TALITA GIRIO CARNAVAL

Análise *in vitro* de um dispositivo polimérico como alternativa para o uso de antimicrobiano sistêmico em Odontologia

São Paulo

2015

TALITA GIRIO CARNAVAL

**Análise *in vitro* de um dispositivo polimérico como alternativa para o uso de
antimicrobiano sistêmico em Odontologia**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obter o título de
Doutor pelo Programa de Pós-graduação em
Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Adde

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Carnaval, Talita Girio.

Análise *in vitro* de um dispositivo polimérico como alternativa para o uso de antimicrobiano sistêmico em Odontologia / Talita Girio Carnaval ; orientador Carlos Alberto Adde. -- São Paulo, 2015.
126 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Clínica Integrada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão corrigida.

1. Polímeros. 2. Antiinfeciosos. 3. Teste de materiais. 4. Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão. 5. Poli-L-lactídeo (PLLA). I. Adde, Carlos Alberto. II. Título.

Carnaval TG. Análise *in vitro* de um dispositivo polimérico como alternativa para o uso de antimicrobiano sistêmico em Odontologia. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: ____/____/ 2015

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos Alberto Adde

Instituição: FOU SP

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À **Deus**,

Agradeço por ter uma vida iluminada repleta de glórias, conquistas e saúde.

Pela minha essência plena embasada no caráter e no bem.

Aos meus pais **Pedro e Leonor**,

Pela minha criação repleta de amor e de exemplos embasados no caráter, força, humildade e principalmente em Deus.

Ao meu irmão **Rogério**,

Por sua amizade e companheirismo que sempre pairou em nosso berço familiar.

Ao meu noivo **Alexander**,

Obrigada por todo o companheirismo, amor e carinho que me deram força em cada etapa do meu doutorado. Agradeço por sempre andar junto aos meus objetivos me apoiando e incentivando a chegar cada vez mais longe. Sua força e compreensão foram para mim fundamentais para a execução deste difícil trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador e amigo **Prof. Carlos Alberto Adde**, muito obrigada por tudo!

Agradeço por ser essa pessoa maravilhosa, que sempre confiou em mim e me mostrou caminhos, exemplos e condutas que foram fundamentais na minha formação pessoal e profissional até o amadurecimento desta tese e acima de tudo, pelo diferencial de ser humano com personalidade e caráter, com quem posso contar com palavras em todas as minhas conquistas e dificuldades. É uma honra e grande alegria tê-lo como meu orientador. Mais uma vez, muito obrigada por tudo!

Aos três tutores especiais que, não por um acaso, foram colocados no meu caminho para acrescentarem como pesquisadores e como seres humanos em minha vida:

À **Flávia Gonçalves (IQUSP)**, não há palavras para o agradecimento. Sem você este trabalho não teria sido executado. É uma excelente professora e orientadora, uma pessoa simples, batalhadora e meiga, que sem dúvida, me mostrou como alcançar tudo que eu precisava com calma e persistência. Tenho por você uma grande admiração e eterna gratidão por toda acolhida e tudo que conquistamos juntas. Muito Obrigada!

À **Giovanna de Castro (FOUSP)**, que me mostrou a inteligência e perspicácia de uma jovem pesquisadora. Muito obrigada por todos os dias me recebeu com seu belo sorriso! Agradeço por todo conhecimento e tempo oferecido e pela persistência em comigo alcançar todos os objetivos. Desejo todo o sucesso na sua jornada.

Ao **Léo Cruz (ICBUSP)**, meus sinceros agradecimentos por me recolocar no mundo microbiológico que para mim se encontrava tão distante. Obrigada pelos seus conhecimentos, por toda paciência e a persistência fundamental para a execução deste trabalho. Muito obrigada por toda sua dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao **Profª Márcia Mayer**, responsável pelo Laboratório Microbiologia do ICBUSP agradeço pela confiança, pela acolhida em seu laboratório, por sua disponibilidade e todo o conhecimento que nos permitiu alcançar os horizontes esperados.

Ao **Prof Victor Elias Arana-Chávez**, responsável pelo Laboratório de Biologia Oral (LBO - FOUSP), agradeço pela acolhida, dedicação, interesse em meu trabalho, e acima de tudo por sua fiel paciência com todas as etapas que envolveram o estudo.

Ao **Prof Luiz Henrique Catalani** responsável pelo Laboratório de Biomateriais do IQUSP, agradeço por ter desde o início acreditado na equipe de Clínica Integrada da FOUSP oferecendo grande acolhimento e a excelente estrutura de seu laboratório. Obrigada por todo tempo despendido que nos permitiu investigações nunca galgadas por essa equipe e a entrada no mundo dos biomateriais

Ao **Prof Marcelo M. Romano** responsável por algumas das indagações deste estudo, agradeço por confiar a mim a responsabilidade de execução de suas ideias. Obrigada por todo o carinho e a conexão de bons trabalhos.

Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada **Profº Rodney Garcia Rocha, Profº Flávio Eduardo Guillin Perez, Profº Waldyr Antonio Jorge, Profº Mario Sérgio Soares, Profº José Leonardo Simone, Profª Isabel Peixoto, Profª Sibebe Sarti Penha, Profª Inês A. Buscariollo e Profª Carina Domaneschi**, obrigada por terem me recebido junto ao corpo discente deste Departamento.

A todos os colegas de pós-graduação e da Clínica Integrada que dividiram comigo momentos de ensinamentos e conquistas, permitindo-me ter mais forças para o desenvolvimento desta tese.

A todos meus amigos de trabalho da USP que comigo venceram todos os dias de muito estresse no acúmulo de atividades e jornadas e me forneceram ânimo para prosseguir sempre em frente.

“No fim tudo dá certo, e se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim”

Fernando Sabino

RESUMO

Carnaval TG. Análise *in vitro* de um dispositivo polimérico como alternativa para o uso de antimicrobiano sistêmico em Odontologia. [Tese]. São Paulo. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original.

A administração indiscriminada de antimicrobianos sistêmicos tem como principais efeitos indesejáveis a seleção antimicrobiana, hipersensibilidade, comprometimento gastrointestinal e toxicidade. A busca por uma alternativa à terapêutica antimicrobiana sistêmica em Odontologia através do uso de um material biodegradável de aplicação local pode apresentar inúmeras vantagens. As características estruturais, de citocompatibilidade e facilidade de fabricação do polímero sintético ácido poli-L-lactídeo (PLLA) permitem que este seja um carreador de fármacos como amoxicilina (AM), azitromicina (AZ), clindamicina (CL) ou metronidazol (ME) mantendo concentrações inibitórias constantes e por tempo prolongado, sendo capazes de prevenir a colonização dos principais patógenos orais. **Objetivo:** Avaliar e comparar o comportamento de filmes ou malhas de PLLA associados aos quatro antimicrobianos mais utilizados em Odontologia como uma alternativa local. **Metodologia:** 180 (N) discos poliméricos com 15 ou 6 mm de diâmetro foram preparados em associação a 20% do antimicrobiano amoxicilina, azitromicina, clindamicina ou metronidazol sendo classificados como grupo F (filme) e M (malha). Foram confeccionados segundo os métodos de deposição e eletrofiação (fibras) respectivamente. Todos os discos foram armazenados em solução tampão (pH 5 ou 7.4) e alíquotas foram coletadas e analisadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. As espécimes foram pesadas após 3 e 6 meses de armazenamento nas soluções tampões para análise de degradação. Para a análise de citotoxicidade, os materiais foram cultivados com fibroblastos humanos por 24h, 48h e 72h e analisados por ensaio de MTT. A capacidade antimicrobiana dos discos foi determinada em cultura de *P.gingivalis* e *S.pyogenes*. Para o controle estrutural foram realizadas fotografias digitais e MEV dos espécimes controle, das interfaces (criofratura) e das espécimes degradadas. **Resultados:** A liberação farmacológica

para os antimicrobianos na ordem pH levemente básico (7.4) e ácido (5.0) foi respectivamente: ME 70.03% (F) e 100% (M); 88,01% (F) e 19,4% (M). Para AM 38,73% (F) e 18,63% (M); 61,44% (F) e 47,93% (M). Para AZ 32,53% (F) e 82,85% (M); 46,78% (F) e 73,15% (M). Para CL 68,42% (F) e 81,10% (M); 76,47% (F) e 72,76% (M). A análise antimicrobiana demonstrou capacidade inibitória para *S.pyogenes* e *P.gingivalis* para todos os materiais testados, não havendo diferença significativa entre filme e malha dentro de cada grupo ($p>0.05$). A reação de citotoxicidade por MTT comprovou que os biomateriais testados são compatíveis com fibroblastos humanos e mais citocompatíveis que o controle PLLA, controle de vida e morte ($p<0.05$). As malhas demonstraram favorecimento do crescimento celular principalmente em 24 e 48 horas. A MEV demonstra um filme com superfície rugosa e malha com fibras e poros mimetizando a matriz extracelular. Após criofratura a MEV da interface comprovou incorporação do fármaco ao filme e malha, exceto para o ME, com cristais externos ao polímero. Após a degradação, os filmes de amoxicilina apresentaram maior degradação que PLLA no pH 5.0 ($p=0.007$) e pH 7.4 ($p=0.046$). Já para as malhas a azitromicina apresentou maior degradação que PLLA no pH 7.4 ($p=0.031$). **Conclusão:** O PLLA é um polímero cuja associação aos antimicrobianos utilizados mostrou-se segura, citocompatível e promissora na liberação de doses inibitórias contra os microrganismos *P.gingivalis* e *S.pyogenes*. A liberação farmacológica foi influenciada pela característica química do fármaco, apresentação do polímero (filme e malha) e pH da solução de armazenamento. Este estudo comprovou ser possível através de uma terapêutica medicamentosa local controlar ou prevenir infecções localizadas, sem que seja necessário o fármaco sistêmico.

Palavras-chave: Polímero. Poli-L-lactídeo (PLLA). Antimicrobiano. Teste de biocompatibilidade. Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão

ABSTRACT

Carnaval TG. *In vitro* analysis of a polymeric device as an alternative for systemic antibiotics in Dentistry [Thesis]. São Paulo. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Indiscriminate administration of systemic antimicrobial has undesirable effects such as antimicrobial selection, hypersensitivity, gastrointestinal commitment and toxicity. For an alternative to systemic antimicrobial therapy in Dentistry, use a biodegradable material of local application can present numerous advantages. The structural characteristics, cytocompatibility and ease of fabrication of the synthetic polymer poly-L- lactide acid (PLLA) enable this to be a carrier biomaterial. When associated with antimicrobials as amoxicillin (AM), azithromycin (AZ), clindamycin (CL) or metronidazole (ME) it can maintain constant the inhibitory concentrations for a long time, being able to prevent colonization of the main oral pathogens. **Objective:** To evaluate and compare the behavior of PLLA associated with the most useful antimicrobials in Dentistry as an alternative for prevention and treatment of infections. **Methodology:** 180 (N) polymer discs with 15 or 6 mm diameter were prepared in association with the antimicrobial concentration of 20% amoxicillin, metronidazole, clindamycin or azithromycin being classified as Group F (film) and M (mesh). They were made using the methods of deposition and electrospinning (nanofibers) respectively. All discs were stored in buffer solutions (pH 5 or 7.4) and aliquots were collected and analyzed by high performance chromatography (HPLC) on 8, 24, 48, 72, 96, 120 , 144 and 168 hours. Cytotoxicity of human fibroblasts was tested after 24h, 48h and 72h by the MTT reaction. The antimicrobial capacity of the disks was determined against *P. gingivalis* and *S. pyogenes* cultures. The specimens were weighed after 3 and 6 months of storage for degradation analysis. Specimens were also carried out by digital photos for structural control. SEM was used to control interfaces (freeze-fracture) and degradation description. **Results:** The drug release for antimicrobials in order slightly basic pH (7.4) and acid (5.0) was respectively : ME 70.03 % (F) and 100% (M) ; 88.01 % (F) and 19.4 % (F) . For AM 38.73 % (F) and 18.63% (F) ; 61.44 % (F) and 47.93 % (F) . To AZ 32.53 % (F) and 82.85 % (

F) ; 46.78 % (F) and 73.15% (F) . CI 68.42 % (F) and 81.10 % (F) ; 76.47 % (F) and 72.76 % (F) . Antimicrobial analysis showed inhibitory capacity against *S. pyogenes* and *P. gingivalis* for all tested polymers. ANOVA showed no difference between film and mesh within each group ($p > 0.05$). The MTT reaction demonstrated that the biomaterials tested are compatible with human fibroblasts ($p < 0.05$). The meshes have shown a tendency to cell growth especially in 24 to 48 hours. The SEM images showed a film with a rough surface and mesh of nanofibers and pores mimicking the extracellular matrix and also proved incorporation of the drug to the film and mesh after the freeze-fracture interface, except for ME that was external to the polymer crystals. Degradation showed differences among Amoxicillin-film and PLLA pH 5.0 ($p = 0.007$) and pH 7.4 ($p = 0.046$). As for the meshes differences occurred only between azithromycin and the PLLA pH 7.4 ($p = 0.031$). **Conclusion:** The PLLA is a polymer biomaterial whose association to antimicrobial is safe, biocompatible and promising. It can inhibit *P. gingivalis* and *S. pyogenes* microorganisms. The drug release was influenced by the chemical characteristics of the drug, polymer performance (mesh and film) and the pH of the storage solution. This study proved a local drug system therapy to control or prevent localized infections without systemic doses.

Keywords: Polymer. Poly-L-lactide. Antimicrobial. biocompatibility test. Disk Diffusion Antimicrobial Tests.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Amoxicilina
AZ	Azitromicina
CL	Clindamicina
cm	centímetros
CRIO	criofratura
DSC	differential scanning calorimeter
FDA	Food and Drug Administration
h	horas
HPLC	high Performance Liquide ChromatographHy
Kg	quilograma
Kv	quilovolts
ME	Metronidazol
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MTT	(3-(4,5-dimetiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
mg	miligramas
mcg	microgramas
mm	milímetros
nm	nanometros
PDLA	ácido polo-D-lactídeo
PDLLA	ácido poli-D-L-lactídeo

PGA	ácido poli-glicólico
pH	potencial hidrogeniônico
PCL	policaprolactone
PHBA	ácido polihidroxibutírico
PLA	ácido poli lactídeo
PLGA	ácido poli lactídeo glicólico
PLL	ácido poli-caprolactones
PLLA	ácido poli-L-lactídeo
POL	polímero
SDH	succinato desidrogenase
TCO	biocerâmica ácido/ β -tricálcio

LISTA DE SÍMBOLOS

°C graus Celsius

D dextrogiro

H⁺ hidrônio

L levógiro

OH⁻ hidroxila

ZrO₂ zircônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Justificativa	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 O uso de Antimicrobianos nas especialidades Odontológicas - Periodontia	20
2.2 Sistemas de liberação de fármacos.....	24
2.3 Uso de dispositivos de liberação local farmacológica.....	28
2.4 Característica do polímero PLLA.....	30
2.5 Característica química do fármaco	35
2.6 Associação polímero e antimicrobiano	39
2.7 Comportamento celular.....	43
3 PROPOSIÇÃO.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Material	49
4.2 Confeções dos polímeros farmacológicos.....	50
4.3 Análise da taxa de liberação dos fármacos.....	52
4.4 Análise da atividade antimicrobiana.....	53
4.4.1 Teste de difusão em ágar.....	53
4.5 Análise da citotoxicidade.....	55
4.5.1 Obtenção das células.....	55
4.5.2 Citotoxicidade direta.....	56
4.6 Análise estrutural.....	57
4.6.1 Análise estrutural por fotografia digital	57
4.6.2 Análise estrutural com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	57
4.7 Degradação.....	59
4.7.1 Perda de massa	59
4.7.2 Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura.....	59

5 RESULTADOS.....	60
5.1 Liberação Farmacológica	60
5.2 Análise microbiológica.....	67
5.3 Análise de citotoxicidade.....	73
5.4 Análise estrutural.....	78
5.5 Degradação.....	83
5.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pH 5.0	86
5.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pH 7.4	88
6 DISCUSSÃO	91
REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

A administração indiscriminada de antimicrobianos sistêmicos por profissionais da saúde é um dos problemas causadores da seleção antimicrobiana pelo mundo (Andrade, 2014).

Neste aspecto, a escolha de uma terapêutica medicamentosa local e eficiente torna possível o tratamento de infecções localizadas, sem que seja necessário o uso de fármacos sistêmicos. Assim, as formulações sistêmicas poderiam ser selecionadas apenas para as infecções potencialmente agressivas. Uma situação importante e desejável na Saúde, uma vez que evita a seleção antimicrobiana e diminui os gastos financeiros com fármacos (Sousa et al., 2013).

Considerando-se que há duas maneiras de melhorar a ação de um fármaco: através da redução e/ou eliminação de seus efeitos indesejáveis (aumento do índice terapêutico) ou sua liberação em sítios específicos, minimizando os seus efeitos sistêmicos indesejáveis (Schwach-Abdellaoui et al., 2000). Os biomateriais poliméricos permitem manter a concentração do fármaco constante na faixa terapêutica por um período prolongado, com única dose, o que pode aumentar a eficácia clínica e diminuir a toxicidade (Qi et al., 2013).

O sistema de biomaterial carreador poderá ser apresentado de diversas formas como: sistema controlado por solvente, sistema de reserva e sistema de controle químico (Schwach-Abdellaoui et al., 2000). Para tanto, uma das opções para criação destes biomateriais envolve a nanotecnologia, cuja confecção de nanoestruturas permite o controle das principais características do biomaterial (Burger et al., 2006).

Justificando a necessidade do uso de sistemas locais em Odontologia, sabemos que em Periodontia alguns estudos demonstram baixa efetividade quanto ao uso de antimicrobianos sistêmicos uma vez que os produtos ativos do fármaco não atingem concentrações adequadas no sítio de ação específico e/ou a incapacidade destes produtos ativos se manterem retidos localmente ou por um tempo prolongado (Kornman, 1993; Vanderkerckhove et al., 1997; Andrade, 2014).

Dadas as dificuldades de resultados descritas por essa especialidade, a aplicação de um sistema de liberação capaz de aumentar a concentração antimicrobiana local, favoreceria situações em que o antimicrobiano sistêmico seria aplicado na Periodontia como no tratamento da Periodontite Juvenil, Periodontite refratária e Periodontite com envolvimento sistêmico (ex. HIV). Outras aplicações seriam em sítios profundos com complexa anatomia e difícil acesso ao Cirurgião Dentista (ex. defeito de furcas) (Kornman, 1993).

Há também aplicabilidade na Implantodontia e Cirurgia onde o uso do antimicrobiano sistêmico é indicado, porém questionado, o que pode levar a insucesso técnico do cirurgião na utilização de implantes e/ou enxertos. Nessas especialidades, em que a colocação de um biomaterial num campo rico em microrganismos poderá ocasionar a possível contaminação do sítio receptor e do biomaterial, com alta chance de fracasso. Esta é a principal indicação de antimicrobianos em Implantodontia e Cirurgia (Esposito et al., 1998).

Ainda assim, as características superficiais e químicas dos implantes dentários tornariam o sítio receptor mais susceptível a infecções pós-operatórias locais, como sua rugosidade superficial e energia superficial, também indicando a antibioticoprofilaxia (Teughels et al., 2006).

Atualmente, sabe-se que a melhor forma de lidar com a infecção de um implante é através da prevenção da colonização nos primeiros momentos da implantação, evitando-se a formação do biofilme (Engelsman et al., 2010). Justifica-se assim, a busca por alternativa à terapêutica atual.

Quanto aos protocolos medicamentosos a serem seguidos, os modelos científicos utilizados para administração de antimicrobianos até agora mostram controvérsia nos resultados e questionam a efetividade desta conduta medicamentosa nas especialidades descritas (Bollen et al., 1996).

Então, considerando-se a necessidade do uso de antimicrobianos, as controvérsias nos modelos de administração sistêmica e o fato do uso poder causar efeitos indesejáveis gastrointestinais, hipersensibilidade, interações medicamentosas, seleção bacteriana entre outros, seu uso atualmente se mostra questionável (Reise et al., 2012).

