

Universidade Federal de Itajubá
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Física e Química
Pós-graduação em Materiais para Engenharia

Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol

Laiza Maria Borges Tangerino

Dissertação apresentada como exigência parcial
para obtenção do grau de mestre em Materiais para Engenharia
à Comissão Julgadora da Universidade Federal de Itajubá, sob a
orientação do Prof. Dr. Álvaro Antonio Alencar de Queiroz e
co-orientação da Prof^a. Dr^a. Mariza Grassi

Itajubá, outubro de 2006

Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol

Laiza Maria Borges Tangerino

Banca examinadora:

1º examinador

2º examinador

3º examinador

Itajubá, _____ de _____ de _____

Ao meu marido, Celso Bonfim Junior, pelo amor e dedicação de sempre, pelo incentivo e apoio incondicionais.

Aos meus pais, Maria do Carmo e Nilson Ricardo, pelos ensinamentos e incentivos de toda minha vida.

A minha irmã, Cássia Mara, pelo apoio, carinho e amizade tão imprescindíveis.

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Álvaro Antonio A. de Queiroz, pela orientação, ensinamentos e comprometimento com minha formação científica.

À Dra. Olga Zazuco Higa, do Instituto de Pesquisas Nucleares da Universidade de São Paulo pelos ensaios de citotoxicidade e micrografias MEV.

Ao bioquímico Roberto Mendes, do Laboratório Clínico de Itajubá, pela colaboração nos ensaios antimicrobianos.

À Prof^ª Dr^ª Cristina I. Mizusaki pela valiosa amizade, estímulo e incentivo à minha formação científica.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e do curso de Mestrado em Materiais para Engenharia da Universidade Federal de Itajubá pelos ensinamentos que me possibilitaram a conclusão deste trabalho.

Aos colegas do curso de mestrado, em especial a Nirton Cristi, Mayler Martins, Edson Giuliani e André Paiva pelo incentivo, companheirismo e colaborações.

Aos meus familiares e amigos, que cada qual a seu modo, estiveram sempre presentes apoiando e incentivando-me.

A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver e testar polímeros biologicamente ativos baseados nos copolímeros macroporosos PCL-co-Eg com potencial para utilização na medicina. O elemento antimicrobiano na cadeia principal do copolímero é o eugenol (Eg). O eugenol (2-alil-4-metoxifenol) é amplamente utilizado na odontologia devido às suas propriedades analgésicas e antissépticas. O eugenol é dotado de propriedades antimicrobianas devido à capacidade doadora do próton H^+ do grupamento fenólico hidroxila. Neste trabalho, copolímeros bioreabsorvíveis com atividade antimicrobiana baseados nos monômeros eugenol (Eg) e caprolactona (CL) foram preparados por polimerização em massa a 25°C utilizando iodo (I_2) como iniciador. A microestrutura do copolímero obtido foi investigada por espectroscopia 1H -NMR e FTIR bem como análises térmicas. A razão de reatividade de ambos os monômeros foi determinada pela aplicação de método não-linear mínimo-quadrado proposto por Tidwell e Mortimer. Os resultados obtidos ($r_{Eg}=0,126$ e $r_{CL}=2,132$) confirmam que o par comonômero polimeriza estatisticamente, independente do suprimento monomérico. Para obtermos mais informações sobre os fatores que determinam a bioatividade dos copolímeros PCL-co-Eg, foi realizada modelagem molecular. Os cálculos químicos teóricos indicam que a atividade antimicrobiana dos copolímeros deve estar significativamente associada com a diferença de energia do orbital molecular (HOMO LUMO). Os achados presentes são concordantes com nossos estudos experimentais sobre a propriedade antimicrobiana dos copolímeros PCL-co-Eg por técnicas *in vitro*. De acordo com a energia LUMO, as moléculas podem ser classificadas como fortemente eletrofílicas ($E_{LUMO}>3,0eV$) e levemente eletrofílicas ($E_{LUMO}<2,5$). Em geral, moléculas fortemente eletrofílicas mostram uma atividade biológica mais marcante, sugerindo que o sítio ativo na biomolécula deveria ser um forte nucleofílico. Apesar do fato da atividade antimicrobiana do copolímero PCL-co-Eg ser influenciada por outros fatores, a energia LUMO parece ser um parâmetro teórico adequado para prever qualitativamente a atividade antimicrobiana desses copolímeros. A energia dos orbitais HOMO-LUMO no copolímero não mostrou uma dependência significativa em relação a concentração de eugenol no copolímero. A energia do orbital LUMO é inversamente proporcional a concentração de eugenol no PCL-co-Eg. Esses estudos confirmam os achados anteriores relatando propriedades antimicrobianas dos copolímeros PCL-co-Eg para *S. aureus* e *E. coli*. Investigações futuras precisam ser desenvolvidas quanto ao uso terapêutico do PCL-co-Eg em tratamentos periodontais. Os copolímeros PCL-co-Eg mostram grande potencial a esse respeito, especialmente nos casos em que ocorrem limitações como o desenvolvimento de resistência e toxicidade ao uso contínuo de antibióticos. Entretanto, mais investigações teóricas e experimentais sobre os copolímeros PCL-co-Eg auxiliarão na elucidação de suas propriedades de biodegradação e quanto à sua utilização na área biomédica, antes que possam ser desenvolvidos comercialmente como um antimicrobiano para as áreas médica e odontológica.

ABSTRACT

The main objective of this work was to develop and to test a novel biologically active polymer based on macroporous PCL-co-Eugenol copolymers with potential for use in medicine. The antimicrobial element in the copolymer main chain is the bioactive compound eugenol (Eg). Eugenol (2-allyl-4-methoxyphenol) (Eg) has wide use as cement in dentistry due to their analgesic and antiseptic properties. Eugenol is able to act as antimicrobial due to their hydrogen donating capacity of the phenolic hydroxyl group. In this work bioresorbable copolymers with antimicrobial properties based on Eugenol (Eg) and caprolactone (CL) monomers were prepared by mass polymerization at 25 °C using iodine (I₂) as initiator. The microstructure of the copolymer obtained was elucidated by means of ¹H-NMR and FTIR spectroscopy as well by thermal analyses. The reactivity ratios of both monomers were determined by the application of the non-linear least-squares method suggested by Tidwell and Mortimer. The obtained results ($r_{Eg}=0.126$ and $r_{CL}=2.132$) confirm that the comonomer pairs polymerizes statistically, independently of the monomer feed. To obtain more information about the factors that determine the bioactivity of the PCL-co-Eg copolymers, molecular orbital modeling was performed. The theoretical quantum-chemistry calculations indicated that the antimicrobial activity of copolymers might be significantly associated with the frontier molecular orbital energy gap (LUMO-HOMO energy difference). The present findings are consistent with our experimental studies about the antimicrobial property of PCL-Eg copolymers by *in vitro* techniques. According to the LUMO energy, the molecules can be classified as hard electrophiles ($E_{LUMO}>3.0$ eV) and soft electrophiles ($E_{LUMO}<2.5$ eV). In general, hard electrophiles show a more important biological activity, suggesting that the active site of the biomolecule could be a hard nucleophile. Despite the fact that the antimicrobial activity of the PCL-co-Eg may be also influenced by other factors, LUMO energy seems to be an adequate theoretical parameter to predict qualitatively the antimicrobial activity of these copolymers. The energy of the HOMO-LUMO orbitals in the copolymer did not show a significant dependence with the Eg composition in the PCL-co-Eg copolymer. The frontier orbital LUMO energy is inversely proportional to the Eg composition in the PCL-co-Eg copolymer. Our study confirms and supports the earlier findings regarding antimicrobial properties of PCL-co-Eg copolymers against *S. Aureus* and *E. Coli*. Further investigations need to be done to develop PCL-co-Eg copolymers into a useful therapeutic tool for treatment of periodontitis. PCL-co-Eg copolymers show great potential in this respect, especially on the grounds of limitations such as development of resistance to side effects and toxicity of currently used antibiotics. However, more theoretical and experimental investigations about PCL-Eg copolymers will aid in the elucidation of its biodegradation properties and clarification about some potential health hazards before they can be safely evaluated and commercially developed as beneficial antimicrobial coating in medicine.

