

Autores. Título. *In Propriedades e Aplicações dos Biomateriais*, Editores Carlos Nelson Elias, Ana Karine Rocha de Andrade Nattrodt e Roberto Hirsch Monteiro. Edição digital 2022.

TÍTULO DO ARTIGO

AValiação *in vivo* da membrana de poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) associada ao fosfato de cálcio no potencial inflamatório: estudo morfológico e histomorfométrico.

Rafael Coutinho Carrijo, SLMandic, corcrj@gmail.com, 0000-0001-7331-018X
Joviniano M. O. Júnior, SLMandic, crodf2393@gmail.com, 0000-0002-6516-1038
Pedro G. Montagner, SLMandic, pgmontagner@gmail.com, 0000-0002-7836-7131
Elizabeth F. Martinez, SLMandic, elizabeth.martinez@slmandic.edu.br, 0000-0002-4991-1185

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar as características morfológicas e a influência no potencial de indução de inflamação de uma membrana sintética de poli ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA) incorporada com o fosfato de cálcio DuoSynth® (FGM) comparada a uma membrana de colágeno Bio-Gide® (Geistlich Biomaterials, Suíça), em defeitos críticos em calvárias de ratos. Foram utilizados 32 ratos machos da espécie *Rattus Norvegicus Albinus* da linhagem Wistar, com idade média de 3 meses, estes divididos em grupos teste (PLGA e fosfato de cálcio, n=16) e controle (Bio-Gide®, n=16), sendo realizados defeitos críticos com 6,0 mm de diâmetro nas calvárias. Após 7, 30, 60 e 90 dias das cirurgias, os animais foram eutanasiados e os espécimes processados para as análises histológicas e histomorfométricas para mensuração do infiltrado inflamatório na área do defeito. Além disso, foram avaliadas as características morfológicas da superfície das membranas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e pH, da dissolução *in vitro*, após imersão das membranas por 24, 48 e 72h em solução tampão (PBS). Os dados foram submetidos a análise estatística, sendo considerada o nível de significância de 5%. Os resultados evidenciaram característica de membrana bifásica para PLGA com grânulos de fosfato de cálcio incorporados em escala nanométrica, dispersos nas fibras aleatoriamente dispostas. O pH da solução foi maior para membrana PLGA quando comparado à membrana colagênica, em todos os tempos avaliados ($p < 0,05$). Em ambas as membranas observou-se no leito a presença de infiltrado inflamatório tipicamente mononuclear linfocitário, sendo de moderado a intenso aos 7, 30, 60 dias de análise ($p > 0,05$). Aos 90 dias, observou-se infiltrado inflamatório discreto para ambas as membranas, com presença de células gigantes fagocíticas para grupo da membrana de PLGA. Os resultados do presente estudo evidenciaram que a membrana aloplástica de PLGA incorporada com fosfato de cálcio apresentou características morfológicas de membrana para regeneração óssea e tecidual guiada. Além disso, apesar do pH mais elevado quando degradada em solução *in vitro*, apresentou potencial de indução de inflamação semelhante à Bio-Gide, sendo, portanto, alternativa para procedimentos clínicos que exijam uso de membrana.

Palavras-chave: Membranas. PLGA. Colágeno. Inflamação.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo tem várias características que lhe permitem uma grande capacidade de regeneração, entretanto, o tamanho da lesão óssea pode ser decisivo para a falha na regeneração completa do tecido, consequentemente, levar a deformidades permanentes (Fardin et al., 2010). Assim, em procedimentos que requerem ganho tecidual, os biomateriais ganham destaque para uso clínico (Oliveira, 2004).

As propriedades desejáveis dos biomateriais, quando utilizados em procedimentos de regeneração óssea associado à colocação de implantes, sujeitos a cargas mastigatórias são: biocompatibilidade, osteogênicidade, osteocondução e/ou osteoindução no processo de cicatrização, homeostasia dos tecidos peri-implantares, completa ausência de antigenicidade, atuar como arcabouço para crescimento tecidual e substituição por tecido ósseo neoformado (Jones, 2001; Artzi et al., 2004; Lemons, 2004).

Dentre os substitutos ósseos utilizados, os enxertos de origem autógena são considerado o “padrão ouro” em termos de potencial osteogênico para enxertia de tecido duro, mas eles apresentam algumas desvantagens, tais como disponibilidade limitada, morbidade da área doadora e tendência a reabsorção parcial (Valentini, Abensur, 1997; Valentini et al., 1998; Wang, 2003).

