UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE
RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE LÁTEX
NATURAL PARA APLICAÇÕES MÉDICAS

Rondinelli Donizetti Herculano

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área de concentração: Física
Aplicada à Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO

ABR/2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Herculano, Rondinelli Donizetti

“Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações médicas”

Ribeirão Preto, 2009.

151 p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: **Carlos Frederico de Oliveira Graeff.**

1.Biomateriais, 2.Membrana de Látex Natural, 3. Regeneração Óssea Guiada. 4.Sistema de Liberação Controlada de Fármacos.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE
RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE LÁTEX
NATURAL PARA APLICAÇÕES MÉDICAS

Rondinelli Donizetti Herculano

Orientador: Dr. Carlos F.O. Graeff

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área de concentração: Física
Aplicada à Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO

ABR/2009

À minha nova família, Ana Maria e **Ana Beatriz** pelo apoio incondicional e pela força e confiança que dedico este trabalho. Em especial, dedico todo meu sucesso a minha luz dos olhos e razão de viver, **Ana Beatriz**, minha filha e pedaço de mim.

Aos meus irmãos **Heleno Donizetti Herculano** e **Oswaldo Herculano Jr.** pelo apoio incondicional, confiança e força. Não poderia esquecer de meus pais **Oswaldo Herculano** e **Orandi Vasconcellos Herculano**, mesmo não estando aqui, certamente estão torcendo por mim de algum lugar.

Aos ex-amigos de república (**Alexandre Mana, Silvio Leão Vieira, Danievertton Moretti, Decko e Adriano Holanda**) pelos bons momentos vividos. Não posso me esquecer de agradecer ao **Jorge Antonio Gómez Luna** e **Pablo Diniz Batista** pede amizade e companheirismo.

Aos amigos de infância de Tambaú/SP, meus amigos recentes de Ribeirão Preto/SP, minha família de Tambaú, em especial, aos meus tios Agostinho e Marta Herculano. Não posso esquecer de meus primos: César, Vitória e Taís Herculano.

Agradeço pelo resto da vida a estas pessoas por confiar e torcerem por mim: **Lucas Zampolo, Léo Talamoni, Vinicius Zampolo, Thiago Sumeira, Rafael e Ricardo Delaneze, André e Marcelo Delaneze, Maicon Pavanelli, Pablo Pereira, Maurício e Murilo Martinelli, Mirela Teotônio, Clayton Mariano, José Antônio Miranda Bellotte, José David Gómez, Leandro e André Pavão, Wesley Pradal, Vinicius e Gustavo Dezotti, Diego Del Bue.** Agradeço a todas estas pessoas e suas respectivas famílias, em especial, **Eneida & Chicão, Lídia & Zezinho & Clarissa, Lourdes & Jair, Vilma & Largato, Carmem & Edson e Idetilde & Maurício.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos F. O. Graeff, a Profa. Ângela Kinoshita e a Cibele Ereno pelos trabalhos *in vivo* associados a este trabalho.

A CAPES, IMMP, FAPESP pelo apoio financeiro e principalmente a CNPq pela Bolsa de Doutorado.

Aos técnicos: CARLOS ALBERTO BRUNELLO, José Luiz Aziani, Eldereis de Paula, Lourenço Rocha e Élcio Aparecido Naves por todo o suporte que ofereceram.

Aos técnicos em informática (Adriano Costa, Decko, Adriano Holanda e Fábio) do Departamento de Física e Matemática pelo suporte e ajuda.

Em especial, ao pessoal do grupo RESSOMAT: João Borin, Jorge Gomez Luna, Mayler Martins, Rondes Ferreira, Jair Júnior, Fernando Castro, Marcelo Caetano e Ângela Kinoshita e o Prof. Oswaldo Baffa.

Ao pessoal da Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia, em especial a Luciana, Pablo Gonçalves, Tiago, Márcio, Cássia.

As pessoas que eu considero como meus amigos dos Programas de Pós-Graduação do IFSC e da FFCLRP: Ademar Caldeira, Elídia Guerra, Ernando Ferreira, Pablo Diniz, Gláucio Ribeiro, Daniel da Silva (Peitinho), Marcos Cardoso, Danievertton Moretti, Rodrigo Rotta, Júlio Ugucioni, Renato Meneghatti, Fabrício Dias, Andréa Vieira, Pancinha (Ricardo Mendonça) e Mônica Campiteli.

Agradeço do fundo do meu coração ao Pancinha e Luciana pelas caronas providenciais e importantes dadas a minha amada filha. Não posso me esquecer de agradecer ao Ernando Ferreira, Gesline e Ana Paula pelas ajudas recebidas.

As minhas ex-vizinhas: Alice, Amanda, Arianne, Juliana, Beatriz, Joyce. Ao Eric Alexandre Brito & Bianca pela confiança e amizade.

Para pessoal da casa da Pós-Graduação 12 e 13, pelo companheirismo e pelos momentos especiais. Muito Obrigado

Ao Padre Donizetti Tavares de Lima e Nossa Senhora Aparecida por sempre estarem ao meu lado nos bons e principalmente nos maus momentos.

Dedico também esta tese a minha prima Maria Alice Herculano (*“in memoriam”*).

E a DEUS, por tudo.

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho consiste na incorporação de substâncias de interesse biológico (fármacos) em filmes de látex natural (NRL). Assim, estudou-se a liberação destes, visando no futuro usar estes filmes como membrana oclusiva e como sistema de liberação controlada (SLC) de substâncias para aplicações odontológicas e ortopédicas, que envolvem a cicatrização óssea guiada. Estudamos o comportamento do SLC utilizando albumina de soro bovina (BSA) como modelo de proteína e o metronidazol (MTZ) como modelo de antibiótico. Diferentes tratamentos térmicos foram aplicados durante a confecção dos filmes a fim de gerar diferentes porosidades e com isso estudar-se a taxa de liberação destes fármacos. A taxa de liberação dos fármacos foi monitorada e quantificada utilizando o método de Lowry e o método UV-VIS. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a Microscopia de Força Atômica (AFM) determinaram a morfologia do SLC. Em outra parte deste trabalho desenvolvemos um sistema para liberação do óxido nítrico (NO) agregando-se o complexo (FeDETC) ao NRL, pois esta substância atua como *spin trap* para este radical. A taxa de liberação do NO pelo sistema NRL-FeDETC-NO foi caracterizada pela Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).

A escolha destas substâncias para este estudo deve-se pelo fato que auxiliam no processo de regeneração óssea (MTZ e NO). Entretanto, a BSA foi utilizada porque possui peso molecular da mesma magnitude e é mais barata que as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP). As BMP's são excelentes estimuladores do crescimento ósseo.

Palavras Chaves: Biomateriais, Membranas de Látex, Regeneração Óssea Guiada

ABSTRACT

In this work, we have tested Natural Rubber Latex (NRL) as an occlusive membrane for GBR with promising results. One possible way to accelerate bone regeneration would be to incorporate proteins bone morphogenetic protein (BMPs) in NRL. BMPs have strong bone-inductive activity. However since bone healing takes place in weeks to months, it is important that BMPs are released in these time scales. Instead of using BMPs, in our study we used BSA that has similar molecular weight however is less expensive. Moreover, we also employed the metronidazole (MTZ) and nitric oxide (NO) as drug delivery model. MTZ is a used antibiotic for treatment of infections in the skin, fabrics and bones. Initially, we study the BSA delivery system behavior and MTZ delivery system using different thermal treatments during the membranes polymerization. The thermal treatments control the size of the pores of the SLC and release rate of the BSA and MTZ. These membranes were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy (AFM), as well as the Lowry Method to measure the BSA release. Finally, we propose a NO delivery system made of a spin trap (iron(II)-diethyldithiocarbamate complex, FeDETC) encapsulated in a NRL matrix. NO is an early mediator of the increase in bone formation. NO delivery system presents high stability by Electron Paramagnetic Resonance. The results indicate that natural rubber latex could be used in the future as an active membrane for accelerated bone healing.

Keywords: Biomaterials; Latex Membrane; Guided Bone Regeneration

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xiv
CAPÍTULO 1 – PREFÁCIO.....	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	7
O Látex Natural.....	8
2.1 – Introdução.....	8
2.2 – O látex de borracha natural.....	10
2.3 – Processo de extração.....	10
2.4 – Preservação do látex.....	11
2.4.1 – Caracterização do látex de borracha natural.....	12
2.5 – Biocompatibilidade da membrana de látex natural.....	14
2.6 – Regeneração Óssea Guiada (ROG).....	18
2.7 – Tipos de Membranas.....	19
2.3.1 – Barreiras não absorvíveis.....	19
2.3.2 – Barreiras reabsorvíveis.....	20
2.8 - Sistema de Liberação Controlada (SLC).....	21
2.8.1 – Importância da liberação controlada.....	21
2.8.2 – A albumina de soro bovina (BSA).....	22
2.8.3 – O Metronidazol.....	23
2.8.4 – Óxido Nítrico.....	25
2.8.4.1 – Aprisionadores de Óxido Nítrico.....	27
CAPÍTULO 3 – MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	28

4.6 – Microscopia de força atômica.....	65
4.7 – Liberação da BSA.....	71
4.7.1 – Caracterização da liberação de substâncias pelas membranas de látex natural (NRL).....	71
4.8 – Liberação do Metronidazol (MTZ).....	79
4.8.1 – Caracterização da liberação de substâncias pelas membranas de látex natural (NRL).....	81
4.9 – Liberação do Óxido Nítrico (NO).....	86
4.9.1 – Espectro do sistema de liberação controlada (SLC) de NO.....	89
4.9.2 – Estudo da liberação de NO pela membrana no ar.....	90
4.9.3 – Estudo da liberação de NO pela membrana em solução aquosa..	91
 CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	 96
5.1 – Conclusões.....	97
 CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS.....	 99
 APÊNDICE A.....	 107
 APÊNDICE B.....	 119
 APÊNDICE C.....	 127

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.....**A técnica da Regeneração Óssea Guiada
- Figura 2.....**Corte para sangria da seringueira em meia espira e coleta
- Figura 3.....**O látex após centrifugação na Sorvall RC 26 Plus, a 10000 rpm e 2 h, onde são obtidas quatro frações: a fração borracha, a fração intermediária, o soro e os lutóides.
- Figura 4.....**Estrutura molecular da borracha (a), formas das cadeias (b)
- Figura 5.....**Estimulação da angiogênese, pelo látex natural
- Figura 6.....**Membrana utilizada como barreira mecânica para a técnica de ROG
- Figura 7.....**a-) Estrutura do metronidazol para tratamento de infecções na pele, tecidos e ossos; b-) Fórmula molecular, $C_6H_9N_3O_3$ e ilustração do Flagyl que possui o metronidazol como princípio ativo.
- Figura 8.....**Endotélio usa o NO para comandar o relaxamento do músculo liso da parede do vaso
- Figura 9.....**Estrutura do complexo $Fe(NO)DETC_2$
- Figura 10.....**a-) Forma; b-) Espessura de 2mm; c-) Elasticidade; d-) Flexibilidade da membrana de látex natural
- Figura 11.....**Máquina universal de ensaios – **EMIC Modelo DL 2000** utilizada nos experimentos.
- Figura 12.....**Membrana em teste
- Figura 13.....**Liberação de substâncias pela membrana de NRL e liberação da BSA pela membrana de NRL+BSA.
- Figura 14.....**a-) Soluções de diferentes concentrações de BSA, preparadas através do Método Lowry Modificado, b-) Curva de calibração de BSA utilizando método Lowry $Y = (0,012 \pm 0,004) + (1,26 \pm 0,03)x$
- Figura 15.....**Curva de calibração do material liberado pela membrana de látex em solução aquosa $Y = (7,9 \times 10^{-4} \pm 9,9 \times 10^{-4}) + (0,888 \pm 0,005)x$
- Figura 16.....**Solução de látex e solução de FeDETC

Figura 17.....Espectrômetro VARIAN E4 utilizado para estudo e caracterização do sistema liberador de NO.

Figura 18..Deformações obtidas para as membranas de NRL, NRL+BSA e NRL +MTZ

Figura 19.Termogramas de membranas de NRL polimerizado a diferentes temperaturas

Figura 20.....Termogramas de membranas de NRL + BSA polimerizado a diferentes temperaturas e da BSA em pó.

Figura 21.....Termogramas de membranas de NRL + MTZ polimerizado a diferentes temperaturas e da MTZ em pó.

Figura 22.....Comparação entre os termogramas das membranas de NRL, NRL+ BSA, NRL + MTZ e entre a BSA e MTZ. Note que não se encontra nenhuma diferença entre as membranas de NRL, NRL +BSA e NRL+MTZ.

Figura 23.....Espectros de FTIR do látex natural.

Figura 24.....Espectros de FTIR de membranas de NRL polimerizadas a diferentes temperaturas.

Figura 25..... Espectros de FTIR de membranas de NRL + BSA polimerizadas a diferentes temperaturas.

Figura 26.....Espectros de FTIR de membranas de NRL+ MTZ polimerizadas a diferentes temperaturas.

Figura 27.....Espectros de FTIR de membranas de NRL , membranas de NRL+ BSA e BSA em pó.

Figura 28.....Espectros de FTIR de membranas de NRL , membranas de NRL+ MTZ e MTZ em pó

Figura 29.....Imagens de MEV das membranas de NRL: a-) polimerizado a -100°C, b-) polimerizado a -10°C, c-) polimerizado a -1°C e d-) polimerizada a RT

Figura 30.....Imagens de MEV das membranas de NRL + BSA: a-) polimerizado a -100°C, b-) polimerizado a -10°C, c-) polimerizado a -1°C e d-) polimerizada a RT.

Figura 31.....Imagens de MEV das membranas de NRL + BSA: a) polimerizado a -100°C, b-) polimerizado a -10°C, c-) polimerizado a -1°C e d-) polimerizada a RT, polimerizado a +40°C.

Figura 32.....Imagens tridimensionais de AFM (topografia) do SLC de BSA: Note que a oscilador (sonda) não conseguiu varrer corretamente a amostra devido a rugosidade.

Figura 33.....Imagens de AFM das membranas de NRL polimerizadas a -10°C

Figura 34.....Imagens de AFM das membranas de NRL polimerizado a RT

Figura 35.....Curvas de liberação de substâncias pela membrana de NRL e da BSA pelas membranas de NRL+BSA polimerizados a diferentes temperaturas: a-) RT, b-) -1°C e c-) -10°C.

Figura 36.....Liberação de BSA pela membrana de NRL preparadas sob diferentes temperaturas.

Figura 37.....Taxa de liberação de BSA das membranas de NRL preparadas sob diferentes temperaturas.

Figura 38.....Curva de calibração do Metronidazol (MTZ)

Figura 39.....a-) Espectro de MTZ em função do tempo, b-) Curva de liberação do MTZ em função do tempo.

Figura 40.....Liberação de MTZ pela membrana de NRL preparadas sob diferentes temperaturas.

Figura 41.....Curva de calibração $Y = (0,06 \pm 0,05) + (0,17 \pm 0,01).x$, onde Y é a amplitude do espectro EPR e x é a concentração da solução de NO.

Figura 42.....SLC retangular sobre uma flat cell

Figura 43.....Métodos de obtenção da intensidade do sinal de EPR: (a) pela amplitude do sinal, e (b) pela área obtida do próprio sinal.

Figura 44.....Espectro inicial de NO contido no SLC.

Figura 45.....Espectros de NO pelo SLC em contato com o ar

Figura 46.....Curva de liberação de NO pelo SLC exposto ao ar. A curva foi ajustada pelo modelo $Y = a.e^{bt}$

Figura 47.....Espectros do SLC de NO em meio aquoso

Figura 48.....Curva de liberação de NO pelo SLC em solução aquosa. A curva foi ajustada pelo modelo $Y = a.e^{bt}$.

Figura 49.....Comparação das curvas de liberação no ar e na água

Figura 50.....Etapas na aplicação do SLC de NO na pele

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.....Composição típica em porcentagem em massa e total de sólidos (TS) de látex da borracha natural

Tabela 2.....Condições em que foram feitas as medidas de EPR para o SLC de NO

Tabela 3.....Valores médios de espessura, médias de diferentes amostras para deformação e resistência de membranas de látex submetidas ao teste mecânico de tração.

Tabela 4.....Bandas de absorção relativas dos principais modos vibracionais do cis 1,4-poliisopreno

Tabela 5.....Valores dos parâmetros da curva $A = at^b$

Tabela 6.....Amostras para elaboração da curva de calibração

Tabela 7.....Parâmetros obtidos pelo ajuste das curvas de liberação

LISTAS DE ABREVIACES

TGA	análise termogravimétrica
AFM	microscopia de força atômica
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mL	mililitro
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
Membranas de NRL	membranas de látex natural
BSA	albumina de soro bovina
MTZ	metronidazol
NaNO₂	nitrito de sódio
Na₂S₂O₄	ditionito de sódio
NO	xido nítrico
H₂O	gua
FTIR	espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
RTG	regenerao tecidual guiada
NRL	natural rubber latex (látex de borracha natural)
ROG	Regenerao ósseo-guiada
UV/VIS	espectroscopia no ultravioleta visível
DFM	Departamento de Física e Matemática
USP	Universidade de São Paulo
SLC	sistema de liberao controlada
FeDETC	espectroscopia no ultravioleta visível

FeDETC-NO.....complexo ferro-DETC-NO

FFCLRP.....Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto

USC.....Universidade Sagrado Coração

U.A......unidades arbitrárias

mT.....miliTesla

W.....Watts

NRL+BSA.....membranas de látex natural + 10mg/mL de albumina de soro bovina

NRL+MTZ.....membranas de látex natural + 10mg/mL de metronidazol

RT.....room temperature (temperatura ambiente → 27° C)

mg.....miligrama

Capítulo I

PREFÁCIO

1. PREFÁCIO

O tecido ósseo é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, no qual a matriz extracelular é mineralizada, conferindo-lhe rigidez, mas mantendo algum grau de elasticidade. Além de sua função de suporte, o osso é a maior reserva primária de cálcio no organismo, sendo o cálcio um íon necessário para a vida, pois participa da manutenção do pH interno do corpo, da transmissão e condução de impulsos elétricos em nervos e músculos. Deste modo, o tecido ósseo tem uma grande capacidade de remodelação, renovando-se constantemente para responder às necessidades metabólicas do corpo e à manutenção da estabilidade da calcemia.

Recentemente, casos de doenças ósseas e/ou defeitos com grandes magnitudes vêm crescendo entre a população mundial. Além disso, existem muitos pacientes que não possuem a quantidade óssea suficiente para a colocação dos implantes em posição adequada, o que compromete o aspecto estético e funcional da reabilitação protética. Assim, o progresso das técnicas e a evolução dos biomateriais para implante ósseo têm estimulado pesquisadores a desenvolver inovações, e aprimorar os produtos já existentes. As características desejáveis de um biomaterial são biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica, ausência de riscos trans-operatórios ou seqüelas, além da boa aceitação do paciente.

Schenk *et al* (1994) [1] relatam que o uso de membrana sobre defeitos ósseos estimula a regeneração óssea pelo princípio de osteopromoção (na regeneração óssea guiada, ROG), ou seja, impedindo a invasão do espaço do defeito pelo tecido conjuntivo frouxo (Figura 1). A ROG baseia-se na criação de um espaço segregado para a invasão de vasos sangüíneos e células osteoprogenitoras, protegendo a reparação óssea contra o

crescimento de tecidos não osteogênicos que possuem velocidade de migração maior que as células osteogênicas. As barreiras de membranas devem possuir características que conduzam requisitos biológicos, mecânicos e de uso clínico para servirem como barreira contra a invasão celular indesejável. Esse procedimento cria um ambiente celular, tecidual e molecular adequados para a neoformação óssea. Contudo, o índice de formação óssea depende da revascularização e do recrutamento de células osteoprogenitoras [2], e da distância a ser percorrida por estas células, impondo o tempo de permanência durante o qual a membrana deverá ficar funcionalmente intacta no local.