Índice de Figuras

Capítulo 1

Figura 1: Aspecto clínico da gengivite e periodontite evidenciando exposição radicular por perda óssea.....	01
---	----

Capítulo 2

Figura 1: Estrutura da proteoglicana.....	04
Figura 2: Corte histológico evidenciando osteoblastos, osteócitos e periósteo no tecido ósseo.....	05
Figura. 3: Corte histológico evidenciando osteoclastos e osteócitos no tecido ósseo.....	06
Figura. 4: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de partículas de hidroxiapatita.....	06
Figura 5: Estrutura do colágeno	07
Figura 6: Corte histológico evidenciando canais de Havers e Volkmann.....	08
Figura 7: Corte do osso mandibular humano evidenciando as porções trabecular (A) e cortical (B).	08
Figura 8: Paciente com parte da face transplantada segundo os princípios do enxerto alógeno	16
Figura 9: Estrutura química dos fármacos utilizados no controle da rejeição pós-implante alógeno: ciclosporina (A), prednisona (B), tacrolimus (C), micofenolato mofetil (D) e rapamune â (E).....	17
Figura 10: Materiais empregados no enxerto xenógeno: matriz mineral de osso bovino PRO-BONE® (A) e Gen-Ox (B), matriz orgânica de osso bovino (C).....	19
Figura 11: Representação esquemática de uma prótese de fêmur.....	24
Figura 12: Estrutura química da vancomicina (A), cefalosporina (B), ampicilina (C) e metronidazol (D).....	29

Capítulo 3

Figura 1: Estrutura da amilopectina.....	40
Figura 2: Exemplos das diferentes formas farmacêuticas: (A) esfera (sistema matricial) e (B) cápsula (sistema reservatório).....	43
Figura 3: Mecanismos de liberação do princípio bioativo por difusão (A), erosão (B) e liberação pelo sistema reservatório (dissolução ou difusão) (C).....	44

Figura 4: A evolução nas pesquisas sobre a aplicação dos polímeros biodegradáveis na medicina. Fonte: Science Direct. PEG (A), PLA (B), PCL (C), PHB (D).....	46
Figura 5: Estrutura química do PHB (a), PCL (b), PEG (c).....	47
Capítulo 4	
Figura 1: Artigos científicos publicados sobre a PCL nos últimos 10 anos. Fonte: Science Direct.....	55
Figura. 2: Reação de polimerização por abertura de anel da ϵ -caprolactona.....	57
Figura 3: Esquema de adição de radiocontraste à PCL.....	58
Figura 4: Embalagem comercial do fio de sutura Monocryl e sutura após exodontia....	62
Capítulo 5	
Figura 1: Localização geográfica das Ilhas Molucas.....	68
Figura 2: Cravo-da-índia	69
Figura 3: Isômeros do eugenol.....	70
Figura 4: Condução da reação de isomerização do eugenol.....	70
Figura 5: Embalagem comercial do pó de óxido de zinco e eugenol.....	72
Figura 6: Cones de guta percha, de diferentes diâmetros, para obturação dos canais radiculares.....	73
Figura 7: Mecanismos da atividade antimicrobiana do eugenol (A) e ionização do copolímero PCL-co-Eg com liberação do próton (B).....	75
Capítulo 6	
Figura. 1: Espectrofotômetro UV/Vis Cary 50 utilizado na caracterização do sistema ϵ -CL:I ₂ e Eg-I ₂	80
Figura 2: Fundamento da técnica de GPC.....	82
Figura 3: Equipamento para cromatografia de permeação em gel (GPC) Waters, modelo 510 utilizado neste trabalho. O equipamento pertence à Petroquímica União/SP.....	83
Figura 4: O efeito de um campo magnético externo sobre o núcleo do hidrogênio.....	85
Figura 5: Separação dos níveis de energia de spin para um núcleo em função de um campo magnético externo (H_0).....	86
Figura 6: Blindagem (H induzido) causada por elétrons circulando em torno do núcleo em plano perpendicular ao campo externo (H_0).....	87
Figura 7: Equipamento de RMN Bruker 300 MHz (A) e Bruker 500 MHz (B) do ICTP/CSIC. Nota-se em (B) a introdução da amostra no equipamento de RMN.....	89

Figura 8: Equipamento para análise térmica Metler TA 4000.....	91
Figura 9: Fluxograma da técnica MEV.....	93
Figura 10: Microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL	93
Capítulo 7	
Figura 1: Processo de polimerização por abertura do anel da poli (ϵ -caprolactona) com o iodo.....	103
Figura 2: Dependência do percentual de conversão para polimerização em massa do monômero ϵ -CL em PCL em função do tempo e da temperatura do sistema reacional.....	105
Figura 3: Espectro vibracional do PCL. . O espectro foi obtido após dispersão de 100mg da amostra em pastilhas de KBr.....	106
Figura 4: Espectro vibracional do eugenol.....	106
Figura 5: Espectro vibracional do copolímero PCL-co-Eg (18%Eg).....	107
Figura 6: Análise do GPC do polímero PCL polimerizada via CTC após 121 horas de polimerização.....	108
Figura 7: Evolução do peso molecular do polímero PCL em função do tempo.....	109
Figura 8: Espectro ^1H -RMN da poli(ϵ -caprolactona). Solvente CDCl_3	113
Figura 9: Espectros ^1H -NMR do eugenol. Solvente: CDCl_3 , temperatura: 25°C	113
Figura 10: Espectro ^1H -NMR do copolímero PCL-co-Eg.....	114
Figura 11: Diagrama de Fineman-Ross para a copolimerização radicalar de Eg com ϵ -CL.....	115
Figura 12: Termogramas para o PCL e seus copolímeros PCL-co-Eg.....	118
Figura 13: Variação da temperatura de transição vítrea dos copolímeros PCL-co-Eg em função do teor de Eg. Calculado de acordo com a equação de Fox (A) e obtido experimentalmente (B).....	120
Figura 14: Micrografia de PCL e PCL-co-Eg. %Eg=10%/m/m.....	121
Figura 15: Curva de intumescimento da PCL e do copolímero PCL-co-Eg.....	123
Figura 16: Curva de biodegradação da poli (ϵ -caprolactona).....	125
Figura 17: Curva de biodegradação da poli (caprolactona)-co-eugenol. Porcentual de Eg no copolímero: 6,5% (m/m).....	126
Figura 18: Análise de biodegradabilidade dos copolímeros PCL-co-Eg em solução fisiológica (PBS 0,1 M, pH 7,4) a 37°C contendo 0,15% (m/V) das enzimas: Lipase (45 U.mL^{-1}) (A), colesterol estearase (40 U.mL^{-1}) (B) e PBS (C).....	128
Figura 19: Ensaio antimicrobiano para <i>E.coli</i> e <i>S.aureus</i>	130

Figura 20: Resultados da inibição do crescimento bacteriano em função da concentração de Eg para <i>E.coli</i>	131
Figura 21: Resultados da inibição do crescimento bacteriano em função da concentração de Eg para <i>S.aureus</i>	132
Figura 22: Energia mínima local e global obtidas pelo processo de minimização e dinâmica molecular, respectivamente.....	135
Figura 23: Orbitais de fronteira HOMO (A) e LUMO (B) para os monômeros eugenol (I) e ϵ -caprolactona (cadeia aberta) (II).....	141
Figura 24: Orbitais de fronteira HOMO (A) e LUMO (B) para o oligômero poli(eugenol).....	142
Figura 25: Orbitais de fronteira HOMO (A) e LUMO (B) para o oligômero poli(ϵ -caprolactona).....	142
Figura 26: Orbitais de fronteira HOMO (A) e LUMO (B) para o copolímero alternado PCL-co-Eg.....	143
Figura 27: Superfícies equipotenciais para os monômeros eugenol (A) e ϵ -caprolactona (B).....	146
Figura 28: Superfície equipotencial 2D para os monômeros eugenol (A) e ϵ -caprolactona (B).....	146
Figura 29: Potencial eletrostático (A) e superfície equipotencial 2D (B) para o oligômero de poli(eugenol).....	147
Figura 30: Potencial eletrostático (A) e superfície equipotencial 2D (B) para o oligômero de poli(ϵ -caprolactona).....	147
Figura 31: Potencial eletrostático (A) e superfície equipotencial 2D (B) para o copolímero alternado PCL-co-Eg.	148
Figura. 32: Viabilidade celular após ensaio de citotoxicidade.....	149
Figura 33: Variação na concentração de macrófagos no exsudato com o tempo de implantação do copolímero de PCL-co-Eg (A) e silicone grau médico (B).....	151
Figura 34: Atividade extracelular da fosfatase alcalina no exsudato de PCL-co-Eg (A) e silicone grau médico (B) em função do tempo de implante.....	152

Índice de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1: Módulos de elasticidade de materiais sintéticos e o tecido biológico.....20

