

MEMBRANAS BIOREABSORVÍVEIS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)
CARREGADAS COM METRONIDAZOL PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA

Marcio Aguiar Corrêa da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira
Thiré.

Marysilvia Ferreira da Costa

Rio de Janeiro
Novembro de 2014

Silva, Marcio Aguiar Corrêa da

Membranas Bioreabsorvíveis de Poli(3-hidroxibutirato)
Carregadas com Metronidazol para Regeneração Tecidual
Guiada / Marcio Aguiar Corrêa da Silva. – Rio de Janeiro:
UFRJ/COPPE, 2014.

XVIII, 118 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré
Marysilvia Ferreira da Costa.

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de
Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2014.

Referências Bibliográficas: p. 100-108.

1. Biopolímeros. 2. Liberação controlada de fármacos.
3. Modificação Química de fibras naturais. I. Thiré, Rossana
Mara da Silva Moreira *et al.* II. Universidade Federal do Rio
de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e
de Materiais. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A minha esposa por ser meu porto seguro e por me incentivar nos momentos mais difíceis.

Aos meus filhos pela paciência de dividir o pai com o doutorado.

Às Professoras Marysilvia Ferreira da Costa e Rossana Mara S. M. Thiré por terem me orientado e por toda ajuda.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À PHB Industrial S/A por ter cedido a matéria-prima principal desse trabalho.

À Acecil Central de Esterilização Com. Ind. Ltda pela esterilização das amostras para os testes de citotoxicidade.

A todos os Professores deste Departamento que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Professora Elena Mavropoulos Oliveira Tude, do CBPF, pelas análises de citotoxicidade.

À Professora Ana Paula Vieira Colombo, do Laboratório de Microbiologia Oral no CCS, pelas análises de atividade antimicrobiana.

Às amigas Renata Nunes Oliveira e Roberta Helena Mendonça que me apoiaram imensamente na hora mais difícil dessa caminhada.

Aos colegas do Laboratório de Biopolímeros pela parceria nos momentos sérios e de descontração.

Aos amigos que estiveram comigo durante o doutorado.

A todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para essa jornada.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

MEMBRANAS BIOREABSORVÍVEIS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)
CARREGADAS COM METRONIDAZOL PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA

Marcio Aguiar Corrêa da Silva

Novembro / 2014

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré
Marysilvia Ferreira da Costa

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A periodontite é a inflamação dos tecidos periodontais e leva à destruição dos tecidos que suportam os dentes. A técnica de Regeneração Tecidual Guiada (RTG) pode ser utilizada para a reconstrução do periodonto. Esta técnica utiliza membranas de barreira que evitam o crescimento epitelial no local da ferida. Membranas de RTG também podem ser usadas para liberar antibióticos, para proteger a ferida contra infecções oportunistas. Recentemente, o interesse em membranas biodegradáveis, como o poli (3-hidroxitirato) - PHB tem aumentado, pois evitam a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para remover a membrana. O metronidazol é um fármaco potencial para ser usado no controle de infecção. O objetivo deste trabalho foi produzir membranas bioabsorvíveis de PHB contendo metronidazol, visando sua aplicação no tratamento de doenças periodontais utilizando a técnica de RTG. Membranas de PHB, contendo 2% de fármaco e 20% de plastificante foram fabricadas por meio dos processos de evaporação de solvente e moldagem por compressão. Estas membranas foram analisadas por meio de ensaios de tração, microscopia óptica e microscopia de eletrônica de varredura, foram feitos testes de citotoxicidade e a quantificação do metronidazol foi feita por UV-Vis. Aproximadamente 70% da droga foram liberados dentro de trinta dias e que a difusão do fármaco foi fickiana. As membranas mantiveram sua integridade estrutural após a liberação da droga e foram citocompatíveis. Membranas PHB carregadas com metronidazol podem ser consideradas candidatas potenciais para utilização como membranas de RTG.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

BIORESORBABLE MEMBRANES OF POLY (3-HYDROXYBUTYRATE) LOADED
WITH METRONIDAZOLE FOR GUIDED TISSUE REGENERATION

Marcio Aguiar Corrêa da Silva

November / 2014

Advisors: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré
Marysilvia Ferreira da Costa

Department: Metallurgical and Materials Engineering

Periodontitis is the inflammation of the periodontal tissues and leads to destruction of the tissues that support the teeth. The technique of Guided Tissue Regeneration (GTR) can be used for the periodontium reconstruction. This technique uses the barrier membranes which prevent epithelial growth in the wound site. GTR membranes may also be used to release antibiotics, to protect the wound against opportunistic infections. Recently, interest in biodegradable membranes, such as poly (3-hydroxybutyrate) - PHB has increased because they avoid the need for a second surgical procedure to remove the membrane. Metronidazole is a potential drug to be used in controlling infection. The objective of this work was to produce bioabsorbable membrane PHB containing metronidazole, for their application in the treatment of periodontal diseases using the GTR technique. Membranes PHB containing 2% drug and 20% plasticizer were manufactured by using casting processes and compression molding. These membranes were analyzed by mechanical testing, microscopy (optical and scanning electron microscopy), cytotoxicity assays and quantitation of metronidazole was made by UV-Vis. Approximately 70% of the drug was released within thirty days and that the diffusion of the drug was Fickian. The membranes maintained their structural integrity after the release of the drug and were cytocompatible. PHB membranes loaded with metronidazole can be considered potential candidates for use as GTR membranes.

Sumário

Capítulo 1.....	1
1 Introdução.....	1
1.1 Objetivo.....	6
1.1.1 Objetivos específicos.....	6
Capítulo 2.....	7
2 Revisão da literatura.....	7
2.1 Aparelho estomatognático.....	7
2.2 Doença periodontal.....	9
2.2.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	15
2.3 Tratamento de doença periodontal.....	16
2.3.1 Regeneração Tecidual Guiada (RTG).	18
2.3.2 Poli(3-hidroxi-butirato).....	23
2.4 Liberação controlada de fármacos – PHB – metronidazol.....	30
Capítulo 3.....	34
3 Materiais e Métodos.....	34
3.1 Produção de membranas por evaporação de solvente.....	34
3.2 Moldagem por compressão.....	35
3.3 Difração de raios – X (DRX).....	36
3.4 Calorimetria Diferencial de Varredura.....	36
3.5 Análise Dinâmico-Mecânica (DMA).....	37
3.6 Microscopia.....	38
3.7 Construção da curva padrão do metronidazol.....	38
3.8 Lixiviação das membranas produzidas por moldagem por compressão.....	39
3.9 Liberação do fármaco metronidazol.....	39
3.9.1 Ensaio preliminares.....	40
3.9.2 Estudo da liberação de metronidazol em um período de 30 dias.....	40
3.9.3 Liberação do fármaco metronidazol em tempo real.....	41
3.9.4 Estudo do mecanismo de difusão.....	42
3.10 Propriedades mecânicas – ensaio de tração.....	43
3.11 Tratamentos estatísticos.....	44
3.12 Avaliação quanto à citotoxicidade.....	44

3.13	Análise de adesão celular por imunofluorescência.....	46
3.14	Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	48
Capítulo 4.....		50
4	Resultados e Discussão.....	50
4.1	Membranas produzidas por evaporação de solvente.....	50
4.1.1	Ensaio preliminares.....	50
4.1.2	Análise morfológica.....	52
4.1.3	Ensaio mecânico.....	53
4.1.4	Análise microestrutural.....	56
4.1.5	Análise térmica.....	59
4.1.6	Considerações preliminares.....	61
4.2	Membranas produzidas por moldagem por compressão.....	62
4.2.1	Análise morfológica.....	62
4.2.2	Ensaio mecânico.....	64
4.2.3	Análise microestrutural.....	67
4.3	Curva padrão do metronidazol.....	68
4.4	Lixiviação das membranas.....	70
4.5	Liberação do fármaco metronidazol.....	72
4.5.1	Ensaio de liberação de longo prazo.....	73
4.5.2	Avaliação da integridade estrutural da membrana.....	78
4.5.3	Ensaio de liberação em tempo real.....	80
4.6	Estudo do mecanismo de difusão da liberação controlada de metronidazol nas membranas produzidas por moldagem por compressão.....	82
4.7	Avaliação quanto à citotoxicidade.....	88
4.8	Análise de adesão celular por imunofluorescência.....	91
4.9	Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	93
Capítulo 5.....		96
5	Conclusão.....	96
6	Trabalhos Futuros.....	99
7	Bibliografia.....	100
8	Anexos.....	109
8.1	Anexo 1 – Tabelas relativas às análises de variância.....	109

Índice de Figuras

Figura 1 - Ossos que fazem parte do aparelho estomatognático (A) assim como os músculos que o compõem (B). Figura construída utilizando-se o programa <i>Zygot Body Browser</i> ®.....	8
Figura 2 - Estruturas dentárias normais. 1-Coroa, 2-Raiz, 3-Esmalte, 4-Dentina, 5-Polpa, 6-Sulco Gengival, 7-Epitélio, 8-Conjuntivo, 9-Cemento, 10-Ligamento Periodontal, 11-Osso alveolar.....	10
Figura 3 - Esquema demonstrando como ocorre o processo de colonização dos microorganismos que farão parte do biofilme dental com a película adquirida (A) e camada de hidratação (B). Diagrama baseado em conceitos descritos por KOLENBRANDER e LONDON, (1993) e THYLSTRUP e FEJERSKOV, (1995)	12
Figura 4 - Perda óssea generalizada.	15
Figura 5 - Perda óssea angular.....	15
Figura 6 - Fontes doadoras de células para reparar a lesão.	19
Figura 7 - Epitélio juncional longo (seta).	20
Figura 8 - Colocação da membrana (em destaque) entre o tecido conjuntivo e o osso.	21
Figura 9 - Representação esquemática mostrando bactérias com grânulos de PHB em seu interior. Adaptado de (SCHUT, 2008).....	23
Figura 10 - Estruturas químicas de um poli-hidroxicanoato (genérico) (a) e do poli(3-hidroxicanoato) (b).....	24
Figura 11 – Estrutura química da acetilcoenzima A.	30
Figura 12 - Estrutura química do metronidazol (MTZ).....	32
Figura 13 - Gráfico mostrando os perfis de liberação de membranas produzidas por evaporação de solvente.....	51
Figura 14- Imagens de microscopia óptica da superfície externa (em contato com o ar) das membranas obtidas por evaporação de solvente (a) M0P0 ^{ES} , (b) M0P20 ^{ES} , (c) M2P0 ^{ES} e (d) M2P20 ^{ES} (100X).....	52
Figura 15 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície externa (em contato com o ar) das membranas obtidas por evaporação de solvente. (a) M0P0 ^{ES} , (b) M0P20 ^{ES} , (c) M2P0 ^{ES} e (d) M2P20 ^{ES}	53
Figura 16 - Curvas Tensão X Deformação obtidas nos ensaios de tração. As curvas mostram a diferença nas médias das propriedades mecânicas dos corpos de prova com e sem o plastificante citrato de etila.....	54

Figura 17 – (A) Difractogramas das amostras produzidas por evaporação do solvente e as alterações produzidas pela adição do MTZ e do citrato de etila ao PHB. (B) Difractograma do fármaco metronidazol.	57
Figura 18 – Curvas de calorimetria diferencial de varredura (2 ^o . Aquecimento) mostrando membranas obtidas por evaporação de solvente (a) M0P0 ^{ES} , (b) M2P0 ^{ES} , (c) M0P20 ^{ES} e (d) M2P20 ^{ES}	60
Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície externa das membranas M2P20 ^{ES} e da M2P20 ^{MC} (1000X)	63
Figura 20 - Foto feita por microscopia eletrônica de varredura mostrando a face de fratura de uma membrana M2P20MC. No detalhe cristais de MTZ.....	63
Figura 21 - imagens de microscopia óptica de membranas produzidas por moldagem por compressão - M2P20 ^{MC} (a) e por evaporação de solvente - M2P20 ^{ES} (b) (100X) .	64
Figura 22 - Curva Tensão X Deformação obtida no ensaio de tração. Diferenças do comportamento mecânico entre M2P20 ^{ES} e M2P20 ^{MC}	65
Figura 23 – (A) Difractogramas das amostras M2P20 ^{ES} e M2P20 ^{MC} e (B) Detalhe de A.	67
Figura 24 - Espectro Uv-Vis (200-800 nm) para o fármaco metronidazol em meio tampão acetato de potássio a pH 5,0 e tampão PBS a pH 7,4.....	68
Figura 25- Curva padrão associando a concentração do fármaco no meio com a absorvância dada pelo espectrofotômetro em comprimento de onda 320 nm para os meios PBS pH7,4 e acetato pH5,0.....	69
Figura 26 - Micrografia por microscopia óptica em corpos de prova antes do processo de lixiviação. (a) Superfície do corpo de prova não lixiviado M2P20 ^{MC} e (b) superfície do corpo de prova após o processo de lixiviação M2P20 ^{MC} _L	71
Figura 27 - Gráfico mostrando a diferença do perfil de liberação das membranas M2P20 ^{MC} e M2P20 ^{MC} _L em meio tampão PBS pH 7,4 e meio tampão acetato de potássio pH 5,0. No detalhe é possível ver a mesma curva nos primeiros 2 dias de ensaio.....	73
Figura 28 - Gráfico mostrando a curva de liberação das membranas M2P20 ^{MC} e M2P20 ^{MC} _L em meio tampão PBS pH 7,4 e meio tampão acetato de potássio pH 5,0. No gráfico “a” o agrupamento foi feito pelo meio e no gráfico “b” foi feito pelo processo de lixiviação.	75
Figura 29 - Gráfico exibindo o fluxo de liberação de fármaco pelas membranas e a comparação com a MIC do metronidazol contra <i>P. gingivalis</i> . No detalhe as mesmas curvas em uma escala diferente.	76
Figura 30 - Ensaio de tração de membranas antes e após o ensaio de liberação.....	79

Figura 31 - Liberação de fármaco em tempo real das amostras lixiviadas (M2P20 ^{MC_L}) e não-lixiviadas (M2P20 ^{MC}).....	80
Figura 32 - Liberação em tempo real de membranas M2P20 ^{MC} e M2P20 ^{MC_L} comparadas com a MIC do metronidazol contra <i>P. gingivalis</i>	82
Figura 33 - Curva da liberação de fármaco traçada segundo a equação de Higuchi para as membranas M2P20 lixiviadas em meio (a) PBS e em meio (b) acetato e também para as não lixiviadas em meio (c) PBS e (d) acetato.	84
Figura 34 - Curva da liberação de fármaco traçada segundo a equação de Korsmeyer-Peppas para as membranas M2P20 lixiviadas em meio (a) PBS e em meio (b) acetato e também para as não lixiviadas em meio (c) PBS e (d) acetato.	86
Figura 35 - Ensaio de citotoxicidade e proliferação celular pelos métodos XTT, vermelho neutro (VN) e eluição do corante cristal violeta (CVDE). Controle positivo (C+): dodecil sulfato de sódio a 1%; Controle negativo (C-): meio de cultura puro (α -MEM).....	88
Figura 36 - Fotomicrografias de fluorescência de células MC3T3 aderidas em lamínulas de vidro. a e b) controle (lamínula recoberta com fibronectina), c) M0P0 ^{MC_L} , d) M0P20 ^{MC_L} , e) M2P0 ^{MC_L} , f) M2P20 ^{MC_L}	92
Figura 37 - Teste de sensibilidade a antimicrobianos (disco - difusão) mostrando (a) halo de inibição a volta dos discos de M2P20 ^{MC_L} e (b) discos de controle contendo apenas a matriz polimérica (M0P0 ^{MC}).	93
Figura 38 - Teste de sensibilidade a antimicrobianos (macrodiluição) mostrando (a) limpeza nos tubos contendo metronidazol e (b) tubos controle contendo discos com apenas a matriz polimérica (M0P0 ^{MC})	94

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Lista de membranas comercialmente disponíveis para RTG. Adaptada de (Bottino, Thomas, <i>et al.</i> , 2012).....	22
Tabela 2 - Propriedades do poli(3-hidroxi-butirato) (Misra, Valappil e Roy, 2006).	26
Tabela 3 - Cristalinidade das diferentes composições de membranas produzidas.....	58
Tabela 4 - Comparação entre cristalinidade das amostras obtida por DRX e DSC.	61
Tabela 5 - Resultados da análise dinâmico - mecânica realizado nas membranas produzidas por moldagem por compressão mostrando os valores obtidos para G' e G'' (em 37°C) e T_g	66
Tabela 6 – Análises de variância entre das taxas de liberação entre os grupos lixiviado e não lixiviado.	78
Tabela 7 – Valores de K obtidos pela equação de Higuchi para as amostras lixiviadas e não lixiviadas em tampão PBS e tampão acetato.	84
Tabela 8 – Valores de n obtidos pela equação de Korsmeyer-Peppas para as amostras lixiviadas e não lixiviadas em tampão PBS e tampão acetato.	86
Tabela 9 - Tabela mostrando os resultados das análises de variância comparando os grupos estudados com o controle negativo para o XTT.	89
Tabela 10 - Tabela mostrando os resultados das análises de variância comparando os grupos estudados com o controle negativo para o VN.	89
Tabela 11 - Tabela mostrando os resultados das análises de variância comparando os grupos estudados com o controle negativo para o CVDE.	90
Tabela 12 - Análise de variância (tabela ANOVA) e teste de Tukey da alteração dos valores de módulo secante. O fator considerado nessa análise foi a adição de plastificante à matriz de PHB.	109
Tabela 13 - Análise de variância (tabela ANOVA) e teste de Tukey da alteração dos valores da temperatura de transição vítrea (T_g). Os fatores considerados nessa análise foram a adição de plastificante e de metronidazol à matriz de PHB.....	109
Tabela 14 - Análise de variância (tabela ANOVA) e teste de Tukey da alteração dos valores de módulo de cisalhamento (G'). Os fatores considerados nessa análise foram a adição de plastificante e de metronidazol à matriz de PHB.....	110
Tabela 15 - Análise de variância (tabela ANOVA) e teste de Tukey da alteração dos valores de módulo de perda (G''). Os fatores considerados nessa análise foram a adição de plastificante e de metronidazol à matriz de PHB.....	111

Tabela 16 - Análise de variância (tabela ANOVA) e teste de Tukey mostrando a diferença entre as quantidades liberadas na primeira hora. O fator considerado nessa análise foi o processo de lixiviação.	111
Tabela 17 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 18 h.....	112
Tabela 18 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 23,5 h.....	112
Tabela 19 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 45 h.....	113
Tabela 20 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 90,3 h.....	113
Tabela 21 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 163 h.....	113
Tabela 22 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 215,3 h.....	114
Tabela 23 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 381,9 h.....	114
Tabela 24 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 526,7 h.....	114
Tabela 25 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P0 com o controle negativo para o XTT.....	115
Tabela 26 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P0 com o controle negativo para o XTT.....	115
Tabela 27 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P20 com o controle negativo para o XTT.....	115
Tabela 28 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P20 com o controle negativo para o XTT.....	116
Tabela 29 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P0 com o controle negativo para o VN.....	116
Tabela 30 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P0 com o controle negativo para o VN.....	116
Tabela 31 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P20 com o controle negativo para o VN.....	117
Tabela 32 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P20 com o controle negativo para o VN.....	117
Tabela 33 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P0 com o controle negativo para o CVDE.....	117

Tabela 34 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P0 com o controle negativo para o CVDE.....	118
Tabela 35 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P20 com o controle negativo para o CVDE.....	118
Tabela 36 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P20 com o controle negativo para o CVDE.....	118

Lista de Siglas e Abreviações

α -MEM	Meio de cultura <i>essencial mínimo</i> .
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A.
ATM	Articulação temporomandibular.
CVDE	Eluição do cristal violeta - Método para avaliar a citotoxicidade segundo o método proliferação celular.
DMA	Análise dinâmico – mecânica.
DRX	Análise de difração de raios X.
DSC	Calorimetria diferencial de varredura.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G'	Módulo de armazenamento.
G''	Módulo de perda.
GH	Hormônio do crescimento.
hrGH	Hormônio do crescimento recombinante.
ICDD	International Centre for Diffraction Data
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
MC3T3-E1	Linhagem de célula osteoblástica de rato. Usada para pesquisa.
MOP0 ^{ES}	Membrana de poli(3-hidroxiбутирато), sem aditivos, confeccionada pelo processo de evaporação de solvente.

M2P0 ^{ES}	Membrana de poli(3-hidroxi-butirato), contendo 2% do fármaco metronidazol, confeccionada pelo processo de evaporação de solvente.
M0P20 ^{ES}	Membrana de poli(3-hidroxi-butirato), contendo 20% do plastificante citrato de etila, confeccionada pelo processo de evaporação de solvente.
M2P20 ^{ES}	Membrana de poli(3-hidroxi-butirato), contendo 2% do fármaco metronidazol e 20% do plastificante citrato de etila, confeccionada pelo processo de evaporação de solvente.
M0P0 ^{MC}	Membrana de poli(3-hidroxi-butirato), sem aditivos, confeccionada pelo processo de moldagem por compressão.
M2P0 ^{MC}	Membrana de poli(3-hidroxi-butirato), contendo 2% do fármaco metronidazol, confeccionada pelo processo de moldagem por compressão.
M0P20 ^{MC}	Membrana de poli(3-hidroxi-butirato), contendo 20% do plastificante citrato de etila, confeccionada pelo processo de moldagem por compressão.
M2P20 ^{MC}	Membrana de poli(3-hidroxi-butirato), contendo 2% do fármaco metronidazol e 20% do plastificante citrato de etila, confeccionada pelo processo de moldagem por compressão.
M0P0 ^{MC} _L	Membrana de poli(3-hidroxi-butirato), sem aditivos, confeccionada pelo processo de moldagem por compressão após ser submetida ao processo de lixiviação.

M2P0 ^{MC} _L	Membrana de poli(3-hidroxi- <i>butirato</i>), contendo 2% do fármaco metronidazol, confeccionada pelo processo de moldagem por compressão após ser submetida ao processo de lixiviação.
M0P20 ^{MC} _L	Membrana de poli(3-hidroxi- <i>butirato</i>), contendo 20% do plastificante citrato de etila, confeccionada pelo processo de moldagem por compressão após ser submetida ao processo de lixiviação.
M2P20 ^{MC} _L	Membrana de poli(3-hidroxi- <i>butirato</i>), contendo 2% do fármaco metronidazol e 20% do plastificante citrato de etila, confeccionada pelo processo de moldagem por compressão após ser submetida ao processo de lixiviação.
MEV	Microscopia eletrônica de varredura.
MIC	Concentração mínima inibitória.
MTZ	Metronidazol.
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio.
P. A.	Para análise.
PBS	Solução tampão fosfato.
PCL	Poli (caprolactona).
PGA	Poli (ácido glicólico).
PHA	Poli - hidroxi- <i>alcanoato</i> .
PHB	Poli (3-hidroxi- <i>butirato</i>).
PHBV	poli (3-hidroxi- <i>butirato-co-3-hidroxi-<i>valerato</i></i>)

PLA	Poli (ácido láctico).
PTFE	Politetrafluoretileno.
RTG	Regeneração tecidual guiada.
SBF	Soro fetal bovino.
SDS	Dodecil sulfato de sódio. Detergente aniônico.
Tg	Temperatura de transição vítrea.
Tm	Temperatura de fusão cristalina.
UFC	Unidade formadora de colônias.
Uv-Vis	Espectrofotometria no espectro ultra violeta – visível (200-800 nm).
VN	Vermelho Neutro - Método para avaliar a citotoxicidade segundo o parâmetro integridade da membrana plasmática.
Xc	Grau de cristalinidade.
XTT	<i>2,3-bis (2-metil-4-nitro-5-sulfofenil) – 5 – [(fenilamino) carbonil] – 2H – hidróxido de tetrazólio</i> - Método para avaliar a citotoxicidade segundo o parâmetro respiração celular.

Capítulo 1

1 Introdução

A periodontite é a inflamação dos tecidos periodontais (gengiva e osso) que dão suporte ao dente. É o tipo de inflamação mais comum encontrada em seres humanos (FA-MING CHEN E YAN JIN, 2010). Dados do “National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health” indicam que 86% dos adultos nos Estados Unidos em 2005 com idade superior a 70 anos têm pelo menos um quadro de periodontite moderada, sendo que, em pelo menos 25% desses casos, há perda de elementos dentários (ZHANG, FONG, *et al.*, 2007 ; BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012 ; CHEN E SHI, 2014 ; CHEN E YAN, 2010). Dados epidemiológicos coletados no Brasil em 2005 mostram que a periodontite, em diferentes graus, atinge 91,4% da população brasileira. Também foi possível constatar nesse estudo que a periodontite afeta igualmente indivíduos independentemente da condição socioeconômica destes (CHAMBRONE, LIMA E CHAMBRONE, 2006).

À medida que a doença periodontal progride, se não houver remoção dos agentes etiológicos do local, no caso o biofilme bucal e o cálculo dentário formado pela mineralização desse (tártaro), começa a haver reabsorção óssea e o aparecimento de uma estrutura patológica conhecida como bolsa periodontal (DUARTE, 2009). Devido à reabsorção óssea há um aprofundamento patológico do sulco periodontal. Em um sulco periodontal saudável, a profundidade de sondagem varia de 1 a 3 mm, enquanto que em uma bolsa periodontal essa profundidade passa de 5 mm e em casos mais

avançados chega a 12 mm. A presença desse novo componente exacerba os danos pela entrada de mais agentes irritantes no sulco gengival (FRIEDMAN E GOLOMB, 1982 ; LISTGARTEN, 1986 ; MEDLICOTT, RATHBONE, *et al.*, 1994 ; BRUSCHI, PANZERI, *et al.*, 2006). Esse estágio da doença periodontal é conhecido como periodontite. A bolsa periodontal é uma estrutura importante na doença, pois ela permite a retenção mecânica de patógenos e a proliferação bacteriana (COSTERTON, STEWART E GREENBE, 1999).

A bactéria *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria gram-negativa anaeróbia, e também um importante agente etiológico da doença periodontal. A proliferação deste micro-organismo causa lesão nos tecidos por meio de fatores de virulência como as proteinases que são produzidas por ele. Fatores de virulência, por definição, são aqueles que têm a capacidade de causar doença, ou interferir com a função metabólica ou fisiológica do organismo hospedeiro (HOLT E EBERSOLE, 2005). A *P. gingivalis* também atua na desregulação dos sistemas imune e inflamatório desse organismo (BOSTANCI, THURNHEER E BELIBASAKIS, 2011).

Diferentes estratégias são utilizadas no tratamento da doença periodontal visando reduzir e/ou eliminar os efeitos causados pelo biofilme nos tecidos periodontais e promover a regeneração desses. O tratamento é baseado na remoção dos agentes etiológicos (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012 ; DUARTE, 2009 ; SCULEAN, NIKOLIDAKIS E SCHWARZ, 2008).

A técnica de Regeneração Tecidual Guiada (RTG) envolve a colocação de uma membrana de barreira entre o dente e o tecido conjuntivo gengival, a fim de evitar o crescimento epitelial para o local da ferida, permitindo assim a formação de estruturas funcionais. Este tratamento pode ser utilizado para a reconstrução do periodonto, (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012 ; BOSTANCI, THURNHEER E BELIBASAKIS, 2011 ; COSTERTON, STEWART E GREENBE, 1999 ; DUARTE, 2009 ; SCULEAN, NIKOLIDAKIS E SCHWARZ, 2008 ; REIS, BORGES, *et al.*, 2013 ; MAGINI, 2009).

Existem dois tipos de membranas aplicadas a RTG: as bioabsorvíveis e as não absorvíveis. As principais membranas não absorvíveis para a aplicação em RTG são o politetrafluoretileno de alta densidade (PTFE) (Cytoplast®TXT-200, Osteogenics Biomedical, Lubbock, TX, USA), o politetrafluoretileno de alta densidade reforçado com titânio (e.g., Cytoplast® Ti-250, Osteogenics Biomedical, Lubbock, TX, USA) e poliésteres (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012). No entanto, estas membranas requerem um segundo procedimento cirúrgico para a sua remoção, o que traz desconforto para o paciente e aumenta a possibilidade de infecção (PONTORIERO, LINDHE, *et al.*, 1989). Por outro lado, elas mantêm a sua integridade estrutural inalterada ao longo de todo o tratamento.

Para eliminar a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico, membranas de barreira bioabsorvíveis têm sido desenvolvidas (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012) (CRUMP, RIVERA-HIDALGO, *et al.*, 1996) (MIRON, SAULACIC, *et al.*, 2013). Elas apresentam resultados muito semelhantes às não absorvíveis em testes *in vivo*, sem que haja a necessidade de uma segunda cirurgia (BAEK E KIM, 2001).

A maior parte das membranas reabsorvíveis para regeneração periodontal no mercado é fabricada com poliésteres (por exemplo, poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA), poli (caprolactona) (PCL), e seus copolímeros), que são biocompatíveis, biodegradáveis, e fácil de manusear (cl clinicamente) em comparação com as membranas de PTFE, por exemplo. As membranas comerciais podem também ser produzidas com o colágeno, que apresenta propriedades mecânicas desfavoráveis, mas apresentam uma excelente integração com o tecido (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012).

Entre os polímeros biocompatíveis, há o poli(3-hidroxiбутирато) - PHB, que é um poliéster microbiano biodegradável e compatível com uma ampla variedade de células animais tais como, fibroblastos, hepatócitos e células endoteliais fibroblastos (SHISHATSKAYA, VOINOVA, *et al.*, 2008). Este polímero já vem sendo estudado em

diversas aplicações na área biomédica como suturas, válvulas cardíacas, veículo para liberação controlada de fármacos, marizes para engenharia tecidual etc. Testes *in vivo* e *in vitro* já mostram sucessos nestas aplicações.

O metronidazol, um fármaco antiprotozoário e antimicrobiano, é utilizado no tratamento de lesões periodontais, possibilitando um resultado mais satisfatório do que o tratamento mecânico exclusivo. Agindo como agente anti-infeccioso, este fármaco promove uma recuperação dos pacientes mais rápida quando em comparação com tratamentos que não envolvem associação com antimicrobianos (GRIFFITHS, SMART, *et al.*, 2000 ; ALBANDAR, 2013).

AHERN *et al.* (2014) avaliaram a susceptibilidade microbiana ao metronidazol dos micro-organismos isolados de 50 pacientes com periodontite crônica ou agressiva. Neste estudo verificaram a eficiência do metronidazol contra bactérias anaeróbias gram-negativas, tais como *Porphyromonas sp*, *Fusobacterium sp* e *Prevotella sp*, que desempenham um papel importante na patogênese da periodontite (AHERN, SCHWEITZER, *et al.*, 2014).

Como o metronidazol pode ser utilizado em sistemas de liberação de fármacos (SUNDARARAJ, THOMAS, *et al.*, 2013), a adição deste fármaco na fabricação de membranas bioabsorvíveis poderia torná-las mais adequadas para a aplicação em RTG (TATAKIS, PROMSUDTHI E WIKESJÖ, 1999).