Sabendo-se que um possível método para prevenção da colonização bacteriana envolve a modificação da superfície a serem implantada localmente por uma cobertura de camada polimérica biocompatível e reabsorvível, que poderá liberar antibiótico apenas no sítio desejado (Engelsman et al., 2009). Este material poderia ser adaptado e aplicado a cada especialidade satisfazendo-se as necessidades do Cirurgião-dentista e paciente.

Desta forma, tendo em vista a necessidade de tratamento de infecções locais na Clínica, o que atinge diversas especialidades odontológicas como Periodontia, Implantodontia e a Cirurgia faz-se necessária a investigação de um sistema de liberação local capaz estruturalmente de adaptar-se em cada situação clínico-cirúrgica.

1.1 Justificativa

Considerando-se a necessidade de uma proteção terapêutica adicional para alguns procedimentos odontológicos, justifica-se à procura de alternativas, sendo o uso de fibras ou filmes de polímero sintético poli-L-lactídeo (PLLA) o dispositivo de investigação devido às propriedades de biocompatibilidade, bioabsorção, estrutura e degradação deste biomaterial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão da literatura foi construída seguindo uma ordem de apresentação lógica dos conceitos associados ao antimicrobiano em Odontologia e dispositivo polimérico de liberação como alternativa. Foi apresentada na seguinte ordem: o uso dos antimicrobianos nas especialidades odontológicas; Características dos sistemas de liberação dos fármacos; Eletrofiação (fibras); Uso de dispositivos de liberação farmacológico em Odontologia; Características do polímero PLLA; Característica química do fármaco; Associação polímero antimicrobiano; Comportamento celular e comportamento de microrganismos.

2.1 O uso de Antimicrobianos nas especialidades Odontológicas - Periodontia

Em Periodontia sabe-se que para a grande maioria dos pacientes com doença periodontal diagnosticada, o uso de antimicrobianos sistêmicos não é indicado. Essa indicação prevalece apenas para o uso de infecções agudas severas, com sinais de disseminação, para as periodontites agressivas e doenças necrosantes (Andrade, 2014).

Os estudos demonstram baixa efetividade quanto ao uso de antimicrobianos sistêmicos devido ao fato de os produtos ativos do fármaco não atingirem concentrações adequadas no sítio de ação específico e/ou a incapacidade destes se manterem retidos localmente ou por um tempo prolongado (Vanderkerckhove et al., 1997).

Em outras especialidades médicas há esta mesma dificuldade de ação do antimicrobiano em locais profundos. Como exemplo Van Zanten et al. (2003) constataram a dificuldade de eliminação do *H.pylori* da mucosa estomacal, uma vez que o antimicrobiano precisaria atingir concentrações inibitórias ou bactericidas no sítio da infecção (mucosa estomacal) e não apenas no plasma. Constataram que

variáveis como a espessura da camada mucosa, o formato, a motilidade estomacal e a acidez do ambiente poderiam contribuir para uma distribuição e concentração inadequada na superfície da mucosa.

Embora o uso de antimicrobianos sistêmicos devesse ser atrativo em Periodontia dada a natureza microbiana da doença periodontal crônica, alguns autores concentram-se no fato de indicar estes fármacos somente em situações cujos patógenos escapem da ação de instrumentação mecânica ou quando o resultado é deficiente da defesa do hospedeiro. Ainda deve ser considerado que 4% a 8% dos pacientes respondem mal à terapia convencional e, nestes casos, o uso racional de antimicrobianos poderia ser uma terapia aliada ao tratamento (Andrade, 2014).

Por fim, a indicação do antimicrobiano em Periodontia continua sendo um dilema, cujas dificuldades na obtenção de resultados tornam efetiva a busca de um sistema de liberação capaz de aumentar a concentração antimicrobiana local, favorecendo situações em que o antimicrobiano sistêmico seria aplicado. São exemplos a Periodontite Juvenil, Periodontite refratária e Periodontite com envolvimento sistêmico (ex. HIV). Outras aplicações seriam em sítios profundos com complexa anatomia e difícil acesso ao Cirurgião Dentista (ex. defeito de furcas) (Kornman, 1993).

2.1.2 Implantodontia e cirurgia

Nas últimas décadas diversos estudos comprovam o alto índice de sucesso da reabilitação oral através do uso de implantes osseointegráveis (Becker et al., 1990; Lee et al., 1999; Qurynen et al., 2002).

Considerando-se esta situação cirúrgica moderna devemos conhecer que o material para proteção ideal de uma ferida cirúrgica deve minimizar infecções e dor;

prevenir perda excessiva de fluídos; manter a ferida úmida; promover restauração epitelial e ser biocompatível. Além disso, deve ter boa aderência à área ferida, ser de fácil aplicação e remoção para o conforto do paciente. Em adição a proteção da ferida, deve existir a irrigação da área com solução anestésica e aplicação da profilaxia antibiótica para prevenir infecções ao paciente (Thakur et al., 2008).

A manutenção desta cadeia é fundamental, pois caso ocorra contaminação do sítio receptor durante o processo cirúrgico poderá ocorrer insucesso da osseointegração do implante, sendo a microbiota salivar a principal forma de contaminação. Uma vez instalada a contaminação esta poderá ocasionar ao longo prazo um quadro de perimplantite, que possui um papel muito importante na falência de implantes. Embora ocorra em menos de 10% dos procedimentos é considerada uma das principais causas de insucesso (Becker et al., 1990; Lee et al., 1999; Quirynen et al., 2002; Pfau et al., 2005; Schwarz et al., 2006), sendo, portanto necessária sua prevenção através do controle da contaminação local por microrganismos.

Devem também ser observadas as características superficiais e químicas dos implantes dentários que tornam o sítio receptor mais susceptível a infecções pós-operatórias locais, como sua rugosidade superficial que interfere na quantidade e qualidade do biofilme acumulado, favorecendo o acúmulo de microrganismos nas espiras e poços superficiais do biomaterial. Além disso, a característica química da superfície implantar (titânio) que oferece maior energia de superfície livre para o acúmulo do biofilme (Teughels et al., 2006).

Perante a contaminação instalada, a microflora presente nos tecidos perimplantares possui grande papel na evolução da doença, portanto, a redução e controle destes microrganismos seria uma grande preocupação na prevenção e na manutenção do estado de saúde (Quirynen et al., 2002).

Considerando-se as particularidades da microbiota perimplantar, é semelhante à microflora de bolsas de dentes naturais, o que sugere que a perimplantite poderia ser induzida pelos mesmos mecanismos da doença periodontal (Socransky et al., 1998; Mombelli, 2002.; Guggenheim et al., 2009; Filoche et al., 2010).

Assim como em Periodontia, os sulcos perimplantares apresentam altas proporções de células cocóides, sendo a proporção de espécies anaeróbicas/aeróbicas baixa. Então, a contagem de células gram negativas anaeróbicas seria pequena e a detecção de periodontopatógenos muito baixa (Mombelli et al., 1995; Tanner et al., 1998; Mombelli, 2002; Quirynen et al., 2002). Sendo, portanto as bactérias frequentemente encontradas em implantes saudáveis e bem sucedidos os: *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. e *Capnocytophaga ochracea* (Pfau et al., 2005).

Já em implantes com sinais de inflamação perimplantar as bactérias encontradas com maior frequência seriam: *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Campylobacter rectus*. Em bolsas acima de 6 mm também seriam encontradas as bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (Becker et al., 1990; Bollen et al., 1996; Kawahara et al., 2000; Mombelli, 2002; Mombelli, 1998; Quirynen et al., 2002).

Fato comprovado por Fong et al. (1999), que constataram ser a microbiota presente na perimplantite similar a da periodontite avançada, composta por espiroquetas e anaeróbios gram-negativos *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*.

Em relação ao controle destes microrganismos, estudos apontam um constante crescimento de resistência a vários tipos de antimicrobianos por parte de *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp., particularmente aos β -lactâmicos, Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina e Metronidazol, o que justifica a busca por terapias e sistemas de liberação de fármacos locais e com concentração inibitória controlada (Pfau et al., 2005).

Tendo em vista que os componentes protéticos sobre implantes, como o parafuso de cobertura e cicatrizador, ficam expostos à cavidade oral ou localizados, na maioria das vezes, em regiões subgingivais suscetíveis à microflora oral, seria importante um rigoroso controle desta microflora. Esta condição de manutenção constante do estado de saúde perimplantar reduziria os riscos de uma possível

perda de suporte ósseo e fibroso pela infecção (Mombelli et al., 1995; Mombelli, 2002; Quirynen et al., 2002; Schwarz et al., 2006).

De fato, dada a condição de manutenção constante de saúde, neste estudo buscamos criar biomateriais que satisfaçam a cobertura de componentes implantares e proteção de enxertos, evitando o risco de infecções e perdas (Lan et al., 2013).

2.2 Sistemas de liberação de fármacos

Há duas maneiras de melhorar a ação de um fármaco. A primeira envolve o controle da liberação do mesmo através da redução e/ou eliminação de seus efeitos indesejáveis (aumento do índice terapêutico). A segunda se preocupa com a liberação do fármaco em sítios específicos, o que minimiza os seus efeitos sistêmicos (Schwach-Abdellaoui et al., 2000). Pautada nestes parâmetros nasceu o conceito de liberação farmacológica controlada.

A liberação controlada de fármacos envolve sistemas capazes de transportar o fármaco até um alvo específico, diminuindo, assim, os efeitos indesejáveis da ação em outros sítios não requisitados. O fármaco fica ligado a um transportador (carreador), que é o responsável por contornar as propriedades físico-químicas limitantes, melhorando, desta forma, a farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controle da absorção e distribuição tecidual) e os efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica) dos mesmos (Henrique et al., 2006).

Os sistemas de liberação farmacológicos envolvem um tipo de metodologia que utiliza um ou mais polímeros como carreadores do fármaco com a finalidade de controlar sua liberação, prolongar a eficácia, além de reduzir efeitos colaterais e auxiliar a liberação do fármaco na área alvo (Yang et al., 2008).

Estes carreadores são de natureza e composição variada sendo sua administração segura devido a sua biocompatibilidade. Eles compõem um sistema de liberação controlada cujos objetivos principais envolvem a manutenção constante da concentração sanguínea da droga, assegurando uma maior biodisponibilidade, e reduzindo os efeitos colaterais, o que realça a adesão do paciente ao tratamento.

Quando comparados aos sistemas convencionais, a liberação controlada oferece a grande vantagem de manter a concentração do fármaco constante na faixa terapêutica por um período prolongado, utilizando-se de uma única dosagem, o que pode aumentar a eficácia clínica e diminuir a toxicidade. Diferente da administração sistêmica onde a concentração do fármaco na corrente sanguínea apresenta um pico máximo e, posterior declínio. Como desvantagem há a dificuldade de interrupção da ação farmacológica de um medicamento administrado por estes dispositivos, além do alto custo de alguns polímeros biodegradáveis (principais carreadores) e da nanotecnologia. Há, também, o risco de nanopatologia, ou seja, a presença de nanopartículas de natureza inorgânica em tecidos humanos, que não são metabolizadas e têm excreção dificultada, levando a sintomas, como febre, hepatomegalia e acidose metabólica (Henrique et al., 2006).

Para ser escolhido como biomaterial de um sistema de liberação farmacológico, o material deve contemplar as seguintes características: (a) ser livre de impurezas, aditivos, estabilizantes, resíduos catalíticos e emulsificantes; (b) as propriedades físicas, químicas e mecânicas não podem ser alteradas pelo ambiente biológico (exceto nos sistemas “bioerodíveis”); (c) estabilidade térmica e mecânica; (d) permitir processamento, aglomeração, moldagem em filmes, bastões, tubos, etc; (e) não carcinogênico, tóxico e/ou inflamatório e (f) permitir esterilização ou preparo em condições assépticas (Schwach-Abdellaoui et al., 2000).

Dentro da gama de biomateriais já foram fabricados diversos tipos e apresentações de liberação farmacológicos tais quais as partículas, tiras, fibras porosas, géis e cimentos (Schwach-Abdellaoui et al., 2000; Tamimi et al., 2008).

Independente da forma de apresentação os sistemas podem ser classificados de acordo com o seu comportamento químico como: (a) *sistema controlado por solvente* – neste sistema há permeabilidade de pequenas moléculas após a hidratação da matriz polimérica; (b) *sistema de reserva* – este sistema é controlado pela difusão do fármaco através de uma membrana polimérica e (c) *sistema de controle químico* – neste sistema a taxa de liberação do fármaco será controlada

pela degradação das ligações químicas e a erosão da matriz polimérica (Schwach-Abdellaoui et al., 2000).

2.2.1 Eletrofiação (fibras)

Considerando-se as tecnologias para a produção destes sistemas, uma das opções para produção do dispositivo polimérico local se refere à nanotecnologia, ciência em crescimento que tem estudado o desenvolvimento de objetos e materiais com características e dimensões de aproximadamente 100 nm. Dentro destas diversas nanoestruturas que têm sido desenvolvidas para aplicações práticas, a produção de fibras a partir de polímeros sintéticos e naturais tem recebido atenção especial devido ao controle de composição, estrutura e propriedades funcionais (Burger et al., 2006).

As funcionalidades das fibras poliméricas podem ser dominadas através do conhecimento da localização de suas moléculas nas superfícies das fibras, podendo especificar a produção de propriedades de cada uma através do domínio de sua composição superficial e morfologia. Estes aspectos levaram a produção polimérica para múltiplas aplicações como construção de tecidos, biodisponibilidade de fármacos, implantes farmacológicos, biosensores e aplicações odontológicas (Zhang et al., 2005).

Uma trama polimérica desempenha características fundamentais na engenharia de tecidos, uma vez que seu desempenho pode trazer benefícios devido à imitação das características da matriz extracelular (Ma, 2008). A formação de uma trama constituindo uma malha tem como principal função o fechamento mecânico do defeito, além de induzir uma fonte de cicatrização com boa biocompatibilidade e adesão celular (González et al., 2005).

Uma das técnicas mais utilizadas para a produção destes sistemas nanométricos é a eletrofiação, que consiste na fabricação de biomateriais como fibras com diâmetro inferior a 100 nm (soluções biopoliméricas). Estas fibras têm

propriedades únicas que as distinguem de outros métodos de fabricação de biomateriais como a deposição. O processo produtivo envolve a orientação dos polímeros dentro das fibras, o que confere propriedades mecânicas superiores, por exemplo, aumento da resistência à tração. Além disso, durante o processo, o solvente é evaporado rapidamente ao longo da produção da malha polimérica, o que pode tipicamente separar a eletrofiação dos outros processos de produções poliméricas, cuja evaporação exige tempo. E por último, a pequena dimensão das fibras torna as áreas superficiais específicas, assim as propriedades das fibras podem ser altamente influenciadas pelas propriedades de superfície proporcionando rigidez a funcionalidade da fibra o que não é encontrada nas fibras grandes (Kriegel et al., 2008). Também deve ser considerado que essa técnica versátil produz malhas com topografia micro ou nanométrica e grande quantidade de porosidade o que pode mimetizar a matriz extracelular (Greiner; Wendorff, 2007).

Essas fibras eletrofiadas são de interesse particular para o encapsulamento de materiais funcionais como fármaco devido sua ampla relação superfície/volume que a estrutura geométrica única proporciona ao material (Dong et al., 2009).

Durante a confecção de malhas eletrofiadas poderá ser associado o processo de encapsulamento de compostos bioativos como fármacos e proteínas. Este método de liberação é amplamente investigado, pois as nanopartículas podem atravessar a membrana deixando disponível o fármaco e facilitando a entrega do composto à célula. Dentro deste processo há diversos métodos para incorporar bioativos nas nanopartículas sendo exemplos: auto incorporação, emulsão simples e dupla emulsão, sendo o segundo o processo mais simples. A emulsão simples consiste em 2 passos: inicialmente emulsificar uma solução polimérica contendo a substância a ser encapsulada e, posteriormente aguardar o “endurecimento” das estruturas de nanopartículas formadas (Dong et al., 2009).

Nos últimos anos, as pesquisas têm utilizado a eletrofiação na tentativa de acelerar a reparação e aumentar a biocompatibilidade dos materiais cicatrizadores (Thakur et al., 2008). Entre as vantagens do uso de fibras carregadas por fármacos está a obtenção adicional de propriedades. A literatura demonstra que o uso de fibras híbridas frequentemente exhibe propriedades sinérgicas derivadas de cada

componente incorporado ao sistema, quando comparada as propriedades da fibra isolada (Zhou et al., 2011).

Todavia, sem dúvida o mais importante no sistema de carregamento por fibras poliméricas é o aumento da especificidade ao sítio de ação farmacológico e a diminuição da dosagem em relação à terapêutica convencional (Qi et al., 2013).

Também deve ser considerado que a arquitetura da trama polimérica como de PLLA (ácido poli-L-lactídeo) demonstra aumentar seletivamente a adsorção de proteínas (Woo et al., 2003), o que contribui com a adesão celular. Além disso, a alta interconexão permitida pelos poros da fibra é um excelente contribuinte para o crescimento celular e angiogênese (Woo et al., 2009).

A engenharia de tecidos baseada na eletrofiação de fibras pode mimetizar a estrutura e favorecer a reorganização tecidual após implantação de um enxerto polimérico, assim aumentando o sucesso deste ao longo prazo (Stitzel et al., 2001).

Através da criação de uma arquitetura de matriz polimérica que mimetiza o tecido natural, a trama de fibras pode aumentar a citocompatibilidade até mesmo quando comparado às superfícies de materiais mais finas (Boland et al., 2004).

Em contrapartida, como desvantagem ao uso de polímero biodegradável como carreador para um fármaco, temos a possível “bomba” inicial de liberação antimicrobiana no local (Kankilic et al., 2014). Esse grande percentual de liberação inicial poderá dificultar uma liberação contínua e estável em níveis inibitórios desejáveis até a degradação polimérica. Sendo, portanto, muitas vezes difícil prolongar a liberação farmacológica com as membranas poliméricas como carreadoras, uma vez que a ampla área superficial e a taxa de liberação costumam ser próxima de 2 – 5 semanas (Dong et al., 2009).

2.3 Uso de dispositivos de liberação local farmacológica em Odontologia

O uso de sistemas reabsorvíveis para distribuição de fármacos teve seu início nas últimas décadas, sendo a aplicação destes biomateriais antimicrobianos com importante aumento na área médica e odontológica, especialmente na Odontologia conservadora, em que a eliminação da placa e das bactérias é fundamental para um tratamento efetivo (Balamurugan et al., 2008).

Foram conhecidos inicialmente os filmes de hidroxipropilcelulose carregados, e também os géis dentais carregados por fármacos como o Elyzol® (Dumex GmbH, Bad Vilbel, Germany, gel de 1g de benzoato de Metronidazol, equivalente a 250mg de Metronidazol (Meira et al., 2007).

Atualmente, existem no mercado odontológico cinco tipos diferentes de sistemas de liberação local de antimicrobiano: 1. Elyzol® - gel de metronidazol a 25% de concentração (Colgate-Palmolive, Surrey, United Kingdom); 2. PerioChip® - 2,5g de clorexidina incorporada a uma matriz biodegradável gelatinosa (Dexcel Pharma Technologies Ltd, Daventry, Northamptonshire); 3. Actisite® - 12,7 mg de Tetraciclina em acetato vinil etileno monolítico (ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA); 4. Arestin® - 1mg de Minociclina encapsulada em 3m de polímero bioadesivo e bioabsorvível (OraPharma, Inc, USA) e 5. Atrigel®- sistema de 2 seringas com Polin-DL-lacitídio + hidrato de doxociclina 42,5mg (QLT Inc, USA), que podem ser aplicados em diversas especialidades odontológicas (Meira et al., 2007).

Em Periodontia, para a eliminação efetiva de um patógeno, o agente antimicrobiano deve estar disponível na bolsa periodontal na concentração adequada e por um período de tempo suficiente. Estes são motivos que justificam o uso de sistemas locais que controlam a liberação do agente além de garantir concentrações ideais do fármaco em detrimento das altas concentrações no fluido sulcular (Reise et al., 2012).