Tabela 2: Parâmetros para antibioticoterapia profilática.....32

Capítulo 4

Tabela 1: Composição da solução SBF.....59

Capítulo 6

Tabela 1: Número quântico de spin para vários núcleos atômicos.....84

Capítulo 7

Tabela 1: Bandas de absorção relativas ao espectro FTIR do PCL107

Tabela 2: Bandas de absorção relativas ao espectro FTIR do eugenol.....108

Tabela 3: Copolimerização em massa entre Eg e ϵ -CL.....114

Tabela 4: Diâmetro padrão para alguns antimicrobianos.....129

Lista de Siglas e Unidades

MEV: microscópio eletrônico de varredura
HA: hidroxiapatita
BMU: unidade multicelular básica de remodelação óssea
IL: interleucina
TNF: fator de necrose tumoral
OPG: osteoprotegerina
PTH: paratormônio
BMP: proteína óssea morfogenética
FGF: fator de crescimento fibroblástico
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
ON: óxido nítrico
EGF: fator de crescimento epidérmico
Bis-GMA: bisfenol-A metacrilato de glicidila
UDMA: dimetacrilato de uretano
TEG-DMA: dimetacrilato de trietileno glicol
EDMA: dimetacrilato de etileno glicol
6-APA: ácido 6-aminopenicilâmico
PGA: penicilina G acilase
PCL: poli (ϵ -caprolactona)
PHB: poli (hidroxibutirato)
PHBV: poli (hidroxibutirato-co-valerato)
ASTM: American Standard for testing and Methods
PEG: poli (etilenoglicol)
PLA: poli (ácido láctico)
FDA: Food and Drug Administration
PVP: poli N-vinil-2-pirrolidona
NPC-mPEG: metoxi (poli etileno glicol)-p-nitrofenil carbonato
LDA: diisopropilamida de lítio
SBF: Simulated Body Fluid
PGA: poli (ácido glicólico)
Eg: eugenol

Gram +: gram positiva
Gram -: gram negativa
PCL-co-Eg: poli (caprolactona-co-eugenol)
CTC: complexo de transferência de carga
 $^1\text{H-NMR}$: ressonância magnética nuclear de prótons
DSC: calorimetria exploratória diferencial
GPC: cromatografia de permeação em gel
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: tiosulfato de sódio
H: intensidade do campo magnético
E: nível de energia
h: constante de Planck
 $[\eta]$: viscosidade intrínseca
 η : rendimento
TMS: tetrametil silano
 CDCl_3 : clorofórmio deuterado
ATCC: American Type Culture Collection
 $\epsilon\text{-CL}$: ϵ -caprolactona
Tg: temperatura de transição vítrea
QSAR: Quantitative Structure- Activity Relationship
MolM: modelagem molecular
HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital
mg: miligrama
L: litro
mM: milimolar
M: massa molar
m: massa molecular
mL: mililitro
min: minuto
h: hora
 μm : micrometro
 μL : microlitro
GPa: giga pascal
MHz: mega hertz

cal: caloria

Hz: hertz

ppm: partes por milhão

°C: grau Celsius

kg: quilograma

μmol: micromol

mmol: milimol

Sumário

1. OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO.....	01
1.1 Proposição da utilização do copolímero PCL-co-Eg em odontologia.....	01
1.2 Objetivos.....	02
2. INTRODUÇÃO.....	04
2.1 A fisiologia óssea.....	04
2.2 Remodelação e reparo ósseo.....	09
2.3 Histórico e caracterização de materiais aloplásticos para implantes.....	15
2.4 Infecção hospitalar e os polímeros com atividade antimicrobiana.....	26
2.5 Considerações finais.....	34
2.6 Referências.....	35
3. APLICAÇÕES DE POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS EM MEDICINA / ODONTOLOGIA.....	40
3.1 Considerações finais.....	51
3.2 Referências.....	53
4. POLI (CAPROLACTONA) – GENERALIDADES.....	55
4.1 Constituição química e métodos de síntese.....	55
4.2 Principais utilizações do PCL na medicina/odontologia.....	57
4.3 Propriedades biodegradáveis da poli (caprolactona).....	60
4.4 Utilização da poli (ϵ -caprolactona) conjugada com agentes antimicrobianos.....	62
4.5 Considerações finais.....	64
4.6 Referências.....	65
5. EUGENOL : OBTENÇÃO E APLICAÇÕES.....	68
5.1 Histórico sobre a utilização do eugenol.....	68
5.2 Atividade antimicrobiana do eugenol.....	74
5.3 Considerações finais.....	77
5.4 Referências.....	78
6. EXPERIMENTAL	
6.1 Síntese do copolímero PCL-co-Eg.....	79
6.2 Caracterização Físico-Química	
6.2.1 Cromatografia de Permeação em gel.....	81
6.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de prótons ($^1\text{H-NMR}$)	83

6.2.3	Análise Térmica (DSC).....	89
6.2.4	Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).....	92
6.3	Caracterização Bioquímica	
6.3.1	Difusão de fluido biológico.....	94
6.3.2	Degradação “in vitro”.....	94
6.3.3	Estudo da atividade antimicrobiana.....	95
6.3.4	Citotoxicidade.....	96
6.3.5	Hiperemia.....	98
6.4	Referências.....	100
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
7.1	Porcentual de conversão de polimerização do monômero ϵ -CL a PCL.....	102
7.2	Análise da composição dos copolímeros obtidos.....	110
7.3	Caracterização Físico-Química do Copolímero PCL-co-Eg	
7.3.1	Temperatura de transição vítrea (Tg) do sistema PCL-co-Eg.....	117
7.3.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	121
7.4	Caracterização bioquímica	
7.4.1	Difusão de fluido fisiológico (intumescimento).....	122
7.4.2	Biodegradabilidade.....	124
7.4.3	Hidrólise enzimática.....	127
7.4.4	Atividade antimicrobiana.....	129
7.4.5	Relação estrutura química e atividade biológica.....	133
7.4.6	Citotoxicidade.....	148
7.4.7	Atividade hiperêmica do copolímero PCL-co-Eg.....	150
7.5	Considerações finais.....	153
7.6	Referências.....	154
8.	CONCLUSÕES GERAIS.....	155
9.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	156

1. OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

1.1 Proposição da utilização do copolímero PCL-co-Eg em odontologia

A crescente demanda por materiais que possam ser utilizados como enxertos para o reparo ósseo tanto na medicina quanto na odontologia incentiva continuamente as pesquisas na área de biomateriais.

Defeitos ósseos gerados por traumatismos, cistos e tumores ou doenças periodontais ocasionam dificuldades tanto funcionais quanto estéticas, comprometendo a saúde física e emocional do paciente. Traumas podem acarretar em fraturas mandibulares que impossibilitam a fala e a mastigação, assim como cistos e tumores na região maxilar e/ou mandibular levam a perdas ósseas que podem culminar em deformações faciais.

A inflamação dos tecidos moles adjacentes aos elementos dentais (gingivite) quando não controlada e monitorada evolui para um quadro de comprometimento ósseo (periodontite) que pode ocasionar até mesmo em perda local ou generalizada dos elementos dentais.

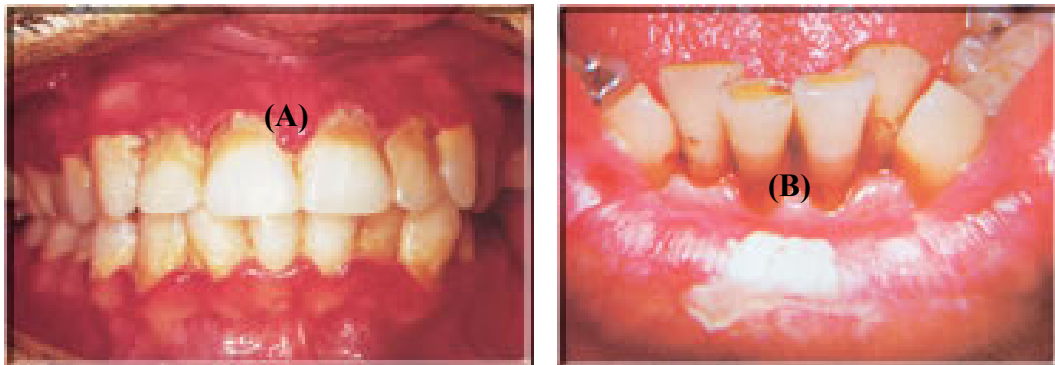


Figura 1.1: Aspecto clínico da gengivite (A) e periodontite evidenciando exposição radicular por perda óssea (B).

As chamadas doenças periodontais já constituem a maior causa de perdas dentárias em pacientes em idade adulta, segundo a Organização Mundial de Saúde. A reposição

óssea nesse caso evitaria a perda dentária e criaria um suporte ósseo suficiente para casos em que é necessária a utilização de implantes para o suporte de próteses.

O copolímero poli (ϵ -caprolactona)-co-eugenol visa conduzir a formação óssea fornecendo um arcabouço macroporoso que abrigue células osteoprogenitoras e simultaneamente apresente características antimicrobianas, garantindo o prognóstico favorável do enxerto e biodegradabilidade suficiente para que seja substituído pelo tecido ósseo neoformado, não necessitando de procedimento operatório posterior para sua retirada.

1.2 Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo caracterizar e avaliar as características físico-químicas e bioquímicas do copolímero PCL-co-Eugenol.