A fim de evitar intervenções cirúrgicas adicionais, o que aumenta a morbidade e possíveis inconvenientes ao paciente, o uso de substitutos ósseos de origem humana, bovina e sintética têm sido amplamente empregados (Moore et al. 2001; Sándor et al., 2003; Hirota et al., 2009).

Outras categorias de materiais que são os aloplásticos, categorizados como produtos sintéticos e biocompatíveis. Estão disponíveis com grande variedade no mercado como biomateriais cerâmicos, polímeros e compósitos. A hidroxiapatita sintética (HA) estão entre os biomateriais preferenciais para neoformação óssea promovendo a função de substitutos ósseos. A HA cerâmica e porosa apresenta capacidade de integrar-se ao leito receptor, sendo osteocondutora e apresentando êxito na reconstrução de defeitos ósseos nas áreas médica e odontológica (Caria et al., 1999).

Outro material aloplástico utilizado tem na sua composição química as cerâmicas de fosfato de cálcio, sendo estas empregadas como substitutos ósseos no reparo de defeitos, sendo o beta-tricálcio fosfato (β -TCP) um dos primeiros a ser utilizado na reparação óssea (Moore et al., 2001; Takeuchi et al., 2009). O β -TCP é um material biocompatível e reabsorvível, e seu mecanismo de formação óssea é por meio da osteocondução (Eleftheriadis et al., 2010).

Vale ressaltar outro tipo de biomaterial amplamente associado, são as membranas para regeneração óssea guiada (ROG), sendo que a primeira membrana sintetizada, consistia em um componente que não era clinicamente viável, mas serviu para estabelecer o conceito de ROG (Nyman et al., 1982). Posteriormente, foram estabelecidas algumas características básicas para que a membrana se tornasse clinicamente viável (Lindhe et al., 2010), devendo ser feita de um material biocompatível, porém apenas poucos biomateriais são completamente inertes, sendo assim, as membranas não devem promover sensibilização imunológica ou induzir uma resposta inflamatória que possa interferir no processo de regeneração que comprometa os resultados clínicos. As membranas devem impedir a migração de células epiteliais e do tecido conjuntivo e promover a troca de nutrientes do tecido conjuntivo para o defeito ósseo.

As membranas não reabsorvíveis são consideradas as barreiras padrão-ouro para a regeneração tecidual guiada (RTG) e a principal membrana não reabsorvível é o

politetrafluoretileno expandido de alta densidade (e-PTFE), que pode ser reforçado ou não com titânio (Stoecklin-Wasmer et al., 2013). As membranas reabsorvíveis consistem em uma barreira natural ou sintética que é gradualmente degradada. As membranas naturais são feitas de colágeno reticulado de origem suína ou bovina (Bunyaratavej, Wang, 2001). Dentre as membranas sintéticas, destacam-se as de ácidos polilático ou copolímeros de ácido polilático e ácido poliglicólico, consideradas biocompatíveis e gradualmente reabsorvidas pelo organismo (Zhang et al., 2016).

O poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) é um copolímero bioreabsorvível, que quando degradadas *in situ*, formam subprodutos de dióxido de carbono e água (Zhang et al., 2016). Devido suas características químicas são passíveis de incorporação de componente inorgânicos como fosfato de cálcio, sendo considerado uma alternativa promissora, uma vez que estimula o recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas, auxiliando na osteogênese (Almeida et al., 2020).

Assim, tendo em vista o processo de manufatura de membranas, estudo objetivou avaliar, em modelo animal, a capacidade de uma membrana aloplástica de PLGA incorporada com fosfato de cálcio, em estimular processo inflamatório, em defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos, associando os achados com características morfológicas das membranas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Apreciação ética

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade São Leopoldo Mandic (CEUA SLMandic), e obteve a aprovação na reunião feita em 24/05/2018, sob o Protocolo nº 2018/20.

Grupos amostrais

Foram utilizados 2 tipos de membranas reabsorvíveis, uma composta de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico, PLGA) associadas ao biomaterial composto de fosfato de cálcio, disponibilizada comercialmente pela empresa FGM (Joinville, SC, Brasil) e outra de colágeno de origem porcina (colágeno I e III) não reticulada, a BioGide[®] (Geistlich, Wolhusen, Suíça).