Na Odontologia, por exemplo, é de primordial importância a possibilidade de formação óssea nos maxilares, durante o processo reconstrutivo. A ROG permite hoje, nesse aspecto, soluções inimagináveis há alguns anos. A ROG de alvéolos de extração dentária está entre as técnicas mais empregadas na tentativa de manutenção do volume de tais rebordos, [3-5] tendo certos enxertos ainda, o potencial de acelerar o processo de reparo - característica de grande valor quando se almeja a reabilitação da área através de implantes osseointegrados.

[Figura 1] A técnica da Regeneração Óssea Guiada: a-) cicatrização sem membrana, b-) cicatrização com membrana.

Pode-se observar que na figura 1.a, temos um defeito ósseo sem uma barreira mecânica, assim nota-se o preenchimento do osso por fibroblastos que é o tecido frouxo. Já na figura 1.b, observa-se a barreira mecânica protegendo o osso dos fibroblatos. Entretanto, para acelerar o processo de reparo, a membrana “ideal” seria a que, além de atender as propriedades já citadas, fosse capaz de liberar substâncias que possam contribuir ao processo de regeneração. Uma das substâncias são as proteínas morfogénéticas ósseas (BMPs) que são encontradas em altas concentrações no tecido ósseo e são consideradas as responsáveis pela habilidade indutiva e regenerativa dos enxertos ósseos desmineralizados usadas em terapia periodontal. A outra substância utilizada foi o metronidazol (MTZ) [6-8] que é um antibiótico muito empregado no tratamento de doenças periodontais, pois ele age contra as bactérias anaeróbicas da cavidade oral, além de reduzir a inflamação e rejeição da membrana. Finalmente, a terceira e última substância empregada foi o óxido nítrico (NO) que é uma molécula

produzida nos sistemas biológicos, o qual desempenha um papel fundamental na fisiologia, patologia e farmacologia. Esta substância foi utilizada com o propósito de amenizar o processo inflamatório da membrana no momento do implante.

Um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver uma membrana de látex natural (NRL) capaz de liberar proteínas de forma controlada. Para isto, utilizamos a separação de fase induzida termicamente (TIPS) que é um método para fazer membranas microporosas. Para a otimização das membranas de NRL, decidimos variar a temperatura do látex natural durante a polimerização como controle de poros das membranas. Desta forma, preparamos membranas de NRL em 5 diferentes temperaturas de polimerização: -100°, -10°C, -1°C, Room Temperature–RT (27°C) e + 40°C. Controlando a morfologia da membrana (densidade e tamanhos dos poros), é possível variar a taxa de liberação das proteínas.

O látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* foi utilizado como matriz para o “novo” sistema de liberação controlada (SLC) porque tem se mostrado promissor em aplicações biomédicas [9]. Membranas feitas deste material têm sido usadas como próteses e enxertos médicos devido a suas características de biocompatibilidade e estímulo natural à angiogênese [9]. Por essas razões o consideramos um excelente candidato para aplicação como barreira mecânica (ROG) e sistema liberador de proteínas (drug-delivery). Além disso, contamos com a possibilidade do próprio látex natural ser um indutor da regeneração óssea. Trabalhos recentes em nosso grupo (RESSOMAT–DFM–USP) mostraram as excelentes propriedades tais como: resistência mecânica, elasticidade, fácil manuseio e baixo custo. Neste trabalho utilizamos a BSA ao invés da BMP porque é mais acessível além de possui o peso molecular da mesma magnitude.

Em resumo, este trabalho consistiu no desenvolvimento de membrana de látex natural com o propósito de ser utilizada como barreira mecânica (1) e também como sistema liberador gradativo de fármacos (2). No primeiro caso, temos uma membrana passiva, que servirá de barreira contra os fibroblastos, enquanto no segundo caso temos uma membrana ativa.

A tese será dividida em seis capítulos. O **Capítulo 2** faz uma elaborada revisão da literatura sobre o látex natural, expondo os aspectos relativos à sua extração, preservação e biocompatibilidade. Neste capítulo, discorreremos sobre a regeneração óssea guiada e os tipos de membranas utilizadas como membrana oclusiva. Ainda no **Capítulo 2** referimos ao sistema de liberação controlada, discutindo sobre a sua importância. Além disso, abordamos a importância da BSA, do metronidazol e do óxido nítrico (NO). As técnicas experimentais apresentadas são expostas no **Capítulo 3**. Os resultados obtidos e as discussões são expostos no **Capítulo 4**. No **Capítulo 5** discorre sobre as conclusões deste trabalho. Finalmente, as referências são apresentadas no **Capítulo 6**.

Capítulo II

REVISÃO DA LITERATURA

2. LÁTEX NATURAL

2.1 Introdução

Durante o primeiro milênio, bolas de borracha eram utilizadas pelos Maias. Esses “brinquedos” tinham sido confeccionados a partir do látex oriundo de uma árvore nativa das Américas Central e do Sul. O látex alcalino era coagulado para formar uma matriz a partir da qual eram confeccionadas as bolas e outros artigos. As cinzas das fogueiras, que eram usadas para aquecer, podem ter sido a primeira contribuição do conhecido “negro de fumo”, que desde essa época foi o responsável para dar maior resistência aos artigos de borracha [10-16].

Como a borracha foi reconhecida como um material que apresentava interessantes propriedades físicas, os pesquisadores do início de 1700 começaram a estudar o comportamento da Natural Rubber (borracha natural em inglês) quando misturada em solventes, com o objetivo de desenvolver algum material que fosse à prova de água, que possuísse elasticidade para fabricação de balões a ar quente.

A modernização da indústria de polímeros começou com o desenvolvimento da borracha na Europa. Sua primeira aparição no cenário comercial data do século XVI, quando os franceses começaram a descobrir as vantagens e aplicações desse material.

Em 1820, Thomas Hancock iniciou a obtenção de produtos da borracha e em 1837 patenteou um equipamento para mistura e mastigação de elastômeros [17].

M. Faraday em 1826 foi o primeiro a analisar a estrutura química do material e foi o primeiro a postular que tratava-se de um material constituído exclusivamente de carbono e hidrogênio. O aquecimento levou a um resíduo e um destilado de hidrocarbonetos com uma fórmula empírica igual a C_5H_8 . A fração volátil foi caracterizada na Inglaterra em 1860 como tendo um ponto de ebulição entre 37-38°C, e

foi chamada de isopreno. Sua estrutura foi determinada por W. Tilden, quando estudou a fração volátil isoladamente. E concluiu que essa fração era a responsável pela sua elasticidade.

A descoberta fundamental para o desenvolvimento da borracha aconteceu em 1839 por Nathaniel Hayward e Charles Goodyear, nos Estados Unidos e Thomas Hancock na Inglaterra, em trabalhos independentes. Embora o mérito tenha sido concedido à Goodyear, ambos obtiveram resultados bastante semelhantes. Eles aqueceram a borracha natural com enxofre e chumbo branco obtendo desta forma um material com propriedades superiores às da borracha natural. As propriedades da borracha natural vulcanizada, nome do processo de cura então desenvolvido, constituiu, e ainda constitui, um modelo para que se possa ter idéia das suas propriedades elastoméricas incluindo entre outras, a possibilidade de grandes alongamentos, alta dureza, resistência ao estiramento e rápida retração. Embora atualmente existem inúmeros agentes de reticulação, o enxofre continua a ser o mais utilizado na indústria da borracha.

O Brasil já foi o maior produtor e exportador do látex de borracha natural do mundo, mesmo porque a seringueira é originária da Amazônia. Essa posição foi ocupada até a década de 50, quando a exploração era, na totalidade, do tipo extrativista. Problemas econômicos e fitossanitários na região impediram o desenvolvimento sustentável da atividade. Atualmente, a borracha natural é produzida no país por meio de cultivo de plantas de alta produtividade, selecionadas e adaptadas também as regiões Sudeste e Centro-Oeste do país [18-19].

2.2 O látex de borracha natural

Látices de borracha natural ocorrem em cerca de 200 espécies de plantas, sendo que a *Hevea brasiliensis* fornece aproximadamente 99% da produção mundial de borracha natural [20]. O látex acha-se em minúsculos vasos no córtex interno da casca da árvore o qual fica abaixo do córtex externo, [21] sendo que a borracha se encontra nas partículas de borracha citoplasmáticas [22]. Genericamente, o látex é uma dispersão coloidal constituída de substâncias não-borracha e partículas de borracha dispersas em uma fase aquosa chamada de soro [23].

2.3 Processo de extração

Neste processo uma faca especialmente desenhada é usada para remover fatias da casca da superfície de um corte feito na árvore a uma profundidade de cerca de 1 mm do câmbio (camada de tecido do vegetal). O corte é feito da esquerda para a direita em um ângulo de 30° em meia circunferência ao redor do tronco e no ponto mais baixo é inserida uma cânula de metal por onde o látex escorre para dentro de pequenos potes (Figura 2). O corte em cada lado do painel (região do tronco em que se faz os cortes) deve ser feito em dias alternados e as incisões devem ser feitas logo abaixo do corte anterior [24-26].

[Figura 2] Corte para sangria da seringueira em meia espira e coleta

2.4 Preservação do látex

A necessidade de estabilização do látex através de aditivos decorre da necessidade de se evitar o processo de coagulação espontânea, em que se observa a formação de uma fase superior coagulada e uma fase inferior aquosa e clara. Várias hipóteses [27-30] explicam o porquê deste processo ocorrer rapidamente, em questão de horas. A primeira considera a ação de microorganismos reagindo com compostos não-borracha, diminuindo seu poder de estabilização. A segunda hipótese atribui esse efeito à liberação de ânions de ácidos graxos através da hidrólise de várias substâncias lipídicas presentes no látex. Estes ânions são então adsorvidos na superfície das partículas de borracha, possivelmente removendo parte das proteínas adsorvidas. Estes ânions então interagem com cátions metálicos divalentes como cálcio e magnésio, presentes no látex ou gradualmente liberados de complexos pela ação de enzimas. A Tabela 1 mostra a composição típica em porcentagem em massa e total de sólidos (TS) de látex da Borracha Natural

[**Tabela 1**] Composição típica em porcentagem em massa e total de sólidos (TS) de látex da Borracha Natural [31].

	Alto Teor de Amônia		Baixo Teor de Amônia	
	Látex	TS	Látex	TS
Borracha	59,67	97,61	59,61	97,62
Proteínas	1,06	1,73	1,03	1,69
Lipídios	0,23	0,38	0,23	0,38
Sais	0,40	0,28	0,38	0,32
Amônia	0,68	-	0,21	-
Água	37,96	-	38,54	-

2.4.1 Caracterização do látex de borracha natural

O Natural Rubber Latex (NRL) é um látex polidisperso (tamanho médio de partículas $\sim 1\mu\text{m}$) com alto teor de amônia (NH_3) que é utilizada para impedir o crescimento de bactérias na fase de estocagem do material. Este látex é estabilizado pelas longas cadeias de ácidos graxos adsorvidas e que são produtos de hidrólise de fosfolipídios. Essa estabilidade é mantida a partir da hidrólise das proteínas originalmente adsorvidas na superfície, as quais, em pH alto fornecem o caráter iônico do látex [32].

O principal componente do Natural Rubber Latex (NRL) é o poli-cis-isopreno sindiotático que possui propriedades *suigeneris* quando comparado com a maioria das borrachas sintéticas. Entre as principais propriedades encontra-se a possibilidade de inúmeras modificações químicas, como a hidrogenação, epoxidação, cloração por

enxertia e vulcanização, viabilizadas pela insaturação em sua estruturação, levando ao grande número de produtos de borracha encontrados no mercado [33].

A partir do método de centrifugação, observamos quatro frações no látex natural: a fração borracha, a fração intermediária, o soro e os lutóides (Figura 3).

[Figura 3] O látex após centrifugação na Sorvall RC 26 Plus, a 10000 rpm e 2 h, onde são obtidas quatro frações: a fração borracha, a fração intermediária, o soro e os lutóides.

1. Fase borracha (37%) (hidrocarboneto isoprênico)

A fração borracha fica no topo da coluna, é a mais volumosa e contém as partículas de borracha, que são menos densas que a água e migram para a superfície. A fração intermediária contém pequenas partículas de borracha [34] e um pouco do soro e é conhecida como fração *skim* [35] (do inglês, significa “desnatada” ou “magra”). Apresenta coloração branca. A Figura 4 mostra a estrutura molecular da borracha e seus tipos de cadeias.

[Figura 4] a-) Estrutura molecular da borracha, b-) formas das cadeias.

2. Soro (48%)

Fração intermediária aquosa é o meio dispersivo do sistema coloidal látex e contém proteínas e sais dissolvidos. A fração aquosa abaixo da intermediária é soro que contém íons, proteínas, carboidratos, açúcares e outras substâncias solúveis [36].

3. Fração de fundo (Lutóides) (15%)

A fração do fundo contém os lutóides, que são as organelas ricas em soro catiônico que promove a coagulação do látex, além de suas funções bioquímicas como o controle do pH e de patógenos [37]. Apresenta coloração amarela e é constituída por: lutóides (proteínas, fosfolipídios e sais minerais) e partículas Frey-Wyssling (constituídas de carotenóides e lipídios conferindo à borracha, a coloração amarela).

2.5 Biocompatibilidade da membrana de látex natural

A membrana de látex natural foi utilizada pela primeira vez por F. Mrué *et al* em 1996 [38], que a usou como prótese de um segmento do esôfago cervical de cães. O látex funcionou apenas como ponte para a regeneração dos tecidos, não foi incorporado aos tecidos do hospedeiro. Demonstrou propriedade indutora de regeneração tecidual,

sendo totalmente eliminado após dez dias de pós-operatório nas fezes dos animais e no lugar formou-se um “neo-esôfago”.

Sader *et al.* em 2000 [39], estudaram o comportamento da membrana de látex natural como substituto parcial do pericárdio de cães. Foram avaliados três grupos: grupo A, onde o retalho do pericárdio foi removido e reimplantado imediatamente; grupo B, em que o retalho foi removido e substituído por outro de látex natural, com 0,3mm de espessura; grupo C, no qual o retalho de látex tinha 0,7mm de espessura. Em 50% dos animais do grupo B e C houve completa regeneração do pericárdio. Nos cães do grupo A foi observado um quadro de regeneração irregular do pericárdio. Os resultados mostraram que a membrana de látex foi satisfatória para a substituição parcial do pericárdio de cães.

Em um teste biológico, *in vivo*, da membrana cório-alantóide de embriões de galinha, a membrana de látex natural foi usada por Alves em 2003 [40] para analisar o estímulo de atividade angiogênica causada por este material. Foi possível observar a indução de angiogênese no tecido onde a membrana de látex manteve contato durante o experimento, ver figura 5.

[Figura 5] Estimulação da angiogênese, pelo látex natural [40].

Pinho *et al.* em 2003 [41] pesquisaram o uso da membrana de látex natural com polilisina a 0,1% (Poly-L-lysine Hydrobromide, PM 70-140 Kda-Sigma) na reconstrução conjuntival em coelhos neo-zelandeses adultos. Foram analisados um grupo controle (sem membrana) e um experimental (com membrana). Após análises histológicas, observaram que a recuperação foi satisfatória em 60% dos olhos com biomembrana enquanto que, nos olhos do grupo sem membrana, ela foi satisfatória em apenas 20%. O número médio de vasos por campo óptico na ferida cirúrgica dos olhos com biomembrana foi o dobro desse mesmo número nos olhos com esclera nua (grupo controle). Esses dados sugeriram que a membrana de látex favorece a cicatrização conjuntival e a neoangiogênese.

Segundo Rabelo *et al.* em 2005 [42], a técnica de implantação da membrana de látex, poliamida e polilisina a 0,1%, apresentou bons resultados na reparação hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. Apesar de ser um material não absorvível, não foi observada reação inflamatória tipo corpo estranho ou demais complicações com o uso da membrana, possivelmente porque o material possui baixa antigenicidade.

Balabarian *et al.* em 2006 [43], avaliaram a biocompatibilidade do látex natural. Grânulos de látex foram implantados cavidades ósseas alveolares depois de extração dental em ratos. Os animais foram sacrificados 7, 21 e 42 dias após o procedimentos. Os dados quantitativos confirmaram a aceleração da neoformação óssea e a diminuição da presença de tecido conjuntivo ao redor do implante. Foi demonstrado que o material apresentou biocompatibilidade, progressiva integração com o osso alveolar, simultaneamente aceleração da neoformação óssea e mostrou importante atuação no processo de cicatrização.

Diante dos achados teóricos encontrados na literatura [38-43], os quais demonstraram as propriedades do látex natural (resistência mecânica, biocompatibilidade, flexibilidade e fácil manuseio), objetivou-se no presente trabalho:

1. Confeção de novos filmes de látex natural agregados a substâncias de interesse em odontologia e ortopedia, que são a albumina de soro bovina (BSA), metronidazol (MTZ) e o (óxido nítrico) NO, a fim de que atuem como sistema de liberação controlada (SLC).
2. Caracterização da taxa de liberação de fármacos, de acordo com a porosidade do filme utilizando-se as técnicas de espectrofotometria ótica, termogravimétrica e microscopia.
3. Caracterização química, estrutural dos novos SLC's através de espectroscopia ótica, espectrometria de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e resistência mecânica..

2.6 Regeneração Óssea Guiada (ROG)

De todas as áreas do conhecimento médico, talvez a mais importante e de maiores perspectivas para a humanidade seja a regeneração. Toda a estrutura da vida esta baseada na capacidade do organismo de se regenerar, e o processo de senilidade nada mais é do que a redução lenta e gradual dessa capacidade. Inúmeras patologias de diferentes e variadas procedências tem como ponto etiológico comum alterações do processo regenerativo.

A regeneração óssea guiada (ROG) [44-47] é um procedimento bem estabelecido em cirurgias ortopédicas reconstrutivas e em tratamento periodontal de defeitos ósseos. Nesta técnica, uma membrana é colocada sobre o defeito ósseo para proteger esse espaço, mantendo uma ambiente favorável para migração contínua de células com potencial osteogênico no defeito. Esta barreira impede a invasão de **fibroblastos** que resultam na não união do osso (Figura 6).

[Figura 6] Membrana utilizada como barreira mecânica para a técnica de ROG.

2.7 Tipos de membranas

As membranas devem possuir alguns requisitos indispensáveis para agir como barreira física passiva: biocompatibilidade, propriedades oclusivas, capacidade de criação de espaço, integração tecidual e clinicamente manuseável [47]. Além disso, as membranas devem promover regeneração óssea de forma previsível, sem a presença de efeitos colaterais. Estas barreiras também devem ser de fácil manipulação, custo acessível e de sucesso previsível [48].

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com algumas de suas propriedades, e divididos em: osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores.

1- Osteogênicos: são os materiais orgânicos capazes de estimular diretamente os osteoblastos a formar osso.

2- Osteoindutores: são materiais capazes de induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, aumento o crescimento ósseo ou, até mesmo, formando osso ectópico.

3- Osteocondutores: (geralmente inorgânicos, materiais desproteinizados) favorecem a migração, proliferação e maturação das células progenitoras, além de conduzirem a aposição do novo osso em sua superfície a partir de tecido ósseo preexistente nas bordas da lesão.

2.7.1 Barreiras não absorvíveis

A primeira membrana desenvolvida para ROG foi de politetrafluoretileno (PTFE) por ser inerte. Porém ela não é absorvível, requerendo uma segunda cirurgia

para sua remoção, e eram, freqüentemente, associadas à exposição, que, conseqüentemente, arriscava o sucesso clínico [49].

