

GUSTAVO PEREIRA GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA E  
FIBROÍNA DE SEDA E AVALIAÇÃO DE SUA BIOCAMPATIBILIDADE**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

G635c  
2016  
Gonçalves, Gustavo Pereira, 1989-  
Caracterização do compósito de hidroxiapatita e fibroína de seda e avaliação de sua biocompatibilidade / Gustavo Pereira Gonçalves. - Viçosa, MG, 2016.  
ix, 51f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Ortopedia veterinária. 2. Hidroxiapatita. 3. Regeneração tecidual guiada. 4. Materiais biomédicos. 5. Seda. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.


CDD 22 ed. 636.089

GUSTAVO PEREIRA GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA E FIBROÍNA  
DE SEDA E AVALIAÇÃO DE SUA BIOCAMPATIBILIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2016.

  
Emily Correia Carlo Reis  
(Coorientadora)

  
Fabrício Luciani Valente  
(Coorientador)

  
João Bosco Gonçalves de Barros

  
Andréa Pacheco Batista Borges  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

A minha família pela confiança e apoio incondicional nos momentos tristes e difíceis ao longo desses anos em Viçosa, e por sempre compartilharem as alegrias e as conquistas.

A minha namorada Mayara pelo amor, suporte e carinho.

A minha orientadora, Andrea Pacheco Batista Borges pela confiança, orientação e amizade construídas ao longo dos anos de convivência. Agradeço os conselhos e a experiência obtida. Principalmente pela sua dedicação e paciência em me orientar. Foi e sempre será espelho para meu crescimento profissional dentro da Medicina Veterinária.

Aos amigos da pós-graduação: Alan, Samuel, Rodrigo, Fernando, Dayana, Cristiane, João, Flávia, Luciana e todos os estagiários pela força e dedicação.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário e Departamento de Medicina Veterinária da UFV.

Agradecimento especial para os meus coorientadores, Professora Emily e professor Fabricio pelo apoio incondicional durante a realização deste trabalho e pela paciência na transmissão do conhecimento.

Ao amigo João Bosco, pela paciência, momentos de descontração e, principalmente, por me manter firme para a conclusão deste trabalho, acreditando no meu potencial. Muito Obrigado!

Ao Departamento de Solos, através do Laboratório de Mineralogia da UFV, pelo auxílio na realização da difração de raios-X.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, e ao Professor Renê do departamento de Física, pelo auxílio na realização das análises de microscopia eletrônica.

A Professora Doutora Sheyla Maria Castro Máximo, ao seu laboratório JHS Laboratório Químico Ltda e ao professor Sérgio Yoshioka pelas orientações e fornecimento dos compósitos.

A Universidade Federal de Viçosa por todo o ensinamento e aprendizado adquirido nesses nove anos de estudos.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o Mestrado.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS .....   | v   |
| RESUMO .....   | vii |
| ABSTRACT .....   | ix  |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 01  |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                    | 03  |
| 2.1 Bioengenharia Tecidual e Biomateriais .....                  | 03  |
| 2.2 Hidroxiapatita.....  | 05  |
| 2.3 Fibroína de Seda .....                                       | 08  |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                       | 11  |
| 3.1 Biomaterial.....   | 11  |
| 3.1.1 Solubilização da Fibroína .....                            | 11  |
| 3.1.2 Preparação das placas de fibroína com hidroxiapatita... .. | 11  |
| 3.2 Difração de raios-x .....                                    | 12  |
| 3.3 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) .....              | 12  |
| 3.4 Testes <i>in vitro</i> de biocompatibilidade.....            | 13  |
| 3.4.1 Teste de contato direto .....                              | 13  |
| 3.4.2 Preparação do material para microscopia.....               | 14  |
| 3.4.3 Teste de adesão .....                                      | 15  |
| 3.5 Análise de biocompatibilidade <i>in vivo</i> .....           | 15  |
| 3.5.1 Procedimento cirúrgico .....                               | 16  |
| 3.5.2 Coleta de amostras .....                                   | 16  |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                  | 17  |
| 4.1 Difração de raios-x.....                                     | 17  |
| 4.2 Microscopia eletrônica de varredura.....                     | 21  |
| 4.3 Teste de biocompatibilidade <i>in vitro</i> .....            | 25  |
| 4.3.1 Contato direto.....  | 25  |
| 4.3.2 Teste de adesão celular .....                              | 28  |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 4.4 Avaliação Histológica.....     | 32 |
| 5. CONCLUSÃO.....                  | 41 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Microscopia eletrônica de varredura em espuma HAP, evidenciando os poros (setas).....   | 6  |
| <b>Figura 2</b> - Corte Transversal de fio de seda natural em microscopia eletrônica de superfície.....   | 9  |
| <b>Figura 3</b> - Disposição das amostras e dos controles negativos e positivos em placa de 24 poços para realização de teste de contato direto e teste de adesão celular aos biomateriais.....       | 14 |
| <b>Figura 4</b> -Representação esquemática da obtenção das micrografias ópticas na interface membrana/placa do meio de cultura. ....  | 15 |
| <b>Figura 5</b> -Desenho esquemático da localização das incisões do teste de biocompatibilidade <i>in vivo</i> e coleta de amostras. ....   | 17 |
| <b>Figura 6</b> - Difrátogramas do compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda HAP+FS 0,5 placa (A) e pó(B) na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X.....    | 18 |
| <b>Figura 7</b> - Difrátograma do compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda HAP+FS 2,5 placa (A) e pó (B) na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X.....    | 19 |
| <b>Figura 8</b> - Difrátograma da fibroína de seda (FS) na forma de placa (A) e em pó (B) na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X.....   | 20 |
| <b>Figura 9</b> - Microscopia eletrônica por varredura de placa de Fibroína de seda. Aumento de 200x (A) e aumento de 1500x (B).. ....  | 24 |
| <b>Figura 10</b> - Microscopia eletrônica de varredura do compósito HAP + FS 0,5. Observar a presença de cristais de hidroxiapatita (setas amarelas) aderidas a rede fibrosa da Fibroína de Seda..... | 24 |
| <b>Figura 11</b> - Microscopia eletrônica de varredura do compósito HÁP + FS 2,5. Observar a presença de cristais de hidroxiapatita (setas amarelas) aderidas a rede fibrosa da Fibroína de Seda..... | 25 |
| <b>Figura 12</b> - Fotomicrografias ópticas retiradas após cultivo celular.....   | 26 |
| <b>Figura 13</b> - Fotomicrografias ópticas do fundo da placa de cultivo das amostras retiradas após cultivo celular coradas com azul de metileno.. ....  | 28 |
| <b>Figura 14</b> - Microscopia eletrônica de varredura após a adesão de fibroblastos 3T3 em placa de Fibroína de Seda Pura em aumento de 1000x(A) e de 2000x (B). ....                                | 30 |
| <b>Figura 15</b> - Microscopia eletrônica de varredura após a adesão de fibroblastos 3T3 em compósito HÁP + FS 0,5 em aumento de 1000x (A) e B)1500X.....   | 30 |
| <b>Figura 16</b> - Microscopia eletrônica de varredura após a adesão de fibroblastos 3T3 em compósito HÁP + FS 2,5 em aumento de 500x (A) e B)1000X.....  | 31 |
| <b>Figura 17</b> - Fotografia mostrando o momento da coleta da amostra para posterior análise histológica.....  | 32 |
| <b>Figura 18</b> - Micrografia dos tecidos coletados após 15 dias de implantação dos compósitos e fibroína de seda. ....  | 34 |
| <b>Figura 19</b> - Micrografia dos tecidos coletados após 30 dias de implantação dos compósitos e da fibroína de seda.....  | 36 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 20</b> - Micrografia dos tecidos coletados após 60 dias de implantação dos compósitos e fibroína de seda. ....   | 37 |
| <b>Figura 21</b> - Micrografia dos tecidos coletados após 120 dias de implantação dos compósitos.....                      | 38 |
| <b>Figura 22</b> - Representação gráfica da espessura da cápsula fibrosa em função dos dias de coleta dos compósitos. .... | 40 |

## RESUMO

GONÇALVES, Gustavo Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Caracterização do compósito de hidroxiapatita e fibroína de seda e avaliação de sua biocompatibilidade.** Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges. Coorientadores: Emily Correna Carlo Reis e Fabrício Luciani Valente.

A bioengenharia tecidual busca a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados, superando as limitações dos tratamentos convencionais vigentes. Assim, os biomateriais são utilizados em interface com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir tecidos, órgãos ou funções no organismo e são cada vez mais utilizados para o tratamento de lesões. O benefício exercido por estes na regeneração tecidual *in vivo* está relacionado diretamente a diversas características como a biocompatibilidade, porosidade, e topografia de superfície complexa. Portanto, este trabalho teve por objetivo, caracterizar os compósitos de hidroxiapatita e fibroína de seda quanto a suas propriedades físico-químicas e biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*. Para isso, foram realizados testes *in vitro* onde os biomateriais foram colocados em contato com linhagens de fibroblastos de camundongo (NIH/3T3) e posteriormente avaliados com microscopia eletrônica de varredura, para avaliação de adesão celular, e a microscopia ótica para avaliação da citotoxicidade por contato direto. A cristalinidade da hidroxiapatita e da fibroína de seda foram avaliados por difração de Raios – X. O teste *in vivo* compreendeu a implantação de três biomateriais na região dorsal de coelhos. Posteriormente, o material foi coletado e envolveu pele, tecido subcutâneo, compósito, se houver, e tecido muscular e foram encaminhados para o processamento e análise histológica. Os compósitos analisados apresentaram elevada cristalinidade, superfície complexa e porosa com grânulos de hidroxiapatita na superfície, *in vitro*, observou-se, a ausência de citotoxicidade, além da adesão e proliferação celular na superfície e em torno das placas de hidroxiapatita e fibroína de seda. Além de demonstrarem biocompatibilidade *in vivo* incitando respostas

toleráveis do organismo. Os resultados indicam que o biomaterial é um candidato à aplicação como suporte para o crescimento celular na regeneração tecidual.

## ABSTRACT

GONÇALVES, Gustavo Pereira, M.Sc., Federal University of Viçosa, July ,2016. **Characterization of hydroxyapatite and silk fibroin composite and assessment of its biocompatibility.** Advisor: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-advisors: Emily Correna Carlo Reis and Fabrício Luciani Valente.

Tissue bioengineering seeks the application of engineering and health sciences principles and methods in order to support and speed up the regeneration and repair of damaged or flawed tissue, overcoming the limitations of current conventional treatment practices. This way, biomaterials are used in interface with biological systems to assess, treat, expand or replace tissue, organs or specific functions of organs in organisms, and are being increasingly employed in the treatment of injuries. The benefit held by that practice in tissue regeneration *in vivo* is directly related to many characteristics, such as biocompatibility, porosity, and topography of complex surfaces. Thus, the goal of the present work is to characterize hydroxyapatite and silk fibroin composites regarding their physicochemical properties and biocompatibility *in vivo* and *in vitro*. In order to achieve that, tests *in vitro* were conducted where biomaterials were put in contact with fibroblast lines of rats (NIH/3T3), and then evaluated by scanning electron microscopy in order to assess cell adhesion, and by optical microscopy to assess the cytotoxicity via direct contact. The crystallinity of the hydroxyapatite and silk fibroin was assessed by X-Ray diffraction. The test *in vivo* consisted in the implementation of three types of biomaterials in the dorsal region of rabbits. Afterwards, the material was collected and it was composed by skin, subcutaneous tissue, composite, in case it exists, and muscular tissue, and then submitted to processing and histological analysis. The analyzed composites presented increased crystallinity, complex and porous surfaces with hydroxyapatite granules on its surface. *In vitro*, it was possible to observe the absence of cytotoxicity, and also cellular adhesion and proliferation on the surface and around the hydroxyapatite and silk fibroin plaques. It also demonstrated biocompatibility *in vivo*, driving the organism to tolerable responses. The results point out that the biomaterial is a viable candidate to the application as a support for cellular growth in tissue regeneration.

## 1. INTRODUÇÃO

Traumas ósseos extensos e deformidades causadas pela remoção de neoplasias constituem as principais causas de defeitos ósseos que afetam a qualidade de vida de pessoas e animais (Kokubo *et al.*, 2003; Meinel *et al.*, 2006). Nessa casuística se observa além da perda tecidual, a dificuldade de regeneração ou regeneração em maior tempo do que o esperado devido a influências do meio interno assim como externas (Vaccaro *et al.*, 2003).

Visando superar a dificuldade e o maior tempo de regeneração dos grandes defeitos ósseos, a rotina clínico-cirúrgica humana e animal utiliza os substitutos ósseos, tanto de origem natural ou sintética (Burchart, 1983; Boer *et al.*, 2003). Essa substituição de tecidos pode ser feita através de enxertos, como os enxertos autógenos onde são utilizados tecidos do próprio paciente, originados a partir de regiões anatômicas secundárias, podendo também ser empregado os enxertos alógenos, quando originário de outro paciente. Apesar de eficazes, a quantidade limitada de tecido disponível, as dificuldades relacionadas à moldagem do osso excisado, além da dor e morbidade no local de coleta, limitam grandemente sua utilização (Hench, 1998; Mygind *et al.*, 2007).

Outra alternativa para a substituição dos tecidos é o uso de implantes feitos de biomateriais. Esses biomateriais são utilizados em interface com o sistema biológico e tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções no organismo e são cada vez mais utilizados para o tratamento de lesões (Williams, 1987; Hench, 1998; Khan *et al.*, 2008; Leeuwenburgh *et al.*, 2008). Uma vez que apresentam como principais vantagens a não utilização de procedimentos invasivos para a coleta, disponibilidade ilimitada e a possibilidade de desenvolvimento de características diferenciadas para favorecer a regeneração tecidual, dependendo do local de utilização, como a moldabilidade e uma complexa topografia de superfície (Rupprecht *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2008; Tabata *et al.*, 2009). O benefício oferecido pelos biomateriais na regeneração tecidual *in vivo* concerne diretamente a diversas características como a biocompatibilidade, porosidade, propriedades mecânicas

adequadas e topografia de superfície complexa, dentre outras (Khan *et al.*, 2008; Nagano *et al.*, 2011).

Inclusa na grande classe dos biomateriais, as cerâmicas como os biovidros, a alumina, o beta-fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) e a hidroxiapatita (HAP), são estudadas em procedimentos de reparação óssea por apresentarem osteocondutividade e biocompatibilidade apropriadas a reparação do osso. Isso é possível pois sua fase química e estrutural é similar a fase mineral óssea (Hench, 1991; Okamoto e John, 2013). Entretanto, a HAP apresenta déficits quanto a coesão, a resistência mecânica e a tenacidades não sendo suficientes para permitir a utilização desse biomaterial em locais que requeiram sustentação de peso (Carlo *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013). Wang *et al.* (2010), relataram bons resultados com a união da hidroxiapatita com o polímero fibroína da seda (FS), devido a uma interação que ocorre entre as estruturas desses biomateriais, o que favorece ainda mais o processo de mineralização, similar ao tecido ósseo. A FS é considerada um polímero importante no processo de biomineralização e para a engenharia de tecido ósseo por induzir a formação de apatita nas superfícies de proteínas em soluções que se assemelham ao fluido corporal e por apresentar propriedades significativas de biocompatibilidade (Kirschbauer, 2009; Zhang *et al.*, 2009). A fibroína da seda (FS) é um polímero que apresenta propriedades mecânicas satisfatórias, além de possuir fatores de adesão e alta capacidade de se adaptar ao ambiente em que é implantada. Sendo possível realizar estudos adicionais para a exploração de proteínas fibrosas e suas aplicações como biomateriais (Altman *et al.*, 2003).

Neste contexto, a adição de material orgânico, como o colágeno e as sedas, pode modificar e melhorar as propriedades mecânicas, e as taxas de degradação dos materiais (Jin *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2014). Essas descobertas despertam o interesse de pesquisadores da área e o consequente desenvolvimento de biomateriais que explorem essas associações com o intuito de melhorar a aplicabilidade de compósitos, promovendo aplicabilidade na área do conhecimento.

Assim, com o objetivo de ampliar os conhecimentos na área da bioengenharia, esse trabalho foi desenvolvido para caracterizar o compósito de hidroxiapatita e fibroína

de seda, bem como avaliar as propriedades físico-químicas de biomateriais descritos avaliando sua biocompatibilidade *in vivo* e *in vitro*.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Engenharia Tecidual Óssea e Biomateriais**

A engenharia tecidual é um campo multidisciplinar que se transformou numa das áreas da biomedicina com maior desenvolvimento científico (Tabata, 2009). Ela busca a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados, superando as limitações dos tratamentos convencionais vigentes (Sachlos, *et al.*, 2003). As estratégias de tratamentos baseadas na introdução de material biocompatível possuem um grande potencial na prática da medicina reparadora para tratamento de doenças como infarto do miocárdio, diabetes, osteoartrites, queimaduras de pele, lesões ósseas de grande magnitude. A engenharia tecidual é capaz de produzir substitutos para órgãos e tecidos que apresentem tolerância imunológica, o que possibilita sua implantação no paciente sem risco de rejeições (Alsberg, *et al.*, 2002; Sachlos, *et al.*, 2003; Shin, 2003; Tabata, 2009).

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não e que não sejam drogas ou fármacos, utilizados em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (Williams, 1987).

De acordo com sua natureza química desses biomateriais, podemos classificá-los em: naturais como, por exemplo, o colágeno, a seda, a queratina, a laminina e a quitosana, e os sintéticos que incluem as cerâmicas, os polímeros sintéticos, as ligas metálicas e os compósitos. Os biomateriais naturais, além de biocompatíveis, possuem a vantagem de permitir o reconhecimento biológico, favorecendo a adesão e a função das células, participando do controle da estrutura do tecido e na regulação do fenótipo celular (Matthews *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Ohkawa *et al.*, 2004; Neal *et al.*, 2009; Armentano *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010).

Apesar das suas vantagens, materiais naturais podem induzir respostas imunológicas e inflamatórias mais exageradas que os biomateriais sintéticos, além de possuir propriedades mecânicas indesejáveis (Kleinman *et al.*, 1986; Armentano *et al.*, 2010).

Já os biomateriais sintéticos oferecem a possibilidade de manipulação de suas características mecânicas e da taxa de degradação de acordo com a utilização desejada, além de poderem ser produzidos em larga escala (Armentano *et al.*, 2010).