Alguns polímeros biodegradáveis, tais como o PHB, podem ser usados como matrizes de membranas para a liberação de fármacos (BONARTSEV, BONARTSEVA, *et al.*, 2006 ; POUTON E AKHTAR, 1996 ; CHOI E PARK, 2004). Esse polímero, que é um poliéster microbiano biodegradável, compatível com uma ampla variedade de células animais (SCULEAN, NIKOLIDAKIS E SCHWARZ, 2008 ; FERNANDES, CORREIA, *et al.*, 2014). PHB é um material potencial para a fabricação de membranas RTG (SHISHATSKAYA E VOLOVA, 2004). No entanto estudos relacionados ao comportamento de membranas de PHB carregadas com metronidazol não foram

encontrados na literatura. Sendo assim, no presente trabalho, as membranas periodontais de PHB carregadas com metronidazol foram produzidas. A cinética de liberação do metronidazol foi estudada para membranas lixiviadas e não-lixiviadas. O processo de lixiviação foi realizado para remover os cristais de fármaco adsorvidos na superfície da membrana. A microestrutura das membranas, propriedades mecânicas e propriedades biológicas em ensaios *in vitro* também foram investigadas.

O fármaco foi incorporado com sucesso às membranas, liberado no meio, avaliado e a cinética de liberação das amostras que sofreram lixiviação foi descrita como difusão fickiana. As membranas apresentaram elevadas propriedades mecânicas mesmo após imersão em soluções tampão. Elas foram capazes de inibir a proliferação da bactéria *Pophyromonas gingivalis* e provaram-se não citotóxicas.

1.1 Objetivo

O presente trabalho teve por objetivo a produção de membranas de barreira bioreabsorvíveis com capacidade para liberação de fármaco para o tratamento da doença periodontal - utilizando o biopolímero poli(3-hidroxi-butilato) carregado com o fármaco metronidazol - com potencial aplicação em regeneração tecidual, aplicáveis à correção de defeitos periodontais angulares por meio da utilização dessas em cirurgias periodontais.

1.1.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Avaliação dos métodos de produção das membranas de PHB / metronidazol.
- Caracterização microestrutural e avaliação das propriedades mecânicas das membranas produzidas.
- Análise da cinética da liberação do fármaco metronidazol em solução tampão fosfato salino PBS pH 7,4 e solução tampão acetato de potássio pH 5,0.
- Avaliação da citotoxicidade e da atividade antimicrobiana das membranas por meio de testes biológicos *in vitro*

Capítulo 2

2 Revisão da literatura

2.1 Aparelho estomatognático

O aparelho estomatognático é uma entidade fisiológica, funcional, perfeitamente definida e integrada por um conjunto heterogêneo de órgãos e tecidos, cuja biologia e fisiopatologia são absolutamente interdependentes, envolvidos nos atos funcionais como fonética, mastigação e deglutição dos alimentos, e nos hábitos para-funcionais como apertamento dentário e bruxismo (MACEDO, 2007). Seus componentes anatômicos são: os ossos fixos da cabeça e do pescoço, a mandíbula, o hioide, as clavículas e o esterno, os músculos da mastigação, deglutição, expressão facial e posteriores do pescoço, as articulações dento-alveolar (periodonto) e temporomandibular (ATM) e seus ligamentos, os sistemas vascular e nervoso, os dentes, a língua, os lábios, as bochechas e as glândulas salivares. (FERNANDES NETO E ALFREDO JÚLIO, 2006). A Figura 1 mostra uma representação esquemática dos ossos e dos músculos que compõem o aparelho estomatognático.

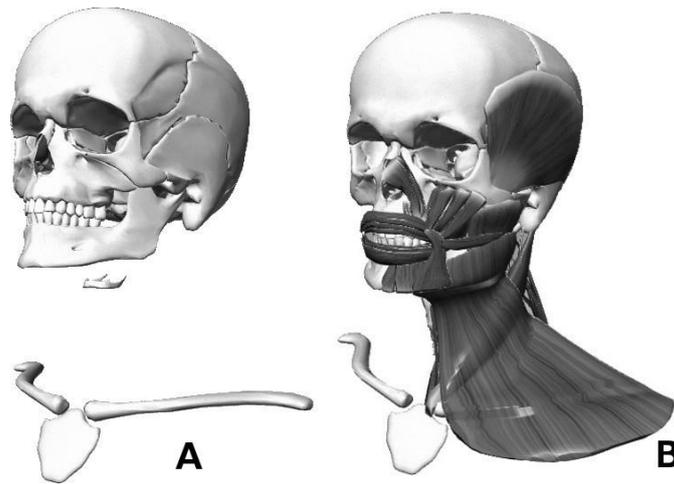


Figura 1 - Ossos que fazem parte do aparelho estomatognático (A) assim como os músculos que o compõem (B). Figura construída utilizando-se o programa *Zygote Body Browser*®.

A boca, como parte do sistema digestório, tem influência direta sobre todo o corpo humano. A mastigação, primeira etapa desse processo, que pode ser descrita como um padrão rítmico de movimentos mandibulares onde o alimento é triturado entre as faces oclusais dos dentes, está intimamente ligada a uma boa digestão bem como a um bom estado de saúde (PEREIRA, DUARTE E VAN DER BILT, 2006). Uma vez que os alimentos são previamente triturados durante a mastigação, eles estão prontos para sofrer a ação das enzimas na etapa seguinte da digestão (HIEMAE, HEATH, *et al.*, 1996) (JULIEN, BUSCHANG, *et al.*, 1996) (VAN DER BILT, ENGELEN, *et al.*, 2006).

Para que haja uma mastigação satisfatória é necessário que os dentes estejam em bom posicionamento em suas arcadas e em boas condições quanto à integridade estrutural. Algumas doenças como a cárie e a doença periodontal podem afastá-los dessas condições ideais. Entre os problemas associados a uma mastigação deficiente podem-se encontrar patologias diversas, desde aquelas ligadas à má digestão, à dores de cabeça bastante severas por disfunção da ATM, podendo culminar na perda da capacidade cognitiva em idade avançada (MIURA, YAMASAKI, *et al.*, 2003). A

dentição, bem como as estruturas de suporte ao dente (periodonto) constitui parte fundamental para que haja uma boa mastigação.

2.2 Doença periodontal

O periodonto saudável pode ser dividido funcionalmente em periodonto de proteção e periodonto de sustentação. O periodonto de proteção compreende a mucosa ceratinizada, o sulco gengival, epitélio juncional e inserção conjuntiva, enquanto que o periodonto de sustentação compreende o cemento, o osso alveolar e o ligamento periodontal. Também é responsável por manter a nutrição do dente. O periodonto de sustentação faz a interface entre o osso alveolar e o cemento (Figura 2). Essa estrutura tem a função de suportar o dente e proporcionar a distribuição das forças aplicadas durante a mastigação de forma a evitar sobrecarga pontual. O ligamento periodontal possui mecanorreceptores que fornecem informações detalhadas sobre as relações espaciais entre os dentes e os alimentos que estão sendo processados e sobre as cargas oclusais geradas durante esse processamento modulando as forças mastigatórias. (GILLETT, JOHNSON, *et al.*, 1990 ; JOHANSSON, SVENSSON E TRULSSON, 2006 ; NANJI E BOSSHARDT, 2006).

As forças que atuam sobre as estruturas envolvidas na mastigação são bastante severas se comparadas às forças que atuam sobre o corpo humano no dia-a-dia, podendo chegar a 522 N (BAKKE, HOLM, *et al.*, 1990) (aproximadamente 75% do peso total de um ser humano médio).

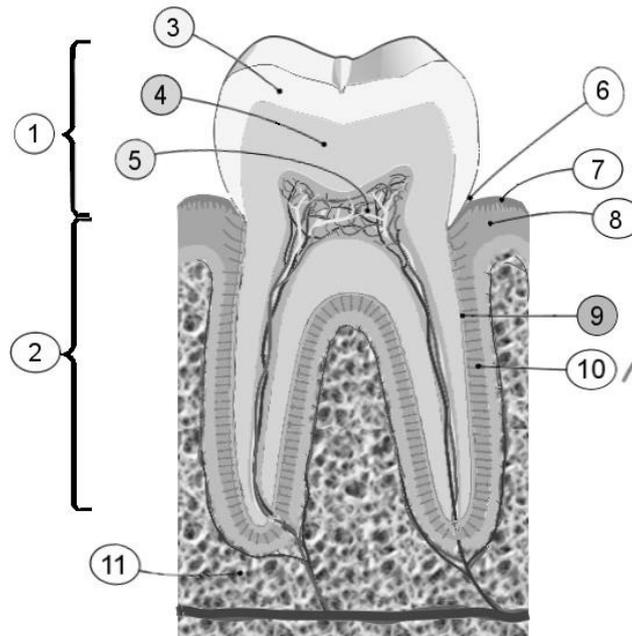


Figura 2 - Estruturas dentárias normais. 1-Coroa, 2-Raiz, 3-Esmalte, 4-Dentina, 5-Polpa, 6-Sulco Gengival, 7-Epitélio, 8-Conjuntivo, 9-Cemento, 10-Ligamento Periodontal, 11-Osso alveolar.

Como previamente introduzido, a doença periodontal é a inflamação dos tecidos periodontais que dão suporte ao dente. (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012 ; CHEN E SHI, 2014 ; CHEN E YAN, 2010). A doença periodontal começa de forma indolor e muitas vezes as pessoas não conseguem identificá-la em seu início, o que contribui para seu agravamento. A doença gera problemas como hemorragia gengival e mau hálito e, em um estado mais avançado, a perda dos elementos dentários. Atualmente, essa doença atinge uma grande parcela da população causando problemas de oclusão, o que pode levar a um mau funcionamento da articulação temporomandibular. Além disso, devem ser considerados os efeitos que uma saúde bucal comprometida pode causar no convívio social e até mesmo na condição sistêmica dos pacientes (DE SOUZA, TENÓRIO, *et al.*, 2012).

A doença periodontal e a doença cárie têm como principal fator etiológico o biofilme que cresce aderido à superfície dentária. Por definição, biofilmes são comunidades microbianas imersas em uma matriz extracelular composta

principalmente de polissacarídeos produzidos pelos próprios micro-organismos. Essas comunidades tendem, com o passar do tempo, a ter um alto grau de organização fazendo com que os micro-organismos que colonizam primariamente o biofilme criem condições para que outros possam fazê-lo (COSTERTON, STEWART E GREENBE, 1999). Além disso, é sabido que a doença periodontal também pode estar ligada a trauma, problemas genéticos e desordens sistêmicas (ZHANG, FONG, *et al.*, 2007).

A formação desse biofilme ocorre em etapas. Primeiramente o esmalte dentário, rico em hidroxiapatita que possui grupos fosfato (PO_4^-), apresenta um acúmulo de cargas negativas em sua superfície. Os íons cálcio, dotados de carga positiva são atraídos pela superfície e formam sobre esta uma camada chamada de "camada de hidratação". Em um segundo momento, por meio de ligações secundárias fracas, como as geradas pelas forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações iônicas, há a formação de uma camada denominada "película adquirida" do esmalte (THYLSTRUP E FEJERSKOV, 1995). Tanto essa camada (película adquirida) como a anterior (camada de hidratação) tem formas inespecíficas de se ligar ao dente, uma vez que a superfície do esmalte é carregada negativamente podendo atrair diferentes substâncias carregadas positivamente. A película adquirida é rica em proteínas e glicoproteínas, as adesinas, e será o substrato sobre o qual os micro-organismos colonizadores se aderirão (Figura 3). Cada adesina se liga de forma específica e estável aos micro-organismos colonizadores primários (KOLENBRANDER E LONDON, 1993). Pode-se citar como principais micro-organismos: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*.

Em uma etapa posterior, novos micro-organismos, que originalmente não possuíam a capacidade de se ligar às adesinas da película adquirida, começam a fazer uma colonização secundária graças às interações desses com os colonizadores primários. Como exemplos de colonizadores secundários pode-se citar: *Actinomyces*

spp., *Veillonella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Haemophilus spp.*, *Capnocytophaga spp.* e lactobacilos.

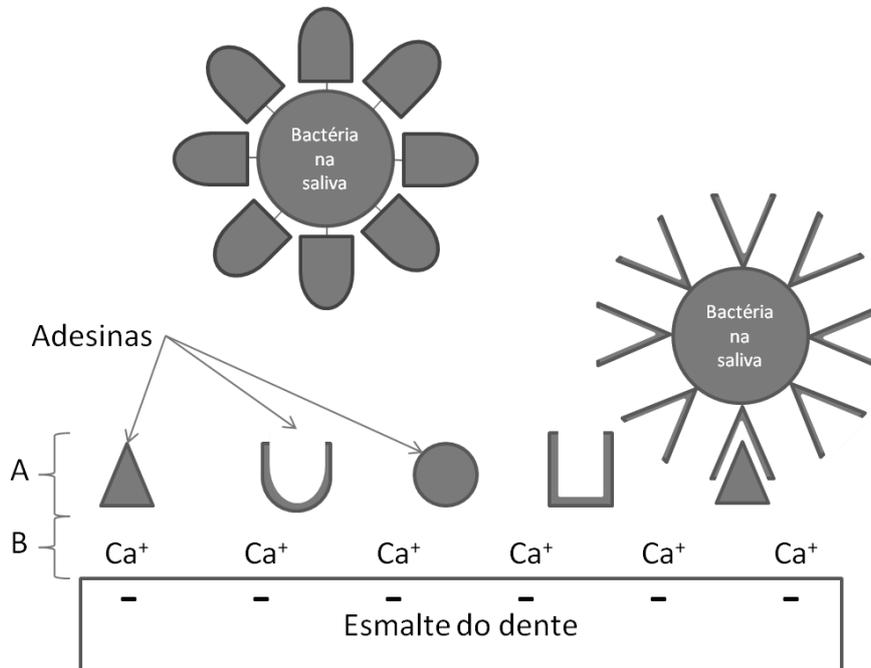


Figura 3 - Esquema demonstrando como ocorre o processo de colonização dos micro-organismos que farão parte do biofilme dental com a película adquirida (A) e camada de hidratação (B). Diagrama baseado em conceitos descritos por KOLENBRANDER e LONDON, (1993) e THYLSTRUP e FEJERSKOV, (1995)

Quanto à localização do biofilme, pode-se subdividi-lo em biofilme supragengival, quando localizado sobre a coroa clínica dos dentes (parte visível dos dentes) ou biofilme subgengival, quando se apresenta sob a gengiva. À medida que o biofilme cresce (aumento de espessura com o tempo) pode chegar a apresentar 500 diferentes cepas de bactérias. A esse biofilme mais maduro agregam-se outros micro-organismos chamados colonizadores tardios. Devido às condições ambientais criadas pela organização do biofilme, podem incluir nesses últimos colonizadores espécies anaeróbias estritas, como as dos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Actinobacillus* e *Treponema* (KOLENBRANDER E LONDON, 1993). Grande parte dos micro-organismos que colonizaram previamente a superfície do dente são bactérias que

produzem ácido láctico e conseqüentemente faz com que o pH da região diminua, podendo em alguns casos chegar a 4,0 (MARCOTTE E LAVOIE, 1998 ; MARSH, 2003). Entretanto, devido às condições ecológicas em biofilmes muito subgingivais há uma alcalinização do meio relacionada à resposta inflamatória. Esse fato se dá devido à degradação de proteínas, liberação de aminas e formação de amônia, elevando o pH para valores em torno de 7,3. Essas condições específicas favorecem o desenvolvimento e proliferação de algumas espécies, como por exemplo, uma espécie com alto potencial patogênico como a *Porphyromonas gingivalis* que encontra condições ideais de crescimento em pH próximo a 7,5 (MARCOTTE E LAVOIE, 1998 ; MARSH, 2003). Esse biofilme produzido por toda essa migração e proliferação bacteriana, assim como toda a produção de toxinas decorrentes dos produtos metabólitos desses micro-organismos levam a um ataque químico contra as estruturas do periodonto.

A região onde há a junção do dente com a gengiva chama-se epitélio juncional. Essa estrutura, entretanto, não oferece uma barreira completamente impermeável, constituindo então uma via de acesso pela qual toxinas, antígenos e enzimas originados na placa bacteriana adjacente, como produtos do metabolismo dos micro-organismos que a colonizam, possam penetrar e atingir o tecido conjuntivo subepitelial. Tal infiltração, em conjunto com a resposta imunológica do paciente, dá origem a um ciclo inflamatório e de injúrias teciduais (BRUNETTI, 2003). O organismo tenta combater os agentes agressores locais fazendo com que tanto células de defesa fagocitárias (neutrófilos) quanto do sistema imunológico (linfócitos) cheguem até a região. Essa fase inicial é conhecida como gengivite. As características clínicas são: o aumento do volume da região, a mudança da cor no local de rosa para vermelho e a possibilidade de sangramento à sondagem e sangramento espontâneo, características comuns do processo inflamatório (DUARTE, 2009).

Outra alteração perceptível do processo inflamatório é a intensificação do fluxo de fluido gengival. O fluido gengival é um exsudato fisiológico que emana do sulco gengival. Sua composição é bastante complexa e sofre alterações conforme a saúde do periodonto. A mudança mais perceptível, no entanto, é o volume de exsudato. Um sulco gengival saudável pode apresentar um fluxo gengival crevicular de 3 µl/h enquanto que na inflamação esse fluxo pode ser aumentado para 44 µl/h (GOODSON, 2003).

Processos inflamatórios agem nos tecidos gengivais para proteger contra o ataque microbiano e impedir que os micro-organismos se disseminem invadindo os tecidos e como reação imunológica aos componentes fisiológicos normais de uma bactéria, como por exemplo, os lipopolissacarídeos encontrados na membrana celular de bactérias Gram-negativas (LINDHE, KARRING E LANG, 2005).

Em alguns casos essas reações de defesa são passíveis de danificar as células e as estruturas vizinhas do tecido conjuntivo, podendo envolver o osso alveolar nesse processo destrutivo provocando assim a maior parte da lesão tecidual observada na gengivite e na periodontite (LINDHE, KARRING E LANG, 2005).

A perda óssea que acompanha a formação da bolsa periodontal pode acontecer de duas formas distintas:

- Perda Óssea Generalizada - O tecido ósseo que dá suporte ao dente (osso alveolar) perde estrutura na parte superior das cristas ósseas (Figura 4).
- Perda óssea localizada (defeito angular) - apenas uma determinada região do osso alveolar à volta do dente é destruída (Figura 5).



Figura 4 - Perda óssea generalizada.

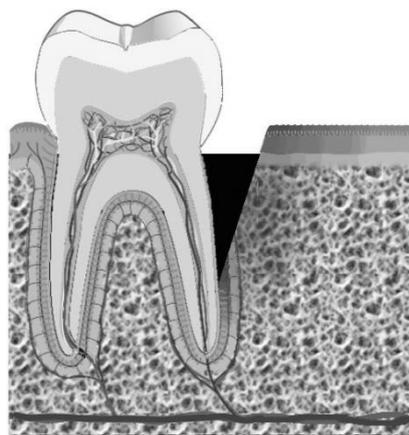


Figura 5 - Perda óssea angular.

2.2.1 *Porphyromonas gingivalis*

A bactéria *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria gram-negativa anaeróbia, tem a forma de bacilo e também pode ser descrita como um importante agente etiológico da doença periodontal. Entre os efeitos produzidos pelas proteases secretadas pela *P. gingivalis* estão: habilidade para degradar imunoglobulinas, inativar citocinas e seus receptores, atenuar a atividade antibacteriana dos neutrófilos,

degradar o tecido hospedeiro, ativar proenzimas, aumentar a permeabilidade vascular e promover sangramento. Essas enzimas também são capazes de degradar o colágeno das fibras periodontais (TOKUDA, CHEN, *et al.*, 1998). Uma protease secretada por essa bactéria que atrai bastante atenção por seu potencial patogênico é a Arg-1 que tem a capacidade de induzir uma forte resposta imune (LINDHE, KARRING E LANG, 2005).

A transmissão da *P. gingivalis* se dá entre pessoas. Como é uma bactéria anaeróbia estrita, não tem a capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente. Estudos mostraram que as bactérias periodontais são similares entre indivíduos da mesma família (TUIITE-MCDONNEL, GRIFFEN, *et al.*, 1997 ; ASIKAINEN, CHEN E SLOTS, 1996 ; VON TROIL-LINDEN, TORKKO, *et al.*, 1995). A transmissão pela saliva sugerida por esses estudos foi corroborada por outro estudo que provou ser possível o cultivo de *P. gingivalis* em saliva (VON TROIL-LINDEN, TORKKO, *et al.*, 1995).

Todas essas características fazem com que a *P. gingivalis* tenha um papel muito importante na progressão da periodontite (DZINK, SOCRANSKY E HAFFAJEE, 1988 ; LAMONT E JENKINSON, 1998).

2.3 Tratamento de doença periodontal

As diferentes estratégias de terapia periodontal têm como objetivo reduzir e / ou eliminar os efeitos causados pelo biofilme nos tecidos periodontais e regenerar novos tecidos periodontais. Como em qualquer outra doença, o tratamento da doença periodontal fundamenta-se na remoção dos seus agentes etiológicos (DUARTE, 2009 ; GIANNOBILE E SOMERMAN, 2003 ; WANG, 2005 ; TABA JR, JIN, *et al.*, 2005 ; SCULEAN, NIKOLIDAKIS E SCHWARZ, 2008 ; BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012).

Para que as fases iniciais dessa doença não evoluam para a perda do elemento dentário faz-se necessária à intervenção do dentista, que atua no sítio afetado promovendo a remoção mecânica por meio de raspagem dos cálculos aderidos ao dente assim como o debridamento de possíveis tecidos periodontais degenerados. Desde a década de 70 vários protocolos de intervenção têm sido testados (POLIMENI, XIOPAIDIS E WIKESJÖ, 2006), podendo ser cirúrgicos ou não-cirúrgicos.

O tratamento da doença periodontal, independente do grau de invasividade a ser empregado, passa necessariamente por modificação dos hábitos de higiene bucal para controle do biofilme e remoção mecânica do cálculo dentário. Quando esse cálculo tem localização supragengival ou ainda muito pouco subgengival, uma raspagem não-cirúrgica é viável e também preferível. Por outro lado, quando os cálculos dentários estão localizados abaixo da gengiva uma abordagem cirúrgica é necessária (REIS, BORGES, *et al.*, 2013).

Outro motivo pelo qual o tratamento cirúrgico se faz necessário é quando o profissional deseja intervir na lesão de forma a recuperar áreas de perda óssea ou promover crescimento ósseo. O objetivo principal da regeneração do periodonto é recuperar a ligação cemento - osso alveolar por meio das fibras periodontais de colágeno (SCULEAN, NIKOLIDAKIS E SCHWARZ, 2008 ; POLIMENI, KOO, *et al.*, 2008 ; BEHRING, JUNKER, *et al.*, 2008 ; PIATTELLI, SCARANO, *et al.*, 1996 ; NYMAN, GOTTLOW, *et al.*, 1987 ; NYMAN, GOTTLOW, *et al.*, 1982 ; NYMAN, LINDHE, *et al.*, 2005 ; KARRING, NYMAN, *et al.*, 1993 ; LINDE, ALBERIUS, *et al.*, 1993 ; REIS, BORGES, *et al.*, 2013).

Além do tratamento cirúrgico supracitado, existem: a raspagem supragengival, a raspagem subgengival fechada (já mencionadas), controle químico (DUARTE, 2009 ; LINDHE, KARRING E LANG, 2005) e regeneração tecidual guiada para formação óssea, que é o foco do presente trabalho.

2.3.1 Regeneração Tecidual Guiada (RTG).

Uma vez que as lesões tenham sofrido a intervenção dos dentistas e a higiene da área tenha sido restaurada, o organismo tentará recuperar a área lesionada por meio da proliferação dos tecidos periodontais, isto é, ligamento periodontal, osso alveolar, cemento e tecido conjuntivo próximo ao dente (ZHANG, FONG, *et al.*, 2007) (TATAKIS, PROMSUDTHI E WIKESJÖ, 1999).

A reconstrução dessa área pode então evoluir para uma de duas formas: o reparo ou a regeneração (LINDHE, KARRING E LANG, 2005).

A regeneração do periodonto significa uma nova formação de osso, cemento e ligamento periodontal com as suas devidas inserções, restaurando, portanto, a forma e a função das estruturas citadas. O termo reparo significa a cicatrização de uma ferida por um tecido que não restaura completamente a função e/ou a forma do tecido original.

Para que haja essa recuperação, as áreas vizinhas à lesão servirão como fonte doadora de células para a reconstrução dos tecidos que foram destruídos (Figura 6) (LINDHE, KARRING E LANG, 2005).

Nos estudos de LINDHE *et al.* (2005), as diferentes fontes doadoras foram testadas *in vivo* em cães e descobriu-se que:

- Quando a reconstrução da área lesionada se dá pela proliferação das células ósseas, tem-se como resultados possíveis a anquilose (fusão do cemento radicular com o osso alveolar) e a reabsorção radicular. A reabsorção radicular é um processo multifatorial que resulta na perda de estrutura da raiz do dente, em consequência da atividade patológica de células clásticas. (KARRING, NYMAN E LINDHE, 1980);

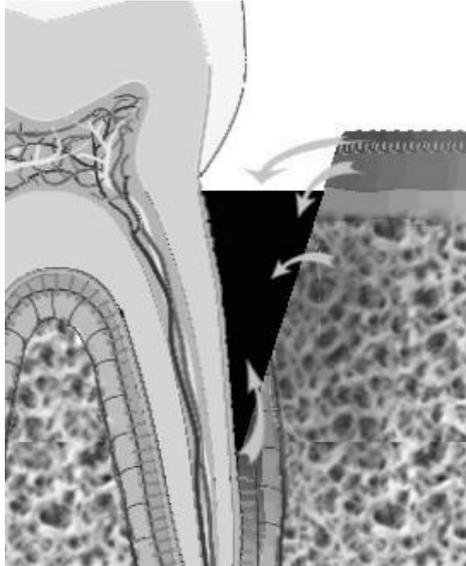


Figura 6 - Fontes doadoras de células para reparar a lesão.

- Quando a reconstrução da área lesionada se dá pela proliferação das células do tecido conjuntivo, tem-se como resultados indesejados a formação de fibras de colágeno paralelas à raiz do dente sem, entretanto que haja inserção com essa e a reabsorção radicular (NYMAN, LINDHE, *et al.*, 1980);
- Quando a reconstrução da área lesionada se dá pela proliferação das células epiteliais há a formação de uma estrutura chamada epitélio juncional longo, que além de ser mais sujeito a recidiva da lesão periodontal, também impede por interposição a perfeita regeneração da área lesionada (LINDHE, KARRING E LANG, 2005) (Figura 7);
- Quando a reconstrução da área lesionada se dá pela proliferação das células do ligamento periodontal, tem-se nova formação das fibras de colágeno do ligamento, novo cemento e uma regeneração apropriada da área lesionada (LINDHE, KARRING E LANG, 2005).

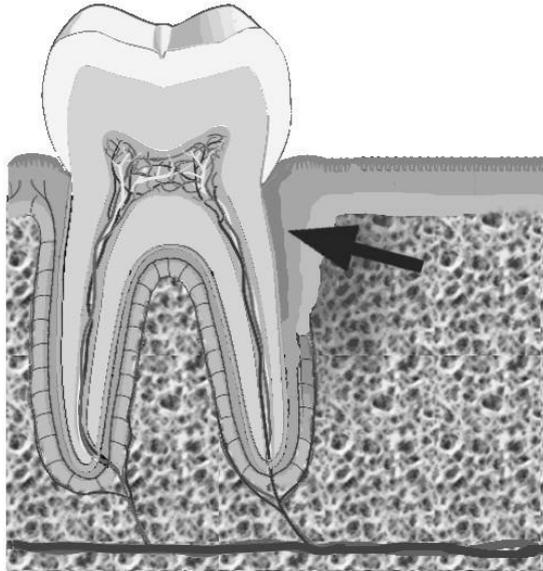


Figura 7 - Epitélio juncional longo (seta).

A técnica de Regeneração Tecidual Guiada (RTG) é um tratamento possível para a reconstrução do periodonto (LINDHE, KARRING E LANG, 2005). Esta técnica envolve a colocação de uma membrana de barreira entre o osso e o tecido conjuntivo gengival (marcada na Figura 8), a fim de evitar o crescimento epitelial para o local da ferida. Como o crescimento epitelial ocorre a uma taxa maior do que a formação do tecido ósseo, a formação do tecido epitelial deve ser guiada para não atrapalhar a formação deste, permitindo assim a formação de estruturas funcionais (Figura 8).

A área lesionada será colonizada, portanto, com células provenientes dos ligamentos periodontais, do osso alveolar, do tecido conjuntivo e do epitélio adjacentes à área afetada (ZHANG, FONG, *et al.*, 2007 ; TATAKIS, PROMSUDTHI E WIKESJÖ, 1999).

Dentre os materiais bem estabelecidos e utilizados como membranas de barreira, destacam-se o politetrafluoretileno (PTFE) e o colágeno. O PTFE é um material inerte, resistente e esterilizável que pode ser aplicado como membrana de

barreira, entretanto seu uso exige uma cirurgia para remoção do mesmo (SELVIG, KERSTEN, *et al.*, 1992).

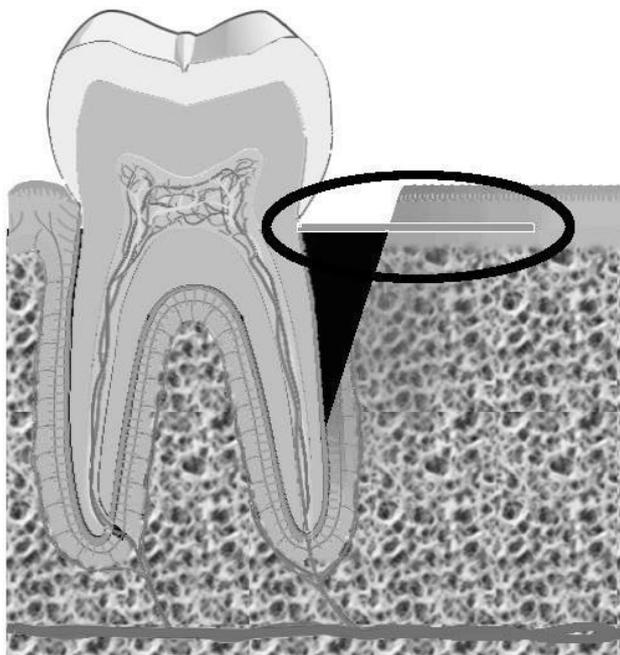


Figura 8 - Colocação da membrana (em destaque) entre o tecido conjuntivo e o osso.

O colágeno é um material biocompatível e biorreabsorvível e seria o material ideal para aplicação em membranas, entretanto a resistência mecânica desse polímero torna restrita sua aplicação (Tabela 1). Recentemente alguns autores vêm conseguindo melhorar as propriedades mecânicas do colágeno por meio da utilização de meios físicos ou químicos para reticulação da matriz da membrana, como radiação ultra-violeta, genipina, glutaraldeído, entre outros (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012).

Outro material com boa resistência mecânica, esse biorreabsorvível, é o poli(ácido lático) (PLA). A desvantagem do PLA é que ele apresentou uma resposta inflamatória aguda por parte dos organismos nos quais ele foi implantado (QU, WU, *et al.*, 2006).

A Tabela 1 apresenta a lista de membranas comercialmente disponíveis para RTG.