Para os ensaios de caracterização morfológica, utilizou-se fragmentos de 4X4mm (n=3, para cada membrana). Para os ensaios de avaliação do pH, utilizou-se fragmentos de 5X5mm (n=9 para cada membrana), e após mantidos em solução para obter a proporção de 0,2g/mL, conforme normativas da ISO (International Organization for Standardization) 10993:11 (2017). Esse tamanho da amostra proporciona poder do teste de 0,80 ($\beta=0,20$), com tamanho de efeito $f=1,05$, com nível de significância de 0,05 ($\alpha=0,05$). Os cálculos foram realizados com auxílio do programa Gpower.

Avaliação morfológica (microscopia eletrônica de varredura) das membranas

A análise da topografia da superfície das membranas estudadas foi realizada por meio de Microscópio Eletrônico de Varredura com fontes de emissão de campo (FEG ZEISS modelo Auriga e FEI SEM Magellan 400L), empregando elétrons secundários acelerados a 5 kV em alto vácuo, com metalização das amostras com um filme condutor de ouro de aproximadamente 20 nm.

Avaliação do pH em solução

Para avaliação dos níveis de pH das membranas presentes em solução, os corpos de prova foram mantidos em tampão PBS, em pH 7,0. Seguindo a normativa ISO 10993:11

(2017), foi utilizado 0,2 g/ml de material para este ensaio, sendo estes mantidos em estufa a 37°C.

Após os tempos 24, 48 e 72h, o pH foi mensurado em peagâmetro de bancada (MPA210, MS Tecnopon Instrumentação, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e os valores tabulados para as análises. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados com a utilização dos anestésicos cloridrato de cetamina a 5% (Dopalen Vetbrands, Jacareí - SP, Brasil) e cloridrato de xilazina a 2% (Rompun Bayer, São Paulo - SP, Brasil). Após a tricotomia da área dorsal do crânio, foi realizada uma antisepsia com povidine tópico (PVPI aquoso a 10%, com 1% de iodo ativo, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil), seguida de incisão de 2 cm de extensão na região mediana do crânio, com extensão da protuberância occipital externa até a região nasofrontal. O periósteo foi incisado e divulsionado, com ampla exposição dos ossos occipital, frontal e parietal direito

Em cada animal, o defeito ósseo crítico bicortical, envolvendo as corticais externa e interna da calvária, foi criado no osso parietal por meio de uma broca trefina de 5 mm de diâmetro (Ref. 103.207, Neodent, Curitiba, PR, Brasil) com o auxílio de um contra-ângulo redutor 20:1 adaptado a um motor de rotação controlada, com velocidade de 800 rpm e abundante irrigação externa com solução fisiológica salina a 0,9%.

A cortical interna foi removida, liberando-a completamente da dura-máter, preservando esta estrutura intacta.

Randomicamente, os defeitos críticos dos dois grupos foram preenchidos com as membranas reabsorvíveis associadas ao coágulo sanguíneo. Os dois grupos experimentais foram recobertos por membrana de PLGA (Grupo teste) (Duosynt[®], FGM, Joinville, SC, Brasil), e o outro com uma membrana de colágeno de origem suína (grupo Controle, Bio-Gide[®], Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça).

Efetuada por planos, pele e periósteo foram aproximados e suturados com fio absorvível 4-0 de poliglactina 910, (Vycril[®], Ethicon, Johnson & Johnson, EUA). Logo após o procedimento cirúrgico, os animais receberam uma aplicação de cloridrato de tramadol (5mg/kg), que foi administrado por três dias consecutivos, com intervalo de 24 horas entre essas aplicações, bem como dose única de flunixinina megluminea (1,1 mg/kg).

Os animais foram eutanasiados após 7, 30, 60 e 90 dias do pós-operatório por meio de sobredosagem de anestésico (90-150 mg de Tiopental Sódico) associado a 10 mg/ml de Cloridrato de Lidocaína, que foram administrados via intraperitoneal. As remoções das calvárias foram feitas, seguidas da remoção de todos os tecidos moles, fixadas em formol a 10%, e encaminhadas para o processamento histológico.

Processamento histológico

As calvárias foram desmineralizadas em ácido fórmico a 20%, desidratadas e incluídas em parafina histológica, para a realização de cortes na região central dos defeitos, paralelos à sutura mediana, com 4 µm de espessura.