As características citadas acima fazem com que os biomateriais sintéticos sejam cada vez mais empregados na rotina cirúrgica veterinária, possibilitando sua utilização como substitutos ósseos com o intuito de estimular o processo de cicatrização de forma mais rápida (Moraes *et al.*, 2004).

Nesse contexto, é necessário atentar ao fato de que a reparação do tecido ósseo é complexa e exige compostos com propriedades físico-químicas compatíveis com a fisiologia do osso (Najjar *et al.*, 1991; ElBatal *et al.*, 2003).

Dessas propriedades, a biocompatibilidade é um fator importante para utilização de um compósito como biomaterial. É definida como a habilidade de um material de exercer funções desejáveis na terapia médica sem causar efeitos indesejáveis locais ou sistêmicos no organismo receptor e gerar respostas celulares ou teciduais apropriadas para aquela situação específica e melhorando a resposta clínica àquela terapia (Wataha, 2012).

O biomaterial deve, ainda, ser de fácil dissolução e absorção, ao mesmo tempo em que permite e estimula a formação óssea (Wan *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010). Trata-se então da biodegradabilidade, que varia de acordo com a cristalinidade e a dureza do biomaterial. Quando mais duro e mais cristalino for, maior é o tempo de degradação do mesmo (Reis *et al.*, 2009). Esse controle da biodegradabilidade é de extrema importância, já que o material não deve deteriorar antes da recuperação da região onde foi implantado, mas deve ser substituído gradativamente à medida que o processo ocorre (Cunha *et al.*, 2011).

Em vista disso, as análises *in vitro* são cada vez mais utilizadas para a avaliação dessas características e apresentam importantes vantagens como: homogeneidade dos testes e interação celular, economia de material recém-desenvolvido, menor tempo

para avaliação do que trabalhos *in vivo*, facilidade para trabalhos em larga escala e a redução de uso de animais (Hench, 2000; Bhumiratana *et al.*, 2011).

A utilização de células isoladas em pequenos defeitos ósseos é bem entendido, contudo, os tecidos são organizados em três dimensões para formação de órgãos funcionais, nesse caso faz-se necessário o crescimento celular em três dimensões. A engenharia tecidual desenvolveu, então, os *scaffolds*, uma alternativa para orientar o crescimento celular, e facilitar a síntese de matriz extracelular e facilitando a formação de tecidos funcionais (Zhang *et al.*, 2000; Ma, 2004).

Os *scaffolds* são suportes para o cultivo de células teciduais juntamente com fatores de crescimento, permitindo o desenvolvimento do tecido até que o suporte seja substituído completamente (Ma, 2004). Esta estrutura é constituída pelos diferentes tipos de biomaterial e deve possuir características como a alta porosidade e poros interligados e de tamanho apropriado a fim de para facilitar a adesão, proliferação e diferenciação de células. Além de apresentar uma grande área de superfície, biodegradabilidade e taxa de degradação que correspondam a taxa de formação do novo tecido, integridade mecânica para manter a estrutura tecidual e não deve ser tóxico para as células, isto é, deve ser biocompatível (Ma, 2004; Liu *et al.*, 2007).

## **2.2.Hidroxiapatita**

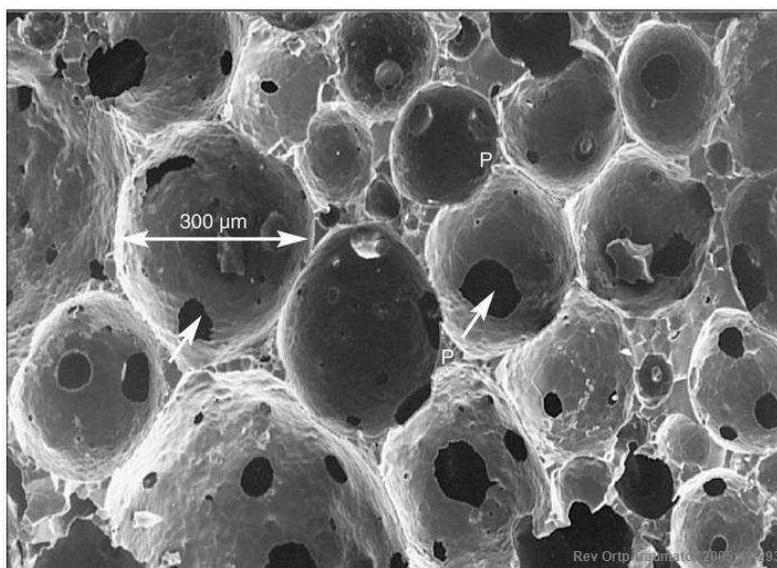
A hidroxiapatita (HAP) pertence ao grupo das cerâmicas de fosfato de cálcio. É o principal componente mineral de ossos e dentes e vem sendo altamente utilizadas nos procedimentos para reparação óssea (Aoki, 1991; Okamoto e John, 2013).

Sua estrutura química estequiométrica é representada pela fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , com razão Ca/P de 1,67 (Fulmer *et al.*, 1992), podendo ter origem nos corais e algas, ser derivado de mineral ósseo natural ou ainda desenvolvido sinteticamente (Schmitz *et al.*, 1999).

A síntese em laboratório é realizada por reações de estado sólido, que exigem altas temperaturas, e por métodos úmidos. As sintetizadas em altas temperaturas apresentam boa cristalinidade e tamanho de cristais grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas em baixas temperaturas apresentam baixa cristalinidade e tamanho de

cristais pequenos. A hidroxiapatita precipitada por via úmida possui características similares às do tecido ósseo e dentário, diferentemente da hidroxiapatita sintetizada a altas temperaturas (Fulmer *et al.*, 1992).

A síntese em laboratório oferece biomateriais livres de impurezas que retardam a osteogênese. Além disso, o tamanho, a forma e a porosidade do produto (Figura 1) podem ser controlados e pré-determinados (Rezende *et al.*, 1998). Se tornando reabsorvível quando fabricada pela sinterização (Rezende *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 2003) ou pela calcinação (Borges *et al.*, 2000).



**Figura 1** Microscopia eletrônica de varredura em espuma HAP, evidenciando os poros (setas).

**Fonte:** Lax-Perez *et al.*, 2005

Devido à grande similaridade com a fase cristalina dos tecidos ósseos (Varma *et al.*, 1999), a HAP se apresenta como um biomaterial bioativo e osteocondutor, ou seja, tem a capacidade de servir como suporte para o crescimento de novo osso assim como novos vasos sanguíneos (Borges *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2001; Boer *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2006; Vital *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012). Essa capacidade de dá pela interação tipo bipolo na superfície desse biomaterial, fazendo com que moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidas levando a uma forte ligação entre a hidroxiapatita e o tecido na sua superfície sob condições *in vivo* (Varma *et al.*, 1999).

Estudos da reação de células osteogênicas com hidroxiapatita *in vivo* (Edwards *et al.*, 1997; Borges, 1998) e *in vitro* (Bagambisa & Schilli, 1990) mostraram que a sua superfície é osteocondutiva, além de ter sua superfície irregular e complexa, o que facilita a adesão e a proliferação celular (Okamoto e John, 2013). Essa cerâmica é termodinamicamente estável em pH fisiológico e participa ativamente, formando ligações químicas com o tecido ósseo e estimulando a síntese de colágeno (Zambonin & Grano, 1995; Vaz, 2006; Rossi, 2011).

Ao entrar em contato com fluidos corpóreos como o plasma sanguíneo, o meio em torno da HAP se torna ácido, como ocorre em lesões cirúrgicas próprias do processo de implantação, permanecendo sua superfície carregada negativamente, devido a grupos  $\text{OH}^-$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ . Esses grupos combinados seletivamente com o  $\text{Ca}^{+2}$ , carregado positivamente, formam o fosfato de cálcio. À medida que o cálcio se acumula, a superfície começa a se tornar positiva atraindo, dos fluidos corporais, íons fosfato carregados negativamente. Essa camada é instável e transiente e se transforma em camada de apatita carbonatada, que foi demonstrado por Fujibayashi *et al.*, (2003) por meio da microscopia eletrônica de varredura. A mesma é responsável pela bioatividade da HAP e alguns estudos demonstram que os nanocristais de apatita, muito semelhantes à fase mineral da matriz óssea, fornecem um ambiente para células precursoras migrarem, fixarem e diferenciarem-se em osteoblastos. Esses nanocristais também se associam às fibras colágenas da matriz orgânica produzida pelos osteoblastos e, o recrutamento dessas células precursoras leva à formação de tecido ósseo (Macneill *et al.*, 1999; Rohanizadeh *et al.*, 1999; Borges *et al.*, 2000; Hench, 2000; Kawachi *et al.*, 2000; Kokubo *et al.*, 2003; Carlo *et al.*, 2007).

Além da osteocondução, o processo de reabsorção da hidroxiapatita contribui para que ela seja um excelente substituto para o tecido ósseo, uma vez que é realizada por osteoclastos, com as mesmas características que ocorre no processo natural de remodelação óssea (Borges *et al.*, 2000; Rumpel *et al.*, 2006). A taxa de degradação e os subprodutos de material biodegradável também devem ser considerados, pois são críticos no papel de regeneração óssea. Nesse contexto, a integridade mecânica de um biomaterial será significativamente reduzida se a taxa de degradação for rápida,

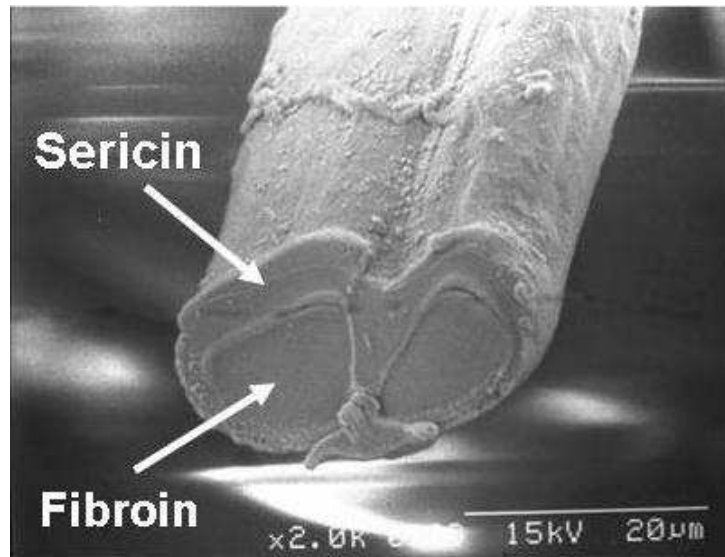
resultando assim na eliminação do biomaterial antes da regeneração tecidual acontecer (Wu *et al.*, 2014).

Assim, para minimizar ou até eliminar esses problemas, ou seja, reduzir sua dureza e promover a coesão entre as partículas tem sido estudado elaboração e formação de compósitos de HAP associado a polímeros (Carlo *et al.*, 2009; Carlo Reis *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

### **2.3.Fibroína de Seda**

A fibroína de seda (FS) é uma proteína fibrosa biocompatível, biodegradável e com propriedades mecânicas superiores e é produzido por alguns artrópodes como o bicho da seda (*Bombyx mori L.*), aranhas, escorpiões, ácaros e moscas que as utilizam para diversas funções, como estrutura de suporte, reprodução e captura de alimentos (Altman *et al.*, 2003; Hakimi *et al.*, 2007; Vepari *et al.*, 2007; Kaplan e Mcgrath, 2012). As proteínas da seda são produzidas no interior de glândulas especializadas (glândulas sericígenas) presentes em tais artrópodes, após a biossíntese em células epiteliais e secreção para o interior do lúmen destas glândulas, onde as proteínas são armazenadas e posteriormente processadas na forma de fibras (Altman *et al.*, 2003).

A seda produzida pelo bicho-da-seda domesticado é composta por dois tipos de proteínas: a fibroína, proteína de cadeia leve, que se apresenta em forma de filamentos de seda e compõe cerca de 70 a 80% do polímero e a sericina (ser), proteína semelhante à cola que envolve os filamentos e faz parte de 30 a 20% da estrutura da FS (Figura 2). A organização estrutural da fibroína possui regiões cristalinas dispostas em folha- $\beta$  e regiões amorfas, responsáveis pela elasticidade da seda (Altman *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2005; Khetan *et al.*, 2013).



**Figura 2** Corte Transversal de fio de seda natural em microscopia eletrônica de superfície. Notar o envolvimento e disposição da proteína de revestimento sobre os filamentos da fibroína.

**Fonte:** Kato (2012)

A fibroína da seda, não se dissolve em água devido aos aminoácidos hidrofóbicos glicina (gly) (43%) e alanina (ala) (30%) que são interconectadas com aminoácidos como a sericina da seda que apresenta caráter hidrófilo e mais viscoso e tirosina (Ko *et al.*, 2013; Mondal *et al.*, 2007). Embora a sericina apresente propriedades interessantes como resistência à radiação ultravioleta e à oxidação, capacidade antibacteriana (Zhang, 2002) e indução da mineralização através da formação de apatita (Altman *et al.*, 2003), tem sido relatado que esta pode induzir a uma resposta inflamatória in vivo, assim, é necessário extrair a sericina dos casulos antes do processamento da SF para aplicações biomédicas (Seliktar, 2012). Essa remoção é realizada através do processo de degomagem, por aquecimento em solução alcalina (Vepari *et al.*, 2007).

A fibroína de seda pode ser encontrada em dois tipos cristalinos, a seda I e seda II. A seda I é a forma metaestável, solúvel em água e armazenada nas glândulas do bicho da seda. Sua estrutura é descrita como um conjunto de conformações em  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha. A seda II é a fibroína sólida e pode ser encontrada em fios de seda, é estabelecida como forma de folha  $\beta$ -antiparalela. Apresenta-se como insolúvel em

muitos solventes, hidrofóbica e termodinamicamente estável (Meinel *et al.*, 2006; Hakimi *et al.*, 2007; Vepari *et al.*, 2007; Kundu *et al.*, 2008). Podendo possuir ácido aspártico em sua composição, que promove a adesão celular, principalmente de osteoblastos, fibroblastos e células-tronco (Rolim, 2010).

O fio de seda é produzido a partir de uma solução aquosa, em condições de temperatura ambiente e baixa pressão. As mudanças na interação e orientação molecular que transformam a seda, solúvel em água em fibra insolúvel ainda não foram esclarecidas. Acredita-se que uma combinação de forças induzidas pelo fluxo, desidratação ativa, acidificação gradual e íons de cobre e potássio possam estar envolvidas no processo (Hakimi *et al.*, 2007).

Recentemente, vários pesquisadores têm investigado a fibroína como um recurso promissor para biotecnologia e material biomédico devido à sua biocompatibilidade com diversos tipos de células, alta permeabilidade para o oxigênio e vapor d'água, controle de biodegradabilidade e mínima reação inflamatória (Ge *et al.*, 2012). Além disso, apresenta elasticidade, flexibilidade e resistência a tensão, biodegradabilidade e fácil absorção. Produz baixo efeito trombogênico e mínima resposta inflamatória, possui estabilidade térmica, oxigenação adequada e propriedade hemostática (Hardy *et al.*, 2008; Kundu *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2012; Ko *et al.*, 2013).

A Fibroína da seda pode ser manipulada em diversos formatos (filmes, fibras, redes, malhas, membranas, fios e esponjas), funcionando como um suporte para adesão celular *in vitro*, além de promover a reparação de tecidos *in vivo* (Wang *et al.*, 2006).

No ano de 2014, Shi e colaboradores realizaram um estudo com scaffolds de esferas de fibroína para tratamento de esfíncter uretral deficiente. Após os testes *in vitro* de citotoxicidade por MTT, os pesquisadores implantaram o material em ratos que simulavam incontinência urinária severa. Os resultados se demonstraram promissores para a regeneração dos tecidos afetados.

A seda tem sido utilizada comercialmente como suturas biomédicas por muitas décadas (Altman *et al.*, 2003). Dados publicados por Chao *et al.* (2010) sugerem que os hidrogéis de seda podem ser utilizados como uma ferramenta para o estudo dos fatores e mecanismos relacionados na formação da cartilagem, bem como um

biomaterial tolerável e totalmente degradável para engenharia de tecidos de cartilagem. O aumento da capacidade de controlar a morfologia e estrutura molecular desse polímero expandiu sua utilidade e ampliou suas aplicações como biomaterial em diversas áreas da medicina (Correia *et al.*, 2012) como em cicatrização de feridas (Zhou *et al.*, 2013), e regeneração de ossea (Zhang *et al.*, 2012), componente útil para a distribuição de medicamentos (Wang *et al.*, 2009).

A fibroína da seda pura ou associada a outras matérias ainda atua na regeneração de tecidos vascular, nervoso, epitelial, ósseo, cartilaginoso, de tendões e ligamentos, cardíaco, oftálmico, hepático, medula espinhal, traqueia e tímpano (Kundu *et al.*, 2013).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Biomaterial**

##### **3.1.1 Solubilização da fibroína**

Casulos do bicho-da-seda (*Bombyxmori L.*) foram fornecidos pela empresa de Fiação de Seda BRATAC Ltda Bastos-SP, Brasil). Inicialmente os casulos foram selecionados retirando sujidades. 5 gramas de casulos (sem as crisálidas) foram lavados em 1 litro de água destilada contendo carbonato de cálcio (0,5%, m/v) a uma temperatura de 90-100 °C, durante 30 minutos (min) para retirada da sericina. Após esse tempo, as fibras foram lavadas em 1 litro de água destilada no mínimo a cada 1 hora por 3 vezes. Após a última lavagem, as fibras de fibroína foram espremidas para retirar o excesso de água e então colocadas em uma placa de Petri para secagem na estufa a 50 °C por 24 horas. As fibras de fibroína secas foram dissolvidas lentamente em ácido fórmico sob agitação magnética e deixadas agitando por 24 horas. As soluções de fibroína obtidas (10 – 25%, m/v) foram utilizadas em um prazo de 4 dias.

### **3.1.2 Preparação das placas de fibroína com hidroxiapatita**

As placas de fibroína com hidroxiapatita foram preparadas misturando 2 partes da solução de fibroína para uma parte em massa de hidroxiapatita em pó (fornecida pela JHS - Laboratório Químico, Sabará, MG). Após a homogeneização, a mistura foram colocada em uma placa de teflon com moldes arredondados (2 x 1cm) e mergulhada em etanol (EtOH) para a remoção do ácido fórmico e formação de folhas beta por 72 horas, com trocas do EtOH a cada 12 horas. Em seguida, as placas foram retiradas dos moldes de teflon e deixadas em EtOH por mais 24 horas para retirada de todo ácido fórmico. Após esse período, as placas foram transferidas para estufa para secagem a 50 °C e transferidas para água para retirada do EtOH por 48 horas. Estas últimas placas foram secas sobre papel de filtro e armazenadas em sacos plásticos até o seu uso.

