando os seus resultados (SCULEAN et al., 2015).

Em relação ao uso de materiais utilizados para o reparo ósseo descrito acima por Sculean et al. (2015), é reafirmado por Salomão e Siqueira (2010), descobriu-se que no decorrer dos anos, várias técnicas e materiais foram e estão sendo descritos na literatura para a Regeneração Óssea Guiada (RGO), é importante ressaltar que muitos deles exigem para um resultado satisfatório o uso de materiais no preenchimento do defeito ósseo, sendo em seguida recoberto por retalho, havendo assim cicatrização por primeira intenção.

As membranas biocompatíveis dentre os biomateriais, são muito empregadas na área da odontologia com o objetivo de estimular a RGO em defeitos permanentes na cavidade oral. Em casos de falhas periodontais as membranas são indicadas após extração dentária, osso insuficiente para a fixação de implantes e em aparelho protético (COSTA et al., 2016).

Materiais biodegradáveis ou não, ao longo dos anos, vêm sendo utilizados como membrana para a RGO, não importando o tipo de material, contanto que a mesma apresente capacidades de biocompatibilidade, permeabilidade seletiva, relação com os tecidos do hospedeiro, flexibilidade clínica e capacidade de inalteração do espaço (KARRING et al., 1993 apud AYUB, 2011).

Inúmeros estudos mostram a produção de novos biomateriais para as diversas áreas da odontologia, com resultados satisfatórios para a sua aplicação, porém para o seu uso clínico o mesmo deve ser analisado em todo o seu trajeto científico, desde os ensaios *in vitro* até os clínicos *in vivo* (SINHORETI, VITTI, CORRER-SOBRINHO, 2013).

A medicina odontológica amplifica as suas necessidades no controle das características do processo de formação alveolar maxilar, com relevância na manutenção das peças dentárias ou em sua substituição protética, quando ocorre perda óssea (DINATO; NUNES; SMIDT, 2011; GLOCKER, ATTIN; SCHMIDLIN, 2014 apud MUSATOVA, 2016).

A pesquisa, o desenvolvimento e a crescente aplicação de biomateriais na área da saúde estimulam a busca por novos polímeros bioativos, biodegradáveis, não-tóxicos e de fácil manuseio com diferentes aplicações. No caso específico das membranas barreiras para o uso em odontologia, o material mais utilizado atualmente são membranas preparadas a partir de colágeno de origem animal. Estas apresentam propriedades excelentes no que se refere à sua aplicação, exibindo excelentes propriedades de barreira, ausência de toxicidade e resposta inflamatória (SILVA et al., 2017).

Porém, por serem de origem animal, a tendência é a diminuição do uso em humanos num futuro próximo. Dessa forma, a proposta deste projeto de pesquisa é o desenvolvimento de membranas alternativas baseadas em proteína de origem vegetal.

2.2 Regeneração Óssea Guiada na Odontologia: biomateriais e sua utilização como membranas de barreira

Outro aspecto importante e que deve ser relatado neste trabalho é a Regeneração Óssea Guiada por meio de biomateriais que surgiram no decorrer dos anos para a preservação de tecido ósseo.

Segundo o Census Bureau dos Estados Unidos, pessoas com mais de 65 anos representarão 17% dos habitantes do planeta em 2050, sendo, a proporção atual de 8,5%, demonstrando um século de envelhecimento dramático da população, desta forma, as doenças periodontais são mais frequentemente encontradas, devido ao potencial destrutivo dos patógenos periodontais, a necessidade de proteção e

tratamento dos tecidos periodontais. Na última década do século anterior, Langer e Vacanti (1993) consideraram a engenharia de tecidos como um conceito técnico na regeneração de tecidos perdidos, promovendo a introdução do conceito biológico de regeneração guiada em periodontologia (KARRING et al., 1993 apud DABRA et al., 2012).

As infecções periodontais são um grande problema para a saúde bucal, podendo causar defeitos intraósseos, piorando a integridade dos dentes a longo prazo, tornando esse problema um dos grandes objetivos no tratamento periodontal (SCULEAN et al., 2015).

Complicações cirúrgicas de transoperatório e pós-operatório, como fraturas dentárias, doença e infecções periodontal, periodontais e traumatismo alveolar podem ocasionar imperfeições ósseas alveolares em diferentes dimensões e complexidade (VAN DER WEIJDEN et al., 2009 apud SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010).

A Regeneração Óssea Guiada foi incluída como categoria terapêutica, que na Odontologia utiliza-se membranas de barreira para a formação de novo tecido ósseo após sua reabsorção (DAHLIN et al., 1988 apud AYUB, 2011).

Para melhorar o reparo de tecidos direcionando-os para regeneração tecidual, a partir dos anos de 1950, começou a utilização de barreiras mecânicas como o titânio para possibilitar o fechamento físico de um local anatômico (COSTA et al., 2016).

Sabendo que o epitélio migra em média de 3 a 4 vezes mais rápido que o tecido conjuntivo, Bjorn em 1961 propôs que se houvesse algo que impedisse a invasão do tecido epitelial para uma determinada área, seria possível a regeneração dos tecidos, iniciando o conceito de membranas de barreira para guiar células que devem proporcionar a regeneração óssea (COSTA et al., 2016).

Os primeiros materiais aprovados para uso clínico foram as membranas não reabsorvíveis, requerendo uma cirurgia secundária para a sua remoção. Possuem a capacidade de manterem sua integridade estrutural, estabilidade dimensional e sua forma permite ao cirurgião um completo controle de sua aplicação e redução das variações de efeito, sua função é provisória e uma vez completada é removida (COSTA et al., 2016).

A primeira a entrar no mercado era feita de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE), membrana porosa de teflon. Em seguida, outras membranas não-absorvíveis

surgiram, tais como, membranas de poli-tetrafluoroetileno, silicone (Biobrane®) e celulose (COSTA et al., 2016).

Este tipo de membrana mostrou boa biocompatibilidade e manutenção da integridade estrutural durante a cicatrização. As membranas não reabsorvíveis geralmente apresentam resultados positivos quando investigadas em estudos experimentais e quando usadas em procedimentos clínicos de ROG. Todavia, o aspecto negativo apresentado é a imprescindibilidade de cirurgia adicional para a remoção da membrana, visto que ela não é absorvida por meio fisiológico (TURRI et al., 2016).

A membrana de e-PTFE, é ainda a mais utilizada em virtude de sua grande capacidade de promover crescimento do tecido ósseo com densidade de qualidade e regeneração rápida. Por possuir uma microestrutura como uma teia fibrosa densa inibe a penetração celular permitindo uma integração tecidual, contudo susceptível a contaminação latente no pós-cirúrgico (COSTA et al., 2016).

Para Costa et al. (2016), há vários materiais não-reabsorvíveis disponíveis no mercado, como:

- a) Filtro Millipore®: opera como barreira mecânica favorecendo a repopulação radicular por meio de células originárias do ligamento periodontal, entre o tecido conjuntivo gengival, epitelial e da superfície radicular;
- b) Biobrane®: membrana semipermeável de silicone, com boa aderência, unida mecanicamente a um tecido de nylon flexível com cobertura de colágeno hidrofílicos.

O uso desses materiais não descarta a necessidade de uma pequena cirurgia no local para o segurar e, na maioria das vezes, essas cirurgias, por menores que sejam, podem causar morbidades à pessoa (SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010).

A maior desvantagem das membranas não-reabsorvíveis, é a necessidade de intervenção cirúrgica secundária para a sua remoção (COSTA et al., 2016).

As membranas não-biodegradáveis são frequentemente usadas na regeneração periodontal e óssea, o fato de requererem uma segunda intervenção cirúrgica levou ao desenvolvimento de materiais degradáveis. No entanto, o tempo de degradação dos diferentes materiais é difícil de ser equilibrado, por vezes comprometendo a cicatrização e o processo de regeneração (HÄMMERLE; JUNG, 2003 apud AYUB, 2011).

Uma segunda geração de membranas reabsorvíveis, naturais ou sintéticas, foi introduzida com o objetivo de eliminar a necessidade do segundo procedimento cirúrgico (TURRI et al., 2016).

Bartold et al. (2006); Lindhe e Lang (2015) apud Moreira (2017), afirmam que atualmente a investigação científica tem-se focado em diversas técnicas para a regeneração periodontal em oposição às técnicas cirúrgicas ressetivas.

Já os materiais poliméricos bioabsorvíveis podem se desintegrar em meio a fluidos corporais sem qualquer alteração de sua cadeia macromolecular e diminuição de sua massa (COSTA et al., 2016).

As membranas absorvíveis podem ser de colágeno (Geistlich Bio-Gide®), ácido poliláctico (Guidor®), poliglactina 910 (Vicryl®) e ácido poliláctico glicólico (PLGA®) (COSTA et al., 2016).

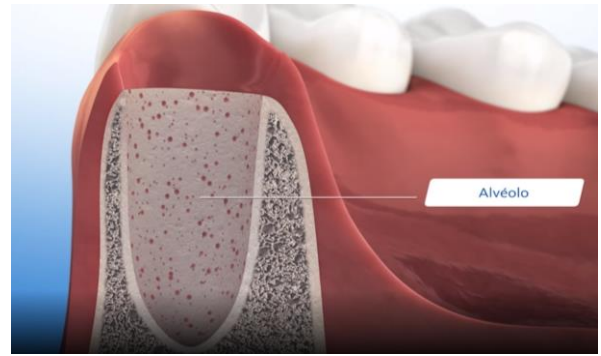
O colágeno natural apresenta características de biocompatibilidade, quimiotaxia para fibroblastos, ativação e atração de neutrófilos e vasta disponibilidade, sendo sua aplicação clínica bastante diversificada, como por exemplo: no sistema controlado de liberação de drogas, matriz carreadora na Engenharia de tecidos, materiais de preenchimento para o reparo ósseo e agente hemostático, na produção de enxertos como barreira física para a regeneração tecidual guiada no tratamento de queimaduras (COSTA et al., 2016).