Atualmente, o material de membrana mais pesquisado e utilizado em procedimentos de ROG é constituído por uma estrutura especificamente formada por politetrafluoretileno expandido (e-PTFE). A molécula fluorcarbono, politetrafluoretileno (base química componente do ePTFE), não pode ser quebrada quimicamente, em condições fisiológicas. Além disso, a segurança do ePTFE foi estabelecida por extensos testes de biocompatibilidade, longa história de segurança e uso efetivo em próteses vasculares e de tecidos moles [47].

Apesar da alta previsibilidade de regeneração óssea com a utilização de membranas de e-PTFE, a principal desvantagem desta membrana é que a sua exposição pode causar contaminação bacteriana. A reação inflamatória da área pode levar à necessidade de remoção precoce da membrana [50-53]. Outro tipo de membrana não absorvível utilizada é a titânio microperfurada [54].

2.7.2 Barreiras absorvíveis

No intuito de eliminar a necessidade de um segundo tempo cirúrgico para a remoção da membrana não-absorvível, tem sido intensa a investigação para desenvolvimento de membranas absorvíveis [48].

O conceito de material absorvível envolve alguns importantes aspectos. Primeiro, o material deve sofrer reabsorção e degradação macromolecular através da associação de hidrólise e degradação enzimática por enzimas, tais como a fosfatase ácida e a collagenase. Segundo, a bioreabsorção requer total eliminação dos produtos da degradação sem efeitos residuais locais [48]. Os materiais poliméricos sintéticos mais comuns, propostos para uso, como membranas para ROG (ácidos polilático (PLA) e

poliglicólico (PGA)) [49]. Outras barreiras utilizadas como membranas oclusivas são as derivadas de colágeno suíno tipo I e tipo III [55], além de lâminas ósseas desmineralizadas [56].

2.8 Sistema de liberação controlada (SLC)

2.8.1 Importância da liberação controlada

A importância dos sistemas de liberação de princípios ativos advém do fato que raramente um fármaco veiculado em solução aquosa, ou numa forma convencional, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado. Isso pode ser facilmente entendido quando verificamos que entre o local de administração do fármaco e o órgão ou tecido alvo, se interpõe uma série de obstáculos de naturezas diversas (anatômicos, químicos e biológicos). Somente uma parte em dez mil de um fármaco injetado intravenosamente alcança seu alvo final quando o alvo está localizado em sítios profundos. A liberação controlada de fármacos é um tópico importante para várias iniciativas em nanotecnologia devido ao possível impacto para a sociedade, com a criação de sistemas otimizados que garantam a liberação num sítio específico e a uma taxa controlada. Dentre os vários paradigmas de liberação controlada destaca-se o uso de sistemas liberadores de drogas sustentado em materiais poliméricos [57].

Entretanto, existem limitações nos sistemas carreadores existentes. Como por exemplo, o tempo de reabsorção do carreador. Pois se for demasiado curto, não mantém a concentração adequada de BMP durante o tempo necessário e se muito longo pode impedir fisicamente o desenvolvimento do novo tecido calcificado, levando à formação óssea não-orientada e pseudoartrose.

Desta forma, surge a necessidade da confecção de um SLC de fármaco eficaz que provenha a liberação de fármacos no sítio do defeito ósseo por períodos prolongados de tempo com uma dose apropriada. Como já mencionado, o BMP possui forte atividade osteoindutora, entretanto, seu uso clínico tem sido dificultado pela falta de sistemas carreadores (delivery systems) aceitáveis [58]. A Hidroxiapatita é biocompatível, mas não é biodegradável e, portanto remanesce no sítio do defeito. Esponjas de colágeno podem ser imunogênicas e osso desmineralizado mostra-se como um mantenedor insuficiente e possui uma caracterização pobre da liberação das proteínas.

2.8.2 Albumina de soro bovina (BSA)

Pode-se definir as albuminas como sendo membros de uma mesma classe de proteínas, responsáveis pelo transporte das mais variadas moléculas no organismo, sejam elas de caráter hidrofóbico (ácido graxos, bilirrubina, hormônios e drogas) ou hidrofílico (a própria água, Ca^{2+} , Na^+ e K^+), e pela manutenção do equilíbrio osmótico no sangue [59]. Devido à similaridade da albumina de soro (ou plasma) bovino (BSA) em relação à albumina do plasma humano (HSA) o estudo da BSA fornece uma boa analogia frente a HSA em relação aos métodos de purificação descrição de propriedades físico-químicas, bem como análise estrutural e modelagem matemática.

As albuminas são altamente solúveis em água e são precipitadas apenas por altas concentrações de sais neutros como o sulfato de amônio. A estabilidade em solução de BSA é alta, especialmente se as soluções são guardadas como alíquotas congeladas. Apesar disso, as albuminas são facilmente coaguladas (desnaturação seguida de precipitação) pelo calor. Quando aquecidas até 50°C ou mais, as albuminas rapidamente

formam agregados hidrofóbicos que não reverterem aos monômeros mediante resfriamento.

A BSA possui massa molecular de 66.430g/mol, sendo que a sua estrutura primária é a de uma cadeia única de polipeptídeo que consiste em aproximadamente 583 resíduos de aminoácidos e nenhum carboidrato. Na faixa de pH 5,0 até 7,0 a BSA possui 17 pontes de dissulfeto internas e um grupo sulfidril.

BSA foi empregada porque possui peso molecular da mesma ordem de grandeza das **BMP's** (bone morphogenetic proteins), 30.000g/mol, que são proteínas que aceleram o crescimento ósseo, além de ser mais acessível.

Vale reforçar que as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são promotores de crescimento capazes de induzir a formação de osso e cartilagem, promovendo a quimiotaxia e diferenciação de células mesenquimais para o local onde foram implantadas, mas para uma efetiva osteocondução necessitam de uma substância carreadora. Quando implantadas em tecidos animais, as BMPs se ligam a receptores específicos existentes na superfície das células osteoinduzidas, ativam as proteínas citoplasmáticas SMAD (mothers against decapentaplegic proteins) e, no núcleo da célula receptora, passam a regular a transcrição de genes relacionados com calcificação e formação óssea. Além disso, vale ressaltar que a BSA é apenas um substituto da BMP e que em trabalhos futuros, pretende-se agregar a BMP nas membranas de látex natural.

2.8.3 Metronidazol (MTZ)

O metronidazol (MTZ) é um antibiótico usado para tratamento de infecções na pele, tecidos e ossos. Ele é um derivado nitroimidazol com atividade antiprotozoária da família dos nitro-5-imidazóis [4-6]. Este composto também possui atividade antibacteriana contra os microorganismos anaeróbios. Está indicado no tratamento de

giardíase, amebíase, tricomoniase, vaginites por *Gardnerella vaginalis* e infecções causadas por bactérias anaeróbias como *Bacteroides fragilis* e outras bactérias, *Fusobacterium sp*, *Clostridium sp*, *Eubacterium sp* [60].

Propomos a agregação do MTZ na membrana de látex natural porque ele é usado para tratamento de doenças periodontais, pois ele age contra bactérias anaeróbicas da cavidade oral. Além disso, o MTZ é usado para reduzir o processo de inflamatório em caso de rejeição e inflamação. Ao penetrar na célula, o MTZ é degradado por ação de nitrorredutases, gerando compostos polares citotóxicos. Estes determinam perda da estrutura helicoidal do DNA bacteriano, quebra de filamentos e comprometimento concomitante de sua função, além de inibir a síntese de ácidos nucleicos; isso é explicado por Seymour *et al* em (1995) [61]. Com a ruptura da estrutura helicoidal do DNA, a célula bacteriana morre. MTZ afeta as células independentemente de estarem se dividindo ou não. A Figura 7 mostra a estrutura do metronidazol.

[Figura 7] a-) Estrutura do metronidazol para tratamento de infecções na pele, tecidos e ossos [60]; b-) Fórmula molecular, $C_6H_9N_3O_3$ e ilustração do Flagyl que possui o metronidazol como princípio ativo.

2.8.4 Óxido Nítrico (NO)

O radical livre óxido nítrico (NO) é extensamente investigado na fisiologia por causa de seu papel em múltiplos processos incluindo a vasodilatação, angiogênese, neurotransmissão, e a resposta imune [62-66]. Por exemplo, o NO liberado pelas células do endotélio serve para proteger o tecido cardiovascular melhorando o fluxo de sangue e inibe trombose e enzimas que destroem as células intermediárias [67].

O NO será usado como modelo de droga em membranas de látex natural pois auxilia na vascularização e atua em processos inflamatórios. O NO é um mediador gasoso responsável por uma variedade de fenômenos fisiológicos. A L-arginina é a precursora da síntese do óxido nítrico, na presença de óxido nítrico-sintase (NOS).

Em 1980, Furchgott & Zawadzki [68] demonstraram que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina foi dependente da presença do endotélio e evidenciaram que este efeito foi mediado por um fator humoral lábil, mais tarde conhecido como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF). Em 1987 foi demonstrado que esse fator de relaxamento derivado do endotéliom (Figura 8) era um radical livre, o óxido nítrico (NO). Palmer *et al* [69] sugeriram que EDRF e o óxido nítrico eram indistinguíveis na atividade biológica, estabilidade química e susceptibilidade à inibidores ou potencialização e que ambos tinham sua ação inibida pela hemoglobina e potencializada por superóxido dismutase. Porém, alguns autores alegaram que a forma ativa do EDRF não era o NO, mas um precursor do NO ou um tiol derivado do NO [70]. O óxido nítrico foi escolhido como a molécula do ano de 1992 [71].

[Figura 8] Endotélio usa o NO para comandar o relaxamento do músculo liso da parede do vaso.

NO pode ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio em que ele está e é rapidamente destruído pelo oxigênio [72], sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato [73]. O NO tem o menor peso molecular de qualquer produto de secreção celular de mamíferos; sua meia-vida é curta e a especificidade de suas reações é mínima [74]. O NO é citotóxico e vasodilatador [75] e modula reações inflamatórias ou antiinflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo [76].

A molécula do NO tem um elétron não pareado e reage facilmente com oxigênio, radical superóxido, ou metais de transição, como ferro, cobalto, manganês ou cobre [77-78]. O NO tem alta afinidade com o heme, encontrado em proteínas intracelulares (óxido nítrico-sintase, cicloxigenase e guanilato ciclase) e também liga-se a grupos -SH, formando tiol [79], é um gás incolor e estável, moderadamente solúvel em água e sua meia-vida varia de 3 a 60 segundos, mas pode ser maior devido ao ambiente do NO, concentração de O_2 e $O_2^{\bullet}$ [73,80].

2.8.4.1 Aprisionador ou “*trap*” de NO

“*Traps*” ou aprisionadores de NO são compostos capazes de se ligarem a ele formando compostos estáveis e com características especiais. Os complexos de ferro são os mais conhecidos “traps” de NO usados em técnicas de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) por apresentarem sinais bastante característicos e poderem ser usados em experimentos *in vivo* e *ex-vivo*.

Um dos “traps” que utilizamos neste trabalho é o $\text{Fe}[\text{S}_2\text{CN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2]_2$ (FeDETC_2) em que o NO se liga para formar $\text{Fe}(\text{NO})[\text{S}_2\text{CN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2]_2$, também conhecido como MNIC-DETC ou $[\text{Fe}(\text{NO})\text{DETC}_2]$, cuja estrutura é mostrada na Figura 9.

[Figura 9] Estrutura do complexo $\text{Fe}(\text{NO})\text{DETC}_2$.

Capítulo III

MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.1 Introdução

Este capítulo discute os métodos utilizados para caracterizar as membranas de látex natural como uma ferramenta para a liberação controlada de drogas.

Fármacos foram agregados a matriz de latex natural e o comportamento da liberação destas drogas foi estudado. Ao longo deste trabalho, incorporamos a albumina de soro bovina (BSA), o metronidazol (MTZ) e o óxido nítrico (NO) como modelos de droga. Foram utilizadas as seguintes técnicas para caracterização: microscopia de força atômica (AFM), análise termogravimetria (TG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e análise de resistência mecânica.. A liberação da BSA foi estudada utilizando o método de Lowry (espectrofotometria), fazendo medidas de absorção em função do tempo. Para a liberação do MTZ, a absorção em função do tempo foi observada empregando a espectroscopia UV/visível. A liberação do NO será caracterizado utilizando a técnica de EPR.

3.2 Membrana de Látex

O látex natural utilizado neste trabalho consiste em uma mistura de diferentes clones. A extração foi realizada na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queirós” – ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil. Depois da extração, amônia foi utilizada para o látex líquido, e este material foi centrifugado a 8000g. A centrifugação foi empregada para reduzir algumas proteínas contidas no látex natural que causam reações alérgicas.

A confecção das membranas foi feita através do método de simples deposição. A fabricação consistiu em depositar 2 mL de látex sobre a placa circular de $5,00 \pm 0,05$ cm de diâmetro de inox. Um micrômetro digital foi utilizado para medir a espessura das membranas. Na Figura 10, observa-se, respectivamente: forma; espessura; flexibilidade; e elasticidade da membrana de látex natural.

[Figura 10] Forma (a); Espessura de 1,5mm (b); Elasticidade (c); Flexibilidade da membrana de látex natural (d).

3.3 Caracterização das membranas de látex natural

3.3.1 Testes de Resistência Mecânica

A análise de resistência mecânica mede as alterações dimensionais da amostra. Os ensaios foram realizados em uma máquina universal de ensaios – Modelo DL 2000 da **EMIC** (Figura 11). Neste experimento uma carga constante (10kgf) é aplicada sobre a amostra e podemos observar a deformação da amostra em detalhes. Neste experimento é possível encontrar o módulo de Young para diferentes amostras.

[Figura 11] Máquina universal de ensaios – **EMIC Modelo DL 2000** utilizada nos experimentos.

O teste de resistência mecânica fornece informações sobre a mudança do comportamento elástico da amostra.

Corpo de prova é a parte da membrana submetida ao teste de tensão ou deformação. Abaixo, segue as dimensões das membranas para corpo de prova. Note que a membrana foi confeccionada em formato de alteres.

- comprimento da base= $(44,0 \pm 0,5)\text{cm}$;
- largura = $(1,5 \pm 0,5)\text{cm}$;
- espessura $\sim 1,5\text{mm}$

Dois pequenos pedaços de lixa foram na garra do equipamento de tensão-deformação para evitar que corpos de prova se soltassem ou rompesse na garra.

3.3.1.1 Testes de tensão-deformação

Os três principais modos pelos quais os sistemas sofrem deformação são tração, cisalhamento e compressão. Neste trabalho utilizou-se a tração, que consiste na aplicação de força nas extremidades da amostra. Quando uma tensão é exercida em um corpo sólido, este tende a se deformar. A razão entre a tensão aplicada e a deformação ocorrida define, o módulo de elasticidade do material, que corresponde a uma característica do material, não importando suas dimensões. Quanto maior for este módulo maior será a resistência do material à deformação. E, obviamente, para uma mesma tensão, quanto menor forem as dimensões do corpo de prova, menor será a força necessária para deformá-lo.

Feitos todos os ajustes necessários, as membranas foram submetidas ao teste de tensão-deformação. O equipamento EMIC-DL 2000 é acompanhado de um software que retorna a curva de resposta (força [kgf] vs deformação [mm]) de cada corpo de prova. As membranas foram tencionadas até sua ruptura (Figura 12) e os resultados foram analisados a partir dessas curvas.

[Figura 12] Membrana em teste

3.3.2 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica das amostras foi determinada por análise termogravimétrica, sendo as amostras aquecidas sobre nitrogênio à taxa de 50° C/min, de 20 a 600° C, em um sistema de análise termogravimétrico **TGA 50**. As massas das amostras de látex natural, látex natural + BSA, látex natural + MTZ e látex natural + FeDETC variaram de 4,5 a 6,0 mg.

3.3.3 Espectroscopia de infravermelho

As amostras foram caracterizadas por FT-IR utilizando o equipamento **Nicolet 380** fabricado pela Thermo Electron Corporation. Os espectros foram obtidos de filmes preparados após a secagem das amostras. Foi utilizado o módulo de espectroscopia de reflexão totalmente atenuada, Attenuated Total Reflectance (ATR) na região 500-4000 cm^{-1} . Cada espectro foi obtido acumulando 32 varreduras, com resolução de 4 cm^{-1} . Esta técnica foi utilizada para poder entender a interação dos fármacos nas membranas de látex.

3.3.4 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura

O Microscópio Eletrônico de Varredura, MEV (Scanning Electron Microscope, SEM) é um equipamento versátil que permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas. Um feixe fino de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra onde, ocorrendo uma interação, parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de BSE (ou ERE) - imagem de elétrons retroespalhados - ou nesta interação a amostra emite elétrons produzindo a chamada imagem de ES (elétrons secundários). Neste trabalho, a distribuição dos poros das membranas de NRL foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um equipamento modelo ZEISS EVO 50 (15KV)

3.3.5 Caracterização por microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica feita em modo de não contato é ideal para superfícies moles ou frágeis, que por ventura possam ser danificadas pela sonda como é o caso da borracha. A técnica consiste na varredura da superfície da amostra por uma sonda em distâncias que variam de 10 nm a 100 nm, na sua frequência natural de ressonância mecânica. O raio de curvatura da extremidade da sonda, feita de silício, é menor que 20 nm. Esta ponteira é fixa em um cantilever que tem 100 a 200 μm de comprimento, com as constantes de mola da ordem de 24 a 100 N/m. A sonda ao se aproximar da superfície sofre a ação de forças de van der Waals que mudam a constante

de mola efetiva da sonda, resultando na variação da frequência natural de ressonância e, conseqüentemente da amplitude e fase do sinal.

A microscopia de força atômica, por ter uma resolução na ordem sub-micrométrica, é utilizada no estudo dos padrões obtidos por secagem, presença de flocos, fissuras e da rugosidade das membranas de látex. Por exemplo, é possível quantificar a rugosidade da superfície através da determinação de alguns parâmetros de rugosidade das imagens topográficas. Esta técnica foi utilizada para mostrar o tipo de cadeias das membranas de látex natural.

3.4 SLC utilizando o látex como matriz

3.4.1 Liberação da BSA

A confecção do SLC utilizando a BSA como modelo de droga foi dividido em duas etapas: Solubilização da BSA e adição da BSA na solução de látex. A BSA foi adquirida INLAB Ltda., Brasil.

Nesta etapa do trabalho, a confecção do SLC foi realizada através do método de simples deposição. A metodologia consistiu na confecção de 15 membranas de látex natural com BSA. Para isto foram depositadas em 15 placas de circulares de $5,00 \pm 0,05$ cm de diâmetro de inox, 2mL de látex natural acrescidos de 1mL de BSA em solução com concentração de 10mg/mL, portanto a composição final do filme foi de 2mL de látex e 1mL de BSA. Foram também produzidas 10 membranas de látex natural sem proteína (BSA). Para isto, 2mL de látex natural foi depositado nestas placas de circulares.

Desta forma, membranas de NRL e membranas de NRL+BSA foram colocadas em diferentes béqueres contendo 200mL de solução aquosa com 0,05% de azida de

sódio (antifúngica), onde o comportamento da liberação foi observado. Alíquotas destas soluções foram coletadas em diferentes intervalos de tempo durante 400 horas. Em seguida, foram construídas duas curvas de absorbância versus tempo, sendo uma para membranas de NRL e outra para membrana de NRL+BSA. Para quantificar as substâncias liberadas pelas membranas de NRL em solução aquosa e a BSA liberada pelas membranas de NRL+BSA foi utilizado método Lowry Modificado [81-82] nessas alíquotas. Nestes experimentos, observamos que a BSA liberada pela membrana de NRL+BSA e as substâncias contidas na membrana de NRL absorvem no mesmo comprimento de onda, 280nm. Assim a curva de liberação das membranas de NRL foi subtraída da curva de liberação das membranas de NRL+BSA, como pode ser observada na figura 13. A diferença entre a curva de NRL+BSA e curva de NRL será a quantidade de BSA liberada pelo SLC.