As amostras foram submetidas à coloração com Hematoxilina-Eosina e posteriormente montadas em lâminas com resina para a realização das fotomicrografias. Imagens das lâminas foram capturadas em um sistema de imagem computadorizado (AxioVision rel 4.8, Carl Zeiss), acoplados ao microscópio de luz Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Para as análises histológicas qualitativas e quantitativas, considerou-se a presença de inflamação, incluindo presença de vasos sanguíneos dilatados congestos, células gigantes, infiltrado leucocitário nos tecidos avaliados, em diferentes tempos de análise (7, 30, 60 e 90 dias). Foi adotado o escore de classificação, variando de 0 a 3, considerando a extensão do processo inflamatório na área do defeito, sendo 0 para ausente; 1 para discreto (até 25%); 2 para moderado (de 25% a 50%) e 3 para intenso (acima de 50%) (Martinez et al., 2019; Oliveira et al., 2021).

Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa R e com nível de significância de 5%. Inicialmente foram realizadas análises descritivas e exploratórias dos dados. A partir das análises exploratórias foram definidas as metodologias estatísticas adequadas a cada variável de estudo. Para analisar o escore de inflamação foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney para comparar as membranas e os testes de Kruskal Wallis e Dunn para comparar os tempos. O pH foi analisado por análise de variância a dois critérios (ANOVA, two way), teste de Tukey e teste t, para uma média para comparar com o pH no tempo inicial.

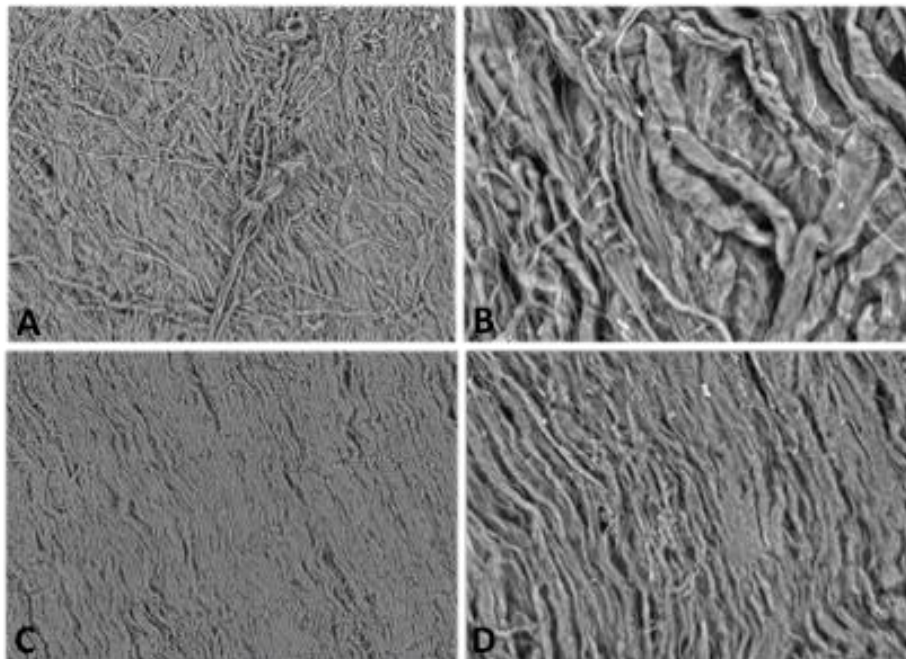
RESULTADOS

Caracterização Morfológica

Imagens características da morfologia ultra-estrutural das membranas estão ilustradas na figura 2.