Os benefícios da utilização de uma membrana absorvível, se apresenta por meio da imobilização do coágulo no local da extração dentária, estabilizando e promovendo aumento da cicatrização na ferida e sua habilidade quimiotática de atrair fibroblastos. Entretanto, uma vez não fixada corretamente, permite movimento e reabsorção, provocando o rompimento da superfície do coágulo, acarretando o desenvolvimento de tecido mole entre a membrana e o coágulo, dificultando a reparação óssea (figura 10) (COSTA et al., 2016).

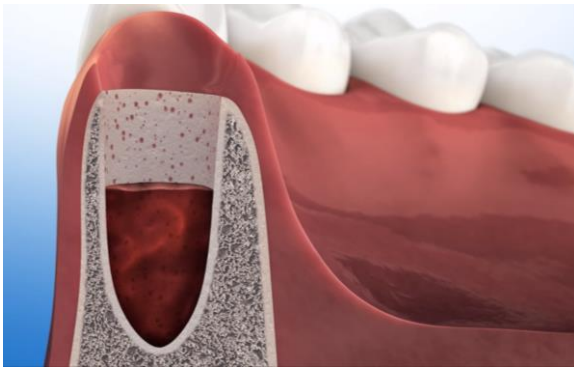
Figura 10: Formação do coágulo sanguíneo após extração dentária e a reabsorção do rebordo alveolar.



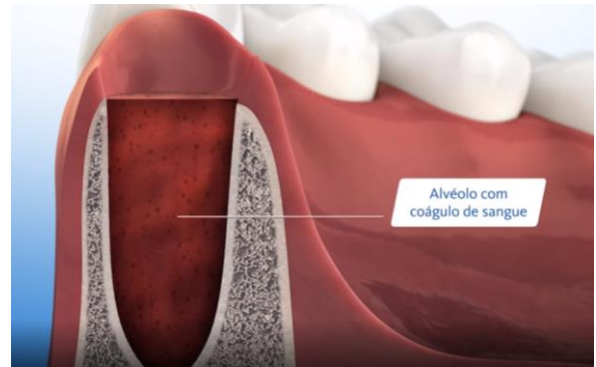
a) extração dentária.



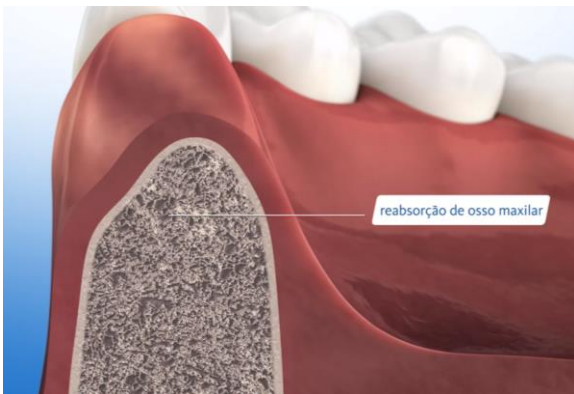
b) cavidade alveolar extração dentária.



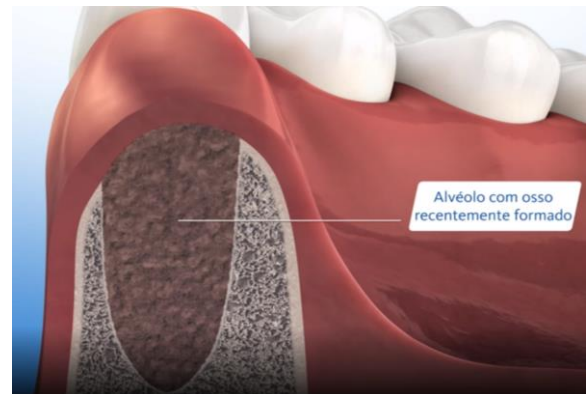
c) formação do coágulo sanguíneo.



d) alvéolo com coágulo de sangue.



e) alvéolo com osso recém-formado.



f) reabsorção do rebordo alveolar.

Fonte: Geistlich Pharma do Brasil.

Contudo, para que ocorra uma maior regeneração óssea após a extração dentária, é importante manter no local o coágulo sanguíneo e não o remover, uma vez que o coágulo é riquíssimo em plaquetas e fatores de crescimento que

estimulam a regeneração óssea e reduzem a infiltração epitelial (AMLER, 1969; TROMBELLI et al., 2008 apud SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010).

A regeneração periodontal usa determinados materiais para estimular a regeneração óssea. A seguir são listados os materiais mais estudados em relação a essa capacidade (BARTOLD et al., 2006 apud MOREIRA, 2017):

- a) materiais aloplásticos, que geralmente são usados para preenchimento sintéticos;
- b) enxertos autólogos, em que o material utilizado é proveniente do próprio indivíduo;
- c) enxertos alógenos, provenientes de indivíduos da mesma espécie;
- d) xenoenxertos, em que a espécie dadora é diferente da espécie do receptor.

Ainda para Bayne (2005), o tratamento para a regeneração dos tecidos deve atender alguns requisitos primordiais:

- a) matriz extracelular (podendo ser sintético);
- b) célula-tronco;
- c) sinais morfogenéticos.

2.3 História dos biomateriais e sua utilização na medicina

Os primeiros relatos sobre o uso dos biomateriais surgiram na pré-história. Os egípcios utilizavam os fios de linho para sutura; os maias confeccionavam dentes de nácar com conchas do mar, realizando assim uma 'integração óssea'; já as lentes de contato datam de 1508, por Leonardo Da Vinci (BHAT; KUMAR, 2012).

Os primeiros implantes dentários foram realizados em 1809 com Maggiolo, que substituiu um dente extraído por uma âncora de ouro. Em 1891, o cirurgião alemão Theodor Gluck realizou a implantação da primeira prótese de quadril em humanos, a qual foi feita com bola de marfim cimentada. John Jacob também realizou as primeiras tentativas de diálises no início do século XX, em 1901, removendo toxinas do sangue de um paciente (BHAT; KUMAR, 2012).

No final do século passado, houve o aprofundamento nos estudos dos biomateriais biológicos, constatando a capacidade dos mesmos na restauração do tecido natural (BAYNE, 2005).

A Sociedade para Biomateriais foi fundada na década de 70, no entanto, os biomateriais continuaram voltados às aplicações ortopédicas e seguimentos dentários (BAYNE, 2005).

Os biomateriais, segundo Bayne (2005), propuseram grandes transições ao longo de sua história em termos de inovações tecnológicas, sendo que, para muitos, essas inovações marcaram o nascimento dos verdadeiros polímeros naturais.

Assim sendo, segundo Bhat e Kumar (2012), biomaterial compreende parte ou todo de uma estrutura viva ou um produto biomédico que desempenha, amplifica ou substitui a função que foi perdida por qualquer acidente ou lesão, feito de qualquer material natural ou sintético.

Todo o material usado para implantes ou dispositivos médicos para a interação com os sistemas biológicos são considerados biomateriais (WILLIAMS, 1987 apud BHAT; KUMAR, 2012).

Os biomateriais mais comuns utilizados na medicina são, de acordo com Bhat e Kumar (2012)

- a) válvulas cardíacas substitutas;
- b) quadris artificiais;
- c) articulações do joelho;
- d) implantes dentários;
- e) modelo de regeneração da pele;
- f) dialisadores para rins.

A variedade para o uso dos biomateriais e suas diferenças químicas, físicas, biológicas e morfológicas, traz para a pesquisa nesta área características interdisciplinares, com a contribuição efetiva dos profissionais da engenharia de materiais no desenvolvimento de novos biomateriais e na sua elucidação dos mecanismos que dominam a regeneração óssea (SINHORETI, VITTI, CORRER-SOBRINHO, 2013).

2.4 Classificação dos biomateriais

Bhat e Kumar (2012) classifica os biomateriais em três classes principais:

- a) polímeros sintéticos como o poli (metacrilato de metila) que tem sido usado na cimentação óssea, poli (ácido glicólico) em suturas cirúrgicas degradáveis, poli (ácido glicólico-co-lático) nos parafusos ósseos ou poli

(vinil siloxano) em implantes dentários e os naturais como alginato, colágeno, hialurônico ácido e géis de fibrina;

b) metais que incluem aços 316, 316L, titânio, prata, tântalo, cobalto, F-75 e ligas de Ti, Cr + Co, Cr + Co + Mo;

b) cerâmicas de carbonos (alumina, zircônia e carbono pirolítico);

vitrocerâmicas e vidros.

2.4.1 polímeros:

Os polímeros são biomateriais de origem natural ou sintética, podendo ambos serem usados na medicina regenerativa. Observa-se também o uso dos polímeros em outras áreas, como para cimentação óssea [poli (metil metacrilato)], fios de suturas degradáveis [poli (ácido glicólico)], implantes com parafusos ósseos [poli (ácido glicólico-co-láctico)] e implantes dentários [poli (vinil-siloxano)] (BHAT; KUMAR, 2012).

2.4.2 metais:

Os biomateriais metálicos sempre tiveram grande uso na medicina, como grampos, placas e fios metálicos como o vitallium, prata, tântalo, cobalto, F-75 e ligas de Ti, Cr + Co, Cr + Co + Mo. Porém, eles ainda oferecem certas desvantagens para seu uso, como baixa biocompatibilidade, susceptíveis à corrosão no meio fisiológico e vários danos mecânicos ao tecido biológico (BHAT; KUMAR, 2012).

2.4.3 cerâmicas:

As cerâmicas, vidros e vitrocêramicas são substâncias inorgânicas, não metálicas, que proporcionam vantagens em relação aos biomateriais metálicos, podemos citar a biocompatibilidade, alta resistência à corrosão em meio fisiológico e baixa condutividade elétrica e térmica. Vários tipos de cerâmicas são utilizados como biomateriais: a hidroxiapatita (HAp) como reparo ósseo; óxido de alumínio (Al_2O_3); aluminatos de cálcio; óxidos de titânio; fosfato de cálcio; carbono; bioglass (ácido láctico) entre outros (BHAT; KUMAR, 2012).