[Figura 13] Liberação de substâncias pela membrana de NRL e liberação da BSA pela membrana de NRL+BSA.

Para mensurar a quantidade de BSA liberada pela membrana de NRL+BSA é necessário construir uma curva de calibração (Figura 14.b) através do Método Lowry-Modificado. Observe que quanto maior a concentração de BSA, mais azul se torna a solução (figura 14.a).

[Figuras 14] a-) Soluções de diferentes concentrações de BSA, preparadas através do Método Lowry Modificado e b-) Curva de calibração de BSA utilizando método Lowry $Y = (0,012 \pm 0,004) + (1,26 \pm 0,03).x$

Diferentes temperaturas de polimerização (-100°C a 40°C) foram empregadas com o propósito de controlar a morfologia da membrana. A variação da morfologia da membrana (densidade e tamanho de poros) tem forte influência na taxa de liberação de proteínas.

3.4.1.1 Curva de calibração para as substâncias liberadas pelas membranas de NRL

Para relacionar a absorbância com a concentração de substâncias liberadas pelas membranas de NRL, construiu-se uma curva de calibração da seguinte forma: Foram preparadas três membranas de látex natural, e a seguir elas foram colocadas em um béquer com solução aquosa 0,05% de azida e deixados por 10 dias. A seguir, as

membranas foram retiradas do béquer, e a solução aquosa contendo substâncias liberadas pela membrana foram submetidas ao processo de liofilização.

O processo de liofilização [83-84] consiste no congelamento do material e então redução da pressão circunvizinha permitindo que a água congelada no material sublime diretamente da fase líquida ao gás. O resultado final do material liofilizado consistiu em substâncias liberadas pela membrana de NRL. Utilizando este material liofilizado foi possível preparar soluções de diferentes concentrações e, aplicando o método Lowry-Modificado pôde-se obter a curva absorbância versus concentração (Figura 15).

[Figura 15] Curva de calibração do material liberado pela membrana de látex em solução aquosa $Y = (-7,9 \times 10^{-4} \pm 9,9 \times 10^{-4}) + (0,888 \pm 0,005).x$

3.4.2 Confeção e caracterização da liberação do MTZ

A confeção do SLC utilizando o metronidazol (MTZ) como modelo de droga também dividido em duas etapas: solubilização do MTZ e adição do metronidazol na solução de látex. Nesta etapa do trabalho, a confeção do SLC foi realizada através do método de simples deposição. A fabricação consistiu na confeção de 7 membranas de

látex natural com MTZ. Para isto foram depositados em 7 placas de circulares de $5,00 \pm 0,05$ cm de diâmetro de inox, 2mL de látex natural acrescidos de 1mL de MTZ em solução com concentração de 10mg/mL. A seguir as membranas foram polimerizadas a -100°C , -10°C , -1°C , RT e 40°C .

Foram também produzidas 10 membranas de látex natural sem o MTZ. Pois foi necessário confirmar que as substâncias contidas pela membrana de látex não absorvam no mesmo comprimento de onda do MTZ. Consequentemente foi observado que o MTZ absorve em 330nm e as substâncias contidas na membrana de NRL absorvem em 280nm.

As membranas de NRL incorporada com Metronidazol (MTZ) foram colocadas em 200 mL de solução aquosa. O comportamento da liberação foi observado retirando alíquotas desta solução durante 450 horas. A liberação do MTZ foi caracterizada empregando a técnica por espectroscopia por UV-VIS.

3.4.3 Confeção e caracterização da liberação do NO

A preparação do sistema liberador de NO foi separado em dois estágios: preparação da matriz de látex e da solução de FeDETC e o processo de mistura do látex com o FeDETC obtendo o sensor sólido. Para a preparação da solução de FeDETC foram utilizados os seguintes reagentes: Cloreto de ferro hexahidratado($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), dimetilformamida(DMF, $\text{C}_3\text{H}_7\text{ON}$) e o dietilditiocarbamato de sódio(DETC, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NNaS}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). A solução de FeDETC (Figura 16) foi preparada utilizando 12mg de cloreto de ferro e 20mg de DETC que foram diluídos em 3ml de DMF durante 10 minutos no banho ultra-sônico por 10 minutos para homogeneização.

[Figura 16] Solução de látex e solução de FeDETC

A temperatura em que a solução de látex com FeDETC é transformado em uma borracha foi de 27°C, ou seja, temperatura ambiente (RT). A concentração de FeDETC utilizada na matriz de látex foi de 14.8mM [85, 86]. O radical livre, óxido nítrico foi obtido pela redução do nitrito de sódio (NaNO_2) utilizando ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) como mostra a reação abaixo (1).

As membranas de Látex-FeDETC foram fabricadas utilizando látex natural, água e a solução FeDETC. A solução de FeDETC vulcaniza instantaneamente ao entrar em contato com o látex [85, 87], resultando em uma membrana não homogênea. Na tentativa da obtenção de uma membrana homogênea, optamos pela diluição da solução de látex em água, a fim de reduzir a velocidade da reação.

A solução de FeDETC foi adicionada vagarosamente à solução de látex e água sob agitação magnética. A seguir, 3 mL da solução final obtida foi depositada em uma placa de inox de $(5,00 \pm 0,05)$ cm de diâmetro. Após a deposição, a membrana é levada na estufa a 40° C por 24 horas para a polimerização. A seguir a membrana foi retirada da placa de inox e recortado em retângulos de $(0,70 \pm 0,05)$ por $(2,6 \pm 0,05)$ cm.

3.4.3.1 Adição do óxido nítrico no SLC

O sistema de liberação controlada foi mergulhado na solução de óxido nítrico (NO) por duas horas. A obtenção do NO foi mostrado na equação 1. O monitoramento do radical livre, NO, foi feito através da espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Os espectrômetros de EPR são classificados de acordo com a frequência e a modulação das microondas de trabalho. Com relação à frequência das microondas, os espectrômetros levam os nomes das bandas de frequência com que operam. O espectrômetro de **Banda X** opera com frequência de microondas de aproximadamente 9.5 GHz, o de **Banda K**, 24 GHz e o de **Banda Q**, 35 GHz. Existem ainda comercialmente os espectrômetros de **Banda L** (1.5 GHz), **Banda S** (3.2 GHz) e **Banda W** (95 GHz). As frequências altas são utilizadas quando se pretende uma melhor resolução do fator g. As frequências baixas são usadas quando a resolução da interação hiperfina é um parâmetro importante, quando a presença de água impede o uso de frequências mais altas, ou quando queremos realizar medidas com amostras grandes, já que o tamanho da cavidade do espectrômetro é inversamente proporcional à frequência de trabalho.

Neste trabalho foi utilizado um espectrômetro VARIAN-E4 acoplado a um amplificador Lock-in EG&G 7260, a um frequencímetro HEWLETT PACKARD 5350B e adaptado para ser controlado remotamente por um microcomputador através de placas e cabos GPIB (figura 17).

[Figura 17] Espectrômetro **VARIAN E4** utilizado para estudo e caracterização do sistema liberador de NO.

O espectrômetro opera com campos magnéticos de 0,025 a 0,6 T (250 a 6000 G) e com microondas não moduladas de frequências de 8,8 a 9,6 GHz, sendo portanto um espectrômetro de **banda-X**. Com as adaptações, o espectrômetro pode operar com várias frequências de modulação do campo magnético e também pode obter espectros de ressonância magnética detectada eletricamente (EDMR). A tabela 2 mostra as condições em que foram feitas as medidas de EPR para o SLC de NO. A temperatura utilizada nestes experimentos foi de 300K.

[Tabela 2] Condições em que foram feitas as medidas de EPR para o SLC de NO.

Parâmetro	Valor
Potência das microondas	20 mW
Frequência das microondas	9.48 GHz
Amplitude de modulação	0,4 mT
Campo Central	331,5mT
Faixa de Varredura	20 mT
Número de varredura	10
Tempo de varredura	60s
Constante de tempo	300ms

Capítulo IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Introdução

Neste capítulo, é analisada a influência da temperatura de polimerização na morfologia da membrana de látex natural. Para isto, foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia de força atômica (AFM). Para a caracterização química e estrutural foi utilizada análise termogravimétrica (TG) e espectroscopia no infravermelho (FTIR).

Além disso, será apresentado o comportamento da liberação dos fármacos. Para isto, estudamos a liberação dos seguintes fármacos na matriz de NRL.

1. BSA – Albumina de Soro Bovina
2. MTZ – Metronidazol
3. NO – Óxido Nítrico

4.2 Testes de Resistência Mecânica

Testes biomecânicos de tração foram realizados no laboratório de materiais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), em que se determinou o grau de deformação e resistência de cada membrana antes da implantação. Para isso, preparam-se com 44 cm de comprimento por 1,5 cm de largura e a espessura de cada amostra foi determinada com micrometro, em que obteve-se a média, após sete repetições para cada membrana (Tabela 3).

[**Tabela 3**] Valores médios de espessura, médias de diferentes amostras para deformação e resistência de membranas de látex submetidas ao teste mecânico de tração.

Membrana	Espessura (mm)	Deformação (mm)	Resistência (kgf)
NRL	1,56	179	16,85
NRL+BSA	1,57	180	14,23
NRL+MTZ	1,56	170	12,35

Os testes de tração a que as amostras foram submetidas revelaram que a composição influencia na deformação e resistência (Figura 18). Observamos que ao adicionar fármacos (proteínas) ao látex natural, ocorre uma diminuição da resistência mecânica. Este resultado era esperado, pois os fármacos estão agregados no “bulk” da membrana de látex natural, aumento o número de ligações cruzadas. Assim, podemos inferir que, as propriedades mecânicas dos vulcanizados são função do número e do tipo de ligações cruzadas. Membranas oclusivas devem possuir características como que conduzam requisitos biológicos, mecânicos e de uso clínico para servirem como barreira contra a invasão celular indesejável, ou seja, a resistência mecânica é um fator importante.

A Figura 18 mostra que a deformação de ruptura da membrana de NRL ocorreu em 179 mm, enquanto para a membrana de NRL com BSA observamos que ocorreu a ruptura em 180 mm e para a membrana de NRL com metronidazol a ruptura ocorreu em torno de 170 mm. Em resumo, observa-se que não há mudança significativa na resistência mecânica da membrana com a adição dos fármacos. É importante salientar, que a espessura da amostra influencia diretamente sua resistência, sendo diretamente proporcional, quando se compara amostras do mesmo material. Os três tipos de

membranas utilizadas possui o mesmo comprimento de base (44mm) e a mesma espessura (~1,56mm). A figura 18 mostra que a força de ruptura das membranas de NRL, NRL+BSA e NRL+MTZ foram respectivamente: 4,5MPa, 3,9MPa e 3,3MPa.

[Figura 18] Deformações obtidas para as membranas de NRL, NRL+BSA e NRL +MTZ.

O módulo de Young é definido pela equação (2):

$$Y = \frac{F / A}{\Delta \ell / \ell_0} = \frac{F \cdot \ell_0}{A \cdot \Delta \ell} \quad (2)$$

Onde:

F= força de tração

A = área transversal do corpo de prova

$\Delta \ell$ = é o alongamento sofrido

ℓ_0 = é o comprimento do corpo não tracionado

A partir da equação 2, observamos que o módulo de Young da membrana de NRL foi de 16,85MPa, enquanto para a membrana de NRL + BSA foi de 14,23MPa. Já em relação a membrana de NRL com MTZ, observamos que o módulo de Young foi de 12,35MPa. De acordo com a literatura [8-9, 42, 62] o látex natural possui resistência suficiente para aplicação biológica. Desta forma, podemos inferir que apesar das mudanças no módulo de Young e na força de ruptura das NRL+BSA e NRL+MTZ, estas amostras possuem resistência suficiente para aplicação como membrana oclusiva em tibia de coelhos.

4.3 Análise termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica (TG) é uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e de outros tantos materiais. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por consequência, as propriedades físicas dos materiais. Em uma curva de TG observa-se a inflexão devido ao processo de degradação térmica do material, o qual depende da natureza química, ou seja, da estrutura e da extensão das forças de interação.

Seu objetivo neste trabalho foi analisar a degradação térmica dos fármacos nas membranas de látex. A Figura 19 apresenta os termogramas de membranas de látex natural (NRL) polimerizados à -100°C, -10°C, -1°C, RT e 40°C, obtidos em atmosfera de nitrogênio. Uma única etapa de perda de massa é observada nos termogramas e em todas as amostras analisadas os perfis de perda são semelhantes. A faixa de temperatura utilizada neste experimento foi de 20°C até 400°C e a atmosfera utilizada foi de nitrogênio e seu fluxo foi de 50ml/min.

[Figura 19] Termogramas de membranas de NRL polimerizado a diferentes temperaturas

A Figura 20 apresenta os termogramas de membranas de látex natural (NRL) com BSA polimerizados à -100°C, -10°C, -1°C, RT, 40°C e da BSA em pó. Observe que o termograma da BSA em pó (linha laranja) é completamente diferente aos outros termogramas das membranas de látex natural com BSA. Note que os termogramas das membranas látex com BSA são semelhantes às membranas de látex sem adição de BSA. Os parâmetros como: fluxo, atmosfera e faixa de temperatura são os mesmo da Figura 19.

[Figura 20] Termogramas de membranas de NRL + BSA polimerizado a diferentes temperaturas e da BSA em pó.

A Figura 21 apresenta os termogramas de membranas de látex natural (NRL) com MTZ polimerizados à -100°C, -10°C, -1°C, RT, 40°C e do MTZ em pó. Observe que apenas o termograma do metronidazol (MTZ) em pó (linha rosa) é diferente aos termogramas das membranas de látex natural com MTZ. Os termogramas mostrados da Figura 21, foram obtidos em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50ml/min e a faixa de temperatura de 20°C a 600°C.

[Figura 21] Termogramas de membranas de NRL + MTZ polimerizado a diferentes temperaturas e da MTZ em pó.

A variação da temperatura de polimerização do látex natural não acarreta mudanças nos termogramas das membranas de NRL. Tal fato, pôde ser observado para as membranas de NRL +BSA e para as membranas de NRL + MTZ. As faixas de temperatura de perda de massa mostram que a maior parte do polímero se decompõe em uma única etapa, associada com a formação de produtos voláteis. O ombro observado nas curvas de dm/dT , em torno de 350°C, de todas as amostras é associado à decomposição mais lenta de cadeias poliméricas ou resíduos poliméricos altamente reticulados, freqüentemente observado em curvas de TG de borracha natural [88].

A Figura 22 mostra os termogramas das membranas de NRL, membranas de NRL+BSA e membranas de NRL+MTZ. Podemos observar que apesar da BSA em pó e o metronidazol (MTZ) em pó possuem termogramas totalmente distintos do NRL.

Quando estas substâncias são adicionadas ao látex, não observamos mudanças entre os termogramas do NRL, NRL+BSA e NRL+MTZ.

[Figura 22] Comparação entre os termogramas das membranas de NRL, NRL+BSA, NRL + MTZ e entre a BSA e MTZ. Note que não se encontra nenhuma diferença entre as membranas de NRL, NRL +BSA e NRL+MTZ.

Os resultados obtidos mostram que as amostras apresentam a mesma estabilidade térmica quando em atmosfera de nitrogênio, exceto as amostras de BSA e de MTZ que têm comportamentos térmicos distintos nesta atmosfera. Um fato curioso, é que ao agregar o BSA ou MTZ ao NRL, imaginávamos encontrar termogramas diferentes ao da membrana de NRL, pois estamos misturando substâncias diferentes a matriz de látex. Assim, com esta técnica não foi possível mostrar a interação do fármaco com a matriz de látex natural. Desse modo, foi necessário utilizar a espectroscopia no infravermelho (FTIR) para entender como está ocorrendo a interação das proteínas (fármacos) com a membrana de látex natural.

4.4 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

O objetivo da espectroscopia de absorção no infravermelho é a determinação dos grupos funcionais de um dado material. Cada grupo absorve em frequência característica de radiação na região do infravermelho. Assim, um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, o espectrograma de infravermelho, permite caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido.

A Figura 23 apresenta os espectros de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IFTR) usando o modo de refletância total atenuada (ATR) obtidos do látex natural na região de 500-4000 cm^{-1}

[Figura 23] Espectros de FTIR do látex natural.

As bandas de absorção relativas dos principais modos vibracionais do *cis* 1,4-poliisopreno estão na Tabela 4. Os espectros de FTIR de todas as frações Sol e Gel

apresentam as aberrações características do cis 1,4-poli-isopreno, sendo as mais significativas em 835, 1092, 1127, 1375, 1448, 1663, 2912, 2926 e 2961 cm^{-1} .

[Tabela 4] Bandas de absorção relativas dos principais modos vibracionais do cis 1,4-poliisopreno.

<i>Experimental</i>	<i>Literatura</i> ¹⁴³	<i>Atribuição</i> ^{143,144,145}
3114	3114	$\nu_{\text{ass}} (\text{C}=\text{C})$ ¹⁴⁶
3038	3036	$\nu_{\text{s}} (\text{C}=\text{H})$
2961	2962	$\nu_{\text{ass}} \text{C-H no } \text{CH}_3$ ¹⁴⁷
2926	2925	$\nu_{\text{ass}} \text{C-H no } -\text{CH}_2-$
2912	2912	$\nu_{\text{s}} \text{C-H no } \text{CH}_3$
2854	2854	$\nu_{\text{s}} \text{C-H no } -\text{CH}_2-$ ¹⁴⁸
2725	2726	$\nu -\text{CH}_2-\text{C}=(\text{CH}_3)$ ¹⁴⁹
1663	1663	$\nu_{\text{s}} \text{C}=\text{C}$
1448	1450	$\delta -\text{CH}_2-$
1432	1432	$\delta_{\text{s}} -\text{CH}_3$
1375	1375	$\delta_{\text{s}} -\text{CH}_3$
1358	1362	$-\text{CH}_2$ bending
1324	1324	$\delta (\text{=CH})$ no plano
1310	1309	$-\text{CH}_2-$ twist
1288	1287	C-H bending ¹⁴⁷
1241	1244	$-\text{CH}_2-$ twist
1127	1125 ou 1128 ^{146,158}	C-H bending no plano ou $\nu (\text{C-C})$ cis ou CH_2 wag ¹⁴⁷
1092	1091 ¹⁴⁶	Estiramento C-CH_2-
1038	1038	$-\text{CH}_3$ rock
1010	1015	Estiramento $-\text{C-CH}_2$ ¹⁴⁷
984	985	Estiramento $-\text{C-CH}_3$ ¹⁴⁷
888	889	$-\text{CH}_3$ wag $-\text{C-H}$ do $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)$ ¹⁵⁰
835	837	$\delta \text{C}=\text{C-H}$ ¹⁵¹
764	764	$-\text{CH}_2-$ rock ¹⁴⁸ $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH-}$ ¹⁴⁹
739	741	$-\text{CH}_2-$ rock ¹⁴⁷ $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH-}$ ¹⁴⁸
574	573	$(\text{R})_2 \text{C}=\text{CH}_2$ twisting ¹⁴⁶
507	506	cis $-\text{RCH}=\text{CH-R}$ twisting ¹⁴⁶
490	488	$=\text{CC}_2$ rocking

Os espectros de FTIR das membranas de látex natural (NRL), membranas de NRL + BSA e membranas de NRL + MTZ apresentam todas as absorções características do cis 1,4-poli-isopreno, sendo as mais significativas em 835, 1092, 1127, 1375, 1448, 1663, 2912, 2926 e 2961 cm^{-1} . As regiões de maior interesse para esta discussão são: 3280-3400 cm^{-1} e principalmente 1750-1500 cm^{-1} . Na primeira região pode-se obter informação sobre a existência de material protéico e/ou contendo grupos oxigenados capazes de formar pontes de hidrogênio através de ligações N-H e O-H. Na segunda há absorbâncias que permitem avaliar a presença de grupos funcionais devido à presença de grupos carbonílicos como ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e amidas.

A técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier é empregada neste trabalho para compreender a interação dos fármacos na matriz de látex natural. Além disso, a partir desta técnica podemos observar se a variação temperatura de polimerização da membrana influencia no aparecimento de outras bandas. A Figura 24 apresenta os espectros de FTIR obtidos das membranas de NRL polimerizados à -100°C, -10°C, -1°C, temperatura ambiente (27°C) e + 40°C. Observe que com a variação da temperatura de polimerização não houve mudanças significativas nos espectros de IFTR.

[Figura 24] Espectros de FTIR de membranas de NRL polimerizadas a diferentes temperaturas.

A Figura 25 apresenta os espectros de FTIR obtidos das membranas de NRL + BSA polimerizada a -100°C , -10°C , -1°C , temperatura ambiente (27°C) e $+40^{\circ}\text{C}$. Observamos significativas mudanças na banda de 3450 cm^{-1} . Notamos que para membranas de NRL + BSA polimerizadas a -100°C houve o aparecimento de novas bandas em 2150 e 2250 cm^{-1} . Infere-se que isto ocorreu devido a desnaturação da BSA decorrente a temperatura.

[Figura 25] Espectros de FTIR de membranas de NRL + BSA polimerizadas a diferentes temperaturas.

A Figura 26 apresenta os espectros de FTIR obtidos das membranas de NRL + MTZ polimerizada a -100°C , -10°C , -1°C , temperatura ambiente (27°C) e $+40^{\circ}\text{C}$. Observamos grandes mudanças na banda de $3450\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$. Notamos que para membranas de NRL + MTZ polimerizadas a RT e a $+40^{\circ}\text{C}$ possuem a banda em 3500 cm^{-1} na mesma magnitude do que a banda de 2900 cm^{-1} .

[Figura 26] Espectros de FTIR de membranas de NRL+ MTZ polimerizadas a diferentes temperaturas.

A Figura 27 mostra que o espectro da BSA em pó (linha rosa) possui bandas características em 1500 e 1700 cm^{-1} , enquanto que a membrana de látex natural (NRL) apresenta uma banda característica em 2950 cm^{-1} . Observamos que os espectros das membranas de NRL e membrana de NRL +BSA possuem bandas muito semelhantes. Com as técnicas de espectroscopia no infravermelho (FTIR) não é possível dizer se a BSA está incorporada na matriz do látex natural, pois as bandas das amidas I, amidas II, C=O, NH e O-H (ver figura 23) são coincidentes, ou seja, não houve alteração na intensidade relativa.

[Figura 27] Espectros de FTIR de membranas de NRL , membranas de NRL+ BSA e BSA em pó.

A Figura 28 mostra que o espectro do MTZ em pó (linha preta) possui bandas características em 3100 e 3250 cm^{-1} , enquanto que a membrana de látex natural (NRL) apresenta uma banda característica em 2900-2950 cm^{-1} . Notamos que as bandas da membrana de NRL entre 500 e 1500 cm^{-1} são completamente diferentes tanto na forma quanto na magnitude. Um fato curioso, é que os espectros das membranas de NRL + MTZ e das membranas de NRL são muito semelhantes, isto leva a concluir que as análises por espectroscopia no infravermelho (FTIR) não mostra a interação do MTZ nas membranas de látex natural.

[Figura 28] Espectros de FTIR de membranas de NRL , membranas de NRL+ MTZ e MTZ em pó.

Os espectros das Figuras 24 a 27 (exceto BSA em pó e o MTZ em pó) mostraram que todas as amostras apresentam absorbância na região de 3295 cm^{-1} , característica de pontes de hidrogênio em proteínas. Os espectros de todas as amostras das figuras 24 a 27 (exceto BSA em pó e o MTZ em pó) na região de $1750\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ apresentam absorções nas regiões de $1738\text{ e }1548\text{ cm}^{-1}$, atribuídas a compostos carbonílicos (ésteres, cetonas, aldeídos) e proteínas, de acordo com as atribuições na Tabela 4.

4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta técnica é uma técnica muito versátil usada rotineiramente para análise micro estrutural de materiais sólidos [89, 90]. O principal objetivo da técnica de

microscopia eletrônica de varredura foi analisar a morfologia da membrana, ou seja, o tamanho e a distribuição de poros.

Segundo Lloyd *et al*, Matsuyama *et al* e Yave *et al* [87, 91-94], separação de fase induzida termicamente (TIPS) é um método para fazer membranas microporosas. Para a otimização das membranas de NRL, decidimos variar a temperatura do látex natural durante a polimerização como controle de poros das membranas. Desta forma, preparamos membranas de NRL em 5 diferentes temperaturas de polimerização: -100°, -10°C, -1°C, Room Temperature–RT (27°C) e + 40°C. A Figura 29 mostra as imagens de MEV destas cinco amostras.

a-)

b-)

c-)

d-)

[Figura 29] Imagens de MEV das membranas de NRL: a-) polimerizado a -100°C, b-) polimerizado a -10°C, c-) polimerizado a -1°C e d-) polimerizada a RT.

Vale ressaltar que a imagem de MEV para membrana de NRL polimerizado a +40°C não foi mostrada porque esta amostra não apresentou poros, ou seja, a morfologia desta membrana é similar a membrana polimerizada a RT.

A morfologia das membranas de látex natural com BSA também foi analisada. A Figura 30 mostra as imagens de MEV das membranas de NRL + BSA polimerizadas: a)-100°, b)-10°C, c)-1°C, d-) RT.

a-)

b-)

[Figura 30] Imagens de MEV das membranas de NRL + BSA: a-) polimerizado a -100°C, b-) polimerizado a -10°C, c-) polimerizado a -1°C e d-) polimerizada a RT.

Para finalizar a conclusão as análises morfológicas das membranas de látex natural, foram feitas imagens de microscopia eletrônica de varredura para membranas de NRL + metronidazol (MTZ). A Figura 31 mostra as imagens de MEV das membranas de NRL + MTZ polimerizadas: a)-100°, b)-10°C, c) -1°C, d) RT, e) 40°C.

a-)

b-)

c-)

d-)

e-)

[Figura 31] Imagens de MEV das membranas de NRL + BSA: a-) polimerizado a -100°C , b-) polimerizado a -10°C , c-) polimerizado a -1°C e d-) polimerizada a RT, polimerizado a $+40^{\circ}\text{C}$.

Nas Figuras 29-31, a formação da estrutura porosa da membrana ocorre devido ao congelamento rápido das moléculas de água presentes na solução de látex natural seguido por sua eliminação durante o aquecimento na estufa. Na Figura 30, onde a BSA

está agregada ao látex natural pode-se observar uma maior densidade de poros. Isto ocorre devido a presença da BSA na superfície da membrana de látex. Tal fato também foi observado na Figura 31 onde membranas de látex natural com MTZ também apresentam maiores densidade de poros. O mecanismo de eliminação da água e consequentemente a formação de poros leva a variação da entrega de fármacos pela membrana de NRL. Este tópico será discutido em seções posteriores (4.7 - 4.8).

4.6 Microscopia de força atômica (AFM)

O principal objetivo do experimento de microscopia de força atômica (AFM) nas membranas de látex natural neste trabalho é analisar a disposição dos grãos de albumina (BSA) e metronidazol (MTZ) no material, o tamanho e a distribuição dos poros no material, o tipo de cadeia polimérica na matriz de látex natural e a rugosidade das membranas em função do tratamento térmico [95, 96]. Entretanto, com o alto grau de rugosidade, não foi possível analisar a disposição dos grãos de BSA e MTZ pela técnica de microscopia de força atômica, pois devido a este tipo de topografia, o oscilador não consegue varrer toda a superfície da amostra. Observe que a amostra foi totalmente danificada pela sonda (oscilador). Tal fato pode ser verificado na Figura 32.

[Figura 32] Imagens tridimensionais de AFM (topografia) do SLC de BSA: Note que a oscilador (sonda) não conseguiu varrer corretamente a amostra devido a rugosidade.

Devido a estas limitações, nos preocupamos em analisar apenas as mudanças na matriz de látex natural em função do tratamento térmico. Vale ressaltar que imagens de AFM das membranas de NRL polimerizadas a -1°C , -10°C e -100°C apresentaram perfis semelhantes. A Figura 33 mostra imagens de AFM das membranas de NRL polimerizado a -10°C . Nesta figura, podemos que o SLC não é liso. É possível observar a morfologia da membrana, ou seja, a distribuição e os tamanhos dos poros. A Figura 33.b mostram regiões mais altas e depressões, com um desnível máximo de 566,12nm.

[Figura 33] Imagens de AFM das membranas de NRL polimerizadas a -10°C

As membranas de NRL polimerizada a RT (room temperature) não apresentou topografia semelhante às membranas polimerizadas a 1°C, -10 °C e -100°C. Comparando as imagens verifica-se que as membranas polimerizadas a RT não apresentaram regiões altas e depressões. Observamos com nitidez a estrutura das cadeias poliméricas do látex natural. Note que as cadeias são cruzadas (cross-linking). Tal fato será discutido na seção 4.7, e esta característica é muito importante para à liberação de BSA pela matriz de látex natural. A Figura 34 mostra imagens de AFM das membranas de NRL polimerizado a temperatura ambiente (RT).

[Figura 34] Imagens de AFM das membranas de NRL polimerizado a RT.

As membranas de NRL polimerizada a 40°C apresentaram topografias semelhantes às membranas polimerizadas a RT, ou seja, não observamos depressões e regiões altas. Também é possível observar a estrutura das cadeias poliméricas, entretanto, sem a mesma nitidez do que as membranas polimerizadas a RT.

Um fato interessante é que as membranas polimerizadas a -1°C apresentam poros maiores e profundos. Observou-se também que as regiões mais altas e depressões apresentaram um desnível da ordem de 694,31nm. Portanto, a superfície mole do látex natural foi um pouco danificada pela sonda.

A técnica de AFM não é satisfatória para membranas poliméricas com poros com grande profundidade. Entretanto, apesar do tamanho e densidade de poros influenciarem na liberação de fármacos (resultados mostrados na seção 4.5), a liberação de BSA será influenciada pelo tipo da cadeia polimérica do látex natural (seção 4.7).

Em resumo, apesar da técnica de AFM e MEV estudarem a morfologia da membrana de látex, apenas a técnica de AFM consegue mostrar a estrutura polimérica da matriz de látex, ou seja, cadeia linear, cadeia ramificada e cadeia cruzada.

**SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA (SLC) USANDO A
BSA COMO MODELO DE DROGA**

4.7 Liberação da BSA

A liberação controlada de fármacos é um tópico importante para várias iniciativas em nanotecnologia devido ao possível impacto para a sociedade, com a criação de sistemas otimizados que garantam a liberação num sítio específico e a uma taxa controlada. Dentre os vários paradigmas de liberação controlada destaca-se o uso de sistemas liberadores de drogas sustentado em materiais poliméricos [57]. A partir destas informações, decidiu-se empregar o látex como sistema liberador de fármacos. Inicialmente, uma solução de BSA foi misturada a uma solução de látex natural. Depois de polimerizada, esta membrana foi colocada em um recipiente com solução aquosa e caracterizou-se a liberação de BSA pela membrana de látex natural.

4.7.1 Caracterização da liberação de substâncias pelas membranas de látex natural

De acordo com a literatura [95,96], o tamanho dos poros da membrana de látex varia com a temperatura de polimerização da membrana. Membranas confeccionadas a diferentes temperaturas foram colocadas em solução aquosa (para simular um meio biológico) aonde é possível observar que a temperatura de polimerização do látex influencia na liberação da BSA no sistema. Isto ocorre devido ao tamanho dos poros da membrana de látex. Na Figura 29 (seção 4.6), é observado as diferenças nos tamanhos dos poros para membranas de NRL confeccionadas a diferentes temperaturas.

A Figura 35 mostra as absorções das membranas de NRL e NRL+BSA em função do tempo. Note que estas absorções são das substâncias liberadas pelas membranas de látex puro sem BSA e pela membrana de látex com BSA. A caracterização da liberação do sistema foi realizada empregando o Método Lowry-Modificado. Como mostrado, a membrana de NRL age como um sistema liberador de

proteínas e a liberação destas substâncias é gradativa. Pode-se observar que no início a absorção é zero pois não ocorre liberação de proteínas. Na medida que o tempo aumenta inicia-se a liberação da proteína até atingir a saturação da absorbância. Isto ocorre porque o sistema entra em equilíbrio. A Figura 35.a, 35.b e 35.c mostra a liberação das proteínas e a saturação das membranas preparadas com diferentes temperaturas de polimerização. Note que além de diferentes pontos de saturação, as membranas de NRL possuem taxas de liberação distintas. Tal fato ocorre devido ao tamanho dos poros.

a-)

b-)

c-)

[Figura 35] Curvas de liberação de substâncias pela membrana de NRL e da BSA pelas membranas de NRL+BSA polimerizados a diferentes temperaturas: a-) RT, b-) -1°C e c-) -10°C.

Os dados experimentais da Figura 35 que representam a liberação de substâncias pela membrana de NRL e a liberação de BSA pela membrana de NRL+BSA foram ajustados utilizando o aplicativo Origin Lab. O modelo da curva de ajuste obtido que apresentou melhor ajuste com os dados experimentais (menor valor de χ^2) foi $A = at^b$. Nesta expressão A refere-se a absorbância obtida pelo método de Lowry Modificado e t representa o tempo de liberação de proteínas em horas, a e b são constantes a serem determinadas. Os valores encontrados para os parâmetros a e b de cada curva estão dispostos na Tabela 5.

[Tabela 5] Valores dos parâmetros da curva $A = at^b$

	a	b	c² reduzido	R²
BSA -1°C	0,090 ± 0,004	0,114 ± 0,009	0,00005	0,948
Latex -1°C	0,054 ± 0,003	0,145 ± 0,011	0,00002	0,962
BSA Ambiente	0,050 ± 0,005	0,200 ± 0,020	0,00021	0,913
Latex Ambiente	0,024 ± 0,003	0,218 ± 0,027	0,00005	0,936
BSA -10°C	0,110 ± 0,003	0,128 ± 0,005	0,00002	0,986
Latex -10°C	0,041 ± 0,003	0,203 ± 0,014	0,00005	0,946

Subtraindo a curva da membrana de látex+BSA pela curva da membrana de látex puro encontramos a absorbância correspondente a liberação da BSA porque tanto as substâncias presentes na membrana de látex puro(NRL) quanto a BSA absorvem em 280nm.

Deste modo, subtraindo a curva de NRL+BSA pela curva de NRL (látex puro) ($A_{\text{proteína}} = A_{\text{NRL+BSA}} - A_{\text{NRL}}$) encontra-se as seguintes curvas de liberação de BSA para as membranas de NRL preparadas às temperaturas -10° C, -1° C e RT. A Figura 36 é construída utilizando as curvas de liberação de proteínas (Figura 35.a, 35.b, 35.c) e a curva de calibração de concentração de BSA versus absorbância (Figura 15). Através da curva de calibração pôde-se transformar o eixo vertical de absorbância para concentração de BSA (mg/ml) liberada em função do tempo.

[Figura 36] Liberação de BSA pela membrana de NRL preparadas sob diferentes temperaturas.

A Figura 36 mostrou que foram diferentes as doses de BSA liberadas pelas membranas preparadas sob diferentes temperaturas de polimerização. A membrana de NRL+BSA que apresentou maior dose de liberação de BSA foi a preparado a RT que as polimerizadas a -1°C e -10°C . Pode se notar que após um intervalo de tempo relativamente curto (75 horas) a taxa de liberação de proteínas tende a uma constante. Observa-se também que concentração de BSA aumenta assintoticamente para todas as amostras. A quantidade liberada de BSA pelas 3 membranas foi calculada integrando as curvas da Figura 36 até 285 horas. Deste modo, o total de BSA liberada em 285 horas foi: 13,24mg (44,1% da BSA usado na confecção da membrana) para membrana polimerizada a RT, 3,73mg (12,4%) para membrana polimerizada a -1°C e 7,52mg (25,1%)-para membrana polimerizada a -10°C . Depois de 18 dias, a membrana polimerizada a RT liberou 20,54mg de BSA, ou seja, 68,4% da quantidade incorporada durante a polimerização.

A Figura 37 apresenta a taxa de liberação BSA próximo ao ponto de saturação. As três membranas alcançaram a saturação em diferentes concentrações, ou seja, a quantidade total de BSA liberada pelas membranas depende da temperatura de polimerização do látex.

[Figura 37] Taxa de liberação de BSA das membranas de NRL preparadas sob diferentes temperaturas.

Em resumo, de acordo com o trabalho de Woo *et al* [97], o melhor sistema liberador de proteínas utilizando a matriz de ácido poligaláctico biodegradável é aquele que mantenha a liberação por 40 dias porque para um eficaz sistema de liberação de fármaco é necessário que ele seja liberado por períodos prolongados de tempos e com doses apropriadas.

A Figura 36 mostrou que a membrana de NRL preparada a RT retém a liberação de proteínas por cerca de 18 dias. Sendo assim, seguindo os resultados de Woo *et al* [97], talvez seja necessário diminuir a dimensão dos poros das membranas de NRL para reter a liberação de proteínas por mais dias. Isso pode ser feito através da adição de

enxofre a membrana de NRL que promoverá a ligação intercadeias do polímero de látex natural. Entretanto, é necessário salientar que apesar da morfologia da membrana (densidade e tamanho dos poros) ser importante para liberação da BSA, o fator mais importante para liberação de BSA nas membranas de látex natural é o tipo de cadeia. Na seção 4.6 observou-se que a cadeia polimérica é linear para membranas polimerizadas a RT. Membranas polimerizadas a outras temperaturas, o tipo de cadeia é cruzada (cross-link). Por não se cruzada, a BSA incorporada nas membranas polimerizadas a RT tem mais liberdade para sair da matriz polimérica.

**SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA (SLC) USANDO O
METRONIDAZOL (MTZ) COMO
MODELO DE DROGA**

4.8 Liberação do Metronidazol (MTZ)

A liberação de metronidazol (MTZ) é realizada na periodontia para o tratamento de alguns tipos de infecções. O termo “doença periodontal” traduz uma série de condições patológicas que acometem as estruturas do periodonto de proteção e ou sustentação. Como a doença periodontal está envolvida com um complexo bacteriano, diferentes bactérias têm sido associadas ao estado de saúde periodontal, gengivite e diversos tipos de periodontites [6-8].

Uma nova alternativa no tratamento de doenças periodontais foi desenvolvida misturando as soluções de MTZ e de látex natural. Para realizar o teste de liberação do metronidazol (MTZ), as membranas de látex natural com MTZ foram colocadas em 200ml de solução aquosa com 0,05% de azida de sódio (antifúngica) [98]. Alíquotas dessa solução aquosa foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (0 a 450 horas). Para quantificar o MTZ liberado pela membrana de látex em solução aquosa aplicou-se o método UV-VIS nessas alíquotas. Em seguida, construiu-se a curva de absorbância versus tempo.

Para relacionar a absorbância com a concentração do MTZ liberado pelas membranas de látex, foi construída uma curva de calibração através do método UV-VIS para soluções de MTZ a concentrações de 0,3 a 30 µg/ml. Como já mencionado, a idéia de utilizar o MTZ como *drug-delivery* é para evitar reações inflamatórias do látex, caso ocorra e no tratamento de doenças periodontais. A Figura 38 mostra a construção da curva de calibração através da espectroscopia UV-VIS para soluções de MTZ com concentrações de 0,3 a 25 µg/mL.

a-)

b-)

[Figura 38] Curva de calibração do Metronidazol (MTZ).