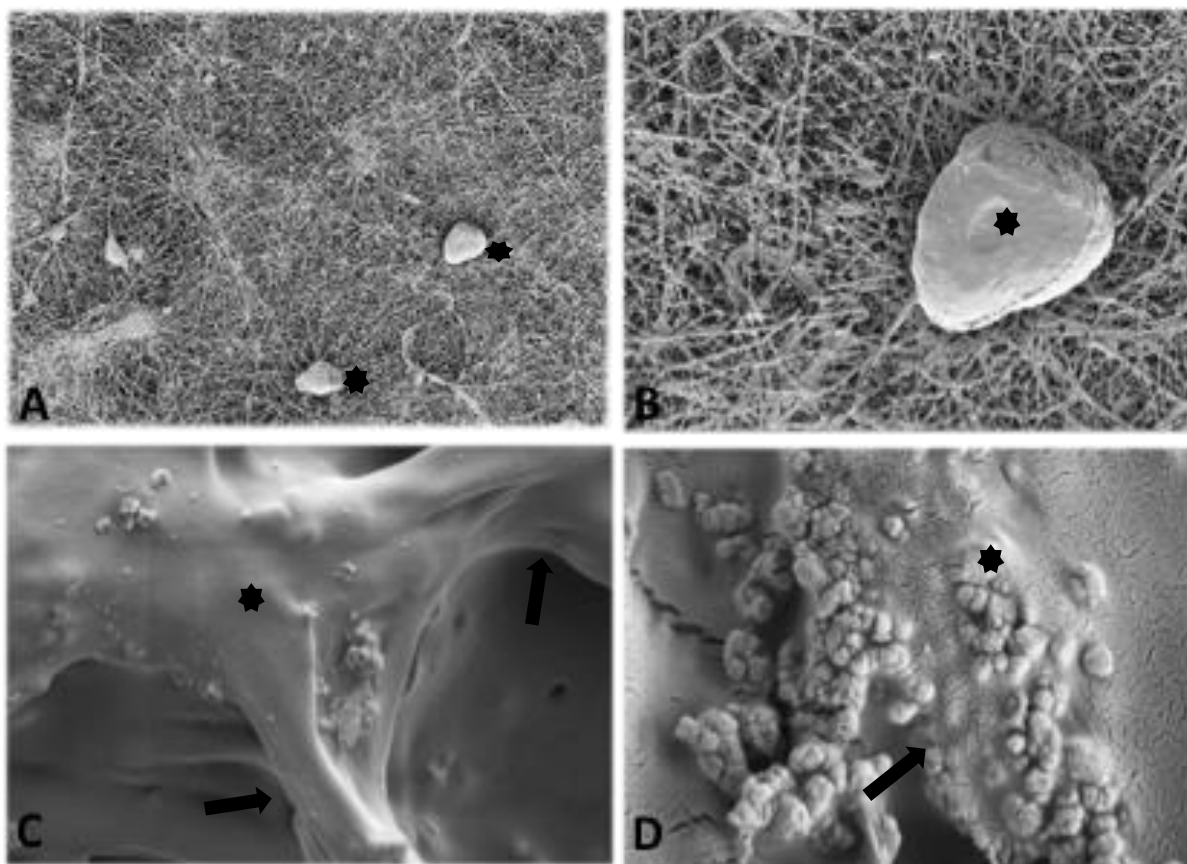
Para a membrana colagênica (Bio-Gide®), observa-se a presença de fibras dispostas aleatoriamente na parte rugosa (figura 1, A e B) e com arranjo mais uniforme na superfície lisa (figura 1, C e D).

Figura 1 - Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura das superfícies rugosa (A, B) e lisa (C, D) da membrana colagênica (Bio-Gide®). Aumentos originais: A, C=200X; B, D=1000X.



A avaliação da superfície da membrana de PLGA, observa-se grande conectividade entre os poros da membrana e deposição de pequenos grânulos de fosfato de cálcio impregnado à membrana (figura 2), disposto uniformemente em escala nanométrica. As fibras de PLGA dispõem-se aleatoriamente, sem paralelismo entre elas.

Figura 2 - Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície da membrana PLGA (DuoSynth). Aumentos originais: A=200X; B=1000X; C= 40000X; D=80000X.



Legenda: seta: poros de membrana; asterisco: grânulos de fosfato de cálcio.

Avaliação do pH em solução

Nos três tempos avaliados, o pH foi significativamente maior no grupo contendo a membrana DuoSynth® do que com Bio-Gide® ($p < 0,05$).

Nota-se que após 72h, para ambas as membranas o pH foi significativamente maior do que no tempo inicial avaliado de 24 h ($p < 0,05$). Em todos os tempos avaliados, o pH da solução contendo PLGA foi maior que 7,00, e portanto, básico, enquanto a solução contendo Bio-Gide menor que 7,00 e portanto, ácida.

Tabela 1 - Média (desvio padrão) do pH em função da membrana e do tempo.