Embora tenha a cerâmica tendo vários fatores vantajosos, seu uso apresenta certas desvantagens, tais como baixa resistência ao impacto e dificuldades de fabricação inviabilizando o seu uso (BHAT; KUMAR, 2012).

2.5 Propriedades dos biomateriais

As características dos biomateriais dependem da classe à qual pertence e suas principais propriedades são: as de superfície, corrosão, propriedades mecânicas e degradação (BHAT; KUMAR, 2012).

2.5.1 propriedades de superfície

Pode-se dizer que superfície de um biomaterial é o final do seu espaço em altura, profundidade e largura (tridimensional), já as propriedades de superfície são suas interações com o tecido onde ele se encontra (BHAT; KUMAR, 2012).

2.5.2 corrosão

A corrosão é a liberação de partículas de íons dos biomateriais no ambiente fisiológico, diminuindo sua biocompatibilidade, o que se observa muito em biomateriais de origem metálica. Assim, o aço inoxidável utilizado nos implantes metálicos pode sofrer oxidação. (BHAT; KUMAR, 2012).

2.5.3 degradação

Normalmente os biomateriais degradáveis em meio fisiológico como poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico) e copolímeros degradam-se em ácido láctico, sendo removidos do meio onde foram implantados pelos processos metabólicos normais do corpo. A cerâmica é um excelente biomaterial por sua biocompatibilidade e não sofre corrosão em meio fisiológico, porém pode sofrer degradação liberando seus subprodutos, causando reações adversas. O biomaterial ideal seria aquele que tivesse um tempo de degradação regulada combinando com o surgimento de um novo tecido (BHAT; KUMAR, 2012).

2.5.4 propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de um biomaterial depende do tipo de material usado e seu processo de fabricação, porém o mais importante de um biomaterial em relação as suas propriedades mecânicas é que ele ofereça resistência mecânica apropriada a cada tipo de tecido onde será implantado, como por exemplo os implantes ósseos, que devem possuir uma resistência maior ou igual aos ossos (BHAT; KUMAR, 2012).

2.5.5 biocompatibilidade

Para a possibilidade criação de um novo biomaterial a ser usado pela medicina regenerativa, é importante que ele possua algumas características indispensáveis para o seu sucesso, como a citotoxicidade, na qual os efeitos tóxicos como a morte e a alteração na permeabilidade celular não devem existir (BHAT; KUMAR, 2012).

2 METODOLOGIA

Várias técnicas para a extração da zeína foram e estão sendo utilizadas ao longo dos anos. Essa extração pode acontecer por métodos químicos ou enzimáticos. Certos fatores como o tipo de solvente, temperatura, pH e tempo de extração contribuem para eficiência do processo (SHUKLA; CHERYAN, 2001; CAPOBIANGO et al., 2006 apud PAPALIA; LONDERO, 2015).

No presente estudo a extração química da proteína foi realizada na Escola Técnica Coronel Raphael Brandão/Barretos, no laboratório de química.

A proteína foi extraída/purificada e confeccionada em membranas de barreiras, as quais foram caracterizadas quanto às suas propriedades morfológicas, mecânicas, de biodegradação, quanto à sua capacidade de barreira contra invasão celular e ensaios de citotoxicidade.

3.1 Material e métodos

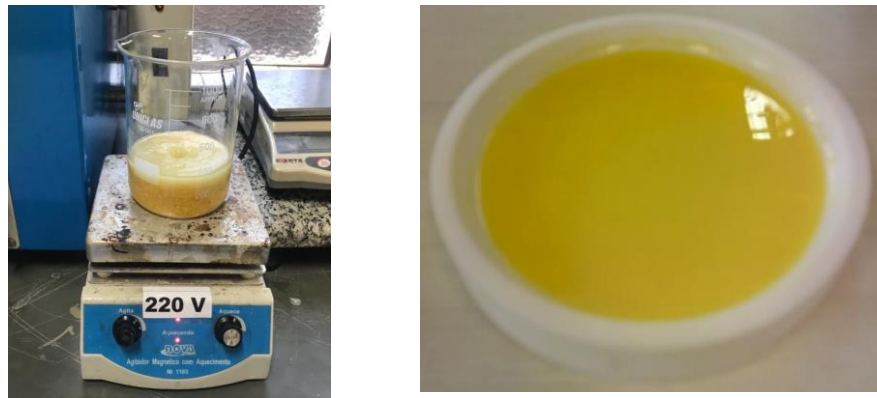
São listados a seguir todos os materiais e métodos utilizados para a extração/purificação da zeína (a partir de derivados do milho), para a produção da membrana, e sua caracterização.

3.1.1 Extração química/Purificação da zeína

Método de extração de Carter e Reck (1970 apud ANDERSON; LAMSAL, 2011) modificado, em que 100 gramas de amostras de moagem seca de milho (Agrosolo – AgroPintadão de Barretos/SP), foram pesadas em balança digital (Balança Shimadzu BL3200H 3200g X 0,01g). A amostra e o álcool isopropílico a 88% (Manipulart - Farmácia de manipulação de Barretos/SP) na proporção 8:1 líquido/sólido foram adicionados em um becker, aquecidos a uma temperatura de 60 a 65°C, agitados em agitador magnético (Agitador magnético com aquecimento - NI 1103 - Novainstruments) por 30 a 40 minutos (figura 5) controlados com barra magnética e termômetro analógico. Em seguida, o conteúdo foi filtrado com auxílio de um becker, funil e papel filtro (Unifil - 18,5 cm) para a separação do líquido do sólido. O líquido (amostra), em seguida, foi despejado em placa de petri, colocado para precipitar em refrigerador comum a -18°C, por 24 horas.

O precipitado foi removido com auxílio de uma espátula e nele adicionado hexano absoluto (hidrocarboneto alceno - QHEMIS) na proporção de 1:1 em agitação mecânica com becker e pipeta por 05 minutos para a remoção das gorduras. Esse processo foi repetido por 03 vezes e novamente foi colocado para secar em placa de petri em temperatura ambiente, formando um filme (Figura 11).

Figura 11: Processo de extração da proteína.



Fonte: Próprio autor.

3.1.2 Cálculo do rendimento

Com base no método de extração modificado de Carter e Reck (1970 apud ANDERSON; LAMSAL, 2011), o rendimento percentual da extração proteica foi determinado com base na massa da matéria-prima em relação a massa do produto purificado, empregando-se o teor de proteínas do resíduo (fórmula 1).

Fórmula 1: Rendimento percentual da extração proteica.

$$R (\%) = (Mp/Mmp) \times 100$$

R (%): resíduo da proteína, **Mp**: é a massa do produto e **Mmp**: a massa da matéria-prima.

Fonte: Próprio autor.

3.1.3 Caracterização da proteína

A zeína foi caracterizada por espectroscopia no infravermelho (FTIR), utilizando um Espectrômetro Perkin-Elmer (Spectrum 100) com dispositivo de refletância total atenuada (ATR) de cristal de seleneto de zinco revestido com diamante. As medições foram realizadas em filmes de zeína com 100 micrômetros de espessura, com resolução de 4 cm^{-1} , sendo feitas 16 varreduras para cada corrida realizada de 4.000 a 650 cm^{-1} .

3.1.4 Preparação da membrana não reticulada

Para a preparação das membranas não reticuladas, a proteína após extraída e purificada foi novamente solubilizada em etanol 70% (Álcool etílico hidratado 70°INPM - Ciclo Farma) em placa de petri e colocada para secar em temperatura ambiente. Em seguida, foi removida com espátula e lavadas com água deionizada, colocada para secar novamente em temperatura ambiente e prensada em prensa hidráulica com aquecimento (SL10 – SOLAB) com auxílio de chapa metálica e kapton a 1 tonelada na temperatura entre 71 e 73 °C por 2 minutos.

3.1.5 Preparação da membrana reticulada

Para a preparação das membranas reticuladas, a proteína após extraída e purificada foi novamente solubilizada em etanol 70% (Álcool etílico hidratado 70°INPM - Ciclo Farma) em placa de petri e colocada para secar em temperatura ambiente, removida com espátula e imersa em formaldeído a 4% (Formaldeído - QUIMESP QUÍMICA) na proporção de 10 mL de água deionizada para 0,4 mL do formaldeído. Essas membranas foram deixadas na solução por 30 minutos; após esse procedimento foram lavadas com água deionizada, colocada para secar novamente em temperatura ambiente e prensada em prensa hidráulica com aquecimento (SL10 – SOLAB) com auxílio de chapa metálica e kapton a 1 tonelada na temperatura entre 71 e 73 °C por 2 minutos.

3.1.6 Caracterização da membrana não reticulada e reticulada

As membranas reticuladas e não reticuladas foram caracterizadas para determinação de suas propriedades estruturais, físico/químicas e biológicas.

- **Físico/Químico**

- a) **Propriedades mecânicas (ensaios mecânicos):**

Os ensaios de tração foram realizados no equipamento de DMA, Modelo 8000 da Perkin Elmer, em modo tração, com temperatura constante de 25°C. A carga utilizada no ensaio foi de 10 N com uma taxa de 0,5N/min.

As dimensões dos corpos de prova foram retangulares de 7,5 mm de largura, 25 mm de comprimento e 0,1 mm de espessura. Foram utilizados 2 corpos de prova de cada amostra.

- b) **Degradação hidrolítica in vitro:**

As membranas não reticuladas (A e B) e reticuladas (A e B) com dimensões de aproximadamente 1,6 x 1,0 cm, foram retiradas do filme para estudo de degradação hidrolítica. As amostras foram imersas em becker contendo solução fisiológica a 0,9% (Sonobiol – 9g/L - pH 4,5 à 7,0), sendo que as amostras foram removidas em períodos específicos de 0, 07 e 15 e 30 dias. Foram lavadas em água deionizada, secas em temperatura ambiente por 24 horas e pesadas em balança analítica (SHIMADZU, modelo AY-220 – capacidade de 220g X 0,1mg) para determinação de perda de suas massas.