Tabela 1 – Lista de membranas comercialmente disponíveis para RTG. Adaptada de (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012)

REABSORÇÃO	NOME COMERCIAL	COMPOSIÇÃO	RESISTÊNCIA MECÂNICA	TEMPO DE DEGRADAÇÃO
Não-reabsorvível	Cytoplast [®] TXT-200	Politerafluoretileno de alta densidade (d-PTFE)	N/D	Não –degradável
	Cytoplast [®] TI-250	Politerafluoretileno de alta densidade reforçado com titânio	N/D	Não –degradável
Reabsorvível sintética	Resolult LT [®]	Poli-DL-ácido lático/ co-ácido glicólico	11,7 MPa	5 – 6 meses
	Vicryl [®]	Poliglactina 910 (Poli-L-ácido lático/ co-ácido glicólico) ((9:1) w/w)	N/D	~ 9 meses
	Atrisob [®]	Poli-DL-ácido lático e solvente (n-metil 2 pirrolidona)	N/D	6 - 12 meses
Reabsorvível derivados de colágeno	AlloDerm [®]	Colágeno tipo I derivado de pele humano.	9,4 – 21,5 MPa	~ 4 meses
	Bio-Guide [®]	Colágeno tipos I e II derivado de pele de porco.	7,75 MPa	~ 6 meses
	BioMend Extended [®]	Colágeno tipo I derivado de tendão bovino	3,5 – 22,5 MPa	~ 4,5 meses
	Cytoplast [®] RTM	Colágeno tipo I derivado de tendão bovino	N/D	6,5 - 9,5 meses.
® Marca Registrada	N/D Dados não disponíveis			

2.3.2 Poli(3-hidroxibutirato)

O PHB é um poliéster produzido por micro-organismos, biodegradável e biocompatível, com uma grande variedade de células animais, e é pertencente à família dos Poli-hidroxicanoatos - PHA (TATAKIS, PROMSUDTHI E WIKESJÖ, 1999). Tais características o tornam um material com potencial aplicabilidade na confecção de membranas para RTG.

Poli-hidroxicanoatos (PHA) são poliésteres de ácidos hidroxicanoicos, acumulados como reserva de carbono e energia por diversas bactérias na forma de grânulos intracelulares insolúveis em água no citoplasma celular (MISRA, VALAPPIL E ROY, 2006) (Figura 9). Como exemplo dessas bactérias tem-se: *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha* (BARUD, SOUZA, *et al.*, 2010) entre outras. Algumas das bactérias que produzem os PHA's são encontradas em associação com a cana-de-açúcar (TELLES, SARAN E UNÊDA-TREVISOLLI, 2011).

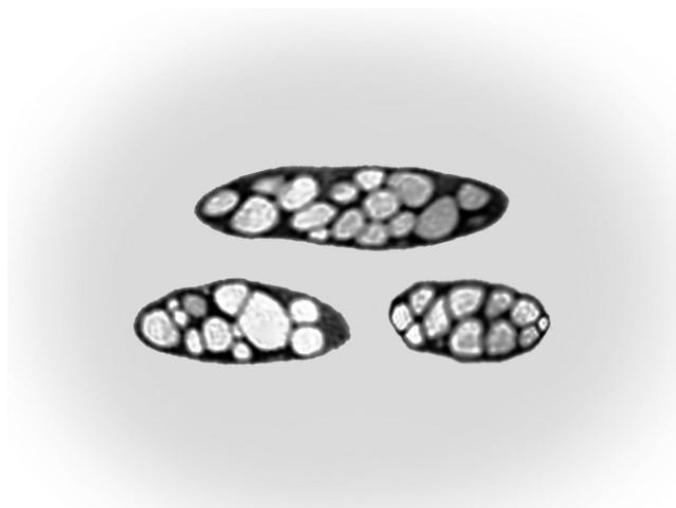


Figura 9 - Representação esquemática mostrando bactérias com grânulos de PHB em seu interior. Adaptado de (SCHUT, 2008).

Estes materiais de reserva são produzidos em condições ambientais não balanceadas, como excesso de fonte de carbono e/ou déficit de outros nutrientes (ex.: nitrogênio e fósforo) (MISRA, VALAPPIL E ROY, 2006). Esses grânulos intracelulares podem chegar a atingir até 80% em peso seco da biomassa bacteriana (PACHENCE, BOHRER E KOHN, 2007 ; ROCHA, PEREIRA, *et al.*, 2007 ; SPYROS, KIMMICH, *et al.*, 1997)

Os PHAs em geral possuem aplicações que vão desde embalagens, materiais descartáveis, matriz para liberação controlada de fármacos, até implantes e moldes na área médica. Na Figura 10(a), está apresentada a estrutura química genérica de um PHA. Tipicamente, PHAs com grupos laterais (R) pequenos são materiais semicristalinos, enquanto PHAs com grupos laterais (R) volumosos são elastoméricos. O Poli(3-hidroxiacetato) (PHA) é o mais simples dos poliésteres poli-hidroxiacanoatos. O PHB é um polímero natural altamente cristalino, frágil, relativamente hidrofóbico e biológica e ambientalmente degradável. O PHB é solúvel em clorofórmio e em outros solventes (contendo hidrocarbonetos halogenados). Esse polímero foi primeiramente isolado e caracterizado entre 1923 e 1926 pelo microbiologista francês Maurice Lemoigne. O PHB foi o primeiro polímero dos PHAs que foi utilizado em aplicações médicas (MISRA, VALAPPIL E ROY, 2006).

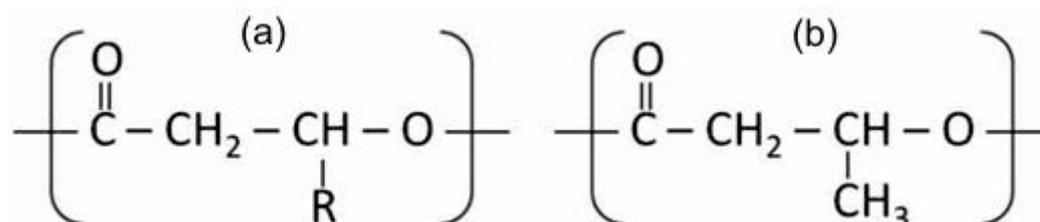


Figura 10 - Estruturas químicas de um poli-hidroxiacanoato (genérico) (a) e do poli(3-hidroxiacetato) (b).

Para que as bactérias comecem a armazenar carbono, produzindo assim o PHB, é necessário que se forneça a elas fonte de carbono em excesso, como carboidratos ou ácidos carboxílicos. Essas fontes de carbono serão convertidas em moléculas de acetil-CoA, responsável pela formação do monômero 3-hidroxi-butirato (3HB) (ROCHA, PEREIRA, *et al.*, 2007).

A estrutura do PHB pode ser visualizada na Figura 10(b). As cadeias poliméricas de PHB atingem massas molares que variam de 1×10^4 a 3×10^8 g/mol.

Devido a diferenças no cultivo dos micro-organismos (ROCHA, PEREIRA, *et al.*, 2007), nas técnicas de extração e nos métodos de preparação das amostras, encontramos grande variação em suas propriedades (MISRA, VALAPPIL E ROY, 2006), como nos mostra a Tabela 2. Dependendo de condições ambientais, como estresse do micro-organismo e disponibilidade de carbono, o tamanho das cadeias pode variar muito. Alguns autores buscam exatamente alterações como essas utilizando-se de variações no fluxo de substrato que é oferecido à bactéria (ROCHA, PEREIRA, *et al.*, 2007).

A alta pureza do PHB como fundido resulta em um baixo grau de nucleação heterogênea, conduzindo ao crescimento de grandes esferulitos, o que o torna um material quebradiço. O PHB forma cristais lamelares extremamente finos que são organizados em cristais simples e alongados quando crescem a partir de soluções diluídas ou esferulitos, quando crescem a partir do estado fundido. A espessura lamelar nos esferulitos é em torno de 50 \AA e em cristais crescidos de soluções podem ser menores. A velocidade de cristalização do PHB puro é relativamente baixa quando comparada com os polímeros sintéticos comuns (RENSTAD, KARLSSON E ALBERTSSON, 1997). Apesar do PHB isolado no processo bacteriano possuir cristalinidade entre 55 e 88%, as inclusões encontradas no interior das bactérias são amorfas (HONG E CHEN, 2006 ; MISRA, VALAPPIL E ROY, 2006).

Tabela 2 - Propriedades do poli(3-hidroxiбутирато) (MISRA, VALAPPIL E ROY, 2006).

PROPRIEDADES	VALORES
Temperatura de fusão (°C)	160 – 177
Temperatura de transição vítrea (°C)	-4 – 15
Resistência à tração (MPa)	15 – 40
Módulo de elasticidade em tração (GPa)	1.1 – 3.5
Cristalinidade (%)	55 – 80
Alongamento na ruptura (%)	1 – 6
Densidade (g/cm ³)	1,243
Índice de polidispersão	1,9 – 2,1
Ângulo de contato (°)	66

Este poliéster possui resistência à tração comparável a do polipropileno isotático. É um material rígido e pouco maleável e duro. O PHB tem propriedades mecânicas comparáveis com os poliésteres degradáveis produzidos sinteticamente, tal como o poli(ácido láctico). Sua taxa de degradação, todavia, é inferior à dos poliésteres sintéticos. Isso se dá, provavelmente, devido à sua elevada cristalinidade (SHINN, YI E CHIA, 2008 ; MISRA, VALAPPIL E ROY, 2006) Uma das metodologias utilizadas para alterar a cristalinidade do PHB é a adição de plastificante como por exemplo, o citrato de etila (CHOI E PARK, 2004), que é um plastificante muito bem tolerado pelo corpo humano, usado inclusive na indústria alimentícia. Este procedimento foi o utilizado no presente trabalho.

O PHB é um material que possui ótima biocompatibilidade com uma grande variedade de células animais, sem apresentar citotoxicidade. Para mostrar esse fato SHISHATSKAYA *et al.* (2004) compararam culturas de células como fibroblastos, hepatócitos e células endoteliais sobre filmes de PHB e sobre meio de cultura apropriado para controle. Os fibroblastos foram escolhidos por estarem diretamente envolvidos no processo inflamatório e de encapsulamento de corpo estranho e os hepatócitos, pela sua função de desintoxicação e por serem as células mais sensíveis à citotoxicidade. Não houve diferença significativa entre os grupos, sendo o material considerado não-citotóxico (SHISHATSKAYA E VOLOVA, 2004).

Há estudos que mostram alguma resposta inflamatória associada a implantes de PHB, como mostrado por LOBLER *et al.* (2002) e UNVERDORBEN *et al.* (2002). No entanto, poli-hidroxialcanoatos (PHAs), como o PHB mostraram uma resposta inflamatória menor do que a de outros poliésteres como PLA, um polímero largamente utilizado nesta área (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012). QU *et al.* (2006) mostraram resposta inflamatória aguda significativa quando PLA foi implantado em coelhos por até 6 meses. A baixa toxicidade do PHB é devida em parte ao fato de que este se degrada *in vivo* gerando ácido D-3-hidroxi-butírico, um componente normal do sangue humano.

Em outro trabalho, foi demonstrada a proliferação de odontoblastos sobre arcabouços desse polímero (MISRA, ANSARI, *et al.*, 2010). A biocompatibilidade do PHB também foi testada em um trabalho no qual suturaram amostras quadradas de 10 mm² desse material em estômagos de ratos. Não foram obtidos sinais macroscópicos de inflamação ao longo das oito semanas de duração do experimento (LÖBLER, SAB, *et al.*, 2002).

A biodegradação do PHB assim como a dos outros PHAs pode ser classificada como uma sucessão de eventos e é a etapa anterior necessária à sua biorreabsorção (BARBANTI, ZAVAGLIA E DUEK, 2005). Essa biorreabsorção só é encontrada em

polímeros constituídos por ligações metabólicas ou seus análogos com ligações hidrolisáveis. (VANIN, SANTANA, *et al.*, 2004).

A primeira etapa da biodegradação dos PHAs inicia-se com a hidratação quando o dispositivo é exposto aos fluidos aquosos do organismo. Com a presença das moléculas de água, o processo de biodegradação se dá por meio da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo, sendo esse trabalho realizado por enzimas, ou pela clivagem hidrolítica passiva, caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa molar e pela perda das suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração e compressão (BARBANTI, ZAVAGLIA E DUEK, 2005).

O primeiro fato que pode ser facilmente mensurado na degradação dos poli (α -hidroxi ésteres) é a perda de resistência mecânica devido ao decréscimo da massa molar. As cadeias poliméricas são solúveis no fluido extracelular quando a massa molar está abaixo de 7000 g/mol, e então, devido a essa baixa resistência mecânica começa um processo de fragmentação do polímero causado por tensões mecânicas do próprio local onde ele foi implantado (VANIN, SANTANA, *et al.*, 2004).

A biodegradação do PHB se dá preferencialmente na porção amorfa desse polímero semicristalino, com a água penetrando na superfície do dispositivo e atacando preferencialmente as ligações químicas da fase amorfa. Neste processo as longas cadeias poliméricas são quebradas em cadeias menores e depois em fragmentos solúveis (VANIN, SANTANA, *et al.*, 2004). A degradação da parte amorfa pode chegar a ser vinte vezes mais rápida que na região cristalina (SHINN, YI E CHIA, 2008). Entretanto, após a degradação da região amorfa interlamelar, tanto regiões amorfas como cristalinas são degradadas indiscriminadamente (SPYROS, KIMMICH, *et al.*, 1997).

Micro-organismos secretam enzimas que quebram o PHB em blocos constituintes, chamados hidroxiácidos, os quais são utilizados pelos micro-organismos como fonte de carbono. A presença de bactérias e enzimas acelera o tempo de degradação do PHB (TATAKIS, PROMSUDTHI E WIKESJÖ, 1999). A degradação enzimática do PHB acontece da seguinte maneira: inicialmente acontece uma adsorção enzimática na superfície do filme de PHB, acompanhada pela sua ação catalítica pela clivagem dos grupos funcionais (ésteres) deste polímero (LÖBLER, SAB, *et al.*, 2002). A principal enzima para a degradação do PHB em oligômeros é a PHB depolimerase (SPYROS, KIMMICH, *et al.*, 1997).

A enzima lactoperoxidase (lisozima) também pode acelerar a degradação do PHB *in vivo*. No trabalho de (ZHIZIANG, 2006) foi realizado teste de degradação enzimática *in vitro* de arcabouços de PHB em tampão PBS/lisozima. O material também foi submetido à degradação em água deionizada. Após um período de 35 dias, as amostras imersas em água apresentaram uma redução na massa inferior a 0,5%, comprovando que o processo de degradação hidrolítica no PHB é muito lento. Já as amostras submetidas à degradação enzimática tiveram diminuição na massa em torno de 6%.

O tempo de degradação do PHB em ambientes biologicamente ativos tem uma variação de 6 a 12 meses (CHOI E PARK, 2004). A taxa de degradação desse material pode ser aumentada com a adição de agentes plastificantes. Aditivos amorfos ou hidrofílicos levam a alta absorção de água e aceleram o processo de hidrólise. A adição de um segundo componente adequado acelera a degradação de PHAs (ARKIN E HAZER, 2002).

A baixa taxa de degradação do PHB é uma vantagem desse material sobre materiais como o colágeno, por exemplo. Para aplicações como cirurgias odontológicas, onde há a necessidade da manutenção da integridade estrutural da

membrana por tempo suficiente para a regeneração da área lesionada, suportando as forças da mastigação uma membrana que se mantenha íntegra por mais tempo é mais indicada.

Os produtos da degradação desse polímero também foram testados quanto a sua toxicidade. Suturas de PHB implantadas em animais por um período de um ano não apresentaram inflamações (SHISHATSKAYA, VOINOVA, *et al.*, 2008), necroses e formação de tumores malignos (CHEN E WU, 2005). A baixa toxicidade do PHB deve-se em parte ao fato de que ele se degrada *in vivo* gerando ácido D-3-hidroxi-butírico, um constituinte normal do sangue humano (PACHENCE, BOHRER E KOHN, 2007). Esse ácido por sua vez degrada-se em acetilcoenzima A (Acetil-CoA) (Figura 11) etapa comum no Ciclo de Krebs que é aonde acontece a respiração celular.

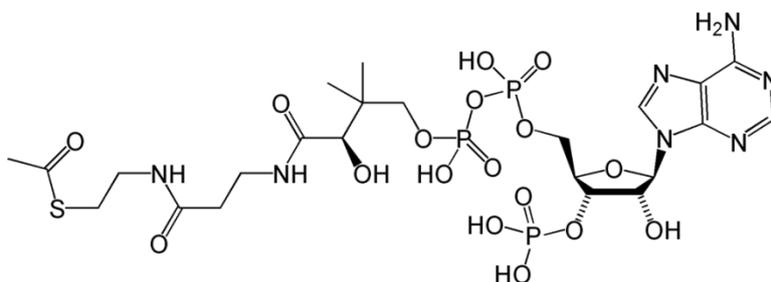


Figura 11 – Estrutura química da acetilcoenzima A.

2.4 Liberação controlada de fármacos – PHB – metronidazol

A tecnologia de liberação controlada de fármacos busca resolver inúmeros problemas associados à administração tradicional dos princípios ativos por meio da regulação da taxa e da localização espacial de liberação do agente. Os sistemas de liberação controlada proporcionam, por um longo período de tempo, efeitos

terapêuticos que só poderiam ser alcançados após múltiplas administrações pelas formas convencionais (COSTA E THIRÉ, 2011).

A utilização do biopolímero PHB na confecção de materiais para liberação controlada de fármacos vem sendo amplamente estudada devido às propriedades desse material tais como: biocompatibilidade, taxa de degradação, produtos de degradação biorreabsorvíveis e resistência mecânica. Exemplos são encontrados na literatura onde o PHB é combinado com outros polímeros para formar sistemas de liberação controlada na forma de compósitos (CHEN, WU, *et al.*, 2011 ; BONARTSEV, BONARTSEVA, *et al.*, 2006 ; POUTON E AKHTAR, 1996 ; CHOI E PARK, 2004).

Dentre eles pode-se citar o trabalho desenvolvido por (MARTELLINI, RIBELA, *et al.*, 2005) que avaliou o uso do PHB como veículo para liberação de hormônio de crescimento recombinante (hrGH) para tratamento de pacientes com deficiência na produção desse hormônio (GH), com síndrome de Turner ou com insuficiência renal crônica e para tratamento de pacientes com imunidade debilitada (como nos casos de AIDS, pacientes submetidos à cirurgias etc.), Esse trabalho mostrou a eficiência desse sistema na liberação controlada de GH.

Uma via sintética para preparar modelo conjugado PHB-amina que contém uma ligação imina hidrolisável foi relatada por MICHALAK *et al.* (2013). As propriedades de liberação de tais conjugados são confirmadas no experimento de hidrólise, revelando cinética de liberação de amina dependente de pH. A simplicidade do protocolo, em conjunto com propriedades únicas do PHB, faz desse conjugado uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de drogas (MICHALAK, MAREK, *et al.*, 2013).

Outro sistema utilizado foi o preparo de microcápsulas de PHB por meio de várias técnicas e foi avaliada a capacidade desses dispositivos para a liberação de albumina de soro bovino. PHB também tem sido sugerido como uma matriz adequada

para a administração de fármaco localmente em medicina veterinária, por exemplo, no rúmen de bovinos (JOSHI E PATEL, 2012).

No campo da odontologia, os dispositivos de liberação controlada de fármacos podem ser utilizados no tratamento da doença periodontal (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012). O fármaco metronidazol - MTZ (2-metil-5-nitro-imidazol-1-etanol) (Figura 12) é um composto antibacteriano pertencente à classe dos imidazóis, sub-grupo dos nitroimidazóis, que se destaca para a aplicação em odontologia por ser efetivo contra uma variada gama de micro-organismos (GOODMAN E GILMAN, 2001 ; MURPHY E JONES, 1994).

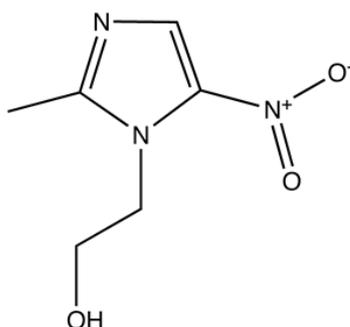


Figura 12 - Estrutura química do metronidazol (MTZ).

Esse fármaco é um coadjuvante que, quando aplicado ao tratamento das lesões periodontais, possibilita um resultado mais satisfatório do que o tratamento mecânico exclusivo. Sendo assim, este fármaco é utilizado na confecção de algumas membranas de barreira (GRIFFITHS, SMART, *et al.*, 2000).

O PHB por ser biocompatível, biodegradável e por apresentar resistência mecânica superior a do colágeno é um material adequado para produção de membranas de barreira. Entretanto, esse material não apresenta atividade antimicrobiana. Polímeros carregados com metronidazol se mostraram efetivos no

tratamento da doença periodontal, indicando que o carregamento deste fármaco em sistemas poliméricos é funcional (TIWARI, 2010). Não há na literatura referências de membranas de PHB carregadas com MTZ. Baseado nas propriedades supracitadas do PHB e do MTZ acredita-se que a confecção desse tipo de membrana agregue as características do polímero PHB e do fármaco MTZ, apresentando atividade antimicrobiana.

Capítulo 3

3 Materiais e Métodos

Nesse estudo as membranas foram, inicialmente, produzidas por dois processos distintos: evaporação de solvente e moldagem por compressão. Para ambos os processos as matérias primas utilizadas foram PHB, fornecido pela PHB Industrial S/A (Biocycle 1000®, lote 141), o fármaco metronidazol (M3761-5G, Sigma-Aldrich, lote 095K0693, Suíça) e o plastificante citrato de etila (Fluka analítico, lote 43708105, Suíça), ambos para análise (P.A.).

3.1 Produção de membranas por evaporação de solvente

Uma solução de PHB foi preparada adicionando-se 8,0 g PHB a 100 ml de clorofórmio. O preparo da solução se dividiu em duas etapas: (i) inchamento do polímero sob agitação magnética a temperatura ambiente por 2 h; (ii) dissolução por meio do aquecimento do sistema sob agitação e refluxo a 65°C por um período de 2 horas. A solução resultante, depois de atingir a temperatura ambiente foi filtrada a vácuo em funil de vidro. Seguiu-se o protocolo já estabelecido no Laboratório de Biopolímeros do PEMM/COPPE.

Para a confecção de membranas pelo processo de evaporação de solvente foram feitos alguns testes de confecção e de liberação que aqui foram nomeados

como “ensaios preliminares”. Para esses ensaios a quantidade de metronidazol na composição das membranas foi de 0%, 2% e 5% (p / p).

A quantidade do plastificante (citrato de etila) usada foi de 0% e 20% em peso seguindo o trabalho de (CHOI E PARK, 2004).

O MTZ e o plastificante foram adicionados à solução de PHB 8% (p/v) e mantidos sob agitação magnética por 20 minutos. Aproximadamente 20 ml dessa solução em diferentes concentrações foram vertidos em cada placa de Petri vidro de 14 cm de diâmetro para a evaporação do solvente à temperatura ambiente por um prazo de 24 horas. As placas de Petri foram fechadas para controle da evaporação do solvente.

As amostras obtidas por essa metodologia foram nomeadas como: MiPj^{ES} onde i corresponde à concentração do fármaco metronidazol e j corresponde à concentração do plastificante citrato de etila.

3.2 Moldagem por compressão

No processo de moldagem por compressão o fármaco, na concentração de 2% (p/p), e o plastificante, na concentração 20% (p/p), foram adicionados ao PHB por meio de agitação manual por vinte minutos. Essa composição foi definida como ideal baseada nos testes preliminares realizados nas amostras produzidas por evaporação de solvente. Após a incorporação do fármaco e do plastificante ao PHB uma porção de 4 g da mistura foi prensada em uma prensa Marconi (modelo MA - 098 / A), aquecida a 168°C por um período de 5 minutos sem a utilização de espaçador. Antes da aplicação de uma força de 4 toneladas foi realizado o processo de degasagem (1 minuto) para evitar a inclusão de bolhas no filme. Findos os 6 minutos da prensagem o filme foi posto para resfriar por 20 minutos em prensa hidráulica Carver com um

dispositivo de refrigeração à água ligado a um reservatório contendo água a 42°C. As amostras obtidas por essa metodologia foram nomeadas como: MiPj^{MC} onde i corresponde à concentração do fármaco metronidazol e j corresponde à concentração do plastificante citrato de etila.

3.3 Difração de raios - X (DRX)

A identificação das fases presentes foi feita por meio de difração de Raios-X (DRX), difratômetro SHIMADZU vertical configuração theta-2theta, modelo XRD 6000, geometria Bragg-Brentano, com raio goniométrico de 185 mm. O alvo utilizado foi de cobre (Radiação CuK α) 30kV/30mA. A determinação da cristalinidade do material foi estimada subtraindo-se o halo amorfo das curvas e calculando-se a área da curva resultante (A_c). A fração cristalina foi considerada como sendo a porcentagem definida pela divisão de A_c pela área total da curva do difratograma.

3.4 Calorimetria Diferencial de Varredura

As amostras foram analisadas via calorimetria diferencial de varredura (DSC), equipamento Perkin Elmer, DSC 8000 em atmosfera de N₂. Aproximadamente 10 mg das amostras foram submetidos a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, com a temperatura variando dentro da faixa de -50 a 160°C e em seguida foram submetidas a um resfriamento rápido de 160 °C a -50 °C. Um segundo ciclo de aquecimento foi utilizado para obter as propriedades de interesse, temperatura de transição vítrea - T_g, temperatura de fusão - T_m e grau de cristalinidade - X_c. O X_c foi calculado segundo a Equação 01, onde ΔH é a entalpia de fusão e $\Delta H_{100\%}$ é a entalpia de fusão do PHB 100% cristalino, 146 J/g (RODRIGUEZ-CONTRERAS, KOLLER, *et al.*, 2013).

$$Xc = 100 \frac{\Delta H}{\Delta H_{100\%}} (\%) \quad \text{Eq. 01}$$

Por ser tratar de um compósito, é possível calcular o grau de cristalinidade mássico, Xc mássico levando em consideração somente a massa de PHB presente na amostra. Isso pode ser feito substituindo a entalpia de fusão (ΔH) pela entalpia de fusão por unidade de massa de PHB presente na amostra (ΔH^*):

$$\Delta H^* = \frac{\Delta H}{W_{PHB}}, \quad \text{Eq. 02}$$

onde W_{PHB} : fração mássica de PHB na amostra (0,98)

3.5 Análise Dinâmico-Mecânica (DMA)

O ensaio de DMA do tipo flexão a 3 pontos foi realizado em corpos de prova com dimensões: 13 mm X 50 mm (L x C) e espessura média de 1,7 mm ($\pm 0,03$ mm) produzidos pelo método de moldagem por compressão. O equipamento usado para esse ensaio foi um equipamento TA instruments Q800-0505. As condições para o ensaio foram: ensaio de flexão de 3 pontos, faixa de temperatura de -30 a 50°C com um aumento de 2°C /min, frequência de 1 Hz e atmosfera de N_2 .

3.6 Microscopia

A avaliação morfológica dos filmes, assim como da distribuição qualitativa do metronidazol pela matriz do dispositivo, foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um equipamento JEOL JSM (modelo 6460 LV). As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro obtida por pulverização a vácuo (20 mA por 2 minutos) e observadas a 20 e 15 kV. Também foi utilizada microscopia óptica para análise morfológica, microscópio Olympus (modelo GX71). Para a visualização da superfície de fratura a membrana a ser examinada foi imersa em nitrogênio líquido por 1 minuto e então removida e clivada por impacto. A isso seguiu-se o recobrimento com ouro.

3.7 Construção da curva padrão do metronidazol

Para estabelecimento de uma curva padrão que correlacionasse a absorção da luz com a concentração do metronidazol no meio analisado foi realizada uma varredura do espectro ultravioleta-visível (200-800 nm). A partir desse espectro foi possível determinar o pico de maior absorbância desse fármaco e traçar uma curva padrão correlacionando essa absorbância à concentração deste na amostra. Para isso foi utilizado um espectrofotômetro UV-VIS (Biospectro, SP-220). As concentrações utilizadas na construção dessa curva foram 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,075 mg/ml e 0,1 mg/ml. Foi construído um gráfico com as concentrações descritas e os valores de absorbância medidos. Por meio de regressão linear foi possível estabelecer uma correlação entre a concentração real da amostra e a absorbância aferida.

3.8 Lixiviação das membranas produzidas por moldagem por compressão

As membranas produzidas por compressão foram submetidas a um processo de lixiviação para a remoção dos cristais de MTZ adsorvidos na superfície da membrana. A lixiviação foi conduzida colocando-se as amostras M2P20^{MC} em tubos Falcon contendo 50 ml de água destilada e mantendo-as em agitação orbital de 120 rpm pelo tempo de uma hora à temperatura ambiente. A avaliação da quantidade de metronidazol removida das membranas foi determinada por espectrofotometria UV-Vis da água utilizada no processo de lixiviação. Esse cálculo foi feito com base na curva padrão do metronidazol estabelecida previamente no item anterior (3.7).

3.9 Liberação do fármaco metronidazol

Para os ensaios de liberação de fármaco de 30 dias e em tempo real foram utilizadas membranas lixiviadas e não lixiviadas, ambas produzidas pelo processo de moldagem por compressão.

Os ensaios de liberação foram conduzidos em dois meios distintos: meio tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 e meio acetato de potássio pH 5,0. A escolha do meio PBS foi feita para simular as condições fisiológicas. Vários autores em trabalhos de liberação de material utilizaram esse tampão (KURTIŞ, ÜNSAL, *et al.*, 2002 ; RAVAL, PARIKH E ENGINEE, 2011 ; SHIFROVITCH, BINDERMAN, *et al.*, 2009). A escolha do meio tampão acetato de potássio em pH 5,0 foi feita para simular condições patológicas de inflamação dos tecidos (COAKLEY, TAGGART, *et al.*, 2002).

3.9.1 Ensaios preliminares

Esses ensaios foram conduzidos com o objetivo de experimentar a produção das membranas com diferentes concentrações de metronidazol. Também foi possível nesse ensaio avaliar de forma genérica o perfil de liberação do metronidazol por membranas produzidas por evaporação de solvente assim como a influência do uso do plastificante nesse perfil.

Nos ensaios preliminares, 12 corpos de prova retangulares nas seguintes dimensões: 24 mm X 68 mm (LxC), com espessura média de 0,124 mm ($\pm 0,035$ mm) foram recortados a partir de membranas produzidas conforme o item 3.1. As dimensões escolhidas para os corpos de prova foram as que melhor se ajustaram aos tubos Falcon com capacidade para 50 ml onde se deu o ensaio.

Os corpos de prova foram colocados em tubos Falcon contendo 45 ml de solução tampão PBS pH 7,4. Os tubos Falcon contendo os corpos de prova foram parcialmente submersos em água. Esse sistema foi mantido durante todo o ensaio à temperatura de 37°C. Foram coletadas amostras de 1,5 ml da solução tampão PBS do interior dos tubos nos seguintes tempos de ensaio: 3h, 22h, 69h, 165h, 189h, 239h e 334h.