A Figura 38.a mostra que com o aumento da concentração de MTZ se tem uma maior absorção. A Figura 38.b será utilizada na seção 4.8.1, pois no gráfico da absorção

do MTZ liberado pela membrana de látex em função do tempo (Figura 40), pode-se transformar o eixo vertical de absorbância para concentração de MTZ (mg/ml).

4.8.1 Caracterização da liberação de MTZ pelas membranas de NRL

A morfologia da membrana de látex natural influencia na liberação de proteínas. O tamanho e a densidade de poros na membrana de NRL controlam a taxa de liberação de proteínas.

Na seção 4.5, observou-se que a membrana de NRL + MTZ polimerizada a RT (Figura 31.d) não possui poros. Entretanto, observou-se poros nas membranas de NRL+MTZ polimerizadas a -100°C e -1°C. Na figura 31, observou-se que a densidade de poros é maior para temperatura baixas. Tamanho de poros sem uma forma definida e com média de diâmetros de 2,1 μm são observados com membranas de NRL+MTZ polimerizadas a -100°C, enquanto para as membranas polimerizadas a -1°C mostra poros menores e com menor densidade, onde seus tamanhos são em torno de 1,09 μm .

A Figura 39 mostra a caracterização da liberação de MTZ pelo SLC em solução aquosa. A Figura foi construída pela absorção do MTZ liberado pela matriz de látex em função do tempo. Note que a liberação é para o SLC preparado a -100°C, aonde temos a maior densidade de poros. Pode-se notar que a membrana de látex natural age como um sistema de liberação controlada de MTZ e sua liberação é gradativa.

a-)

b-)

[Figura 39] a-) Espectro de MTZ em função do tempo, b-) Curva de liberação do MTZ em função do tempo.

A Figura 40 mostra a curva de liberação do MTZ em função do tempo para amostras preparadas a diferentes temperaturas (-100°C, -10°C, RT e 40°C). Observe que o SLC de MTZ polimerizado à -100°C é o que possui a maior taxa de liberação. Isto

ocorre devido a densidade e ao tamanho dos poros da membrana de NRL. Observamos também que os SLC de MTZ polimerizados a -100°, -1°, RT e 40°C possuem pontos de saturação diferentes. Os dados experimentais da Figura 40 foram fitados usando a função de **decaimento exponencial 2, ExpDec2** que é mostrada por esta função $y = y_0 + A_1 e^{-x/t_1} + A_2 e^{-x/t_2}$. O aplicativo OriginLab foi utilizado para fitar esta função.

[Figura 40] Liberação de MTZ pela membrana de NRL preparadas sob diferentes temperaturas.

Utilizando a curva de calibração do MTZ (Figura 38) e a taxa de liberação de MTZ em função da absorbância (Figura 40), é possível calcular a quantidade exata do MTZ liberado pelas 3 membranas. Para isto, integramos as curvas da Figura 40 até 310 horas. Deste modo, o total de MTZ liberado em 310 horas foi: 15,41mg (77,1% do MTZ usado na confecção da membrana) para membrana polimerizada a -100°C, 11,86mg (59,00%) para membrana polimerizada a -10°C, 10,63mg (53,15%) para membrana

polimerizada a RT e 9,40mg (47,02%) para membranas polimerizadas a 40°C respectivamente.

Em resumo, observa-se que a mudança na temperatura de polimerização da membrana de látex natural afeta na liberação do MTZ. Ao misturar as soluções de MTZ látex, elas são resfriadas a baixas temperaturas fazendo que as moléculas de água presentes se transformem em cristais de água. Ao aquecer esta solução congelada, os cristais de água evaporam criando poros na membrana de látex natural. Nota-se que congelamento a temperatura muito baixa, gera uma grande densidade de poros. O SLC proposto libera o MTZ por até 350 horas, demonstrando ser um excelente sistema liberador de fármacos. Este sistema é bem versátil pois dependendo das característica do paciente é possível ter uma liberação mais lenta (como o SLC preparado a temperatura de 40°C) ou uma liberação mais rápida (para o SLC preparado a -100°C).

SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA (SLC) DE OXIDO
NITRICO (NO)

4.9 Liberação do Óxido Nítrico (NO)

Nas seções 4.7 e 4.8, os fármacos (BSA e MTZ) incorporados na matriz polimérica de látex natural (NRL) foram monitorados utilizando espectroscopia ótica (Método de Lowry e UV/VIS). Entretanto, para a molécula de NO, sua taxa de liberação foi monitorada e detectada através da ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Foi comparada a taxa de liberação de NO pelo sistema de liberação controlada (SLC) exposto ao ar e em solução aquosa. Em solução, o SLC de NO é usado para simular um processo *in vivo*. Com o propósito de determinar a quantidade de óxido nítrico (NO) contido em cada membrana de NRL é realizado a construção de uma curva de calibração: Fe(NO)DETC₂ versus concentração de NO. Para isto, foram preparadas várias soluções com concentrações diferentes e conhecidas de NO. As concentrações das substâncias utilizadas são mostradas na Tabela 6.

[Tabela 6] Amostras para elaboração da curva de calibração

Substância	Concentração final das substâncias na amostra				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
FeCl ₃ .6H ₂ O	14,8 mM	14,8 mM	14,4 mM	14,4 mM	14,4 mM
Na ₂ S ₂ O ₄	0,55M	0,55M	0,55M	0,55M	0,55M
DETC	33,8 mM	33,8 mM	33,8 mM	33,8 mM	33,8 mM
[NO]	1mM	2,5mM	5mM	6.25mM	10mM

Para o registro do espectro de EPR, as soluções de Fe(NO)DETC₂ com diferentes concentrações foram colocadas em uma *flat cell*, que é um suporte que permite a realização de medida de EPR em líquidos, o volume deste dispositivo é de 150 ^mL. A relação entre o tamanho do sinal e a concentração de NO foi obtida

medindo-se a amplitude pico a pico do sinal. A Figura 41 mostra a curva de calibração com várias concentrações de NO em solução.

[Figura 41] Curva de calibração $Y = (0,06 \pm 0,05) + (0,17 \pm 0,01).x$, onde Y é a amplitude do espectro EPR e x é a concentração da solução de NO.

Convencionalmente, utiliza-se tubos de quartzo cilíndricos, de diâmetro interno de 3 a 4 mm para acondicionar as amostras para o registro dos espectros de EPR, porém com o intuito de se preservar o SLC(membrana de látex +FeDETC) em sua forma original para uma seqüência de experimentos, os SLC foram recortados em forma de retângulos e colocados sobre uma flat cell (Figura 42). Tal procedimento foi realizado para evitar que o sistema de liberação controlada de NO sofresse deformações ao ser enrolado e desenrolado quando inserido dentro do tubo cilíndrico.

[Figura 42] SLC retangular sobre uma flat cell.

As membranas de látex-FEETC foram mantidas em temperatura ambiente (RT), em contato com ar. As medidas de EPR em função do tempo foram feitas com o intuito de quantificar a concentração de NO presente no SLC. Desta forma, caracteriza-se o uso destas membranas como sistema de liberação controlada de droga.

A associação da intensidade do sinal de EPR com a quantidade de NO pode ser obtida de duas formas: medindo-se a altura do sinal, como na Figura 43.a; ou medindo-se a área da curva obtida entre a linha de base e o sinal, como na Figura 43.b.

[Figura 43] Métodos de obtenção da intensidade do sinal de EPR: (a) pela amplitude do sinal, e (b) pela área obtida do próprio sinal.

Em nosso trabalho a intensidade do sinal será determinada pelo método 1, pois estamos estudando apenas uma espécie paramagnética na qual não observamos

nenhuma mudança significativa na forma de linha nos vários espectros analisados. Além de evitar os erros induzidos pela linha de base na determinação da área sob a curva

4.9.1 Espectro do Sistema de Liberação Controlada (SLC) de NO

O espectro típico de EPR do SLC de NO usando uma *flat cell*, pode ser observado na Figura 44. Através da curva de calibração, comparamos o espectro inicial do SLC de NO e podemos notar que com esta metodologia de preparo de amostras, o espectro inicial obtido corresponde a solução FeDETC-NO com concentração correspondente a $(0,24 \pm 0,06)$ mM. Sabendo que o volume da flat cell é 150 μ L e que a área da membrana é de $(1,82 \pm 0,10)$ cm². Temos que o número de radicais NO por cm² nesta membrana é de $1,18 \cdot 10^{16}$.

[Figura 44] Espectro inicial de NO contido no SLC.

4.9.2 Estudo da Liberação de NO pela membrana no ar

A Figura 45 ilustra alguns dos espectros do SLC de NO registrado em diferentes períodos de exposição ao ar. Nesta figura a intensidade pico a pico mostra a quantidade de NO aprisionado na matriz de látex. Pode-se notar que a amplitude do sinal decai com o passar do tempo, evidenciando a liberação do radical NO.

[Figura 45] Espectros de NO pelo SLC em contato com o ar .

A Figura 46 mostra a caracterização da liberação de óxido nítrico (NO) pelo SLC através da medida da amplitude do sinal de EPR dos SLC expostos ao ar. Como mostrado graficamente o SLC age como um liberador de óxido nítrico e a sua liberação é gradativa em contato com ar.

[Figura 46] Curva de liberação de NO pelo SLC exposto ao ar. A curva foi ajustada pelo modelo $Y = a.e^{bt}$

Ajustando-se os valores experimentais com uma função exponencial: $Y = a.e^{bt}$ obtivemos os seguintes parâmetros: $a = 1,01 \pm 0,02$ e $b = -0,0091 \pm 0,0005$

4.9.3 Estudo da Liberação de NO pela membrana em solução aquosa

De forma análoga ao seção anterior (4.9.2), para simularmos a liberação de NO em um ambiente *in vivo*, os SLC de NO foram colocados em 200 mL de solução aquosa 0,05% de azida de sódio (antifúngica). Utilizamos um pequeno alfinete no SLC com o propósito deste ficar completamente imerso na água.

Em vários intervalos de tempo, o SLC de NO era retirado da solução, devidamente seco, e então se media a sua quantidade de NO como no experimento anterior. Na Figura 47 ilustramos alguns dos espectros do SLC registrado em diferentes intervalos de liberação em solução aquosa. A seta na Figura 47 mostra o decaimento da

intensidade do sinal (pico a pico) com o passar do tempo evidenciando a liberação da molécula de NO. Note que para solução aquosa, a amplitude pico a pico da membrana de látex-FEETC deixado por 3 horas (curva verde) é maior do que para a membrana deixada por 98 horas (curva preta).

[Figura 47] Espectros do SLC de NO em meio aquoso

A Figura 48 mostra a caracterização da liberação de óxido nítrico (NO) pelo SLC através da medida da amplitude do sinal de EPR dos SLC imersos em solução aquosa.

[Figura 48] Curva de liberação de NO pelo SLC em solução aquosa. A curva foi ajustada pelo modelo $Y = a.e^{bt}$.

Ajustando-se os valores experimentais com uma função exponencial: $Y = a.e^{bt}$, obtivemos os seguintes parâmetros: $a = 0,77 \pm 0,02$ e $b = -0,026 \pm 0,002$. Através das constantes de decaimento e como observado no gráfico da Figura 48 pode-se notar que a liberação do radical NO em meio aquoso é diferente do que encontramos com o filme no ar.

O modelo da equação $Y = a.e^{bt}$ apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais (menor valor de χ^2). Nesta expressão “t” refere-se ao tempo de liberação de óxido nítrico em horas, a e b são constantes determinadas pelo ajuste.

A tabela a seguir resume os valores encontrados do parâmetro a e b para cada curva estão dispostos na Tabela 7.

[Tabela 7] Parâmetros obtidos pelo ajuste das curvas de liberação

Parâmetro	Água	Ar
χ^2	0,00151	0,00251
R(Coeficiente de correlação)	0,8528	0,98299
a	$0,77 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,02$
b	$-0,026 \pm 0,002$	$-0,0091 \pm 0,0005$

Em resumo, observe-se que o SLC proposta libera NO gradativamente (Figura 49). Como já mencionado, um sistema de liberação controlada deve liberar fármacos por um tempo prolongado e dose apropriada.

[Figura 49] Comparação das curvas de liberação no ar e na água

Segundo Herculano *et al* [85-87], o látex natural é uma excelente matriz sólida para a confecção de sensor de Óxido Nítrico (NO). Uma das perspectivas deste trabalho é a confecção de um novo tipo de “band-aid” (Figura 50) contendo látex e FeDETC, que ao ser exposto em meio contendo NO (por exemplo, pele) reage com o aprisionamento do mesmo, e o sinal característico do sensor é alterado conforme a quantidade da amostra em questão.

[Figura 50] Etapas na aplicação do SLC de NO na pele.

Entretanto, existem pessoas que não produzem quantidade adequada de Óxido Nítrico (NO). Pensando nisto, um novo Sistema de Liberação controlada (SLC) empregando o látex natural como matriz foi desenvolvido para a liberação de NO. Observe-se que a liberação da molécula de NO é gradativa e que sua liberação é mais rápida em solução aquosa do que em contato do ar (Figura 49). Isto se deve ao fato que as moléculas de água são absorvidas pelo SLC fazendo que a membrana fique túrgida liberando o radical NO mais facilmente do que se a membrana estivesse no ar. A liberação do NO pela membrana em solução aquosa ocorre por até 180 horas. Por ser mais lenta (menor taxa), a liberação do NO em contato com ar ocorre por até 350 horas. A partir destes resultados conclui-se que este nova membrana látex-FeDETC pode ser usado como um inovador sistema de liberação controlada de NO.

Capítulo V

CONCLUSÕES

5.1 CONCLUSÕES

Um novo sistema liberação controlada (SLC) de fármaco utilizando o látex natural (NRL) como matriz foi desenvolvido. O látex foi escolhido como matriz devido a sua excelente biocompatibilidade aliado a boa resistência mecânica e fácil manuseio. Para modelo de droga a ser liberada, utilizamos a albumina de soro bovina (BSA), o metronidazol (MTZ) e o óxido nítrico (NO). A taxa de liberação destes fármacos foi controlada variando a temperatura de polimerização da matriz de látex. Foi mostrado que a temperatura de polimerização determina a morfologia da superfície, produzindo e controlando a densidade de poros.

Em relação à liberação da BSA pelo SLC, observamos que os tipos de cadeias que são organizadas durante a polimerização é o fator predominante para a liberação de BSA. Entre os três tipos de temperatura de polimerização estudada, SLC polimerizado a temperatura ambiente (RT) liberou 68,4% da BSA contida em 400 horas, ou seja, com uma taxa de liberação lenta.

Já em relação ao metronidazol (MTZ), observamos que o tipo (forma) de cadeias não tem influencia na taxa de liberação do fármaco. Observamos que a densidade e tamanho de poros é o fator principal para a liberação do MTZ. Também constatamos que para que haja uma liberação mais gradativa do MTZ é necessário diminuir a dimensão e a densidade de poros do SLC. É possível que o SLC polimerizado a -100°C libere o MTZ por até 15 dias (360 horas).

Sobre a liberação de óxido nítrico (NO), observamos que este SLC possui características interessantes para aplicações na espectroscopia de EPR, como excelente estabilidade e boa sensibilidade. Foi estudado o efeito da liberação do NO em solução aquosa e no ar. Notamos que a liberação do NO na água é mais rápida. Uma hipótese

para isto é que a difusão do NO na água é maior, pois o SLC absorve água fazendo com que a membrana fique túrgida e então libere o radical NO mais facilmente do que se a membrana estivesse no ar. A liberação do NO pela membrana em solução aquosa ocorre por até 180 horas. Possuindo essas características pretende-se futuramente aplicar estas membranas em testes *in vivo* para averiguar o estímulo da regeneração óssea através do radical NO e diminuir o processo inflamatórios nos testes *in vivo*.

Capítulo VI

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- [1] Schenk RK. Biology of fracture repair. In: Browner BD, editor. *Skeletal trauma: basic science, management and reconstruction*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2003; **2**: pp. 29-73.
- [2] Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994; **9**(1): pp. 13-29
- [3] Ereno C. Estudo da regeneração óssea guiada pela membrana de látex. (Dissertação de Mestrado em Biologia Oral), Universidade Sagrado Coração, Bauru/SP, 2007.
- [4] Erk N, Altun ML. Spectrophotometric resolution of metronidazole and miconazole nitrate in ovules using ratio spectra derivative spectrophotometry and RP-LC *J Pharm Biomed Anal*. 2001; **1**: pp. 115-122
- [5] Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM. Identification of transforming growth factor β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990, 87:9843.
- [6] Herculano RD, Silva CP, Ereno C, Catanzaro-Guimarães SA, Kinoshita, Graeff CFO. Development latex film for use as occlusive membrane in bone guide regeneration. In EUROMAT 2007, Nuremberg, Germany.
- [7] Alves, MCO. Teste da angiogênese estimulada por membranas de látex natural (Dissertação de Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia, Departamento de Física e Matemática) FFCLRP, USP, 2003.
- [8] Rehman A-ur, Ijaz AS, Raza A. Spectrophotometric determination of metronidazole in pharmaceutical pure and dosage forms using *p*-Benzoquinone. *J. Iran. Chem. Soc*. 2005; **2**(3): pp. 197-202.
- [9] Liu W, Wang Y, Tang J, Shen G, Yu R. An optic-fiber sensor for metronidazole based on the fluorescence quenching of copolymer bound flavone derivative. *Anal Sci*. 1998; **14**: pp. 547-551.
- [10] Leber AP. Overview of isoprene monomer and polyisoprene production processes. [*Chem Biol Interact*](#). 2001; **1**(135-136): pp.169-173.
- [11] Kaplan ML, Bebbington PG, Hartless RL. Natural rubber: chemical modification, *J Polym Sci*. **1973**; 11: pp. 357-361.
- [12] Tanaka Y. Structural characterization of natural polyisoprenes: solve the mystery of natural rubber based on structural study. *Rubber Chem. Technol*. 2001; **74**: pp. 355-375.
- [13] Hasma H, Othman AB and. Fauzi MS. Barrier integrity of punctured gloves: NR superior to vinyl and nitrile. *J. Rubb. Res*. 2003; **6**(4): pp. 231-240.
- [14] The International Rubber Study Group (IRSG). Singapore. Group Web site. Statistics. www.rubberstudy.com. **2008**.
- [15] Loadman MJ, Tidd BK, Saville B, Steer M. Thermal ene addition of monothiobenzil to 2-methylpent-2-(and-1-)-ene. *Chem. Commun*. 1972; **21**: pp. 1167-&.