- **Ensaios de atividade biológica**

- a) **Ensaio de citotoxicidade:** Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando-se como substância reveladora o cloridrato de resazurina (Sigma), que possui potencial REDOX (óxido-redução), com mudança colorimétrica e indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo celular (O'BRIEN et al., 2000).

- ✓ **Preparação da amostra**

As membranas com 1,25 cm² permaneceram por 24 horas a 37°C em 0,5 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's médium - Sigma – Aldrich) com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF - Gibco), sob agitação. Após esse período, os eluatos obtidos foram utilizados sem diluição (denominados 100%) e diluídos através de diluições seriadas diretamente nas placas de 96 poços.

✓ **Linhagem celular**

A linhagem celular GM07492 - tipo fibroblástica não transformante - foi obtida no Laboratório de Micobacteriologia e no Laboratório de Mutagênese da FCF - UNESP, Araraquara. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's médium - Sigma - Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- Gibco) e replicadas semanalmente por tripsinização até um máximo de 10 passagens.

✓ **Ensaio de viabilidade celular pela resazurina**

A linhagem celular foi incubada sob condições padronizadas de cultivo celular em garrafas de cultivo de 75 cm², contendo meio de cultura (DMEM) apropriado para seu crescimento, suplementado com SFB (Gibco).

As células foram recolhidas da garrafa de cultivo utilizando 3 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), centrifugadas a 1500 rpm por 4 minutos e contadas em câmara Neubauer, utilizando o método de exclusão pela solução azul de trypan a 0,004% (Sigma). Em seguida, foram semeadas em microplacas de 96 poços (TPP) à uma concentração celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, a qual foi incubada, sob condições padronizadas de cultivo, durante 24h para permitir a aderência celular.

Para o tratamento, o eluato previamente preparado foi diluído na microplaca. As células foram novamente incubadas por 24 h. Posteriormente, o meio de cultura foi removido, e adicionados 50 µL de cloridrato de resazurina 0,4 mM (Sigma).

A leitura da fluorescência foi realizada em leitor de microplacas em filtros de excitação e de emissão nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em ensaios independentes.

b) **Ensaio de migração e invasão celular in vitro:** para o preparo da amostra, as membranas com 1,25 cm², foi submetida a esterilização em luz ultravioleta (UV) por 30 minutos em cada lado da superfície. O meio de cultura utilizado no ensaio de adesão celular foi

o DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's médium - Sigma – Aldrich) com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF – Gibco).

✓ **Linhagem celular**

A linhagem celular GM07492 - tipo fibroblástica não transformante - foi obtida no Laboratório de Microbacteriologia e no Laboratório de Mutagênese da FCF - UNESP, Araraquara.

As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's médium - Sigma - Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- Gibco) e replicadas semanalmente por tripsinização até um máximo de 10 passagens.

✓ **Ensaio de Migração Celular**

A linhagem celular foi incubada sob condições padronizadas de cultivo celular em garrafas de 75 cm², contendo meio de cultura apropriado para seu crescimento, suplementado com SFB (Gibco).

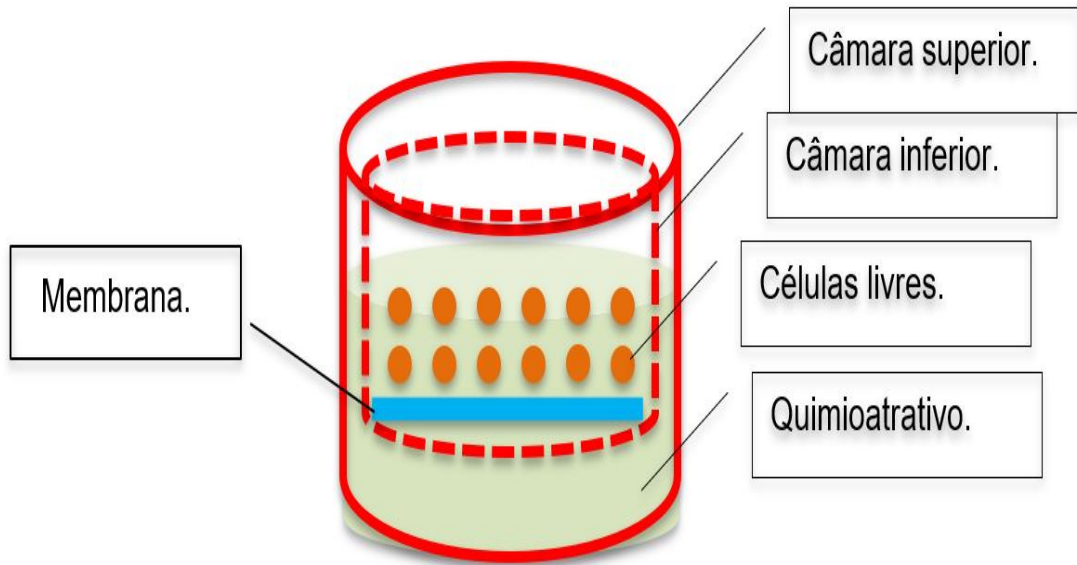
As células foram recolhidas da garrafa de cultivo utilizando 3 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), centrifugadas a 1500 rpm por 4 minutos e contadas em câmara Neubauer, utilizando o método de exclusão pela solução azul de trypan a 0,004% (Sigma).

Para a verificação da migração celular através da membrana proposta, o experimento foi iniciado com a inserção da membrana no compartimento apical das placas *Transwell*® (figura 9 a), seguido da adição da suspensão celular sobre a membrana, a fim de depositar-se as células e acompanhar sua migração (ou não), através da membrana. Em caso de migração, as células cresceriam aderidas ao filtro do sistema *Transwell*®.

A concentração celular utilizada foi de $4,5 \times 10^4$ células/poço, utilizando-se uma placa de 24 poços. Para o experimento, realizou-se um controle de esterilidade da membrana, onde adicionou-se ao poço apenas membrana com DMEM, em seguida, um controle de esterilidade do compartimento apical, onde havia o filtro e o meio de cultivo (DMEM). O experimento foi realizado com um poço contendo somente as células (para controle de crescimento), um poço contendo o filtro com células semeadas em sua superfície, um poço contendo o filtro sem células, um poço contendo a membrana de zeína com células

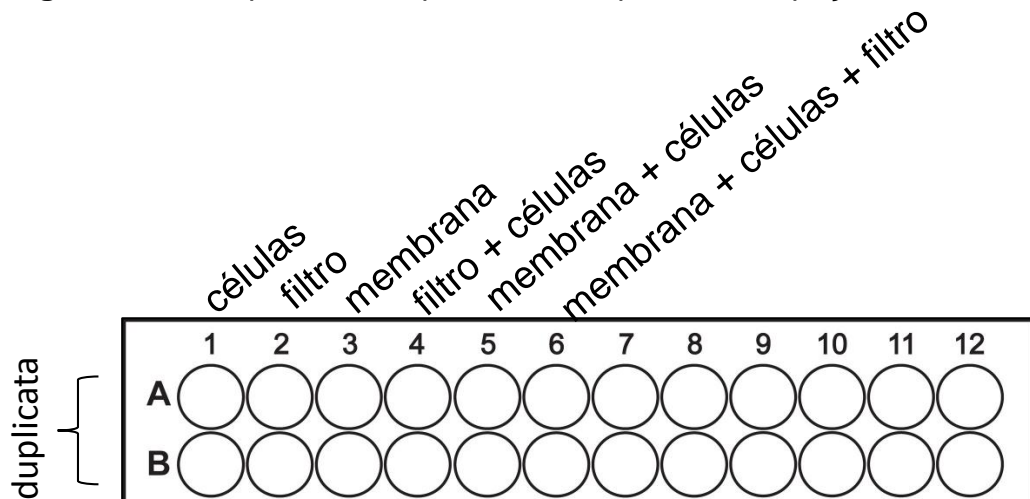
semeadas diretamente sobre sua superfície, um poço contendo a membrana de zeína disposta sobre o filtro, sobre a qual as células foram semeadas para análise da sua ação de barreira à migração celular (figura 12b). A placa foi novamente incubada por 24h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C. A invasão celular foi avaliada através da observação da presença/ausência das células na superfície do filtro do sistema *transwell* utilizando-se um microscópio óptico de transmissão/reflexão DM 2500.

Figura 12 a: Método de invasão celular.



Fonte: Próprio autor.

Figura 12 b: Esquema do experimento na placa de 96 poços.