3.9.2 Estudo da liberação de metronidazol em um período de 30 dias

Os ensaios de liberação do metronidazol em 30 dias foram realizados com base nos procedimentos descritos por SHIFROVITCH (2008).

As membranas M2P20^{MC} e M2P20^{MC}_L (3 amostras por condição) a serem analisadas foram colocadas em tubos Falcon contendo 50 ml de meio tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 e solução tampão acetato de potássio pH 5,0.

Os corpos de prova foram cortados nas dimensões de 8 mm X 100 mm (L x C) com espessura média de 0,275 mm ($\pm 0,026$ mm).

Os tubos foram mantidos a 37°C em agitação orbital de 120 rpm. Foram coletadas amostras de 1,5 ml da solução tampão do interior dos tubos ao longo de 30 dias. Após a coleta de cada amostra, o nível de solução dentro do tubo foi completado com o mesmo volume de solução tampão (SHIFROVITCH, BINDERMAN, *et al.*, 2009).

Para a determinação da concentração de MTZ na amostra coletada a absorbância medida pelo espectrofotômetro foi convertida utilizando-se a curva padrão (item 3.7). Para eliminar o erro produzido pela diluição da solução por inserção de solvente um fator de correção foi aplicado à concentração da amostra, conforme apresentado na Equação 03.

$$FC = \left(\frac{50}{50-1,5} \right)^{n-1}, \quad \text{Eq. 03}$$

onde FC é o fator de correção, n é o número sequencial da amostra, 1,5 é o volume em mililitros da alíquota retirada e 50 é o volume total do tubo em mililitros (SHIFROVITCH, BINDERMAN, *et al.*, 2009).

3.9.3 Liberação do fármaco metronidazol em tempo real

Foram realizados ensaios de liberação de fármaco em tempo real nas membranas M2P20^{MC} e M2P20^{MC}_L em 3 amostras por condição. As amostras foram cortadas nas dimensões de 6 mm X 30 mm (L x C) com espessura média de 0,275 mm ($\pm 0,023$ mm). As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo para serem analisadas por espectrofotometria de luz UV-Vis e essas preenchidas com a solução

fosfato-salino (PBS) pH 7,4 e com solução tampão acetato de potássio pH 5,0. Por meio de um espectrofotômetro acoplado a um computador e utilizando-se o programa “Winspec 2.3.1” (fornecido pelo fabricante) foi possível fazer a avaliação da liberação com intervalos de um segundo durante toda a primeira hora. Assim como no ensaio de liberação de 30 dias a conversão dos valores de absorbância em concentração foi feita utilizando-se a curva padrão (item 3.7).

3.9.4 Estudo do mecanismo de difusão

Para avaliar o mecanismo de cinética de liberação de metronidazol em amostras lixiviadas e não lixiviadas (nos ensaios de liberação de 30 dias) foram usados os modelos matemáticos de Higuchi (Equação 3) e de Korsmeyer-Peppas (Equação 4). As taxas de liberação, K e n, de cada modelo foram obtidas por regressão da curva dos perfis de liberação das amostras nos meios avaliados (PBS e acetato). Os coeficientes de correlação (R^2) foram utilizados para avaliar a precisão da equação obtida.

$$M_t = Kt^{\left(\frac{1}{2}\right)}, \quad \text{Eq. 3}$$

onde M_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t e K é a taxa constante (HIGUCHI, 1961).

No caso da reta definida pelo gráfico traçado por essa equação possuir inclinação igual ou superior a 1 dizemos que a liberação do sistema é regida por difusão fickiana.

Para aqueles sistemas que se desviam da equação de Higuchi, a relação de Korsmeyer-Peppas (Equação 04) pode mostrar a adequação ou não à Lei de Fick (KORSMEYER, GURNYA, *et al.*, 1983).

$$\frac{M_t}{M_{inf}} = Kt^n, \quad \text{Eq. 4}$$

onde $\frac{M_t}{M_{\infty}}$ é a quantidade de fármaco liberado no tempo t (s); K é uma constante, que compreende os parâmetros estruturais e geométricos, característicos do sistema; e n é o expoente de liberação, que é um parâmetro que depende do mecanismo de liberação. Este valor n é usado para caracterizar os diferentes mecanismos de liberação. Se o valor de n é de 0,5 ou menos, o mecanismo de liberação segue a difusão fickiana e se (0,5 < n < 1), que indica um mecanismo de difusão não- fickiana (anômala) (KORSMEYER, GURNYA, *et al.*, 1983).

3.10 Propriedades mecânicas – ensaio de tração

Os ensaios de tração foram conduzidos numa máquina universal de testes, Instron 5582, utilizando uma cela de carga de 2 KN. A velocidade do travessão foi de 0,5 mm/min (Modificado da norma ASTM D882-91, 1991). Foram realizados seis ensaios para as diferentes composições e os resultados foram apresentados como médias de todos os ensaios efetuados para cada uma das condições. As espessuras das membranas foram medidas com um paquímetro digital (Mitutoyo – Digimetic Caliper).

3.11 Tratamentos estatísticos

A significância dos resultados obtidos foi avaliada pelo método de análise de variância de um fator (one way ANOVA), Programa OriginPro 8.0, quando havia apenas um fator a ser avaliado (ex.: níveis de fármaco 0 e 2%) e por análise de variância de dois fatores (two way ANOVA) quando foi necessário avaliar a influência de dois fatores (presença de plastificante e presença de fármaco). Os níveis utilizados para cada fator foram 0 e 20% para o plastificante e 0 e 2% para o fármaco. O nível de significância para as análises de variância foi de 95%. Quando foi necessário analisar se houve correlação entre os fatores, foi utilizado teste de Tukey, nível de significância de 95%. As análises de variância (tabela ANOVA) podem ser encontradas no Anexo 1.

3.12 Avaliação quanto à citotoxicidade

Este ensaio foi conduzido no Laboratório de Biocerâmicas e Cultura Celular no CBPF. Os testes de citotoxicidade foram realizados em amostras lixiviadas M0P0^{MC_L}, M2P0^{MC_L}, M0P20^{MC_L} e M2P20^{MC_L}. Todas as amostras foram submetidas à lixiviação prévia para eliminação da alta taxa de liberação inicial proveniente da dessorção dos cristais de metronidazol adsorvidos à superfície. A esterilização das membranas foi feita por óxido de etileno. A citotoxicidade foi avaliada de acordo com um método multiparamétrico utilizando-se um kit específico (*Cytotox kit, Xenometrix, Germany*). Este método permite a avaliação de 3 diferentes parâmetros de sobrevivência e viabilidade celular ao mesmo tempo (2,3-bis (2-metil-4-nitro-5-sulfofenil) – 5 – [(fenilamino) carbonil] – 2H – hidróxido de tetrazólio (XTT), vermelho neutro (VN) e eluição do cristal violeta (CVDE)).

O teste do XTT tem como fundamento, a conversão do sal tetrazólio em cristais solúveis de formazan pela enzima succinato-desidrogenase da cadeia respiratória mitocondrial que podem ser medidos por sua absorbância a 480 nm em um leitor de microplacas UV/Vis. Dessa maneira, somente células viáveis conseguem reduzir o XTT em cristais de cor laranja, solúveis em água.

O ensaio de incorporação do vermelho neutro é um teste *in vitro* eficaz e reprodutível que monitora a integridade da membrana plasmática. Está baseado no fato de que o vermelho neutro é um corante solúvel em água e células viáveis com membranas celulares intactas são capazes de incorporar e reter o corante em seus lisossomos. A quantidade de corante incorporado pode ser medida, após extração, por sua absorbância ao comprimento de onda de 540 nm (Synergy 2, BioTek Instruments).

O ensaio de eluição do cristal violeta tem como princípio a avaliação da incorporação do corante vital, cristal violeta, que se associa ao núcleo celular. A solubilização deste corante em água é correlacionada com a quantidade de DNA nuclear, isto é, número de células fornecendo parâmetros de proliferação celular. A absorbância a 540 nm equivalente à quantidade de células no poço.

Os ensaios de citotoxicidade seguiram estritamente o protocolo da ISO-10993-12. O extrato dos materiais foi obtido em meio de cultura *essencial mínimo* (α -MEM) em ausência de soro fetal bovino, na concentração de 100 mg de material para cada mililitro de meio de cultura durante 24 h, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A citotoxicidade para cada material foi determinada utilizando-se células do tipo MC3T3-E1 ($0,8 \times 10^4$ células/poço). Após 24h, o meio de cultura contendo o extrato foi removido e as células lavadas com PBS. Como controle positivo as células foram colocadas em dodecil sulfato de sódio (SDS) na concentração de 1% e como controle negativo as células foram colocadas no meio de cultura puro (α -MEM).

Para análise estatística, além da análise de variância simples (*One way ANOVA*), também foi utilizado o pos-test de *Dunnett*, representativo de dois

experimentos independentes em sextuplicata. As amostras foram normalizadas em porcentagem e comparadas ao controle negativo. Foi considerada diferença significativa um valor de p menor que 0,05.

3.13 Análise de adesão celular por imunofluorescência

Este ensaio foi conduzido no Laboratório de Biocerâmicas e Cultura Celular no CBPF. Foi feita a avaliação da distribuição do citoesqueleto e dos pontos de adesão focal, visando determinar a morfologia das células em resposta aos extratos obtidos a partir das membranas. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência, onde, inicialmente foi realizada a imunomarcação com faloidina e vinculina, respectivamente. Após 24 horas de exposição aos extratos, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% em PBS, por 10 minutos. As células foram lavadas por 3 vezes, com tampão PBS e então feita a incubação com NH_4Cl , 20 mM por 10 minutos. Seguiram-se mais 3 lavagens com PBS e em seguida foi feita a permeabilização da membrana celular com Triton-X-100 0,1 % e BSA 1% em PBS por 15 minutos. As células foram incubadas em solução de albumina por 20 minutos e então foram marcados com anticorpo antivinculina (1:100) e incubadas por 24 horas.

Neste estudo foram utilizadas células murinas da linhagem pré-osteoblástica MC3T3-E1 (ATCC 7594), cultivadas rotineiramente em garrafas específicas de 75 cm² para cultivo celular e mantido na incubadora a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO_2 . O meio de cultura α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) foi utilizado para manutenção da cultura com trocas a cada 72 h. Para cada passagem, quando subconfluentes, as células foram submetidas ao destacamento (tripsinização) com tripsina-EDTA a 0,2%. O monitoramento do crescimento celular foi acompanhado

diariamente por observação de rotina, pela técnica de contraste de fase em microscópio invertido (Olympys CKX41).

Os extratos das amostras a serem testadas (membranas M0P0^{MC_L}, M2P0^{MC_L}, M0P20^{MC_L}, M2P20^{MC_L} e controle), foram obtidos em meio de cultura α -MEM sem soro fetal bovino (SBF), na concentração de 100 mg/mL (material/meio de cultura) , durante 24h, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Para o experimento, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e adicionadas na densidade de 10³ células/lamínula de vidro em placas de 24 poços. Todos os controles foram feitos em lamínulas de vidro recobertas com fibronectina (neuVtro, Fibronectin coated coverslips).

A distribuição do citoesqueleto e o contato focal célula-superfície foram avaliados por imunomarcação com faloidina e vinculina, respectivamente. A microscopia de fluorescência foi realizada após 48 horas de cultivo em contato com os extratos. As células aderidas foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 4,0% (em tampão PBS) por 10 minutos. Em seguida, este foi retirado e as células lavadas 3 vezes em tampão PBS pH 7,2 e adicionados NH₄Cl 20mM por 10min. As amostras foram novamente lavadas 3x com PBS. Em seguida, as células foram permeabilizadas numa solução de Triton-X-100 0,1 % e BSA 1% em PBS por 15 minutos. Posteriormente lavadas e incubadas numa solução de albumina 3 % em PBS por 20 minutos à temperatura ambiente. Após essa etapa, as amostras foram marcadas com anticorpo em atmosfera úmida a 4 °C, em seguida lavadas e incubadas com anticorpo secundário Alexa 488 (1:500) por 1h, lavadas com PBS e incubadas com faloidina-ALEXA 546 (1:50) por 40 minutos em atmosfera úmida à 37°C ao abrigo da luz. O núcleo foi marcado em solução antifade Fluoroshed DAPI. As amostras foram finalmente seladas em lâminas para serem analisadas no microscópio de fluorescência invertido com câmera digital Axio Observer A1 (Zeiss) equipado com a

câmera digital AxioCAM HRc. As imagens obtidas foram digitalmente analisadas pelo software Image Pro Plus.

3.14 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade foram realizados em amostras lixiviadas M0P0^{MC}_L, M2P0^{MC}_L, M0P20^{MC}_L e M2P20^{MC}_L. Todas as amostras foram submetidas à lixiviação prévia para eliminação da alta taxa de liberação inicial proveniente da dessorção dos cristais adsorvidos à superfície.

Os testes de susceptibilidade a agentes antimicrobianos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Oral no Centro de Ciências da Saúde de acordo com as normas do guia *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, anteriormente NCCLS) M11-A6 para anaeróbios, com modificações. (WIKLER, 2004)

Para o preparo do inóculo, o micro-organismo *Porphyromonas gingivalis* W83 foi cultivado em placa de ágar sangue, por 5 dias a 37°C, em anaerobiose. Após crescimento, o inóculo foi ajustado até alcançar a turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml) e adicionado nos tubos e nas placas como descrito abaixo. Ambos foram incubados em anaerobiose por 5 dias para a realização da leitura dos resultados. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Macrodiluição: Foram separados 4 tubos de ensaio de 15 ml onde foram adicionados 9 ml do meio de cultura Caldo Muller-Hinton, 1 ml do inóculo previamente ajustado e um disco de cada condição por tubo. A leitura do resultado foi feita por meio da observação da turvação no meio, quando não houve inibição, e do meio límpido, quando houve.

Disco-difusão: Em uma placa de meio de cultura ágar sangue o inóculo, previamente ajustado para 0,5 McFarland, foi adicionado com o auxílio de um *swab* e adicionado um disco de cada condição por placa. A leitura do resultado foi feita por meio da medição do halo de inibição formado ao redor dos discos.

Capítulo 4

4 Resultados e Discussão

4.1 Membranas produzidas por evaporação de solvente

4.1.1 Ensaios preliminares

A liberação acumulada percentual das membranas produzidas por evaporação de solvente nos ensaios preliminares deu origem aos perfis que podem ser visualizados na Figura 13.

Observando do gráfico foi possível notar que a liberação do fármaco foi influenciada pela adição de plastificante à matriz da membrana. Tal fato se deveu, provavelmente, à capacidade do plastificante de se interpor entre as cadeias do PHB promovendo um afastamento entre elas e assim colaborando para a liberação do metronidazol.

Quanto à concentração do metronidazol na membrana, pode-se afirmar que não houve diferença entre os perfis de liberação que receberam plastificante.

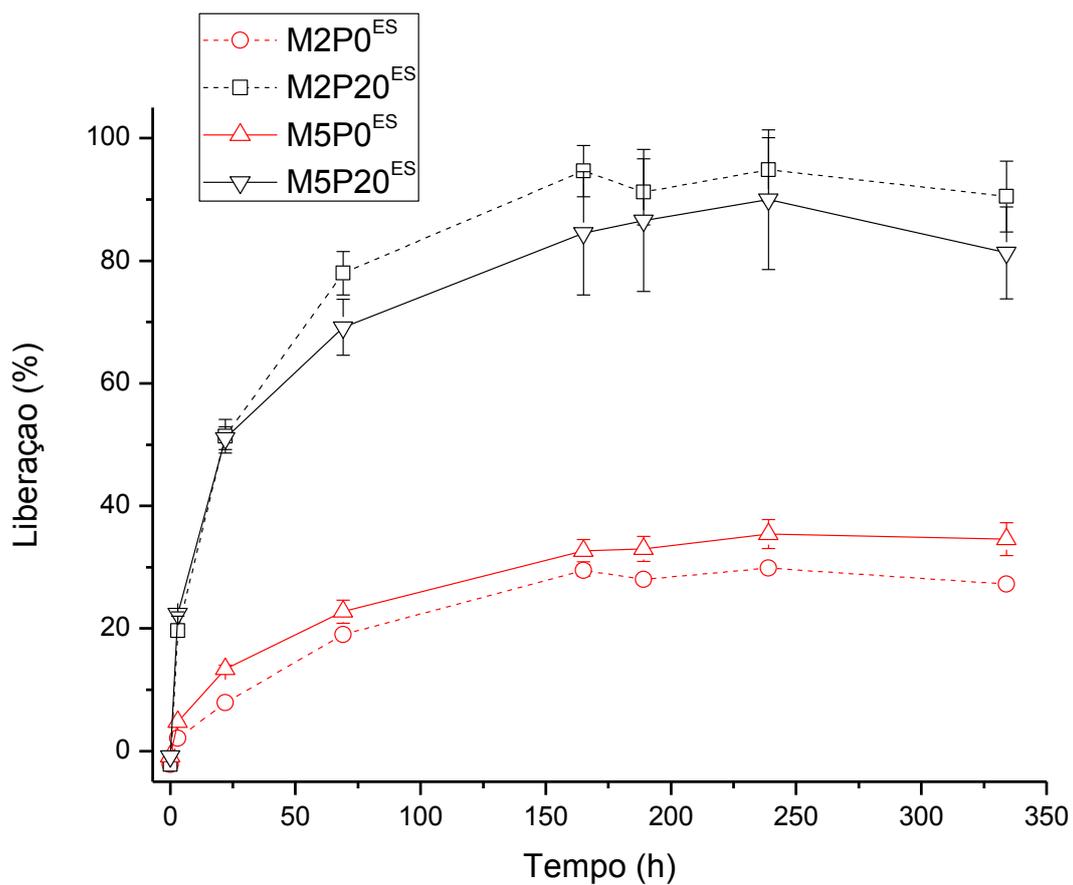


Figura 13 - Gráfico mostrando os perfis de liberação de membranas produzidas por evaporação de solvente

Em uma inspeção visual macroscópica (não mostrada) as membranas que receberam 5% de metronidazol apresentaram aglomerações que poderiam causar distorções na avaliação da liberação. A partir disso a concentração escolhida para o metronidazol foi de 2%.

4.1.2 Análise morfológica

A Figura 14 mostra imagens de microscopia óptica da superfície das membranas obtidas por evaporação de solvente.

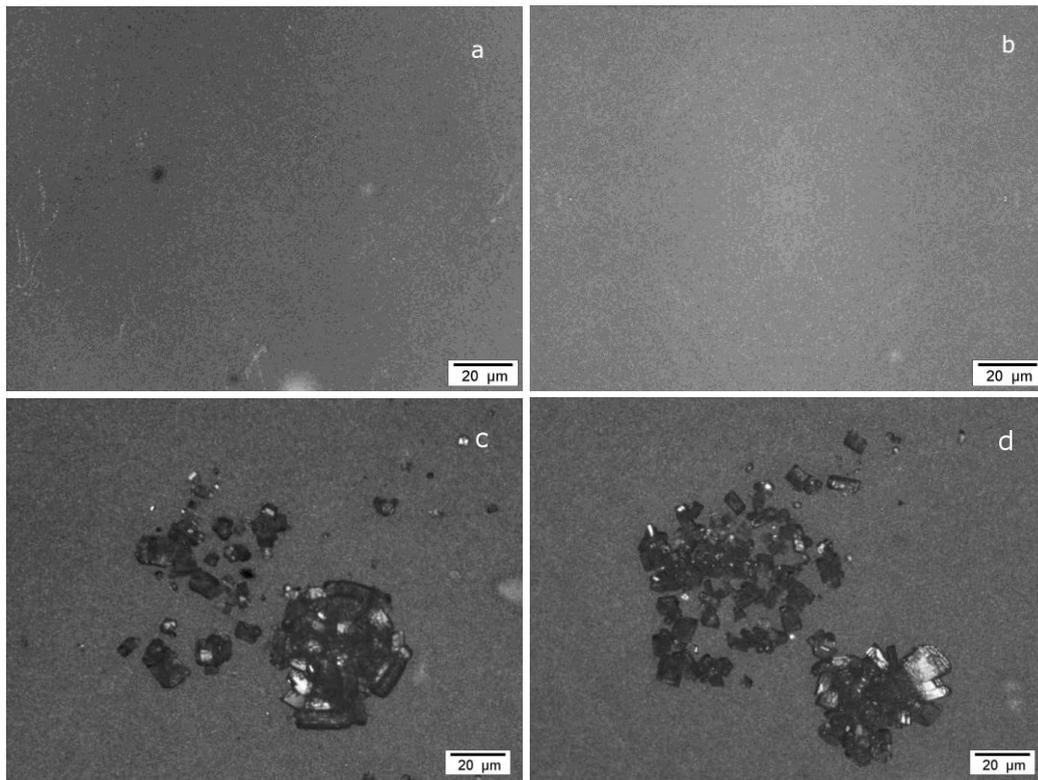


Figura 14- Imagens de microscopia óptica da superfície externa (em contato com o ar) das membranas obtidas por evaporação de solvente (a) M0P0^{ES}, (b) M0P20^{ES}, (c) M2P0^{ES} e (d) M2P20^{ES} (100X).

Ao observar em microscopia óptica as superfícies das diferentes composições de membranas feitas pelo método de evaporação de solvente (M0P0^{ES}, M2P0^{ES}, M0P20^{ES} e M2P20^{ES}) pode-se notar que as membranas que não receberam o fármaco apresentam-se bastante uniformes independentemente da presença do plastificante, ou seja, aparentemente, houve uma boa interação entre o polímero e o plastificante.

Nas membranas que receberam metronidazol é possível notar nesse aumento, a formação de alguns aglomerados, fato que pode ser confirmado por meio das imagens de MEV (Figura 15). Todas as membranas apresentaram-se densas.

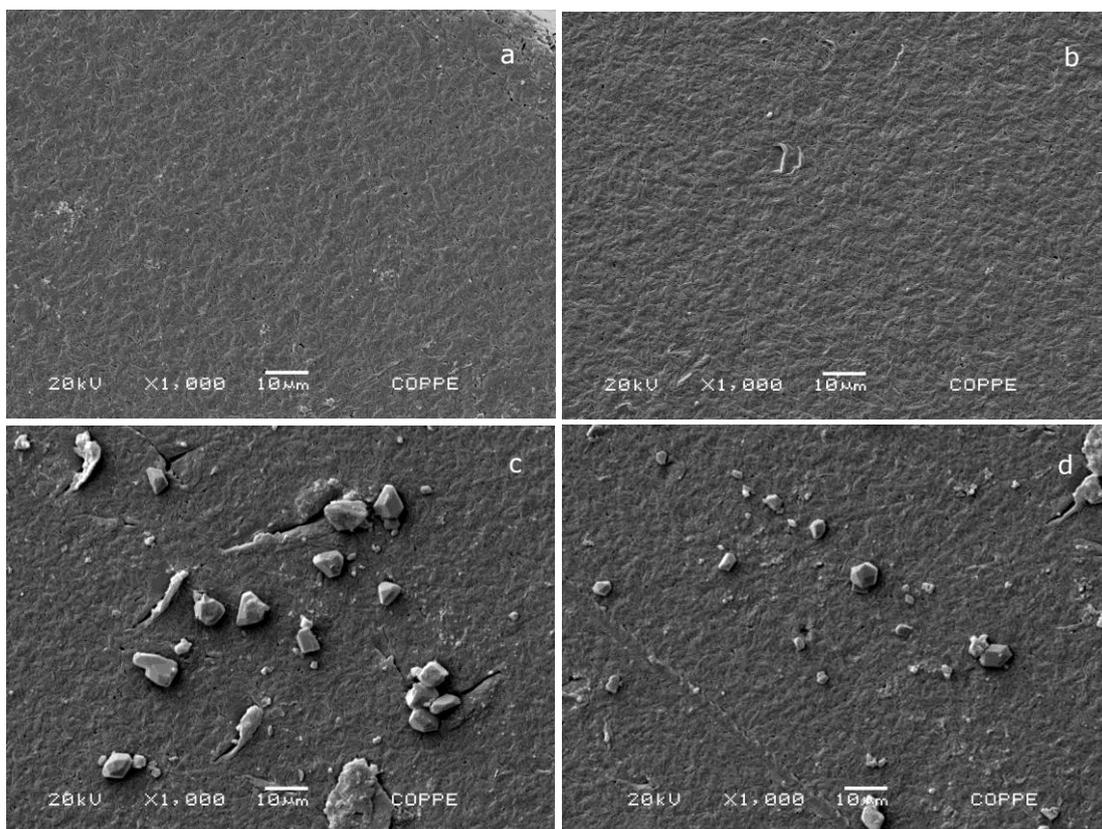


Figura 15 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície externa (em contato com o ar) das membranas obtidas por evaporação de solvente. (a) MOP0^{ES}, (b) MOP20^{ES}, (c) M2P0^{ES} e (d) M2P20^{ES}.

4.1.3 Ensaio mecânico

Por meio de observação macroscópica, verificou-se que as membranas de PHB produzidas por evaporação de solvente tiveram por característica rigidez e baixa maleabilidade. De forma a aumentar a maleabilidade da membrana, o plastificante citrato de etila foi adicionado ao PHB e o efeito da adição do plastificante foi avaliado.

Para tal as amostras foram submetidas ao ensaio de tração, cujo resultado é apresentado na Figura 16. A adição de 20% de plastificante alterou consideravelmente as propriedades mecânicas da membrana. Esse resultado está de acordo com o observado por CHOI *et al.* (2004).

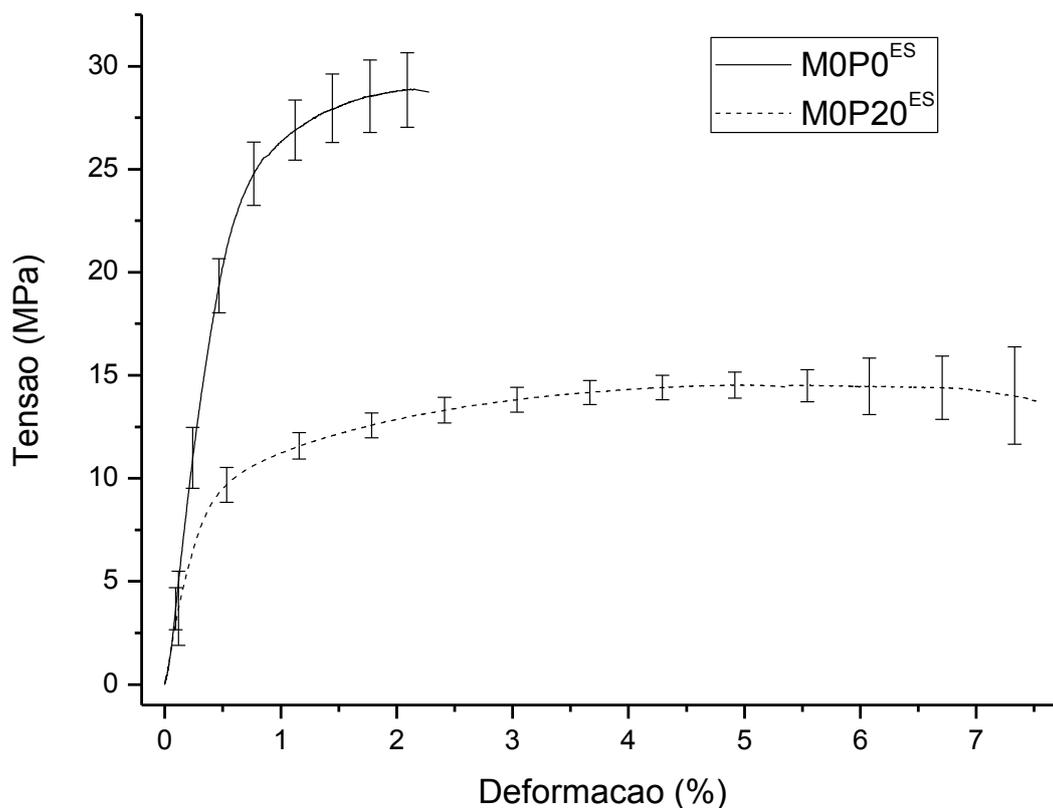


Figura 16 - Curvas Tensão X Deformação obtidas nos ensaios de tração. As curvas mostram a diferença nas médias das propriedades mecânicas dos corpos de prova com e sem o plastificante citrato de etila.

A adição de plastificante facilita o processamento e a utilização da membrana por parte do profissional, uma vez que no local de aplicação, a membrana precisa ser conformável, mantendo, no entanto, a sua integridade estrutural. O PHB puro é muito

rígido e pouco maleável como observado na Figura 16. A membrana sem plastificante apresentou 28,49 MPa ($\pm 2,33$ MPa) de tensão limite de resistência à tração foi obtida e a membrana com 20% de plastificante, 14,78 MPa ($\pm 0,69$ MPa). Também foi notado um aumento na deformação máxima sofrida pelo material. A adição de plastificante à membrana fez com que a alongação máxima fosse elevada de 6,5% ($\pm 2,83\%$) para 17,09% ($\pm 3,12\%$).

CHOI E PARK (2004), em estudo que avaliou as propriedades mecânicas do poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato - 94/6% (p/p)) (PHBV) com diferentes plastificantes, também observaram aumento na alongação e diminuição no módulo de elasticidade e na resistência à fratura nas amostras de PHBV contendo 20% do plastificante citrato de etila se comparadas às amostras de PHBV puro.

A adição de plastificante também levou à diminuição do módulo de elasticidade das membranas às quais ele foi adicionado. O PHB puro apresentou um módulo secante médio de 2,41 GPa ($\pm 0,40$ GPa) enquanto que para as membranas M2P20^{ES} foi obtido um módulo médio de 1,27 GPa ($\pm 0,04$ GPa).

Por meio da análise de variância - one-way ANOVA, fator: quantidade de plastificante, com níveis 0 e 20%, (Tabela 12, Anexo 1) provou-se que a adição de plastificante ao PHB foi responsável por uma redução significativa no valor do módulo das membranas ($p = 3,95 \times 10^{-5}$). Esse resultado foi corroborado pelo teste de Tukey com um nível de significância de 95%.

A membrana periodontal tem como objetivo ser colocada entre o osso alveolar e os tecidos conjuntivo e epitelial da gengiva que circunda o dente cobrindo o defeito periodontal conforme demonstrado no esquema da Figura 8. Além da função de barreira, selecionando a fonte doadora de células para o repovoamento do defeito, a membrana também possui a função de proteção e, por esse motivo, as propriedades mecânicas das membranas de barreira têm sido estudadas (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012). Membranas com resistência mecânica à ruptura tão baixa quanto 0,017

MPa têm sido consideradas viáveis para atuar como membranas de barreira (FUJIHARA, KOTAKIB E RAMAKRISHNA, 2005). Membranas comerciais com resistência mecânica entre 10 MPa e 15 MPa têm sido utilizadas, sendo esse último valor similar à resistência das membranas contendo 20% plastificante do presente trabalho (MILELLA, RAMIRES, *et al.*, 2001 ; BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012).

As membranas com plastificante do presente trabalho apresentaram resistência mecânica próxima às das membranas comerciais (ex: Resolut LT®), podendo-se considerar o uso do plastificante citrato de etila na proporção de 20% p/p como adequado para a produção das membranas de PHB (BOTTINO, THOMAS, *et al.*, 2012).