Nesta especialidade são usados os sistemas de fibras não absorvíveis para a liberação de fármacos como Tetraciclina (Actisite®), estes são deixados dentro do sulco periodontal entre 7 e 10 dias, todavia o sistema é deteriorado ao longo do

tempo e, quando removido aumenta o risco de danos ao periodonto (Reise et al., 2012).

Ainda no contexto periodontal, estudos demonstraram que o uso de sistemas locais de liberação farmacológica a base de tetraciclina resultaram em diminuição da seleção de bactérias resistentes quando comparado ao uso do mesmo antibiótico sistêmico (Rodrigues et al., 2004).

Estes fatos demonstram que são necessárias investigações para este uso, podendo inclusive expandir para outras áreas da Odontologia como a Implantodontia, uma vez que ainda não há sistema local disponível que possa ser associado aos componentes implantares oferecendo uma possibilidade terapêutica.

Quando comparado o sistema de administração antimicrobiana sistêmica ao local, o último é considerado mais efetivo, uma vez que a droga específica àquele patógeno poderá ser administrada diretamente no sítio periodontal, disponibilizando concentrações efetivas. Além disso, diminui-se o risco de causar efeitos indesejáveis devido às altas concentrações antimicrobianas sistêmicas ou do desenvolvimento de seleção bacteriana (Kinane; Radvar, 1999; Rams; Slots, 2000). Além disso, atingiria a concentração quimioterápica ideal. Também contribui para modulação da resposta inflamatória, minimizando efeitos da destruição tecidual óssea e conjuntiva (Meira et al., 2007).

Tendo em vista as considerações, a criação de novos dispositivos farmacológicos compostos por materiais biocompatíveis e biodegradáveis (malhas nanométricas e filmes) poderá oferecer maiores benefícios com diminuição de riscos aos pacientes.

2.4 Características do polímero PLLA

Os polímeros bioabsorvíveis são considerados as alternativas para a melhoria e o desenvolvimento de dispositivos na área médica (Lasprilla et al., 2012). Estes

polímeros sintéticos biodegradáveis, poli-lactones, como ácido poli-lactídeo (PLA), ácido poli-glicólico (PGA) e ácido poli-caprolactones (PLL) e seus copolímeros são usados na biomedicina devida suas excelente biocompatibilidade (Cheng et al., 2009).

O ácido poli-lactídeo (PLA) foi descoberto em 1932 por Carotheus (DuPont) através do experimento de aquecimento do ácido láctico a vácuo. Após este experimento foram realizadas diferentes experimentos para a síntetização desta molécula (Lasprilla et al., 2012). Este termo PLA se refere a uma família de polímeros em que estão presentes poli-L-lactídeo (PLLA), poli-D-lactídeo (PDLA) e poli-D,L-lactideo (PDLLA) (Griffith, 2000). O fato se dá uma vez que o ácido láctico (2-hydroxypionic acid) é uma molécula quiral que existe como dois enantiômeros L e D, que diferem na sua polarização em relação à luz (Gupta et al., 2007) (figura 2.1).

Esse ácido é um dos biopolímeros mais promissores por seus monômeros serem produzidos a partir de fontes renováveis, não tóxicas, assim como outros ácidos orgânicos. No mundo, 90% do ácido láctico são produzidos a partir da fermentação de açúcares, sendo a cana a principal fonte. Os demais são sintetizados através da hidrólise do lactonitrilo (Lasprilla et al., 2012).

O PLA pode ser preparado por diferentes métodos de polimerização do ácido láctico tal qual a policondensação, abertura de anel de polimerização e os métodos diretos como desidratação azeotrópica e polimerização enzimática (Garlotta, 2001).

O Poly L-lactic acid (PLLA) ou ácido poli-L-lactídeo é um poliéster termoplástico, anfipático, linear e sintetizado a partir de fontes renováveis. É frequentemente utilizado como um material básico para diversas aplicações em biomedicina, devido sua excelente biocompatibilidade, além de ser biodegradável e atóxico ao organismo (Lasprilla et al., 2012; Reise et al., 2012). Este isômero (L) é a principal fração do PLA e constituiu também um metabólito biológico natural (Lasprilla et al., 2012).

Em clínica, o PLLA tem sido amplamente utilizado por ter diversas aplicações protéticas, cirúrgicas e de distribuição de fármacos já aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration) e European Regulatory Authorities (Lasprilla et al., 2012; Liu et al., 2013; Pilipchuk et al., 2015). São exemplos as suturas, micropartículas de

distribuição farmacológica, nanopartículas e membranas porosas para curativos teciduais (Lasprilla et al., 2012).

Dentre as vantagens na utilização de um polímero absorvível em biomedicina estão as propriedades mecânicas e não corrosão quando comparados ao titânio e demais metais (Dearnaley et al., 2007). Além disso, a não requisição de uma segunda cirurgia para remoção do material, o que reduz custos médicos e permite melhor recuperação tecidual. A possibilidade de utilização como carreadores de fármacos analgésicos, antibióticos e antiinflamatórios, além da estimulação de células específicas que possam contribuir com a regeneração tecidual e, por fim, estes materiais não interferem em exames de imagens como tomografias computadorizadas (Lasprilla et al., 2012).

Tanto o PLLA como outros polímeros com características similares são alvos de diversas pesquisas *in vitro* para o uso em biomedicina e Odontologia. Dentre as aplicações deste polímero está o uso como matriz no carreamento farmacológico. Nesta situação a escolha das características do fármaco que será associado é fundamental, já que fatores da droga como grau de hidrofília, peso molecular, pH ótimo de liberação e interações físico-químicas com a matriz polimérica são importantes na cinética de liberação da liberação farmacológica (Cui et al., 2006).

Para a utilização de um polímero como carreador é necessária sua solubilização. Em geral, os polímeros do grupo PLA são solúveis em dioxano, acetonitrila, clorofórmio, cloridrato de metileno, 1,1,2 tricloetano e ácido dicloroacético. Porém, não são solúveis em água, álcoois como metanol, etanol e propilenolico e, o PLLA especificamente na forma cristalina, não se solubiliza em acetona, etilacetato e tetrafurano (Lasprilla et al., 2012).

Quanto às características poliméricas, o mecanismo de liberação farmacológica tem uma associação direta à degradação do polímero matriz. Além disso, as vias de difusão formadas dentro da estrutura também fundamentais na liberação farmacológica. Desta forma, no caso de uma malha, o ajuste da composição e a morfologia de suas fibras tem relação com a liberação farmacológica (Sill; von Recum, 2008).

Deve-se atentar ao fato que a incorporação do fármaco numa blenda (associação polímero+substância) pode alterar radicalmente as propriedades biomecânicas dos componentes poliméricos. Além disso, outros fatores como a microestrutura obtida e a interface das fases são fundamentais para análise das propriedades mecânicas (Broz et al., 2003).

Para o processo de liberação farmacológica através de fibras poliméricas o princípio da taxa de dissolução da droga se baseará no aumento da superfície tanto do fármaco como de seu carreador correspondente (Cui et al., 2006)

Quanto à degradação, estes polímeros sofrem hidrólise simples das ligações tipo éster, o que não necessita da presença de enzimas específicas, prevenindo reações inflamatórias do organismo (Lasprilla et al., 2012). No corpo, degradam-se a subprodutos facilmente eliminados por serem moléculas com baixo peso molecular e atóxicas ao organismo (Cui et al., 2006) e essas moléculas são eliminadas facilmente através de produtos não tóxicos na urina (Lasprilla et al., 2012).

Perante a essas características, a possibilidade de se controlar a liberação farmacológica através da degradação da matriz polimérica é uma das qualidades apresentadas pelas fibras poliméricas, sendo, portanto, atrativo para o processo de liberação farmacológico (Cui et al., 2006).

Comprovando essa característica Mainil-Varlet (1997), através de estudos *in vitro* e *in vivo*, mostraram o papel importante do pH da solução na degradação de implantes cirúrgicos de PLA (Mainil-Varlet, 1997). No caso do PLLA, a degradação polimérica poderá ser acelerada quando exposto ao ácido láctico o que poderá causar uma acidose local e influenciar nas características de cicatrização da ferida cirúrgica (Reise et al., 2012).

Outro fator que poderia influenciar na degradação do polímero seria a incorporação de componente. Como exemplo a combinação de PLLA e TCP (biocerâmica ácido/ β -tricálcio) apresentou tempo de degradação longo atingindo cerca de 3 a 6 meses, no entanto quando associado a um fármaco como a Vancomicina, pode ter este tempo de degradação prolongado (Kankilic et al., 2014).

Outros fatores também interferem na característica do polímero carreador como sua forma de apresentação. A eletrofiação do PLLA pode causar alterações

em sua estrutura química. Thakur et al. (2008), após análise por calorimetria constataram que o processo de eletrofiação causou um alinhamento parcial das cadeias poliméricas. Após uma reação endotérmica e a transição vítrea do material, foi observada uma reação exotérmica relacionada a um decréscimo no alinhamento nas cadeias do PLLA e a um aumento da cristalinidade deste polímero.

Cui et al. (2006) através da análise de calorimetria diferencial exploratória (DSC) com filmes e malhas com paracetamol demonstraram que para as malhas a temperatura de transição vítrea foi inferior que para os filmes (54,6°C) e (61,7°C). Este fato poderia ser justificado pelo estresse e diminuição do grau de alinhamento e orientação das cadeias poliméricas ocasionadas pela eletrofiação. Além disso, quanto maior a concentração do fármaco houve extensão das cadeias poliméricas e diminuição da temperatura vítrea.

Ainda assim, quanto à influência do diâmetro das fibras, para fibras com diferentes diâmetros e mesma concentração farmacológica, observou-se maior percentual de liberação para as menos espessas, porém a liberação foi alta nos primeiros momentos avaliados. Este fato poderia ser justificado pela maior presença de porosidades quando comparado às fibras mais espessas, Já para os filmes, foi observada uma grande liberação farmacológica inicial em detrimento de uma liberação menor ao longo do tempo. Este fato poderia ser justificado pela característica de as moléculas dos fármacos dispostas na superfície do filme serem imediatamente liberadas, todavia, as que foram absorvidas pelo filme polimérico poderão ser liberadas apenas após a total degradação polimérica (Cui et al., 2006).

Perante a estas considerações é possível inferir que as fibras com maior aprisionamento do fármaco são mais adequadas para a liberação de antibiótico na prevenção de infecções pós-cirúrgicas. Uma justificativa seria a liberação farmacológica inicial ser importante para eliminar as bactérias antes de sua proliferação. Todavia, para aquelas bactérias resistentes a “bomba” farmacológica inicial, a liberação continuada ao longo da degradação polimérica deve ter papel importante no controle (Cui et al., 2006).

Ainda quanto as suas características, o PLLA é conhecido por se cristalizar em estruturas helicoidais (Brizzolara et al., 1996), sendo as hélices existentes nas suas fibras sintéticas capazes de mimetizarem a estrutura molecular do colágeno, o que

explicaria estes materiais oferecerem adsorção proteica, especificidade e aumento da adesão celular (Woo et al., 2003).

Figura 2.1 – Molécula do polímero PLLA

2.5 Característica química do fármaco

É fundamental conhecermos as características de cada fármaco para que seja possível desvendar possíveis interações entre o antimicrobiano, polímero e o meio (figura 2.2).

A Amoxicilina é um fármaco anfotérico que contém tanto grupo básico (NH₂) e ácido (-COOH) com pka 2.4 e 7.2. Então, grande parte de suas moléculas se encontra na forma não ionizada em pH alcalino e, também no muito ácido, o que poderá afetar a lipossolubilidade do fármaco (Zheng et al., 2010). Tem como característica o baixo peso molecular 365g/mol, o que permitiria a esta molécula ultrapassar as junções “tight” celulares, que são carregadas negativamente, e assim proporcionaria uma difusão paracelular do fármaco pelo epitélio (Matysiak-Budnik et

al., 2002). É considerada a primeira opção para o tratamento de infecções odontológicas leves ou moderadamente severas. Apresenta amplo espectro contra cocos gram-positivos e cocos e bacilos gram-negativos e, diferente das penicilinas sintéticas, apresentam boa absorção por via oral não sendo inativadas no suco gástrico (Andrade, 2014).

A Azitromicina é um antimicrobiano pertencente a “geração avançada” dos macrolídeos e difere da Eritromicina, antibiótico padrão deste grupo, por ter um grupo metil substituído por um nitrogênio no anel lactona. Este fato a torna uma molécula dibásica contrariando todos os demais antimicrobianos macrolídeos que são monobásicos (Amsdem, 2001). Além disso, a substituição pelo N-metil torna a Azitromicina mais estável que a eritromicina em pH ácido (2.1) aumentando a $t_{1/2}$ meia vida do fármaco (Esteban et al., 2009). Deve também ser considerado que pela Azitromicina ter dois grupos alifáticos de aminas capazes de interagirem com ácidos, como os ácidos de sistemas polieletrólitos, este fármaco poderia interagir com ácidos do meio favorecendo sua estabilidade química. (Esteban et al, 2009). Ela age impedindo a síntese proteica necessária ao crescimento bacteriano. Tem rápida absorção e distribuição para os tecidos, sendo o pico plasmático entre 2 a 3 horas (Debremer et al., 2003). Apresenta ótima absorção e biodisponibilidade quando administrada por via oral. Sua meia-vida é bastante prolongada, mantendo concentrações ativas teciduais durante até 10 dias, o que permite administração deste antimicrobiano em 3 dias de tratamento. Tem amplo espectro de ação similar a das penicilinas, atingindo cocos gram-positivos e cocos e bacilos gram-negativos (Andrade, 2014).

A Clindamicina (incluído o sal HCL e outras formas) é um antimicrobiano comum de escolha para o tratamento de infecções por gram-positivos. Apresenta pK_a 7.6 (Platzer; White, 2006). É uma molécula facilmente degradada dependendo da temperatura e do pH do meio aquoso e apresenta relativo alto peso molecular 461,44 g/mol, o que a torna disponível e solúvel em água (Calderó et al., 2010). É muito bem absorvida por via oral, atinge cocos gram-positivos e negativos, bactérias produtoras de penicilinas e também bacilos anaeróbios gram-negativos (Andrade, 2014).

O Metronidazol é um antimicrobiano hidrofílico, derivado imidazólico com ação antiprotozoária, antibacteriana contra bacilos, anaeróbios e gram-negativos, e bacilos gram-positivos esporulados e cocos anaeróbios. É bem absorvido por via oral, sendo distribuído na saliva e fluido do sulco gengival (Andrade, 2014). Age inibindo a síntese do DNA e afeta, especificamente, bacilos anaeróbios e as espiroquetas que na cavidade oral estão situadas na microflora subgengival (Schwach-Abdellaoui et al., 2000).

Sabemos que a característica química do fármaco interfere na solução polimérica e, conseqüentemente, nas condições do polímero obtido. Como exemplo, a adição de um fármaco que aumente a força iônica da solução polimérica poderá induzir cargas e ocasionar a redução das fibras eletrofiadas (Fong et al., 1999).

A cristalização de fármacos nas fibras poliméricas eletrofiadas tem sido observada como uma das funcionalidades da solução polimérica, sendo a separação em fases considerada a principal causa desta cristalização. Dentro deste fato, fármacos hidrofílicos, como os sais de hidrocloreto (ex. tetraciclina e doxorubina), costumam cristalizar fora da trama polimérica dos polímeros hidrofóbicos como o PLLA. Em contrapartida, os hidrofóbicos ou lipofílicos não costumam cristalizar fora da trama polimérica, mantendo-se interno a trama. Estas considerações podem implicar diretamente na característica de liberação farmacológica (Thakur et al., 2008).

Como forma de minimizar a implicação das características químicas do fármaco na liberação farmacológica, Thakur et al. (2008) constataram que para alcançar a liberação imediata de um fármaco hidrofóbico associado a um polímero também hidrofóbico, a adição de um sal hidrofílico pode ser utilizada como uma opção para manipular a liberação farmacológica, uma vez que o segundo minimiza a restrição do primeiro perante a liberação.

Para antimicrobianos hidrofílicos como a doxiciclina e tetraciclina é aceitável uma liberação farmacológica nos primeiros momentos alta a fim de atingir concentrações efetivas. No entanto, é também necessário que esta liberação seja prolongada para atingir infecções crônicas e evitar a administração repetitiva do fármaco (Feng et al., 2010).

Em relação ao pH do ambiente de ação do fármaco, Zheng et al. (2010), compararam a distribuição, transporte e farmacocinética de diferentes concentrações de Amoxicilina injetável (50mg/Kg, 100mg/Kg ou 200mg/Kg) com sua associação ao controlador de bomba de prótons Rabeprazol em estômago de ratos. Verificaram que o aumento da concentração do antimicrobiano não implicou em alteração significativa do pH do ambiente. Em contrapartida, concluíram que a associação Amoxicilina 200mg com Rabeprazol elevou o pH do suco gástrico e alterou a cinética da Amoxicilina, já que reduziu a degradação do fármaco e aumentou de sua estabilidade e, conseqüentemente, potencial antimicrobiano na mucosa gástrica contra o *H.pylori*. Este aumento no pH aumentaria a proporção de Amoxicilina não ionizada e, conseqüentemente a lipossolubilidade do fármaco, o que contribuiria para a penetração em epitélios complexos como a mucosa gástrica.

Figura 2.2 – Moléculas dos antibióticos Metronidazol, Amoxicilina, Azitromicina e Clindamicina

2.6 Associação polímero e antimicrobiano

De maneira comum, o sistema de carregamento das fibras poliméricas pode ser formado facilmente através da eletrofiação direta de uma mistura/blenda feita entre o polímero escolhido e o fármaco (Qi et al., 2013). Outra maneira de incorporar o fármaco ao carreador seria através do processo de deposição.

A associação polímero- antimicrobiano já foi estudado com diferentes tipos de polímeros carreadores e substâncias antimicrobianas:

Reise et al. (2012) associaram o PLA ao Metronidazol na concentrações de 0,1 a 40% para confecção de membranas poliméricas. Constataram que todas as concentrações incorporadas foram citocompatíveis, não havendo alteração na viabilidade celular maior que 8%. Além disso, todas as concentrações liberaram percentuais compatíveis com a concentração inibitória mínima para a principal bactéria periodontal *P.gingivalis* (0,031-1,54 µg/ml) (Poulet et al., 1999). A rugosidade e hidrofília do metronidazol concentraram os fibroblastos na superfície das fibras, o que indica que este antibiótico teria pouca influência na adesão celular, o que poderia ser uma vantagem para o uso em Periodontia (Reise et al., 2012).

Ainda quanto à associação PLA-Metronidazol, a liberação farmacológica atingiu liberação entre 32-48% após 7 dias de armazenamento. A concentração de metronidazol influenciou no diâmetro das fibras e na área superficial polimérica provavelmente pela viscosidade obtida. Foram obtidas fibras de 0,64 µm a 1,2 µm sendo o menor diâmetro e maior área a 20%. A concentração de 20% de Metronidazol apresentou liberação inicial mais rápida tendo 48% do fármaco liberado nas primeiras 48 horas. A partir do 3º dia de armazenamento a liberação decresceu atingindo parâmetro próximo ao linear. Quanto às características do polímero a calorimetria demonstrou fase de transição do material a 159°C - 163°C, o que sugeriu cristalização deste material (Reise M, 2012).

Hu et al. (2013), investigaram a associação de PLLA a ZrO₂ (zircônia) e o antimicrobiano cloranfenicol (concentrações 2%,4%,8% e 10%) como uma alternativa medicamentosa. Concluíram que a adição de cloranfenicol não ocasionou

alterações significativas no tipo e forma das fibras das membranas poliméricas até a concentração de 8% do fármaco. A partir desta concentração, as fibras foram desiguais e intercaladas por cordões, sendo a provável razão a pobre compatibilidade do fármaco com a matriz polimérica. Além disso, demonstraram que a incorporação de cloranfenicol 8% foi capaz de atingir uma liberação farmacológica de 84,3% após 72h de armazenamento do polímero (Wang et al., 2013).

Este antimicrobiano já havia sido incorporado ao polímero PGLA como membranas para cicatrização de feridas, alcançando uma redução de 93% do crescimento bacteriano sem causar citotoxicidade às células (Soscia et al., 2010).