Através da investigação de suas propriedades antimicrobianas, de biodegradação e citotoxicidade buscamos avaliar a viabilidade de sua utilização na odontologia em casos clínicos em que seja requerido reparo ósseo nos quais o copolímero atuaria como um arcabouço para a sustentação da neoformação do tecido ósseo. Os objetivos específicos deste trabalho são:

- A) Investigar a síntese e a caracterização do copolímero poli (ϵ -caprolactona-co-eugenol).
- B) Obter um copolímero de PCL bioativo quanto às suas propriedades antimicrobianas.
- C) Investigar o comportamento biocompatível do copolímero poli (ϵ -caprolactona-co-eugenol) obtido neste trabalho.
- D) Analisar a biodegradabilidade do copolímero em condições *in vitro*.

Em função dos objetivos acima explicitados, uma revisão de literatura no sentido de abordar tópicos que ressaltam a importância deste trabalho para a área de biomateriais será abordada nos capítulos seguintes.

Neste sentido, no capítulo 2 é abordada a fisiologia do tecido ósseo bem como a necessidade de desenvolver-se polímeros adequados para sua regeneração.

Os capítulos 3 e 4 tratam do desenvolvimento de polímeros biodegradáveis, especialmente as aplicações do polímero poli (ϵ -caprolactona) na medicina. A necessidade

de um polímero com propriedades antimicrobianas é enfatizada nos capítulos anteriormente citados.

O capítulo 5 aborda a utilização de um princípio bioativo natural na obtenção de copolímeros com atividade antimicrobiana.

Nos capítulos 6 e 7 apresenta-se o desenvolvimento deste trabalho a nível experimental e as discussões decorrentes da interpretação dos principais resultados obtidos.

Procurou-se ao final de cada capítulo apresentar as considerações finais de modo a favorecer o elo entre teoria e experimento, bem como as ligações entre estes tópicos e a literatura pertinente à área de biomateriais até este momento.

2.1 A fisiologia óssea

O tecido ósseo é constituído por uma porção orgânica (células ósseas e matriz orgânica) e uma matriz inorgânica. São células ósseas os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras.

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese da matriz colágena (colágeno e proteoglicanas). O colágeno é a proteína mais abundante do organismo humano e tem fundamental importância na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo. As proteoglicanas são macromoléculas formadas por associações entre proteínas (como por exemplo, o colágeno) e glicosaminoglicanas. As proteoglicanas e as glicosaminoglicanas participam dos processos de migração e interação celular. A Figura 1 ilustra a estrutura da proteoglicana constituída pelas glicosaminoglicanas sulfato de queratina e sulfato de condroitina.^{1,2}

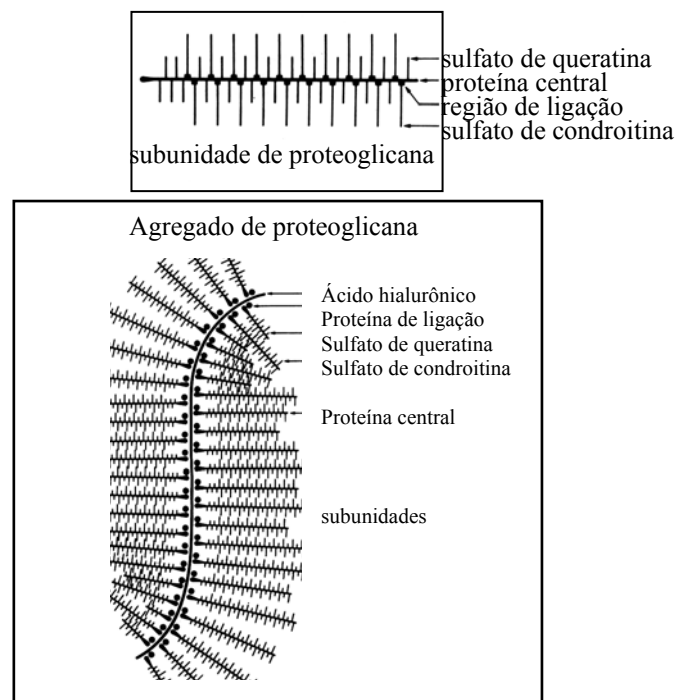


Figura. 2.1: Estrutura da proteoglicana.

Os osteoblastos são encontrados nas regiões periféricas e superficiais dos ossos adultos. Após a deposição da matriz óssea os osteoblastos que permanecem presos em seu interior são denominados osteócitos (Figura 2).^{1,2}

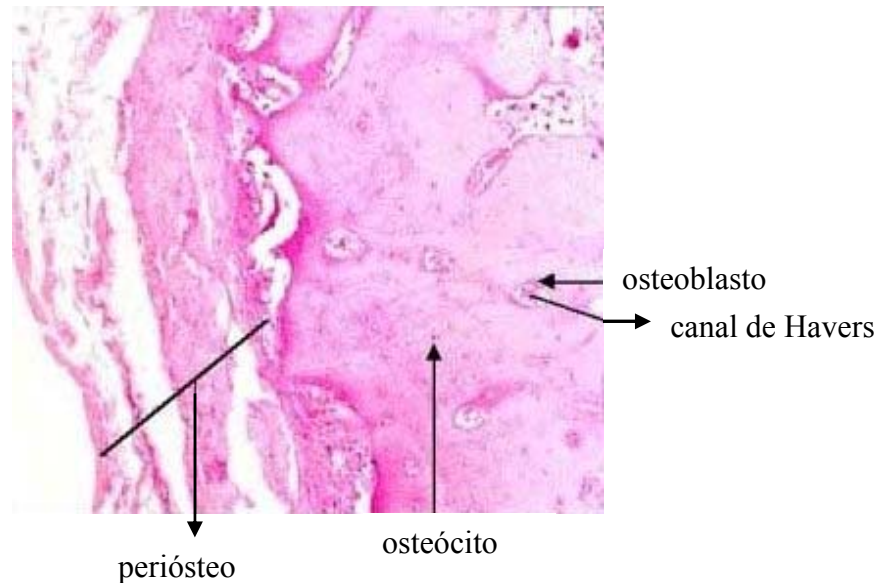


Figura 2.2: Corte histológico evidenciando osteoblastos, osteócitos e periosteio no tecido ósseo.³

A reabsorção do tecido ósseo é função dos osteoclastos (Figura 3). Algumas organelas presentes nessas células (os lisossomos) liberam enzimas para o exterior resultando em um ambiente propício para a reabsorção da parte mineral pela ação de enzimas. As células osteoprogenitoras são encontradas na medula óssea e no periosteio e originam outras células da linhagem medular.^{1,2}

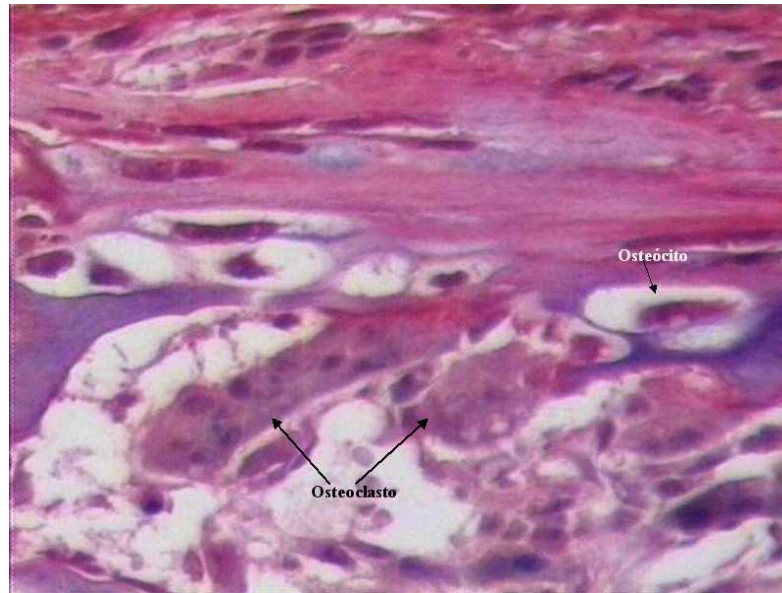


Figura 2.3: Corte histológico evidenciando osteoclastos e osteócitos no tecido ósseo. ⁴

A matriz óssea inorgânica é constituída principalmente por cálcio e fósforo organizados em uma estrutura cristalina denominada hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH}_2)$]. (Figura 4).

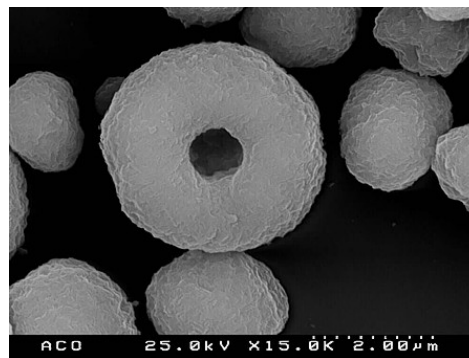


Figura 2.4: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de partículas de hidroxiapatita. ⁵

A deposição de HA se dá ao longo das fibras de colágeno e essa associação é responsável pela dureza do tecido ósseo.