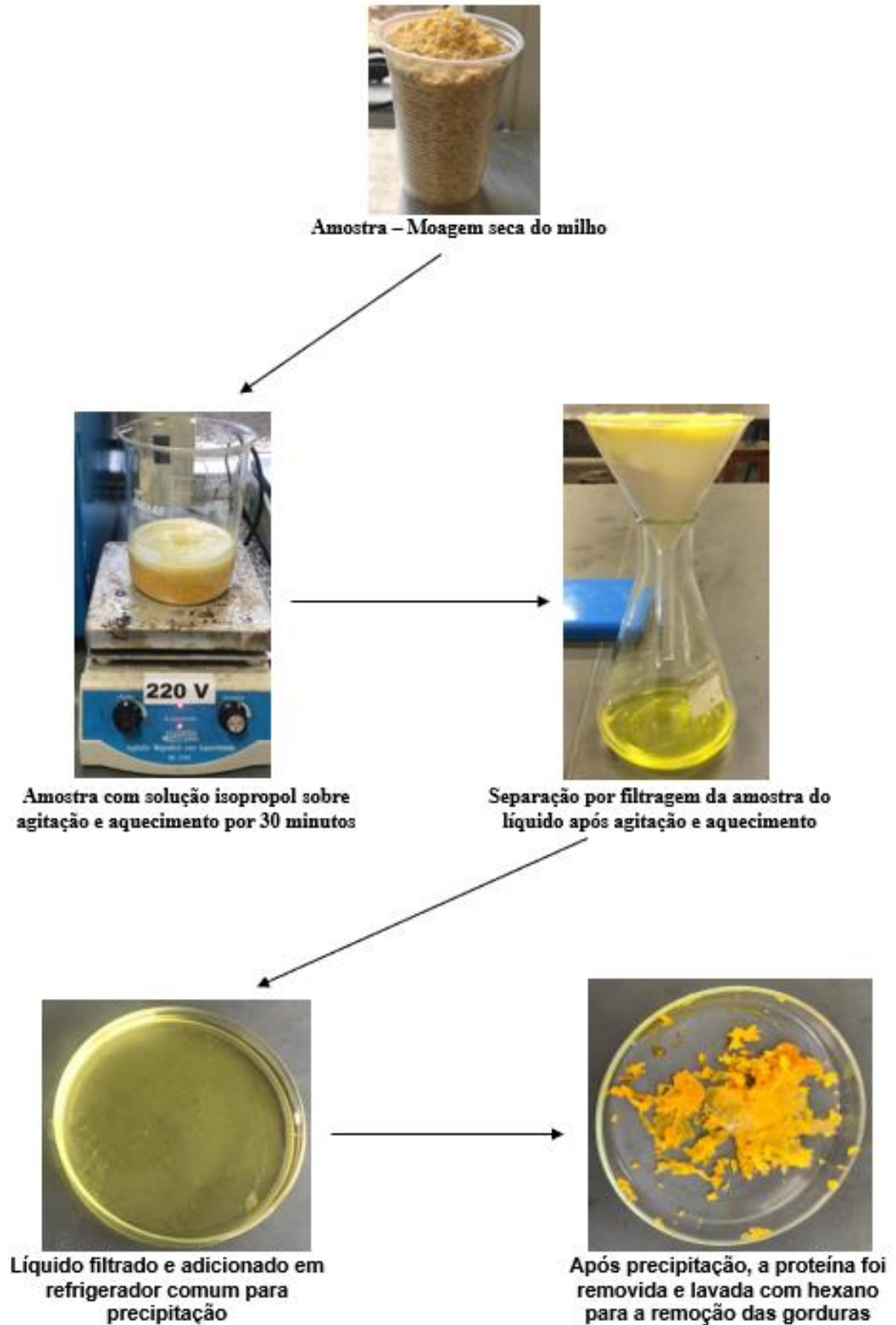
Fonte: Próprio autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Extração, separação e preparo dos filmes de zeína

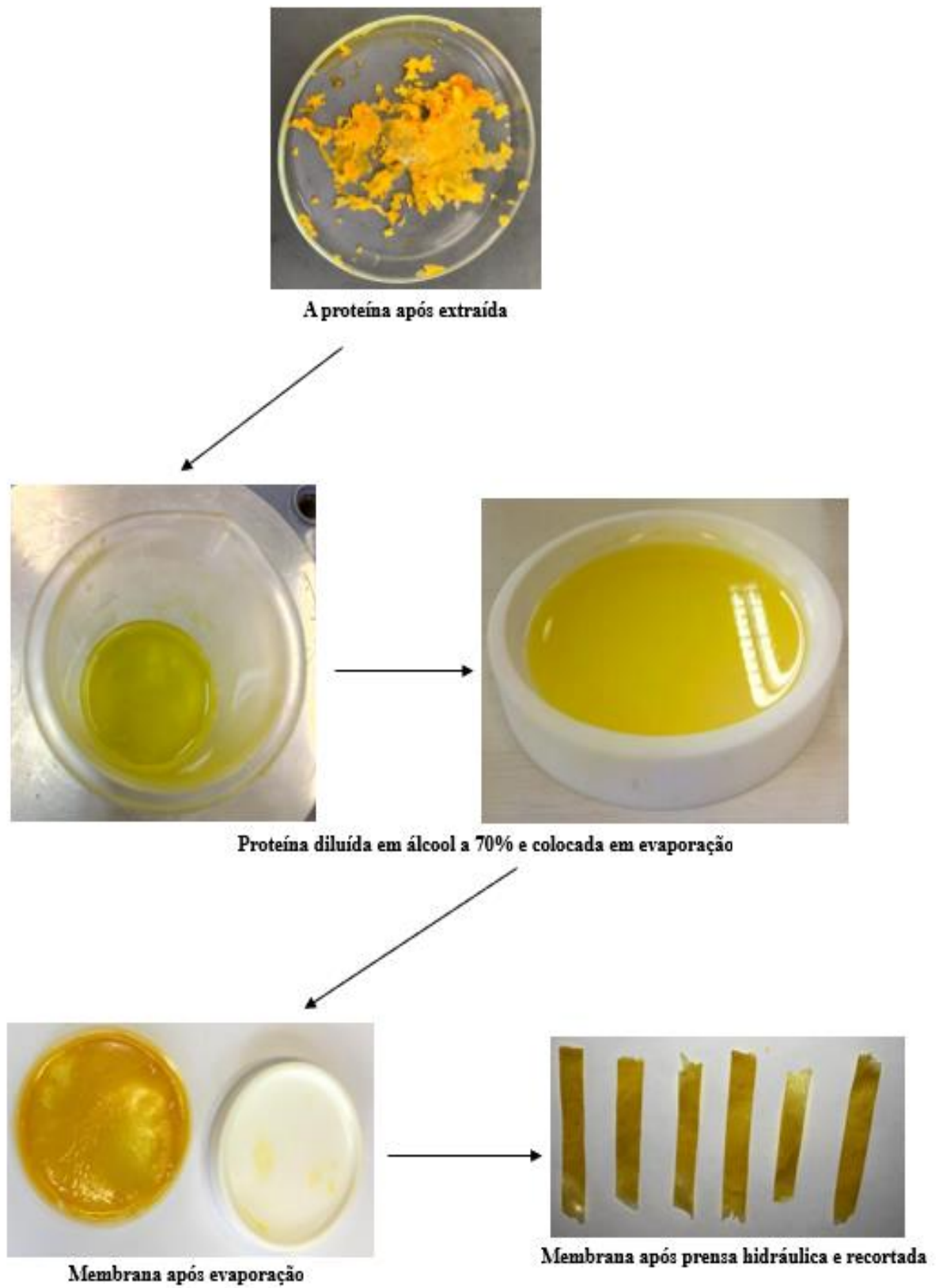
A zeína foi extraída utilizando-se uma metodologia simples de extração com solvente isopropílico sob aquecimento e agitação. As etapas da extração estão ilustradas na figura 13, onde o milho seco foi triturado até atingir a granulometria de pó, seguindo-se assim o processo de extração já citado na metodologia deste trabalho. Após o processo de extração, o solvente foi separado da matéria-prima por filtração, conforme ilustrado. A solução resultante contendo a zeína foi seca à temperatura ambiente e lavado com hexano por 3 vezes para a remoção do excesso de gorduras. Este material foi dissolvido em etanol (figura 14) e seco em estufa a 45°C, e então prensado a 70°C, gerando os filmes utilizados neste trabalho.

Figura 13: Representação da extração da proteína.



Fonte: Próprio autor.

Figura 14: Representação do preparo da membrana.



Fonte: Próprio autor.

4.2 Cálculo do rendimento

Com base no cálculo de rendimento da extração da proteína pela fórmula já citada na metodologia deste trabalho, o rendimento por este método foi de 5,11%.

4.3 Caracterização da proteína

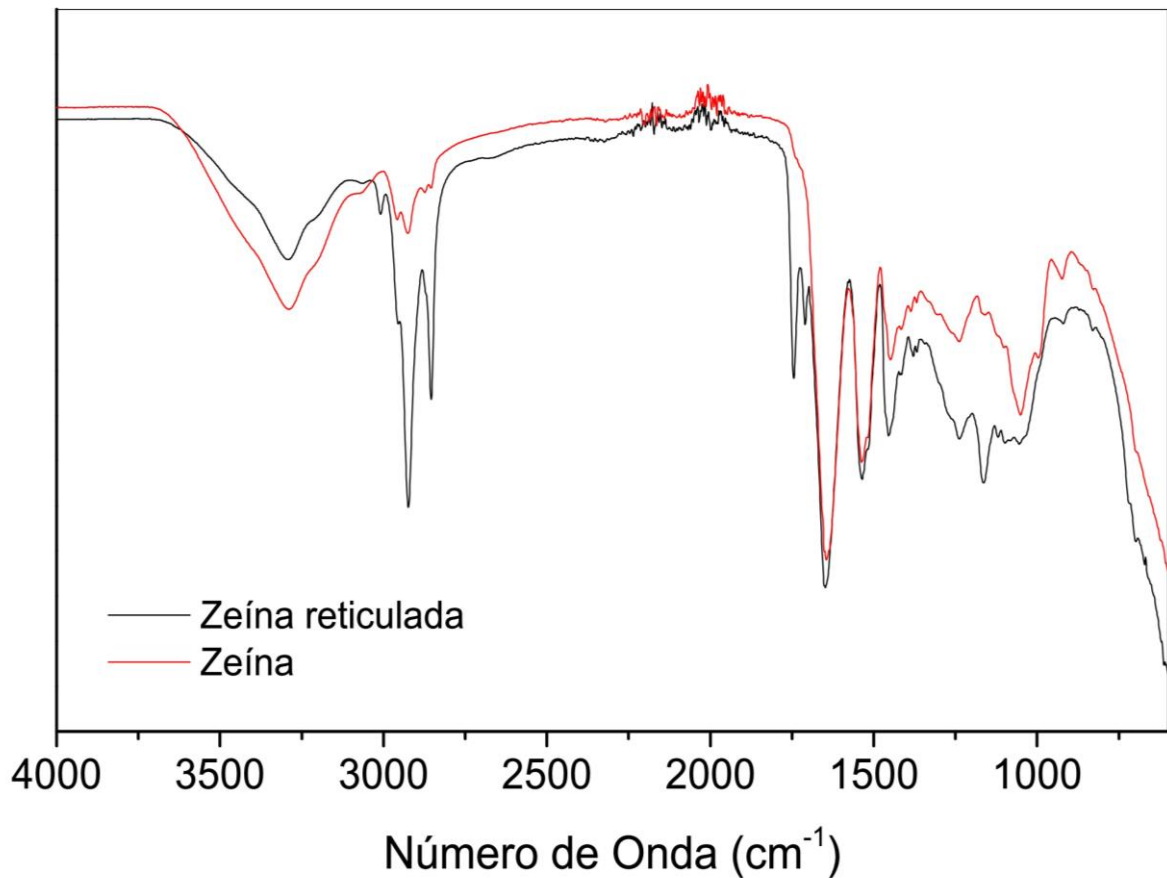
- **Amostra não reticulada**

Os espectros de FTIR, da proteína, representado na figura 15, apresentam o perfil típico da prolamina do milho zeína. A banda larga nas regiões de 3300 cm^{-1} corresponde à vibração de grupamentos hidroxila (O-H), em 2924 a 2851 cm^{-1} do espectro, indicando os grupamentos alifáticos (CH_2 e CH_3).