Diante do exposto foram avaliados três compósitos, os quais são constituídos de placas de hidroxiapatita sintética (HAP), fibroína da seda (FS) nas proporções HAP: FS 1:0,5 , 1: 2,5, e placas de fibroína da seda pura.

### **3.2 Difração de raios-X**

A cristalinidade das placas foi analisada por difração de raios-X. As análises de cada amostra foram realizadas em um difratômetro da marca Rigaku D-Max modelo Geiger Flex equipado com tubo de cobalto (radiação Co-K $\alpha$ ,  $\lambda = 1,79026 \text{ \AA}$ ), e um monocromador de cristal curvo de grafite no feixe difratado, operado com diferença de potencial de 40 kV e corrente elétrica de 30 mA. As varreduras foram realizadas no modo 2 $\theta$  passo a passo em intervalo de 15 a 50° 2 $\theta$  com 0.05° de incremento e 2 segundos de contagem de tempo em cada passo. Para estudo comparativo da cristalinidade foram realizadas análises em duplicata com o material macerado na forma de pó.

### **3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para análise morfológica, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca LEO 1430VP, a voltagem de 15 Kv do núcleo de Microscopia eletrônica e microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Para tal, as superfícies foram cobertas por uma camada de 20 nm de carbono, utilizando um sistema de deposição “sputtering balzers” (Electron Microscopy Sciences, modelo 550x), e, através de uma fita dupla face, foram fixados na superfície dos ‘*stubs*’ e colocados no interior do microscópio para leitura e análise. Foram obtidos dados qualitativos das fotografias, analisando-se a topografia das superfícies pela: 1) distribuição e formato dos cristais de hidroxiapatita expostos na superfície das amostras, se existentes; 2) presença ou não de poros.

### **3.4 Testes *in vitro* de biocompatibilidade**

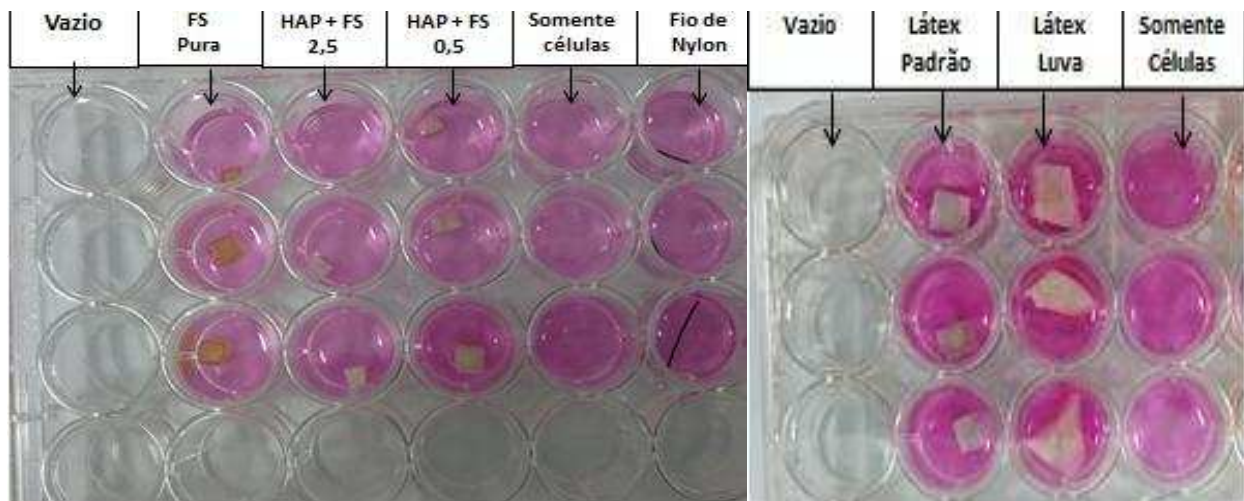
#### **3.4.1 Teste de Contato Direto**

Para este teste, os biomateriais foram cortados em formato quadrangular de 5 mm x 5 mm de forma a permitir sua posterior imersão no centro dos poços da placa de cultivo de 24 poços por um período de 24 horas.

Foi utilizada uma linhagem celular de fibroblastos de camundongo (NIH/3T3), os quais foram cultivados em meio de cultura Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) Glicose intermediária, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica (100 UI/ml de penicilina, 100 microgramas/ml de estreptomicina e 0,25 microgramas/ml de anfotericina B).

Em seguida cada poço recebeu 1 ml de meio de forma a permitir que os biomateriais ficassem imersos. Após esse período foi preparada uma solução das células NIH/3T3 com  $1 \times 10^6$  células/ml. Em seguida o meio de cultivo dos biomateriais foi removido de cada poço. Sobre cada biomaterial foi colocado 100  $\mu$ l da solução contendo as células NIH/3T3 e os biomateriais foram encubados por 2 horas

. Também foram utilizados fragmentos de fio de nylon como controle positivo e fragmentos de látex como controle negativo bem como um poço sem qualquer biomaterial contendo apenas células como controle do procedimento (Figura 3).

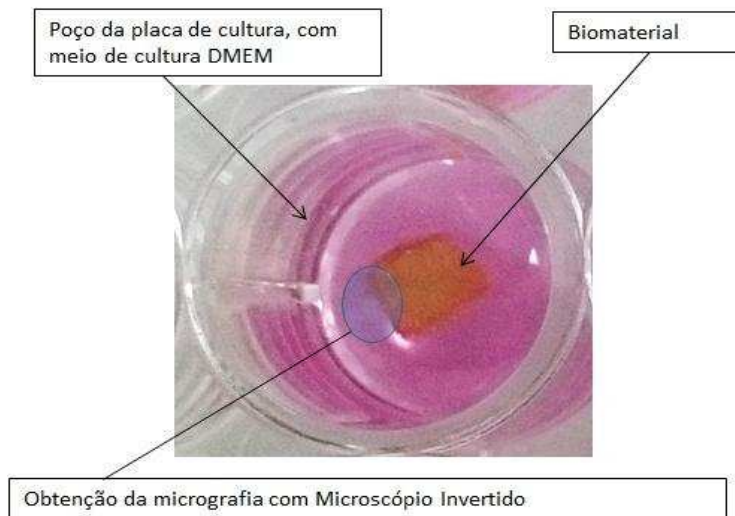


**Figura 3**-Disposição das amostras e dos controles negativos e positivos em placa de 24 poços para realização de teste de contato direto e teste de adesão celular aos biomateriais.

### 3.4.2 Preparação do material para microscopia

Após 24 horas de incubação, o meio de cultivo foi aspirado cuidadosamente sem tocar no fundo do poço e no biomaterial, adicionando-se 1 ml de solução tampão fosfato salino (PBS) por poço. Após esta etapa o PBS foi removido e adicionado 1 ml de metanol em cada poço, sendo mantido por 10 minutos em temperatura ambiente e posteriormente removido e lavado com solução PBS. Uma gota de corante azul de metileno a 0,4% foi adicionado em cada poço e mantido por um minuto e posteriormente lavados com água destilada por duas vezes.

Logo após foram obtidas micrografias através de Microscópio Invertido (Nikon TMS) da interface biomaterial/placa de cultura (Figura 4) onde foram avaliadas as características referentes à viabilidade celular, onde essas quando viáveis apresentam formato fibroblastoide, com núcleo e citoplasma bem evidenciados bem como aderência ao biomaterial. Quando inviáveis as mesmas se apresentam arredondadas e flutuantes com núcleo e citoplasma indistintos.



**Figura 4** -Representação esquemática da obtenção das micrografias ópticas na interface membrana/placa do meio de cultura.

### 3.4.3 Teste de adesão

O procedimento de plaqueamento foi o mesmo aplicado ao teste de contato direto. Após o cultivo das células, cada biomaterial foi fixado com uma solução de glutaraldeído a 2.5% e 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0.1 M pH:7,4 a 4c° por 2 horas. A seguir, as amostras foram desidratadas em uma sequencia de etanol (50% absoluto) e levadas para realização de secagem em ponto critico (Balzers CPD 030). Então, as amostras secas foram recobertas com uma fina deposição de ouro (Metalizador Quorum Q 150 S) para que fossem analisadas as superfícies das membranas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (Leo 1430VP).

### 3.5 Análise de biocompatibilidade *in vivo*

O presente trabalho experimental obteve sua metodologia aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa sob protocolo número 259/15.

Para as análises de biocompatibilidade *in vivo*, foram utilizados oito coelhos da raça Nova Zelândia provenientes da Coelheira do Departamento de Zootecnia da UFV.

Os animais obtiveram um mês para aclimatação a adaptação ao ambiente e foram alojados em gaiolas individuais, recebendo ração duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

### **3.5.1 Procedimento Cirúrgico**

Foram implantados os dois compósitos Hidroxiapatita HA + Fibroína da seda FS 0,5% e HA +FS 2,5% assim como da placa de FS pura, todos em duplicatas em animais diferentes. Quatro incisões foram feitas na região dorsal de cada animal (Figura 5), duas incisões craniais, direita e esquerda, e duas incisões caudais, direita e esquerda. As quatro incisões de um mesmo animal receberam o mesmo compósito, (fragmentos de 0,5 cm por 0,5cm de cada placa), no tecido subcutâneo entre a fáscia muscular e a pele do animal. A pele do animal foi suturada em padrão simples interrompido com fio de nylon 2-0. A analgesia pós-operatória foi realizada com Tramadol 6 mg/kg pela via subcutânea, sendo aplicado posteriormente ao procedimento cirúrgico e durante três dias consecutivos, a cada oito horas.

### **3.5.2 Coleta das amostras**

Posteriormente, os animais foram submetidos às cirurgias para coleta do material, envolvendo pele, tecido subcutâneo, compósito, se houvesse, e tecido muscular. Aos 15, 30, 60 e 120 dias foram coletados as duas amostras de cada grupo e ao final da última coleta foi realizada eutanásia por sobredose de propofol e administração de cloreto de potássio, ambos por via intravenosa, de acordo com as normas exigidas pela Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

As quatro amostras obtidas de cada um dos animais foram encaminhadas para o processamento histológico de rotina (fixação, desidratação, inclusão em parafina, microtomia e coloração por hematoxilina-eosina). Foi avaliada a presença do compósito, sua morfologia e os tecidos e as células em contato com o compósito, os quais foram caracterizados. Foi avaliada e descrita a presença ou ausência da cápsula fibrosa e espessura da mesma se existente. A presença de infiltrado inflamatório foi

caracterizada como discreto moderado ou intenso. Outras características também foram avaliadas e descritas como a irrigação sanguínea, presença de regiões hemorrágicas, infiltração tecidual dentro do biomaterial e evidências de fagocitose.

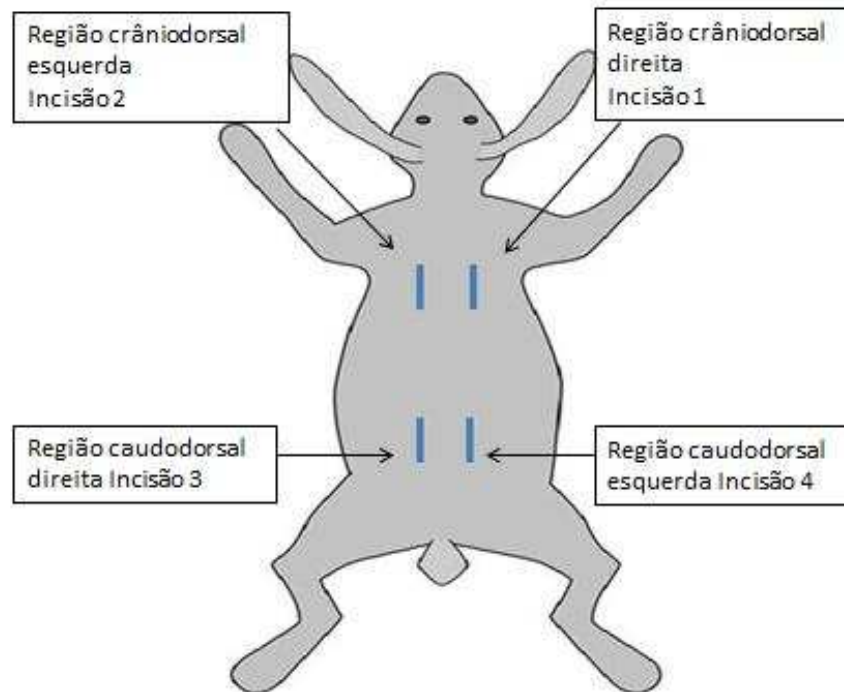


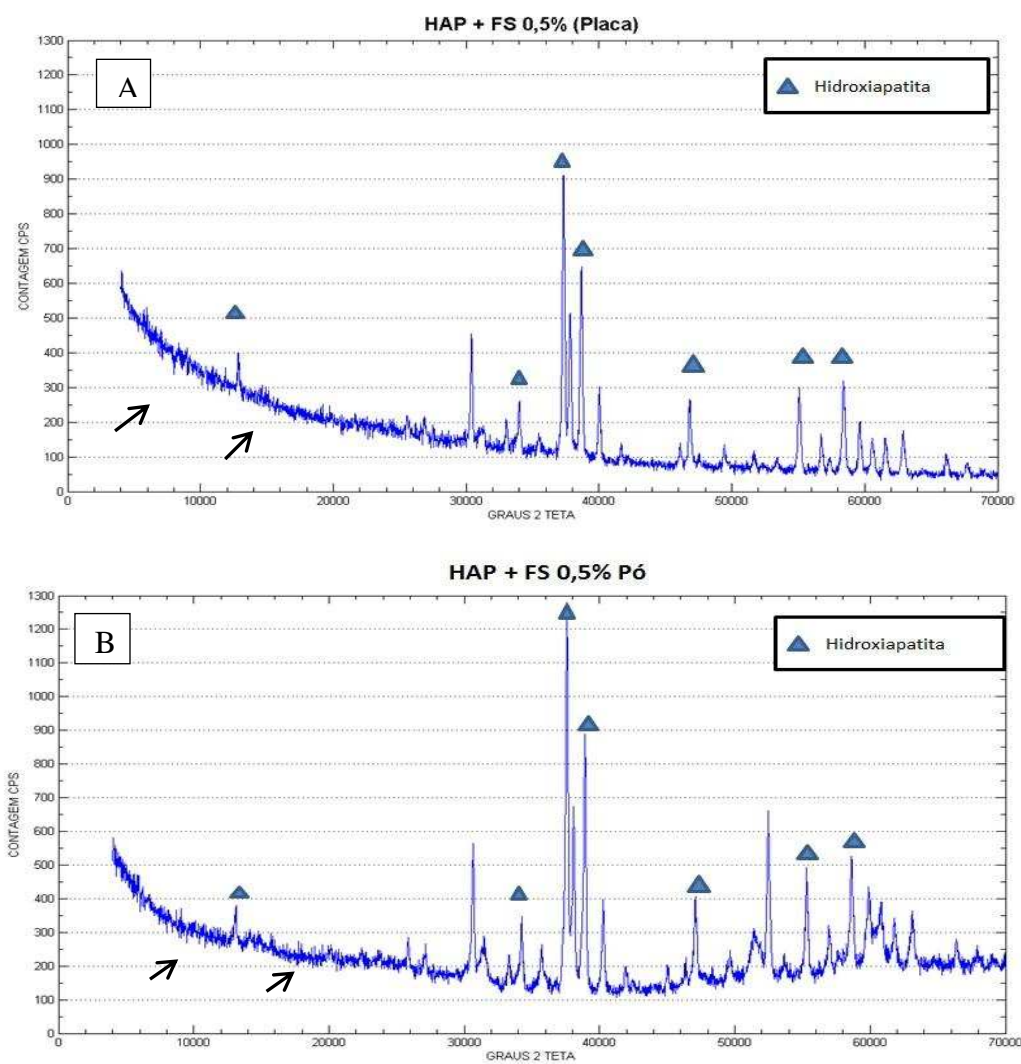
Figura 5-Desenho esquemático da localização das incisões do teste de biocompatibilidade *in vivo* e coleta de amostras.

A espessura da cápsula fibrosa foi avaliada segundo o tratamento e ao longo do tempo por análise de regressão linear e quadrática. Para este teste, foi considerado nível de significância de 5% utilizando o software Sigma Plot (Scientific, 1994).