No processo de remodelagem óssea as células responsáveis pela reabsorção, formação e mineralização do tecido ósseo são os osteoclastos. São células grandes, multinucleares, formadas na medula óssea. Quando estimuladas aparecem na superfície do

osso, secretando enzimas que reabsorvem a matriz óssea liberando cálcio para a corrente sanguínea. Após a reabsorção os osteoclastos dão lugar aos osteoblastos para a formação de um novo osso. Os osteoblastos imersos na matriz do tecido ósseo neoformado passam a se chamar osteócitos e levam nutrição ao osso. ^{1,2,6}

O tecido ósseo é subdividido em osso cortical e osso trabecular. O primeiro é composto por sistema de Havers (Figura 6), um canal central envolto por lamelas concêntricas de tecido ósseo composta por colágeno I mineralizado. Perpendicularmente aos canais de Havers estão os canais de Volkmann (Figura 6) por onde passam veias e artérias transportando O_2 e nutrientes ou coletando CO_2 e resíduos metabólicos. ^{1,6}

Por ser a proteína mais abundante no organismo humano e exercer diferentes funções, o colágeno (Figura 5) é diferenciado em mais de 20 subtipos. O colágeno I é o mais comum deles, está presente nos tendões, cartilagem fibrosa, tecido conjuntivo sob a forma de fibras e feixes constituindo ossos, tendões e pele.

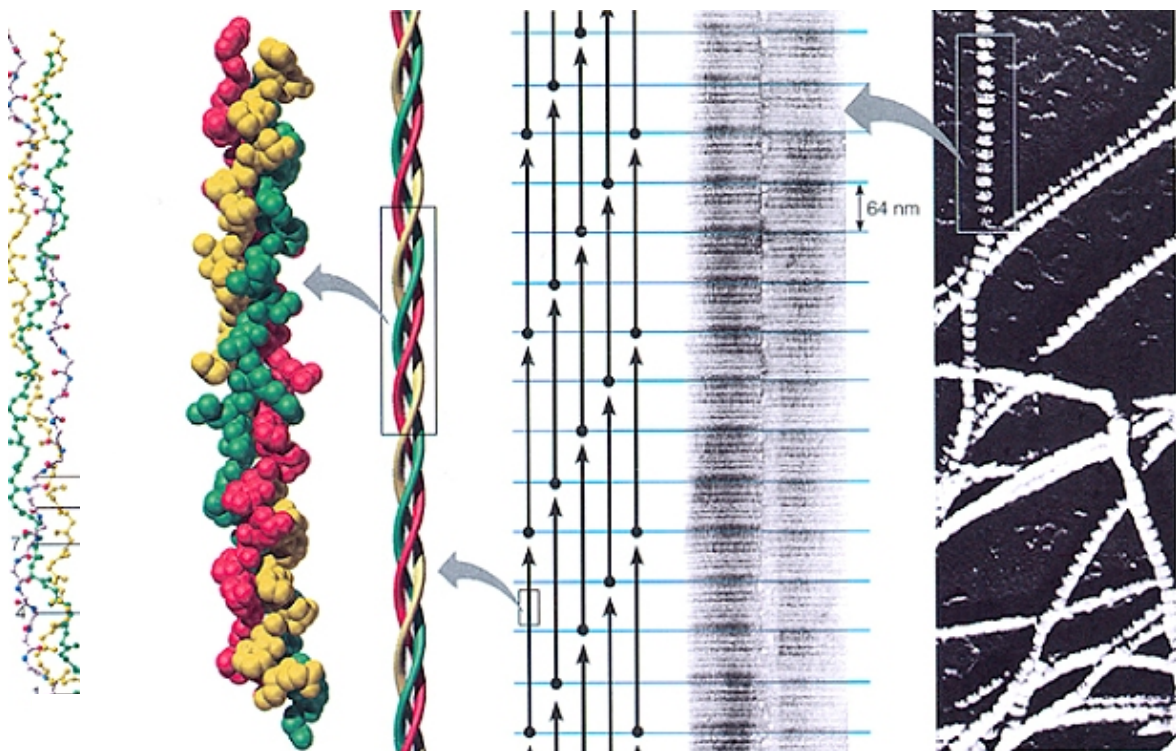


Figura 2.5: Estrutura do colágeno. ⁷

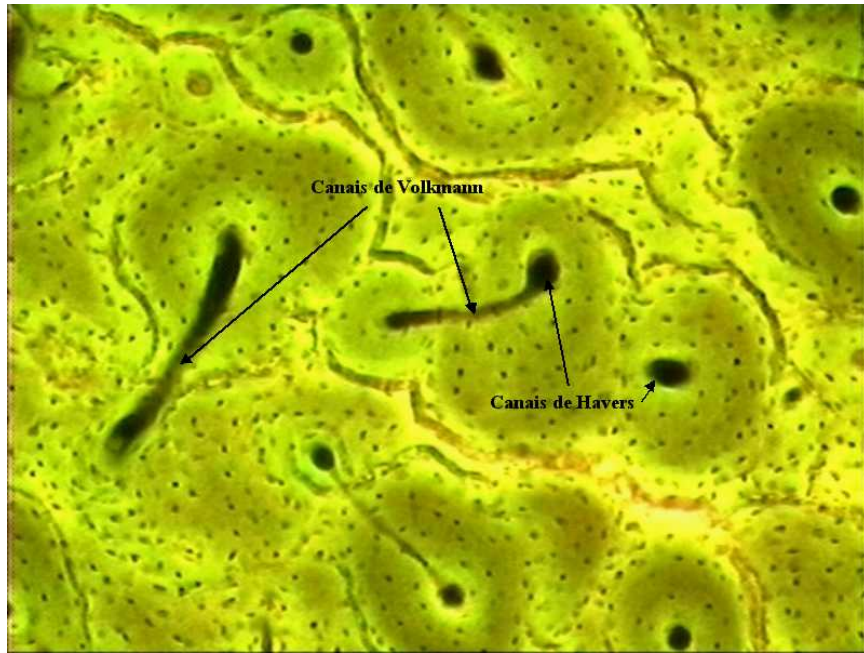


Figura 2.6: Corte histológico evidenciando canais de Havers e Volkmann. ⁸

O osso trabecular constitui a porção interior do osso. Trabéculas formam um mosaico com muitos osteoplastos nos quais se localizam os osteócitos. No interior do osso trabecular encontra-se a medula óssea exercendo a função de regulação mineral e sendo subdividida em vermelha, amarela e branca. A medula vermelha produz células sanguíneas e osteoprogenitoras e após certa idade fica confinada no interior dos ossos longos (fêmur e úmero). Já a medula amarela aparece no tecido ósseo após a adolescência e é formada por tecido adiposo. ⁹

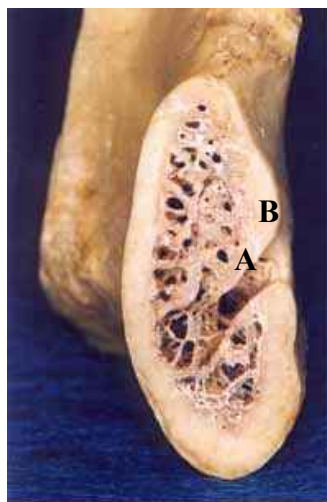


Figura 2.7: Corte do osso mandibular humano evidenciando as porções trabecular (A) e cortical (B). ¹⁰

2.2 Remodelação e reparo ósseo¹¹⁻¹⁸

O osso é um tecido extremamente ativo, sendo que no esqueleto em desenvolvimento essa atividade é primariamente voltada para o crescimento e a modelação óssea, processos pelos quais o osso atinge sua forma e seu tamanho. No adulto, a atividade metabólica envolve predominantemente a remodelação.

A remodelação óssea é definida como um processo de aposição no qual há remoção localizada do osso antigo (reabsorção) e substituição por osso recentemente formado. Esse evento continua por toda a vida adulta do indivíduo, sendo responsável pela renovação do esqueleto e mantendo sua integridade anatômica e estrutural.

A remodelação óssea é um processo fisiológico constante no qual a formação óssea é correspondente à reabsorção, sendo regulada por diversos fatores, como mecanismos regulatórios intracelulares, influência hormonal, fatores locais e externos.

O processo de remodelação ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas de unidades multicelulares básicas de remodelação óssea (BMU), sendo caracterizado pelo acoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos. Cada unidade é geográfica e cronologicamente separada de outros conjuntos, sugerindo que a ativação de seqüência de ocorrências celulares responsáveis pela remodelação seja também controlada localmente por fatores gerados no microambiente ósseo.