Além de fármacos antimicrobianos, já foram incorporadas ao PLLA outras substâncias como AgNP (nanopartículas de prata), que tem atividade antimicrobiana comprovada (Liu et al., 2013). Durante investigações de membranas de PLLA + AgNP para redução de infecções e a adesão celular na região de injúria de tendões, os autores comprovaram que essas membranas foram eficazes para controle de *S.epidemics*, *S aureus* e *P aureginosa*, não sendo consideradas citotóxicas para fibroblastos.

Thakur et al. (2008) utilizaram o PLLA para a fabricação de fibras contendo o antimicrobiano mupirocina e também o anestésico lidocaína, objetivando o uso como cicatrizadores capazes de realizar a profilaxia antibiótica e controle da dor por ao menos 3 dias. Através da técnica “dual spinneret electrospinning” foi possível eletrofiar ao mesmo tempo os dois fármacos obtendo uma trama híbrida com diferentes taxas de degradação, propriedades mecânicas e funções químicas. Foi possível atingir taxas de liberação farmacológica de 90% para lidocaína e 36% para mupirocina após 72 horas. Além disso, a citocompatibilidade em fibroblastos de derme humana demonstrou que as tramas híbridas não inibiram a proliferação celular e proporcionaram adesão celular significativa quando comparada ao controle.

Wang et al. (2010) criaram tramas poliméricas de fibras a base de PLLA, dexametasona, ácido ascórbico e proteínas morfogenéticas de indução óssea (BMP7), tendo como finalidade mimetizar a arquitetura do colágeno tipo I. Foi testada “*in vivo*” e “*in vitro*” a capacidade de diferenciação de células tronco pulpares humanas no polímero PLLA, concluindo-se que o PLLA contribuiu para a diferenciação das células e a formação de um tecido semelhante à dentina. Este fato

demonstra, portanto, a aplicação potencial deste polímero na área de engenharia de tecidos.

Quanto a possíveis associações poliméricas, Feng et al. (2010) criaram um sistema a partir do encapsulamento de fatores de crescimento em nanoesferas de PLGA, que, por sua vez, foram incorporadas aos macroporos de fibras de PLLA que também receberam o antimicrobiano doxíciclina. Esta estrutura criada, semelhante à trama colágena, ficou conhecida pela capacidade de promover a adesão, proliferação e diferenciação celular, além de promover a vascularização e formação óssea devido aos fatores angiogênicos e osteogênicos incorporados. A estrutura foi capaz de liberar o antimicrobiano doxíciclina de maneira controlada e prolongada inibindo o crescimento de *S.aureus* e *E.coli* (Feng et al., 2010).

Kankilic et al. (2014) desenvolveram compósitos a base do polímero PLLA e a biocerâmica ácido/ β -tricálcio (PLLA/ β -TCP) contendo Vancomicina a fim de controlar a liberação do antibiótico e ter a biocerâmica como um osteocondutor para estimular a formação óssea no tratamento de osteomielite. Estes comprovaram efetividade para o controle de *Staphylococcus aureus* resistentes a Metilicina, sendo todos os grupos compósitos estimulantes da proliferação de células osteoblastos MSC no 3° e 7° dia através da reação de MTT. Quanto a liberação farmacológica, o grupo PLLA/ β -TCP com uma camada polimérica liberou $2,67 \pm 0,31$ mg (100%) de antimicrobiano no 1° dia. Já o grupo com dupla camada polimérica liberou $1,71 \pm 0,13$ mg (63,1%) no 1° dia e $2,49 \pm 0,64$ mg (91,9%) após 6 semanas.

Cui et al. (2006) através da comparação de parâmetros das fibras poliméricas em função da degradação polimérica e liberação farmacológica tanto de filmes quanto de malhas de (dPLLA), concluíram que adição de moléculas do fármaco, no caso paracetamol, contribuiu para a formação de fibras uniformes porém menores que o grupo controle (sem fármaco). Uma razão possível seria a influência do fármaco em alterações da solução polimérica diminuindo a tensão superficial e, conseqüentemente, aumentando a instabilidade de união. Contudo, mesmo que o fármaco possa afetar a estrutura polimérica, este manteve sua estrutura química intacta após a eletrofiação.

Há outros polímeros muito investigados, como exemplo o polydioxanone (PDSII) utilizado em biomedicina em nanofilamentos cirúrgicos (Ethicon Inc,

Somerville, NJ). Bottino et al. (2014) utilizaram o polydioxanone associado ao Metronidazol ou Ciprofloxacino para fabricação de esponjas periodontais, cujo principal objetivo seria o controle de bactérias periodontopatogênicas sem o prejuízo das comensais. Após a análise em HPLC durante 7 dias, observou os respectivos percentuais cumulativos de liberação farmacológica: cip5%(92%), cip25%(40%), met5%(30%) e met25%(40%). A amostra de ciprofloxacino 5% liberou ~75µg após 7 dias, isto é, 3 vezes mais que o grupo metronidazol 5% que liberou ~25µg. O tamanho das fibras poliméricas variou entre 477 e 1,560 nm, sendo o maior diâmetro encontrado para o grupo polímero isolado (PDS). Quanto à inibição bacteriana, não ocorreram efeitos inibitórios para o biofilme de bactérias não patogênicas *Lactobacillus casei* e *Streptococcus salivarius*, em contrapartida para as periodontopatogênicas o ciprofloxacino demonstrou inibição satisfatória para *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, enquanto o metronidazol apenas para Aa.

Fernandes-Gutierrez et al. (2013) utilizaram malhas de polipropileno de baixa densidade recobertas por polímeros hidrofílicos (HEMA e co-AMPs) impregnados com 20% de Vancomicina como proposta para uso em defeitos de cirurgias de hérnias abdominais. O polímero apresentou perfil de liberação controlada bastante prolongado (~40 dias), porém pouco constante. Através de testes em defeitos abdominais de coelhos, os autores demonstraram que o polímero manteve a liberação antibiótica por pelo menos 14 dias, controlando a infecção bacteriana de *S.aureus* e *S.epidermidis* por até 30 dias, sem difusão do antibiótico para a corrente sanguínea. Além disso, não ocorreram efeitos tóxicos em fibroblastos de pele humano após 7 dias de cultura e a análise de MEV demonstrou excelente adesão celular à camada polimérica. Desta forma, os autores indicam este sistema para outras aplicações médicas.

Obermeier et al. (2012), testaram *in vitro* diferentes sais de gentamicina a 25%, 26% e 31% como camadas de recobrimento a enxertos vasculares de politetrafluoretileno. Demonstraram que os enxertos recobertos pelo antimicrobiano reduziram o crescimento bacteriano apresentando citotoxicidade dependente da formulação do sal de gentamicina. As características de liberação farmacológica, biocompatibilidade e hemocompatibilidade foram semelhantes às encontradas nas

próteses comerciais PTFE (SEALPTFE™, Yangzhong tianyou Seals Co., Ltd, Yangzhong city, Jiangsu Prov.China) e DACRON (InerGard®, China).

Qi et al. (2013) utilizaram nanotubos inorgânicos (nanotubos halloysite) com a finalidade de encapsular o hidrocloreto de tetraciclina anteriormente a mistura ao PLGA para a eletrofiação. Este processo teve como objetivo diminuir a taxa de liberação farmacológica e controlar a alta liberação nos primeiros momentos. O sistema foi capaz de desempenhar ação antimicrobiana contra *S.aureus* por aproximadamente 42 dias, sendo biocompatível e indicado para o uso terapêutico nas áreas médicas. Deve também ser considerado que o sistema aumentou a viabilidade celular, uma vez que as fibras interconectadas por poros imitaram a estrutura da matriz extracelular proporcionando um ambiente favorável para migração e adesão celular.

Ainda quanto ao peptídeo Tetraciclina, Schwach-Abdellaoui et al. (2000) relataram que a liberação através de microesferas confeccionadas com PLA ou PGLA não é bioativa. A estabilidade deste fármaco se mantém em 100% quando adicionado um surfactante não iônico. No entanto, os estudos *in vitro* são promissores, pois demonstram uma liberação farmacológica controlada em um período de 2 semanas a 1 mês. Já este mesmo antimicrobiano Tetraciclina ou o Metronidazol, quando em tiras biodegradáveis de PHBA (ácido polihidroxibutírico) demonstra liberação por 4 a 5 dias com pico significativo no primeiro dia.

2.7 Comportamento celular

A engenharia tecidual combina conceitos de ciências exatas e biológicas com objetivo de produzir estruturas para reconstituição ou restauração de tecidos biológicos, mantendo ou melhorando as funções deste tecido (Park; Lakes, 2007). Por isso, o comportamento celular pode se relacionar diretamente as características do biomaterial.

Desde o advento dos biomateriais diferentes testes são utilizados para

observar o comportamento celular. Ainda em 1993, Cascone et al. concluíram que os testes *in vitro* seriam instrumentos válidos e fundamentais para avaliar o potencial tóxico dos materiais sintéticos nos diferentes compartimentos celulares seja através dos testes de citotoxicidade como MTT, “Neutral Red uptake” e “Kenacid Blue” ou de citocompatibilidade como os de adesão e proliferação.

Na engenharia tecidual a membrana criada ou matriz extracelular artificial tem papel importante na adesão, migração, diferenciação, neoformação e organização tridimensional da célula. A membrana polimérica é um substrato tridimensional para as células e serve como estrutura para a regeneração tecidual podendo ser substituída pelas células que serão produzidas. Por fim, essa membrana poderá oferecer um ambiente tridimensional para a adesão, proliferação e diferenciação celular. Considerando-se as características descritas, os polímeros biodegradáveis são ótimos candidatos a função de membrana, uma vez que se degradam após exercerem a função estrutural necessária a reparação tecidual (Woo et al., 2003).

Quando as células se encontrarem dentro de suas condições ideais e receberem as sinalizações químicas necessárias, essas irão secretar a matriz extracelular e os compostos para, de fato, criarem um tecido de substituição ao sítio ou defeito (Santos Jr; Wada, 2007).

A superfície adquirida pelo material polimérico tem papel fundamental no desempenho de suas características, já que fatores como volume superficial, geometria das fibras, cristalinidade e orientações do polímero poderão afetar características celulares como a afinidade proteica (Woo et al., 2003).

Neste aspecto, sabemos também que o comportamento das células em superfícies irregulares com bordas, ranhuras ou texturas é diferente que nas superfícies lisas (Saltzman, 2000).

Assim temos que considerar o conceito de “biocompatibilidade” o qual define a capacidade de um material desempenhar no hospedeiro uma resposta apropriada quando apresentar uma aplicação específica, dada as interações entre este biomaterial e o hospedeiro (Koh et al., 2010).

Acredita-se que a adesão, migração e crescimento celular nas superfícies

poliméricas seriam mediados por proteínas adsorvidas do soro sanguíneo ou proteínas secretadas pela própria célula. Pensando neste fato, Woo et al. (2003) compararam o efeito das membranas poliméricas sólidas feitas por deposição com as membranas compostas por fibras na afinidade às proteínas sanguíneas fibronectina, vitronectina, laminina e albumina de soro bovino. Concluíram que as membranas de fibras foram 2.6-3.9 mais efetivas na adsorção às proteínas. Como ambos os materiais tinham o mesmo diâmetro em suas porosidades controladas pela metodologia, este fato sugeriria que características das fibras dariam maior afinidade e força de ligação a proteínas (Woo et al., 2003).

Oyama (2015) comprovaram que membranas bioabsorvíveis produzidas pela blenda de PLLA-PLCL permitiram a adesão e crescimento de células endoteliais de veia umbilical humana. As análises de imunofluorescência com microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura, demonstraram um material cujas características aumentaram em 5 vezes a presença celular após 72 de cultivo sobre a membrana.

2.8 Comportamento de microrganismos

Para estudar o comportamento de microrganismos nas especialidades odontológicas devemos salientar o fato do aumento da resistência antimicrobiana por parte de vários microrganismos encontrados na cavidade oral. Estudos demonstram que a *Prevotella ssp.* e *Porphyromonas ssp.* têm apresentado resistência aos β -lactâmicos, Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina e Metronidazol, o que justifica o grande interesse pela criação de sistemas locais cuja concentração inibitória será controlada (Pfau et al., 2005).

Além disso, é sabido que o uso de antimicrobianos ao longo prazo pode erradicar a flora normal, o que induzirá um desequilíbrio na microbiota podendo matar os microrganismos suscetíveis e selecionar resistentes (Aminov, 2009). Este

fato poderá criar condições para a colonização por oportunistas, além da resistência de patógenos, o que aumentaria o risco de desenvolvimento de doenças (Bottino et al., 2014).

As infecções bacterianas associadas aos biomateriais são complicações indesejáveis das cirurgias modernas (Obermeier et al., 2012). Sendo, portanto fundamental a escolha do antimicrobiano adequado e a aplicação local obtendo a concentração inibitória desejada.

A adesão de bactérias a superfície de biomateriais é uma passo crucial na patogênese da infecção, uma vez que alguns microrganismos são capazes de formar um biofilme sobre a malha e, este protegerá contra o sistema imune e até mesmo a ação de antibióticos (Zinther et al., 2010).

Sabemos que as lesões periodontais, associadas ou não há biomateriais, são compostas por diversos tipos bacterianos sendo os gram negativos anaeróbios como (*P.gingivalis*, *P. intermedia*, *Fusobacterium spp*) e as espiroquetas os prevalentes. No entanto, deve ser também considerada a presença dos cocos aeróbios gram positivos (*Peptostreptococcus*) e os bacilos (*Eubacterium*) (Poulet et al., 1999).

Segundo Obermeier et al. (2012) a aplicação de um antimicrobiano como sistema local deve apresentar como características a capacidade de prevenir a colonização bacteriana e a formação de biofilmes na superfície da prótese através da liberação temporária de grande quantidade do fármaco. E também, tardiamente, este fármaco deve ser liberado da superfície protética aos tecidos adjacentes. Neste aspecto, deve se analisar a suscetibilidade de cada cepa ao antimicrobiano de escolha.

A análise através do teste de diluição em água e E teste® demonstrou que as bactérias *P.intermedia*, *P.gingivalis* e *F.spp* são sensíveis ao Metronidazol, apresentando este antimicrobiano uma excelente atividade contra as duas primeiras. A concentração inibitória mínima para *P.gingivalis* obtida foi de 0,122 µg/ml. Os autores ainda esclarecem que microrganismos suscetíveis raramente desenvolvem resistência ao Metronidazol (Poulet et al., 1999).

Um estudo clínico multicêntrico de Lowenguth et al. (1995) observou a efetividade de fibras de Tetraciclina, Actisite® (ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA), para o controle de patógenos concluindo que para os microrganismos *F.nucleatum*, *E.carrodens* e *P.intermedia* ocorreram três fases distintas: um rápido declínio do patógeno após a terapia antimicrobiana local; aumento da concentração de patógenos 1-3 meses após a terapia seguida do declínio que perdurou cerca de 3-12 meses.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o potencial de liberação farmacológica, citotoxicidade e a atividade antimicrobiana de novos dispositivos compostos por polímeros impregnados com antimicrobianos.

Comparar a capacidade de liberação farmacológica, atividade antimicrobiana, citotoxicidade e degradação de membranas ou filmes confeccionados com polímeros impregnados com quatro substâncias antimicrobianas: Amoxicilina, Azitromicina, Clindamicina e Metronidazol como alternativa ao antimicrobiano sistêmico em Odontologia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado *in vitro* com 180 (N) matrizes poliméricas em discos com 2 tipos de tamanho 15 ou 5 mm:

4.1 Material

- A- Bloco Polimérico Maciço (Filme)
- B- Membrana Polimérica por eletrofiação (Malha eletrofiada)

Os grupos foram estudados de acordo com o quadro 4.1:

Matrizes poliméricas (N= 180)							
Filmes (deposição)		Malhas (Eletrofiação)		Filmes (Deposição)		Malhas (Eletrofiação)	
pH 7.4		pH 7.4		pH 5.0		pH 5.0	
AX	Amoxicilina	AX	Amoxicilina	AX	Amoxicilina	AX	Amoxicilina
AZ	Azitromicina	AZ	Azitromicina	AZ	Azitromicina	AZ	Azitromicina
CL	Clindamicina	CL	Clindamicina	CL	Clindamicina	CL	Clindamicina
ME	Metronidazol	ME	Metronidazol	ME	Metronidazol	ME	Metronidazol
PO	Polímero	PO	Polímero	PO	Polímero	PO	Polímero

Quadro 4.1 – Descrição dos grupos poliméricos

Os discos foram avaliados em diversas etapas. Foi avaliada a taxa de liberação do antimicrobiano em função do tempo e do pH (etapa química). Foram realizadas análises de citotoxicidade em cultura de fibroblastos humanos (etapa celular) e de inibição bacteriana (etapa microbiológica). Também foram realizadas análises estruturais e de degradação (MEV). Todos os testes foram realizados em

triplicata.

A metodologia seguiu o seguinte desenho do estudo conforme a figura 4.2.

Figura 4.2 – Desenho do estudo

4.2 Confeções dos polímeros farmacológicos

Foram confeccionados dois tipos de dispositivos poliméricos para avaliação da possível liberação dos fármacos. A confecção desses dispositivos seguiu as metodologias descritas abaixo.

A. Bloco Polimérico maciço (Filme)

Foi preparada uma solução de PLLA (poli-L-lactídeo) 5% em peso em clorofórmio. Após completa diluição do polímero nos solventes foi adicionado o fármaco sendo definida a concentração padrão como 20%. Esta solução foi mantida sob agitação em vórtex até a obtenção de uma solução homogênea.

A solução foi vertida através de camadas em placas de petri e, posteriormente mantida a temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente. O material de aparência seca foi mantido 24h em dessecador a vácuo para eliminar qualquer vestígio de solvente. Após esta etapa os filmes foram cortados em discos com cortadores padrão de 15 mm para os testes químicos e celulares e 5 mm para o microbiológico.

B. Malha Polimérica confeccionada a partir de eletrofiação (Malha)

Foi preparada uma solução de PLLA 5% em peso, diluída em clorofórmio e dimetilformamida (9:1). A esta solução foi adicionado 20% de concentração do fármaco em questão, e mantido sobre agitação para obtenção de uma solução homogênea que foi submetida à eletrofiação. Para eletrofiação foi utilizada agulha de 0,584 mm de diâmetro e seringa com volume efetivo de 5 ml. Foi adotada uma voltagem de 25 kV e velocidade de alimentação de 4mL/h com distância de trabalho de 18 cm. A malha eletrofiada foi seca em dissecador a vácuo para eliminar qualquer vestígio de solvente. A malha obtida foi então cortada de forma a se obter um bloco com diâmetro de 15 ou 5 mm e espessura de 1 mm.

4.3 Análise da taxa de liberação dos fármacos

Inicialmente os materiais poliméricos confeccionados foram imersos individualmente em tubos de Falcon com solução tampão pH 7.4 ou pH 5.0 e armazenados em estufa à 37 °C. Estes pHs foram escolhidos em virtude de o sítio receptor ser considerado com pH neutro (7.4) em condições normais ou mais ácidas quando em situações de inflamação ou infecção (pH 5.0).

Posteriormente, alíquotas (300µL) das soluções foram coletadas nos tempos 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas para determinar a taxa de liberação em função do tempo, e, por meio do HPLC (cromatografia líquida de alta performance) foi realizada a leitura das alíquotas para identificação da quantidade de fármaco em cada momento. Os parâmetros da análise por HPLC foram determinados de acordo com a condição metodológica para cada antimicrobiano, segundo a tabela 4.1:

Tabela. 4.1 - Parâmetros escolhidos para Cromatografia de Alta Performance

Fármaco	Solvente	Tampão para HPLC	Ph do tampão	Espectro (nm)
Clindamicina	45% acetonitrila	55% Fostato de Potássio	7.4	210
Metronidazol	45% acetonitrila	55% Fostato de Potássio	7.4	300
Azitromicina	80% metanol	20% Fostato de Potássio	7.4	210
Amoxicilina	45% acetonitrila	55% Fostato de Potássio	3.5	230
PLLA	45% acetonitrila	55% Fostato de Potássio	7.4	Controle com cada espectro

4.4 Análise da atividade antimicrobiana

A atividade de cada antimicrobiano foi determinada através da difusão do fármaco em ágar das culturas de *Porphyromonas gingivalis* e *S. pyogenes*.