As bandas nas regiões de 1750 a 1657 cm^{-1} indicam a presença do grupamento peptídeos (C=O) (Amida I) e nas regiões de 1540 a 1450 correspondem à vibração dos nitrogênios das amidas, sendo estes grupamentos típicos de proteínas. Além disto, as bandas em 1540 a 1450 cm^{-1} são importantes por estarem associadas à vibração de alongamento C = N (estiramento da ligação Amida A e dobramento da ligação NA), diretamente relacionadas à conformação da estrutura química principal. A amida encontrada é composta por muitas bandas de absorção, sugerindo uma alta proporção de α -zeínas helicoidais extraídas (BANCILA et. al, 2015).

- **Amostra reticulada**

As diferenças mostradas no gráfico entre a proteína não reticulada e reticulada se encontram nas regiões 1750 a 1600 cm^{-1} , indicando a presença do grupamento C=O. Na de 1400 cm^{-1} indicam o acetaldeído $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ e cadeias laterais de glutaraldeído $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$. O grupamento C=O faz parte da estrutura do glutaraldeído, podendo indicar sua presença.

Figura 15: Gráfico de FTIR.

Fonte: Próprio autor.

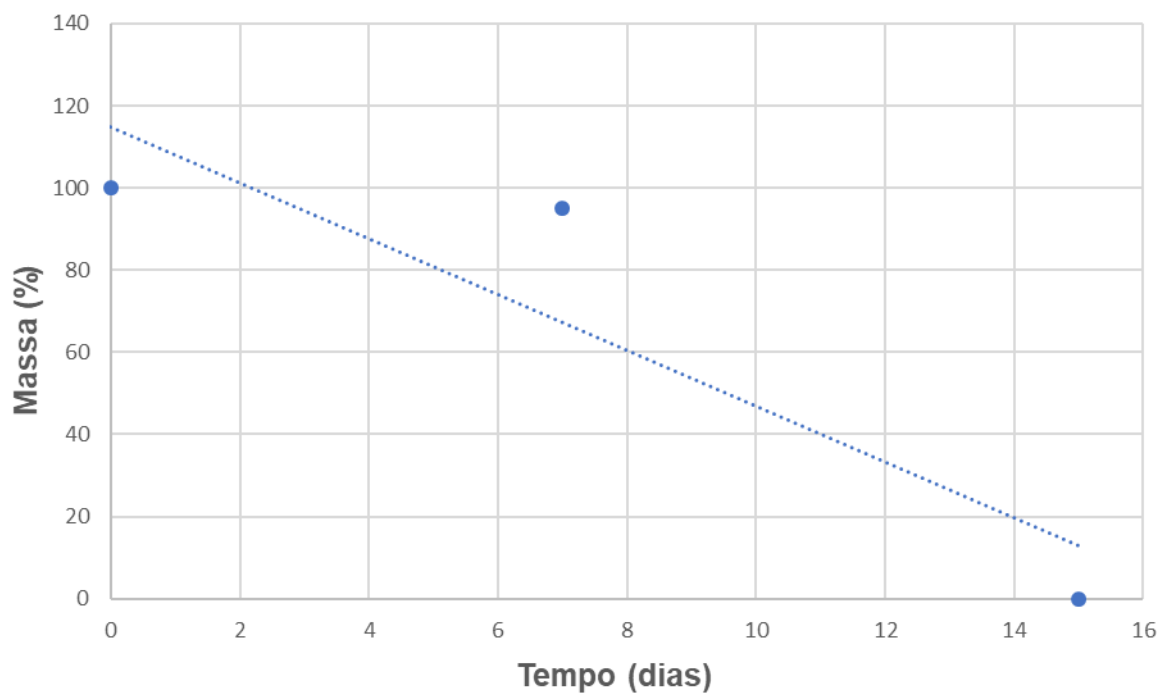
4.4 Degradação hidrolítica in vitro

As amostras A e B não reticuladas foram submetidas ao ensaio de degradação hidrolítica em meio fisiológico, em que suas perdas de massa foram determinadas em um período de 07 dias e os resultados são representados na figura 16. Considerando as suas massas iniciais de 100% para cada membrana, após suas remoções do meio fisiológico houve uma perda de massa de aproximadamente 5% para cada. Apesar de aparentemente não terem perdido massa, elas degradaram-se, mostrando não serem ideais para este estudo, havendo, portanto, a necessidade de se utilizar a membrana sobre processo de reticulação.

As amostras A e B reticuladas foram submetidas ao ensaio de degradação hidrolítica em meio fisiológico, em que suas perdas de massa foram determinadas em um período de 0, 15 e 30 dias respectivamente. Considerando

as suas massas iniciais de 100% para cada membrana, após suas remoções do meio fisiológico a amostra A perdeu aproximadamente 10% de massa com 15 dias e degradação com 30 dias. Já a amostra B perdeu aproximadamente 07% de massa com 15 dias e 43% com 30 dias (figura 17), provando ser a membrana reticulada ideal para a proposta desta pesquisa, pela sua desintegração e perda considerável de massa em um período compatível com o reparo ósseo.

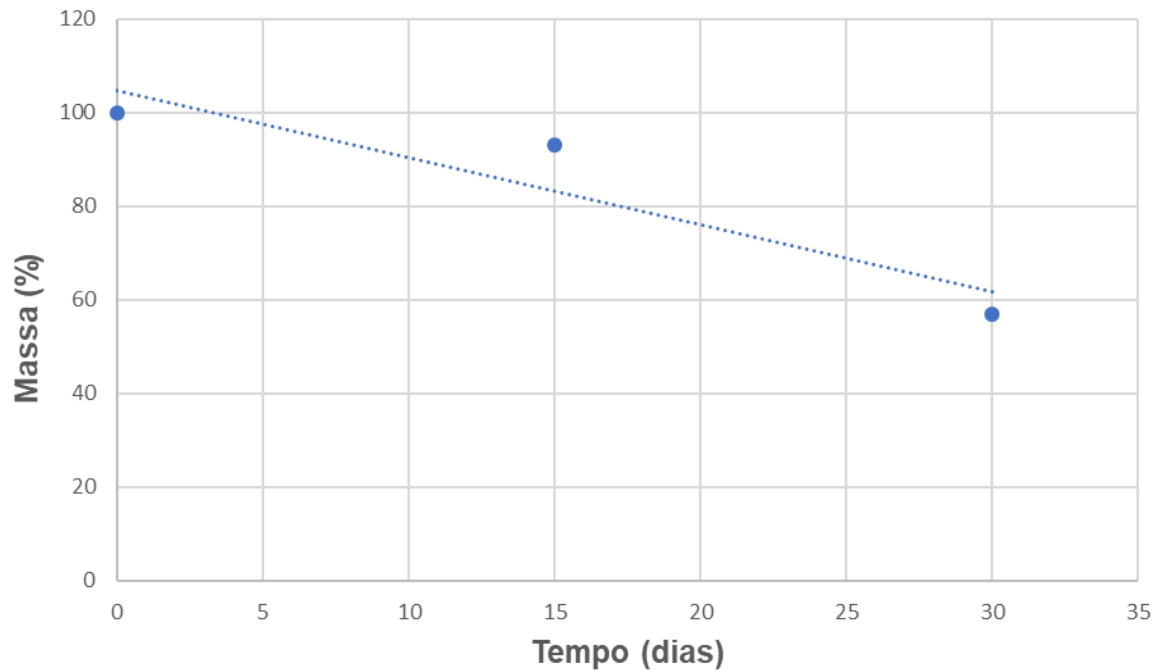
Figura 16: Gráfico representativo da degradação hidrolítica - Amostra não reticulada.



Degradação hidrolítica da amostra não reticulada, evidenciando a porcentagem em massa em função do tempo em dias.

Fonte: Próprio autor.

Figura 17: Gráfico representativo da degradação hidrolítica - Amostra reticulada.