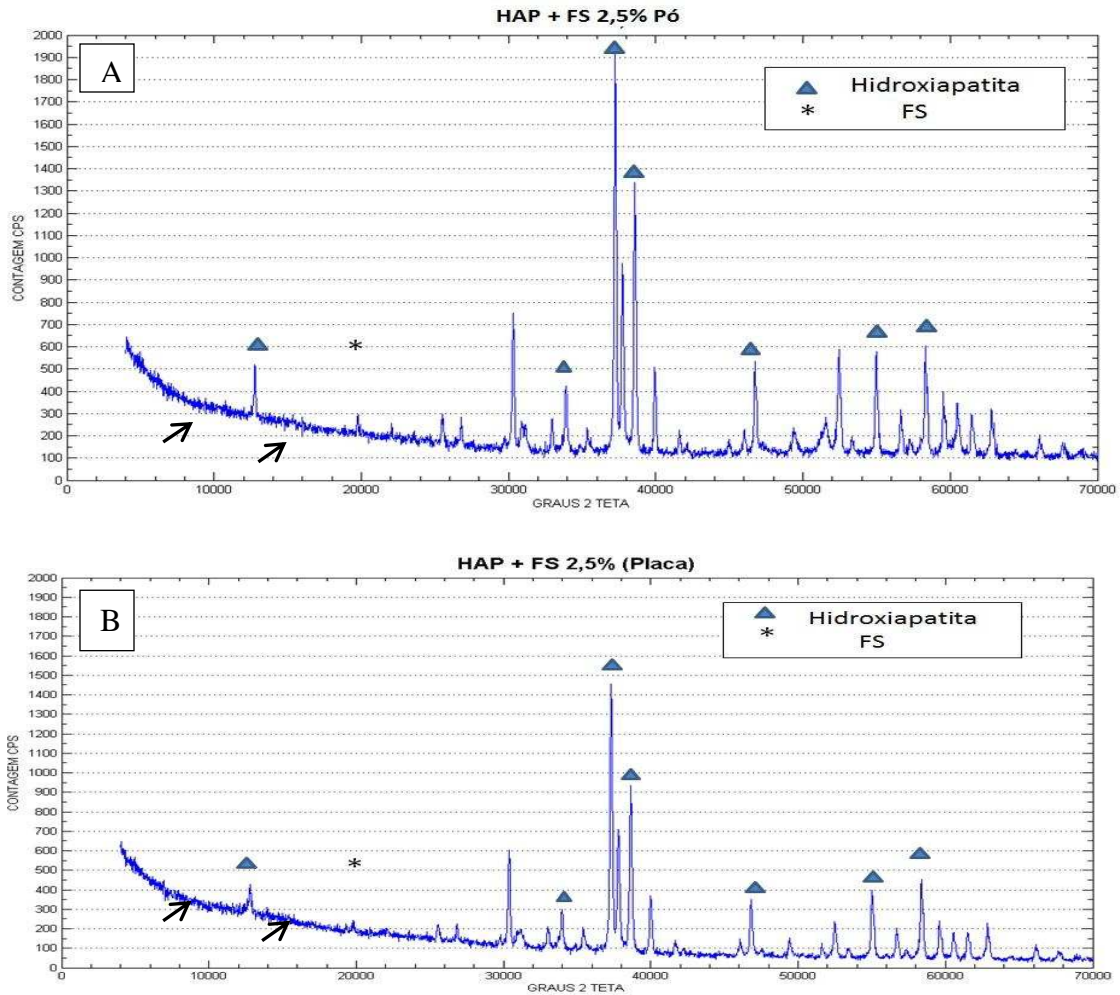
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Difração de raios-x

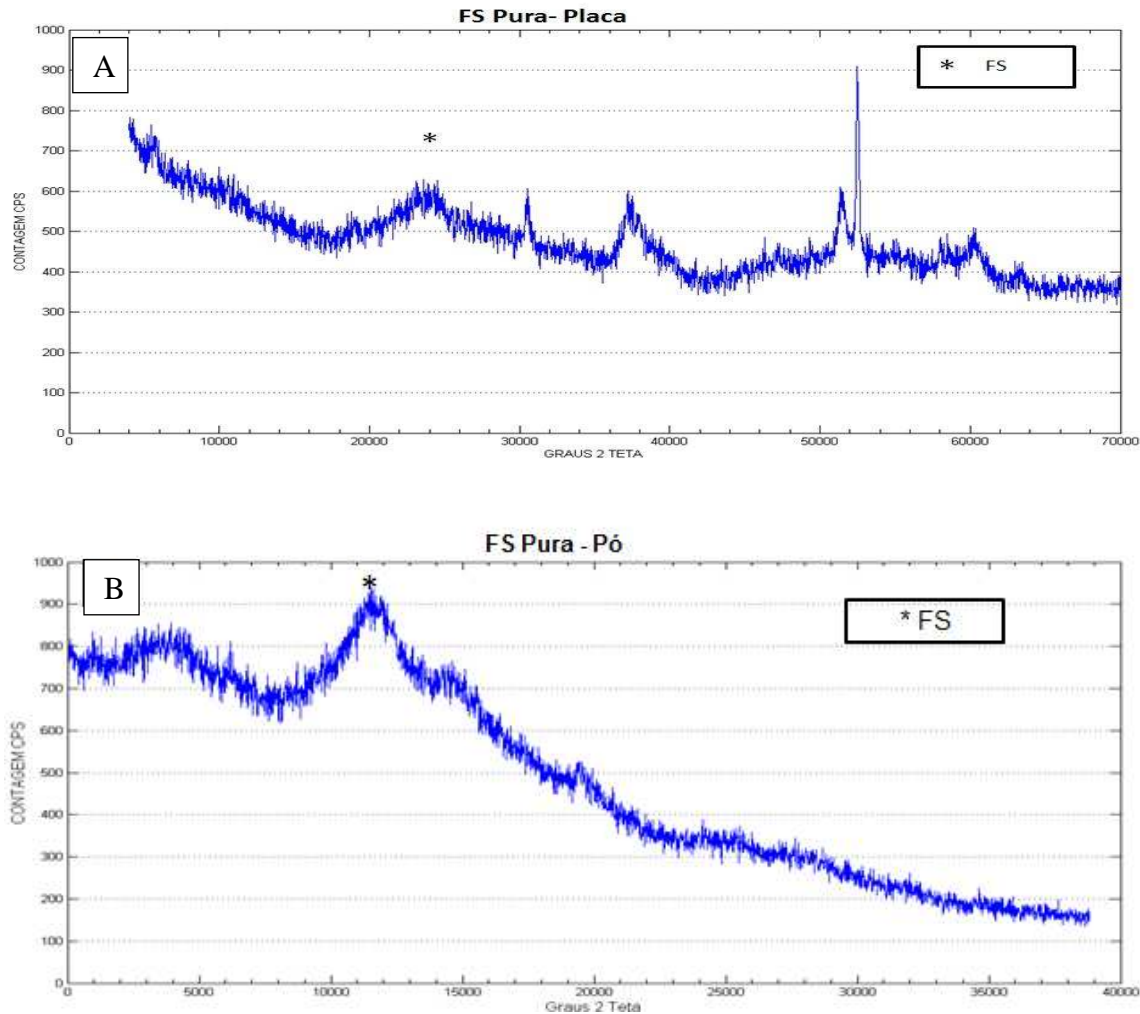
Os difratogramas de cada compósito estão representados nas Figuras 6A e B (HAP+FS 0,5), Figuras 7A e B (HAP+FS 2,5) e Figuras 8A e B (FS pura).



**Figura 6-** Difratogramas do compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda HAP+FS 0,5 placa (A) e pó(B) na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X. Notar os picos de HAP representados na legenda. Notar, região amorfa (setas pretas) representando a fase amorfa do polímero presente no compósito (fibroína da seda).



**Figura 7-** Difratoograma do compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda HAP+FS 2,5 placa (A) e pó (B) na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X. Notar os picos de HAP representados na legenda e picos de fibroína da seda (regiões folha  $\beta$ ) representados por asterisco(\*). Notar, regiões amorfas (setas pretas) representando a fase amorfa do polímero presente no compósito (fibroína de seda).



**Figura 8-** Difratoograma da fibroína de seda (FS) na forma de placa (A) e em pó (B) na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X. Notar picos de fibroína da seda (regiões folha  $\beta$ ) representados por asterisco(\*).

Foram identificados picos de alta intensidade referentes à hidroxiapatita condizentes com seu respectivo CPDS Card (Mynocris, 2016) para os compósitos HAP + FS 0,5 e HAP + FS 2,5. Um discreto aumento na intensidade dos picos foi observado quando comparado o difratograma da forma em pó para a forma em placa. Isso pode ser explicado pelo processamento e modelamento do compósito na sua forma rígida que diminui a cristalinidade da FS. Apesar desta observação, o compósito em forma de placa apresentou elevada cristalinidade.

A fibroína da seda é um biomaterial composto por regiões cristalinas e amorfas (Saitoh *et al.*, 2004). Os picos relacionados a estruturas cristalinas de folha  $\beta$  das fibras da seda (Altman *et al.*, 2003;; Saitoh *et al.*, 2004 ;Lee *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2014) foram demonstrados nos difratogramas referentes ao compósito HA + FS 2,5 e FS pura. A ausência de picos cristalinos característicos de folha  $\beta$  no compósito de HA + FS 0,5 se deve provavelmente pela menor proporção do polímero uma vez que esse método é semi-quantitativo, bem como pela característica amorfa do mesmo (Saitoh *et al.*, 2004).

Regiões amorfas foram visualizadas nos três difratogramas, relacionadas a presença da fibroína da seda. Essas regiões são importantes, pois podem ser responsáveis por melhorar as características mecânicas do compósito (Saitoh *et al.*, 2004; Perdigão, 2015). Regiões altamente cristalinas são frágeis, devido ao seu menor módulo de elasticidade e conseqüentemente, menor grau de deformação frente a um impacto. Além disso, os materiais cristalinos possuem lenta taxa de reabsorção, e a presença de materiais amorfos podem acelerar esse processo equilibrando a taxa de reabsorção frente a uma taxa de remodelação óssea (Conz *et al.*, 2005; Carlo Reis *et al.*, 2012).

#### **4.2 Microscopia eletrônica de varredura**

A caracterização das placas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura revelou neste estudo algumas propriedades específicas dos compósitos de HAP + FS 0,5 e HAP + FS 2,5 como a presença de cristais de hidroxiapatita entremeados nas estruturas fibrosas e irregulares dos polímeros de fibroína da seda. A presença dos cristais de hidroxiapatita contribuiu no aumento da complexidade da superfície das placas dos compósitos HAP +FS 0,5 E HAP + FS 2,5 apresentando diversas irregularidades em escala micrométrica, tendo em vista que neste estudo as placas foram criadas a partir de moldes com superfície lisa, característica essa evidente nas micrografias das placas de FS pura a qual apresentou baixo número de poros e poucas irregularidades ou estruturas em escala macro e micrométrica como vistos nas figuras (Figura 9A e B). A interação a nível celular com as superfícies dos biomateriais é de

extrema importância na eficiência de implantes médicos, podendo definir o seu grau de rejeição, onde superfícies complexas podem aumentar a interação das células através da adesão e proliferação celular (Craighead, 2011), demonstrado em estudos com células neuronais uma maior adesão celular a superfícies irregulares de ordem nanométrica e micrométrica em filmes de silicone (Craighead, 2008).

Com auxílio do programa ImageJ Launcher (Rasband, 2011) foi realizada avaliação da porosidade das placas sendo possível constatar que a placa de Fibroína da seda pura apresentou número escasso de poros, sendo estes quando identificados apresentaram diâmetro médio equivalente a 149,7 nm. A placa do compósito de HAP + FS 0,5 apresentou número elevado de microporos com moderado grau de interconectividade com diâmetro médio de 4,93  $\mu\text{m}$  variando de 2,15 á 31,74  $\mu\text{m}$  (Figura 10). O compósito HAP + FS 2,5 apresentou número elevado de microporos com moderado grau de interconectividade, com diâmetro médio de 5,32  $\mu\text{m}$  variando de 1,29 á 39,78  $\mu\text{m}$  (Figura 11).

Quando um biomaterial é avaliado para sua aplicação voltado a bioengenharia tecidual óssea, a presença de porosidade é de extrema importância tendo em vista que os mesmos permitem e facilitam a proliferação e migração celular de osteoblastos e células mesenquimais. Também propiciam a formação de novos vasos sanguíneos podendo acelerar o processo de reparação óssea (Kuboki, 1998). Somado a isso uma superfície porosa garante uma melhor união entre a superfície de um implante com o tecido ósseo proporcionando maior estabilidade mecânica (Orefice, 2006).

Sabe-se que além de sua presença, o tamanho dos poros pode interferir diretamente no processo de regeneração óssea. (Tampieri *et al.*, 2001, Orefice, 2006) De acordo com dimensão e morfologia foi descrito pela literatura que a presença de um tamanho de poro superior a 150  $\mu\text{m}$  é um requisito essencial para osteocondução (Tampieri *et al.*, 2001), para Tsuruga 1997 e colaboradores em estudo realizado com proteínas ósseas morfogenéticas aplicadas em associação a cerâmicas de hidroxiapatita com diferentes porosidades, observou uma margem ideal de 300-400  $\mu\text{m}$  para diferenciação e crescimento de tecido ósseo. Levando em consideração os polímeros em geral, sua aplicabilidade para interação direta com tecido ósseo seus

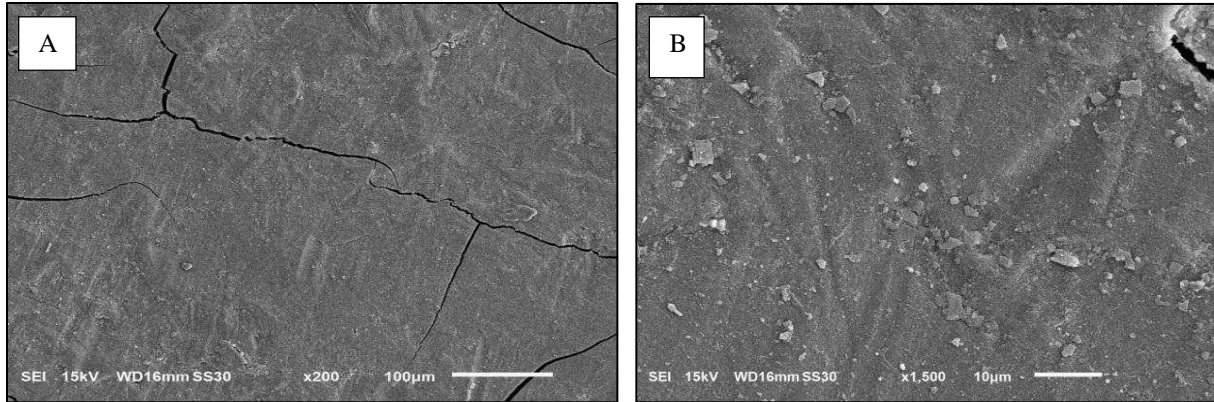
poros devem apresentar diâmetro entre 100-200 µm com uma elevada conectividade entre si (Oréface, 2006).

A porosidade apresenta-se como uma propriedade de interesse na engenharia tecidual, pois favorece a adesão de células aos scaffolds (Bodin *et al.*, 2010). Gholipourmalekabadi *et al.* (2015) avaliando propriedades de compósito preparado a partir de HAP e FS também observaram a presença de poros, caracterizando-o como um biomaterial altamente capacitado a promover adesão, migração celular e crescimento tecidual. Entretanto, também relataram em suas pesquisas que o aumento da quantidade de fibroína da seda pode comprometer o diâmetro dos poros e conseqüentemente apresentarem uma barreira para o desenvolvimento de vasos e transporte celular no interior da matriz, fato este não observado neste estudo uma vez que a variação na concentração de fibroína de seda não alterou de forma semelhante o diâmetro dos poros presentes nos compósitos.

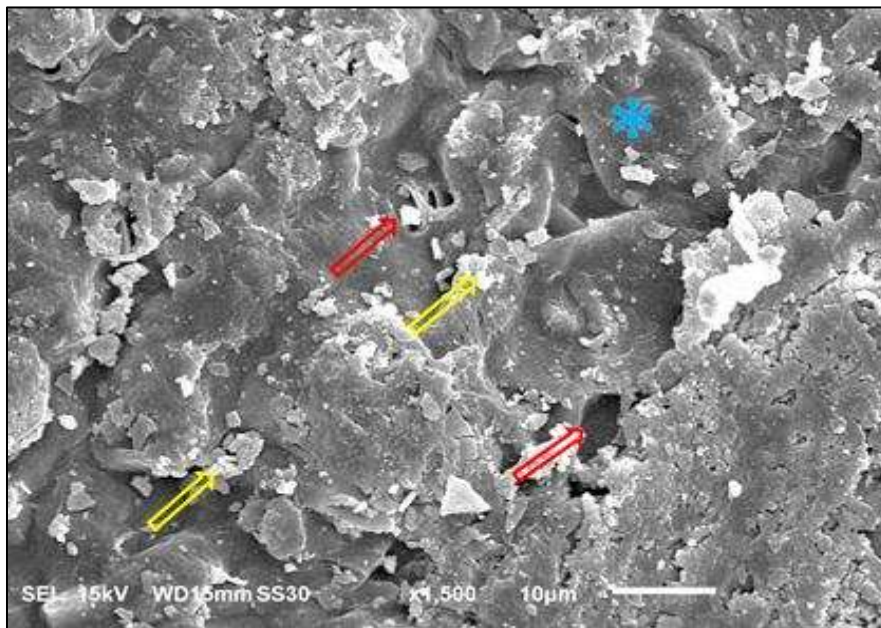
Um parâmetro importante a ser considerado, se refere à resistência mecânica do biomaterial que é inversamente proporcional ao volume e tamanho de seus poros, o que pode guiar a utilização do biomaterial estudado utilizado em ambientes que demandem suporte de carga, isso associado a características mecânicas já conhecidas da fibroína de seda, referentes a sua elevada resistência e elasticidade.

Assim, a adição de fibroína contribuiria neste quesito para a fabricação de dispositivos bioabsorvíveis, pois esta apresenta um controle de biodegradabilidade sendo altamente absorvível (Ge *et al.*, 2012). Esta biodegradabilidade é desejável, já que o ideal é que o material implantado degrade aos poucos, à medida que o novo tecido vai sendo substituído.

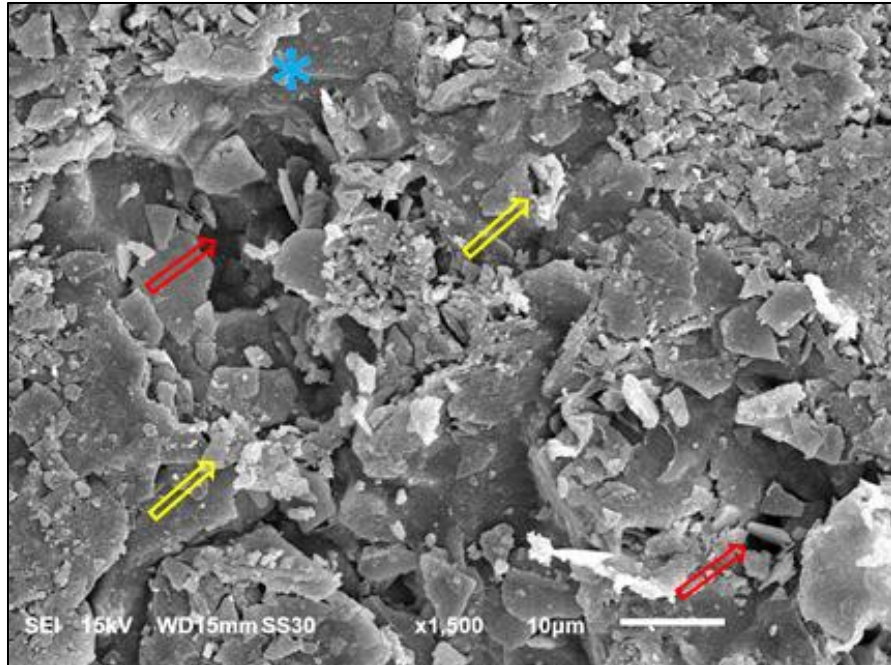
Sua superfície complexa, portanto garante aos compósitos estudados uma predisposição a adesão celular servindo como ótima opção para sua aplicação como suporte para o crescimento celular na regeneração tecidual.