O sinal que inicia a remodelação óssea não está completamente identificado, mas é evidente que forças mecânicas podem ser capazes de alterar a arquitetura óssea local. O primeiro estágio da remodelação envolve o recrutamento das células precursoras de osteoclasto para osso. Essas, presentes em tecidos hematopoéticos, como na medula óssea, respondem a sinais físicos e hormonais, e, concentrando sobre determinada região da superfície óssea que será reabsorvida, fundem-se e transformam-se em osteoclastos multinucleados.

Recentes evidências têm sugerido que o osteoclasto é uma célula secretora que produz fatores que podem estimular sua própria formação e atividade. Estudos demonstraram que células osteoclásticas, formadas em cultura de células medulares de pacientes com doença de Paget, produzem IL-6 capaz de estimular a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea.

A diferenciação de células progenitoras em osteoclastos ocorre por meio de um mecanismo que envolve a interação célula a célula com células osteoblásticas. Após a

diferenciação, a superfície óssea é preparada com a remoção da camada de osteóide não-mineralizado pelos osteoblastos de revestimento que produzem enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, colagenases e gelatinases. Esse processo facilita o acesso dos osteoclastos ao osso subjacente.

A osteoprotegerina (OPG), receptor ativador de fator de necrose tumoral (NF- κ B[RANK]), e a citocina RANK ligante (RANKL) têm sido identificadas como os principais fatores envolvidos na gênese de osteoclastos. A RANK localiza-se na superfície de precursores de osteoclastos e de osteoclastos maduros, enquanto a RANKL é uma proteína pertencente à família do TNF (fator de necrose tumoral). Seu principal papel é a inibição da apoptose dos osteoclastos e a estimulação da diferenciação e ativação dessas células. A OPG pode atuar inibindo a RANKL por meio da ligação com RANK e também diretamente, por meio de outros receptores presentes nos osteoclastos. Seus efeitos são antagônicos aos da RANKL. Diversas citocinas e compostos, como os estrógenos, influenciam a gênese dos osteoclastos por meio da regulação da produção de RANKL/OPG pelas células estromais e pelos osteoblastos. O próximo passo consiste no reconhecimento das proteínas da matriz óssea extracelular por meio de proteínas de membrana celular chamadas integrinas. A seguir são formadas a borda vilosa e as zonas claras, essas livres de organelas e ricas em filamentos de actina. Através das zonas claras são formadas poderosas adesões focais, responsáveis pela forte interação célula/substrato e pelo isolamento do espaço externo abaixo da célula (lacuna de reabsorção), onde a borda vilosa se espalha na superfície óssea.

A ativação osteoclástica é o terceiro evento, provavelmente iniciado pelos fatores liberados pelos osteoblastos e por meio também de contato célula a célula. Em seguida, em fase de reabsorção, os osteoclastos ativados degradam tanto os componentes minerais quanto os orgânicos, pela secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas, liberando fragmentos minerais ósseos e de colágeno. Os osteoclastos são estimulados por calcitriol, paratormônio (PTH), TNF, prostaglandina E₂, além das IL-1, 11 e 6, e são inibidos por IL-4 e 13. O que encerra essa fase pode ser um elevado nível de cálcio local ou substâncias liberadas pela própria matriz.

O osso é uma fonte rica em fatores de crescimento, importantes na regulação do processo de remodelação óssea. Os osteoclastos, além de sua função osteolítica, desempenham importante papel no desenvolvimento e crescimento ósseos, ao liberar esses fatores da matriz extracelular mineralizada. Tais fatores estimulam os osteoblastos a se

proliferarem e a sintetizar proteínas da matriz. Em seguida, ao completarem o ciclo da reabsorção, secretam proteínas que servirão de substrato para a fixação do osteoblasto.

Os osteoclastos sofrem apoptose, possivelmente induzida pelo fator de crescimento transformante beta (TGF-beta), responsável também pelo bloqueio da reabsorção óssea e pela atração dos osteoblastos. Ao contrário do TGF-beta, o PTH e a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibem a apoptose in vitro do osteoclasto.

Em próximo estágio, denominado fase de reversão, células mononucleares da linhagem monócitos e macrófagos preparam a superfície para novos osteoblastos iniciarem a formação óssea, produzindo uma glicoproteína à qual os osteoblastos podem aderir. Caracterizando a fase seguinte, a formação óssea resulta de complexa cascata de eventos que envolvem a proliferação de células mesenquimais primitivas, diferenciação em células precursoras osteoblásticas (pré-osteoblasto), maturação dos osteoblastos, formação de matriz e mineralização.

Os osteoblastos são células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização do osso. Os produtos de secreção dessas células são: fosfatase alcalina, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea, pró-colagenase, ativador de plasminogênio e proteína morfogenética do osso (BMP), entre outras. Essas células possuem receptores para diversos fatores, como PTH, glicocorticóides, hormônio do crescimento (GH), além de IL-1, TNF-alfa, prostaglandinas e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), além de receptores para hormônios sexuais. Dispõem-se nas superfícies ósseas, lado a lado, em arranjo que lembra um epitélio simples. Quando em intensa atividade sintética, são cubóides e, em estado pouco ativo, tornam-se achatados. Os osteoblastos convergem para o fundo da cavidade de reabsorção e formam espessa camada de osteóide. As células gradualmente se achatam, tornando-se quiescentes. Uma vez aprisionado pela matriz recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado de osteócito.

Os osteoblastos se proliferam mediados por fatores de crescimento liberados pelos próprios osteoblastos e pelo osso durante o processo de reabsorção. Entre os mais importantes estão o TGF-beta e os fatores liberados pela matriz óssea, como o IGF-I e II, o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Pode ser que esses fatores auxiliem na formação óssea, também impedindo a apoptose osteoblástica.

Ao sintetizarem novo colágeno e outras proteínas de matriz, preenchendo a cavidade de reabsorção com osteóide lamelar novo, a deposição mineral inicia-se

subseqüentemente e prolonga-se durante vários dias, tempo suficiente para que o colágeno forme suas pontes de ligação. Apenas poucos osteoblastos permanecem presos à matriz em mineralização, transformando-se em osteócitos, enquanto a maioria sofre apoptose. O fim da atividade osteoblástica pode ser devido à inibição por feedback negativo ou à indução da apoptose do osteoblasto pelo TNF liberado pelas células medulares vizinhas.

Entre os fatores de crescimento encontrados no osso, alguns são produzidos pelas células ósseas, como IGF, TGF, FGF, PDGF e BMP. Outros, como IL-1 e TNF-alfa, são produzidos por tecidos relacionados. Os fatores de crescimento, portanto, exercem função sobre as células ósseas de forma autócrina ou parácrina e não endógena. São produzidos por células ósseas, células adjacentes vasculares e hematopoéticas. A ligação desses fatores, como as citocinas, aos receptores de membrana celular gera um sinal ao núcleo, que resulta na transcrição de genes específicos. As IL-1 e 7, assim como o TNF-alfa estimulam a reabsorção e inibem a formação óssea, enquanto as IL-6 e 11 também estimulam a reabsorção, mas também a formação, e as IL-4, 13 e 18 inibem apenas a reabsorção óssea. Prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico (ON) são fundamentais na resposta rápida do osso a ações mecânicas e inflamatórias. As primeiras têm efeitos bifásicos na reabsorção e formação, mas o efeito predominante é estimulador. O ON inibe os osteoclastos, enquanto os leucotrienos estimulam a reabsorção óssea.

Sistematicamente, a função das células ósseas é alterada principalmente pelos hormônios reguladores do metabolismo de cálcio: PTH, vitamina D e calcitocina. Outros hormônios também interferem no metabolismo ósseo, entre eles GH, glicocorticóides, hormônios tireoidianos e sexuais.

Além das excelentes propriedades mecânicas, o osso revela um potencial único para reparação. O tecido ósseo é capaz de reparar fraturas ou defeitos locais por meio do processo de regeneração, com a formação de novo tecido com a mesma organização estrutural do tecido anterior, sem a formação de cicatriz.

Após uma lesão óssea, uma seqüência de eventos dinâmicos ocorre com o objetivo de restaurar a forma e função do osso. Muitos desses mecanismos biológicos celulares ainda não foram completamente identificados, porém sabe-se que o processo é ativado pela liberação de fatores de crescimento e citocinas no local.

A reparação óssea é semelhante tanto para pequenas quanto para grandes injúrias, para fraturas ósseas e para defeitos cirúrgicos. Quando um osso é lesado o periósteo, vasos na cortical, medula e tecidos circundantes são rompidos. Ocorre um sangramento oriundo das margens do tecido ósseo lesado e dos tecidos moles vizinhos, sendo formado um

hematoma ou coágulo sanguíneo dentro do canal medular, entre as extremidades da fratura óssea e o perióstio.