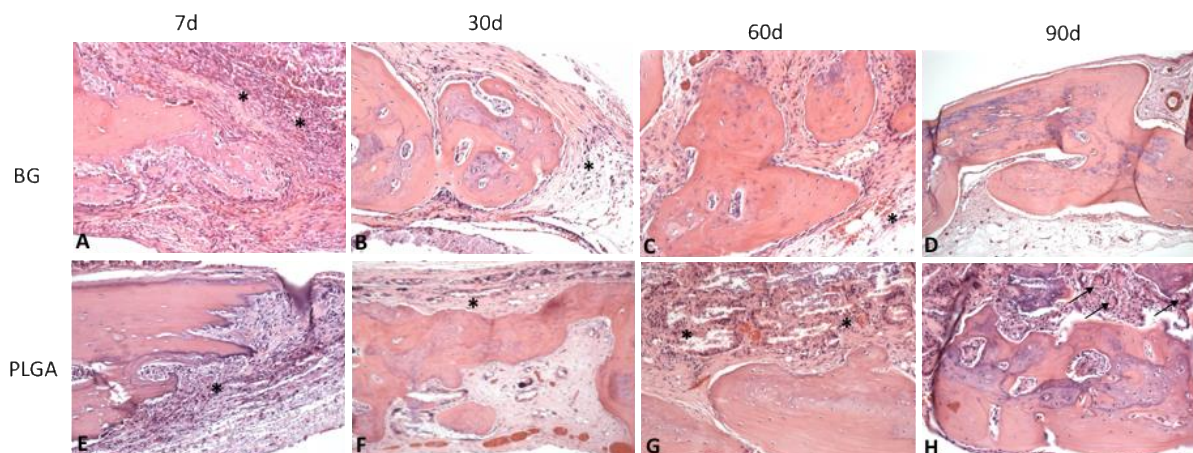
tempo (h)	PLGA/DuoSynth	Bio-Gide
24	7,42 (0,06) Ab	5,89 (0,17) Bb
48	7,59 (0,10) Ab	6,44 (0,06) Ba
72	8,23 (0,08) Aa	6,25 (0,11) Ba

Legenda: Letras distintas (maiúsculas comparando na horizontal e minúsculas na vertical) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Análises histológicas

Imagens representativa do infiltrado inflamatório nos diferentes grupos estão mostradas na figura 4. Aos 7, 30 e 60 dias observou-se na região do reparo adjacente à membrana, para ambos os grupos, a presença de infiltrado inflamatório moderado a intenso, tipicamente linfocitário. Aos 90 dias, nota-se um discreto infiltrado inflamatório, caracterizado no grupo da membrana PLGA pela presença de células gigantes fagocíticas.

Figura 4 - Imagem representativa histológica corada em HE. Observa-se presença de infiltrado linfocitário (asterisco) em ambos os grupos avaliados. Células gigantes fagocíticas encontradas aos 90 dias no grupo PLGA (seta). Aumento original 200X.



Os valores do escore de inflamação mensurado nos diferentes grupos estão ilustrados na tabela 2. Exceto para tempo de 30 dias, não foi observada diferenças entre os escores para ambas as membranas, em cada tempo de análise ($p > 0,05$). Aos 30 dias, observou-se maior escore inflamatório para membrana PLGA quando comparado à colagênica ($p < 0,05$).

Os menores escores de inflamação foram observados após 90 dias de análise quando comparado aos demais tempos ($p < 0,05$), porém sem diferença entre as membranas PLGA e colagênica ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Mediana (valor mínimo e máximo) do escore do processo inflamatório em função do material e tempo.

tempo (dias)	PLGA/DuoSynth	Bio-Gide	p-valor
7	2,5 (2-3) Aab	2 (2-3) Aab	0,5637
30	3 (3-3) Aa	2 (1-2) Bab	0,0209
60	3 (2-3) Aab	3 (2-3) Aa	1
90	1 (1-1) Ab	1 (1-1) Ab	1
p-valor	0,0091	0,01	

Legenda: Letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). Ausente (0), Discreto, até 25% (1), Moderado, de 25% a 50% (2) e Intenso, acima de 50% (3).

DISCUSSÃO

Com a introdução das membranas de ROG a partir da década de 80 e os avanços tecnológicos em engenharia tecidual, nota-se uma busca incessante por um material ideal que proporcione uma neoformação óssea previsível, pouca reação inflamatória e biocompatibilidade nos tecidos circunjacentes (Nyman, 1982; Buser et al., 1994).

Alguns materiais aloplásticos têm surgido no mercado como alternativa aos biomateriais de origem xenogênica ou alogênica, uma vez que estudos tem evidenciado certo potencial imunogênico, mesmo após muito tempo do procedimento de utilização dos mesmos em procedimentos cirúrgicos odontológicos (Lacerda et al., 2016; Coutinho et al., 2017; Klopffleisch, Jung, 2017).

Materiais de origem sintética contendo materiais inorgânicos como a hidroxiapatita e fosfato de cálcio têm sido uma opção, devido ao potencial osteogênico atribuído a este composto, sendo ideal para mediar migração, adesão celular e formação de núcleos de mineralização com as fibrilas de colágeno e acaba atuando como um mediador da ligação da fase inorgânica do osso com as fibrilas da fase orgânica (Li et al., 2002; Chen et al., 2012). Apesar de seu aceite amplo no uso clínico, a sua eficácia é debatida na literatura principalmente associada ao intenso processo inflamatório e à grande quantidade de material remanescente (Huang et al., 2018).