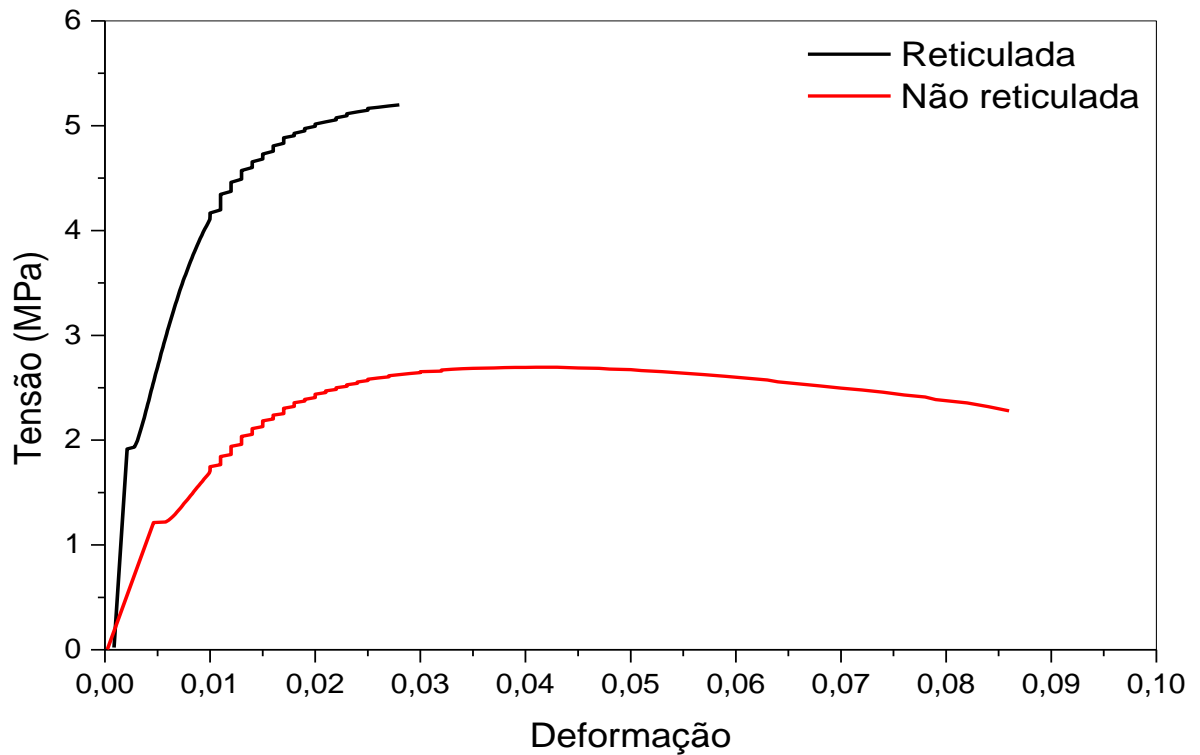
Degradação hidrolítica da amostra reticulada, evidenciando a porcentagem em massa em função do tempo em dias.

Fonte: Próprio autor.

4.5 Propriedades mecânicas (ensaios mecânicos)

Na figura 18 são apresentados os resultados das propriedades mecânicas de resistência à tração e deformação na ruptura de duas amostras uma reticulada e outra não reticulada, ambas submetidas as mesmas condições para a realização do ensaio. Foi observado que a amostra reticulada apresenta maior resistência a deformação após uma tensão em comparação com a amostra não reticulada, conforme esperado para polímeros. Os dados de resistência a tração e deformação obtidos a partir das curvas do ensaio mecânico, são representados na Tabela 1.

Figura 18: Gráfico das propriedades mecânicas da membrana reticulada por DMA.



Espectros de FTIR dos filmes de zeína, sendo a linha vermelha a amostra não reticulada e preta a reticulada, comparando entre as duas suas forças de resistência sobre uma tensão.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 1 – Comportamento da resistência à tração e alongamento na ruptura das amostras de membrana de zeína reticulada e não reticulada em equipamento DMA.

Amostra	Resistência à tração (Mpa)	Deformação (%)
Reticulada	5,5 ± 0	0,03 ± 0
Não reticulada	2,5 ± 0	0,087 ± 0

Fonte: Próprio autor.

4.6 Ensaio de citotoxicidade

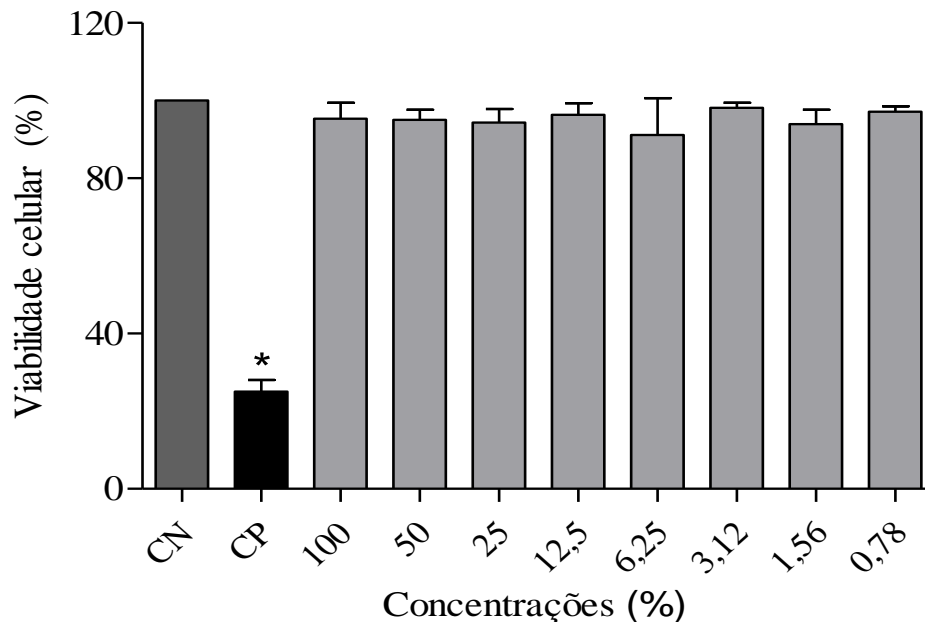
Os resultados da avaliação da viabilidade celular estão apresentados na Figura 19 expressos em porcentagem de células viáveis de GM-07492 tratadas com as diferentes concentrações dos eluatos da membrana.

As concentrações avaliadas não induziram uma redução estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na viabilidade celular comparado ao controle negativo.

Os resultados obtidos mostraram uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular das culturas tratadas com DMSO 20% (controle positivo), garantindo a sensibilidade do sistema-teste (25% de viabilidade celular).

A partir destes resultados, conclui-se que a zeína não apresentou toxicidade nas condições do ensaio. Este resultado está de acordo com o esperado, visto que se refere a uma proteína de origem natural, extraída de um produto alimentar.

Figura 19: Ensaio de viabilidade celular com a linhagem celular GM-07492 tratadas com a membrana reticulada de zeína.



Os valores são apresentados como média e desvio-padrão. CN: controle negativo (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, viabilidade celular de 100%); Controle positivo (DMSO 20%; viabilidade celular de 25%)

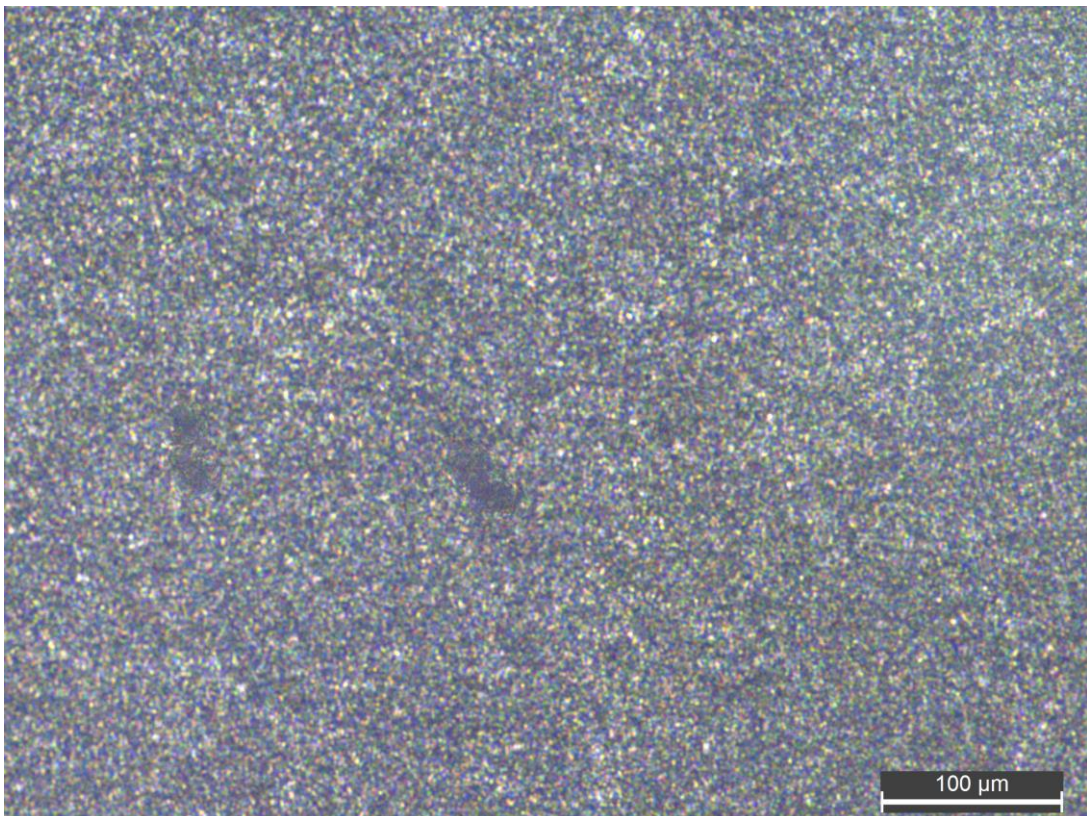
*Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor.