4.1.4 Análise microestrutural

A Figura 17 mostra os difratogramas de raios X das membranas produzidas por evaporação de solventes e do metronidazol.

Os principais picos característicos do PHB ($2\theta = 13,75^\circ$; $2\theta = 17^\circ$; $2\theta = 22^\circ$; $2\theta = 25,5^\circ$; $2\theta = 27,35^\circ$ e $2\theta = 30^\circ$), ficha JCPDS - ICDD (49-2212) podem ser observados no difratograma apresentado na Figura 17. A adição de citrato de etila alterou o difratograma característico do PHB. É possível, por exemplo, observar a presença de dois picos por volta de $2\theta = 22^\circ$ onde originalmente os picos estavam provavelmente sobrepostos.

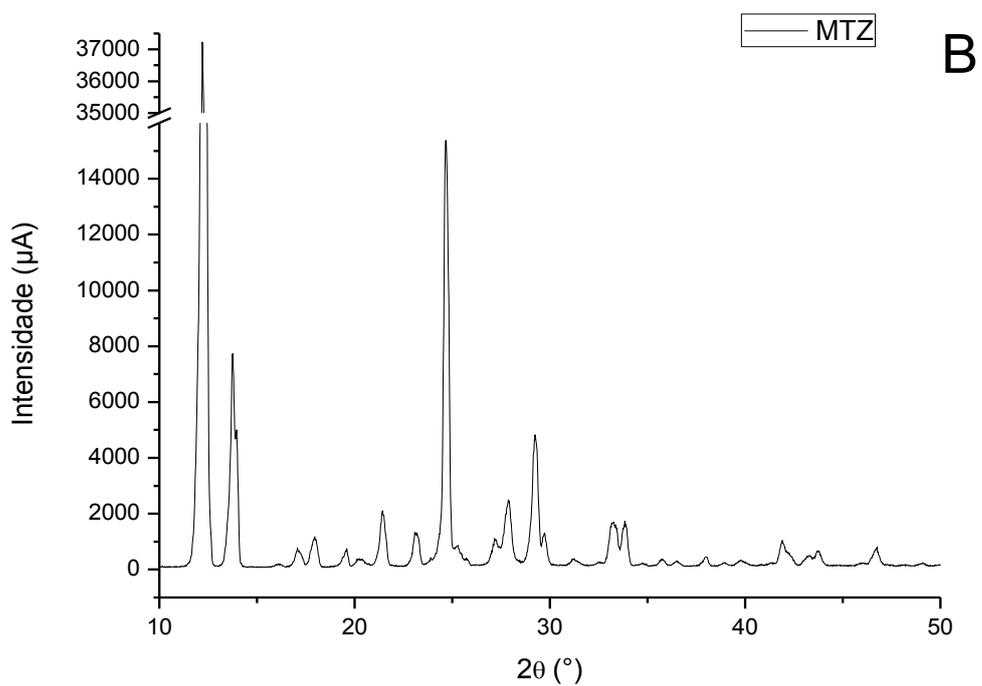
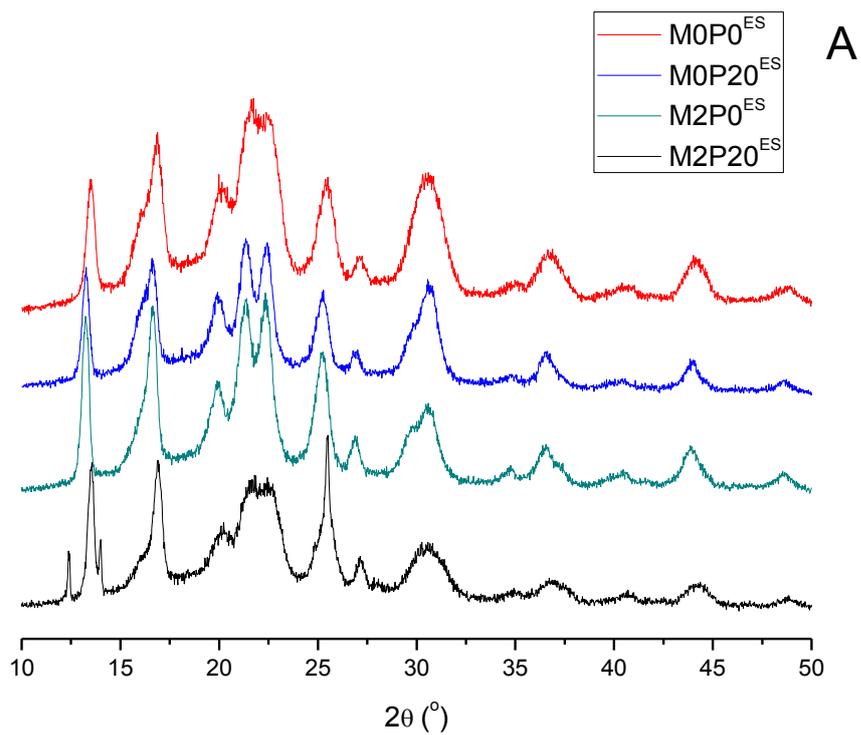


Figura 17 – (A) Difractogramas das amostras produzidas por evaporação do solvente e as alterações produzidas pela adição do MTZ e do citrato de etila ao PHB. (B) Difractograma do fármaco metronidazol.

Em contrapartida a adição de metronidazol (Figura 17 B), material cristalino com picos intensos e bem definidos (ficha JCPDS - ICDD (38-1556)), parece ter aumentado a intensidade dos picos característicos do PHB (ficha JCPDS - ICDD (49-2212)). Também é possível notar, por conta dessa adição, dois pequenos picos volta de $2\theta = 12^\circ$ e 14° .

A fração cristalina dos materiais foi calculada como descrito no item 3.3. Os resultados desse cálculo estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Cristalinidade das diferentes composições de membranas produzidas.

Cristalinidade	
M0P0 ^{ES}	71,9%
M2P0 ^{ES}	61,8%
M0P20 ^{ES}	55,2%
M2P20 ^{ES}	65,1%

A inclusão de plastificante fez com que houvesse uma redução da cristalinidade devido, possivelmente, à capacidade deste de dificultar o empacotamento das cadeias de PHB. Também é possível notar que a inclusão pura de MTZ também provocou redução dessa cristalinidade embora menor que a provocada exclusivamente pelo plastificante. Quando ambos os aditivos foram adicionados houve uma redução da cristalinidade.

Vale ressaltar que a adição de plastificante e do fármaco concomitantemente (amostras M2P20^{ES}), tornou o PHB mais maleável, quando comparado ao M0P0^{ES}, onde alargamento dos picos é observado, indicando diminuição da perfeição cristalina / menor cristalinidade. Foi possível produzir um material com base em PHB, carregado com metronidazol e maleável.

4.1.5 Análise térmica

As amostras foram analisadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC), Figura 18. Observou-se que no PHB puro, a temperatura de transição vítrea (T_g) apresentou um valor de 4°C, valor esperado para amostras de PHB (ABDELWAHAB, FLYNN, *et al.*, 2012). Com a adição de plastificante há uma redução da T_g para -2°C, resultado esperado uma vez que a função do plastificante é se posicionar entre as cadeias da fase amorfa facilitando a movimentação das mesmas. Foi observado que a adição do metronidazol ao PHB na ausência de plastificante, causou uma redução da T_g para o valor de 3°C. Tal redução foi observada para uma única amostra de cada condição. A adição de ambos, entretanto, parece ter tido um efeito sinérgico, pois o valor da T_g foi reduzido de forma mais consistente (-13°C).

A temperatura de fusão cristalina (T_m) diminuiu com adição de plastificante, indicando interferência do mesmo não apenas com a parte amorfa, mas também com a parte cristalina do PHB. Em adição, observou-se o aparecimento de um segundo pico de fusão cristalina em temperaturas menores nas amostras com plastificante apenas (M0P20^{ES}), provável indicativo de formação de cristalitos mais imperfeitos devido à presença do plastificante.

A adição conjunta de plastificante e de metronidazol acarretou não apenas um alargamento do pico de fusão do PHB (provável superposição dos picos dos cristalitos mais imperfeitos com o pico de fusão do PHB), mas também a presença de pico de cristalização (Temperaturas ~50°C) devido a prováveis interações plastificante-metronidazol (Figura 18).

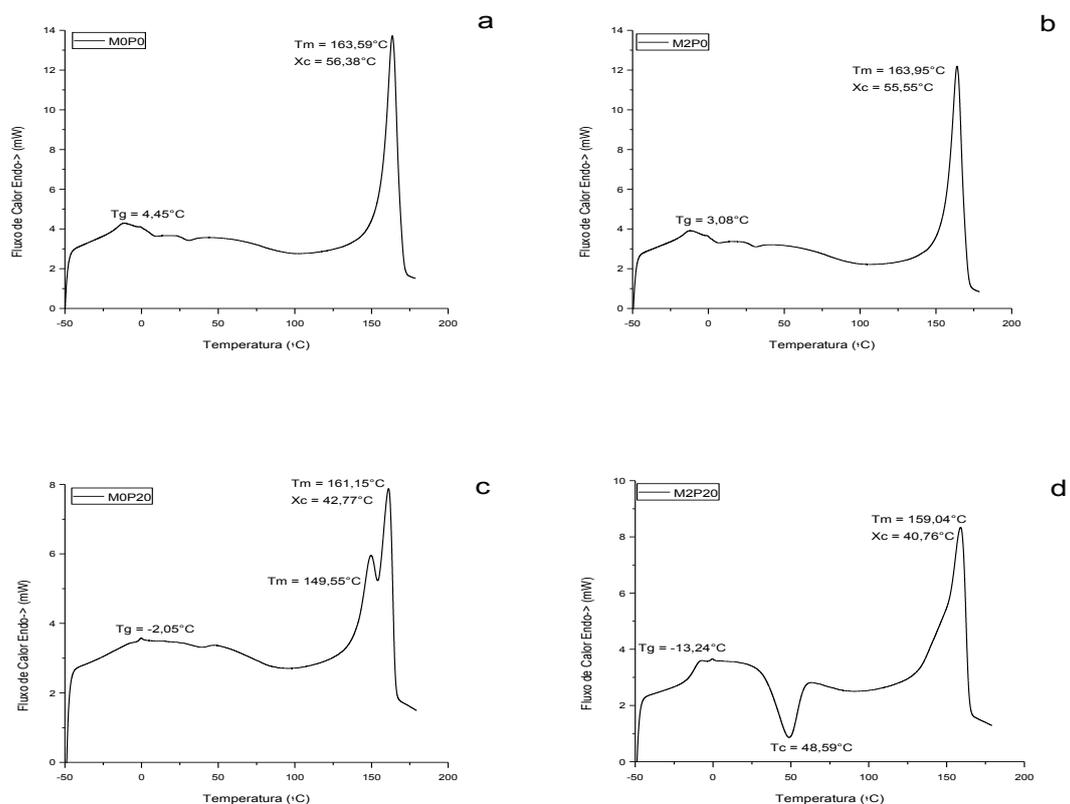


Figura 18 – Curvas de calorimetria diferencial de varredura (2^o. Aquecimento) mostrando membranas obtidas por evaporação de solvente (a) M0P0^{ES}, (b) M2P0^{ES}, (c) M0P20^{ES} e (d) M2P20^{ES}.

A fração cristalina das amostras foi calculada pelo método de difração de raios-X e por calorimetria diferencial de varredura e foram apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Comparação entre cristalinidade das amostras obtida por DRX e DSC.

	Cristalinidade das amostras	
	DSC	DRX
M0P0 ^{ES}	56,3%	71,9%
M2P0 ^{ES}	55,5%	61,8%
M0P20 ^{ES}	42,7%	55,2%
M2P20 ^{ES}	40,7%	65,1%

De acordo com os dados apresentados na tabela 4 a cristalinidade do PHB é afetada tanto pela presença do plastificante como pela presença do MTZ como indica a análise de DSC. A análise de DRX mostra uma tendência diferente da análise do DSC. Isso pode estar relacionado à distribuição do metronidazol na amostra.

O MTZ apresenta-se distribuído de maneira não homogênea, formando aglomerados tanto no interior da matriz quanto na superfície (Figura 14). Essa distribuição pode gerar variações na cristalinidade da amostra dependendo da região na qual o corpo de prova foi cortado.

4.1.6 Considerações preliminares

Com a produção e a caracterização das amostras, observou-se que o processo de evaporação de solvente produzia variações consideráveis nas amostras a cada batelada e, portanto, seria preciso otimizar o processo, de forma a otimizar a produção das membranas de PHB.

O tempo gasto na produção das membranas pelo processo de evaporação de solvente era muito grande. Somando-se todas as etapas do processo para a

confeção da solução esse tempo alcançava 4:20 horas. A esse tempo somava-se o tempo da evaporação propriamente dita fazendo com que o tempo total chegasse a mais de 28 horas.

O processamento por moldagem por compressão a quente poderia representar uma alternativa viável para otimização do processo de produção das membranas, visto que o tempo total de obtenção da membrana era de 46 minutos. E que esse também apresentava maior reprodutibilidade. Tais características fazem da moldagem por compressão um processo muito mais adequado a uma produção comercial.

Os resultados obtidos para as membranas produzidas pelo processo de evaporação de solvente serviram como base para definição da composição da amostra a ser utilizada na produção das membranas pelo processo de moldagem por compressão.

4.2 Membranas produzidas por moldagem por compressão.

4.2.1 Análise morfológica

A Figura 19 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura comparando a superfície externa das membranas contendo metronidazol e plastificante obtidas por evaporação de solvente, M2P20^{ES} (a) e por moldagem por compressão, M2P20^{MC}.

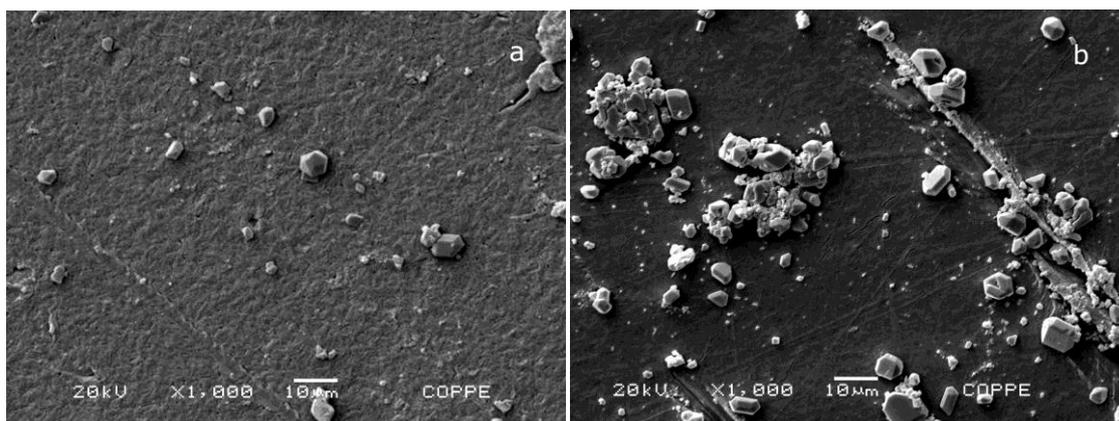


Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície externa das membranas M2P20^{ES} e da M2P20^{MC} (1000X)

A Figura 20 mostra a superfície de fratura de uma membrana M2P20 feita por moldagem por compressão. Nessa imagem é possível ver cristais de metronidazol no interior da matriz da membrana (detalhe).

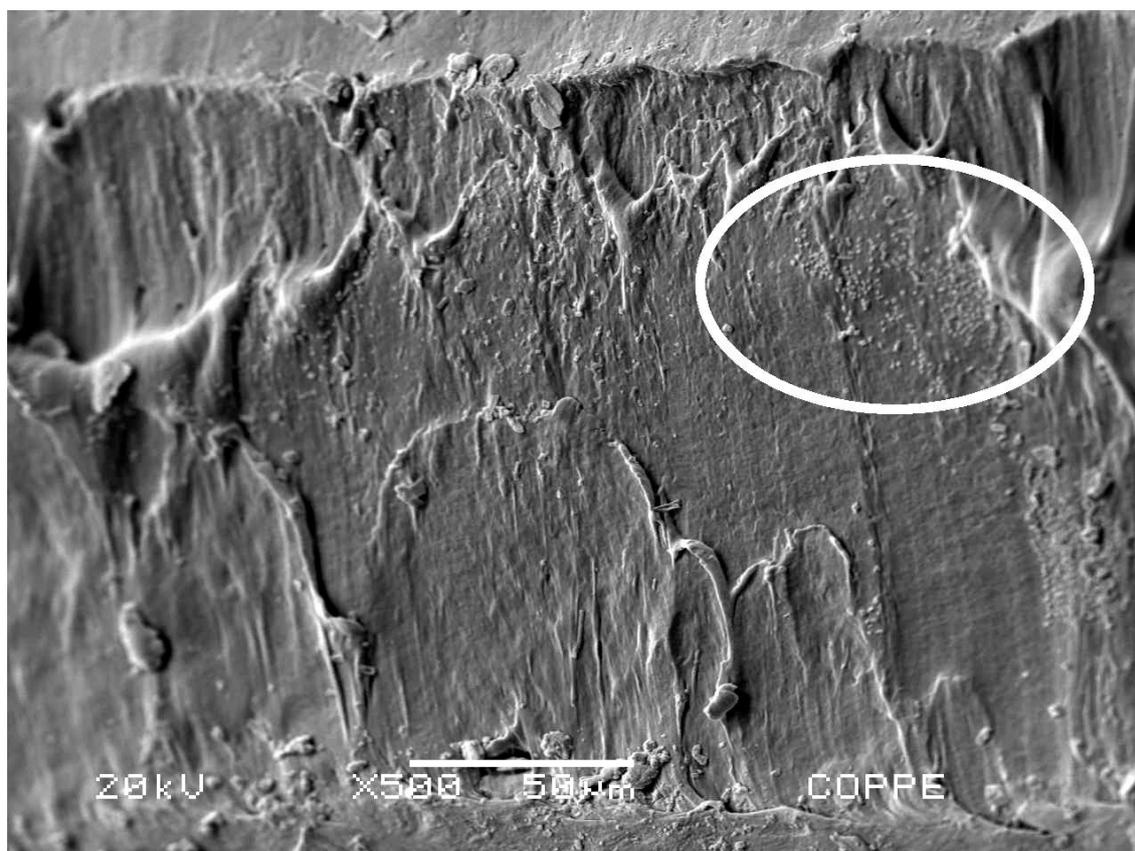


Figura 20 - Foto feita por microscopia eletrônica de varredura mostrando a face de fratura de uma membrana M2P20MC. No detalhe cristais de MTZ.

A Figura 21 mostra imagens de microscopia óptica das membranas obtidas pelo processo de evaporação de solvente e por moldagem por compressão.

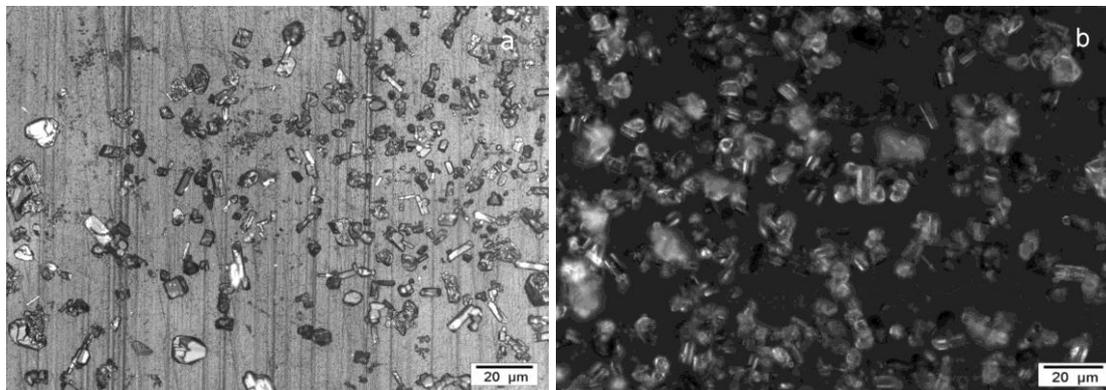


Figura 21 - imagens de microscopia óptica de membranas produzidas por moldagem por compressão - M2P20^{MC} (a) e por evaporação de solvente - M2P20^{ES} (b) (100X)

Ao observar em microscopia eletrônica de varredura (Figura 19) e em microscopia óptica (Figura 21) as membranas que receberam 2% de fármaco e 20% de plastificante feitas pelo método de evaporação de solvente (M2P20^{ES}) e de moldagem por compressão (M2P20^{MC}), pode-se notar que há semelhanças na distribuição dos cristais de metronidazol pela matriz e superfície entre os dois diferentes processos.

4.2.2 Ensaio mecânico

A Figura 22 apresenta as curvas de tração das membranas contendo fármaco e plastificante, obtidas por evaporação de solvente e por moldagem por compressão (M2P20^{ES} e M2P20^{MC}). Ambas as membranas atingiram tensões de ruptura superiores a 12 Mpa e deformações maiores que 7%. Segundo o trabalho de

BOTTINO *et al.* (2012) membranas comerciais bem aceitas no mercado costumam apresentar tensões de ruptura inferiores a essa.

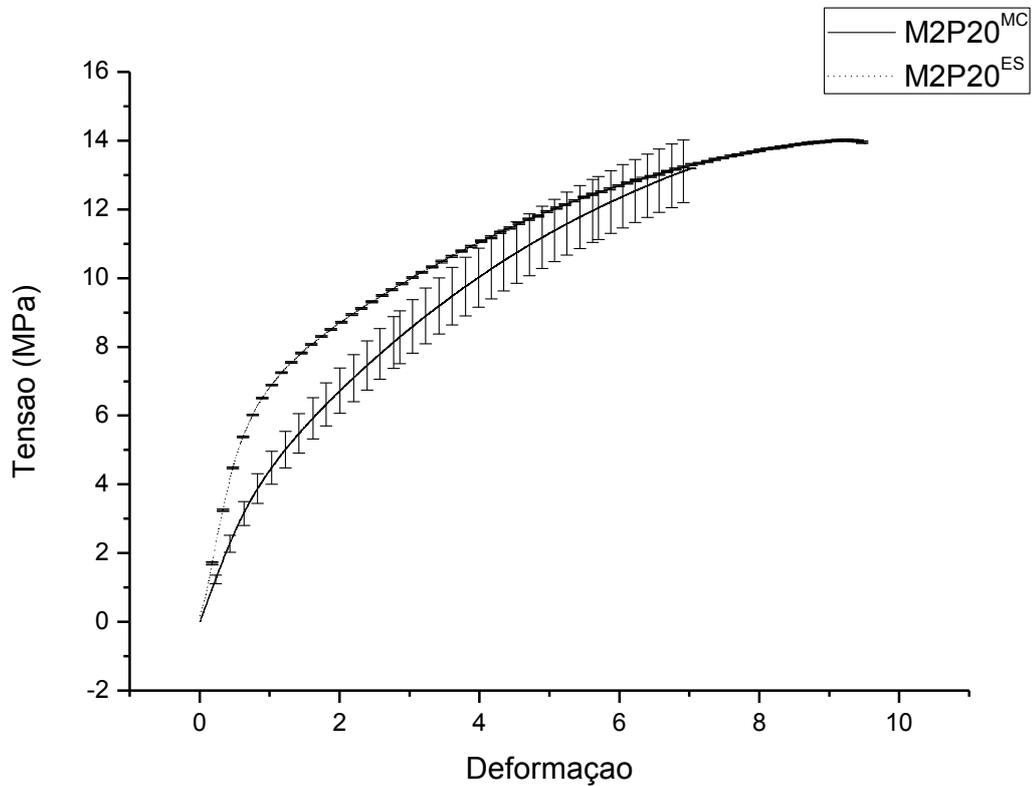


Figura 22 - Curva Tensão X Deformação obtida no ensaio de tração. Diferenças do comportamento mecânico entre M2P20^{ES} e M2P20^{MC}.

As membranas produzidas por compressão foram submetidas à análise dinâmico-mecânica. Esses resultados foram resumidos na Tabela 5.

Os resultados obtidos para as temperaturas de transição vítrea corroboram os resultados encontrados na literatura para o PHB (MISRA, VALAPPIL E ROY, 2006 ; RENSTAD, KARLSSON E ALBERTSSON, 1997).

Tabela 5 - Resultados da análise dinâmico - mecânica realizado nas membranas produzidas por moldagem por compressão mostrando os valores obtidos para G' e G''(em 37°C) e Tg.

	Tg (°C)	G' (MPa)	G'' (MPa)
M0P0 ^{MC}	10 ±3	4099,68 ±495,72	377,63 ±14,79
M2P0 ^{MC}	9 ±1	4209,49 ±188,72	379,34 ±23,26
M0P20 ^{MC}	3 ±3	2130,94 ±441,15	264,16 ±41,44
M2P20 ^{MC}	0 ±3	1822,91 ±273,7	213,02 ±38,68

Os resultados do DMA mostraram por meio de análise via 2 way ANOVA, $\alpha = 0,05$, $n = 3$, que a adição do plastificante e do metronidazol, cada qual testado em dois níveis (0% e 20% de plastificante e 0% e 2% de metronidazol, respectivamente), ao PHB provocou as seguintes alterações nas propriedades mecânicas das membranas:

- A adição do plastificante alterou significativamente a temperatura de transição vítrea (Tg) ($p = 0,001$), enquanto que a adição do metronidazol não alterou significativamente esses valores ($p = 0,37$). Não foi notada interação significativa entre os aditivos ($p = 0,634$). Resultados corroborados pelo teste de Tukey (Tabela 13, Anexo 1).
- A adição do plastificante alterou significativamente os valores do módulo de cisalhamento (G') ($p = 1,91 \times 10^{-6}$), enquanto que a adição do metronidazol não alterou significativamente esses valores ($p = 0,63$). Não foi notada interação significativa entre os aditivos ($p = 0,32$). Resultados corroborados pelo teste de Tukey (Tabela 14, Anexo 1).
- A adição do plastificante alterou significativamente os valores do módulo de perda (G'') ($p = 2,91 \times 10^{-5}$), enquanto que a adição do metronidazol não

alterou significativamente esses valores ($p = 0,20$). Não foi notada interação significativa entre os aditivos ($p = 0,17$). Resultados corroborados pelo teste de Tukey (Tabela 15, Anexo 1).

4.2.3 Análise microestrutural

As amostras M2P20 obtidas pelas diferentes rotas foram também analisadas por difração de raios-X (Figura 23). As amostras obtidas por moldagem por compressão apresentaram alguns picos com maior definição, por exemplo, em aproximadamente $2\theta = 22^\circ$. Entretanto, os difratogramas obtidos para ambas as amostras podem ser considerados similares, não foram observadas variações de intensidade dos picos estudados ou deslocamento de picos.

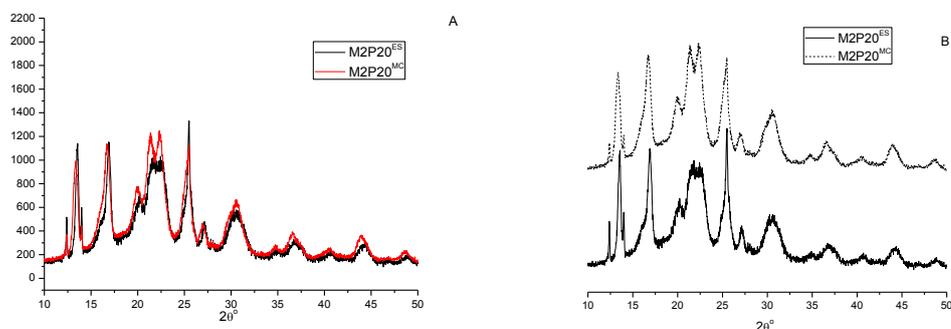


Figura 23 – (A) Difratogramas das amostras M2P20^{ES} e M2P20^{MC} e (B) Detalhe de A.

Os difratogramas das amostras M2P20^{ES} e M2P20^{MC} (Figura 23) apresentaram picos característicos do MTZ Figura 17. Além dos picos característicos do PHB, as alterações promovidas pelo citrato de etila e pelo metronidazol (como o a separação dos dois picos volta de $2\theta = 22^\circ$ e os picos relativos ao MTZ em $2\theta = 12^\circ$ e 14° –

vistos anteriormente na Figura 17) encontram-se presentes em ambas as condições tornando-as semelhantes.

Em um ensaio prévio (não mostrado) feito em amostras M2P0^{MC} e M2P20^{MC} em meio PBS pH7,4 os perfis de liberação das amostras contendo plastificante mostraram maior liberação que aquelas sem o plastificante. Tal fato é esperado uma vez que o plastificante afasta as cadeias permitindo maior liberação de fármaco. Isso pode ser comprovado pelo DRX (Figura 17) e pela análise de DMA (Tabela 5) que mostraram aumento da fase amorfa.

4.3 Curva padrão do metronidazol

Para estabelecimento de uma curva padrão que correlacionasse a absorção da luz com a concentração do metronidazol no meio analisado foi realizada uma varredura do espectro ultravioleta-visível (Figura 24).

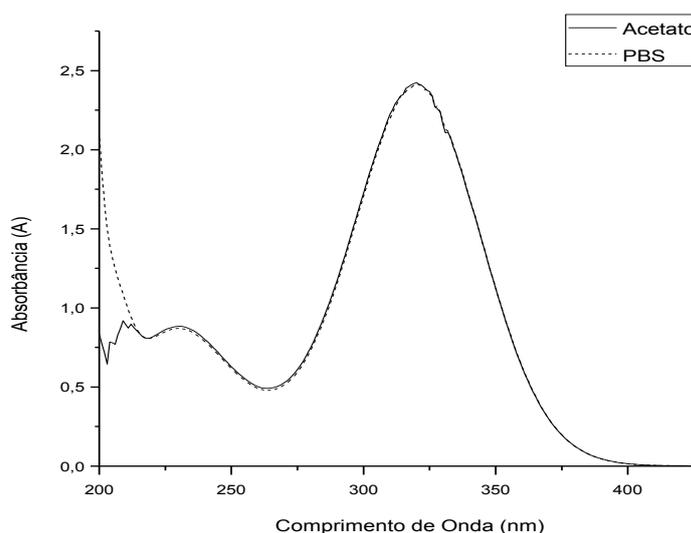


Figura 24 - Espectro Uv-Vis (200-800 nm) para o fármaco metronidazol em meio tampão acetato de potássio a pH 5,0 e tampão PBS a pH 7,4.

Observou-se um pico de absorção em 231 nm (Zamani, Morshed, et al., 2010), e um pico de maior intensidade no comprimento de onda de 320 nm. Este último passou a ser considerado o pico de referência do metronidazol para a construção da curva padrão em tampão acetato e tampão PBS utilizada nesse trabalho (Figura 25). Observou-se também que para comprimentos de onda maiores que ~220 nm, não há diferenças perceptíveis na maneira como o metronidazol absorve a luz do meio tampão acetato em pH 5,0 ou do meio tampão PBS em pH 7,4.