Neste contexto, no presente estudo, foram avaliados os aspectos morfológicos da topografia das membranas, bem como seus efeitos sobre o processo inflamatório durante o reparo de defeitos críticos em calvarias de ratos.

Um dos primeiros polímeros aprovado em aplicações biomédicas foi o poli(d, l-ácido láctico) (PDLLA). No entanto, estes materiais apresentam uma taxa de degradação lenta, podendo o período de degradação ser superior a 10 meses (Nair, Laurencin, 2007), o que limita seu uso em procedimentos teciduais e ósseos guiados (Bottino et al., 2012). A fim de regular a taxa de degradação e hidrofiliabilidade do ácido poli-L-láctico (PLA), incorporou-se componentes glicolídeos sintetizando copolímeros de poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), permitindo assim a degradação mais rápida nas cadeias de PLA (Reed, Gilding, 1981).

O PLGA é aprovado para uso em aplicações biomédicas devido à sua boa biocompatibilidade e biodegradabilidade. No estudo observou-se em microscopia de varredura a característica bifásica com presença de pequenos poros e uma rede de fibras interligadas, permeadas por estruturas arredondadas do material inorgânico de fosfato de cálcio. De fato, para uso em engenharia tecidual, as membranas devem criar um ambiente permissivo para adesão e crescimento celular em uma organização tridimensional (Drioli, Bartolo, 2006; Bartolo et al., 2007), possibilitando a perfusão nutrientes e crescimento celular.

Estudo de Billiar et al. (2001) evidência a maior resistência ao tracionamento da membrana PCL/PLGA quando comparada ao Bio-Gide[®], que é mais hidrofílica (Qian et al., 2016). Entretanto, é importante considerar a análise futura de resistência a tração e rasgamento da membrana, uma vez que as propriedades físico-químicas estão entre os fatores mais importantes que influenciam a performance do material *in vivo*, causando respostas biológicas significativamente diferentes (Martinez et al., 2019).

Outro importante fator a ser considerado é o tempo de degradação do material. O PLGA apresenta tempo de degradação mais rápido, o que o torna um material interessante

para uso em procedimentos que requerem reparação tecidual (Zhang et al., 2016). Entretanto, degrada-se por hidrólise produzindo dois subprodutos monoméricos, o ácido lático e o ácido glicólico. Esses dois monômeros em condições fisiológicas normais são subprodutos de várias vias metabólicas no corpo. O ácido lático é metabolizado no ciclo do ácido tricarboxílico e eliminado via dióxido de carbono e água. O ácido glicólico é metabolizado da mesma forma e também excretado pelos rins (Zolnik, Burgess, 2007). Como o corpo pode metabolizar os dois monômeros, há toxicidade sistêmica mínima associada ao uso de PLGA para aplicações de biomateriais.

No presente estudo, o pH da solução contendo a membrana de PLGA foi significativamente maior quando comparado a membrana colagênica. Apesar da degradação ácida do PLGA reduzir o pH local criando um ambiente autocatalítico (Fu et al., 2000), o fosfato de cálcio presente nas fibras de PLGA tamponaram e elevaram o pH, caracterizado por um aumento lento e gradual no teor de cálcio, e consequentemente, promovendo aumento de pH para valores mais alcalinos (Chakkalakal et al., 1994).

Estes resultados suportam a presença de infiltrado inflamatório moderado a intenso, tipicamente linfocitário observado histologicamente quando utilizada a membrana PLGA nos defeitos críticos, bem como, presença de células gigantes fagocíticas, após 90 dias de análise. De fato, os enxertos sintéticos continuam tendo limitações, principalmente relacionadas à resposta imune e reação a corpo estranho, com intenso processo inflamatório (Anderson et al., 2008). Apesar desta limitação, foi observado o mesmo padrão de potencial de inflamação para a membrana Bio-Gide, com sucesso comprovado em procedimentos de regeneração tecidual, o que de fato, não limita o uso da membrana sintética eletrofiada. Estudos adicionais para identificar o potencial osteogênico da membrana são necessários, de forma a elucidar o seu comportamento biológico quando utilizados em procedimentos de regeneração óssea guiada. Won et al. (2016) apontam um uso futuro personalizado de manufatura de membranas de PLGA usando a tecnologia de impressão tridimensional de forma rápida e econômica, para gerar diversas formas, espessuras, tamanhos e geometria de poros, com função de carreadores de antibióticos, fatores de crescimento ou taxa celular, a partir de dados de tomografia computadorizada.