4.4.1 Teste de difusão em ágar

Este teste determinou a capacidade de inibição do crescimento bacteriano dos agentes antimicrobianos incorporados nas bases poliméricas. Para tal as bases poliméricas foram preparadas em forma de discos de 5 mm de diâmetro x 1,0 mm de altura ou malhas com as mesmas dimensões. Para determinar a eficiência dos agentes antimicrobianos incorporados nas bases poliméricas, cepas de referência de *S. pyogenes* (ATCC 10782) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) foram utilizadas. O método de difusão em ágar foi empregado. O experimento foi realizado em triplicata. As culturas de 24 horas de cada uma das bactérias em meio líquido (Caldo triptone soja para *S. pyogenes*) e (caldo Triptone soja suplementado com hemina (0,5 mg/ml) e menadione (1mg/ml) (TSBHK) para *P. gingivalis* foram diluídas até que as suspensões bacterianas atingiram o valor de 0,5 da escala de McFarland (5×10^7 UFC /ml) também averiguadas em espectrofotômetro. Após obtenção da confluência esperada, 500 µl de solução foram inoculados com auxílio de swab na superfície das placas de Agar Muller Hinton para *S. pyogenes* e ágar sangue suplementado com hemina (0,5 mg/ml) e menadione (1 mg/ml) (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) (ASHK) para *P. gingivalis*. A seguir, os discos de bases poliméricas contendo os agentes antimicrobianos testados, controles (sem adição dos agentes), além de discos comerciais (Tabela 4.2 e Figura 4.1) contendo cada um dos agentes antimicrobianos foram dispostos individualmente na placa de petri 150 mm de diâmetro. Após incubação a 37°C por 48 horas em aerobiose para *S. pyogenes*, e por 5 dias sob atmosfera de anaerobiose (85% N₂, 5% CO₂ e 10% H₂) obtida em

câmara de anaerobiose (Plas Labs, Lansing, MI, EUA) para *P. gingivalis* foi realizada a leitura. O halo de inibição foi medido com auxílio de régua milimetrada padrão, e fotografado com uma escala para arquivo e comparação final. O cálculo do diâmetro dos halos foi realizado no programa Adobe Photoshop CS4.

Tabela. 4.2 - Parâmetros dos Discos Padrões (Paper disc controle)

Fármaco	Concentração
Amoxicilina	10 mcg
Azitromicina	15 mcg
Clindamicina	2mcg
Metronidazol	50 mcg

Figura 4.2 – Disco padrão (paper disc)

4.5 Análise da citotoxicidade

A realização do teste de citotoxicidade envolveu inicialmente a obtenção das células viáveis e, posterior teste de citotoxicidade direta.

4.5.1 Obtenção das células

Foi realizada uma cultura primária de fibroblastos humanos a partir de fragmento de mucosa queratinizada coletados na Clínica de Implantodontia sob Direção da Clínica Integrada da FOU SP, segundo aprovação do Comitê de Ética segundo parecer n.736.009 (Anexo A). Os fragmentos foram coletados durante o procedimento de reabertura de implante com auxílio de Bisturi punch de 0,6 mm, e, então adequadamente manipulados e colocados em meio de cultura para fibroblastos (DMEM). Após 7 dias as células começaram a migrar e com aproximadamente 15 dias a placa de petri estava com 90% de confluência. Nesse momento, foram retirados os fragmentos de gengiva, seguido da tripsinização das células para expansão das mesmas.

O cultivo das células foi realizado no Laboratório de Cultivo Celular do Laboratório de Biologia Oral da FOU SP. Os fibroblastos de gengiva humana foram cultivados em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal de bezerro (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) e 1% de solução antimicrobiana-antimicótica (Sigma®).

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular. As células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo

95% de ar e 5% de dióxido de carbono. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscópio de fase em culturas crescidas sobre poliestireno (plástico), que serviu como controle. Os FGHs na terceira passagem (p3) foram contados em um hemicitômetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e plaqueados em placas de 24 poços conforme o objetivo. Após atingirem a subconfluência, as células foram removidas dos frascos de cultura, contadas em um hemicitômetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). A contagem das células foi realizada por meio de microscópio invertido.

Após todo processo de cultivo, as amostras de polímeros farmacológicos foram suplementadas com 10% de soro fetal de bovino (SFB; Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) e 1% de gentamicina (Sigma®) e posteriormente armazenadas em solução rica em fibroblastos T3.

4.5.2 Citotoxicidade direta

Os ensaios foram realizados em placas de 24 wells A/2 (Corning®, New York, Estados Unidos). Como controle positivo de citotoxicidade foi usado a própria placa de poliestireno e como controle negativo, uma solução de fenol 1%. As células foram depositadas sobre os materiais em estudo e mantidas em condições favoráveis para o seu desenvolvimento. As análises executadas foram feitas com 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Transcorridos os tempos experimentais, as placas foram preparadas para leitura de absorbância.

O meio de cultura foi retirado e os poços lavados com PBS estéril. Em seguida, foram colocados 90 µL de meio de cultura com 10% SFB, mais 10 µL de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) MTT (MTT; 5 mg/mL em tampão fosfato-salino [PBS] estéril) em cada poço “well” e incubados a 37°C por 3 horas. Transcorrido esse período, a solução foi retirada e os poços “wells” lavados com tampão PBS. Em seguida, foram adicionados 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), em temperatura ambiente por 15 minutos em temperatura

ambiente, para solubilizar os cristais de coloração azul/violeta, formados pela clivagem dos anéis de tetrazolium pela enzima succinato-desidrogenase (SDH) das mitocôndrias ativas. Após a solubilização, as soluções foram transferidas para uma nova placa de 96 poços “wells”, e efetuada a leitura.

A citotoxicidade dos materiais foi avaliada por espectrofotometria no aparelho Leitor de Elisa (ELX 800 – Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instruments, ICC, USA), com comprimento de onda de 590 nm.

4.6 Análise estrutural

As amostras foram submetidas as análises por fotografia digital, microscopia eletrônica de varredura e criofratura associada a microscopia

4.6.1 Análise estrutural por fotografia digital

As amostras foram fotografadas em câmera DSLR (Nikon D3200, Nikon – Japão) com a finalidade de averiguar o padrão de configuração visual do filme e malha e também de suas vertentes após a degradação de 6 meses.

4.6.2 Análise estrutural com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M –pH 7,4 durante 6 horas e, em seguida lavadas no mesmo tampão. Os espécimes foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, até etanol absoluto e depois tratadas com hexametildisilazano (HMDS), por 10 minutos.

E, posteriormente foram deixadas para secar no interior de uma capela com sistema exaustor.

Os espécimes foram então montados em suportes de alumínio e depois recobertos com uma camada de aproximadamente 25 nm de ouro em um aparelho Balzers SDC 050. A seguir, foram examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura LEO 430 operando a 10-15 kV.

A MEV foi utilizada para avaliarmos a morfologia e características iniciais da superfície polimérica como controle e após a sua degradação. Utilizamos imagens com aumento de 1000x e 5.00 kx e ENT de 1500kv.

As imagens foram também fundamentais para avaliação do diâmetro médio de fibras produzidas por eletrofiação, uma vez que a medida base identificada na MEV foi base de comparação para a mensuração no programa Image J, versão 1.48v.

4.6.3 Criofratura

Para a averiguação das fases de união polímero\ fármaco foi realizada a criofratura de todas as amostras de filmes, neste caso os discos passaram por congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) e, posteriormente foram fraturados com fórceps padrão de 3 mm. A interface obtida foi condicionada com fita própria de carbono e impregnada com argônio\ouro para a análise em microscopia eletrônica de varredura. No caso das malhas, as características do material impossibilitaram a criofratura das amostras.

4.7 Degradação

A degradação envolveu a análise de perda de massa em mg com posterior microscopia eletrônica de varredura das amostras.

4.7.1 Perda de massa

Todas as amostras iniciais foram pesadas em balança digital de precisão. Transcorrido o período final de armazenamento nas soluções tampões de 3 e 6 meses, as amostras foram secas em câmara de vácuo para eliminação de resíduos líquidos e, posteriormente pesadas para conferência do percentual da massa em gramas perdido.

4.7.2 Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura

Todas as amostras poliméricas foram submetidas à análise de microscopia de varredura (MEV) no tempo inicial (anterior a qualquer tipo de armazenamento em solução tampão) e, também após 6 meses de armazenamento nas soluções tampões de pH 7.4 ou 5.0. No caso das amostras que apresentaram degradação total após o período não foi possível realizar esta análise.

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados segundo a ordem: liberação farmacológica, análise microbiológica, análise de citotoxicidade, análise estrutural e degradação, respectivamente.

5.1 Liberação Farmacológica

A tabela 5.1 apresenta as médias do percentual de liberação farmacológica de cada fármaco e seus desvios padrões, obtidos após 168 horas (7 dias) de armazenamento polimérico.

Tabela 5.1 – Percentual médio (%) de liberação farmacológica ao longo do tempo $\pm$ DESVPAD

Fármaco	Tempo	Filme				Malha			
		ph 7.4	DESVPAD	ph 5	DESVPAD	ph 7.4	DESVPAD	ph 5	DESVPAD
Metronidazol	8	49.95	1.69	52.78	2.30	8.63	2.52	69.00	2.75
	24	67.94	6.41	79.71	15.19	15.13	2.33	62.69	10.06
	48	68.28	7.96	81.62	15.86	17.24	2.64	87.73	16.01
	72	66.26	7.28	75.52	15.80	18.01	1.61	87.58	15.04
	96	69.67	9.74	80.46	16.11	19.40	0.52	88.01	15.87
	120	70.03	5.32	82.85	16.00	17.79	1.18	88.01	16.93
	144	68.93	7.68	81.81	16.28	17.44	1.34	84.50	17.54
	168	69.62	6.33	111.64	9.53	18.16	1.25	67.89	15.91
Amoxicilina	8	38.73	7.25	3.79	0.53	16.99	4.41	4.53	8.89
	24	26.39	11.93	36.88	2.24	14.65	5.12	31.78	6.74
	48	23.98	18.28	47.08	1.94	11.15	2.86	27.55	5.87
	72	17.08	8.36	53.08	6.79	11.99	1.88	48.34	7.15
	96	16.31	6.73	55.61	2.93	8.67	2.23	47.93	4.55
	120	19.14	4.98	58.85	3.20	6.90	1.96	47.44	3.49
	144	16.84	3.73	61.44	2.01	2.62	2.05	37.57	0.41
	168	12.85	4.36	61.15	6.92	18.63	1.27	36.67	12.28
Clindamicina	8	47.86	19.10	54.89	18.23	81.10	11.95	42.14	16.54
	24	63.13	15.51	75.79	0.27	70.63	9.02	69.85	5.26
	48	65.37	13.47	76.23	1.06	54.85	11.63	72.76	5.73
	72	65.34	16.27	75.35	0.47	63.74	17.78	69.74	0.11
	96	63.94	16.54	76.47	0.65	60.51	10.66	68.75	4.15
	120	68.42	17.06	72.54	5.23	60.46	14.68	69.28	4.93
	144	67.84	14.16	73.14	3.07	64.47	15.50	70.40	3.81
	168	67.87	13.74	73.13	0.29	58.72	8.93	70.61	3.78
Azitromicina	8	18.32	18.10	33.99	12.11	17.92	4.95	15.06	6.06
	24	25.43	11.71	40.60	16.46	23.45	0.12	17.95	9.54
	48	27.02	14.75	45.88	18.16	25.36	5.59	22.53	5.02
	72	32.53	18.61	30.13	10.38	46.00	5.04	40.78	4.40
	96	31.18	4.95	29.49	9.49	56.38	23.87	55.15	22.47
	120	28.61	8.62	40.93	18.24	82.85		73.15	10.71
	144	29.08	8.40	46.78	18.38	64.22	17.38	53.77	0.22
	168	27.05	11.81	43.47	23.09	62.51	9.53	45.60	6.86

O gráfico 5.1 apresenta as curvas exponenciais para o antimicrobiano Metronidazol nos padrões filmes e malhas, tanto no pH 7.4 quanto no pH 5.0. Já os gráficos 5.2, 5.3 e 5.4, para Amoxicilina, Clindamicina e Azitromicina, respectivamente.

A análise estatística descritiva dos gráficos estabelece que quando há sobreposição dos erros padrões pelas diferentes curvas (pH 7.4 e pH 5.0), considera-se semelhança entre os grupos ($p>0.05$).

Para o Metronidazol (Gráfico 5.1), o padrão Filme demonstrou resultados semelhantes entre pH 7.4 ou 5.0 ao longo do tempo. No pH neutro vimos pico de liberação de 70.03% (120 horas) de armazenamento, já no ácido liberação total (168 horas). O polímero Malha apresentou liberação superior no pH ácido comparado ao básico. Tendo pico de liberação de 88.01% (96 horas) comparado aos 19.40% (96 horas).

A observação das curvas em Amoxicilina Filmes e Malhas (Gráfico 5.2) demonstram padrões de curvas semelhantes, sendo em ambos uma curva descendente no pH 7.4 e ascendente no 5.0. Em Filme encontramos pico de 38,73% (8 horas) no pH 7.4 e 61,44% (144 horas) no pH 5.0. Já em Malhas 18,63% (168 horas) e 47,93% (96 horas).

A Clindamicina Filmes (Gráfico 5.3), entre todos antibióticos demonstrou o padrão mais equilibrado e semelhante dentre os diferentes pHs. Teve pico de liberação de 68,42% (120 horas) e 76,47% (96 horas), ambos após o 4º dia de armazenamento. Em contrapartida, as malhas apresentaram um padrão descendente ou pico de 81,10% (8 horas) e 72,76% (48 horas). Este fato representa bem a característica polimérica de alta taxa de liberação farmacológica inicial e estabilização ao longo do tempo.

A Azitromicina Filmes (Gráfico 5.4) apresentou padrão semelhante e equilibrado no pH 7.4 ou 5.0, com picos de 32,53% (72 horas) e 46,78% (144 horas), respectivamente. Para as Malhas o pH 7.4 também foi semelhante ao 5.0 ambos com picos as 120 horas (82,85% e 73,15%) respectivamente.

Gráfico 5.1 – Padrão exponencial de liberação farmacológica para Metronidazol Filmes e Metronidazol Malhas, nos pHs 5.0 e 7.4

Gráfico 5.2 – Padrão exponencial de liberação farmacológica para Amoxicilina Filmes e Amoxicilina Malhas, nos pHs 5.0 e 7.4

Gráfico 5.3 – Padrão exponencial de liberação farmacológica para Clindamicina Filmes e Clindamicina Malhas, nos pHs 5.0 e 7.4

Gráfico 5.4 – Padrão exponencial de liberação farmacológica para Azitromicina Filmes e Azitromicina Malhas, nos pHs 5.0 e 7.4

5.2 Análise microbiológica

Foram evidenciados halos de inibição para *S.pyogenes* em (Figura 5.1) e *P.gingivalis* (Figura 5.2) ao redor dos polímeros contendo os agentes antimicrobianos. As linhas em preto (Figura 5.1) e branco (Figura 5.2) são os traçados configurados em programa Adobe Photoshop, os quais foram dimensionados comparativamente com a régua milimetrada padrão para o cálculo do diâmetro do halo de inibição antimicrobiana (2 vezes o valor do Raio).

Azitromicina Controle positivo

Amoxicilina Controle positivo

Figura 5.1 – Imagem representativa do halo de inibição antimicrobiana obtido para *S.pyogenes*

Amoxicilina malha

Metronidazol Filme

Figura 5.2 – Imagem representativa do halo de inibição antimicrobiana obtido para *P. gingivalis*

A tabela 5.2 apresenta os halos de inibição em milímetros para os microrganismos gram positivo *S.pyogenes*, sendo considerado o controle positivo os halos obtidos com o disco padrão de cada antibiótico.

Tabela 5.2 – Diâmetro (mm) para Controle Positivo, Filme e Malha para os antimicrobianos Amoxicilina, Clindamicina, Azitromicina, Metronidazol e PLLA (controle) – *S.pyogenes*

Amoxicilina			
Amostra	Controle Positivo	Filme	Malha
	64.06	45.76	51.69
		57.22	43.84
		78.99	67.01
Média	64.06	60.66	54.18
DesvPad	0.00	16.88	11.78
Clindamicina			
	52.36	31.38	31.07
		21.91	36.13
		34.39	50.28
Média	52.36	29.23	39.16
DesvPad	0.00	6.51	9.96
Azitromicina			
	35.83	32.45	27.35
		53.78	41.86
		51.49	40.26
Média	35.83	45.91	36.49
DesvPad	0.00	11.71	7.96
Metronidazol			
	39,04	0.00	0.00
		0.00	0
		0.00	0
Média	39.04	0.00	0.00
DesvPad	0.00	0.00	0.00
PLLA (Controle Negativo)			
		0	0
		0	0
		0	0
		0	0
		0	0
		0	0
Média		0.00	0.00
DesvPad		0.00	0.00

O gráfico 5.5 representa as médias em milímetros dos halos de inibição antimicrobiano para o microrganismo *S.pyogenes*. Todos os grupos de fármacos foram comparados entre si (Filmes x Malhas) através de ANOVA e com seu controle positivo (paper disc) através de uma análise estatística descritiva, uma vez que são considerados materiais diferentes. Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0.05$) entre filme e malha dentro de cada grupo antibiótico.

Para Azitromicina-filme e Aitromicina-malha, mesmo que semelhantes entre si, ocorreu maior liberação que o controle padrão (paper disc).

Gráfico 5.5 – Diâmetro médio (mm) do halo de inibição para *S.pyogenes*, Controle positivo (paper disc), Filmes e Malhas

A tabela 5.3 apresenta os halos de inibição em milímetros para o microrganismo gram negativo *P.gingivallis*, sendo considerado o controle positivo os halos obtidos com o paper disc padrão de cada antibiótico.

Tabela 5.3 - Diâmetro (mm) para as amostras Controle Positivo, Filme e Malha para os antibióticos Amoxicilina, Clindamicina, Azitromicina, Metronidazol e PLLA (controle) – *P.gingivalis*

Amoxicilina			
Amostra	Controle Positivo	Filme	Malha
	69.14	73.01	63.10
		57.07	73.19
		82.30	74.77
Média	69.14	70.79	70.35
DesvPad	0.00	12.76	6.33
Clindamicina			
	74,86	63.98	99.96
		37.48	66.72
		103.27	119.5
Média	74.86	68.24	95.39
DesvPad	0.00	33.10	26.68
Azitromicina			
	53,56	59.30	50.80
		79.04	59.99
		67.77	69.1
Média	53.56	68.70	59.96
DesvPad	0.00	9.90	9.15
Metronidazol			
	72,73	84.80	57.20
		64.05	55.8
		65.12	83.04
Média	72.73	71.32	65.35
DesvPad	0.00	11.68	15.34
PLLA (Controle Negativo)			
		28.72	22.61
		35.24	15.54
		43.71	13.94
		38.01	38.41
Média		36.42	22.63
DesvPad		6.23	11.18

O gráfico 5.6 representa as médias dos halos de inibição antimicrobiano em milímetros e seus desvios padrões para o microrganismo *P.gingivalis*. Todos os grupos de fármacos foram comparados filmes x malhas através do ANOVA e com seu controle positivo (paper disc) através da estatística descritiva. As comparações dentro de cada grupo não demonstraram diferenças significativas ($p>0.05$).

Deve ser considerado que para os grupos Amoxicilina e Azitromicina tanto filme quanto malha e Clindamicina-malha, os tamanhos dos halos de inibição do crescimento foram superiores aos observados ao redor dos discos padrão, demonstrando que o material propiciou maior liberação do agente antimicrobiano do que o controle, sendo filme e malha semelhante ($p>0.05$).