**Figura 9-** Microscopia eletrônica por varredura de placa de Fibroína de seda. Aumento de 200x (A) e aumento de 1500x (B).Notar a ausência de poros e o aspecto de baixa complexidade da superfície da placa.



**Figura 10-** Microscopia eletrônica de varredura do compósito HAP + FS 0,5. Observar a presença de cristais de hidroxiapatia (setas amarelas) aderidas a rede fibrosa da Fibroína de Seda (\*), revelando a interação entre ambos juntos a presença de porosidade (setas vermelhas).



**Figura 11-** Microscopia eletrônica de varredura do composto HÁP + FS 2,5. Observar a presença de cristais de hidroxiapatita (setas amarelas) aderidas a rede fibrosa da Fibroína de Seda (\*), revelando a interação entre ambos juntos a presença de porosidade (setas vermelhas).

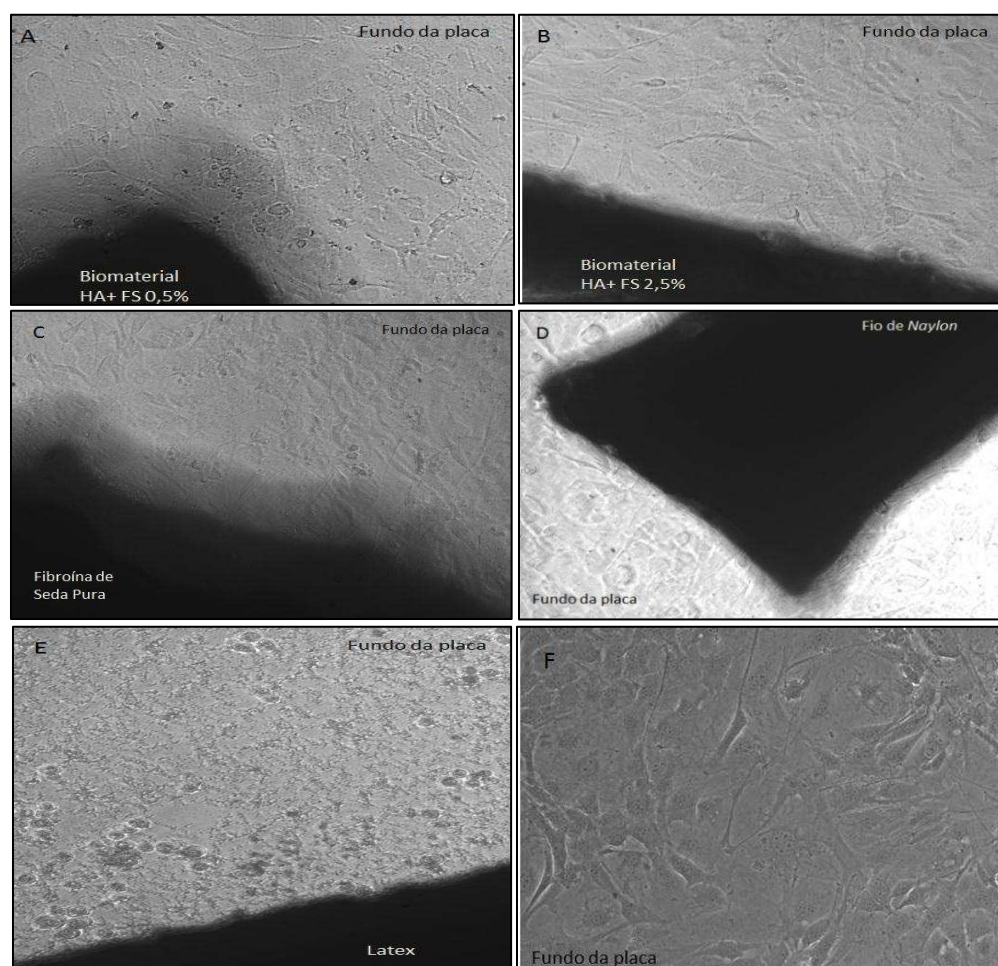
### 4.3 Teste de Biocompatibilidade *in vitro*

#### 4.3.1 Contato Direto

Os testes de biocompatibilidade *in vitro* foram realizados inicialmente para avaliar os materiais e identificar aqueles que apresentassem comportamento citotóxico. Desta maneira, foi possível selecionar apenas os materiais mais adequados para a aplicação *in vivo*, minimizando assim o número de animais experimentais.

A Figura 12 (A a F) apresenta as imagens obtidas com microscópio óptico invertido (Nikon TMS) no final do período de cultivo. As imagens demonstraram que as células proliferaram adequadamente em todos os poços, podendo-se observar que houve grande aumento no número de fibroblastos na placa, inclusive em contato direto com os 3 biomateriais e nos controles positivos referentes ao fio de nylon e aos poços com somente células (Figura 12 D e F) no decorrer do período de observação.

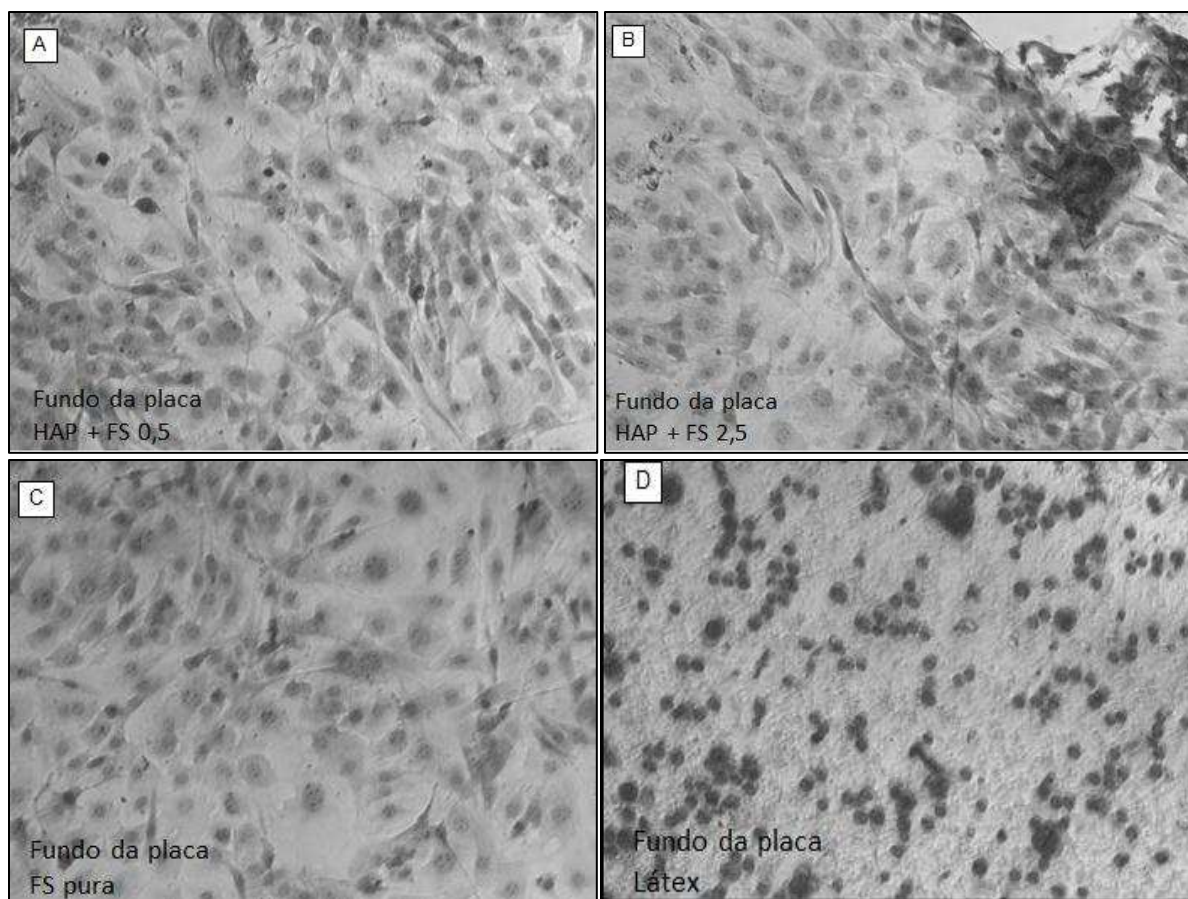
Este fato é mais um indicativo de que os biomateriais avaliados não são citotóxicos, visto que, caso o material apresentasse citotoxicidade, as células não conseguiriam sobreviver na placa de cultura, juntamente com o biomaterial, como demonstrado no controle negativo (Figura 12 E). Esse resultado está de acordo com as prerrogativas qualitativas morfológicas para testes em extratos da ISO: 10993-5 (2009) que cita ausência de reatividade ao dispositivo médico quando as células mantêm a sua arquitetura normal com presença de grânulos citoplasmáticos, ausência de células lisadas e não redução de seu crescimento.



**Figura 12-** Fotomicrografias ópticas retiradas após cultivo celular, onde: A) HAP + FS 0,5; B) HAP + FS 2,5 ; C) Fibroína de Seda Pura ; D) Fio de nylon; E) Controle negativo com látex e F) Fundo de placa sem biomaterial.

Os biomateriais por apresentarem aspecto opaco quando observados em microscópio invertido, não possibilitaram a visualização das células cultivadas sobre ela. Porém, a crescente proliferação celular na placa de cultura e na interface com os biomateriais indica que, também há um significativo número de células presentes em sua superfície, fato este comprovado posteriormente através de MEV de superfície.

Para uma melhor caracterização morfofisiológica da linhagem celular de fibroblastos de embrião de ratos (3T3) presentes nos poços os mesmos passaram por processo de preparo para análise para microscopia após processo de coloração com azul de metileno (Figura 13 – A a D). Observou-se durante esta análise intensa proliferação celular com recobrimento completo do fundo da placa atingindo grau máximo de confluência em todas as amostras com biomateriais analisados formando aspecto de monocamada com os fibroblastos apresentando grânulos intracitoplasmáticos discretos, sem lise celular, sem redução do crescimento celular, seguindo o padrão qualitativo proposto pelo ISO 10993-5 (2009). Fato este não observado no controle negativo a base de látex que demonstrou morte celular, ausência de projeções citoplasmáticas, não interação entre as células com aspecto arredondado sem definição de núcleo e citoplasma.



**Figura 13** Fotomicrografias ópticas do fundo da placa de cultivo das amostrass retiradas após cultivo celular coradas com azul de metileno. A)HAP + FS 0,5 B) HAP + FS 2,5 C) Fibroína de seda pura e D)Controle negativo com látex.Observar a elevada confluência celular da linha 3T3 presentes nos poços dos biomateriais, bem como a morfologia dos fibroblastos(A, B e C) com nucleo e citoplasma bem evidentes com intensa presença de projeções citoplasmaticas, em relação ao controle negativo de látex (D) com aspecto arredondado e sem definição de núcleo e citoplasma.

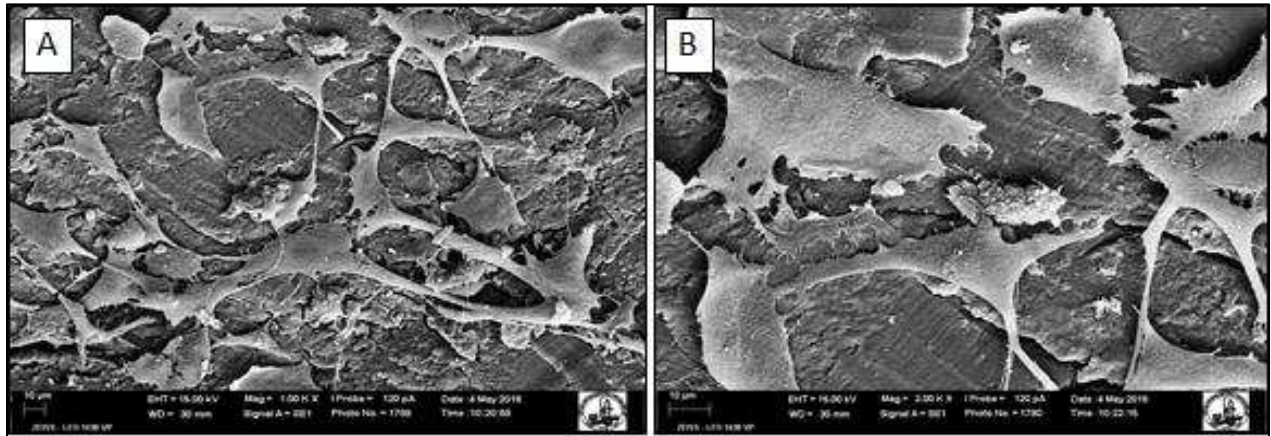
### 4.3.2 Teste de Adesão Celular

A adesão celular influencia vários fenômenos naturais, como: embriogênese, manutenção estrutural dos tecidos, cicatrização, resposta imune, metástase, e interação célula/material. Para que novos biomateriais possam ser aplicados com sucesso na engenharia de tecidos, há a necessidade fundamental do estudo das interações entre as células e estes materiais (Pertile, 2007). A adesão celular a um biomaterial está relacionada a dois fenômenos diferentes: fase de anexação e fase de adesão. A anexação, que ocorre rapidamente, é o movimento da célula em direção ao

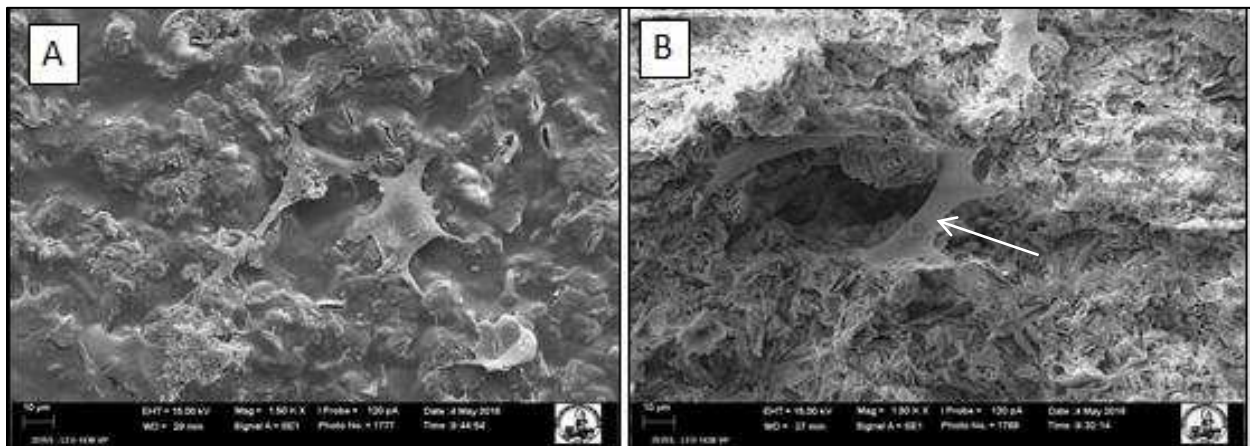
biomaterial recém implantado, nesta ocorrem alguns eventos como ligações físico-químicas, através de forças iônicas e forças de Van der Waals (Anselme, 2000). A fase de adesão ocorre posteriormente e envolve diversas moléculas biológicas como proteínas de matriz extracelular, proteínas de membrana celular e do citoesqueleto, que interagem conjuntamente para induzir a transdução do sinal, promovendo a ação de fatores de transcrição e conseqüentemente regulando a expressão gênica (Anselme, 2000; Chen *et al.*, 2010).

Mesmo com uma superfície menos complexa e com pouca porosidade, esta análise de adesão mostrou que os fibroblastos cultivados sobre as placas de fibroína de seda pura (Figura 14A e B) aderiram diretamente à superfície do material, tal como esperado para estas células, mostrando mais uma vez que o material não é citotóxico, apresentando interação direta com as células cultivadas sobre a sua superfície, não causando a morte das mesmas. A literatura demonstra que a fibroína apresenta aminoácidos alcalinos que são conhecidos por serem receptores celulares e mediar importantes interações entre células de mamíferos e a matriz extracelular, facilitando a adesão e crescimento celular (Fang *et al.*, 2009). Este fato corrobora os achados do estudo realizado ao se examinar as imagens obtidas por meio do MEV, onde é possível visualizar um grande número de fibroblastos 3T3 aderidos a superfície da placa de fibroína de seda pura.

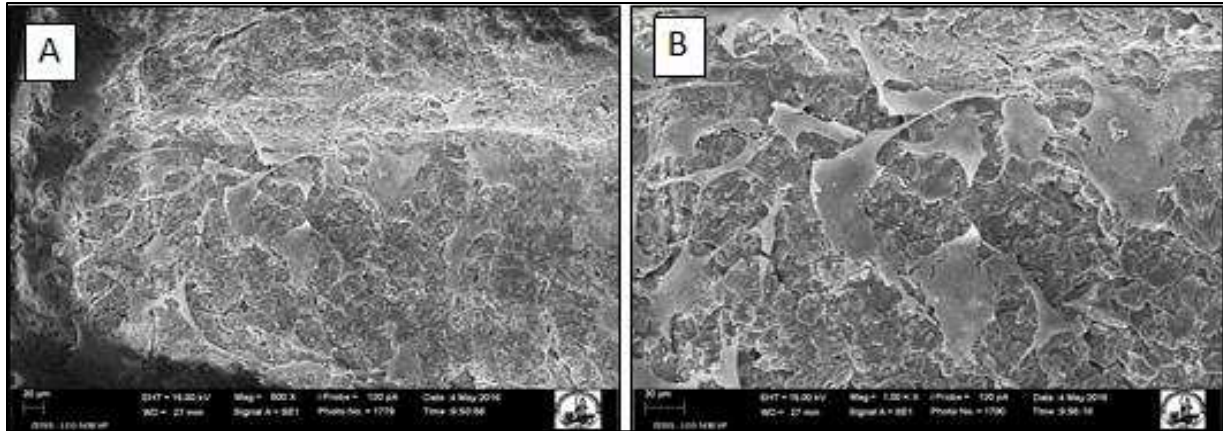
Quanto a avaliação da adesão dos compósitos HAP + FS 0,5 e HAP + FS 2,5 ambas apresentaram características semelhantes, com presença notável de fibroblastos aderidos por suas superfícies complexas, se distribuindo com tendência a formação de uma monocamada (Figuras 15A e B e 16A e B).