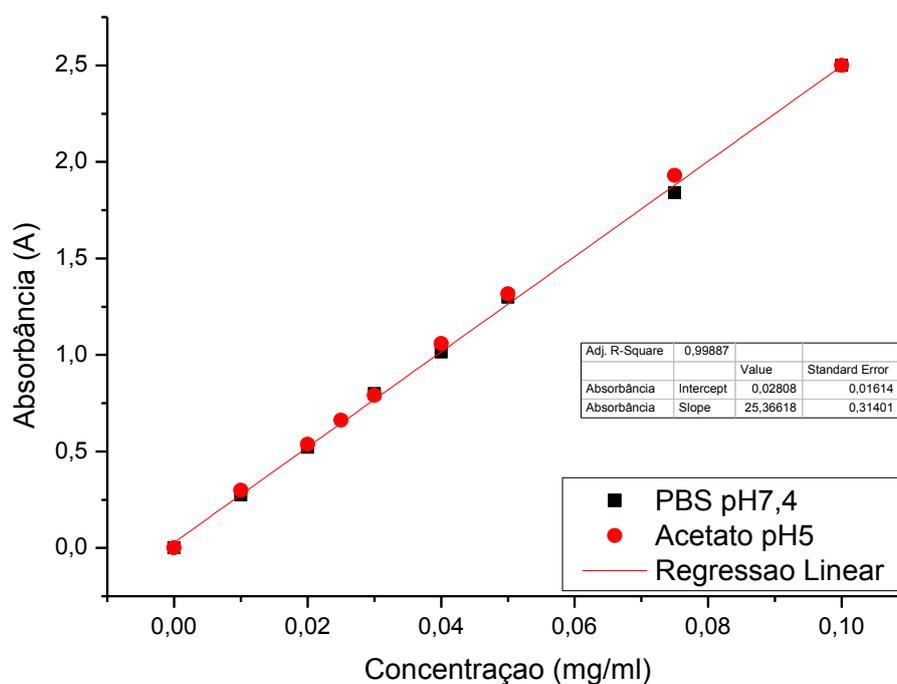


Figura 25- Curva padrão associando a concentração do fármaco no meio com a absorbância dada pelo espectrofotômetro em comprimento de onda 320 nm para os meios PBS pH7,4 e acetato pH5,0.

A semelhança entre os espectros UV-Vis obtidos pela varredura para o meio tampão acetato e tampão PBS reflete-se na construção da curva padrão, mostrando

que qualquer que seja a concentração escolhida a absorvância referente a esta será a mesma para qualquer dos dois meios estudados.

4.4 Lixiviação das membranas

A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura mostrou que as membranas contendo MTZ, quer tenham sido produzidas por evaporação de solvente (Figura 19 - a), quer tenham sido produzidas por moldagem por compressão (Figura 19 - b), apresentaram cristais de metronidazol adsorvidos à superfície.

Em ensaios de liberação preliminares (4.1.1) foi detectado que a liberação inicial do metronidazol era muito intensa se comparada a que podia ser observada no resto do ensaio. Essa liberação inicial poderia estar associada à dissolução dos cristais desse fármaco adsorvidos à superfície da membrana.

Tal liberação inicial poderia apresentar problemas de citotoxicidade, visto que o metronidazol em altas dosagens é capaz de causar citotoxicidade local (FERREIRA, MYIACI, *et al.*, 2010). Para evitar tal efeito deletério parte das membranas que seriam submetidas ao ensaio de liberação de metronidazol passou por um processo de lixiviação prévio conforme descrito no item 3.8.

A efetividade do processo de lixiviação na remoção dos cristais da superfície pôde ser atestada pelo exame visual em um microscópio óptico (Figura 26).

O acúmulo de metronidazol na superfície das membranas foi avaliado por espectrofotometria UV-Vis da água utilizada para a lixiviação. A concentração do fármaco encontrada na água foi de 582,09 µg ($\pm 55,33$ µg).

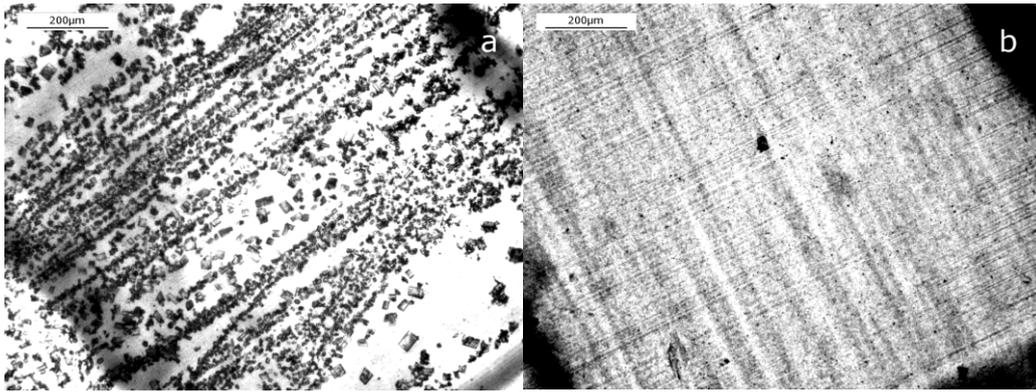


Figura 26 - Micrografia por microscopia óptica em corpos de prova antes do processo de lixiviação. (a) Superfície do corpo de prova não lixiviado M2P20^{MC} e (b) superfície do corpo de prova após o processo de lixiviação M2P20^{MC}_L.

Os corpos de prova desse ensaio possuíam as seguintes dimensões: 8 mm X 100 mm (L x C) com espessura média de 0,275 mm ($\pm 0,026$ mm) (conforme item 3.2). A área média dos corpos de prova desse ensaio foi de 1669,66 mm² ($\pm 5,96$ mm²). Pode-se então afirmar que a quantidade de metronidazol localizada na superfície da membrana era de 0,35 µg / mm² ($\pm 0,048$ µg / mm²). Com base na quantidade de fármaco contido na água de lixiviação também se pode afirmar que a fração de metronidazol depositado na superfície é de 9,73% ($\pm 2,51\%$), da quantidade original de MTZ adicionado.

Levando-se em consideração que os tubos Falcon nos quais os corpos de prova estavam inseridos tinham a capacidade de 50 ml, a concentração de MTZ atingida na água de lixiviação foi de 11,64 µg / ml ($\pm 1,2$ µg / ml). FERREIRA *et al.* (2010) em seu trabalho mostra que uma concentração de 5 µg / ml por um período de 24 horas é suficiente para que apenas 70,06% das células sejam viáveis, o que indicaria citotoxicidade. É preciso, entretanto, levar em consideração que para a aplicação de membrana de barreira em cirurgia periodontal muitos fatores entram na equação da quantidade de MTZ que poderia ser considerada tóxica, tais como fluxo gengival e movimentação da membrana durante a mastigação sendo por tanto muito difícil avaliar *in vivo* esse limite.

Para efeitos de cálculo da quantidade de metronidazol inicial nas membranas M2P20^{MC}_L nos ensaios de liberação de metronidazol a quantidade de metronidazol lixiviada foi descontada.

Uma possibilidade que a intensa liberação inicial decorrente da dessorção dos cristais de metronidazol adsorvidos à superfície da membrana cria é a de que, uma vez que se respeitem os limites de citotoxicidade do metronidazol essa liberação inicial pode vir a ser pensada como dose de ataque em lesões muito infectadas por bactérias anaeróbias estritas.

4.5 Liberação do fármaco metronidazol

Uma vez traçada a curva padrão do metronidazol, foi possível realizar os ensaios de liberação de longo prazo desse fármaco conforme a metodologia descrita no item 3.9.2 e o ensaio de liberação em tempo real. Item 3.9.3.

Esses ensaios foram utilizados para estabelecer os perfis de liberação de metronidazol que a membrana possuía. O ensaio de liberação que forneceu informações mais relevantes foi o ensaio de 30 dias.

A escolha do meio a ser utilizado nos ensaios de liberação foi feita levando-se em consideração os meios aos quais a membrana é exposta quando é aplicada em cirurgia periodontal. Para atuar como barreira em uma cirurgia oral a membrana fica exposta ao meio intersticial fisiológico no momento em que há a cirurgia para a sua colocação. Esse fluido pode ser simulado pelo uso do tampão fosfato (PBS) em pH 7,4. Outro meio ao qual a membrana fica exposta é um meio com pH reduzido causado por reação inflamatória. Também exemplificando uma exposição a pH ácido e passível de serem encontradas nas cirurgias periodontais são as áreas que ficam expostas ao biofilme dental. Esse meio foi simulado pelo uso do tampão acetato de

potássio em pH 5,0. Uma vez que a aplicação alvo dessa tese é a cirurgia periodontal também se levou em consideração a utilização de saliva artificial. Entretanto, em uma cirurgia como essa a área de membrana exposta a esse meio seria muito pequena tendo sido preferível, portanto, concentrar os esforços na análise da liberação do metronidazol nos tampões PBS e acetato.

4.5.1 Ensaio de liberação de longo prazo

Como resultado da liberação do fármaco em meio tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 e meio acetato de potássio pH 5,0 em um ensaio de 30 dias obteve-se o perfil de liberação exibido na Figura 27.

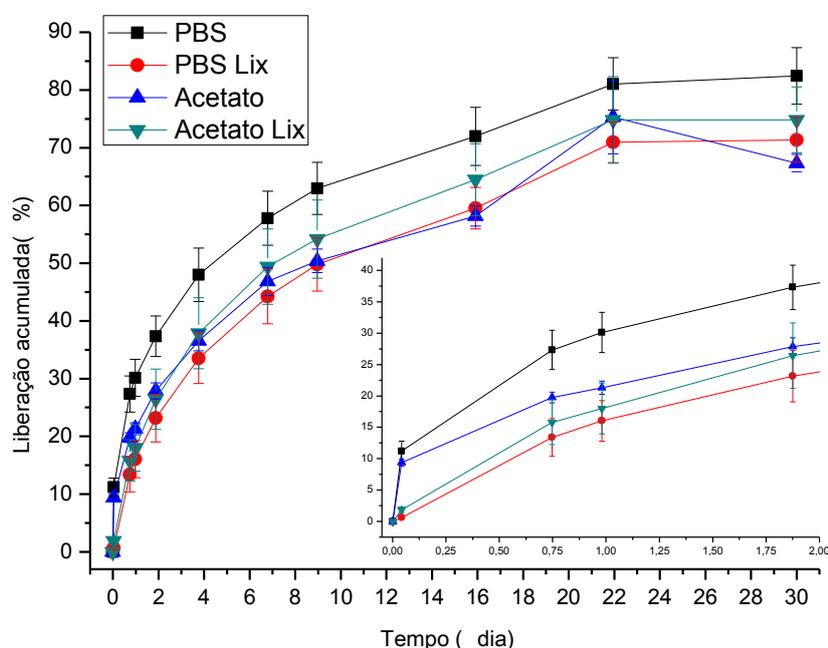


Figura 27 - Gráfico mostrando a diferença do perfil de liberação das membranas M2P20^{MC} e M2P20^{MC}_L em meio tampão PBS pH 7,4 e meio tampão acetato de potássio pH 5,0. No detalhe é possível ver a mesma curva nos primeiros 2 dias de ensaio.

Perfil semelhante de liberação foi observado para ambas as amostras, independentemente do meio. Pode-se notar também que a liberação do fármaco para o meio parece ter atendido a dois comportamentos distintos, uma fase inicial, de liberação rápida, e uma fase tardia, de liberação mais lenta.

No entanto, comparando as amostras lixiviadas e não lixiviadas (detalhe na Figura 27) em ambos os meios, foi possível observar que a taxa de metronidazol liberada durante a fase inicial (de até 5 dias) de amostras não lixiviadas era mais intensa. Provavelmente, este comportamento pode ser associado com o desprendimento de cristais de metronidazol inicialmente adsorvidos sobre a superfície do material.

Observa-se que o coeficiente angular das curvas é diferente no início, sendo o que coeficiente angular da curva do material lixiviado é significativamente menor ($p = 1,0251 \times 10^{-7}$), mostrando uma menor liberação inicial (Figura 27). Tal fato pode ser atestado pela análise de variância simples (one-way ANOVA) (Tabela 16, Anexo 1).

A liberação do metronidazol atingiu o equilíbrio em cerca de 22 dias, para todos os dispositivos, liberando mais de 65% do fármaco.

Apesar da semelhança entre as curvas médias, a dispersão dos dados obtidos nesse ensaio fez com que fosse necessário examinar a influência do meio e do processo de lixiviação na liberação do fármaco.

Ao agruparmos os dados desse ensaio nos dois diferentes meios utilizados obtivemos os gráficos da Figura 28.

Na Figura 28 foi possível notar que nem o meio utilizado no ensaio, nem o pH e nem o processo de lixiviação foram responsáveis por grandes diferenças na fase tardia da liberação.

Outra informação importante que foi possível extrair desse ensaio de liberação foi referente à taxa de liberação do fármaco.

O Metronidazol possui uma ação contra micro-organismos anaeróbios. Um dos mais agressivos em uma infecção periodontal é o *P. gingivalis*. Para que este fármaco seja efetivo contra esse patógeno, ele precisa atingir a concentração mínima inibitória (MIC) que na literatura é descrita como sendo de 0,122 µg/ml (WRIGHT, ELLEN, *et al.*, 1997).

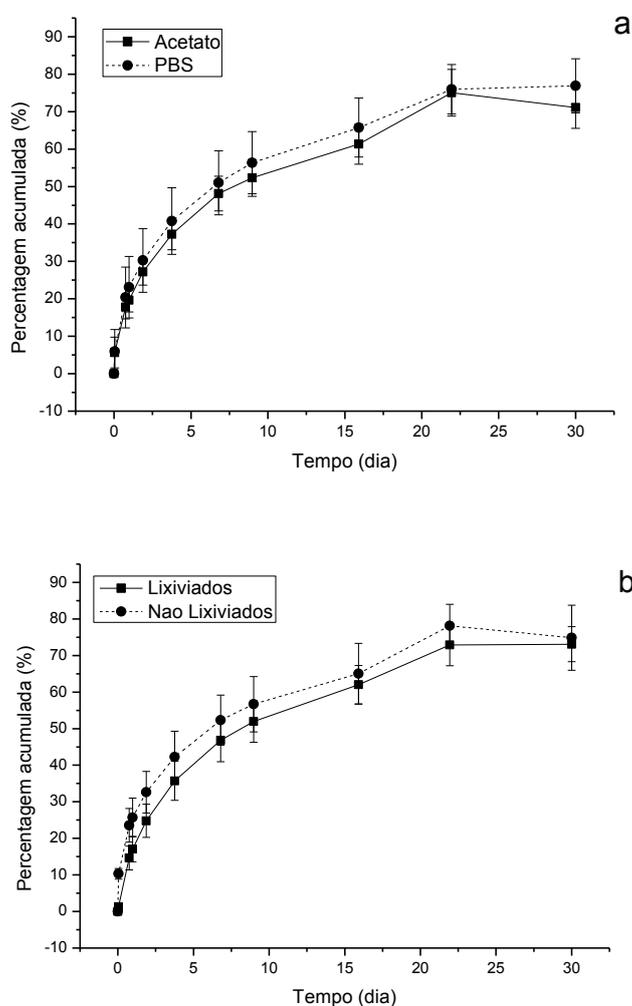


Figura 28 - Gráfico mostrando a curva de liberação das membranas M2P20^{MC} e M2P20^{MC}_L em meio tampão PBS pH 7,4 e meio tampão acetato de potássio pH 5,0. No gráfico “a” o agrupamento foi feito pelo meio e no gráfico “b” foi feito pelo processo de lixiviação.

Organizando os dados desse ensaio em uma função da concentração de metronidazol liberada pelo tempo do ensaio e comparando-se com a MIC do MTZ contra a *P. gingivalis* obteve-se o gráfico da Figura 29.

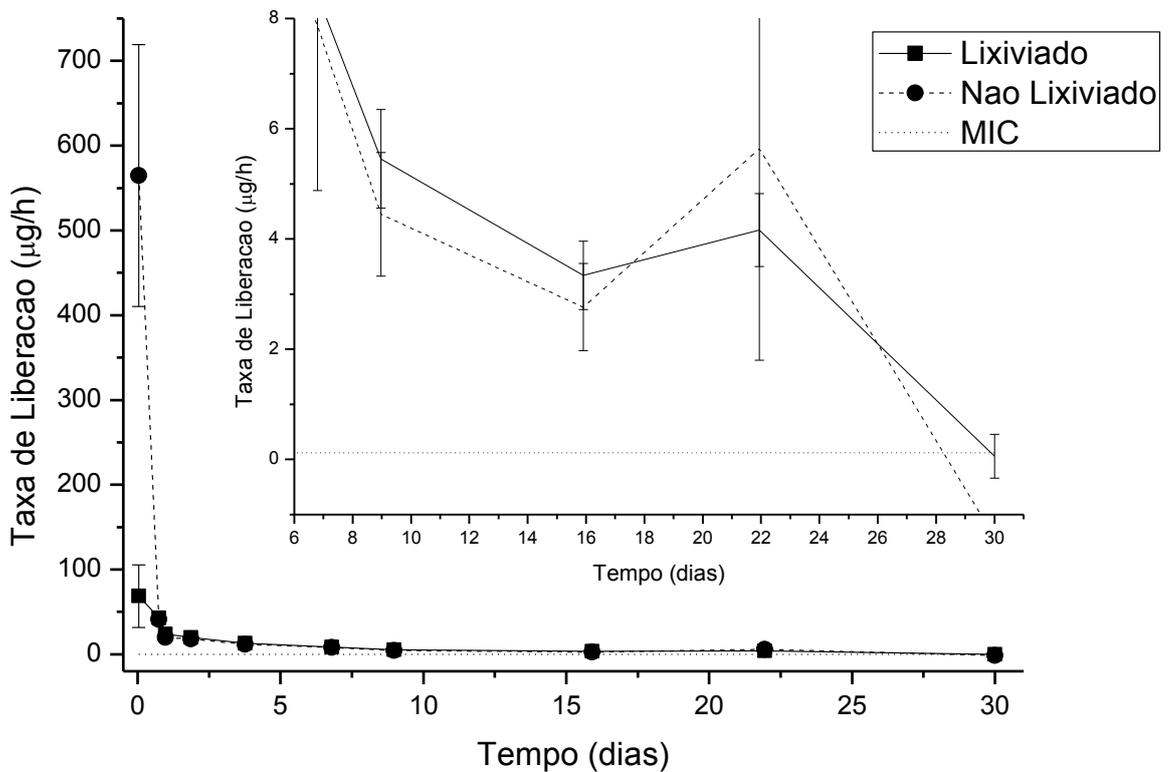


Figura 29 - Gráfico exibindo o fluxo de liberação de fármaco pelas membranas e a comparação com a MIC do metronidazol contra *P. gingivalis*. No detalhe as mesmas curvas em uma escala diferente.

Esse gráfico mostra, por meio da taxa de liberação e como já foi visto anteriormente, que a taxa inicial apresenta uma enorme diferença entre as amostras lixiviadas e não lixiviadas. Na primeira hora de ensaio a amostra coletada apresentou

uma taxa de liberação média das membranas não lixiviadas igual a 564,72 µg/h ($\pm 154,3$ µg/h) enquanto que aquelas lixiviadas apresentaram na mesma amostra (1 hora) taxa de liberação média de 68,66 µg/h ($\pm 36,94$ µg/h). Isso representa uma liberação aproximadamente 822% maior em favor das amostras não lixiviadas.

A partir da segunda amostra coletada (18 horas) não é mais possível perceber diferença significativa entre os grupos lixiviado e não lixiviado, como visto na Tabela 6.

Também foi possível notar no resultado desse ensaio que o desvio observado no perfil de liberação das amostras não lixiviadas foi bastante acentuado.

Por meio da lixiviação fica mais fácil prever a dose de fármaco liberada ao longo do tempo, utilizando doses de liberação mais controladas e de menor quantidade se comparado à dose que o dispositivo não lixiviado liberaria para garantir que este alcançasse a concentração mínima inibitória (MIC) do metronidazol contra *P. gingivalis*.

A comparação do fluxo de liberação do metronidazol com a concentração mínima inibitória contra a *P. gingivalis* mostrou que tanto as amostras lixiviadas quanto aquelas que não passaram pelo processo de lixiviação mantiveram-se efetivas contra este patógeno por, pelo menos, 26 dias.

Tabela 6 – Análises de variância entre das taxas de liberação entre os grupos lixiviado e não lixiviado.

Liberação (horas)	Não Lixiviado		Lixiviado		p	Tabela ANOVA
	Média ($\mu\text{g/h}$)	Desvio ($\pm\mu\text{g/h}$)	Média ($\mu\text{g/h}$)	Desvio ($\pm\mu\text{g/h}$)		
18	41,3	$\pm 6,5$	43	± 6	0,65	Tabela 17 – Anexo 1
23,5	20	$\pm 3,2$	23,8	$\pm 4,7$	0,12	Tabela 18 – Anexo 1
45	17,9	$\pm 5,6$	19,8	$\pm 2,4$	0,46	Tabela 19 – Anexo 1
90,3	11,65	± 3	13,3	$\pm 1,2$	0,25	Tabela 20 – Anexo 1
163	7,9	± 3	8,4	$\pm 0,7$	0,67	Tabela 21 – Anexo 1
215,3	4,4	$\pm 1,1$	5,5	$\pm 0,9$	0,12	Tabela 22 – Anexo 1
382	2,8	$\pm 0,8$	3,3	$\pm 0,6$	0,19	Tabela 23 – Anexo 1
526,7	5,6	$\pm 3,8$	4,1	$\pm 0,7$	0,37	Tabela 32 – Anexo 1

4.5.2 Avaliação da integridade estrutural da membrana

Após o ensaio de liberação de fármaco de longo prazo as membranas que foram submetidas a ele em tampão PBS foram testadas quanto a sua resistência mecânica em um ensaio de tração que as comparou com membranas que não haviam passado pelo mesmo ensaio (Figura 30).

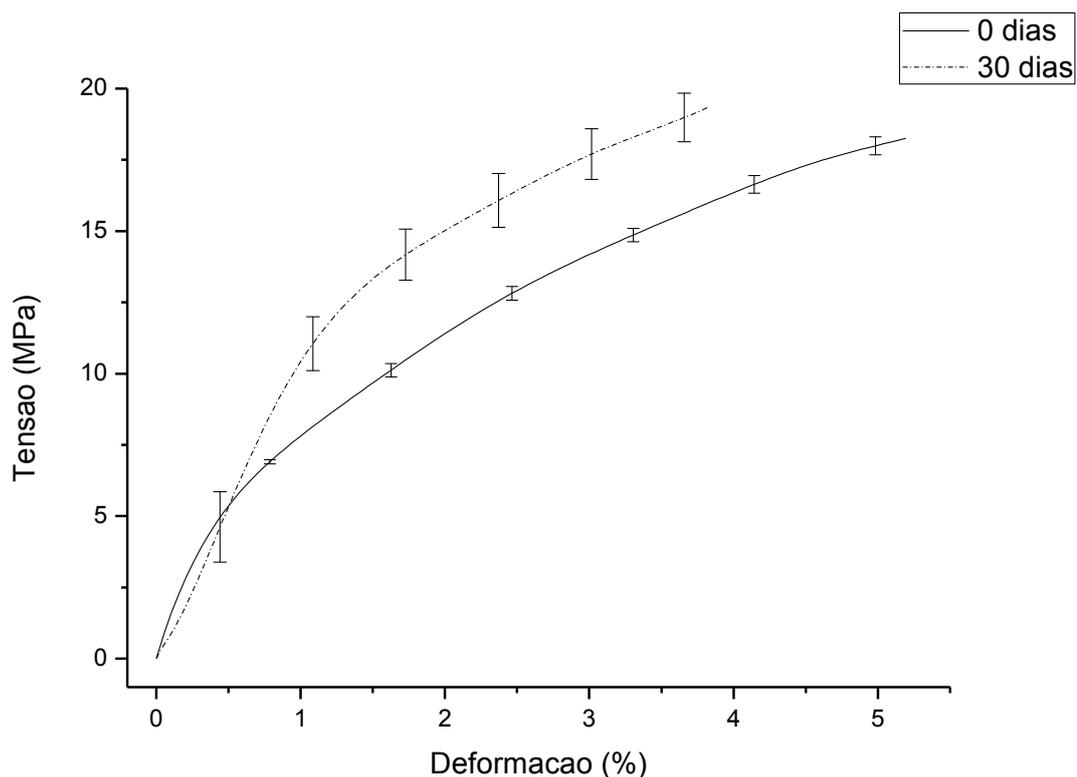


Figura 30 - Ensaio de tração de membranas antes e após o ensaio de liberação.

As membranas que permaneceram imersas em PBS por 30 dias apresentaram variações nas propriedades tensão de ruptura e deformação. Após o ensaio as membranas apresentaram tensão de ruptura de 19,33 MPa ($\pm 0,85$ MPa) e deformação máxima de 3,82% (0,03%), enquanto as membranas que não haviam sido imersas apresentaram tensão de ruptura de 18,26 MPa ($\pm 0,3$ MPa) e deformação máxima de 5,19% (0,1%). Essa variação mostra um discreto enrijecimento das membranas que em uma situação de utilização da membrana em cirurgia mostra a habilidade desta de proteger o local da lesão das forças externas. No caso das cirurgias periodontais, das forças de mastigação. Vale ressaltar que tanto os valores de tensão de ruptura e de deformação das membranas antes do ensaio de liberação quanto os de depois da imersão por 30 dias são compatíveis com as características de membranas bem aceitas no mercado.

4.5.3 Ensaio de liberação em tempo real

Para que o processo de liberação do fármaco nos primeiros minutos do ensaio fosse melhor compreendido houve a necessidade da realização de um ensaio que visualizasse esse período com maior precisão. De forma a avaliar a liberação inicial, foi realizado um ensaio de liberação em tempo real em meio PBS (com um intervalo de um segundo entre os pontos da curva) das amostras prensadas contendo metronidazol, (Figura 31).

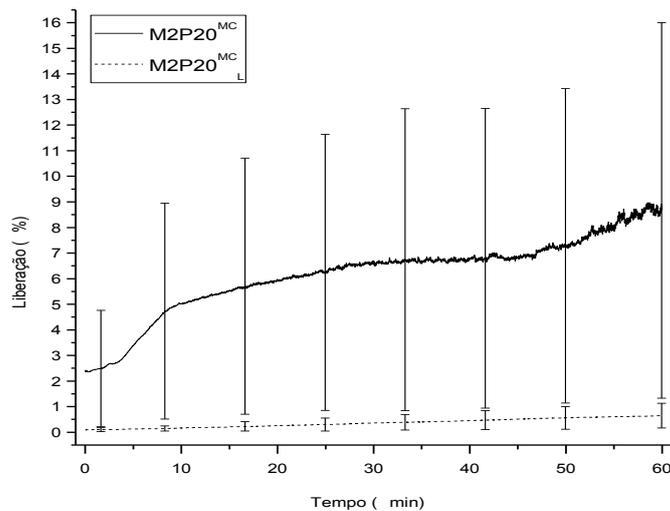


Figura 31 - Liberação de fármaco em tempo real das amostras lixiviadas (M2P20^{MC}_L) e não-lixiviadas (M2P20^{MC}).

O ensaio de liberação em tempo real mostrou que as amostras M2P20^{MC} no início do ensaio já apresentaram uma liberação de 2,37% ($\pm 4,2\%$) enquanto que as amostras lixiviadas (M2P20^{MC}_L) apresentaram liberação de 0,083% ($\pm 0,08\%$). Essa

diferença aparece desde o início do ensaio tanto na dispersão quanto na inclinação da curva que nesse ensaio traduz-se na taxa de liberação.

A efetividade do processo de lixiviação, além de ser comprovada pelo ensaio de liberação em tempo real também pode ser atestada pelo exame visual em um microscópio óptico (Figura 26).

Os resultados obtidos no ensaio de liberação de fármaco em tempo real confirmam o que havia sido observado durante o ensaio longo de liberação. O processo de lixiviação reduz o desvio padrão entre os corpos de prova tornando a liberação do fármaco mais regular e previsível nos primeiros instantes reduzindo assim o risco de que o MTZ apresente citotoxicidade nesse período.

O ensaio de liberação em tempo real também foi útil para mostrar quanto tempo após implantada, a membrana começaria a ser efetiva contra a *P. gingivalis*. Analisando-se o gráfico da concentração acumulada pelo tempo foi possível observar que as membranas cuja liberação seria mais lenta no início (M2P20^{MC}_L) foram capazes de atingir a MIC em aproximadamente 10 minutos (Figura 32).

Na Figura 31, é possível observar que devido ao erro as liberações das amostras lixiviadas ficaram muito próximas independentemente de qual foi o meio utilizado no ensaio. O mesmo pode ser observado para as amostras não lixiviadas.

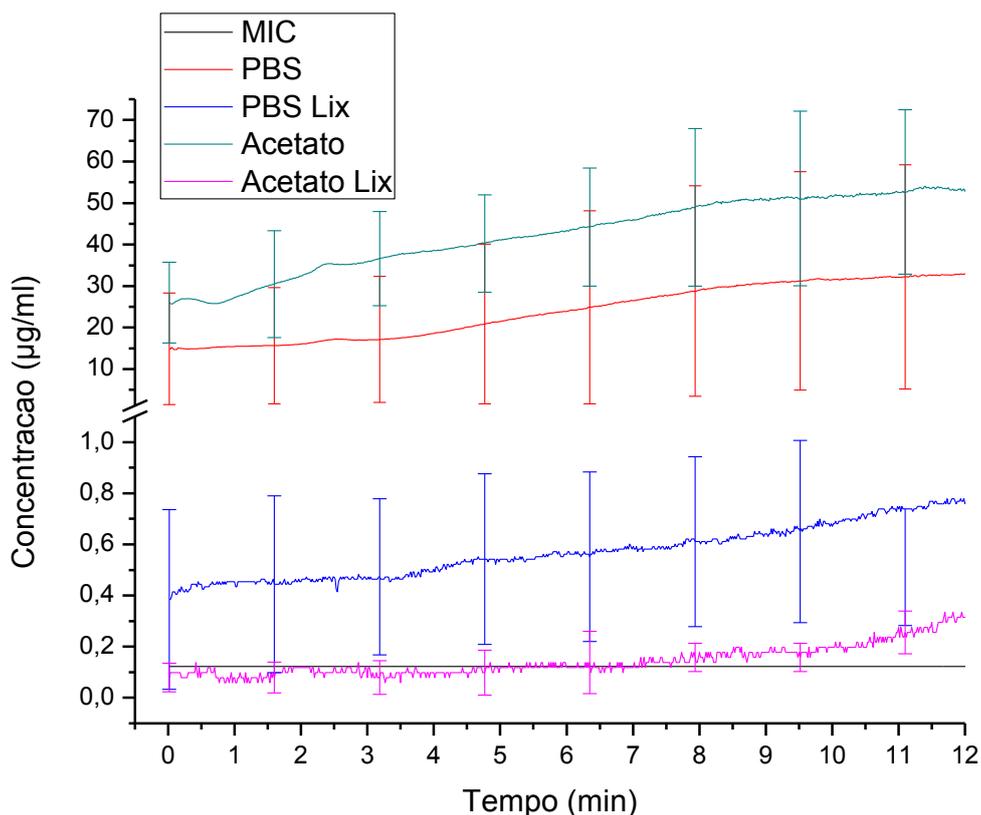


Figura 32 - Liberação em tempo real de membranas M2P20^{MC} e M2P20^{MC}_L comparadas com a MIC do metronidazol contra *P. gingivalis*.