Inibição de crescimento *P.gingivalis*

Gráfico 5.6 – Diâmetro médio (mm) do halo de inibição para *P.gingivalis*, Controle positivo (paper disc), Filmes e Malhas

5.3 Análise de citotoxicidade

A análise de citotoxicidade através da reação de MTT foi realizada com todos os materiais no tipo filme e malha, nos tempos 24h, 48h e 72 (Gráfico 5.7). Todos os fármacos foram comparados com o grupo PLLA, o controle positivo (vida) e o controle negativo (morte), sendo os valores significativos ($p < 0.05$) descritos nas tabelas 5.4 a 5.7 e os valores descritivos na tabela 5.8. Já os valores em que não ocorreram diferenças significativas ($p > 0.05$) não foram tabulados. As correlações entre as médias podem ser observadas nos Anexos B e C, em que a proximidade ao eixo vertical zero indica semelhança entre os grupos ($p > 0.05$).

Todas as comparações realizadas para cada antimicrobiano nos padrões filmes e malhas foram realizadas também com o PLLA (controle). As comparações entre as médias geraram intervalos de confiança. Adotamos o intervalo de 95% que podem ser observados no Anexo D para pH 5.0 e Anexo E para pH 7.4. O encontro de diferentes linhas de intervalo no eixo 0, não demonstra diferença significativa entre os grupos ($p > 0.05$).

Gráfico 5.7 – Espectro de absorvância (nm) para filmes e malhas ao longo do tempo (24h, 48h e 72h)

Tabela 5.4 – Interações para o Antibiótico Amoxicilina em que $p < 0.05$

Interação Amoxicilina x Controles x PLLA		Valor de p
Controle (+) Filme	Controle (-) Filme	< 0.001
Controle (+) Malha	Controle (-) Filme	< 0.001
Controle (+) Filme	Controle (-) Malha	< 0.001
Controle (+) Filme	Controle (-) Malha	< 0.001
Controle (-) Filme	Amox Malha	0.014
Controle (+) Filme	Amox Malha	0.012
Controle (-) Filme	Amox Filme	< 0.001
Controle (-) Malha	Amox Filme	< 0.001
PLLA Filme	Amox Filme	< 0.001
PLLA Malha	Amox Filme	0.001
Controle (-) Filme	Amox Malha	< 0.001
Controle (-) Malha	Amox Malha	< 0.001
Controle (+) Malha	Amox Malha	0.005
PLLA Filme	Amox Malha	< 0.001
PLLA Malha	Amox Malha	< 0.001
PLLA Malha	Controle (-) Malha	< 0.001
PLLA Filme	Controle (+) Filme	< 0.001
PLLA Malha	Controle (+) Malha	0.001

Tabela 5.5 – Interações para o Antibiótico Metronidazol em que $p < 0.05$

Interação Metronidazol x Controles x PLLA		Valor de p
Controle (+) Filme	Controle (-) Filme	<0.001
Controle (+) Malha	Controle (-) Filme	<0.001
Controle (+) Filme	Controle (-) Malha	<0.001
Controle (+) Malha	Controle (-) Malha	<0.001
Controle (-) Filme	Met Malha	<0.001
Controle (+) Filme	Met Filme	<0.001
Controle (-) Filme	Met Filme	<0.001
Controle (-) Malha	Met Filme	<0.001
Controle (+) Malha	Met Filme	<0.001
Controle (+) Malha	PLLA filme	<0.001
Controle (-) Filme	Met Malha	0.011
Controle (-) Malha	Met Malha	0.014
Controle (-) Malha	PLLA filme	0.003
PLLA Filme	Controle (+) filme	<0.001
PLLA Malha	Controle (+) filme	0.006
PLLA Malha	Controle (-) Malha	<0.001
PLLA Filme	Controle (-) Filme	0.002
PLLA Malha	Controle (-) Filme	<0.001
Met malha	Met Filme	<0.001
PLLA filme	Met malha	<0.001
PLLA malha	Met malha	<0.001
PLLA malha	PLLA filme	0.013

Tabela 5.6 – Interações para o Antibiótico Azitromicina em que $p < 0.05$

Interação Azitromicina x Controles x PLLA		Valor de p
Controle (+) Filme	Controle (-) Filme	<0.001
Controle (+) Malha	Controle (-) Filme	<0.001
Controle (+) Filme	Controle (-) Malha	<0.001
Controle (+) Malha	Controle (-) Malha	<0.001
Controle (-) Filme	AZI Malha	0.034
Controle (-) Filme	AZI malha	<0.001
Controle (-) Filme	AZI Filme	<0.001
Controle (-) Malha	AZI Filme	<0.001
Controle (-) Malha	AZI Malha	<0.001
PLLA filme	AZI filme	<0.001
Controle (-) Malha	AZI Malha	0.041
Controle (-) Malha	PLLA filme	0.02
PLLA Filme	Controle (+) filme	<0.001
PLLA Malha	Controle (+) filme	0.032
PLLA Malha	Controle (-) Malha	<0.001
PLLA Filme	Controle (-) Filme	0.013
PLLA Malha	Controle (-) Filme	<0.001
PLLA filme	AZI malha	<0.001

Tabela 5.7 – Interações para o Antibiótico Clindamicina em que $p < 0.05$

Interação Clindamicina x Controles x PLLA		Valor de p
Controle (+) Filme	Controle (-) Filme	<0.001
Controle (+) Malha	Controle (-) Filme	<0.001
Controle (+) Filme	Controle (-) Malha	<0.001
Controle (+) Malha	Controle (-) Malha	<0.001
Controle (+) Filme	CLI Filme	<0.001
Controle (-) Filme	CLI malha	0.025
Controle (-) Filme	CLII Filme	<0.001
Controle (-) Malha	CLI Filme	<0.001
Controle (-) Malha	CLI Malha	0.03
Controle (+) Malha	CLI filme	0.012
Controle (-) Malha	CLI Malha	<0.001
PLLA Filme	Controle (-) Malha	0.014
PLLA Filme	Controle (+) filme	<0.001
PLLA Malha	Controle (+) filme	0.023
PLLA Malha	Controle (-) Malha	<0.001
PLLA Filme	Controle (-) Filme	0.008
PLLA Malha	Controle (-) Filme	<0.001
PLLA filme	CLI malha	<0.001
PLLA filme	Controle (+) Malha	<0.001
PLLA filme	PLLA Malha	0.041
CLI Malha	Cli Filme	<0.001
CLI Malha	PLLA Malha	0.005
CLI Malha	Controle (-) Filme	<0.001

Tabela 5.8 – Valores descritivos Reação MTT

Fármaco	Filmes			Malhas		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Amoxicilina	0.139	0.067	0.059	0.135	0.104	0.071
	0.101	0.085	0.114	0.144	0.106	0.067
	0.078	0.123	0.098	0.131	0.106	0.065
Média	0.106	0.092	0.090	0.137	0.105	0.068
DesvPad	0.031	0.029	0.028	0.007	0.001	0.003
Metronidazol	0.075	0.058	0.052	0.104	0.091	0.061
	0.067	0.057	0.049	0.099	0.105	0.053
	0.059	0.058	0.053	0.131	0.112	0.057
Média	0.067	0.058	0.051	0.111	0.103	0.044
DesvPad	0.008	0.001	0.002	0.017	0.011	0.004
Azitromicina	0.091	0.071	0.061	0.094	0.085	0.057
	0.119	0.104	0.051	0.092	0.084	0.053
	0.067	0.119	0.055	0.097	0.112	0.055
Média	0.092	0.098	0.056	0.094	0.094	0.042
DesvPad	0.026	0.025	0.005	0.003	0.016	0.002
PLLA	0.061	0.081	0.051	0.076	0.063	0.062
	0.062	0.057	0.057	0.085	0.063	0.061
	0.059	0.060	0.052	0.080	0.062	0.048
Média	0.061	0.066	0.053	0.080	0.063	0.043
DesvPad	0.002	0.013	0.003	0.005	0.001	0.008
Clindamicina	0.054	0.058	0.061	0.140	0.070	0.061
	0.061	0.059	0.056	0.116	0.074	0.056
	0.065	0.063	0.059	0.111	0.093	0.059
Média	0.060	0.060	0.059	0.122	0.079	0.046
DesvPad	0.006	0.003	0.003	0.016	0.012	0.003
Controle positivo (vida)	0.107	0.086	0.080	0.096	0.073	0.065
	0.096	0.075	0.070	0.107	0.075	0.070
	0.107	0.085	0.061	0.107	0.085	0.080
Média	0.103	0.082	0.070	0.103	0.078	0.054
DesvPad	0.017	0.008	0.010	0.006	0.006	0.008
Controle negativo Fenol (morte)	0.034	0.030	0.023	0.040	0.032	0.023
	0.041	0.028	0.025	0.034	0.030	0.025
	0.040	0.024	0.015	0.041	0.028	0.015
Média	0.038	0.027	0.021	0.038	0.030	0.018
DesvPad	0.004	0.003	0.005	0.004	0.002	0.005

5.4 Análise estrutural

A fotografia digital permitiu encontrar um padrão visual das amostras tipo filme em DF1 e malha em DM1. Além disso, visualmente obtivemos após a degradação do filme fagulhas como em DF2 e em malha um material semelhante a “pó” em DM2 (Figura 6.3).

Como a incorporação de cada antibiótico trouxe as amostras poliméricas características químicas específicas foi necessária também a microscopia de varredura de cada grupo para uma análise específica do padrão.

DM1. Malha com manutenção da forma inicial

DF1. Filme com manutenção de forma inicial

DM2. Fragmentos de malhas apos degradação

DF2. Fragmentos de filmes apos degradação

Figura 5.3 – Imagem por fotografia digital dos polímeros filme e malha com manutenção da estrutura (DM1 e DF1) e de seus fragmentos após degradação (DM2 e DF2)

Como sequência a análise estrutural foram realizadas as imagens de MEV das interfaces. Para isso, preparamos o material após criofratura dos filmes com antimicrobiano. No caso das Malhas não foi possível realizar este procedimento, uma vez que a característica polimérica de alta flexibilidade e maleabilidade impossibilitou experimento.

A figura 5.4 demonstra as imagens de MEV obtidas após congelamento a -40°C com nitrogênio líquido e posterior fratura dos filmes poliméricos com fórceps padrão (3mm).

Obtivemos as imagens CRIO.AM (Amoxicilina), CRIO.AZ (Azitromicina), CRIO.CL (Clindamicina) e CRIO.ME (Metronidazol), em que o número 1 representa a interface (1000 x) de aumento e 2 a (5.00 Kx) para os quatro grupos antimicrobianos descritos.

Tanto AM quanto AZ demonstrou um padrão homogêneo na interface avaliada. Já CL demonstrou a possível formação de fases através da visualização de grandes estruturas envoltas a porção polimérica. O grupo ME embora com estrutura homogênea, apresenta estrutura cristalinas na interface, possivelmente cristais do antimicrobiano que se formaram.

O entendimento desta formação inicial foi fundamental para traçar características como perfil de liberação farmacológica, citocompatibilidade e degradação.

CRIO.AM1

CRIO.AM2

CRIO.AZ1

CRIO.AZ2

CRIO.CL1

CRIO.CL2

CRIO.ME1

CRIO.ME2

Figura 5.4 – Imagens obtidas por MEV, aumentos 1000x (esquerda) e 5.00Kx (direita) representando os antibióticos AM (Amoxicilina), AZ (Azitromicina), CL (Clindamicina) e ME (Metronidazol)

Dando sequência a análise estrutural, foi fundamental traçar o padrão visual inicial do controle PLLA e dos Filmes e Malhas com antimicrobianos.

A figura 5.5 apresenta as imagens obtidas por Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polímero (POL) PLLA em sua categoria Filme (F) e Malha (M) inicial, e também após sua degradação em solução tampão pH 5.0 (POL5-F e POL5-M) ou pH 7.4 (POL7-F e POL7-M). Já a figura 5.6 apresenta as imagens iniciais de F e M para cada um dos antibióticos estudados.

POL - F

POL - M

POL5 - F

POL5 - M

POL7 - F

POL7 - M

Figura 5.5 - Imagens obtidas por MEV, aumentos 1.5 kx para Filmes (F) e Malhas (M) do polímero PLLA

AMO - F

AMO - M

AZI - F

AZI - M

CLI - F

CLI - M

MET - F

MET - M

Figura 5.6 – Imagens obtidas por MEV (aumentos 1.5 kx) para Filmes (F) e Malhas (M) dos antibióticos Amoxicilina (AMO), Azitromicina (AZI), Clindamicina (CLI) e Metronidazol (MET)

As imagens MEV anteriormente apresentadas foram fundamentais para a mensuração do diâmetro médio das fibras poliméricas produzidas (Tabela 5.8). Os dados demonstram que foram produzidas fibras com padrões micrométricos, cuja presença de quaisquer dos antimicrobianos avaliados proporcionou diminuição da espessura da fibra.

Dentre todas as associações fármaco-antimicrobiano, a Amoxicilina apresentou o padrão mais equilibrado (menor DesvPad) e menor espessura das fibras, já o Metronidazol a maior espessura.

Tabela 5.9. Espessura das fibras poliméricas (μm)

Amostra	Diâmetro da fibra em μm				
	PLLA	Amoxicilina	Azitromicina	Clindamicina	Metronidazol
1	0.861	0.268	0.517	0.401	0.485
2	0.789	0.268	0.259	0.268	0.416
3	0.717	0.268	0.323	0.401	0.416
Média	0.789	0.268	0.366	0.357	0.439
Desvpad	0.072	0	0.134	0.077	0.04

5.5 Degradação

O gráfico 5.7 representa a comparação entre os percentuais médios de massa (mg) preservada dos Filmes poliméricos que foram armazenados em pH 5.0 e 7.4 após 3 e 6 meses, respectivamente. Ocorreram diferenças significativas entre Amoxicilina e PLLA no pH 5.0 ($p=0.007$) e também no pH 7.4 ($p=0.046$). A comparação entre os pHs semelhantes para os demais fármacos e o controle PLLA não demonstrou diferenças significativas ($p>0.05$).

Gráfico 5.7 – Percentual (%) de massa polimérica dos filmes preservada em cada solução (pH 5.0 ou 7.4) em função do tempo de armazenamento

No que se referem às malhas (Gráfico 5.8) ocorreram diferenças entre a Azitromicina e PLLA no pH 7.4 ($p=0.031$). Já as demais comparações entre os mesmos pHs não demonstraram diferenças significativas ($p>0.05$).

Gráfico 5.8 – Percentual (%) de massa polimérica das malhas preservada em cada solução (pH 5.0 ou 7.4) em função do tempo de armazenamento

Quando foram realizadas as comparações dentro do mesmo grupo em função do tipo de material (filme ou malha) (Gráfico 5.9) observou-se diferença dentro do grupo PLLA ($p=0.015$).

Gráfico 5.9 – Percentual (%) de massa polimérica preservada em cada solução (pH 5.0 ou 7.4) em função do tempo de armazenamento para Filmes e Malhas

5.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pH 5.0

A observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi escolhida como ferramenta fundamental para observar o padrão de degradação dos polímeros. A figura 5.7 demonstra as imagens obtidas para cada grupo após armazenamento por 6 meses em solução tampão (pH 5.0). A análise descritiva de cada grupo se fez fundamental tendo como base a comparação com o controle de degradação do PLLA (Figura 5.4).

Para Amoxicilina observa-se em filme a presença de inúmeros poros e nas malhas as fibras demonstraram padrão de cisão após os 6 meses de armazenamento.

Em Azitromicina Filme a estrutura manteve-se íntegra com pequena quantidade de trincas. Ocorreram alguns fragmentos prateados que hipoteticamente seriam cristais do fármaco. No grupo Malha, assim como no Amoxicilina, também ocorreu a quebra das fibras.

Tanto a Clindamicina quanto o Metronidazol demonstraram um padrão microscópico de filmes e malhas com preservação estrutural. Para o Metronidazol Filme observou-se a presença de grandes estruturas com padrão cristalino.

AMO5 - F

AMO5 - M

AZI5 - F

AZI5 - M

CLI5 - F

CLI5 - M

MET5 - F

MET5 - M

Figura 5.7 – Imagens por MEV aumento 1.5 Kx para Filmes (F) e Malhas (M) após degradação de 6 meses em solução tampão pH 5.0

5.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pH 7.4

O padrão visual de degradação no pH 7.4 pode ser observado na figura 5.8.

Para o pH 7.4 a Amoxicilina Filme demonstrou inúmeros poros e não foi possível realizar a Amoxicilina Malha uma vez que apresentou degradação total.

A Azitromicina Filme apresentou muitas trincas extensas e amplas. Em alguns casos foram observados fios escuros internos a essas trincas. Na Azitromicina Malha o padrão foi de muita fragmentação das fibras poliméricas. A Clindamicina Filme demonstrou alguns poros em sua estrutura e um padrão de malhas com preservação estrutural. O Metronidazol Filme apresentou pouquíssimos poros e Malhas a estrutura preservada.

AMO7 - F

AMO7 - M

AZI7 - F

AZI7 - M

CLIN7 - F

CLIN7 - M

MET7 - F

MET7 - M

Figura 5.8 – Imagens por MEV aumento 1.5 Kx para Filmes (F) e Malhas (M) após degradação de 6 meses em solução tampão pH 7.4

5.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa MINITAB versão 17 e os gráficos e tabelas produzidos no programa Excel 2010. Em todos os itens avaliados foram considerados o nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

Após a conferência da normalidade das médias com o teste de normalidade Anderson-Darling, foi aplicada a análise de variância das médias (ANOVA - one way) para halo de inibição antimicrobiana e (ANOVA - two way) para MTT e degradação. Quando encontrado diferença significativa entre as médias ($p < 0.05$) foi aplicado o teste complementar de Tukey.

Para a inibição farmacológica foi realizada a análise descritiva considerando-se os erros padrões. A análise do gráfico demonstrou que onde há encontro entre os desvios padrões semelhança nas análises ($p > 0.05$).

6 DISCUSSÃO

Para uma eliminação efetiva das bactérias patogênicas, o antimicrobiano deve estar disponível no local em concentrações adequadas e por um período de tempo suficiente. Esta é uma das justificativas para o uso de sistemas de liberação local de fármacos, uma vez que estes controlam a liberação de seus agentes, garantindo estabilidade de liberação contínua no local (Reise et al., 2012). No entanto, encontrar os critérios ideais se tornou um grande desafio tecnológico para este estudo.

Assim, a investigação se pautou em dois amplos conceitos: a redução e/ou eliminação dos efeitos indesejáveis do fármaco potencializando seu índice terapêutico e a criação de um dispositivo carreador do fármaco aos sítios específicos desejados pela Odontologia (controle da farmacocinética na absorção e distribuição tecidual), o que minimizaria efeitos tóxicos sistêmicos (Schwach-Abdellaoui et al., 2000; Henrique et al., 2006). Tivemos como foco confeccionar um sistema local que aumentasse a especificidade ao sítio de ação farmacológico (local) e a diminuição da dosagem em relação à terapêutica convencional sistêmica (Qi et al., 2013).

Embora já existam no mercado sistemas poliméricos de disponibilidade farmacológica para uso em Odontologia, a maior parte destes oferece risco ao periodonto por se deteriorar durante sua remoção (Reise et al., 2012) ou não satisfazem princípios esperados em outras especialidades como a Implantodontia e Cirurgia. Desta forma, neste estudo procuramos encontrar a estrutura química polimérica adequada para transformar as amostras nas formas terapêuticas desejadas (parafuso de cobertura, membrana, cicatrizador, chip periodontal, etc), sem perder as características farmacológicas ideais para o uso.

Ainda assim, tivemos a preocupação de encontrar um biomaterial que permitisse atingir concentrações adequadas localmente, mantendo-se retido ou estável por tempo prolongado em locais de maior dificuldade nas suas ações, como uma mucosa ou sítio ósseo cirúrgico e não apenas no plasma sanguíneo (Vandekerckhove et al., 1997; Van Zanten et al., 2003).

Para simular as situações locais em que este biomaterial ficaria retido na ferida cirúrgica ou periodonto, escolhemos os armazenamentos em duas soluções tampões: a primeira com pH 7.4 (levemente básico), simula o pH sanguíneo que irriga a região; a segunda pH 5.0 (ácido) copiando situações inflamatórias e/ou infecciosas cuja a liberação de fluídos e subprodutos da cadeia reparadora torna o ambiente mais ácido. Essas escolhas partiram dos conhecimentos nos quais o PLLA sofre alterações em sua degradação sob acidose local, como exemplo na presença de ácido lático (Reise et al., 2012).