O coágulo que ocorre após a fratura consiste em extravasamento de eritrócitos, fibrina e plaquetas, que liberam PDGF, FGF e TGF-alfa, fatores quimiotáticos e reguladores da atividade celular. Para que o reparo se inicie, o coágulo sanguíneo e os restos celulares e da matriz devem ser removidos pelos macrófagos. Simultaneamente à formação do coágulo, o tecido imediatamente adjacente à fratura se necrosa. Esse tecido necrótico estimula intensas respostas inflamatórias, caracterizadas por vasodilatação e exsudação do plasma, leucócitos e células mesenquimais.

Aproximadamente do terceiro ao quinto dia após a fratura, o perióstio e o endóstio respondem com intensa proliferação, formando um tecido conjuntivo muito rico em células osteogênicas, o qual constitui um colar em torno da fratura e penetra entre as extremidades ósseas rompidas, sendo denominado calo fibroso. Células endoteliais derivadas dos tecidos circunjacentes migram, proliferam-se e formam novos capilares que penetram no hematoma. O estímulo para essa nova formação vascular parece ser a hipóxia local. A angiogênese ocorre em direção a um gradiente químico, que pode ser estabelecido pela hipóxia e pela concentração de quimiotáticos, como PDGF e FGF.

Osteoblastos de dentro do calo sintetizam colágeno e matriz, portanto, nesse anel ou colar conjuntivo, bem como no conjuntivo que se localiza entre as extremidades ósseas fraturadas, surge tecido ósseo imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que se formam, como também por ossificação intramembranosa. Esse processo evolui de modo a aparecer, após algum tempo, o calo ósseo, o qual é constituído de tecido ósseo imaturo, que se formou de modo desordenado, caracterizado por arranjo irregular dos osteócitos e orientação irregular das fibras colágenas.

Enquanto o processo de reparo continua, ocorre remodelação óssea, o calo se torna desnecessário, sendo reabsorvido, e as trabéculas são formadas e orientadas ao longo de linhas de esforços e se tornam funcionais. A velocidade desse processo depende de alguns fatores locais e sistêmicos, entre eles o tipo de tecido ósseo a ser reparado (cortical ou esponjoso), presença de infecção, hemorragias, imobilização local, idade e alterações nutricionais.

Em locais com excessiva mobilidade, pode ocorrer o desenvolvimento de cartilagem, tecido que possui menos exigências metabólicas do que o osso. Quando o tecido é imobilizado, o reparo ocorre por meio de formação óssea primária. Durante esse processo dinâmico, as células ósseas não atuam isoladamente. Elas são reguladas por

interações sistêmicas, realizadas pelo sistema endócrino, por meio da liberação de diversos hormônios: PTH, calcitocina, insulina, GH, hormônios esteróides e da tireóide.

Localmente, certos fatores de crescimento foram identificados, como PDGF, IL-1, FGF, TGF-alfa e beta, fator de crescimento epidérmico (EGF), entre outros. Os PDGF induzem tanto fibroblastos quanto fibras musculares a se proliferarem. Também são quimiotáticos para leucócitos e fibroblastos. A IL-1 estimula os fibroblastos a se proliferarem e a produzirem colágeno e controla o crescimento das células endoteliais. Os FGF são da família dos que estimulam o endotélio vascular, os fibroblastos e as fibras musculares lisas e induzem a formação de novos vasos. O TGF-alfa influencia o TGF-beta quanto ao índice de proliferação de muitas células. O EGF é mitogênico para células mesenquimais (osteoblastos) e epiteliais.

Certos componentes da matriz extracelular regulam a proliferação e a quimiotaxia e são chamadas moléculas de adesão do substrato. Uma dessas moléculas, a fibronectina, produzida por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais exerce diversos efeitos no processo de reparação. A fibronectina é adesiva e parece facilitar a migração de células inflamatórias para dentro da ferida, juntamente com o gel de fibrina/fibronectina. Além disso, estimula a liberação de FGF pelos macrófagos, sendo quimiotática para essas células e também para fibroblastos. Outras moléculas de adesão incluem tenascina, laminina, heparan-sulfato e colágeno tipos IV, V e VI.

É fato bem conhecido na medicina e odontologia que as falhas ósseas de grandes dimensões são difíceis de serem tratadas e que se deixadas ao seu livre curso, não lograriam regenerar-se ou o fariam muito lentamente e de forma incompleta. Situações dessa natureza beneficiam-se do uso de biomateriais para reconstrução, substituição ou preenchimento dos defeitos, e as soluções mais previsíveis ainda não são obtidas com a utilização dos enxertos ósseos. Esses enxertos têm inconvenientes como a morbidade cirúrgica da fonte doadora e a disponibilidade limitada de material (enxertos ósseos autógenos) além de apresentarem ainda riscos de transmissão de infecção e de ativação imunológica do hospedeiro e a desvantagem dos altos custos dos bancos de ossos (enxertos homogêneos e heterogêneos). Em vista disso, têm-se intensificado as pesquisas para o desenvolvimento de materiais aloplásticos que apresentem características adequadas de biocompatibilidade e osseointegração.

2.3 Histórico e caracterização de materiais aloplásticos para implantes

A utilização de materiais sintéticos para a restauração de uma função biológica desejada precede a Idade Contemporânea. Tem-se observado na história da ciência relatos interessantes sobre a utilização de próteses primitivas cuja função não corresponde a de um biomaterial na íntegra, mas que cumprem no entanto função estética. Cita-se, por exemplo, Tycho Brahe, astrônomo dinamarquês que ao duelar contra o matemático Manderup Parsberg em 1566, perdeu o nariz. Passou a usar então uma prótese metálica, liga de ouro e prata. Tratava-se de uma prótese bastante primitiva simplesmente fixada por uma espécie de resina que, conta a história, Tycho sempre carregava consigo por não se tratar, obviamente, de uma prótese permanente.¹⁹⁻²¹

A crescente necessidade da utilização de implantes se dá em função da demanda tanto funcional quanto estética advinda dos pacientes, uma vez que já não é mais suficiente a reposição de elementos perdidos, cresce cada vez mais a demanda por materiais que supram funções e devolvam a estética perdida da maneira a mais minuciosa possível.

Na prática odontológica está cada vez mais distante da realidade dos pacientes a simples extração dentária, atualmente requer-se a reposição dos elementos dentários perdidos de tal maneira que a estética não seja comprometida e que a função seja restabelecida o mais permanentemente possível, daí o desenvolvimento de próteses implanto-suportadas. Para que esses implantes sejam realizados é necessário que o tecido ósseo adjacente tenha volume e características adequadas e seja repostado ou que tenha sua neoformação estimulada quando necessário.

Inicialmente, os materiais utilizados na realização de implantes podem ser classificados de acordo com sua origem ou através dos princípios da fisiologia óssea. Quanto aos tipos de materiais utilizados, os implantes dividem-se em biológicos ou sintéticos. Por sua vez, os implantes biológicos subdividem-se em autógenos, alógenos e xenógenos.

Em implantes autógenos o material enxertado é do próprio paciente. Apesar de ser uma das melhores técnicas, tem como desvantagens a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica e o fato de muitas vezes o tecido biológico não poder ser obtido em quantidade suficiente. Como exemplos dos materiais biológicos, citamos a crista do ilíaco, costelas e a sínfise da mandíbula.^{22,23}

Quando o material a ser enxertado advém de outro indivíduo da mesma espécie, geralmente através de bancos de tecidos biológicos temos o implante alógeno. Recentemente um belo exemplo desta técnica foi apontado pela literatura médica, destacando-se a reconstrução parcial do rosto de pacientes restaurando-se tanto a biofuncionalidade quanto o convívio social. ²⁴ A Figura 8 ilustra este recente avanço alcançado pela prática médica com a face recém implantada da francesa Isabelle Dinoire receptora do primeiro transplante de rosto do mundo. Neste caso, a paciente recebeu tecido mole para preenchimento de parte da porção inferior da face, na região que compreende desde a base do nariz até a sínfise mandibular.