Portanto, os resultados do presente estudo evidenciaram a possibilidade de eletrofiar membrana de PLGA incorporada ao fosfato de cálcio. Apesar do pH mais elevado quando degradada em solução *in vitro*, apresentou potencial de indução de inflamação semelhante à Bio-Gide, sendo, portanto, como alternativa aloplástica para o manejo de situações clínicas que exijam seu uso em comparação com os materiais atualmente disponíveis no mercado.

REFERENCIAS

Abe GL, Sasakia JI, Katata C, Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, et al. Development of PLGA-coated β -TCP scaffolds containing VEGF for GBR application. Dent Mater. 2020 May;36(5): 626-4.

Almeida RS, Silva HMP, Rocha DN, Ribeiro IIA, Barbosa Júnior AA, Miguel FB, Rosa FP. Regeneration of a critical bone defect after implantation of biphasic calcium phosphate - β -tricalcium phosphate/calcium pyrophosphate and phosphate bioactive glass. Ceramica. 2020 Apr-June;66(378):119-25.

Billiar K, Murray J, Laude D, Abraham G, Bachrach N. Effects of carbodiimide crosslinking conditions on the physical properties of laminated intestinal submucosa. J Biomed Mater

Res. 2001 July;56(1):101-8.

Brkovic BM, Prasad HS, Rohrer MD, Konandreas G, Agrogiannis G, Antunovic D, et al. Beta-tricalcium phosphate/type I collagen cones with or without a barrier membrane in human extraction socket healing: polycaprolactone nanofiber mesh-embedded poly(glycolic-co-lactic acid) membrane for effective guided bone regeneration clinical, histologic, histomorphometric, and immunohistochemical evaluation. *Clin Oral Investig*. 2012 Apr;16(2):581-90.

Ceccarelli G, Presta R, Lupi SM, Giarratana N, Bloise N, Benedetti L, et al. Evaluation of Poly(Lactic-co-glycolic) Acid Alone or in Combination with Hydroxyapatite on Human-Periosteal Cells Bone Differentiation and in Sinus Lift Treatment. *Molecules*. 2017 Dec 2;22(12):2109.

Chakkalakal DA, Mashoof AA, Novak J, Strates BS, McGuire MH. Mineralization and pH relationships in healing skeletal defects grafted with demineralized bone matrix. *J Biomed Mater Res*. 1994 Dec;28(12):1439-43.

Drioli E, de Bartolo L. Membrane bioreactor for cell tissues and organoids. *Artif Organs*. 2006;30(10):793-802.

Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res*. 2000;17(1):100-106.

Hirota M, Matsui Y, Mizuki N, Kishi T, Watanuki K, Ozawa T, et al. Combination with allogenic bone reduces early absorption of beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) and enhances the role as a bone regeneration scaffold. Experimental animal study in rat mandibular bone defects. *Dent Mater J*. 2009;28(2):153-61.

Lian M, Sun B, Qiao Z, Zhao K, Zhou X, Zhang Q, et al. Bi-layered electrospun nanofibrous membrane with osteogenic and antibacterial properties for guided bone regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019 Apr 1;176:219-29.

Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*. 2001;71(6):354-61.

Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol*. 1982 May;9(3):257-65.

Pinotti FE, Pimentel Lopes de Oliveira GJ, Scardueli CR, Costa de Medeiros M, Stavropoulos A, Chiéri Marcantonio RA. Use of a non-crosslinked collagen membrane during guided bone regeneration does not interfere with the bone regenerative capacity of the periosteum. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Nov;76(11):2331.e1-2331.e10.

Stoecklin-Wasmer C, Rutjes AWS, Costa BR, Salvi GE, Jüni P, Sculean A. Absorbable collagen membranes for periodontal regeneration: a systematic review. *J Dent Res*. 2013 Sept;92(9):773-81.

Takeuchi H, Nagayama M, Imaizumi Y, Tsukahara T, Nakazawa J, Kusaka Y, et al. Immunohistochemical analysis of osteoconductivity of beta-tricalcium phosphate and carbonate apatite applied in femoral and parietal bone defects in rats. *Dent Mater J*. 2009;28(5):595-601.

Zolnik BS, Burgess DJ. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *J Control Release*. 2007;122(3):338-44.