- [16] Hasma H, Othman AB. "Barrier performance of NR, vinyl and nitrile gloves on puncture". In: *"Latex 2001" Conference*, RAPRA, 4-5, Munich, Germany, December 2001.
- [17] Thomas Hancock Biography (1786-1865). Web site information. www.madehow.com/inventorbios/71/Thomas-Hancock.html. **2008**.
- [18] Rota Brasil Oeste. Brasil responde apenas por 1,3% da produção mundial de borracha. Web site. Estatística. <http://www.brasil Oeste.com.br/noticia/1038/>. **2004**.
- [19] Borracha Natural Brasileira. Estatística. Web site. www.borrachanatural.agr.br. **2009**.
- [20] Cyr DR. Natural Rubber. In: *Encyclopedia of chemical technology*. Kirk-Othner, 1991; **20**: pp. 468-491.
- [21] Brydson JA. Natural Rubber. In: *Rubbery materials and their compounds*. Elsevier, London, 1988; **Chapter 4**: pp. 70-98.
- [22] Cornish K, Siler DJ. Alternative natural rubber. *Chemtech*. 1998; **26**: pp. 38-44.
- [23] Baker CSL, Fulton WS. In: *Encyclopedia of chemical technology*. Krowschitz J, Howe-Grant M (editors). John Wiley, New York, 1997; **21**: pp. 562-591.
- [24] Alvarenga AP, Carmo CAFS. *Implantação e condução do seringal*. In: Alvarenga AP; Carmo CAFS (editores). *Seringueira*. 1 ed. Visconde do Rio Branco: Suprema Grafica e Editora Ltda, 2008; **1**: pp. 311-315.
- [25] Bernardes MS. *Cultura da seringueira no Estado de São Paulo e perspectivas para a produção de mudas*. In: Medrado, M.J.S. (Editor.). *Formação de mudas e plantio de seringueira*. Piracicaba: ESALQ/Departamento de Agricultura, 1992; **1**: pp. 1-8.
- [26] Alvarenga AP, Carmo CAFS. *Seringueira (Hevea spp.)*. In: Paula-Jr TJ, Venzon M. (Editores). *101 Culturas Manuais de Tecnologias Agrícolas*. Belo Horizonte: EPAMIG, 2007, **1**: pp. 691-698.
- [27] Blackley DC. *Polymers Latices*. Chapman & Hall. Glasgow, 1997; **2**.
- [28] Morceli P. Borracha Natural. Situação atual e perspectivas. Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. 2003.
- [29] Gameiro AH. Importação e produção de borracha natural no Brasil. Período de 1992 a 2002. www.cepea.esalq.usp.br. 2003.
- [30] Bernardes MS. Uma comédia de erros: a borracha natural no Brasil - IV. *Preços Agrícolas*. 1999; **153**: pp. 10-11.
- [31] Gazeley KF, Gorton ADT, Pendle TD. *Natural rubber science and technology*. 2ed. Oxford University Press. Cap3: Latex concentrates: properties and composition. 1990, **1**: pp. 68-69.
- [32] Subramanian A. The chemistry of natural rubber latex. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 1995; **15**: pp. 1-20.
- [33] Tanaka Y, Sakdapipanich JT. Chemical structure and occurrence of natural polyisoprenes. In: Koyama T, Steinbüchel A (editors), *Biopolymers, Polyisoprenoids*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2001; **2**: pp.1-25.

- [34] Sato S, Honda Y, Kuwahara M, Watanabe T. Degradation of vulcanized and nonvulcanized polyisoprene rubbers by lipid peroxidation catalyzed by oxidative enzymes and transition metals. *Biomacromolecules*. 2003; 4: pp. 321-329
- [35] Seal KJ, Morton LHG. Chemical materials. *Biotechnology*. 1986; **8**: pp. 583-606.
- [36] Spence D, van Niel CB. Bacterial decomposition of the rubber in Hevea latex. *Ind. Eng. Chem*. 1936; **28**: pp. 847-850.
- [37] Henon JM, Nicolas D. Relation between anatomical characteristics of the laticiferous system and latex yield. Search for early selection criteria. In: D'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H (editors). *Physiology of the rubber tree latex*. Boca Raton: CRC Press, 1989. pp. 3-14.
- [38] Mrué F, Coutinho-Netto J, Ceneviva R, Lachat JJ, Thomazini JA, Tambelini H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Mater. Res*. 2004; **7(2)**: 277-283.
- [39] Sader SL, Coutinho Netto J, Barbieri Neto J, Mazzetto S A, Alves Jr. P, Vanni JC, Sader AA. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2000; **15(4)**: pp.338-344.
- [40] Alves MCO, Neves-Jr WFP, Pelegrina MG, Mulato M, Graeff CFO, Netto JC, Bernardes MS. *Látex natural da Hevea Brasiliensis: Um biomaterial de múltiplas Aplicações*. In: VIII Congresso Brasileiro de Física Médica, Porto Alegre/RS. 2003.
- [41] Pinho ECCM, Sousa SJF, Schaud F, Lachat JJ. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. *Arq Bras Oftalmol*. 2004; **67(1)**: 27-32.
- [42] Rabelo RE, Paulo NM, Silva LAF, Silva OC. Emprego do compósito látex, poliamida e polilisina a 0.1% na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2005; **33(2)**: pp. 169-175.
- [43] Balabanian CACA, Coutinho-Netto J, Lamano-Carvalho TL, Suzie A. Lacerda AS, Brentegani LG. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. *Journal of Oral Science*. 2006; **48(4)**: pp. 201-205.
- [44] Murray G, Holden R, Roschlau W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg*. 1957; **93(3)**: pp. 385-387.
- [45] Mardas N, Kostopoulos L, Karring T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. *J. Craniofac. Surg*. 2002; **13 (3)**: pp. 453-462
- [46] Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1990; **24(1)**: pp. 13-19
- [47] Dahlin C. Scientific background of guided bone regeneration. In Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editors. *Guided bone regeneration: in implant dentistry*. Chicago: Quintessence, 1994: pp. 31-48.
- [48] Triplett RG, Schow SE, Fields RT. Bone augmentation with and without biodegradable and non-biodegradable microporous membranes. *Oral Maxillofac Clin North Am*. 2001; **13**: pp. 411-422.
- [49] Schmitz JP, Lemke RR, Zardeneta G, Hollinger JO, Milam SB. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a Guidor membrane for

guided bone regeneration: case report. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; **58(8)**: pp. 888-893.

[50] Becker W, Dahlin C, Becker BE, Lekholm U, van Steenberghe D, Higuchi K, Kultje C. The use of ePTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994; **9(1)**: pp. 31-40.

[51] Jovanovic SA, Spiekermann H, Richter EJ. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscence defect sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992; **7(2)**: pp. 233-245.

[52] Simion M, Scarano A, Gionso L, Piattelli A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; **11(6)**: pp. 735-742.

[53] Jovanovic SA, Nevins M. Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1995; **15(1)**: 56-69.

[54] Watzinger F, Luksch J, Millesi W, Schopper C, Neugebauer J, Moser D, Ewers R. Guided bone regeneration with titanium membranes: a clinical study. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000; **38(4)**: pp. 312-315.

[55] Schlegel AK, Mohler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide(R)). *Biomaterials.* 1997; **18(7)**: pp. 535-538.

[56] Fugazzotto PA. The use of demineralized laminar bone sheets in guided bone regeneration procedures: report of three cases. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; **11(2)**: 239-244.

[57] Herculano RD, Silva CP, Ereno C, Catanzaro-Guimarães SA, Kinoshita, Graeff CFO. Natural rubber latex used as drug delivery system in Guided Bone Regeneration (GBR). *Mater. Res.* in press, 2009.

[58] Wang XY, Hu X, Daley A, Rabotyagova O, Cebe P, Kaplan DL. Nanolayer biomaterial coatings of silk fibroin for controlled release. *J Controlled Release.* (2007); **121(3)**: pp. 190-199.

[59] Noelken ME, Timasheff SN. Preferential solvation of bovine serum albumin in aqueous guanidine hydrochloride. *J. Biol. Chem.* 1967; **242(21)**: pp. 5080-5085.

[60] Hamid MA, Iwaku M, Hoshino E. The metabolism of phenylalanine and leucine by a cell suspension of *Eubacterium brachy* and the effects of metronidazole on metabolism. *Arch Oral Biol.* 1994; **39(11)**: pp. 967-972.

[61] Seymour RA, Heasman PA. Pharmacological control of periodontal disease. II. Antimicrobial agents. *J Dent.* 1995; **23(1)**: pp. 5-14.

[62] Nagasaki, S, Herculano RD, Graeff CFO, Tanus-Santos JE. eNOS T-786C polymorphism affects atorvastatin-induced changes in erythrocyte membrane fluidity. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* in press, 2009.

[63] Metger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagasaki S, Desta Z, Flockhart DA, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet. Genomics.* 2005; **15(8)**: pp. 565-570.

- [64] Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics*. 2001; **11**: pp. 719–725.
- [65] Celermajer DS. Reliable endothelial function testing at our fingertips?. *Circulation*. 2008; **117(19)**: pp. 2428-2430.
- [66] Zhu Y, Huizinga JD. Nitric oxide decreases the excitability of interstitial cells of Cajal through activation of the BK channel. *J. Cell. Mol. Med.* **12(5A)**: pp. 1718-1727.
- [67] Nagasaki S, Metger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Uzuelli JA, Tanus-Santos JE. eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in a health male population. *Thromb. Res.* 2004; **115(5)**: pp. 375-379.
- [68] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; **288(5789)**: pp. 373- 376.
- [69] Palmer PMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nature. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (London)*. 1987; **327** pp. 524–526
- [70] Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1990; **30**: pp. 535–560.
- [71] Koshland Jr DE. "Editorial-The Molecule of the Year". *Science*. 1992; **258(5090)**: pp. 1861-1861.
- [72] Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*. 1993; **7**: pp. 349-360.
- [73] Kiechle FL, Marlinski T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. *Am. J. Clin. Pathol.* 1993; **100**: pp. 567-575.
- [74] Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992; **6(12)**: pp. 3051–3064
- [75] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; **43(2)**: pp. 109–142.
- [76] Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Med Assoc*. 1996; **209**: pp. 1297-1302.
- [77] Wennmalm A. Endotelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J Int Med*. 1994; **235**: pp. 317-327.
- [78] Farrel AJ, Blake DR. Nitric oxide (review). *Ann Rheum Dis*. 1996; **55**: pp. 7-20.
- [79] Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg*. 1995; **82**: pp. 1598-1610.
- [80] Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg*. 1995; **221**: pp. 220-235.
- [81] Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 1912; **12 (2)**: pp. 239-243.
- [82] Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* 1927; **73 (2)**: pp. 627-650.

- [83] Hauduroy P. Lyophilization; a promising technique. *Presse Med.* 1950; **58** (80):pp.1397-1398
- [84] Hauduroy P, Tanner F. The lyophilization of Bacterian antigens for the sero-diagnosis of brucellosis. *Experientia.* 1952; **8** (12): pp. 464-465
- [85] Herculano RD, Brunello CA, Graeff CFO. Optimization of a novel Nitric Oxide Sensor using a latex rubber matrix. *J. Appl. Sci.* 2007; **7**(23): pp. 3801-3805.
- [86] Herculano RD. Sensor sólido de Óxido Nítrico utilizando látex como matriz. (Dissertação de Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia, Departamento de Física e Matemática) FFCLRP, USP, 2005.
- [87] Herculano RD, Brunello CA, Graeff CFO. Solid state Nitric Oxide sensor using a latex rubber matrix. *Macromol. Symp.* 2006; **245-246**: pp. 529-532.
- [88] de Oliveira LCS, de Arruda EJ, Favaro SP, da Costa RB, Gonçalves PS, Job AE. Evaluation of thermal behavior of latex membranes from genetically improved rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Thermochimica Acta.* 2006; **445**(1): pp. 27-31
- [89] Whiston, C. X-ray Methods. Published John Wiley and Sons Ltd: May 1987, 448 pp.
- [90] Duke PJ, Michette AG. Modern Microscopies: Techniques and Applications. Publisher: Springer-Verlag New York, LLC. Plenum Press: January 1989, 266 pp.
- [91] Lloyd DR, Kinzer KE, Tseng HS. Microporous membrane formation via thermally induced phase separation. I. Solid-liquid phase separation. *J. Membr. Sci.* 1990; **52** (3): pp.239-261.
- [92] Lloyd DR, Kim SS, Kinzer KE. Microporous membrane formation via thermally-induced phase separation. II. Liquid—liquid phase separation. *J. Membr. Sci.* 1991; **64** (1-2): pp. 1-11.
- [93] Matsuyama H, Hayashi K, Maki T, Teramoto M, Kubota N. Effect of polymer density on polyethylene hollow fiber membrane formation via thermally induced phase separation. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004; **93**(1): pp.471-474.
- [94] Yave W, Quijada R, Serafini D, Lloyd DR. Effect of the polypropylene type on polymer–diluent phase diagrams and membrane structure in membranes formed via the TIPS process: Part II. Syndiotactic and isotactic polypropylenes produced using metallocene catalysts. *J. Memb. Sci.* 2005; **263**(1-2): pp. 154-159.
- [95] Santos TC, Neves-Jr WFP, Coutinho-Netto J, Bernardes MS, Graeff CFO, Ferreira M, Mulato M. Natural Rubber Biomaterial: Studies on Fabrication of Porous Membranes and Vascular Prosthesis. In: 5th International Symposium on Natural Polymers and Composites and 8th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and other Wood Components. São Pedro, Brazil. 2004, **1**: pp. 281-283.
- [96] Neves-Junior WFP, Ferreira M, Alves MCO, Graeff CFO, Bernardes MS, Coutinho-Netto J, Mulato M. Influence of fabrication process on the final properties of natural-rubber latex tubes for vascular prosthesis. *Braz. J. Phys.* 2006; **36**(2B): 586-591.
- [97] Woo BH, Fink BF, Page R, Schrier JA, Woo Jo Y, Jiang G, DeLuca M, Vasconez HC, DeLuca PP. Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm. Res.* 2001; **18**(12): pp. 1747-1753.

[98] Mukhtar MD, Oyeyi TI, Ameh, JB. Industries formulating oral antimicrobial suspensions in Nigeria. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2009; **3(1)**: pp. 31-36

APÊNDICE A

Neste Apêndice A, alguns conceitos como: tecido ósseo, regeneração óssea guiada (ROG) e tipos de membranas serão discutidos a fundo.

TECIDO ÓSSEO

Dentre os tecidos altamente organizados, o osso tem o potencial de reconstruir sua estrutura original. Em condições estáveis, é necessário que o osso mantenha de forma adequada o suprimento sanguíneo e a base sólida para deposição óssea [A1, A2].

O osso é constituído, basicamente, de uma matriz orgânica colagênica (colágeno tipo I), contendo proteoglicanas de baixa massa molecular e proteínas não colágenas, que correspondem a 25% de seu peso, uma parte mineral (principalmente hidroxiapatita) correspondente a 65% e água (10%).

Sua função geral está relacionada com a constituição do esqueleto, sustentação e fixação dos músculos e depósito para íons de cálcio para manutenção da calcemia [A1]. Macroscopicamente há duas formas de osso: cortical (compacto) e esponjoso (medular). No osso compacto, a matriz de colágeno está organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central, constituindo o sistema de Harvers. Os canais centrais contendo nervos e vasos sanguíneos se comunicam entre si e com a cavidade medular óssea através dos canais de Volkmann. Já o osso esponjoso apresenta uma matriz mais porosa, organizada em trabéculas. As diferenças entre osso cortical e esponjoso não são apenas estruturais, mas também funcionais. Assim, o osso cortical dá resistência e proteção, enquanto que o esponjoso atua nas funções metabólicas. O osso cortical ou compacto é encontrado na diáfise de ossos longos e na superfície externas de ossos chatos. O osso esponjoso ou medular delimita espaços

intertrabeculares que são preenchidos por medula óssea vermelha, onde há produção ativa de células sanguíneas a partir de células mesenquimais, ou, com o envelhecimento, por medula óssea amarela, um sítio de reserva de gordura. A Figura A1 mostra a estrutura do tecido ósseo.

Protegendo externamente o osso existe uma fina camada de tecido conjuntivo com grande potencial osteogênico, denominado perióstio, e um tecido equivalente, o endóstio, que recobre as superfícies internas dos ossos.

[Figura A1] Estrutura do tecido ósseo.

Histologicamente existem quatro tipos de tecido ósseo:

1. o trabeculado ou entrelaçado,
2. o composto,
3. o lamelar
4. e o fasciculado.

O osso trabeculado desempenha importante papel durante o reparo ósseo, sendo o primeiro tecido ósseo a ser formado. Caracteriza-se por uma velocidade de formação muito rápida (30-50 μm ao dia ou mais), por ter uma matriz de colágeno desorganizada

sem a estrutura lamelar dos sistemas harvesianos e por ser frágil, exibindo pouca resistência biomecânica. É o tecido ósseo predominante durante o desenvolvimento neonatal, por isso é referido como "osso embrionário", um termo incorreto, visto que todos os adultos têm habilidade de formar este tipo de osso. Também é o tecido que caracteriza a primeira fase da regeneração óssea, e apesar de formar-se muito rapidamente, é reabsorvido e substituído pelo osso lamelar.

Ossos lamelares são os ossos maduros, com alta resistência mecânica. Caracteriza-se por formar-se bem devagar, a uma velocidade de 0,6 μm por dia e por ter uma estrutura altamente organizada de fibras colágenas e cristais de minerais.

O termo "**tecido ósseo composto**" é usado para descrever o estágio de transição entre o osso trabeculado ao osso lamelar, durante a fase de remodelação.

O **osso fasciculado** é o osso encontrado na zona de inserção de ligamentos das articulações.

Quanto às células presentes no tecido ósseo, temos:

1-Osteoblastos: células cubóides organizadas em uma camada contínua sobre o osteóide, ou seja, camada não mineralizada de matriz, que recobre a superfície óssea mineralizada. Estas células são responsáveis pela osteogênese, isto é, pela síntese e secreção da maturação e mineralização. O osteoblasto além de sintetizar e secretar o colágeno tipo I, que corresponde a 90% da matriz orgânica, também produz as outras proteínas não colagênicas encontradas na matriz, como: sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, BMPs, proteoglicanas e outras. Os osteoblastos se diferenciam a partir de células mesenquimais indiferenciadas, e a sua diferenciação em osteoblastos depende de estímulos externos, fatores de crescimento, hormônios e interações celulares.

2- Osteócitos: são osteoblastos incorporados a matriz óssea mineralizada, durante a osteogênese. Apresentam longas projeções citoplasmáticas que delimitam canalículos intercomunicantes constituindo uma rede de comunicação entre as células e a superfície óssea.

3- Osteoclastos: são grandes multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares. Quando ativo é polarizado, como parte da membrana envolvida na reabsorção fortemente aderida à superfície óssea e que delimita a zona reabsorvente da célula, denominada "borda em escova" ou "borda franjada". Com o início da reabsorção aparece uma depressão na superfície óssea junta à borda em escova que é conhecida como lacuna de Howship.

REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA (ROG)

Sabe-se, por exemplo, que ao ser lesionado um tecido, imediatamente se inicia o processo de cicatrização, porém o mecanismo que o controla, como substâncias ou estímulos, nos é, ainda em grande parte desconhecido [A3]. Busca-se de maneira geral uma forma de controlar a regeneração prolongando-se a vida e a sua qualidade.

A partir dessas descobertas, desenvolveu-se a técnica da regeneração óssea guiada (ROG), que consiste na colocação de uma barreira oclusiva (membrana) de modo a formar um espaço entre a membrana e a superfície radicular no qual células do ligamento periodontal possam repovoar. Ao mesmo tempo, essa membrana deve impedir que o tecido conjuntivo e o epitélio gengival entrem em contato com a superfície radicular, permitindo, assim, a regeneração do periodonto de inserção, que pode ser observada na Figura A2.

[Figura A2] Barreira oclusiva impede a entrada dos fibroblastos no osso.

Os materiais disponíveis para o tratamento de defeitos ósseos devido a doenças periodontais, ressecção cirúrgica, traumas, regeneração de tecido ósseo, ancoramento para implantes dentais, ou reparo e regeneração da dentina e tecidos periodontais são limitados [A4, A5].

Com essas descobertas, o horizonte de possibilidades de resoluções de seqüelas dos tratamentos periodontais se abriu. A regeneração óssea guiada (ROG) foi amplamente explorada para tratar vários tipos de defeitos periodontais (Figura A3).

[Figura A3] Tratamento periodontal utilizando técnica ROG.

MEMBRANAS ABSORVÍVEIS X NÃO-ABSORVÍVEIS

As membranas devem possuir alguns requisitos indispensáveis para agir como barreira física passiva: biocompatibilidade, propriedades oclusivas, capacidade de criação de espaço, integração tecidual e clinicamente manuseável [A6]. Além disso, as membranas devem promover regeneração óssea de forma previsível, sem a presença de efeitos colaterais. Estas barreiras também devem ser de fácil manipulação, custo acessível e de sucesso previsível [A7].