4.6 Estudo do mecanismo de difusão da liberação controlada de metronidazol nas membranas produzidas por moldagem por compressão

De acordo com a literatura o mecanismo de liberação controlada de fármacos frequentemente dita a resposta biológica final. Os dados *in vitro* tentam correlacionar o desempenho desse material *in vivo* utilizando modelos matemáticos existentes que podem prover informações do mecanismo que governa a liberação do fármaco.

Para compreender melhor o mecanismo de difusão que houve nas membranas produzidas por moldagem por compressão foram utilizados os modelos matemáticos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas e assim saber se a difusão do metronidazol pela

matriz de PHB pode ser classificada como difusão fickiana (RAVAL, PARIKH E ENGINEE, 2011).

Para que se possa afirmar que há difusão do fármaco pela matriz polimérica do filme de PHB algumas condições precisam estar presentes (HIGUCHI, 1961):

1. A concentração inicial na matriz precisa ser muito maior do que o limite de solubilidade do fármaco.
2. As dimensões das partículas de fármaco precisam ser menores do que as dimensões do filme de PHB.
3. Inchamento e dissolução da matriz do polímero devem ser desprezíveis.
4. A difusão do fármaco deve ser constante.
5. O filme deve estar perfeitamente submerso no meio.

No presente trabalho todas as condições supracitadas foram atendidas. Sendo assim, foi realizado então o estudo da cinética de liberação do ensaio de longo prazo.

Os gráficos gerados pela equação de Higuchi aplicada à liberação de metronidazol nos meios tampão PBS e tampão acetato nas membranas lixiviadas e não lixiviadas podem ser vistos na Figura 33.

Os valores de K obtidos por regressão linear para cada uma dessas condições foram resumidos na Tabela 7. Os valores de R^2 obtidos para todas as amostras foram satisfatórios. Esses valores estão de acordo com a literatura (SHIFROVITCH, BINDERMAN, *et al.*, 2009).

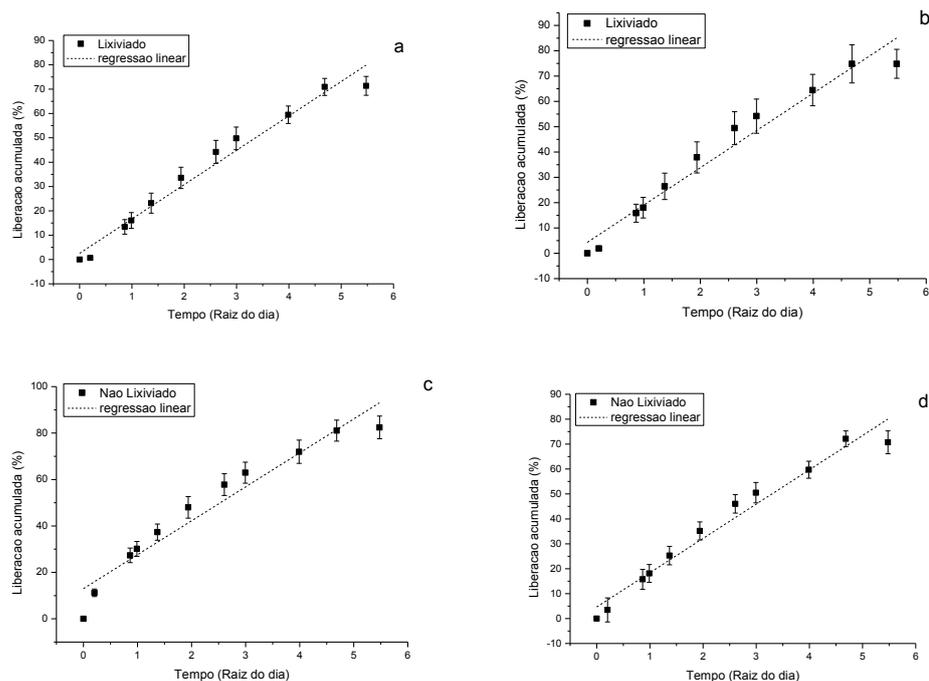


Figura 33 - Curva da liberação de fármaco traçada segundo a equação de Higuchi para as membranas M2P20 lixiviadas em meio (a) PBS e em meio (b) acetato e também para as não lixiviadas em meio (c) PBS e (d) acetato.

Tabela 7 – Valores de K obtidos pela equação de Higuchi para as amostras lixiviadas e não lixiviadas em tampão PBS e tampão acetato.

	Tampão PBS			Tampão acetato		
	R ²	K	Desvio	R ²	K	Desvio
M2P20^{MC}	0,96	13,76	0,81	0,93	14,62	1,23
M2P20^{MC}_L	0,96	14,73	0,93	0,97	14,12	0,75

Pode-se definir a partir do gráfico da equação de Higuchi (Figura 33 a e c) que o valor do K dado pela inclinação da reta definida pela regressão linear da curva do gráfico é igual a 13,76 e 14,73 para as amostras não lixiviadas e lixiviadas respectivamente para a liberação em tampão PBS. Também é possível obter do gráfico da equação de Higuchi (Figura 33 b e d) que o valor do K é igual a 14,62 e

14,12 para as amostras não lixiviadas e lixiviadas respectivamente para a liberação em tampão acetato.

Sendo que para valores de n maiores que 1 considera-se como difusão fickiana (HIGUCHI, 1961). Pode-se afirmar, portanto que por meio da equação de Higuchi todos os grupos apresentaram difusão fickiana.

De acordo com a literatura quando o material é implantado em um ambiente dinâmico a difusão da droga pode receber influência de outras forças. A relação de Korsmeyer - Peppas é frequentemente utilizada para investigar a existência de comportamentos anômalos, ou seja, que diferem da difusão fickiana (RAVAL, PARIKH E ENGINEE, 2011). Comportamentos anômalos dificultam a previsão de como o material se comportará *in vivo*.

A adequação das membranas ao modelo de difusão fickiana também foi testada pela equação de Korsmeyer – Peppas. Foram então gerados os gráficos da Figura 34.

Os valores de n obtidos por regressão linear para cada uma dessas condições foram resumidos na Tabela 8.

Os valores de R^2 obtidos para todas as amostras (para as equações de Higuchi e de Korsmeyer – Peppas) foram satisfatórios. Esses valores estão de acordo com a literatura (SHIFROVITCH, BINDERMAN, *et al.*, 2009).

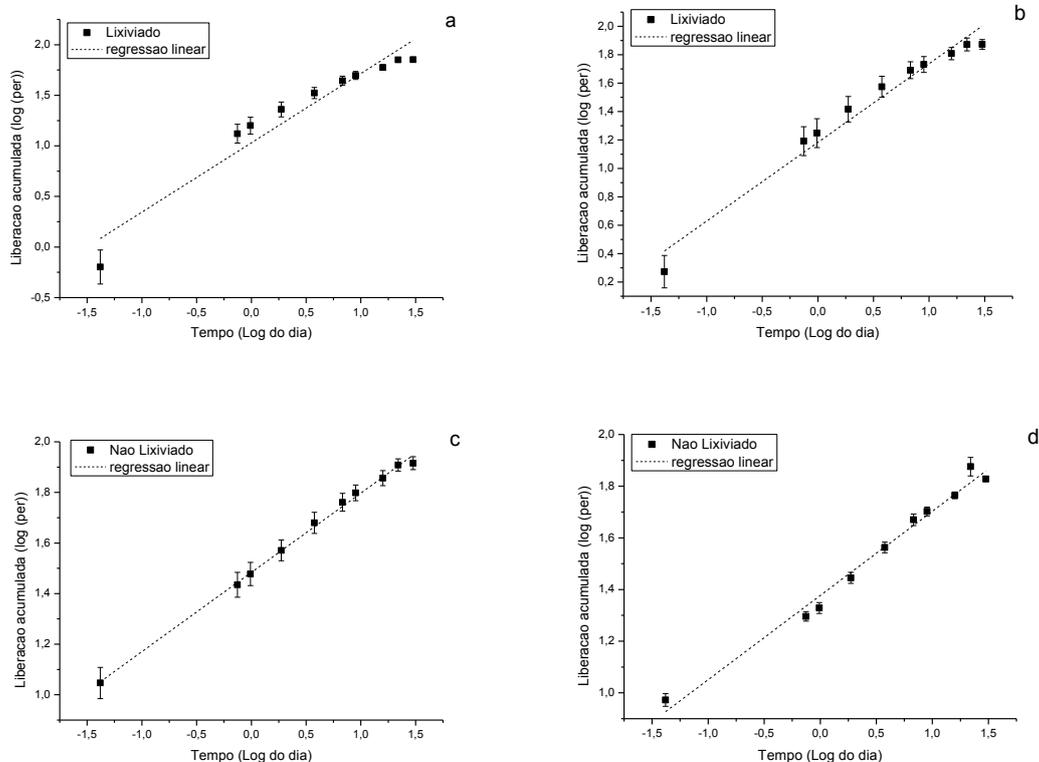


Figura 34 - Curva da liberação de f armaco traçada segundo a equa o de Korsmeyer-Peppas para as membranas M2P20 lixiviadas em meio (a) PBS e em meio (b) acetato e também para as não lixiviadas em meio (c) PBS e (d) acetato.

Tabela 8 – Valores de n obtidos pela equa o de Korsmeyer-Peppas para as amostras lixiviadas e não lixiviadas em tampão PBS e tampão acetato.

	Tampão PBS			Tampão acetato		
	R ²	n	Desvio	R ²	n	Desvio
M2P20^{MC}	0,98	0,32	0,01	0,99	0,31	0,01
M2P20^{MC}_L	0,96	0,55	0,03	0,92	0,68	0,06

Pode-se definir a partir do gráfico da equação de Korsmeyer - Peppas (Figura 34 a e c) que o valor do n dado pela inclinação da reta definida pela regressão linear da curva do gráfico é igual a 0,32 e 0,55 para as amostras não lixiviadas e lixiviadas respectivamente para a liberação em tampão PBS. Também é possível obter do gráfico da equação de Korsmeyer - Peppas (Figura 34 b e d) que o valor do K é igual a 0,31 e 0,68 para as amostras não lixiviadas e lixiviadas respectivamente para a liberação em tampão acetato.

Para que a difusão seja considerada como fickiana pela equação de Korsmeyer - Peppas é necessário que a inclinação da reta seja menor que 0,5 (KORSMEYER, GURNYA, *et al.*, 1983), portanto pode-se afirmar que as membranas que não passaram pelo processo de lixiviação apresentaram um processo de difusão fickiana ao passo que as que foram lixiviadas apresentaram processo de difusão anômalo. Isso se deve provavelmente à interferência da matriz à saída do fármaco na fase inicial, que nas membranas não lixiviadas não aparece devido à dissolução dos cristais adsorvidos à superfície.

Em uma aplicação dessas membranas em pacientes a previsibilidade da liberação do fármaco é importante, pois permite a quem fabrica o dispositivo oferecer ao profissional que irá usá-lo um perfil de liberação conhecido.

As membranas foram avaliadas em meios distintos para avaliar seu perfil de liberação em diferentes situações de uso. Para o caso de uso em cirurgias periodontais essas situações seriam a parte da membrana aprisionada entre o tecido conjuntivo gengival e o osso e a parte que oclui a lesão e se mantém em contato com uma região com um pH mais ácido. Após o estudo da cinética de liberação das membranas propostas foi possível perceber que não há diferença da liberação em tampão acetato ou em tampão PBS.

4.7 Avaliação quanto à citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade das amostras lixiviadas seguiram estritamente o protocolo da ISO-10993-12 como descrito anteriormente no item 3.12. O resultado desse ensaio pode ser visto na Figura 35.

Assumindo o controle negativo como células 100% viáveis e o controle positivo como sendo um material citotóxico, nenhuma das membranas analisadas se mostrou citotóxica para as células. Isso pode ser afirmado uma vez que um material é considerado citotóxico quando as células expostas a ele têm porcentagem inferior a 75% em relação ao controle positivo. Os resultados das análises estatísticas para cada um dos parâmetros podem ser vistos na Tabela 9, na Tabela 10 e na Tabela 11.

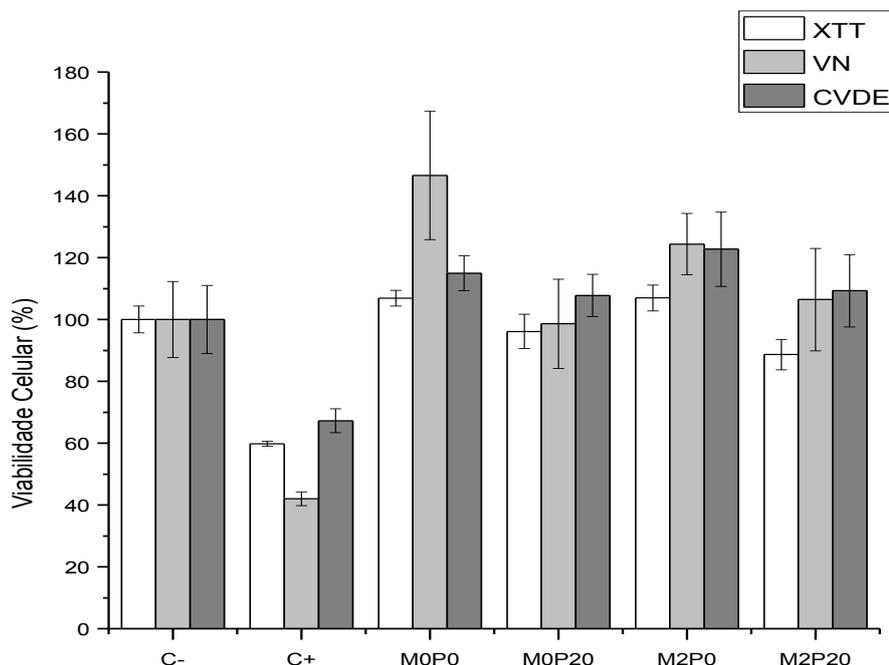


Figura 35 - Ensaio de citotoxicidade e proliferação celular pelos métodos XTT, vermelho neutro (VN) e eluição do corante cristal violeta (CVDE). Controle positivo (C+): dodecil sulfato de sódio a 1%; Controle negativo (C-): meio de cultura puro (α -MEM).

Tabela 9 - Tabela mostrando os resultados das análises de variância comparando os grupos estudados com o controle negativo para o XTT.

Comparação com controle negativo	p	Tabela ANOVA
M0P0 ^{MC} _L	0,00714	Tabela 25 – Anexo 1
M2P0 ^{MC} _L	0,01797	Tabela 26 – Anexo 1
M0P20 ^{MC} _L	0,21	Tabela 27– Anexo 1
M2P20 ^{MC} _L	0,00175	Tabela 28 – Anexo 1

As análises de variância dos grupos M0P0^{MC}_L, M2P0^{MC}_L e M2P20^{MC}_L não apresentaram diferença significativa para o grupo controle negativo do XTT. Embora a análise de variância do grupo M0P20^{MC}_L tenha apresentado alguma diferença na comparação com o controle negativo ainda pode-se afirmar que se trata de um material seguro pois quando comparado ao limite (75%) determinado pela norma ISO-10993-12, a viabilidade celular manteve-se bastante acima dele (96,13% ±5,58%).

Tabela 10 - Tabela mostrando os resultados das análises de variância comparando os grupos estudados com o controle negativo para o VN.

Comparação com controle negativo	p	Tabela ANOVA
M0P0 ^{MC} _L	$8,08742 \times 10^{-4}$	Tabela 29 – Anexo 1
M2P0 ^{MC} _L	0,00604	Tabela 30 – Anexo 1
M0P20 ^{MC} _L	0,85919	Tabela 31 – Anexo 1
M2P20 ^{MC} _L	0,47929	Tabela 32 – Anexo 1

As análises de variância dos grupos M0P0^{MC}_L e M2P0^{MC}_L não apresentaram diferença significativa para o grupo controle negativo do VN. Embora a análise de variância do grupo M0P20^{MC}_L e M2P20^{MC}_L tenham apresentado alguma diferença na comparação com o controle negativo ainda pode-se afirmar que se tratam de materiais seguros pois quando comparado ao limite (75%) determinado pela norma ISO-10993-12, a viabilidade celular desses grupos mantiveram-se bastante acima dele (98,58% ±14,46% para o M0P20 e 106,4% ±16,54% para o M2P20^{MC}_L).

As análises de variância dos grupos M0P0^{MC}_L e M2P0^{MC}_L não apresentaram diferença significativa para o grupo controle negativo do CVDE. Embora a análise de variância do grupo M0P20^{MC}_L e M2P20^{MC}_L tenham apresentado alguma diferença na comparação com o controle negativo ainda pode-se afirmar que tratam-se de materiais seguros pois quando comparado ao limite (75%) determinado pela norma ISO-10993-12, a viabilidade celular desses grupos mantiveram-se bastante acima dele (107,75% ±6,82% para o M0P20 e 109,29% ±11,68% para o M2P20^{MC}_L).

Tabela 11 - Tabela mostrando os resultados das análises de variância comparando os grupos estudados com o controle negativo para o CVDE.

Comparação com controle negativo	<i>p</i>	Tabela ANOVA
M0P0 ^{MC} _L	0,01421	Tabela 33 – Anexo 1
M2P0 ^{MC} _L	0,00656	Tabela 34 – Anexo 1
M0P20 ^{MC} _L	0,17319	Tabela 35 – Anexo 1
M2P20 ^{MC} _L	0,18629	Tabela 36 – Anexo 1

4.8 Análise de adesão celular por imunofluorescência

Após a cultura de células MC3T3 (células pré-osteoblásticas) em contato com os extratos das membranas M0P0MCL, M2P0 MCL, M0P20 MCL, M2P20 MCL e de um grupo controle durante 24 horas foi possível observar, em microscopia de fluorescência, a conformação celular, como mostrado na Figura 36.

A partir das imagens obtidas por microscopia de fluorescência, foi possível observar que as células do grupo controle (substrato com fibronectina) apresentaram filamentos de actina bem organizados (vermelho) e a presença de pontos de adesão focal, indicativos de interação célula-substrato, evidentes pela marcação com anti-vinculina (verde). O mesmo pôde ser observado para as células expostas aos extratos, com exceção daquelas expostas ao extrato obtido a partir da amostra M0P0^{MC}_L, na qual a vinculina aparece concentrada ao redor do núcleo celular.

Vinculinas são moléculas que fazem a ligação entre as integrinas (heterodímeros transmembrana responsáveis pelo processo de adesão célula-substrato) e o citoesqueleto celular. Ao reconhecer um substrato, as integrinas podem se agregar na porção interna da membrana citoplasmática. Nessa região, uma grande quantidade de filamentos do citoesqueleto está ancorada, em um processo chamado de adesão focal. A partir dessa adesão, a integrina expõe, em sua porção intracelular, sítios de ligação específicos para sua interação com os filamentos de actina presentes no citoesqueleto. Esses filamentos sofrem rearranjos que permitem a célula mudar sua conformação em resposta ao ambiente externo (ALBERT, JOHNSON, *et al.*, 2010). A presença da vinculina nas extremidades dos filamentos de actina está diretamente ligada aos processos de adesão celular.

Portanto, partir destes resultados, pode-se concluir que as células expostas aos extratos das membranas que receberam metronidazol e plastificante, quer seja em

conjunto ($M2P20^{MC}_L$) ou separadamente ($M2P0^{MC}_L$ ou $M0P20^{MC}_L$), não sofreram qualquer tipo de alteração em sua fisiologia que levasse a não adesão a um substrato. Entretanto àquelas expostas ao extrato de membranas contendo exclusivamente a matriz polimérica de PHB ($M0P0^{MC}_L$), apresentaram a vinculina dispersa pelo citoplasma, podendo ser indício de alguma interferência no processo de adesão celular.

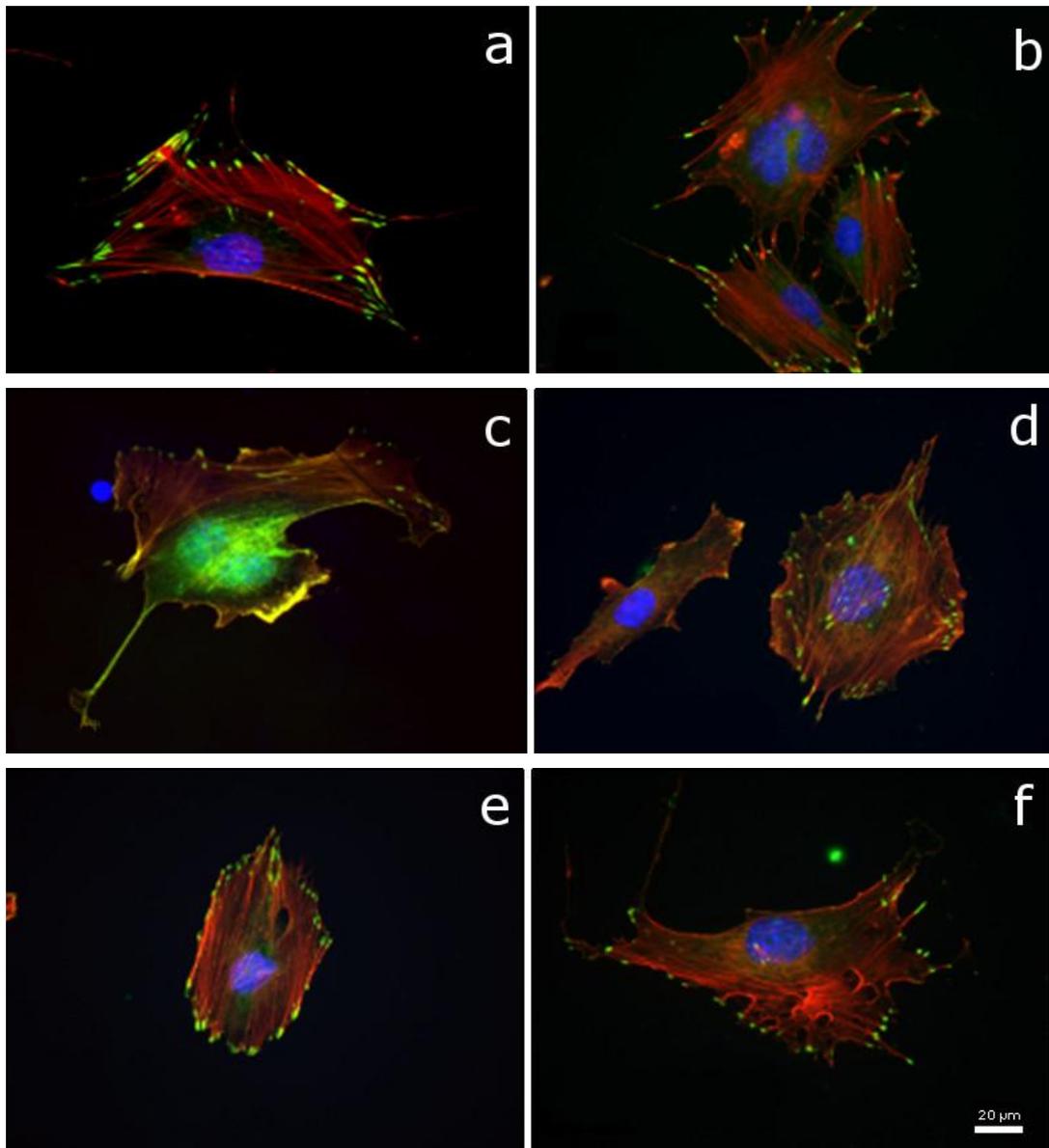


Figura 36 - Fotomicrografias de fluorescência de células MC3T3 aderidas em lamínulas de vidro. a e b) controle (lamínula recoberta com fibronectina), c) $M0P0^{MC}_L$, d) $M0P20^{MC}_L$, e) $M2P0^{MC}_L$, f) $M2P20^{MC}_L$.

4.9 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

A bactéria *Porphyromonas gingivalis* desempenha um importante papel na doença periodontal (Item 2.2.1). Portanto, neste trabalho foi avaliada a capacidade da M2P20^{MC} L inibir a proliferação dessa bactéria. A Figura 37 e a Figura 38 mostram os testes de susceptibilidade antimicrobiana usando as técnicas de disco - difusão e macrodiluição, respectivamente.

Após ser incubada durante 5 dias a 37°C sob condições anaeróbias, foi possível observar nas placas de disco - difusão a formação de halos de inibição em torno dos discos que contêm metronidazol. Estes resultados de Susceptibilidade Antimicrobiana mostram a capacidade deste dispositivo para inibir a proliferação de *P. gingivalis* (Figura 37) (NCCLS, 2004).

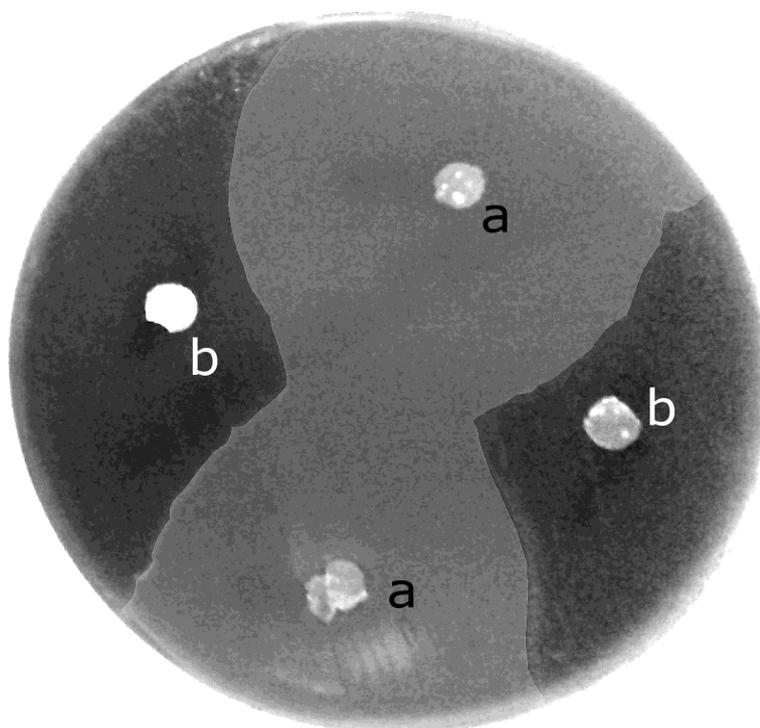


Figura 37 - Teste de sensibilidade a antimicrobianos (disco - difusão) mostrando (a) halo de inibição a volta dos discos de M2P20^{MC} L e (b) discos de controle contendo apenas a matriz polimérica (MOP0^{MC}).

Após a incubação das amostras com a bactéria *Porphyromonas gingivalis* durante 5 dias a 37°C em condições anaeróbias, foi possível observar o meio de cultura turvo nos tubos contendo as membranas de PHB puro (M0P0^{MC}), característico de proliferação bacteriana (Figura 38). Por outro lado, a ausência de turbidez presente nos tubos contendo os discos de M2P20^{MC}_L é um indicativo de que o metronidazol foi eficiente no controle da proliferação do micro-organismo (NCCLS, 2004).

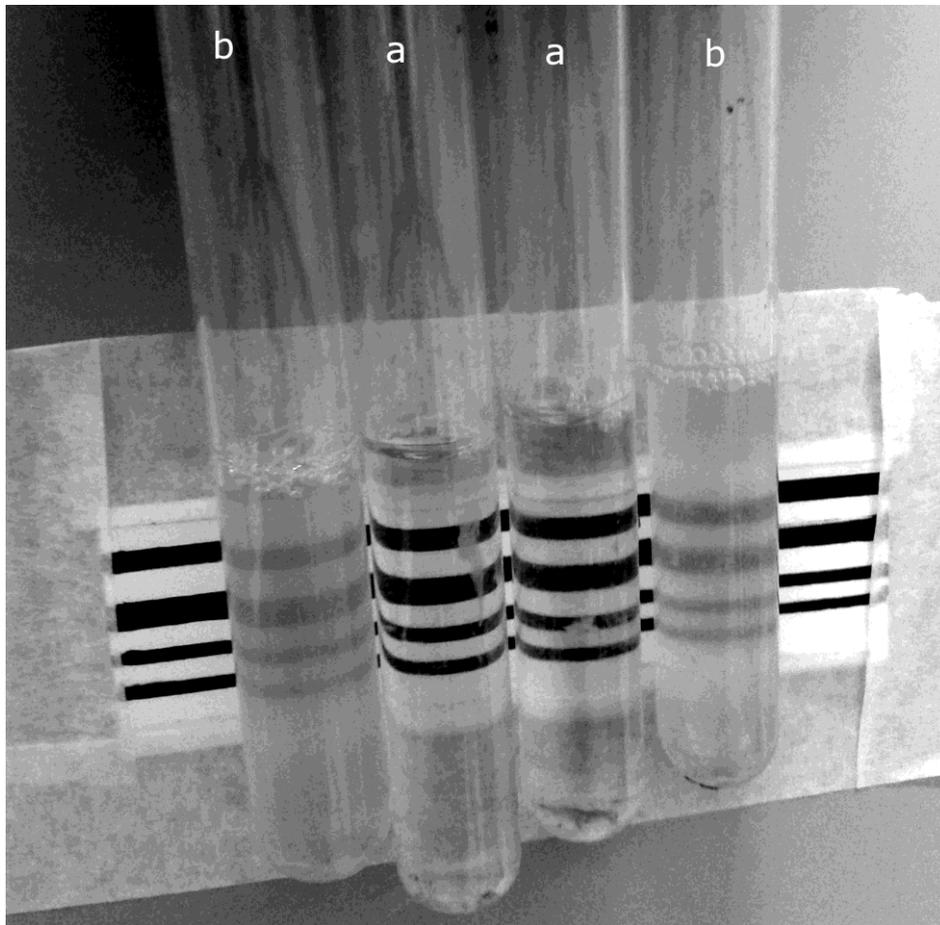


Figura 38 - Teste de sensibilidade a antimicrobianos (macrodiluição) mostrando (a) limpidez nos tubos contendo metronidazol e (b) tubos controle contendo discos com apenas a matriz polimérica (M0P0^{MC})

Tanto o ensaio de disco-difusão quanto o de macrodiluição sugerem que a membrana, se estivesse sendo utilizada como barreira em uma aplicação de RTG, seria capaz de evitar que o local da lesão a ser preenchido estaria protegido de uma possível infecção pelo micro-organismo *P. gingivalis*.

No caso da odontologia, essas membranas seriam bastante úteis eliminando a infecção periodontal pela *P. gingivalis* e permitindo um restabelecimento mais rápido do paciente.

Capítulo 5

5 Conclusão

Utilizando dois processos de fabricação (evaporação de solvente e moldagem por compressão) foram produzidas membranas de barreira para uso em regeneração tecidual guiada. Tais membranas foram compostas por uma matriz de PHB modificado pelo plastificante citrato de etila e carregadas com o fármaco metronidazol.

Utilizando microscopias óptica e eletrônica de varredura, foi possível constatar que o fármaco distribuiu-se tanto pelo interior da matriz quanto pela superfície da membrana.