**Figura 14-** Microscopia eletrônica de varredura após a adesão de fibroblatos 3T3 em placa de Fibroina de Seda Pura em aumento de 1000x(A) e de 2000x (B).Notar morfologia achatada , fibroblatos com numerosos prolongamentos citoplasmaticos



**Figura 15-** Microscopia eletrônica de varredura após a adesão de fibroblatos 3T3 em composto HÁP + FS 0,5 em aumento de 1000x (A) e B)1500X. Notar adesão celular de fibroblato e sua relação com um microporo presente no biomaterial (Seta branca) bem como morfologia achatada , fibroblatos com numerosos prolongamentos citoplasmaticos



**Figura 16-** Microscopia eletrônica de varredura após a adesão de fibroblastos 3T3 em composto HÁP + FS 2,5 em aumento de 500x (A) e B)1000X. Notar morfologia achatada dos fibroblastos com numerosos prolongamentos citoplasmáticos.

Considerando a aplicabilidade de bicompostos de fibroína de seda aplicada a bioengenharia tecidual, podemos comparar em complemento aos resultados observados neste estudo dados da literatura que reforçam a possibilidade de utilização clínica deste biomaterial em questão.

Unger *et al.* (2004) e Nogueira, (2009) realizaram testes de crescimento celular *in vitro* em membranas de fibroína de seda utilizando fibroblastos, queratinócitos e osteoblastos e verificaram que todas as células aderiram e se espalharam nos espaços entre as fibras ou na superfície das membranas, fato este corroborado neste estudo pelas Microscopias de Varredura após o teste de adesão celular com fibroblasto 3T3.

Estudos *in vitro* têm relatado que os fibroblastos dérmicos se espalharam e proliferaram em scaffolds de fibroína sem secreção de interleucinas pró-inflamatórias (Chiarini 2003; Dal Pra, 2003). Dado semelhante observado ao encontrado neste estudo quanto ao crescimento dos fibroblastos embora a origem dos fibroblastos utilizados nos estudos tenha sido diferente, reforçando as características biocompatíveis do composto estudado.

Filmes de fibroína (Sugihara, 2000) e esponjas de fibroína - alginato (Roh, 2006) tiveram seu benefício relatado com melhoras na cicatrização de feridas *in vivo* de defeitos cutâneos criados em ratos. Estudo estes que encorajam a utilização do composto estudado para fins terapêuticos uma vez que sua biocompatibilidade foi comprovada com êxito.

Fang *et al.*, (2009) realizaram um estudo utilizando *scaffolds* de fibroína de seda onde foram semeados tendócitos de ratos de 5 dias de vida para crescimento e adesão celular. A Fibroína de seda é rica em aminoácidos alcalinos conhecidos por serem receptores celulares e mediar importantes interações entre células com a matriz extracelular, facilitando a adesão e crescimento celular. Após o preparo e incubação dos tendócitos nos *scaffolds* e avaliação foram implantados em defeitos causados em tendões de Aquiles de coelhos. Todos os animais foram operados cirurgicamente nos dois tendões, recebendo o implante em um dos lados e outro sem tratamento, constatando melhora clínica e regeneração tecidual demonstrando que a fibroína de seda configura uma excelente opção para enxertos na regeneração do tendão de Aquiles no modelo animal utilizado.

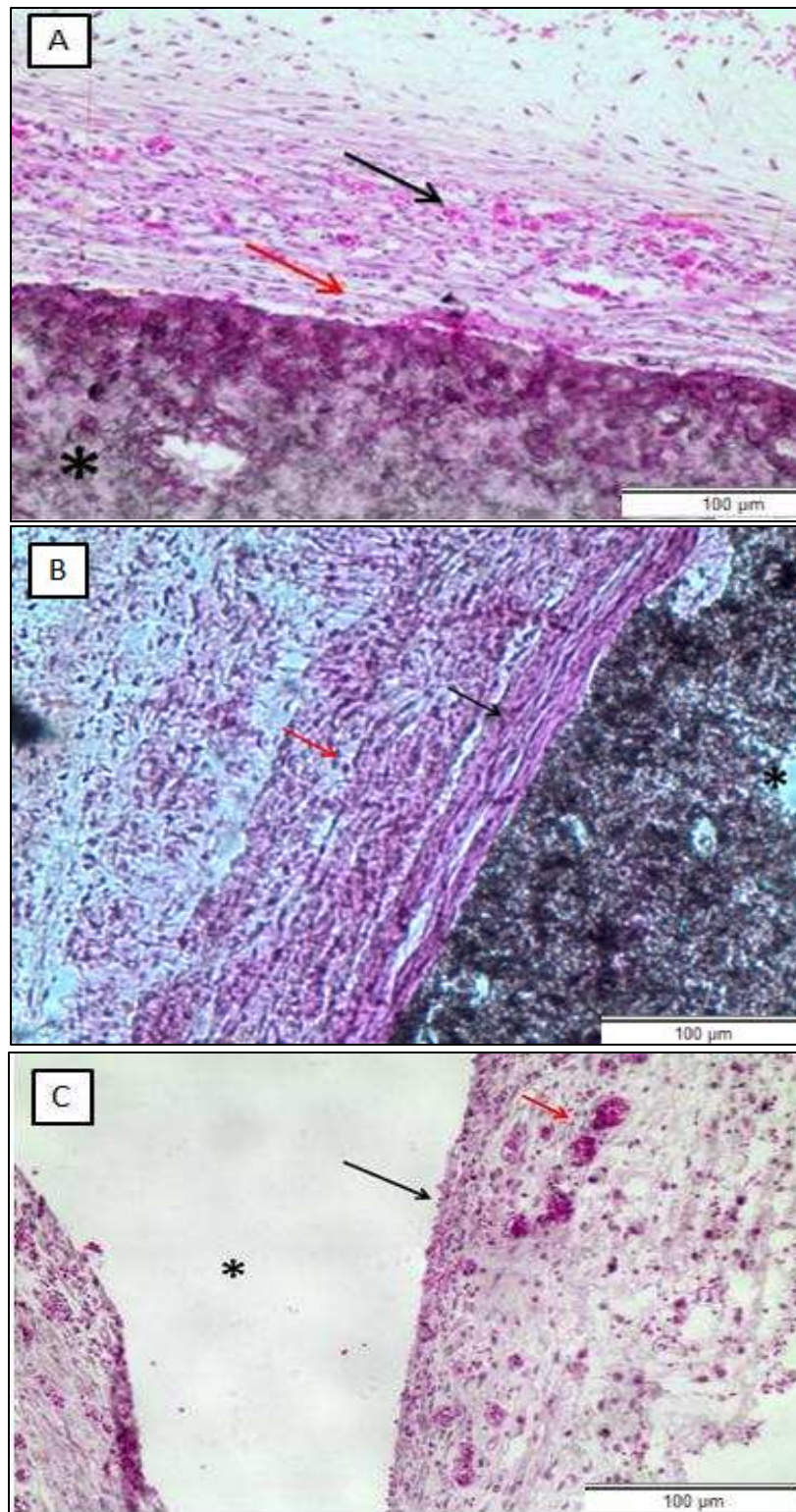
#### 4.4 Avaliação Histológica

Quanto aos resultados das avaliações histológicas, durante toda a avaliação foi possível aferir que o biomaterial se manteve em sua forma original para todas as datas de coleta utilizadas neste estudo, conforme demonstrado na Figura 17. Os resultados das avaliações histológicas foram semelhantes para os dois compósitos HAP+FS 0,5, HAP+FS 2,5 e para o polímero de FS pura.



**Figura 17-** Fotografia mostrando o momento da coleta da amostra para posterior análise histológica. Notar integridade do biomaterial durante coleta com 120 dias (Seta preta)

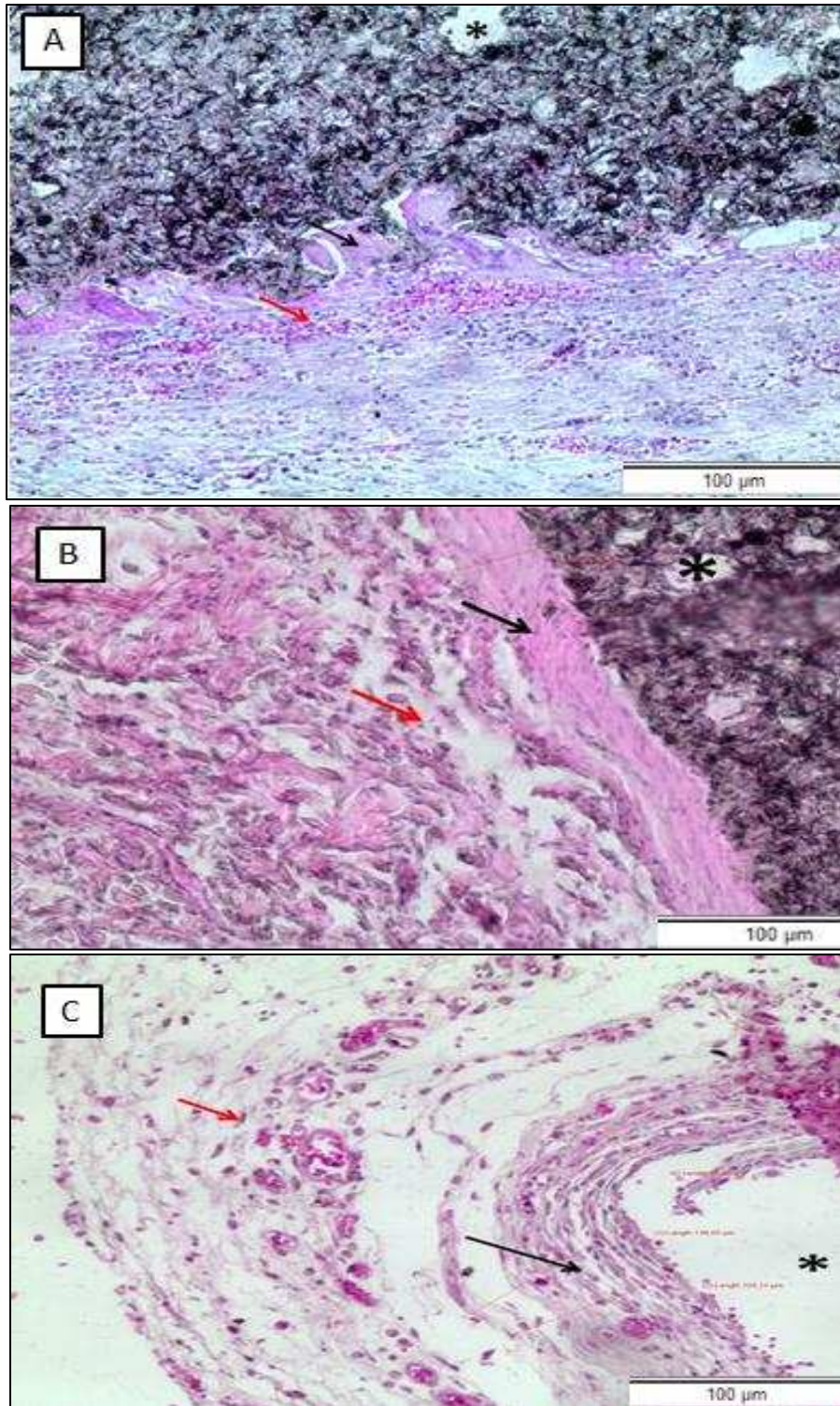
Nos grupos HAP+FS 0,5,2,5,e FS aos 15 dias, observou-se intensa proliferação de células inflamatórias da linhagem monocítica ao redor dos três biomateriais implantados (Figura 18A, B e C). Além da presença de quantidade intensa de células inflamatórias, é possível observar a presença de vasos sanguíneos, com infiltração de tecido conjuntivo indiferenciado ao redor do biomaterial. Foram observados escassos pontos hemorrágicos e o início de formação de cápsula fibrosa e hiperêmica envolvendo o compósito. A resposta inicial à implantação de um biomaterial é a observação de um infiltrado inflamatório agudo neutrofílico, presente por até uma semana. Após esse período, ocorre a fase inflamatória crônica (Anderson *et al.*, 2008). Essa resposta é caracterizada pela presença de células da linhagem monocítica, normalmente de curta duração e está confinada no local do implante, caso haja biocompatibilidade, como foi observado nos achados histológicos deste tempo de avaliação.



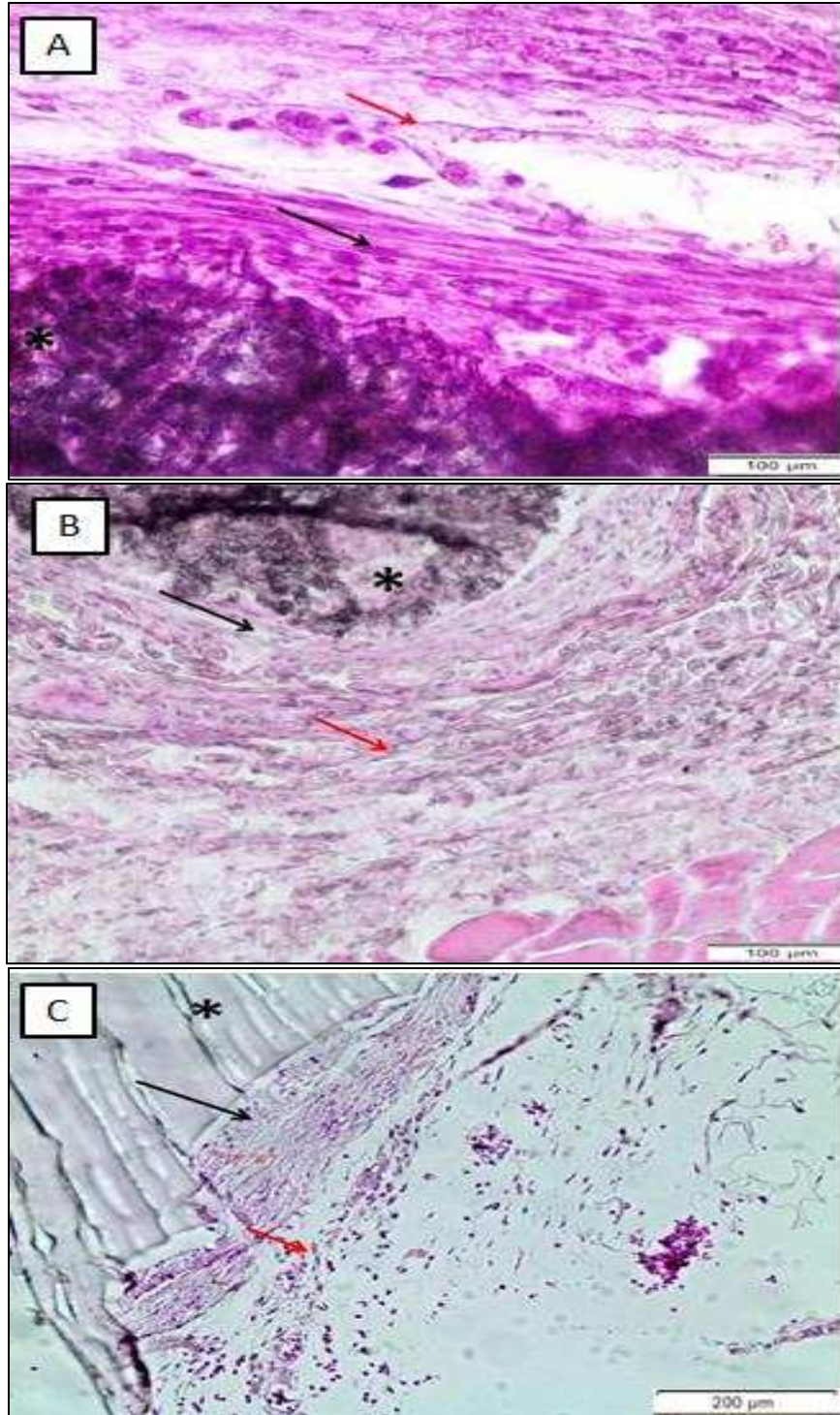
**Figura 18-** Micrografia dos tecidos coletados após 15 dias de implantação dos compósitos e fibroína de seda(\*). A)compósito HAP+FS 0,5; B) compósito HAP+FS 2,5 e C) Fibroína de seda pura. Observar o infiltrado inflamatório monocítico envolvendo o compósito (setas vermelhas) e o início de formação de uma cápsula fibrosa (Setas pretas).Notar presença do molde de fibroína de seda em C (\*).

Na avaliação dos 30 dias, notou-se que o infiltrado inflamatório monocítico diminuiu em relação aos 15 dias, bem como o número de vasos sanguíneos, porém ainda presentes. Houve organização com tendência a formação de tecido fibroso ao redor dos compósitos, sendo possível observar início de organização da capsula. Não foram observadas células gigantes margeando os biomateriais. Tais características foram observadas nos cortes histológicos referentes aos compósitos HAP+FS 0,5 HAP+FS 2,5 e FS pura representados pelas Figuras 19A, B e C, respectivamente. Não foram visualizados pontos hemorrágicos em nenhuma amostra, bem como sinais de absorção do biomaterial, se mantendo preservado até este recorte temporal. Durante o processamento histológico do material, provavelmente devido às características mecânicas da fibroína de seda pura não foi possível mantê-la junto ao corte histológico devido ao desprendimento da mesma.