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com algumas de suas propriedades, e divididos em: osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores.

1- Osteogênicos: são os materiais orgânicos capazes de estimular diretamente os osteoblastos a formar osso.

2- Osteoindutores: são materiais capazes de induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, aumento o crescimento ósseo ou, até mesmo, formando osso ectópico.

3- Osteocondutores: (geralmente inorgânicos, materiais desproteinizados) favorecem a migração, proliferação e maturação das células progenitoras, além de conduzirem a aposição do novo osso em sua superfície a partir de tecido ósseo preexistente nas bordas da lesão.

Mudanças tecnológicas na produção dos biomateriais e na obtenção dos substitutos ósseos são responsáveis por conferir a estes materiais características de osteoindução, osteocondução ou osteogêneses, e estes fatores são o grande foco atual da bioengenharia.

Barreiras Não absorvíveis

As primeiras membranas para Regeneração Óssea Guiada (ROG) foram as não-absorvíveis. Elas requeriam uma cirurgia subsequente para removê-las, e eram, freqüentemente, associadas à exposição, que, conseqüentemente, arriscava o sucesso clínico [A8].

Atualmente, o material de membrana mais pesquisado e utilizado em procedimentos de ROG é constituído por uma estrutura especificamente formada por politetrafluoretileno expandido (e-PTFE). A molécula fluorcarbono, politetrafluoretileno (base química componente do ePTFE), não pode ser quebrada quimicamente, em condições fisiológicas. Além disso, a segurança do ePTFE foi estabelecida por extensos testes de biocompatibilidade, longa história de segurança e uso efetivo em próteses vasculares e de tecidos moles [A6].

Apesar da alta previsibilidade de regeneração óssea com a utilização de membranas de e-PTFE, a principal desvantagem desta membrana é que a sua exposição pode causar contaminação bacteriana. A reação inflamatória da área pode levar à necessidade de remoção precoce da membrana [A9]. Vários autores têm relatado uma redução na quantidade de osso regenerado nessas situações [A9-A11].

Observando a criação de espaço como pré-requisito de uma barreira para ROG, membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), reforçadas com malhas de titânio, foram usadas para tratamento de defeitos ósseos associados a implantes. Essas membranas foram investigadas, para avaliar a sua capacidade de manter um espaço protegido entre a membrana e a superfície óssea, sem a adição de artifícios de suporte. A membrana mostrou ser de fácil manipulação, providenciou o desenvolvimento de excelente espaço, sem mostrar nenhuma reação adversa ao tecido mole ou duro [A10-12].

Com o mesmo objetivo, foi desenvolvida uma membrana de titânio microperfurada, que tem sido usada desde 1995. Estas membranas se apresentam na forma triangular ou oval. Suas propriedades mecânicas previnem o colapso, mantendo um espaço adequado para a regeneração óssea na área operada. As perfurações existentes permitem a difusão de fluido intersticial, porém proíbem a invasão de células do tecido conjuntivo e epitelial. Essas membranas necessitam ser pré-moldadas ao defeito e fixadas com pinos de titânio à superfície óssea da área [A13].

Barreiras Reabsorvíveis

No intuito de eliminar a necessidade de um segundo tempo cirúrgico para a remoção da membrana não-absorvível, tem sido intensa a investigação para desenvolvimento de membranas reabsorvíveis [A7].

O conceito de material absorvível envolve alguns importantes aspectos. Primeiro, o material deve sofrer reabsorção e degradação macromolecular através da associação de hidrólise e degradação enzimática por enzimas, tais como a fosfatase ácida e a collagenase. Segundo, a bioreabsorção requer total eliminação dos produtos da degradação sem efeitos residuais locais [A7].

Mais recentemente, uma nova geração de membranas biodegradáveis tem surgido. Estas incluem as membranas de colágeno, as constituídas de copolímero de polilático e poliglicólico e as de ácido polilático [A8].

Os materiais poliméricos sintéticos mais comuns, propostos para uso, como membranas para ROG (ácidos polilático (PLA) e poliglicólico (PGA)), degradam-se pelo processo de hidrólise, com o produto final sendo substâncias químicas comuns para os processos metabólicos normais. Contudo, durante o processo de degradação hidrolítica, estes materiais perdem a integridade mecânica e quebram-se em fragmentos.

A natureza física e a quantidade destes fragmentos podem ter um efeito significativo na resposta tecidual local, podendo conduzir a uma reabsorção óssea [A6].

Quando as membranas de PLA/PGA são implantadas nos tecidos, a reabsorção geralmente tem seu início depois de 4 a 6 semanas e se completa depois de aproximadamente 8 meses [A11].

Uma outra barreira foi desenvolvida a partir de um polímero de ácido láctico dissolvido em veículo biocompatível (N-metil-2-pirrolidona), apresentando-se como um fluido que se transforma em uma estrutura sólida em contato com água ou outra solução aquosa, ou seja, uma barreira adaptável e parcialmente endurecida formada extra-oralmente. Esta barreira tem a propriedade de continuar a se solidificar *in situ* e, subseqüentemente, reabsorvida via hidrólise [A14-A15].

As membranas derivadas de colágeno são constituídas de puro colágeno suíno tipo I e tipo III, extraído de porcos com certificado veterinário de cautelosa purificação do animal (para prevenir respostas antigênicas do paciente), sendo realizada por radiação gama. Ela consiste de uma superfície porosa, que deve ser posicionada adjacente ao osso, para permitir a invasão de osteoblastos e uma superfície lisa que previne a invasão de tecido fibroso para o interior do defeito ósseo, devendo ficar adjacente ao retalho. A membrana é reabsorvida em 24 semanas, de acordo com estudos realizados em animais [A16].

Fontana *et al* (1994) [A17] estudaram o uso de uma membrana de dura-máter congelada e liofilizada em conjunto com implantes e observaram que, em todos os casos, havia uma deposição óssea sobre os implantes.

Fugazzoto *et al* (1996) [A18] descreveu a utilização de lâminas ósseas desmineralizadas como membranas para promover regeneração óssea guiada ao redor de implantes. O material pareceu ser clinicamente capaz de promover ROG. Porém, a

taxa de reabsorção das lâminas ósseas desmineralizadas na cavidade bucal ainda é desconhecida, não se sabendo se a presença ou ausência de fechamento primário altera o tempo de reabsorção desse material. O tempo de reabsorção parece variar mesmo quando obtido o fechamento primário da ferida.

REFERÊNCIAS

- [A1] Dempster, D.W. New concepts in bone remodeling. In: M.J. Seibel, S.P. Robins, and J.P. Bilezikian, editors. *Dynamics of bone and cartilage metabolism: principles and clinical applications*. Academic Press. San Diego, California, USA. 1999, pp. 261–273.
- [A2] Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent*. 1998; 7(4): pp. 267-276.
- [A3] Kenley RA, Yim K, Abrams J, Ron E, Turek T, Marden LJ, Hollinger JO. Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharm Res*. 1993; **10**: pp. 1393-1401.
- [A4] Catanzaro-Guimarães. Possibility to reinforce bone repair with decalcified dentin matrix. *Jahrbuch Fur Orale Implatologie*, Berlin, Quintessence Verlags – GmbH. 1993; pp. 33-34.
- [A5] Sandberg E, Dahlin C, Linde A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 1993; **51(10)**: pp. 1106-1114.
- [A6] Dahlin C. Scientific background of guided bone regeneration. In Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editors. *Guided bone regeneration: in implant dentistry*. Chicago: Quintessence, 1994: pp. 31-48.
- [A7] Triplett RG, Schow SE, Fields RT. Bone augmentation with and without biodegradable and non-biodegradable microporous membranes. *Oral Maxillofac Clin North Am*. 2001; **13**: pp. 411-422.
- [A8] Schmitz JP, Lemke RR, Zardeneta G, Hollinger JO, Milam SB. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a Guidor membrane for guided bone regeneration: case report. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000; **58(8)**: pp. 888-893.
- [A9] Becker W, Dahlin C, Becker BE, Lekholm U, van Steenberghe D, Higuchi K, Kultje C. The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994; **9(1)**: pp. 31-40.
- [A10] Jovanovic SA, Spiekermann H, Richter EJ. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscence defect sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992; **7(2)**: pp. 233-245.

- [A11] Simion M, Scarano A, Gionso L, Piattelli A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996; **11(6)**: pp. 735-742.
- [A12] Jovanovic SA, Nevins M. Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1995; **15(1)**: 56-69.
- [A13] Watzinger F, Luksch J, Millesi W, Schopper C, Neugebauer J, Moser D, Ewers R. Guided bone regeneration with titanium membranes: a clinical study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000; **38(4)**: pp. 312-315.
- [A14] Polson AM, Garrett S, Stoller NH, Greenstein G, Polson AP, Harrold CQ, Laster L. Guided tissue regeneration in human furcation defects after using a biodegradable barrier: a multi-center feasibility study. *J Periodontol*. 1995; **66(5)**: pp. 377-385.
- [A15] S. Garrett. Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann. Periodontol*. 1996; **1**: 621-666.
- [A16] Schlegel AK, Mohler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide(R)). *Biomaterials*. 1997; **18(7)**: pp. 535-538.
- [A19] Fontana E, Trisi P, Piattelli A. Freeze-dried dura mater for guided tissue regeneration in post-extraction dental implants: a clinical and histologic study. *J Periodontol*. 1994; **65(7)**: pp. 658-665.
- [A20] Fugazzotto PA. The use of demineralized laminar bone sheets in guided bone regeneration procedures: report of three cases. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996; **11(2)**: 239-244.

APÊNDICE B

BIOCOMPATIBILIDADE DA MEMBRANA DE LATEX NATURAL

REGENERAÇÃO ÓSSEA DA TÍBIA DE COELHOS

Em colaboração com a Universidade do Sagrado Coração (USC), foram realizados testes *in vivo* mostrando a biocompatibilidade da membrana de látex puro preparado a RT e processo de polimerização em estufa UV por 4 dias e da membrana adicionada ao complexo FeDETC. Após a confecção, as mesmas foram esterilizadas em óxido etileno no HC-FMRP-USP.

A cirurgia consistiu em implantar a membrana de NRL sobre uma fratura de 5 mm de diâmetro em tíbia de coelho. Para tal procedimento, o animal foi devidamente anestesiado com 15mL de anestésico Dopalen injetável e 1,5 mL de relaxante muscular Pompun. A incisão foi realizada através de uma lâmina de bisturi N° 15 no tecido mole da tíbia. Os tecidos moles deslocados com cuidado, inclusive o periósteo. Em seguida um defeito ósseo de 5 mm de diâmetro foi fabricado, com uma broca trefina com este mesmo diâmetro, sempre irrigando com soro fisiológico durante os procedimentos (Figura B1). Depois a membrana de látex era adaptada sobre o defeito e suturada o retalho com fio de seda 4.0. Após 15 dias, o animal foi sacrificado e o material ósseo foi coletado, preservado em formol à 10% e demais procedimentos para confecção de lâminas para análise histológica (Figura B2). Este experimento foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da USC.

[Figura B1] Cirurgia para implantar a membrana oclusiva de látex sobre a fratura de tíbia de coelho.

[Figura B2] Fotomicroscopia da região do defeito ósseo da tíbia do coelho, 15 dias após a cirurgia . a-) sem membrana b-) membrana de látex e FeDETC c-) Membrana látex puro. As figuras à esquerda foram pigmentadas com Tricômico e as da direita com Hematoxilina.

REGENERAÇÃO ÓSSEA DA CALVÁRIA DE COELHOS

Membranas de látex natural polimerizada a temperatura ambiente (RT) foram utilizadas no trabalho de dissertação de mestrado de Cibele Ereno da Universidade Sagrado Coração-USC, Bauru [B1], as membranas de látex natural (NRL) produzidas neste trabalho foram testadas para a regeneração óssea guiada [B2-B7]. Para isto, vinte e quatro coelhos foram divididos em 2 grupos: grupo experimental e grupo controle. No grupo experimental, foram utilizadas membranas de látex natural dispostas no assoalho e na superfície do defeito. No grupo controle, os defeitos não foram recobertos por membranas, sendo preenchidos somente por coágulo sanguíneo autólogo. Em todos os animais foi criado cirurgicamente um defeito ósseo de tamanho crítico (2cm x 1cm) nos ossos parietais do crânio.

O defeito ósseo foi criado na calvária do coelho, com uma broca trefina de 1cm de diâmetro, acionado por um micromotor cirúrgico de baixa rotação e abundante irrigação com solução salina, para prevenir o aquecimento local (Figura B3.a). Realizaram-se duas perfurações com a trefina, tendo como parâmetro a sutura sagital mediana, que simbolizava o fim da primeira perfuração (Figura B3.b) e o começo da segunda perfuração. Esta medida foi tomada a fim de padronização da localização dos defeitos ósseos. Foram removidos o osso cortical e esponjoso, expondo a membrana meníngea intacta. As bordas dos defeitos foram regularizadas com osteótomo. O defeito ósseo, de forma elíptica, foi na dimensão de 2cm x 1cm (Figura B3.b).

a-)

b-)

[Figura B3] a-) Perfuração com broca trefina de 1cm de diâmetro, sob constante irrigação, b-) egularização do defeito ósseo cirúrgico, com tamanho crítico de 2cm X 1cm

Os animais do grupo experimental receberam duas membranas de látex natural. Uma membrana localizada no assoalho do defeito recobrindo a membrana meninge, e a segunda membrana recobrindo a superfície do defeito (Figuras B4.a e B5) O espaço entre as duas membranas foi preenchido por coágulo sanguíneo autólogo. As membranas foram recortadas minutos antes de sua utilização, conforme descrito anteriormente. Os animais do grupo controle tiveram seus defeitos ósseos preenchidos apenas com coágulo sanguíneo autólogo, sem o uso de membranas (Figura B4.b).

a-)

b-)

[Figura B4] Desenho esquemático: a-) da localização das membranas de NRL recobrindo o defeito ósseo cirúrgico no grupo experimental, b-) grupo controle.

[Figura B5] a-) Posição da primeira membrana de látex natural sobre a membrana meníngea; b-) Posição da segunda membrana de látex natural recobrindo a superfície do defeito.

A biomembrana de látex natural atuou efetivamente como barreira oclusiva em processos de regeneração óssea guiada, sendo, portanto, considerada um material promissor para futuros estudos em modelos de cicatrização óssea guiada.

BIOCOMPATIBILIDADE DO SLC DE ÓXIDO NÍTRICO

A angiogênese é um importante evento que ocorre durante o reparo tecidual e cicatrização. Ela também é importante no crescimento de tumores e na revascularização de tecidos submetidos à isquemia. Outro processo envolvido neste evento é o aumento da permeabilidade vascular, que permite as diversas citocinas e fatores de crescimento alcançarem o tecido lesado. Como já relatado, o látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* possui atividade angiogênica. O óxido nítrico (NO) auxilia na vascularização e atua em processos inflamatórios. Assim um novo SLC de NO foi desenvolvido para auxiliar na vascularização. Desta forma, testes com esta membrana

incorporada com a molécula de NO foi realizado. A Figura B6 mostra a membranas de NRL+FeDETC: a-) sem NO, b-) com NO; colocadas na membrana cório-alantóide do embrião de galinha [B8]. Observe que não houve nenhum tipo de reação inflamatória tanto com os testes feitos com NO quanto sem NO.

a-)

b-)

[Figura B6] SLC colocado na membrana cório-alantóide: a-) sem NO, b-) com NO.

REFERÊNCIAS

- [B1] Ereno C. Estudo da regeneração óssea guiada pela membrana de látex. (Dissertação de Mestrado em Biologia Oral), Universidade Sagrado Coração, Bauru/SP, 2007.
- [B2] Dempster, D.W. New concepts in bone remodeling. In: M.J. Seibel, S.P. Robins, and J.P. Bilezikian, editors. *Dynamics of bone and cartilage metabolism: principles and clinical applications*. Academic Press. San Diego, California, USA. 1999, pp. 261–273.
- [B3] Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent*. 1998; 7(4): pp. 267-276.
- [B4] Murray G, Holden R, Roschlau W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg*. 1957; **93(3)**: pp. 385-387.
- [B5] Mardas N, Kostopoulos L, Karring T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. *J. Craniofac. Surg*. 2002; **13 (3)**: pp. 453-462
- [B6] Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1990; **24(1)**: pp. 13-19

- [B7] Dahlin C. Scientific background of guided bone regeneration. In Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editors. *Guided bone regeneration: in implant dentistry*. Chicago: Quintessence, 1994: pp. 31-48.
- [B8] Kenley RA, Yim K, Abrams J, Ron E, Turek T, Marden LJ, Hollinger JO. Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharm Res*. 1993; **10**: pp. 1393-1401.
- [B9] Alves, MCO. Teste da angiogênese estimulada por membranas de látex natural. (Dissertação de Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia, Departamento de Física e Matemática) FFCLRP, USP, 2003.

APÊNDICE C

CURRICULUM RESUMIDO

Durante o período do doutorado participei de sete conferências internacionais apresentando trabalhos na forma de pôster e/ou oral. Destacando a participação do EUROMAT 2007, com a apresentação de um trabalho oral e um em pôster na cidade de Nurenberg na Alemanha.

Artigos completos publicados em periódicos

1. HERCULANO RD; SILVA CP, ERENO C, CATANZARO-GUIMARÃES SAC, KINOSHITA A, GRAEFF CFO. Natural rubber latex used as drug delivery system in Guided Bone Regeneration (GBR). *Materials Research*, v. **12** (1), p. xx-xxx, 2009.
2. NAGASSAKI S, HERCULANO RD; GRAEFF CFO, TANUS-SANTOS JE. eNOS T-786C polymorphism affects atorvastatin-induced changes in erythrocyte membrane fluidity. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v.**65**, p. 385-392, 2009.
3. HERCULANO RD; TORRO-ALVES N, TERCARIOL CAS; NORBERTO AMQ, GRAEFF CFO. . Produção científica na FFCLRP-USP: Aplicação do índice de *Hirsch. Medicina (Ribeirão Preto)*, v. **41**(3), p. xx-xxx, 2008.
4. TORRO ALVES N, HERCULANO RD, TERCARIOL CAS, KINOUCI O, GRAEFF CFO. Hirsch's index in a real case study in Brazil, the FFCLRP-USP. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. **40**, p. 1529-1536, 2007.
5. HERCULANO RD, BRUNELLO CA, GRAEFF CFO. Optimization of a novel Nitric Oxide Sensor Using a Latex Rubber Matrix. *Journal of Applied Sciences*, v. **7**(23), p. 3801-3805, 2007.
6. HERCULANO RD, BRUNELLO CA, GRAEFF CFO. Solid State Nitric Oxide Sensor Using a Latex Rubber Matrix. *Macromolecular Symposia*, v. **245**, p. 529-532, 2006.

Artigos completos submetidos em periódicos

1. HERCULANO RD, NORBERTO AMQ. Comparison of scientific bibliographic productivity in undergraduate courses of speech-language and hearing science at Universidade de São Paulo using the Hirsh's index. *Revista CEFAC*., submetido, 2008.

Artigos completos em redação

1. ERENO C, CATANZARO-GUIMARÃES SAC, PASETTO S, HOLDAGO L, HERCULANO RD; SILVA CP, GRAEFF CFO, TAVANO O, KINOSHITA A,

BAFFA O. Latex film as an occlusive membrane for guided bone regeneration (GBR). *Journal Materials Science: Materials in Medicine*, 2009.

2. HERCULANO RD, CATANZARO-GUIMARÃES SAC, KINOSHITA A, GRAEFF CFO. Metronidazole release using natural rubber latex (NRL) as matrix. *Biomedical Materials*, 2009.

Na **plataforma Lattes** pode ser encontrado meu currículo detalhado.

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=K4753316D1>