Por meio de testes mecânicos como ensaio de tração e análise dinâmico mecânica (DMA) foi possível comprovar que essas membranas possuem resistência mecânica suficiente para atuar como membrana para RTG. Também foi possível afirmar com base nos testes mecânicos que a adição de plastificante no teor de 20% em peso faz com que haja uma redução no módulo de elasticidade, no módulo de cisalhamento e na tensão máxima para a ruptura. Outra propriedade alterada pelo plastificante é a alongação máxima, sendo essa aumentada. As membranas apresentaram propriedades mecânicas de tensão de ruptura e de deformação máxima compatíveis com membranas bem aceitas no mercado, mesmo depois de imersão em PBS por 30 dias, o que indica que elas podem ser capazes de atuar como barreira física ao longo de todo o tratamento.

As membranas provaram-se capazes de liberar o fármaco contido nelas tanto na simulação de condições fisiológicas (meio tampão PBS pH 7,4) quanto na simulação de condições de inflamação local (meio tampão acetato pH 5,0). Foi possível constatar

que o plastificante citrato de etila, na concentração de 20% (p/p) tem a capacidade de aumentar a liberação do metronidazol. As membranas testadas mantiveram a liberação do metronidazol acima da concentração mínima inibitória contra a *P. gingivalis* durante ao menos 26 dias de ensaio.

O processo de lixiviação executado com o propósito de remover os cristais de fármaco adsorvidos na superfície da membrana provou-se eficaz tanto pela avaliação do metronidazol presente na água utilizada no processo quanto por meio de microscopia. O ensaio de liberação de fármaco em tempo real mostrou que o processo é responsável por uma regularização no perfil de liberação se comparado ao não lixiviado.

Ao analisar a cinética de liberação pelo modelo de Higuchi concluiu-se que todos os grupos (lixiviados/não lixiviados e PBS/acetato) adequavam-se ao modelo Fickiano e pelo modelo de Korsmeyer – Peppas concluiu-se que as amostras não lixiviadas adequavam-se a difusão fickiana, enquanto que as amostras lixiviadas apresentavam um mecanismo anômalo, essa diferença estava provavelmente relacionada com uma fase inicial de dissolução dos cristais de fármaco adsorvidos à superfície.

Em testes de citotoxicidade, as membranas provaram não interferir em três parâmetros distintos da biologia celular: a respiração celular, pelo teste do XTT, a integridade da membrana plasmática, pelo teste da incorporação do vermelho neutro e a capacidade de proliferação celular pelo teste de eluição do cristal violeta.

Na avaliação da adesão celular por imunofluorescência, foi possível corroborar os resultados obtidos no teste de citotoxicidade mostrando que os extratos das membranas que continham o fármaco e o plastificante não interferiam com a adesão celular. Dessa forma foi possível classificar as membranas propostas como não citotóxicas.

O perfil de liberação do fármaco mostrou que as amostras eram capazes de atingir rapidamente a concentração mínima inibitória do metronidazol contra a bactéria *Porphyromonas gingivalis*, um patógeno comum e bastante agressivo em lesões periodontais. Esse fato foi corroborado por ensaios de atividade antimicrobiana nos quais o metronidazol que era liberado da membrana inibiu o crescimento da *P. gingivalis*. Esses ensaios também serviram para provar a capacidade de liberação de fármaco da membrana.

Os resultados sugerem que este sistema pode ser utilizado para a regulação a longo prazo de processos que envolvam o tratamento de doenças periodontais. Devido aos resultados obtidos nos ensaios de liberação também é possível sugerir que essas membranas possam ser utilizadas para outras aplicações que necessitem de liberação de metronidazol.

6 Sugestão para Trabalhos Futuros

- Desenvolver um método que possibilite uma melhor distribuição dos cristais de metronidazol na matriz das membranas.

Com a utilização de misturadores e homogenizadores mecanizados para favorecer a dispersão do fármaco pela matriz polimérica.

- Avaliação *in vivo* da citotoxicidade e da eficácia das membranas.

- Associar fármacos que tenham ação complementar a do metronidazol.

O metronidazol é bastante eficaz contra micro-organismos anaeróbios estritos, mas tem ação bastante limitada contra micro-organismos facultativos ou aeróbios sendo, portanto, de pequeno espectro. Seria útil fazer uma associação do metronidazol com algum outro antimicrobiano de amplo espectro ou com ação específica contra micro-organismos aeróbios.

- Testar as membranas com outros micro-organismos. E com modelos multiespécies de biofilmes.

7 Bibliografia

ABDELWAHAB, M. A. *et al.* Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends. **Polymer Degradation and Stability**, 2012. 1822-1828.

AHERN, D. C. *et al.* Antimicrobial susceptibility to metronidazole of microorganisms isolated from chronic and aggressive periodontitis. **Arch Health Invest**, 3, n. 1, 2014. 8-14.

ALBANDAR, J. M. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. **Journal of Evidence Based Dental Practice**, 13, n. 2, June 2013. 52 - 54.

ALBERT, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. [S.l.]: Artmed, 2010. 1268 p.

ARKIN, A. H.; HAZER, B. Chemical modification of chlorinated microbial polyesters. **BIOMACROMOLECULES**, 3, n. 6, 2002. 1327-1335.

ASIKAINEN, S.; CHEN, C.; SLOTS, J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, 11, 1996. 387-394.

BAEK, S.-H.; KIM, S. Bone repair of experimentally induced through-and-through defects by Gore-Tex, Guidor, and Vicryl in ferrets: A pilot study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, 91, n. 6, 2001. 710-714.

BAKKE, M. *et al.* Unilateral, isometric bite force in eight 68-year-old women and men related to occlusal factors. **Scan J Dent Res.**, 98, 1990. 149-58.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Campinas, 15, n. 1, 2005. 13-21.

BARUD, H. S. *et al.* Bacterial Cellulose/Poly(3-Hydroxybutyrate) Composite Membranes. **Carbohydrate Polymers**, 2010. 1-22.

BEHRING, J. *et al.* Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. **Odontology**, 96, n. 1, 2008. 1 - 11.

BONARTSEV, A. P. *et al.* New Poly(3-hydroxybutyrate)-Based Systems for Controlled Release of Dipyridamole and Indomethacin. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 42, n. 6, 2006. 625-630.

BOSTANCI, N.; THURNHEER, T.; BELIBASAKIS, G. N. Involvement of the TREM-1/DAP12 pathway in the innate immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. **Molecular Immunology**, 49, 2011. 387 - 394.

- BOTTINO, M. C. *et al.* Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. **Dent. Mater.**, 28, n. 7, 2012.
- BRUNETTI, M. C. **PERIODONTIA MEDICA-uma abordagem integrada.** [S.l.]: [s.n.], 2003. 633 p.
- BRUSCHI, M. L. *et al.* Sistemas de Liberação de Fármaco Intrabolsa Periodontal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, 42, n. 1, Jan/ Mar 2006. 29-47.
- CHAMBRONE, L.; LIMA, L. A. P. A.; CHAMBRONE, L. A. Prevalência das Doenças Periodontais no Brasil.Parte II. 1993-2003. **Revista Odonto**, v. 31, n. 16, p. 69 - 76, 2006.
- CHEN, F. M.; SHI, S. Periodontal Tissue Engineering. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering.** [S.l.]: [s.n.], 2014. p. 1507-1538.
- CHEN, F. M.; YAN, J. Periodontal tissue engineering and regeneration: Current approaches and expanding opportunities. **Tissue Engineering Part B**, 16, 2010. 219-255.
- CHEN, G.; WU, Q. The Application of Polyhydroxyalkanoates as Tissue Engineering Materials. **Biomaterials**, 2005. 6565-6578.
- CHEN, Q. *et al.* PHA / PHB. **Comprehensive Biotechnology**, 2, n. 3, 2011. 217-227.
- CHOI, J. S.; PARK, W. H. Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate). **Polymer Testing**, 2004. 455-460.
- COAKLEY, R. J. *et al.* Cytosolic pH and the inflammatory microenvironment modulate cell death in human neutrophils after phagocytosis. **Blood**, 2002. 1-10.
- COSTA, M. F.; THIRÉ, R. M. S. M. Materiais Poliméricos. In: GRANGEIRO, J. M.; SOARES, G. D. A. **Biomateriais em Odontologia: princípios, métodos investigativos e aplicações.** São Paulo: VM Cultural, v. 2, 2011.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBE, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.
- CRUMP, B. T. *et al.* **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 82, 1996. 365-374.
- DE SOUZA, E. S. *et al.* Associação entre doença periodontal e parto prematuro - Projeto Piloto. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 12, n. 1, p. 69-76, 2012.
- DUARTE, C. A. Tratamento Cirúrgico e Não-Cirúrgico. In: **Cirurgia Periodontal - Pré-protética, Estética e Peri-implantar.** 3ª Edição. ed. [S.l.]: Santos, 2009. Cap. 1, p. 5-17.

- DZINK, J. L.; SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive. **Journal Of Clinical Periodontology**, 15, 1988. 316-323.
- FA-MING CHEN, D. D. S. . P. D.; YAN JIN, D. D. S. . P. D. Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current Approaches and Expanding Opportunities. **Tissue Engineering**, 2010. 219-255.
- FERNANDES NETO; ALFREDO JÚLIO. **Aparelho Estomatognático**. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2006.
- FERNANDES, J. G. *et al.* PHB-PEO electrospun fiber membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications. **Polymer Testing**, 34, 2014. 64-71.
- FERREIRA, M. B. *et al.* Time- and concentration-dependent cytotoxicity of antibiotics used in endodontic therapy. **J. Appl. Oral Sci.**, 18, n. 3, 2010. 259-263.
- FRIEDMAN, M.; GOLOMB, G. New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use. **Journal of Periodontal Research**, 17, n. 3, 1982. 323-328.
- FUJIHARA, K.; KOTAKIB, M.; RAMAKRISHNA, S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. **Biomaterials**, 26, 2005. 4139-4147.
- GIANNOBILE, W.; SOMERMAN, M. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. **Annals of Periodontology**, 8, 2003. 193-204.
- GILLETT, I. *et al.* The role of histopathology in the iagnosis and prognosis of periodontal-diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, 17, 1990. 673-684.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **The pharmacological basis of**. 12^a. ed. [S.I.]: McGraw-Hill, 2001. 1232 p. ISBN ISBN 0-07-135469-7.
- GOODSON, J. M. Gingival crevice fluid flow. **Periodontology 2000**, 31, n. 1, February 2003. 43-54.
- GRIFFITHS, G. S. *et al.* Comparison of Clinical Outcomes Following Treatment of Chronic Adult Periodontitis with Subgingival Scaling or Subgingival Scaling plus Metronidazole Gel. **Journal of Clinical Periodontology**, 27, 2000. 910-917.
- HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 50, n. 10, 1961. 874 - 875.
- HIEMAE, K. *et al.* Natural bites, food consistency and feeding behaviour in man. **Archives of Oral Biology**, 41, Fevereiro 1996. 175-89.
- HOLT, S. C.; EBERSOLE, J. L. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. **Periodontology 2000**, 38, n. 1, 2005. 72 - 122.
- HONG, S.-G.; CHEN, W.-M. The attenuated total reflection infrared analysis of surface crystallinity of polyhydroxyalkanoates. **E-POLYMERS** , 24, 1 Jun 2006. 1-17.

ISSA, M. G. **Avaliação do impacto de diferentes variáveis no ensaio de dissolução intrínseca de Metronidazol**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 78. 2011.

JOHANSSON, A. S.; SVENSSON, K. G.; TRULSSON, M. Impaired masticatory behavior in subjects with reduced periodontal tissue support. **Journal of Periodontology**, 77, Setembro 2006. 1491-7.

JOSHI, J. R.; PATEL, R. P. Role of biodegradable polymers in drug delivery. **Int J Curr Pharm Res**, 4, n. 4, 2012. 74-81.

JULIEN, K. C. *et al.* Normal masticatory performance in young adults and children. **Archives of Oral Biology**, 41, Janeiro 1996. 69-75.

KARRING, T. *et al.* Development of the biological concept of guided tissue regeneration — animal and human studies. **Periodontology** 2000, 1, 1993. 26 - 35.

KARRING, T.; NYMAN, S.; LINDHE, J. Healing following implantation of periodontitis affected roots in bone tissue. **Journal of Clinical Periodontology**, 1980. 96-105.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **Journal of Bacteriology**, 175, 1993. 3247-3252.

KORSMEYER, R. W. *et al.* Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, 15, n. 1, 1983. 25 - 35.

KURTIŞ, B. *et al.* Effect of Poly(lactide-Glycolide) (PLGA) Membranes Loaded With Metronidazole on Periodontal Regeneration Following Guided Tissue Regeneration in Dogs. **Journal of Periodontology**, 73, July 2002. 694-700.

LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of Porphyromonas gingivalis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62, n. 4, December 1998. 1244-1263.

LINDE, A. *et al.* Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **Journal of Periodontology**, 64, 1993. 1116 – 1128.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, P. N. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4ª Edição. ed. [S.l.]: [s.n.], v. I, 2005. 1005 p.

LISTGARTEN, M. A. Pathogenesis of periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, 13, n. 5, May 1986. 418-425.

LÖBLER, M. *et al.* Biomaterial patches sutured onto the rat stomach induce a set of genes encoding pancreatic enzymes. **Biomaterials**, 2002. 577-583.

MACEDO, C. R. D. **Placas oclusais para tratamento do bruxismo do sono: revisão sistemática Cochrane**. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, p. 157. 2007.

MAGINI, R. D. S. Regeneração Tecidual Guiada. **Publicação Eletrônica em Reabilitação Oral**, 2009. Disponível em:

<<http://www.pereo.com.br/pagina.php?pagina=caso&cat=4&ID=221>>. Acesso em: 30 nov. 2009.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62, 1998. 71-109.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, 149, February 2003. 279-294.

MARTELLINI, F. *et al.* **Filmes Poliméricos a Base de PHB e PHB-V Utilizados como Sistemas de Liberação Controlada de Hormônio de Crescimento Humano Recombinante**. Anais do 8º Congresso Brasileiro de Polímeros. Águas de Lindóia: [s.n.]. 2005. p. 1350-1351.

MEDLICOTT, N. J. *et al.* Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 13, n. 1-2, January-February 1994. 181-203.

MICHALAK, M. *et al.* Synthesis of PHB-based carrier for drug delivery systems with pH-controlled release. **European Polymer Journal**, 49, n. 12, 2013. 4149-4156.

MILELLA, E. *et al.* Physicochemical, Mechanical, and Biological Properties of Commercial Membranes for GTR. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 58, 2001. 427-435.

MIRON, R. J. *et al.* Osteoblast proliferation and differentiation on a barrier membrane in combination with BMP2 and TGF β 1. **Clin Oral Invest**, 17, n. 3, 2013. 981-988.

MISRA, S. K. *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications. **Biomaterials**, 31, 4 Janeiro 2010. 2806-2815.

MISRA, S. K.; VALAPPIL, S. P.; ROY, I. E. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. **Biomacromolecules**, 7, 2006. 2249-2258.

MIURA, H. *et al.* Relationship between cognitive function and mastication in elderly females. **Journal of Oral Rehabilitation**., 30, 2003. 808 - 811.

MURPHY, P. A.; JONES, E. Use of oral metronidazole in pregnancy. Risks, benefits, and practice guidelines. **J Nurse Midwifery**, 39, n. 4, 1994. 214-220.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontology 2000**, 40, n. 11, 2006.

NCCLS. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A6**. [S.l.]. 2004.

NGUYEN, M. K.; ALSBERG, E. Bioactive factor delivery strategies from engineered polymer hydrogels for therapeutic medicine. **Progress in Polymer Science**, 39, 2014. 1235-1265.

- NYMAN, S. *et al.* Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. **Journal of Clinical Periodontology**, 1980. 394-401.
- NYMAN, S. *et al.* The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **Journal of Clinical Periodontology**, 9, 1982. 290-296.
- NYMAN, S. *et al.* New attachment formation by guided tissue regeneration. **Journal of Periodontal Research**, 22, 1987. 252 - 254.
- NYMAN, S. *et al.* New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, 9, n. 4, 2005. 290-296.
- PACHENCE, J. M.; BOHRER, M. P.; KOHN, J. Biodegradable Polymers. In: LANZA, R. P.; LANGER, R. S.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 3rd. ed. [S.l.]: Elsevier Academic Press, 2007. Cap. 23, p. 323-339.
- PARANHOS, C. M. *et al.* Microstructural Evaluation of Poly(vinyl alcohol)-Based Hydrogels Obtained by Freezing-Thawing Technique: Thermal Analysis and Positron Annihilation. **Journal of Applied Polymer Science**, 105, 2007. 899–902.
- PARK, J. K. *et al.* Guided bone regeneration by poly(lactic-co-glycolic acid) grafted hyaluronic acid bi-layer films for periodontal barrier applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 3394–3403, 2009.
- PEREIRA, L. J.; DUARTE, G. M. B.; VAN DER BILT, A. Influence of oral characteristics and food products on masticatory function. **Acta Odontol. Scand.**, 64, 2006. 193-201.
- PIATTELLI, A. *et al.* Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. **Biomaterials**, 17, 1996. 791 - 796.
- POLIMENI, G. *et al.* Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, 10, n. 2, 2008. 99 - 105.
- POLIMENI, G.; XIOPAIDIS, A. V.; WIKESJÖ, U. M. E. Biology and Principles of Periodontal Wound Healing/Regeneration. **Periodontology** 2000, 41, 2006. 30-47.
- PONTORIERO, R. *et al.* Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. **J Clin Periodontol**, 16, 1989. 170-174.
- POUTON, C. W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 18, 1996. 133 - 162.
- QU, X. H. *et al.* In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions. **Biomaterials**, 27, 2006. 3540-3548.
- RAVAL, A.; PARIKH, J.; ENGINEE, C. Mechanism and in Vitro Release Kinetic Study of Sirolimus from a Biodegradable Polymeric Matrix Coated Cardiovascular Stent. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 50, n. 16, 2011. 9539–9549.

REIS, E. C. C. *et al.* Guided tissue regeneration using rigid absorbable membranes in the dog model of chronic furcation defect. **Acta Odontologica Scandinavica**, 71, n. 3 - 4, 2013. 372 - 380.

REINSTAD, R.; KARLSSON, S.; ALBERTSSON, A.-C. Influence of processing parameters on the molecular weight and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Polymer Degradation and Stability**, 57, n. 3, 1997.

ROCHA, R. C. S. *et al.* Controle da Biossíntese de Poli-hidroxicanoatos Bacterianos Através do Fluxo de Substratos. **Química Nova**, 30, n. 1, 2007. 53-55.

RODRIGUEZ-CONTRERAS, A. *et al.* High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. **Journal of Applied Microbiology**, 114, n. 5, 2013. 1378-1387.

SCHUT, J. H. What's Ahead for 'Green' Plastics: Look for More Supply, More Varieties, Better Properties. **Plastics Technology**, February 2008.

SCULEAN, A.; NIKOLIDAKIS, D.; SCHWARZ, F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials—biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, 35, 2008. 106-113.

SELVIG, K. A. *et al.* Regenerative Surgery of Intrabony Periodontal Defects Using e-PTFE Barrier Membranes - Scanning Electron-Microscopic Evaluation of Retrieved Membranes Versus Clinical Healing. **Journal of Periodontology**, 63, n. 12, December 1992. 974-978.

SHIFROVITCH, Y. *et al.* Metronidazole-Loaded Bioabsorbable Films as Local Antibacterial Treatment of Infected Periodontal Pockets. **Journal of Periodontology**, Fevereiro 2009. 330-337.

SHINN, G. H.; YI, C. L.; CHIA, H. L. Crystallization and degradation behaviors of treated polyhydroxybutyrates. **Reactive & Funcional Polymers**, 68, 2008. 1516-1523.

SHISHATSKAYA, E. I. *et al.* Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 19, 2008. 2493–2502.

SHISHATSKAYA, E. I.; VOLOVA, T. G. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures. **JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE**, 2004. 915-923.

SILVA, E. J. N. L. *et al.* Evaluation of cytotoxicity, antimicrobial activity and physicochemical properties of a calcium aluminate-based endodontic material. **Journal of Applied Oral Science**, 22, n. 1, February 2014. 61-67.

SPYROS, A. *et al.* 1H NMR Imaging Study of Enzymatic Degradation in Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Evidence for Preferential Degradation of the Amorphous Phase by PHB Depolymerase B from *Pseudomonas lemoignei*. **Macromolecules**, 30, n. 26, 1997. 8218-8225.

SUNDARARAJ, S. C. *et al.* Design of a multiple drug delivery system directed at periodontitis. **Biomaterials**, 34, 2013. 8835 - 8842.

TABA JR, M. *et al.* Current concepts in periodontal bioengineering. **Orthodontics & Craniofacial Research**, 8, 2005. 292-302.

TATAKIS, D. N.; PROMSUDTHI, A.; WIKESJÖ, U. M. E. Devices for Periodontal Regeneration. **Periodontology** 2000, 19, 1999. 59-73.

TELLES, M. R.; SARAN, L.; UNÊDA-TREVISOLLI, S. Produção, propriedades e aplicações de bioplástico obtido a partir da cana-de-açúcar. **Ciência & Tecnologia Faetec - JB**, v. 2, n. 1, p. 52-63, 2011. ISSN 2178-9436.

TEMPO, P. J.; NALBANDIAN, J. Colonization of retrieved polytetrafluoroethylene membranes: Morphological and microbiological observation. **J Periodontol**, 64, 1993. 162-168.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. São Paulo: Santos, 1995.

TIWARI, G. Biodegradable Microspheres For Controlled Delivery Of Metronidazole In The Treatment Of Periodontal Diseases: Formulation consideration. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 1, n. 2, 2010. 1-13.

TOKUDA, M. *et al.* Regulation of Protease Expression in Porphyromonas gingivalis. **Infection and Immunity**, 66, n. 11, November 1998. 5232–5237.

TUITE-MCDONNEL, M. *et al.* Concordance of Porphyromonas gingivalis colonization in families. **Journal of Clinical Microbiology**, 35, 1997. 455-461.

UNVERDORBEN, M. *et al.* A polyhydroxybutyrate biodegradable stent: preliminary experience in the rabbit. **Cardiovasc Intervent Radiol**, 25, 2002. 127-132.

VAN DER BILT, A. *et al.* Oral physiology and mastication. **Physiology & Behavior**, 89, 2006. 22-7.

VANIN, M. *et al.* Estudo da Degradação “In Vitro” de Blendas de Poli(β -Hidroxibutirato) (PHB) / Poli(L-Ácido Lático) (PLLA) na Forma de Filmes. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 14, n. 3, 2004. 187-193.

VON TROIL-LINDEN, B. *et al.* Periodontal findings in spouses. A clinical, radiographic and microbiological study. **Journal of Clinical Periodontology**, 22, 1995. 93-99.

VON TROIL-LINDEN, B. *et al.* Salivary levels of suspected periodontal pathogens in relation to periodontal status and treatment. **Journal of Dental Research**, 74, 1995. 1789-1795.

WANG, H. L. Periodontal regeneration. **Journal of Periodontology**, 76, 2005. 1601-1622.

WIKLER, M. A. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A6**. Clinical and Laboratory Standards Institute. [S.l.], p. 1-60. 2004.

WRIGHT, T. L. *et al.* Effects of metronidazole on Porphyromonas gingivalis biofilms. **J Periodontal Res.**, 32, n. 5, 1997. 473-7.

ZAMANI, M. *et al.* Controlled release of metronidazole benzoate from poly ε-caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 75, 2010. 179–185.

ZHANG, H. *et al.* Periodontal-Tissue Engineering. In: LANZA, R. P.; LANGER, R. S.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 3rd. ed. [S.I.]: Elsevier Academic Press, 2007. Cap. 72, p. 1095-1109.

ZHIZIANG, C. Biocompatibility and Biodegradation of novel PHB porous substrates with controlled multi-pore size by emulsion templates method. **J Mater Sci: Mater Med**, 17, 2006. 1297-1303.

8 Anexos

8.1 Anexo 1 – Tabelas relativas às análises de variância

Tabela 12 - Análise de variância (tabela ANOVA) e teste de Tukey da alteração dos valores de módulo secante. O fator considerado nessa análise foi a adição de plastificante à matriz de PHB.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	3,95 E6	3,95 E6	48,28	3,95 E-5
Erro	10	818992,43	81899,24	--	--
Total	11	4,77344E6		--	--

Tukey Test	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Plastificante	-1148,1	165,22	9,82	3,98	0,05	1	-1516,2	-779,95

E-5

Tabela 13 - Análise de variância (tabela ANOVA) e teste de Tukey da alteração dos valores da temperatura de transição vítrea (Tg). Os fatores considerados nessa análise foram a adição de plastificante e de metronidazol à matriz de PHB.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
MTZ	1	8,509	8,50	0,88	0,370
Plastificante	1	185,70	185,70	19,36	0,001
Interação	1	2,32	2,32	0,24	0,634
Modelo	3	207,80	69,26	7,22	0,009
Erro	9	86,29	9,58		
Total	12	294,10			

Tukey Test	MeanDiff	SEM	q	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
			Value					
MTZ 0 - 2%	-2,23	1,72	1,83	0,226	0,05	0	-6,13	1,66
Plastificante 0 - 20%	-7,79	1,72	6,39	0,001	0,05	1	-11,69	-3,89

Tabela 14 - Análise de variância (tabela ANOVA) e teste de Tukey da alteração dos valores de módulo de cisalhamento (G'). Os fatores considerados nessa análise foram a adição de plastificante e de metronidazol à matriz de PHB.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
MTZ	1	31429,19	31429,19	0,24	0,63
Plastificante	1	1,51 E7	1,51 E7	116,06	1,91 E-6
Interação	1	139673,82	139673,82	1,06	0,32
Modelo	3	1,58 E7	5,27 095E6	40,31	1,52 E-5
Erro	9	1,17669E6	130743,33		
Total	12	1,69895E7			

Tukey Test	Mean Diff	SEM	q	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
			Value					
MTZ 0 - 2%	-269,57	201,16	1,89	0,21	0,05	0	-724,6	185,49
Plastificante 0 - 20%	-2199,6	201,16	15,46	1,7	0,05	1	-2654,7	-1744,5

Tabela 15 - Análise de variância (tabela ANOVA) e teste de Tukey da alteração dos valores de módulo de perda (G"). Os fatores considerados nessa análise foram a adição de plastificante e de metronidazol à matriz de PHB.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
MTZ	1	1954,82	1954,82	1,86	0,20
Plastificante	1	62632,97	62632,97	59,69	2,91 E-5
Interação	1	2234,75	2234,75	2,13	0,17
Modelo	3	71068,84	23689,61	22,57	1,59 E-4
Erro	9	9442,35	1049,15		
Total	12	80511,19			

Tukey Test	Mean	SEM	q	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
	Diff		Value					
MTZ 0 - 2%	-36,59	18,02	2,87	0,07	0,05	0	-77,36	4,16
Plastificante 0 - 20%	-143,55	18,02	11,26	2,34	0,05	1	-184,32	-102,79
				E-5				

Tabela 16 - Análise de variância (tabela ANOVA) e teste de Tukey mostrando a diferença entre as quantidades liberadas na primeira hora. O fator considerado nessa análise foi o processo de lixiviação.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	243,42282	243,42282	179,67929	1,0251E-7
Erro	10	13,54763	1,35476		
Total	11	256,97045			

Tukey Test	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
NLix	9,00783	0,672	18,95676	1,39194E-	0,05	1	7,51051	10,50514
- Lix				7				

Tabela 17 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 18 h.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	8,62664	8,62664	0,2186	0,65013
Erro	10	394,63565	39,46356		
Total	11	403,26228			

Tabela 18 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 23,5 h.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	45,70191	45,70191	2,8344	0,12317
Erro	10	161,24041	16,12404		
Total	11	206,94232			

Tabela 19 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 45 h.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	10,90844	10,90844	0,58305	0,46275
Erro	10	187,09274	18,70927		
Total	11	198,00118			

Tabela 20 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 90,3 h.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	7,67704	7,67704	1,50392	0,24816
Erro	10	51,04675	5,10467		
Total	11	58,72379			

Tabela 21 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 163 h.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	0,91894	0,91894	0,19531	0,66794
Erro	10	47,04984	4,70498		
Total	11	47,96878			

Tabela 22 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 215,3 h.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	3,02085	3,02085	2,94362	0,11698
Erro	10	10,26237	1,02624		
Total	11	13,28321			

Tabela 23 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 381,9 h.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	0,99345	0,99345	1,96551	0,19119
Erro	10	5,0544	0,50544		
Total	11	6,04785			

Tabela 24 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando a taxa de liberação do grupo de membranas lixiviado com o não lixiviado em 526,7 h.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	6,52238	6,52238	0,86179	0,3751
Erro	10	75,68368	7,56837		
Total	11	82,20606			

Tabela 25 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P0 com o controle negativo para o XTT.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	142,81834	142,81834	11,34499	0,00714
Erro	10	125,88673	12,58867		
Total	11	268,70507			

Tabela 26 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P0 com o controle negativo para o XTT.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	145,45018	145,45018	7,98798	0,01797
Erro	10	182,08634	18,20863		
Total	11	327,53651			

Tabela 27 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P20 com o controle negativo para o XTT.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	44,81019	44,81019	1,79408	0,21008
Erro	10	249,7674	24,97674		
Total	11	294,57759			

Tabela 28 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P20 com o controle negativo para o XTT.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	385,39306	385,39306	17,8804	0,00175
Erro	10	215,53936	21,55394		
Total	11	600,93242			

Tabela 29 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P0 com o controle negativo para o VN.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	6495,63035	6495,63035	22,33753	8,08742E-4
Erro	10	2907,94541	290,79454		
Total	11	9403,57576			

Tabela 30 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P0 com o controle negativo para o VN.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	1622,5401	1622,5401	12,73563	0,00604
Erro	9	1146,61474	127,40164		
Total	10	2769,15484			

Tabela 31 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P20 com o controle negativo para o VN.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	5,97402	5,97402	0,03314	0,85919
Erro	10	1802,75246	180,27525		
Total	11	1808,72648			

Tabela 32 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P20 com o controle negativo para o VN.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	112,05611	112,05611	0,54471	0,47929
Erro	9	1851,43713	205,71524		
Total	10	1963,49324			

Tabela 33 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P0 com o controle negativo para o CVDE.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	672,04015	672,04015	8,78162	0,01421
Erro	10	765,28029	76,52803		
Total	11	1437,32044			

Tabela 34 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P0 com o controle negativo para o CVDE.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	1550,33513	1550,33513	11,68879	0,00656
Erro	10	1326,34406	132,63441		
Total	11	2876,67919			

Tabela 35 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M0P20 com o controle negativo para o CVDE.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	180,29098	180,29098	2,15114	0,17319
Erro	10	838,11706	83,81171		
Total	11	1018,40804			

Tabela 36 - Análise de variância (tabela ANOVA) comparando o grupo M2P20 com o controle negativo para o CVDE.

	GL	Soma de Quadrados	Médias dos quadrados	Valor de F	Significância (p)
Modelo	1	259,32094	259,32094	2,01369	0,18629
Erro	10	1287,79093	128,77909		
Total	11	1547,11187			