A escolha do PLLA como carreador contemplou as propriedades físico-químicas e mecânicas esperadas para o biomaterial como: estabilidade em solução ácida (5.0) ou levemente básica (7.4) e em meios biológicos (células fibroblastos e microrganismos); acessibilidade ao material puro e livre de impurezas; estabilidade térmica para manutenção em estufa a 37°C e câmara de anaerobiose; capacidade do processamento em filmes ou malhas por eletrofiação; citocompatibilidade não sendo tóxico e inflamatório para os fibroblastos humanos; além de permitir esterilização em raios UV e/ou Gama para manipulação em Capela de cultura com condições adequadas. Assim contemplou muitas características preconizadas para escolha de um carreador na liberação farmacológica (Schwach-Abdellaoui et al., 2000; Lasprilla et al., 2012).

Foi também fundamental em nossa escolha a excelente biocompatibilidade do PLLA já comprovada através da aplicação em materiais na biomedicina (Lasprilla et al., 2012; Reise et al., 2012) e sua característica de biodegradabilidade total dentro de um amplo período de tempo (de 6 meses a 2 anos), o que contemplaria diversas aplicações odontológicas como chips em Periodontia, membrana para proteção de enxertia e reparação óssea, revestimento de componentes de Implantodontia e prótese, etc. Deve-se salientar que este já é um material utilizado em biomedicina sendo aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration, órgão americano) e European Regulatory Authorities (órgão europeu) (Lampe et al., 2009; Lasprilla et al., 2012; Liu et al., 2013).

O estudo por fotografias (Figura 5.3) e microscopia (Figura 5.5) deste biomaterial, seja na forma Filme ou Malha também demonstrou que suas características microscópicas e macroscópicas obtidas, independente do

antimicrobiano associado, permitiriam a proteção de uma possível ferida minimizando a dor e contaminação local, prevenindo a perda de fluídos com a manutenção da ferida úmida e irrigada. Também, sua boa aderência a mucosas e defeitos ósseos com fácil aplicação e remoção não interferiria na recuperação epitelial, podendo inclusive promovê-la (Thakur et al., 2008).

A utilização da metodologia com o polímero biodegradável PLLA como carreador do fármaco antimicrobiano, demonstrou para os quatro antimicrobianos (Amoxicilina, Azitromicina, Clindamicina e Metronidazol), controlar o perfil de liberação ao longo do tempo e prolongar a eficácia do medicamento estando de acordo com Yang et al. (2008). Seria, portanto, uma grande vantagem a administração única de uma pequena dose destes antimicrobianos, manter-se numa liberação controlada e constante (dentro da faixa terapêutica esperada), por um período prolongado até a degradação do material (Henrique et al., 2006).

Foi considerada a possibilidade de fabricação de diversas apresentações poliméricas como partículas, tiras, fibras, géis, cimentos, etc (Schwach-Abdellaoui et al., 2000; Tamini et al., 2008), todavia escolhemos discos de filmes ou malhas por estes se enquadrarem em grande parte das necessidades odontológicas como a Periodontia, Implantodontia e Cirurgia.

A confecção das malhas por eletrofiação teve como principal objetivo criar uma trama que mimetizaria a matriz extracelular contemplando situações clínicas odontológicas que já são usadas membranas como a proteção de enxertos e defeitos ósseos. Ainda assim, o uso da nanotecnologia por eletrofiação permitiu a o maior controle de parâmetros com a finalidade de obtenção das fibras orientadas e com propriedades mecânicas superiores ao filme feito por deposição (Greiner; Wendorff, 2007).

Deve-se salientar que as características das fibras favorecem a adsorção de proteínas, adesão celular e interconexão através dos poros, o que permite o crescimento celular aumentando a citocompatibilidade (Woo et al., 2003; Boland et al., 2004; Woo et al., 2009). Estes dados estão de acordo Gráfico 5.7 em que o espectro de absorbância para Filmes e Malhas após reação de MTT, demonstrou para os quatro antimicrobianos avaliados, semelhança ou superioridade das malhas quando comparadas ao seu padrão filme ou ao controle PLLA.

A metodologia apresentada deparou-se com a liberação farmacológica por 7 dias (168 horas), o que se preocupa com a maioria das situações clínico-cirúrgicas na Odontologia quando estes antimicrobianos são administrados por 7 dias. No entanto, tivemos como objetivo imitar a situação clínica de administração sistêmica, com a aplicação de um polímero, seja filme ou malha, num único momento, o que manteria a concentração do fármaco estável e constante após a estabilização da curva exponencial. O uso desta aplicação em única dosagem tende a aumentar a eficácia clínica, melhorar a adesão do paciente e diminuir toxicidade (Henrique et al., 2006).

Com a finalidade de encontrar a concentração ideal de 20% para cada antimicrobiano, consideramos que a relação entre a concentração sérica do antimicrobiano no osso alveolar e sistêmica é variável, o que tornou empírico e também baseado em estudos *in vitro* este experimento. No entanto, mesmo que essa relação seja variável conforme o fármaco administrado e as características do indivíduo, a concentração alveolar atingida seria equivalente ou ligeiramente inferior à sistêmica (Bystedt et al., 1977; Köndlell et al., 1982). Fato que permitiu considerarmos a concentração média liberada (Anexo E) como a concentração alveolar obtida numa administração sistêmica.

Escolhemos os quatro antimicrobianos mais utilizados em Odontologia. Mesmo que já exista no mercado um sistema local para administração do Metronidazol (Elysol®), ele se encontra apenas na apresentação gel (Meira et al., 2007). Os demais antimicrobianos Amoxicilina, Clindamicina e Azitromicina até este momento não apresentados nesta forma de aplicação para a Odontologia.

Tratando-se da liberação farmacológica a Azitromicina demonstrou maior percentual médio de liberação no pH ácido para os filmes. Já para as malhas o pH não interferiu. Este fato acorda com Esteban et al. (2009), cujas constatações mostraram que a molécula deste antimicrobiano é mais estável e apresenta maior tempo de meia vida em meio ácido.

No caso do Metronidazol filme e malha apresentaram padrão semelhante e superior de liberação no pH ácido. Em contrapartida, no pH levemente básico, a malha apresentou um perfil baixo e constante com pico de 19% de liberação.

Já para Amoxicilina, observamos um padrão superior de liberação no pH ácido tanto para filme quanto para malhas. Embora essa seja uma molécula anfotérica que apresenta grupos NH_2 (básico) e $-\text{COOH}$ (ácido) com pK_a 7.2 e 2.4, respectivamente (Matysiak-Budnik et al., 2002), nossa hipótese é de que a solubilização deste antibiótico juntamente ao surfactante (CTAB) teria favorecido a degradação e liberação em meio ácido. Outra hipótese é que o pH levemente básico reduziria a degradação do polímero e, conseqüentemente, a liberação do antimicrobiano nele contido (Zheng et al., 2010).

A Clindamicina também apresentou melhor liberação farmacológica em padrão ácido, o que contradiz a expectativa, uma vez que é uma molécula com pK_a 7.6 (Platzer; White, 2006). Ainda assim, deve ser retratado que este antimicrobiano apresentou o maior equilíbrio entre o padrão de liberação de filme e malha e entre os pHs ácido e básico.

Dessa forma, esses dados nos mostram que para maior parte dos perfis avaliados os antimicrobianos apresentaram melhor percentual de liberação em pH ácido, o que vai de encontro à situação clínica inflamatória e/ou infecciosa em que os fluidos deixam o pH local ácido. Este fato era esperado, uma vez que PLLA tem sua degradação aumentada em acidose local, com conseqüente influência na liberação farmacológica (Reise et al., 2012).

Ainda no que tange às propriedades de liberação dos polímeros, a “bomba” inicial de liberação foi encontrada apenas para Amoxicilina filme (pH 7.4) e Clindamicina Malha (pH 7.4) (Tabela 5.1). Este fato era aguardado com maior recorrência para as Malhas, já que a ampla área superficial e presença de poros poderiam favorecer a liberação farmacológica inicial (Dong et al., 2009). No entanto, consideramos a pequena incidência deste fato nos quatro grupos avaliados foi desejável já que perante a situação poderia ser difícil prolongar a liberação farmacológica (Dong et al., 2009).

Deve-se considerar que fatores do fármaco como seu grau de hidrofília, peso molecular, pH ótimo de liberação e possíveis interações físico-químicas com a matriz poliméricas foram importantes na cinética de liberação farmacológica (Cui et al., 2006). Além disso, características como a composição, morfologia de fibras e

degradação da matriz polimérica também influenciaram diretamente (Sill; Von Recum, 2008).

Embora todos os antibióticos analisados sejam hidrossolúveis em suco gástrico, a presença de algumas particularidades químicas tornaram alguns polímeros menos compatíveis com a molécula do PLLA (Figura 4.1) tendo interferência na liberação farmacológica, são exemplos o Metronidazol e a Amoxicilina, cuja presença de anel aromático, duplas ligações insaturadas e grupos OH- (Figura 4.2), podem ter interferido nesta característica. No caso das malhas, deve ser considerado que a polaridade da molécula do antimicrobiano poderia induzir forças iônicas na solução polimérica, o que induziria cargas ocasionando a redução das fibras eletrofiadas, com possível aumento da área de superfície e liberação farmacológica (Fong et al., 1999). Ainda assim, os dados de calorimetria de cada material ofereceram referências exploratórias como a temperatura vítrea e temperatura de fusão sendo fundamentais para análise das características estudadas dos materiais (Anexos F, G, H, I, J, K, L, M, N e O).

Demonstramos que com a fabricação de polímeros impregnados com os principais antimicrobianos utilizados em Odontologia podemos atingir níveis de liberação farmacológica estáveis, contínuos e prolongados dentro da faixa terapêutica inibitória (Anexo P), o que permite controlar infecções crônicas evitando a administração repetida do medicamento (Feng et al., 2010).

Sobre a análise microbiológica, a escolha dos microrganismos anaeróbios gram negativo *Porphyromonas gingivalis* (Figura 5.1) se pautou no fato de representar as bactérias mais frequentemente encontradas nas patologias periodontais e perimplantares (Becker et al., 1990; Bollen et al., 1996; Kawahara et al., 2000; Mombelli, 2002; Mombeli, 1998; Quirynen et al., 2002). Já o *Streptococcus pyogenes*, é um microrganismo gram positivo padrão para análise de antimicrobiograma e buscou contemplar situações odontológicas em que haverá prevalência de gram positivos aeróbios, como exemplo a proteção da ferida de um enxerto.

Os gráficos 5.2 e 5.3 mostram que os polímeros malhas e filmes produziram halos de inibição capazes de inibirem tanto *P.gingivalis* quanto *S.pyogenes*. Embora esperado que algum dos microrganismos pudesse formar biofilme sobre o material

polimérico, o que impediria a ação do antimicrobiano, especialmente no caso das malhas de fibras. Observamos que, para todos os polímeros confeccionados, ocorreu liberação farmacológica em doses inibitórias para ambos microrganismos, o que preveniria a colonização e formação de biofilme no local desejado (Obermeier et al., 2012).

Tratando-se individualmente de cada fármaco (Gráficos 5.5 e 5.6), a Clindamicina mostrou maior efetividade contra *P.gingivalis* estando de acordo com seu espectro ampliado contra aeróbios gram positivos e anaeróbios gram positivos e negativos, preferencialmente (Andrade, 2014). A Amoxicilina, embora apresente um amplo espectro contra aeróbios e anaeróbios gram positivos e gram negativos apresentou melhor desempenho contra *P.gingivalis* provavelmente devido ao fato de o polímero, neste caso, ter sido misturado ao detergente surfactante CTAB, que degradaria a camada pouco espessa da parede celular dos gram negativos mais facilmente que gram positivos. O Metronidazol como esperado apresentou efetividade apenas contra anaeróbios gram negativos. Já a Azitromicina também manteve o perfil esperado sendo efetiva tanto para gram positivos quanto para gram negativos com maior espectro contra os gram negativos.

Devemos salientar que o polímero controle PLLA, apresentou espectro de ação inibitória relevante apenas contra *P.gingivalis* (Tabela 5.2 e 5.3). Este fato também deve estar relacionado à espessura menor da parede celular de gram negativos comparados a gram positivos, que foi afetada pelos subprodutos da degradação polimérica.

Quanto à citotoxicidade, a associação do PLLA aos quatro tipos de antimicrobianos demonstrou ser biocompatível aos fibroblastos humanos (Gráfico 5.7). Ainda assim, este estudo pode salientar a já comprovada citocompatibilidade do PLLA isolado (Cheng et al., 2009).

A análise individual de cada antimicrobiano associado ao PLLA mostrou para a Amoxicilina filme e malha estímulo ao crescimento celular. A Clindamicina malha apresentou grande estímulo ao crescimento celular nos dois primeiros dias, todavia o estímulo estabilizou no terceiro dia. Já no filme a citocompatibilidade mostrou-se equilibrada em 24h, 48h e 72h. A Azitromicina filme e malha após 24h e 48h apresentou estímulo do crescimento celular que declinou nas 72 horas. Por fim, o

Metronidazol foi citocompatível com estímulo às células apenas no padrão malha, nos dois primeiros dias.

Observou-se que a fabricação de malhas carregadoras de antimicrobianos proporcionou estímulo ao crescimento celular, fato que pode ser relacionado ao aumento da área de superfície propiciada pelas fibras, o que mimetizaria a matriz extracelular com seus poros e interconexões (Woo et al., 2009). Esta característica seria útil para a manutenção de uma ferida cirúrgica e/ou defeito ósseo protegido e úmido.

De fato, concluímos que a malha polimérica comportou-se como um substrato tridimensional para as células, oferecendo um ambiente adequado para adesão, proliferação e diferenciação celular (crescimento celular) (Woo et al., 2003).

Em relação aos filmes, embora apenas a Azitromicina e Amoxicilina tenham estimulado o crescimento celular, para todos os tempos e antimicrobianos avaliados ocorreu a citocompatibilidade com os fibroblastos humanos.

Sobre a análise estrutural e degradação confirmamos que a incorporação de um fármaco como o antimicrobiano numa blenda foi capaz alterar as propriedades biomecânicas, composição, morfologia de fibras, degradação do polímero construído (Broz et al., 2003; Sill; Von Recum, 2008), uma vez que cada um dos quatro tipos de polímero confeccionado adquiriu propriedades específicas.

A Tabela 5.8 mostra dados que acordam com Cui et al., (2006) confirmando que a associação do fármaco produziu fibras poliméricas mais finas que o grupo PLLA provavelmente por diminuir a tensão superficial da solução a aumentar a instabilidade de união das moléculas. Há de ser considerado que, embora sejam fibras com padrões micrométricos, as imagens de MEV demonstram todas as características de trama, porosidades e interconexões proposto pela produção de fibras.

Vale salientar que para a produção das malhas mantivemos para todos os grupos os mesmos padrões durante a eletrofiação como: voltagem (ddp), velocidade de injeção, distância agulha metálica/placa coletora, calibre da agulha, etc. Observamos que as blendas criadas com cada antimicrobiano, de fato, adquiriram

características particulares importantes como a viscosidade da solução, o que pode ter implicado em produção de fibras menos espessas que no grupo controle PLLA.

A degradação em solução tampão fosfato de potássio, seja ácida ou levemente básica, confirmou que este polímero sofre hidrólise simples das suas ligações tipo éster, sendo desnecessária a presença de enzimas específicas, o que previne reações inflamatórias do organismo (Lasprilla et al., 2012).

A análise estrutural demonstrou que os antimicrobianos se incorporaram a estrutura polimérica seja no filme ou malha, exceto para o Metronidazol que formou cristais externos a estrutura polimérica (Figura 5.4 e 5.6) estando de acordo com a sugestão de Reise et al. (2012), que comprovou uma temperatura vítrea de 159°C - 163°C e cristalinização deste antimicrobiano quando associado ao PLLA.

Assim como esperado o pH da solução de armazenamento demonstrou papel importante na degradação polimérica (Mainil-Varlet et al., 1997). Embora esperávamos que a degradação do PLLA fosse acelerada pela acidose local, como ocorre num ambiente inflamatório com presença de ácido lático (Reise et al., 2012), notamos que após seis meses de armazenamento no padrão filme tanto PLLA quanto os polímeros antimicrobianos confeccionados encontraram padrões semelhantes de degradação independente do pH ($p > 0.05$). Já nas malhas, após 6 meses, todos também atingiram padrões degradativos semelhantes, exceto para Amoxicilina, que em pH levemente básico 7.4 apresentou degradação total e em acidose manteve 60% de sua massa preservada. Este fato contradiz Zheng et al. (2010), cujo aumento do pH associado à Amoxicilina diminuiu sua degradação, aumentando sua estabilidade e liberação farmacológica. Também contradiz a expectativa de degradação acelerada do PLLA em acidose local (Reise et al., 2012).

Por fim, após a análise da liberação farmacológica, inibição antimicrobiana, citocompatibilidade, característica estrutural e degradativa, concluímos que a forma de apresentação interferiu diretamente nas características poliméricas. Pudemos observar que para um polímero com um mesmo antimicrobiano na mesma concentração de 20%, a forma filme ou malha interferiu nas características avaliadas. Neste aspecto sabemos que a eletrofiação pode interferir no alinhamento e estresse de cadeias poliméricas (Thakur et al., 2008), alterando a temperatura de transição vítrea para inferior a dos filmes (Cui et al., 2006). Além disso, a

conformação de trama das malhas, com grande área superficial e poros de interconexões foram fundamentais para as diferenças das características de filmes e malhas.

Este estudo comprovou ser possível através de uma terapêutica medicamentosa local como os dispositivos poliméricos desenvolvidos, tratar ou prevenir infecções localizadas, sem que seja necessário o fármaco sistêmico. Fato que contribui para o uso racional de medicamentos, deixando os antibióticos sistêmicos para infecções potencialmente agressivas, o que reduz a possível seleção antimicrobiana, bem como a instalação de hipersensibilidade, reações adversas e também o gasto financeiro com fármacos (Sousa et al., 2013; Reise et al., 2012).

Através da comparação de diferentes estudos Schwach-Abdellaoui et al., (2000) notaram que nem sempre os efeitos antimicrobianos obtidos *in vitro* irão refletir os resultados *in vivo* quando o sistema local de liberação for aplicado. Portanto, ajustes metodológicos poderão ser necessários para a aplicação *in vivo*.

Sabemos que por ser *in vitro* o estudo oferece limitações inerentes ao estabelecimento de condições experimentais e possibilidade do número de análises (Kankilic et al., 2014). Desta forma, se fazem necessários futuros estudos *in vivo* e, posteriormente, testes clínicos em maior escala que permitam confirmar a viabilidade de aplicação destes polímeros.

7 CONCLUSÕES

- Todos os materiais confeccionados apresentaram potencial de liberação farmacológica, citocompatibilidade e a atividade antimicrobiana compatível para o uso como novo dispositivo para terapêutica de liberação contínua.
- O PLLA é um polímero biocompatível cuja associação com todos antimicrobianos selecionados mostrou-se segura, citocompatível e promissora na liberação de doses inibitórias contra os microrganismos *S.gingivalis* e *S. pyogenes*;
- O perfil de liberação farmacológica foi influenciado pela característica química do fármaco associado, apresentação do polímero (filme e malha), pH da solução de armazenamento;
- Tanto filmes quanto malhas foram citocompatíveis, sendo a escolha da apresentação pautada pela aplicação e especialidade clínica;
- A clindamicina apresentou o perfil mais equilibrado de liberação farmacológica tanto para filme quanto malha, no pH ácido ou levemente básico.