4.7 Ensaio e migração e invasão celular in vitro

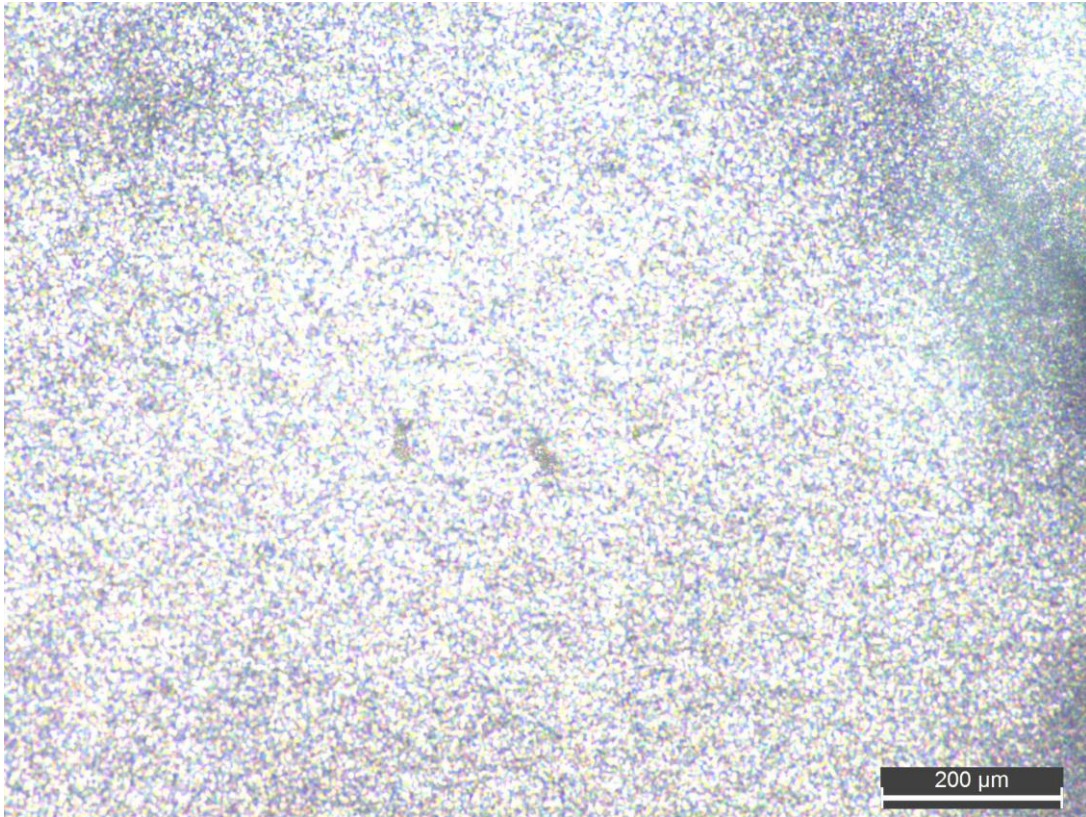
O ensaio de migração e invasão celular em transwell utilizado DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's médium - Sigma – Aldrich) com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF – Gibco), foi realizado para investigar a capacidade de não migração de células na membrana com o propósito de uma barreira. Após a mesma ter sido incubada por 24h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C, observou-se que as células não migraram, não sendo visualizadas na parte superior do filtro com a membrana em análise por meio das imagens obtidas por microscopia óptica (figuras 20a e b).

Figura 20a: Representação da membrana ensaios de migração e invasão celular - Imagem ampliada a 100 micrômetro.



Fonte: Próprio autor.

Figura 20b: Representação da membrana ensaios de migração e invasão celular - Imagem ampliada a 200 micrômetro.



Fonte: Próprio autor.

5 CONCLUSÕES FINAIS

A extração da proteína foi realizada com sucesso, sendo o seu rendimento satisfatório para a utilização em todos os ensaios presentes neste trabalho.

A caracterização por FTIR indicou que o produto resultante do processo de extração é a proteína de interesse.

Após a confecção da membrana e sua submissão e os resultados ensaio de degradação hidrolítica em vitro, houve a necessidade de sua reticulação para a continuação deste trabalho.

As propriedades mecânicas revelam que a amostra reticulada apresenta maior resistência a deformação após uma tensão em comparação com a amostra não reticulada.

Os ensaios de citotoxicidade e migração/invasão celular, ambos foram de maneira geral eficazes na avaliação de citotoxicidade e barreira celular.

A proteína reticulada apresentou propriedades superiores à não reticulada para a aplicação proposta neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, Timothy J.; LAMSAL, Buddhi P. **Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review**. *Cereal Chemistry*, v. 88, n. 2, p. 159-173, 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1094/CCHEM-06-10-0091>>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

2. AYUB, Lauro Garrastazu et al. **Regeneração óssea guiada e suas aplicações terapêuticas**. *Braz J Periodontol*, v. 21, n. 4, 2011. Disponível em: <https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44627784/artigo4.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DRegeneracao+ossea+guiada+e+suas+aplicaco.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190712%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20190712T224826Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=3ed464dca50aa5e128de096b18d5526a21f209072f989425f4091447b356a29d>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

3. BANCILA, Sabina et al. **Ultrasoundassisted zein extraction and determination in some patented maize flours**. *Rev. Roum. Chim*, v. 61, n. 10, p. 725-731, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Gabi_Drochioiu/publication/308892351_Ultrasound-assisted_zein_extraction_and_determination_in_some_patented_maize_flours/links/57f5516508ae280dd0b8dec7.pdf>. Acesso em: 15 de jul. 2019.

4. BAYNE, Stephen C. Dental biomaterials: **where are we and where are we going?**. *Journal of dental education*, v. 69, n. 5, p. 571-585, 2005. Disponível em: <<http://www.jdentaled.org/content/jde/69/5/571.full.pdf>>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

5. Bhat, Sumrita and Ashok Kumar. **"Biomaterials in Regenerative Medicine"**. (2012). Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/4a17/0a97a993d5f64d7cf00f36611d8b065a787d.pdf?_ga=2.162973564.1160422109.1562974140-852678246.1562974140>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

6. BISHARAT, Lorina et al. **Aggregation of zein in aqueous ethanol dispersions: Effect on cast film properties**. *International journal of biological macromolecules*, v. 106, p. 360-368, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017307791?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

7. COSTA, J. B. Z. et al. O uso de membranas biológicas para regeneração óssea guiada em implantodontia. **Revista Bahiana de odontologia**, v. 7, n. 1, p. 14-21, 2016. Disponível em: <[file:///H:/Users/Jorge%20Bonadio/Documents/Downloads/751-3410-1-PB%20\(4\).pdf](file:///H:/Users/Jorge%20Bonadio/Documents/Downloads/751-3410-1-PB%20(4).pdf)>. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

8. DA SILVA PAPALIA, Índira; LONDERO, Patrícia Medianeira Grigoletto. **Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos**. *Ciência Rural*, v. 45, n. 3, p. 552-559, 2015. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/331/33138344028.pdf>>. Acesso em 12 de jul. de 2019.
9. Dabra, S., Chhina, K., Soni, N., & Bhatnagar, R. (2012). **Engenharia de tecidos na regeneração periodontal: uma breve revisão**. *Dental research journal*, 9(6), 671–680. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3612212/>>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.
10. Geistlich Pharma do Brasil. Catálogos. Conceitos de tratamento para alvéolos pós-extração. Disponível: <<https://www.geistlich.com.br/pt/dentistas/membranas/biogide/beneficios-para-o-usuario/>> Acesso em: 19 de nov. 2019.
11. MOREIRA, Maria Teresa de Oliveira. **Biologia da regeneração periodontal**. 2017. Tese de Doutorado. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10400.26/18915>>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.
12. MUSATOVA, Sofia. Estratégias para a preservação do rebordo alveolar. 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10400.26/14703>>. Acesso em: 09 de agosto de 2019.
13. O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 267 (17), p. 5421-5426, 2000. Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>>. Acesso em: 03 de janeiro de 2020.
14. PAES, Maria Cristina Dias. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf>>. Acesso em: 15 de agosto de 2019.
15. PEREIRA, Nayla Silva et al. Regeneração óssea guiada utilizando membrana reabsorvível fixada com etilcianoacrilato. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 69, n. 1, p. 39, 2012. Disponível em: <<http://www.revista.aborj.org.br/index.php/rbo/article/view/367/299>>. Acesso em: 29 de agosto de 2019.
16. RIBEIRO, Wanessa Ximenes. **Caracterização de biofilme à base de zeína e ácido oléico adicionado de nanocarbonato**. 2014. 55 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/115792>>. Acesso em: 14 de jul. 2019.
17. SALOMÃO, Munir; SIQUEIRA, José Tadeu Tesseroli de. **Regeneração óssea guiada através de barreira exposta ao meio bucal após exodontias**. Relato de caso. **Rev Bras Implant**, v. 7, n. 10, p. 5-7, 2010. Disponível em: <<http://boneheal.inpbiomedical.com/wp->

<content/uploads/2012/05/06-ROG-atrav%C3%A9s-de-barreira-exposta-ao-meio-bucal-ap%C3%B3s-exodontias.-Relato-de-caso-IBI-2010.pdf>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

18. SCULEAN, Anton et al. **Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review**. *Periodontology 2000*, v. 68, n. 1, p. 182-216, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/prd.12086?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

19. SILVA, Viviane Viana. **Aplicação de biomateriais em ortopedia e engenharia de tecido ósseo**. *Revista Saúde e Meio Ambiente*, v. 5, n. 2, p. 14-27, 2017. Disponível em: http://www.seer.ufms.br/ojs/index.php/sameamb/article/view/4151/pdf_24. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

20. SINHORETI, Mário Alexandre Coelho; VITTI, Rafael Pino; CORRER-SOBRINHO, Lourenço. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 67, n. 4, p. 256-261, 2013. Disponível em: <http://revodonto.bvsalud.org/pdf/apcd/v67n4/a02v67n4.pdf>. Acesso em: 09 de agosto de 2019.

21. TURRI, Alberto et al. **Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment**. *Biomaterials*, v. 84, p. 167-183, 2016. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S014296121600048X?token=ED19E3B9AF871E6C7165B25F767249C2099D0D5E1486CBB801FB63E0829C58E0D6A94F885A3A74DC52E1D9CA71B70CC7>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.