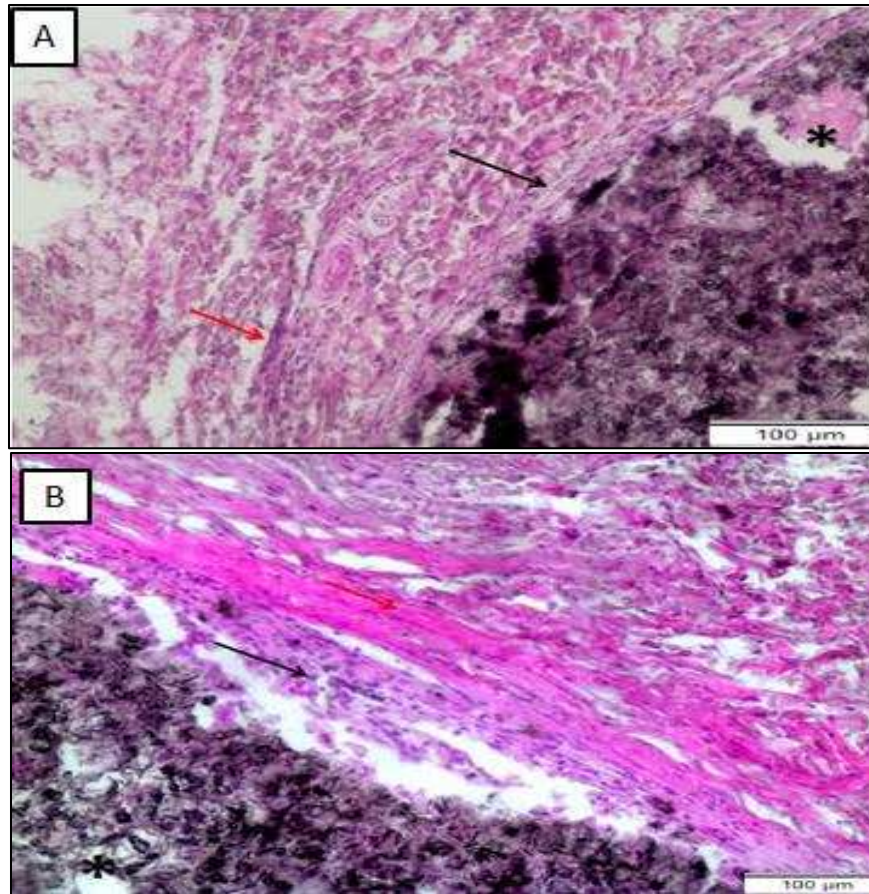
Os resultados apresentados nos dias 60 e 120 (conjunto de Figuras 20 e 21) foram semelhantes em todos os cortes histológicos para os dois compósitos e para a fibroína da seda. Não foi observada fragmentação do compósito. Foi observada a presença de organização tecidual sugerindo a formação de um tecido fibroso, com um discreto infiltrado inflamatório com células da linhagem monocítica também presente, ao redor dos dois compósitos e da FS pura representando a interação do compósito com o tecido.



**Figura 19** - Micrografia dos tecidos coletados após 30 dias de implantação dos compósitos e da fibroína de seda. A)compósito HAP+FS 0,5; B) compósito HAP+FS 2,5 e C) Fibroína de seda pura. Observar a presença de tecido conjuntivo frouxo associado a hiperemia peri capsular notadas em ambos os compósitos A e B(Setas vermelhas) acompanhadas de discreto infiltrado monocítico.Notar organização de capsula fibrosa envolvendo os 2 compósitos e o espaço ocupado (molde) da fibroína de seda em C(\*).



**Figura 20-** Micrografia dos tecidos coletados após 60 dias de implantação dos compósitos e fibroína de seda(\*). A)compósito HAP+FS 0,5; B) compósito HAP+FS 2,5 e C) Fibroína de seda pura. Notar organização de capsula fibrosa envolvendo os dois compósitos e a fibroína de seda(Setas pretas) e presença discreta de tecido conjuntivo frouxo com discreto infiltrado monocítico(Setas vermelhas)



**Figura 21-** Micrografia dos tecidos coletados após 120 dias de implantação dos compostos. A) composto HAP+FS 0,5; B) composto HAP+FS 2,5. Notar a presença do composto após 120 dias (\*). Presença de capsula organizada margeando o biomaterial (setas pretas) e presença discreta de infiltrado monocítico (Setas vermelhas).

A formação de cápsula fibrosa está relacionada a uma série de fatores como o tamanho, forma e textura do implante, bem como suas propriedades químicas, porosidade e local de implantação sendo, portanto uma resposta esperada dentro das características do biomaterial (Li *et al.*, 1999). Carlo *et al.* (2007), em um estudo de biocompatibilidade para os biomateriais hidroxiapatita e biovidro, observaram a presença de tecido conjuntivo fibroso adjacente à hidroxiapatita bem como uma reação proliferativa e não exsudativa, resultados esses semelhantes aos achados histológicos encontrados neste estudo durante a avaliação de 30, 60 e 120 dias

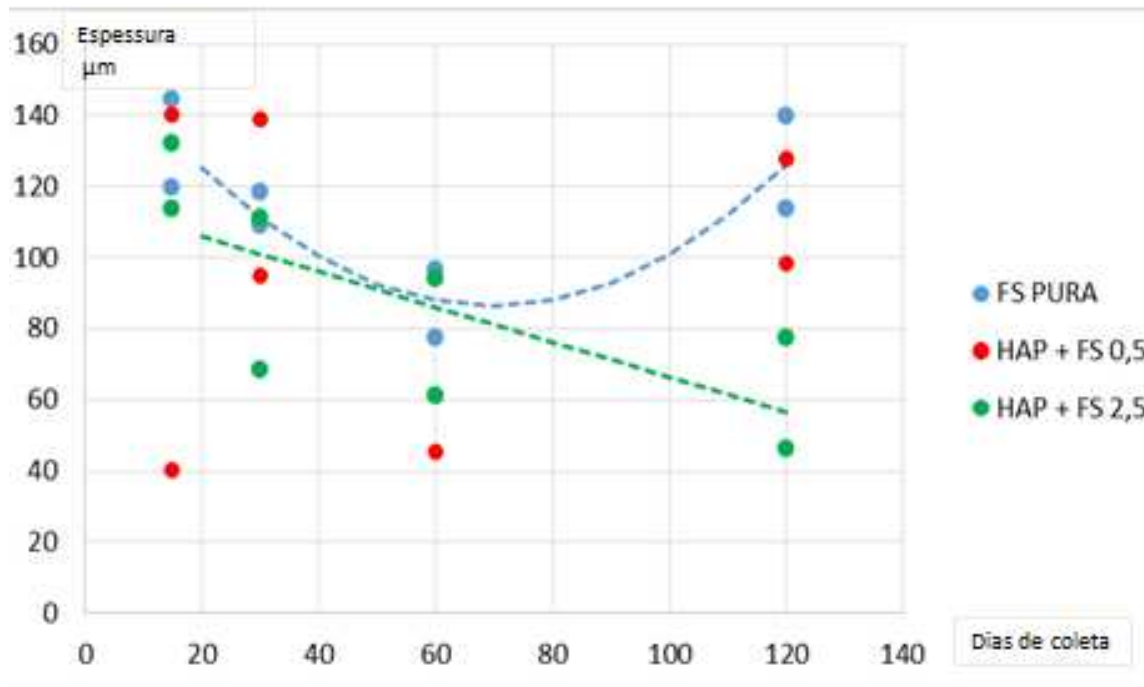
As fibras de seda têm sido utilizadas como suturas comercialmente disponíveis desde o final do século 19 e provaram ser biomateriais eficazes. Evidência de reações biológicas adversas, no entanto, levantaram preocupações sobre a biocompatibilidade. A sericina, uma proteína semelhante a uma cola que mantém as fibras de fibroína em conjunto, tem sido identificada como a fonte de reações imunogênicas (Panilaitis, 2003). Este achado corrobora a eficiência no preparo dos compósitos durante a extração da sericina da seda fornecida durante a confecção das placas do compósito, uma vez que o compósito testado em vivo não apresentou reações biológicas adversas indicando a ausência desta proteína no compósito testado.

Os estudos *in vitro* examinando a resposta de macrófagos para fibroína concluíram que a seda na forma de filme (Santin, 1999) ou forma de fibra (Panilaitis, 2003) não desencadearam nenhuma ativação significativa de macrófagos. No entanto, em sua forma particulada houve ativação dos macrófagos (Panilaitis, 2003), embora os autores especulassem que o tamanho das partículas fosse o motivo de tal achado. Neste estudo não foi possível observar a presença de células gigantes mesmo apresentando material em tamanho particulado de 0,5cm/0,5cm.

Em estudo promovido por Meinel, *et al.*, 2005 avaliando a resposta inflamatória *in vivo* de filmes de fibroína de seda em comparação a outros biomateriais como o colágeno, implantando os mesmos em tecido muscular de ratos observou uma resposta inflamatória branda sem sintomatologia clínica da presença da fibroína de seda no tecido, em comparação ao colágeno, com presença de encapsulamento fibroso organizado e ausência de células gigantes. Também notou em seu estudo que os filmes de fibroína de seda não apresentaram degradação no final de 42 dias de avaliação. Estes dados se assemelham aos achados histológicos encontrados neste estudo tanto pelas características histológicas e clínicas quanto pela integridade do biomaterial ao longo da avaliação durante os 120 dias, embora nenhum animal deste trabalho apresentou sinais clínicos de inflamação após sua implantação, possivelmente devido ao bom processamento de extração da sericina durante o processo de fabricação do biomaterial.

Visando comparar a resposta tecidual dos 3 biomateriais, as espessuras das capsulas fibrosas organizadas ao redor dos biomateriais foram mensuradas e

comparadas na busca por diferenças entre si durante os períodos , conforme demonstrado pela análise de regressão linear (Figura 22).



**Figura 22** Representação gráfica da espessura da cápsula fibrosa em função dos dias de coleta dos compósitos: HAP+FS 0,5 ; HAP+FS 2,5 e FS Pura.

A cápsula fibrosa produzida ao redor do biomaterial apresentou a mesma espessura para os diferentes materiais, independentemente do momento de coleta ( $p=0,174$ ) e não variou ao longo do tempo, independentemente do biomaterial, ou seja, em todos os grupos manteve-se, até a última análise, aos 120 dias, com espessura semelhante à observada já na primeira coleta, aos 30 dias ( $p=0,015$ ). Entretanto, a cápsula produzida ao redor da fibroína de seda ao longo do tempo mostrou uma relação quadrática ( $p=0,0376$ ), de acordo com a equação a seguir:

$$y = 0,0157x^2 - 2,1876x + 162,7042$$

Em que Y corresponde à espessura da cápsula em  $\mu\text{m}$  e X o tempo em dias.

A cápsula fibrosa formada em torno da hidroxiapatita associada a 0,5% de fibroína de seda não apresentou relação linear ( $p=0,9124$ ) ou quadrática ( $p=0,5720$ ) com o tempo. Porém, o biomaterial que continha 2,5% de fibroína de seda apresentou um comportamento linear, em que a espessura da cápsula diminuiu ao longo do tempo ( $p=0,0454$ ), conforme a equação a seguir:

$$y = - 0,4936x + 115,7820$$

em que Y corresponde à espessura da cápsula em  $\mu\text{m}$  e X o tempo em dias.

A partir do exposto disso avaliar com cautela os resultados, possivelmente devido a respostas individuais dos animais de cada grupo, uma vez que o tamanho da capsula fibrosa teve variação ao longo do tempo para o compósito HAP + FS 0,5 e FS pura, fato este que não desqualifica o material com não biocompatível, sendo necessário, portanto uma avaliação histológica com tempo maior .

Para o biomaterial HAP + FS 2,5 houve correlação entre o tempo percorrido entre as coletas com uma diminuição progressiva da espessura da capsula fibrosa, sinal esse que pode ser interpretado como uma tendência a organização tecidual ao redor do biomaterial característica essa desejável, indicando biocompatibilidade com menor reação tecidual ao longo do tempo.

## 5. CONCLUSÃO

Os compósitos HAP + FS 0,5 ,HAP + FS 2,5 apresentaram elevada cristalinidade, sendo identificadas as fases correspondentes à hidroxiapatita e fibroína da seda. Apresentaram também superfície complexa e porosa com grânulos de hidroxiapatita na superfície avaliada. Demonstraram biocompatibilidade *in vivo* incitando respostas toleráveis do organismo e não foram observados sinais de biodegradabilidade até os 120 dias de avaliação.

Os biomateriais avaliados apresentaram comportamento adequado *in vitro*, quando em contato as células, como pode ser observado pela ausência de citotoxicidade, além da adesão e proliferação celular na superfície e em torno das placas de hidroxiapatita e fibroína de seda. Os resultados indicam que o biomaterial apresentou características condizentes para aplicação como suporte para o crescimento celular na regeneração tecidual.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSBERG, E.; ANDERSON, K.W.; ALBEIRUTI, A.; ROWLEY, J.A.; MOONEY, D. Engineering growing tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 12025-12030, 2002.
- ALTMAN, G.H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R.L.; CHEN, J.LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D.L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, p. 401-416, 2003.
- ANDERSON, J.M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v. 20, p. 86-100, 2008.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v.21, p.667-681, 2000.
- AOKI, H. Science and medical applications of hydroxyapatite. **Ishiyaku Euroamerica**, 1991.
- ARMENTANO, I.; DOTTORI, M.; FORTUNATI, E.; MATTIOLI, S.; KENNY, J. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. **Polymer degradation and stability**, v. 95, p. 2126-2146, 2010.
- BAGAMBISA, F. B.; JOOS, U.; SCHILLI, W. The Interaction of Osteogenic Cells With Hydroxylapatite Implant Materials In Vitro and In Vivo. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 5, n. 3, 1990.
- BHUMIRATANA, S.; GRAYSON, W.; CASTANEDA, A.; ROCKWOOD, D.; GIL, E.S.; KAPLAN, D.L.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Nucleation and Growth of Mineralized Bone Matrix on Silk Hydroxyapatite Composite Scaffolds. **Biomaterials**, v. 32, p. 2812- 2820, 2011.
- BODIN, A.; BHARADAJ, S.; WU, S.; GATENHOLM, P.; Atala, A.; ZHANG, Y. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion. **Biomaterials**, v. 31, p. 8889-8901, 2010.
- BOER, F.C.; WIPPERMANN, B.W.; BLOKHUIS, F.J.; PATKA, P.; BAKKER, F.C; HAARMAN, H.J.T.M. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 ou autologous bone marrow. **Journal of Orthopaedic Research**, v.21, p. 521-528, 2003.
- BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NETO, P.I.N. Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 616-620, 2000.
- BURCHARDT, Hans. The biology of bone graft repair. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 174, p. 28-34, 1983.
- CARLO REIS, E.C.; BORGES, A.P.B.; OLIVEIRA, P.M.; BICALHO, S.M.C.M.; REIS, A.M.; SILVA, C.L. Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal. **Polímeros**, v. 22, p. 73- 79, 2012.
- CARLO, E. C., Borges, A. P. B., Del Carlo, R. J., Martinez, M. M. M., Oliveira, P. M., Morato, G. O. & Múcio Silva Reis, J. (2009). Comparison of in vivo properties of

- hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composites assessed for bone substitution. **Journal of Craniofacial.**
- CARLO, E. C., Borges, A. P. B., Pompermayer, L. G., Martinez, M. M. M., Eleotério, R. B., Nehme, R. C., & Morato, G. O. (2009). Composite for the fabrication of resorbable implants for osteosynthesis: biocompatibility evaluation in rabbits. **Ciência Rural**, 39(1), 135-140.
- CARLO, E.C.; BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. M. F.; MOREIRA, J. C. L.; FONSECA, C. C.; PONTES, K. C. S.; DUARTE, T. S. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. **Revista Ceres**, v.54, p.492-500, 2007.
- CARLO, E.C.; BORGES, A.P.B.; VARGAS, M.V.I.; MARTINEZ, M.M.; ELOTÉRIO, R.B.; DIAS, A.R.; RODRIGUES, M.C.D. Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% poli-hidroxibutirato para substituição óssea em coelho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 844- 852, 2009
- CHAN, B.P.; LEONG, K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. **European Spine Journal**, v. 17, p. 467-479, 2008.
- CHAO-GAN, Yan.; YU-FENG, Z. DPARSF: a MATLAB toolbox for “pipeline” data analysis of resting-state fMRI. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 4, 2010.
- CHEN, F.; ZHANG, M.; WU, Z. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, p. 6279-6308, 2010.
- CHIARINI, A.;PETRINI, P.; BOZZINI, S.; PRA, I.D.; ARMATO, U. Silk fibroin/poly (carbonate)-urethane as a substrate for cell growth: in vitro interactions with human cells. **Biomaterials**, v. 24, p. 789-799, 2003.
- CHUNG, H.; PARK, T. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59 p. 249-262, 2007
- CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J.M.; SOARES, G. D. A.Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, p. 136-140, 2005.
- CRAIGHEAD, H. G. et al. Chemical and topographical surface modification for control of central nervous system cell adhesion. **Biomedical Microdevices**, v. 1, n. 1, p. 49-64, 1998.
- CRAIGHEAD, H. G.; JAMES, C. D.; TURNER, A. M. P. Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. **Current opinion in solid state and materials science**, v. 5, n. 2, p. 177-184, 2001.
- CUNHA C., PANSERI, S., ANTONINI, S. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. **J Tissue Eng Regen Med**. 2011; 7(1): 50-9.
- DAL PRA, I.;PRETINI, P.;CHARINI, A.;BOZZINI, S.;FARE, S.;ARMATO, U. Silk fibroin-coated three-dimensional polyurethane scaffolds for tissue engineering: interactions with normal human fibroblasts.**Tissue engineering**, v. 9, p. 1113-1121, 2003.
- DEN BOER, F. C., WIPPERMANN, B. W., BLOKHUIS, T. J., PATKA, P., BAKKER, F. C., & HAARMAN, H. J. T. M. (2003). Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-i or autologous bone marrow. **Journal of Orthopaedic Research**, 21(3), 521-528.

- DHANDAYUTHAPANI, B.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, 2011.
- DUARTE, T. S., BORGES, A. P. B., LAVOR, M. S. L., FILGUEIRAS, R., TSIOMIS, A. C., OLIVEIRA, F. L., & PONTES, K. C. S. (2006). Osteointegration of synthetic hydroxyapatite in alveolar process of mandible in dogs: histological aspects. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58(5), 849-853.
- EDWARDS, J. T.; BRUNSKI, J. B.; HIGUCHI, H. W. Mechanical and morphologic investigation of the tensile strength of a bone-hydroxyapatite interface. **Journal of biomedical materials research**, v. 36, p. 454-468, 1997.
- ELBATAL, H. A.; AZOOZ, M.A.;KHALIL, E.M.A.;MONEM, A.S.;HAMDY, Y. M.Characterization of some bioglass-ceramics. **Materials Chemistry and Physics**, v. 80, p. 599-609, 2003.
- ELBATAL, H.A.; AZOOZ, M.A.; KHALI, E.M.A.; MONEM, A.S.; HAMDY, Y.M WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.E e LONGAKER, M.T. Craniofacial bone tissue engineering.**Dental Clinics of North America**, v. 50, p. 175-190, 2006.
- ELBERT, D.L.; PRATT, A.B.; LUTOLF, M.P.; HALSTENBERG, S.; HUBBELL, J.A. Protein delivery from materials formed by self-selective conjugate addition reactions. **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 11-25, 2001.
- FANG, Q.;CHEN, D.;YANG, Z;.LI, M. In vitro and in vivo research on using *Antheraea pernyi* silk fibroin as tissue engineering tendon scaffolds. **Materials Science and Engineering**, v.29, p. 1527-34,2009.
- FRANCO, K.L.; BORGES, A.P.B.; VILÓRIA, M.I.C.; FERNANDES, E.S.; FEHLBERG, A.F. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita sintética associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 431-436, 2001.
- FUJIBAYASHI, S., NEO, M., KIM, H. M., KOKUBO, T., & NAKAMURA, T. (2003). A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na<sub>2</sub>O–CaO–SiO<sub>2</sub> glasses. **Biomaterials**, 24(8), 1349-1356.
- FUJITA, R.; YOKOYAMA, A.; KAWASAKI, T.; KOHGO, T. Bone Augmentation Osteogenesis Using Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Blocks.**Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, p. 1045-1053, 2003.
- FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. **Journal of Materials ScienceMaterials in Medicine**, v. 3, p. 299-305, 1992.
- GE, Z.; YANG, Q.;XIANG, X.; LIU, K.Z. Assessment of silk fibroin for the repair of buccal mucosa in a rat model. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 41, p. 673-680, 2012.
- GHOLOUPOURMALEKABADI, M., MOZAFARI, M., NAZM, B.; M., HASHEMI-SOTEH, M.B.; Salimi, M. In vitro and in vivo evaluations of three-dimensional hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposite scaffolds.**Biotechnology and applied biochemistry**, v. 62, p. 441-450, 2015.