REFERÊNCIAS¹

- Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol.* 2009 Dec;11(12):2970-88.
- Amsden GW. Advanced-generation macrolides: tissue-directed antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18 Suppl 1:S11-5.
- Andrade ED. *Terapêutica medicamentosa em Odontologia.* 3^a ed. São Paulo: Editora Artes Médicas; 2014.
- Balamurugan A, Balossier G, Laurent-Maquin D, Pina S, Rebelo AH, Faure J, Ferreira JM. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dent Mater.* 2008 Oct;24(10):1343-51.
- Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1990 Spring; 5(1):31-8.
- Bollen CM, Papaioanno W, Van Eldere J, et al. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res.* 1996 Sep;7(3):201-11.
- Boland ED, Telemeco TA, Simpson DG, et al. Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly(glycolic acid) for tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004 Oct 15;71(1):144-52.
- Bottino MC, Arthur RA, Waeiss RA, Kamocki K, Gregson KS, Gregory RL. Biodegradable nanofibrous drug delivery systems: effects of metronidazole and ciprofloxacin on periodontopathogens and commensal oral bacteria. *Clin Oral Investig.* 2014 Dec;18(9):2151-8.
- Brizzolara D, Cantow HJ, Diederichs K, Keller E, Domb A. Mechanism of the stereocomplex formation between enatiomeric poly (lactide)s. *Macromolecules.* 1996; 29(1):191-7.
- Broz ME, VanderHart DL, Washburn NR. Structure and mechanical properties of poly(D,L-lactic acid)/poly(epsilon -caprolactone) blends. *Biomaterials.* 2003 Oct; 24(23):4181-90.
- Burger C, Hsiao BS, Chu B. Nanofibrous materials and their applications. *Annual Rev Mater Res* 2006 Aug;36:333-68.
- Bystedt H, Dahlbäck A, Nord CE. Concentration of azidocillin, erythromycin, doxycycline and clindamycin in dental alveolar serum after single oral doses. *Int J Oral Surg.* 1977 Apr;6(2):65-74.

¹ De acordo com estilo Vancouver.

Calderó G, Llinàs M, García-Celma MJ, Solans C. Studies on controlled release of hydrophilic drugs from W/O high internal phase ratio emulsions. *J Pharm Sci.* 2010 Feb; 99(2):701-11.

Cascone MG, Tricoli M, Cerrai P, Sbarbati Del Guerra R. Cell cultures in the biocompatibility study of synthetic materials. *Cytotechnology.* 1993;11 Suppl 1:S137-9.

Cheng Y, Deng S, Chen P, Rua R. Polylactic acid (PLA) synthesis and modification: a review. *Front Chem China* 2009;4:259-64.

Cui W, Li X, Zhu X, Yu G, Zhou S, Weng J. Investigation of drug release and matrix degradation of electrospun poly(DL-lactide) fibers with paracetamol inoculation. *Biomacromolecules.* 2006 May;7(5):1623-9.

Dearnaley G, Asher J, Peacock AT, Allen SJ, Waaatkins REJ. The use of thin layer activation to evaluate ion beam surface treatments of orthopaedic implant materials. *Surf Coat Technol* 2007 Aug; 201(19):8070-5.

Debremaeker D, Visky D, Chepkwony HK, et al. Analysis of unknown compounds in azithromycin bulk samples with liquid chromatography coupled to ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17(4):342-50.

Dong B, Smith ME, Wnek GE. Encapsulation of multiple biological compounds within a single electrospun fiber. *Small.* 2009 Jul;5(13):1508-12.

Engelsman AF, van Dam GM, van der Mei HC, et al. In vivo evaluation of bacterial infection involving morphologically different surgical meshes. *Ann Surg.* 2010 Jan; 251(1):133-7.

Engelsman AF, Krom BP, Busscher HJ, et al. Antimicrobial effects of an NO-releasing poly(ethylene vinylacetate) coating on soft-tissue implants in vitro and in a murine model. *Acta Biomater.* 2009 Jul;5(6):1905-10.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998 Feb;106(1):527-51.

Esteban SL, Manzo RH, Alovero FL. Azithromycin loaded on hydrogels of carbomer: chemical stability and delivery properties. *Int J Pharm.* 2009 Jan 21;366(1-2):53-7.

Feng K, Sun H, Bradley MA, Dupler EJ, Giannobile WV, Ma PX. Novel antibacterial nanofibrous PLLA scaffolds. *J Control Release.* 2010 Sep 15;146(3):363-9.

Fernandez-Gutierrez M, Olivares E, Pascual G, et al. Low-density polypropylene meshes coated with resorbable and biocompatible hydrophilic polymers as controlled release agents of antibiotics. *Acta Biomater.* 2013 Apr;9(4):6006-18.

Filoché S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010 Jan;89(1):8-18.

- Fong H, Chun I, Reneker DH. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*. 1999 Jul;40(16):4585-92.
- Garlotta D. A literature review of poly (lactic acid). *J Polym Environ*. 2001 Apr;9(2):63-84.
- Gonzalez R, Fugate K, McClusky D, et al. Relationship between tissue in growth and mesh contraction. *World J Surg* 2005 29:1038-43.
- Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007;46(30):5670-703.
- Griffith LG. Polymeric biomaterials. *Acta Mater* 2000 Jan;48 (1):263-77.
- Guggenheim B, Gmür R, Galicia JC, et al. In vitro modeling of host-parasite interactions: the 'subgingival' biofilm challenge of primary human epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2009 Dec 31;9:280. doi: 10.1186/1471-2180-9-280.
- Gupta B, Revagade N, Hilborn J. Poly(lactic acid) fiber: na overview. *Prog Polym Sci*. 2007;34:455-82.
- Henrique JS, Falcare RS, Lopes PS. Sistemas de liberação controlada. *Pharmacia Bras*. 2006; 56(Nov\Dez):p22.
- Hu C, Liu S, Zhang Y, Li B, Yang H, Fan C, Cui W. Long-term drug release from electrospun fibers for in vivo inflammation prevention in the prevention of peritendinous adhesions. *Acta Biomater*. 2013 Jul;9(7):7381-8. doi: 10.1016/j.actbio.2013.03.040.
- Kankilic B, Bilgic E, Korkusuz P, et al. Vancomycin containing PLLA/ β -TCP controls experimental osteomyelitis in vivo. *J Orthop Surg Res*. 2014 Nov 19; 9(1):114.
- Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, et al. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater*. 2000 Nov;16(6):452-5.
- Kinane DF, Radvar M. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. *J Periodontol*. 1999 Jan; 70(1):1-7.
- Koh LB, Rodriguez I, Venkatraman SS. The effect of topography of polymer surfaces on platelet adhesion. *Biomaterials*. 2010 Mar;31(7):1533-45.
- Kornman KS. Controlled-release local delivery antimicrobials in periodontics: prospects for the future. *J Periodontol*. 1993 Aug;64(8 Suppl):782-91.
- Köndell PA, Nord CE, Nordenram A. Concentrations of cloxacillin, dicloxacillin and flucloxacillin in dental alveolar serum and mandibular bone. *Int J Oral Surg*. 1982 Feb;11(1):40-3.

- Kriegel C, Arecchi A, Kit K, et al. Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008 Sep;48(8):775-97. doi: 10.1080/10408390802241325. Review. Erratum in: *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012;52(3):290.
- Lampe KJ, Namba RM, Silverman TR, et al. Impact of lactic acid on cell proliferation and free radical-induced cell death in monolayer cultures of neural precursor cells. *Biotechnol Bioeng*. 2009 Aug;103(6):1214-23.
- Lan SF, Kehinde T, Zhang X, Khajotia S, Schmidtke DW, Starly B. Controlled release of metronidazole from composite poly- ϵ -caprolactone/alginate (PCL/alginate) rings for dental implants. *Dent Mater*. 2013 Jun;29(6):656-65. doi: 10.1016/j.dental.2013.03.014. Epub 2013 Apr 17. PubMed PMID: 23602170.
- Lasprilla AJ, Martinez GA, Lunelli BH, et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review. *Biotechnol Adv*. 2012 Jan-Feb; 30(1):321-8.
- Lee KH, Maiden MF, Tanner AC, et al. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. *J Periodontol*. 1999 Feb;70(2):131-8.
- Liu S, Zhao J, Ruan H, et al. Antibacterial and anti-adhesion effects of the silver nanoparticles-loaded poly(L-lactide) fibrous membrane. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Apr 1; 33(3):1176-82.
- Lowenguth RA, Quinones C, Encarnacion M, et al. Evaluation of periodontal treatments using controlled-release tetracycline fibers: maintenance response. *J Periodontol*. 1995 Aug;66(8):708-15.
- Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Jan 14;60(2):184-98. Epub 2007 Nov 28.
- Mainil-Varlet P, Curtis R, Gogolewski S. Effect of in vivo and in vitro degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides. *J Biomed Mater Res*. 1997 Sep 5;36(3):360-80.
- Matysiak-Budnik T, Heyman M, Candalh C, et al. In vitro transfer of clarithromycin and amoxicillin across the epithelial barrier: effect of *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Dec;50(6):865-72.
- Meira ALT, Todescan SMC, Azoubel E, et al. Use of local antimicrobial in periodontics: A critical approach. *Periodontia* 2007;17(1), 83-89.
- Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000 2002 Jan;28(1):177-89.
- Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000 1998; 17 (1): 63 – 76.

Mombelli A, Marxer M, Gaberthüel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1995 Feb; 22(2):124-30.

Obermeier A, Matl FD, Schwabe J, et al. Novel fatty acid gentamicin salts as slow-release drug carrier systems for anti-infective protection of vascular biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 2012 Jul;23(7):1675-83.

Oyama HTT, Cortella LRX, Rosa INS, et al. Assessment of the biocompatibility of bioresorbable PLLA-PLCL scaffold obtained by electrospinning. *Procedia Engineering* (2015).

Park JB, Lakes RS. *Biomaterials. An Introduction.* New York:Springer; (2007).

Pfau EA, Avila-Campos MJ. *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* isolated from osseointegrated dental implants: colonization and antimicrobial susceptibility. *Braz J Microbio* 2005;36:281-85.

Pilipchuk SP, Plonka AB, Monje A, Taut AD, Lanis A, Kang B, Giannobile WV. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dent Mater.* 2015 Apr;31(4):317-38. doi: 10.1016/j.dental.2015.01.006. Epub 2015 Feb 18.

Platzer DJ, White BA. Development and validation of a gradient HPLC method for the determination of clindamycin and related compounds in a novel tablet formulation. *J PHarm Biomed Anal.* 2006 Apr 11; 41(1):84-8.

Poulet PP, Duffaut D, Lodter JP. Metronidazole susceptibility testing of anaerobic bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1999 Apr; 26(4):261-3.

Qi R, Guo R, Zheng F, et al. Controlled release and antibacterial activity of antibiotic-loaded electrospun halloysite/poly(lactic-co-glycolicacid) composite nanofibers. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013 Oct 1;110:148-55.

Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Feb; 13(1):1-19.

Rams TE, Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol 2000.* 1996 Feb;10:139-59.

Reise M, Wyrwa R, Müller U, et al. Release of metronidazole from electrospun poly(L-lactide-co-D/L-lactide) fibers for local periodontitis treatment. *Dent Mater.* 2012 Feb;28(2):179-88.

Rodrigues RM, Gonçalves C, Souto R, et al. Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J Clin Periodontol.* 2004 Jun; 31(6):420-7.

Saltzman WM. Cell interactions with polymers. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti JP. Principles of tissue engineering. San Diego: Academic Press;2000:221-p.35.

Santos AR Jr, Wada MLF. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. Polímeros: Ciênc Tecnol 2007;17(4):308-31.

Schwarz F, Bieling K, Nuesry E, Sculean A, Becker J. Clinical and histological healing pattern of peri-implantitis lesions following non-surgical treatment with an Er:YAG laser. Lasers Surg Med. 2006 Aug;38(7):663-71.

Schwach-Abdellaoui K, Vivien-Castioni N, Gurney R. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. Eur J Pharm 2000 Jul;50(1):83-99.

Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials. 2008 May;29(13):1989-2006.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of Clinical Periodontology 1998; 25:134-144.

Soscia D, Raof N, Xief Y, et al. Antibiotic-loaded PLGA nanofibres for wound healing applications. Adv Biomater. 2010 Apr;12(4):B83-B88.

Sousa GR, Silveira LB, Ferreira VL, et al. Terapia Fotodinâmica em Odontologia: atlas clínico. Nova Odessa, SP: Napoleão, 2013.

Stitzel JD, Pawlowski KJ, Wnek GE, et al. Arterial smooth muscle cell proliferation on a novel biomimicking, biodegradable vascular graft scaffold. J Biomater Appl. 2001 Jul;16(1):22-33.

Tamimi F, Torres J, Bettini R, et al. Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases. J Biomed Mater Res A. 2008 Jun 1;85(3):707-14.

Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. J Clin Periodontol. 1998 Feb;25(2):85-98.

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. Clin Oral Implants Res. 2006 Oct;17 Suppl 2:68-81.

Thakur RA, Florek CA, Kohn J, Michniak BB. Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. Int J Pharm. 2008 Nov 19; 364(1):87-93.

Van Zanten SJ, Kolesnikow T, Leung V, et al. Gastric transitional zones, areas where Helicobacter treatment fails: results of a treatment trial using the Sydney strain mouse model. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Jul;47(7):2249-55.

Vandekerckhove BN, Quirynen M, van Steenberghe D. The use of tetracycline-containing controlled-release fibers in the treatment of refractory periodontitis. *J Periodontol.* 1997 Apr;68(4):353-61.

Wang H, Ma X, Li Y, et al. Synthesis, antimicrobial and release of chloroampHenicol loaded poly(L-lactic acid)/ZrO₂ nanofibrous membranes. *Int J Biol Macromol.* 2013 Nov;62:494-9.

Wang J, Liu X, Jin X, et al. The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds in vitro and in vivo. *Acta Biomater.* 2010 Oct;6(10):3856-63. doi:10.1016/j.actbio.2010.04.009. Epub 2010 Apr 18.

Woo KM, Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Nov 1;67(2):531-7.

Woo KM, Chen VJ, Jung HM, et al. Comparative evaluation of nanofibrous scaffolding for bone regeneration in critical-size calvarial defects. *Tissue Eng Part A.* 2009 Aug;15(8):2155-62.

Yang Y, Li X, Cui W, et al. Structural stability and release profiles of proteins from core-shell poly (DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Aug;86(2):374-85.

Zhang Y, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2005 Oct;16(10):933-46.

Zheng HL, Hu YM, Bao JJ, et al. Transfer and distribution of amoxicillin in the rat gastric mucosa and gastric juice and the effects of rabeprazole. *Acta Pharmacol Sin.* 2010 Apr;31(4):501-8. doi: 10.1038/aps.2009.191. Epub 2010 Mar 22.

Zhou C, Chu R, Wu R, et al. Electrospun polyethylene oxide/celulose nanocrystal composite nanofibrous mats with homogeneous and heterogeneous microstructures. *Biomacromolecules.* 2011 Jul 11;12(7):2617-25.

Zinther NB, Wara P, Friis-Andersen H. Shrinkage of intraperitoneal onlay mesh in sheep: coated polyester mesh versus covered polypropylene mesh. *Hernia.* 2010 Dec;14(6):611-5. doi: 10.1007/s10029-010-0682-z.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE IN VITRO DE UM DISPOSITIVO POLIMÉRICO COMO ALTERNATIVA PARA O USO ANTIMICROBIANO SISTÊMICO EM IMPLANTODONTIA

Pesquisador: Taita Girio Carnaval

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30303114.1.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 738.009

Data da Relatoria: 01/08/2014

Apresentação do Projeto:

Considerando-se a procura por alternativa à antibioticoprofilaxia, o uso local do antibiótico através de polímero biodegradável diminui efeitos secundários e a resistência bacteriana. Para o tratamento de infecções periimplantares e periodontais, o uso do polímero poli-L-lactídeo (PPLA) impregnado por Amoxicilina, Azitromicina, Metronidazol ou Clindamicina a 20% de concentração pode ser favorável devido ao controle de fabricação e propriedades. O objetivo será avaliar a liberação farmacológica e biocompatibilidade do dispositivo polimérico como alternativa à antibioticoprofilaxia. Foram utilizados 180(N) discos (6 mm) para os grupos F(filme) e M (membrana), confeccionados por deposição e eletrofiliação (nanofibras), respectivamente. Para a comparação dos dados paramétricos será utilizada Análise de Variância a 5%.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B - Imagem representativa da Interação Antibiótico x PLLA x Controle (+) x Controle (-) para Filmes e Malhas

Azitromicina

Tukey Simultaneous 95% CIs

Differences of Means for C3

If an interval does not contain zero, the corresponding means are significantly different.

Clindamicina

Tukey Simultaneous 95% CIs

Differences of Means for C3

If an interval does not contain zero, the corresponding means are significantly different.

ANEXO C - Imagem representativa da Interação Antibiótico x PLLA X Controle (+) x Controle (-) para Filmes e Malhas ao longo dos tempos 24h, 48h e 72h

ANEXO D – Representação da Interação PLLA x Antibiótico no pH 5.0, sendo considerado o eixo 0 semelhança entre os grupo ($p < 0.05$)

ANEXO E - Representação da Interação PLLA x Antibiótico no pH 7.4, sendo considerado o eixo 0 semelhança entre os grupo ($p < 0.05$)

ANEXO F- DSC – PLLA Malha

ANEXO G - DSC – PLLA filme

ANEXO H - DSC – Amoxicilina Malha

ANEXO I - DSC – Amoxicilina Filme

ANEXO J - DSC – Metronidazol Malha

ANEXO K - DSC – Metronidazol Filme

ANEXO L - DSC – Azitromicina Malha

ANEXO M - DSC – Azitromicina Filme

ANEXO N - DSC – Clindamicina Malha

ANEXO O - DSC – Clindamicina Filme

ANEXO P – Liberação farmacológica média (mg)

Fármaco	Tempo	Filme				Malha			
		ph 7.4	DESVPAD	ph 5	DESVPAD	ph 7.4	DESVPAD	ph 5	DESVPAD
Metronidazol	8	2.88	0.06	2.37	0.02	2.86	0.81	2.93	0.25
	24	3.71	0.26	3.98	1.29	5.02	0.64	1.50	1.09
	48	3.72	0.16	4.08	1.35	5.73	0.66	2.82	0.47
	72	3.82	0.21	3.40	1.35	5.99	0.23	2.83	0.52
	96	3.76	0.01	4.20	1.35	6.32	0.09	2.82	0.62
	120	3.82	0.11	4.14	1.37	5.92	0.13	2.82	0.45
	144	3.73	0.12	4.27	1.39	5.80	0.14	3.58	0.86
	168	3.80	0.06	5.02	0.60	6.04	0.15	1.92	0.54
Amoxicilina	8	2.72	0.25	0.29	0.27	1.00	0.00	2.52	0.04
	24	1.85	0.30	3.37	2.69	0.81	0.20	2.33	1.46
	48	1.68	0.66	4.04	3.39	0.62	0.08	2.64	0.48
	72	1.48	0.00	4.01	3.74	0.61	0.11	1.61	1.78
	96	1.41	0.06	4.66	3.99	0.48	0.05	0.52	1.73
	120	1.33	0.04	4.99	4.23	0.38	0.05	1.18	1.73
	144	1.19	0.12	5.43	4.46	0.14	0.08	1.34	1.13
	168	0.88	0.06	3.01	3.28	1.14	0.37	1.25	1.02
Clindamicina	8	4.30	1.65	4.93	1.86	3.27	1.48	2.01	1.57
	24	5.68	1.08	6.02	1.30	3.17	1.36	3.12	1.48
	48	5.90	0.90	6.04	1.25	1.77	0.56	3.23	1.52
	72	5.89	1.18	5.99	1.33	2.64	1.55	2.39	0.58
	96	5.61	1.41	5.59	1.34	1.94	1.32	2.37	1.42
	120	6.17	1.31	6.29	0.50	2.49	1.43	3.07	1.41
	144	6.14	1.13	5.78	1.10	2.65	1.47	3.13	1.42
	168	6.14	0.97	5.34	1.39	1.89	0.49	3.13	1.39
Azitromicina	8	0.97		1.46	0.51	0.66	0.13	0.52	0.26
	24	1.26	0.49	1.78	0.81	0.87	0.07	0.66	0.37
	48	1.37	0.78	1.93	0.65	0.93	0.12	0.83	0.11
	72	1.60	0.88	2.22	1.01	1.71	0.34	1.52	0.30
	96	1.60	0.35	2.31	1.11	1.95	1.32	1.91	0.97
	120	1.43	0.33	3.19	1.68	3.26	2.59	2.70	0.16
	144	1.47	0.51	3.59	1.79	2.13	0.72	1.75	0.51
	168	1.33	0.54	3.29	1.81	2.04	0.15	1.49	0.11