- HAKIMI, O.; KNIGHT, D.P.; VOLLRATH, F.; VADGAMA, P. Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials. **Composites: Part B**, v. 38, p. 324-337, 2007.
- HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**. v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
- HENCH, L.L. The challenge of orthopaedic materials. *Current orthopaedics*, v.14, p.7-15, 2000.
- HO, M.; WANG, H.; LAU, K. Effect of degumming time on silkworm silk fibre for biodegradable polymer composites. **Applied Surface Science**, v. 258, p. 3948-3955, 2012.
- HUANG, Z.M.; ZHANG, Y.Z.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, C.T. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. **Polymer**, v. 45, p. 5361-5368, 2004
- IGNÁCIO, H. Avaliação da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea. Estudo experimental em cães , 92 p. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina – USP. Ribeirão Preto, 1999.
- ISHIDA, M.A.; VOLKMER, T. Obtenção e estudo de síntese de biomaterial hidroxiapatita. **Salão de Iniciação Científica (15.: 2003: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2003.**, 2003.
- ISO, BSEN; STANDARD, BRITISH. Biological evaluation of medical devices. **Part**, v. 1, p. 10993-1, 2009.
- JIN, HJ, KAPLAN, DL. Mechanism of silk processing in insects and spiders. **Nature**, 2003;424:1057–61.
- KAPLAN, David; MCGRATH, Kevin. **Protein-based materials**. Springer Science & Business Media, 2012.
- KATO, N. **The succinate “Umami” inhibits the proliferation of cancer cells**. 2003-2012 - Hiroshima University. Disponível em: [www.hiroshima.ac.jp/en/top/research\\_HU/researchnow/no18](http://www.hiroshima.ac.jp/en/top/research_HU/researchnow/no18) . Acesso em 02 .Jul.2016.
- KAWACHI, E. Y., BERTRAN, C. A., REIS, R. R. D., & ALVES, O. L. (2000). Bioceramics: tendencies and perspectives of an interdisciplinary area. **Química Nova**, 23(4), 518-522.
- KELLOMAKI, M. & TORMALA, P. – **Method. Mol. Biol.**, 238, p.1 (2004).
- KHAN, Y.; YASZEMSKI, M.J.; MIKOS, A.G.; LAURENCIN, C.T. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. **The Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume**, v. 90, p. 36-42, 2008.
- KHETAN, S.; GUVENDIREN, M.; LEGANT, W.R.; COHEN, D.M.; CHEN, C.S.; BURDICK, J.A. Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels. **Nature materials**, v. 12, p. 458-465, 2013.
- KIM, J.; YANG, B.; AHN, J.; PARK, O.S.; SHIM, H. Comparable efficacy of silk fibroin with the collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects. **The Journal of Advanced Prosthodontics**, v. 6, p. 539-546, 2014.
- KIRSCHBAUER, Klaus Giovanelli. **Mineralização in vitro de matrizes colagênicas derivadas de tendões calcâneos bovinos e de avestruz**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

- KLEINMAN, H.K.; MCGARVEY, M.L.; HASSELL, J.R.; STAR, V.L.; CANNON, F.B.; LAURIE, G.W. Basement membrane complexes with biological activity. **Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 312-318, 1986.
- KO, J.S. YOON, K.; KI, C.S.; KIM, H.J.; BAE, D.G.; LEE, K.H.; PARK, Y.H.; UM, I.C. Effect of degumming condition on the solution properties and electrospinnability of regenerated silk solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 161-168, 2013.
- KOKUBO, T; KIM, H.M; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v.24, n.13, p. 2161-2175, 2003.
- KONG, X.D.; WANG, X. M.; CUI, F. Z. Preparation of Hydroxyapatite – Fibroin Nanocomposites. **Key Engineering Materials**, v. 228 – 289, p. 191 – 194, 2005.
- KUBOKI, Y.; TAKITA, H.; KOBAYASHI, D.; TSURUGA, E.; INOUE, M.; MURATA, M. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.39, p.190- 199, 1998.
- KUNDU, B.; RAJKHOWA, R.; KUNDU, S.C.; WANG, X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, p. 457-470, 2013.
- KUNDU, J.; DEWAN, M.; GHOSHAL, S. Mulberry non-engineered silk gland protein via a'-vis silk cocoon protein engineered by silkworms as biomaterial matrices. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, p. 2679-2689, 2008.
- LAX-PEREZ, A.; MESEGUER-OLMO, L. R.; VICENTE, V.; ALCARAZ-BANÔS, M.; ROS-NICOLAS, M. J. Respuesta ósea al implante de espuma de hidroxiapatita (HA-02). Estudio experimental en conejos. **Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología**, v. 49, p. 293-300, 2005.
- LEE, K.H.; BAEK, D.H.; KI, C.S.; PARK, Y.H. Preparation and characterization of wet spun silk fibroin/ poly(vinyl alcohol) blend filaments. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 168-172, 2007
- LI, D. J.; OHSAKI, K.; LI, K.; CUI, P. C.; YE, Q.; BABA, K.; TAKANO, Y.T. Thickness of fibrous capsule after implantation of hydroxyapatite in subcutaneous tissue in rats. **Journal of biomedical materials research**, v. 45, p. 322-326, 1999.
- MA, P.X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials today**, v. 7, p. 30-40, 2004.
- MACNEILL, S.R.; COBB, C.M. e RAPLEY, J.W. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 26, p. 239-245, 1999.
- MARTINEZ, S.A.; WALKER, T. Bone grafts. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29 p. 1207-1219, 1999.
- MATTHEWS, J.A.; WNEK, G.E.; SIMPSON, D.G.; BOWLIN, G.L. Electrospinning of collagen nanofibers. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 2, p. 232-238, 2002.
- MEINEL, L.; BETZ, O.; FAJARDO, R.; HOFMANN, S.; NAZARIAN, A.; CORY, E.; MERKLE, H. P. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. **Bone**, v. 39, p. 922-931, 2006.
- MEINEL, L.; HOFMANN, S.; KARAGEORGIU, V.; KIRKER-HEAD, C.; MCOOL, J.; GRONOWICS, G.; ZICHNER, L.; LANGER, R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v.26, p.147-155, 2005.

- MIN, B.M.; LEE, G.; KIM, S.H.; NAM, Y.S.; LEE, T.S.; PARK, W.H. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 25, p. 1289-1297, 2004.
- MONDAL, M. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn.,-a review. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v. 5, p. 63-76, 2007.
- MONDAL, M. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn.,-a review. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 63-76, 2007.
- MORAES, P. C.; PADILHA FILHO, J. G.; CANOLA, J. C.; SANTOS, L. A.; MARCORIS, D. G.; ALESSI, A. C.; CASTRO, M. B.; DÓRIA NETO, F. A. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, p. 351-359, 2004.
- MYGIND, T., STIEHLER, M., BAATRUP, A., LI, H., ZOU, X., FLYVBJERG, A. & BÜNGER, C. (2007). Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. **Biomaterials**, 28(6), 1036-1047.
- NAGAHARA, K.; ISOGAI, M.; SHIBATA, K. Osteogenesis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate used as a bone substitute. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 7, n. 1, 1992.
- NAGANO, A.; TANIOKA, Y.; SAKURAI, N.; SEZUTSU, H.; KUBOYAMA, N.; HIDEO, Regeneration of the femoral epicondyle on calcium-binding silk scaffolds developed using transgenic silk fibroin produced by transgenic silkworm. **Acta biomaterialia**, v. 7, p. 1192-1201, 2011.
- NAJJAR, T. A.; LERDRIT, W. e PARSONS, J. R. Enhanced osseointegration of hydroxyapatite implant material. **Oral Surgery Oral Medical Oral Pathology**, v. 71, n. 1, p. 9-15, 1991
- NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTANÕ, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v.5, p. 1137-1158, 2008.
- NEAL, R.A.; MCCLUGAGE, S.G.; LINK, M.C.; SEFCIK, L.S.; OGLE, R.C.; BOTCHWEY, E.A. Laminin nanofiber meshes that mimic morphological properties and bioactivity of basement membranes. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, p. 11-21, 2008.
- NOGUEIRA, G.; WESKA, R.; VIEIRA, W.; POLAKIEWICZ, B.; RODAS, A.; HIGA, O. A new method to prepare porous silk fibroin membranes suitable for tissue scaffolding applications. **Journal of applied polymer science**, v. 114, p. 617-623, 2009.
- OHKAWA, K.; CHA, D.; KIM, H.; NISHIDA, A.; YAMAMOTO, H. Electrospinning of chitosan. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 25, n. 18, p. 1600-1605, 2004.
- OKAMOTO, M. e JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1487-1503, 2013.
- ORÉFICE, R.L., *Materiais poliméricos-ciência e aplicações como biomateriais*; In: Orefice, R.L., Pereira, M.M., Mansur, H.S. *Biomateriais-Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro: **Cultura Médica**, p. 87-155, 2006.
- PANILAITIS, B.; ALTMAN, G.H.; CHEN, J.S.; JIN, H.J.; KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D.L. Macrophage responses to silk. **Biomaterials**, v. 24(18), p.3079-3085, 2003.

- PERDIGÃO, A.P. Compósito de hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido hialurônico em defeitos ósseos experimentais na ulna de coelhos.p.82.**Dissertação de mestrado** .Universidade Federal de Viçosa.2015.
- PERTILE, R.A.N. Estudo in vitro da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membrana de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos. 2007. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.
- PRECHEUR, H.V. Bone graft materials. **Dental Clinics of North America**, v. 51, n. 3, p. 729-746, 2007.
- RASBAND, W S. Bethesda, Maryland, USA,. **Image J**. 1997–2011
- REZENDE, C. M., BORGES, A. P., BERNIS, W. O., MELO, E. G., & NOBREGA NETO, P. I. (1998). Aspectos clínico-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, 50(5), 537-45.
- ROH, D.H.; KANG, S.Y.; KIM, J.Y.; KWON, Y.B.; HAE, Y.K.; LEE, K.G.; PARK, Y.H.; BAEK, R.M.; HEO, C.Y.; CHOE, J.; LEE, J.H.Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 547-552, 2006.
- ROHANIZADEH, R., LEGEROS, R. Z., WEISS, P., BOULER, J. M., & DACULSI, G. (1999). Ultrastructural study of interaction between Ca-P ceramic and polymer in a new injectable bone substitute (IBS). In **Bioceramics-conference-** (Vol. 12, pp. 433-436). Singapore; World Scientific; 1998.
- ROLIM, A. E. H. Avaliação de Esferas de Hidroxiapatita, dopados ou não com Estrôncio no reparo de defeito ósseo crítico, em calvário de rato.**Dissertação de mestrado**.Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2010.
- RUMPEL, E.; WOLF, .E.; KAUSCHKE, E.; BIENENGRBER, V.; BAYERLEIN, T.; GEDRANGE, T.; PROFF, P. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes *in vivo*. **Folia morphologica**, v. 65, p. 43-48, 2006.
- RUPPRECHT, S.; MERTEN, H.A.; KESSLER, P.; WILTFANG, J. Hydroxyapatite cement (BoneSource™) for repair of critical sized calvarian defects- an experimental study. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v.31, p. 149-153, 2003.
- SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J.T. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **Eur Cell Mater**, v. 5, p. 39-40, 2003.
- SAITOH, H.; OHSHIMA, K. I.; TSUBOUCHI, K.; TAKASU, Y.; Yamada, H. X-ray structural study of noncrystalline regenerated Bombyx mori silk fibroin. **International journal of biological macromolecules**, v. 34, p. 259-265, 2004.
- SANTIN, M.;MOTTA, A.;FREDDI, G.;CANNAS, M. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. **Journal of Biomedical Materials Research**,v. 46, p.382- 389,, 1999.
- SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. e MILAM, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **Journal Oral MaxillofacialSurgery**, v. 57, p. 1122-1126, 1999.
- SCIENTIFIC, J. Sigma Plot 2.01 for Windows. **Jandel Scientific, Core Madera, CA**, 1994.

- SELIKTAR, D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. **Science**, v. 336, p. 1124-1128, 2012.
- SHI, L.B.; CAI, H.X.; CHEN, L.K.; WU, Y.; ZHU, S.A.; GONG, X.N. Tissue engineered bulking agent with adipose-derived stem cells and silk fibroin microspheres for the treatment of intrinsic urethral sphincter deficiency. **Biomaterials**, v. 35, p. 1519-1530, 2014.
- SHIN, H.; JO, S.; MIKOS, A.G. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4353-4364, 2003.
- SILVA, E.C.; BORGES, A.P.B.; NEVES, C.D.; CARLO, E.C.; BARROS, R.E.; HAGE, M.C.F.N.S.; DE SOUZA, R.L.; BARUD, H.S.; BICALHO, S.M.C.M. Utilização experimental de hidroxiapatita sintética em alvéolos dentários de gatos domésticos (*Felis canis*): estudo clínico radiográfico e histomorfométrico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 873-880, 2012.
- SUGIHARA, A.; SUGIURA, K.; MORITA, H.; NINAGAWA, T.; TUBOUCHI, K.; TOBE, R.; IZUMIYA, M.; HORIO, T.; ABRAHAM, N.G.; IKEHARA, S. Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. **Experimental Biology and Medicine**, v. 225, n. 1, p. 58-64, 2000.
- Surgery**, 20(3), 853-859.
- TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, n. Suppl 3, p. S311-S324, 2009.
- TADJOEDIN, E. S.; LANGE, G. L.; BRONKER, A. L. J. J.; LAYARUU, D. M.; BURGER, E. H. Scanning electron microscopy (SEM) and microanalysis (EDS) applied to the study of biomaterial for dental use. **Minerva Stomatologica**, v. 44, p. 55-68, 2003.
- TAMPIERI, A.; CELLOTI, G.; SPRIO, S.; DELCOGLIANO, A.; FRANZESE, S. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. **Biomaterials**, v. 22, p. 1365-1370, 2001.
- TSURUGA, E.; TAKITA, H.; ITOH, H.; WAKISAKA, Y.; KUBOKI, Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP induced osteogenesis. **Journal of biochemistry**, v. 121, p. 317-24, 1997.
- UNGER, R.E.; WOLF, M.; PETERS, K.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C.; JAMES, K.C. Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, p. 1069-1075, 2004.
- UNGER, R.E.; WOLF, M.; PETERS, K.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C.; JAMES, K. C. Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, p. 1069-75, 2004.
- VACCARO, A.R.; SINGH, K.; HAID, R.; KITCHEL, S.; WUISMAN, P.; TAYLOR, W.; BRANCH, C.; GARFIN, S. The use of bioabsorbable implants in the spine. **The Spine Journal**, v. 3, p. 227-237, 2003.
- VARMA, H. K.; YOKOGAWA, Y.; ESPINOSA, F.F.; KAWAMOTO, Y.; NISHIZAWA, K.; NAGATA, F.; KAMEYAMA, T. In-vitro calcium phosphate growth over functionalized cotton fibers. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, n. 7, p. 395-400, 1999.
- VEPARI, C.; KAPLAN, D.L. Silk as a biomaterial. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 991-1007, 2007.
- VITAL, C.C.; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C.; TSIOMIS, A.C.; CARVALHO, T.B.; FONTES, E.B.; SENA, M.P.; FÓFANO, G. Biocompatibilidade e comportamento de

- compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p. 175-183, 2006.
- VON RECUM, Andreas F.; LABERGE, Martine. Educational goals for biomaterials science and engineering: prospective view. **Journal of applied biomaterials**, v. 6, n. 2, p. 137-144, 1995.
- WAN, Y., TU, C., YANG, J., BEI, J., & WANG, S. (2006). Influences of ammonia plasma treatment on modifying depth and degradation of poly (L-lactide) scaffolds. **Biomaterials**, 27(13), 2699-2704.
- WANG, X.; YUCEL T.; LU, Q.; HU, X.; KAPLAN, D.L. Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery. **Biomaterials**, v. 31, p. 1025–1035, 2009.
- WATAHA, J.C. Predicting clinical biological responses to dental materials. **Dental Materials**, v. 28, n. 1, p. 23-40, 2012.
- WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials**, Chester, England, March 3-5, 1986 (Vol. 4). Elsevier Science Limited .1987
- WU, S; LIU, X.; YEUNG, K.W.K.; LIU, C.; YANG, X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering R**, v. 80, p. 1-36, 2014.
- ZAMBONIN, G.; GRANO, M. Biomaterials in orthopedic surgery: effects of different hydroxyapatites and demineralized bone matrix on proliferation rate and bone matrix synthesis by human osteoblasts. **Biomaterials**, v. 16, n. 5, p. 397-402, 1995.
- ZHANG, Qiang; YAN, Shuqin; LI, Mingzhong. Silk fibroin based porous materials. **Materials**, v. 2, n. 4, p. 2276-2295, 2009.
- ZHANG, Ruiyun; MA, Peter X. Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures. **Journal of biomedical materials research**, v. 52, n. 2, p. 430-438, 2000.
- ZHOU, Y.S.; YANG, H.J.; LIU, X.; MAO, J.; GU, S.J.; XU, W.L. Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly (vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. **International journal of biological macromolecules**, v. 53, p. 88-92, 2013.