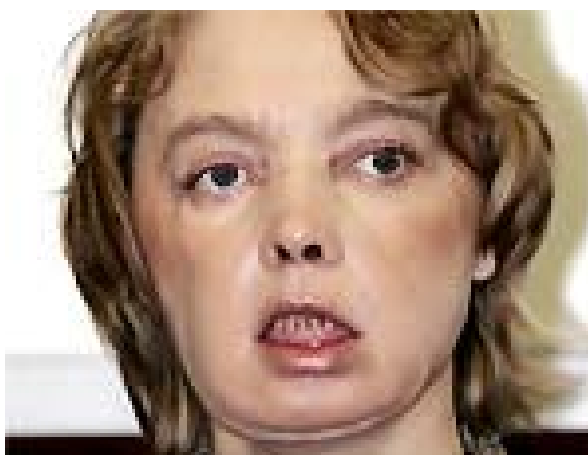


Figura 2.8: Paciente com parte da face transplantada segundo os princípios do enxerto alógeno. ²⁴

A principal desvantagem do enxerto alógeno é a rejeição, requerendo medicamentos que controlem a reação do sistema imunológico. Os imunossuppressores mais utilizados na prática médica atualmente são a Ciclosporina (Sandimun Neoral®), Prednisona(Meticorten®), Tacrolimus (Prograf®), Micofenolato Mofetil (Cellcept®), Rapamune â (Sirolimus). ²⁵ As estruturas químicas desses fármacos são apresentadas na Figura 9.

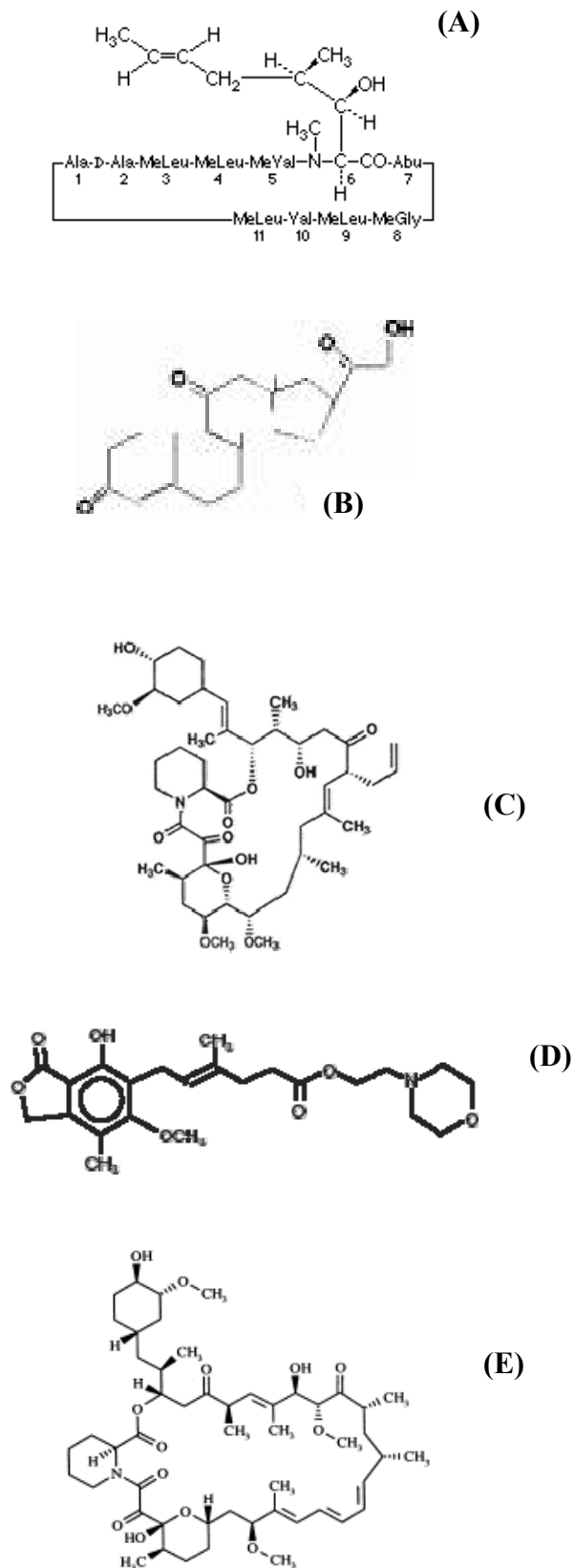


Figura 2.9: Estrutura química dos fármacos utilizados no controle da rejeição pós-implante alógeno: ciclosporina (A), prednisona (B), tacrolimus (C), micofenolato mofetil (D) e rapamune (E)

O sistema imunológico reconhece o implante como um corpo estranho ao organismo e desencadeia, em reação, uma resposta mediada por anticorpos.

Entre as células que normalmente são encontradas nos gânglios linfáticos destacam-se os linfócitos e as células apresentadoras de antígenos, que reconhecem substâncias estranhas ao corpo. Essas células estimulam os linfócitos T₄ ou auxiliares a produzirem inúmeras substâncias capazes de estimular outros linfócitos T e outras importantes células de defesa. Essas substâncias são as interleucinas e os interferons. Algumas interleucinas estimulam os linfócitos B, que se transformam em plasmócitos, células produtoras de anticorpos (ou imunoglobulinas), proteínas presentes no plasma sanguíneo.

Os anticorpos agem por diferentes mecanismos de ação; ligando-se à superfície de uma bactéria com capacidade própria de destruí-la, recobrando bactérias encapsuladas e por isso não fagocitadas por neutrófilos e macrófagos tornando-as susceptíveis à fagocitose, recobrando as mucosas, como as das vias aéreas e as do tubo digestivo, podem impedir que os agentes infecciosos as atravessem.²⁶

O risco de rejeição pós-implante é permanente, embora seja significativamente maior nas primeiras semanas após o ato cirúrgico. O avanço dos tratamentos quimioterápicos levou a uma grande diminuição nos índices de rejeição direcionando o tratamento pós-transplante para a melhora da saúde em longo prazo e a sobrevivência do órgão transplantado, reduzindo ainda os efeitos colaterais das drogas imunossupressoras mais tóxicas.

Complicações a longo prazo e efeitos colaterais associados às drogas imunossupressoras mais tóxicas incluem a elevação dos níveis de colesterol, pressão alta e insuficiência renal.²⁷ Esses medicamentos também estão associados a problemas como o diabetes e os efeitos colaterais no metabolismo, como falência renal em pacientes que tiveram outros órgãos transplantados, podendo levar à necessidade de um segundo transplante.²⁷⁻²⁹

O tratamento imunossupressor objetiva minimizar a rejeição e a inflamação prevenindo a rejeição aguda. Novas pesquisas concentram-se em permitir que as dosagens de drogas mais tóxicas possam ser reduzidas sem que aumentem os riscos da rejeição aguda, minimizando a ocorrência de efeitos colaterais, inclusive insuficiência cardíaca e renal.³⁰⁻³²

Adicionalmente aos efeitos colaterais causados pela terapia medicamentosa, existem as complicações associadas à transmissão de doenças infecto-contagiosas devido ao potencial antigênico do material a ser implantado.

No enxerto xenógeno, o material é oriundo de um organismo de espécie diferente, como por exemplo, matriz orgânica de osso bovino e osso desproteinado, já amplamente comercializado no Brasil (Figura 10).

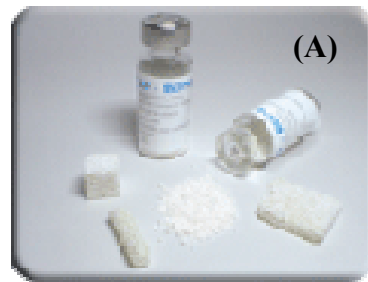


Figura 2.10: Materiais empregados no enxerto xenógeno: matriz mineral de osso bovino PRO-BONE[®] (A) e Gen-Ox (B), matriz orgânica de osso bovino (C).

A metalurgia é uma das ciências mais antigas da humanidade, sendo fácil entender a razão do domínio do homem sobre o metal quando se consideram as cruzadas. As próteses mais primitivas de que se têm notícia eram, na sua maioria, metálicas, fabricadas normalmente a partir do ouro, um metal nobre e de fácil processamento. A primeira

referência de restauração craniana na neurocirurgia utilizando-se metal data do século XVII, quando Fallopius implantou uma placa de ouro para restaurar um defeito craniano.³³

Apesar de alguns metais, como o titânio e suas ligas, considerados biocompatíveis, serem utilizados na prática odontológica, algumas características dos metais limitam sua aplicação como material implantável. Alguns metais são susceptíveis à corrosão e os produtos gerados podem, muitas vezes, ser tóxicos ao organismo humano. Os valores do módulo de elasticidade são muito superiores aos do osso não permitido muitas vezes que esse tecido receba estímulo mecânico. A Tabela 1 mostra os valores do módulo de elasticidade de alguns biomateriais e do osso.³⁴⁻³⁶

Tabela 2.1: Módulos de elasticidade de materiais sintéticos e o tecido biológico³⁴⁻³⁶

	Módulo de elasticidade (GPa)
Osso	13,6 a 35
Dentina	6,9 a 48
Ligas de Alumínio	69
Titânio	105 a 120
Vidro bioativo	80

Em odontologia os metais são utilizados principalmente na confecção de próteses e podem ser instalados tanto internamente à raiz dental como revestindo a própria coroa dos dentes. As ligas metálicas utilizadas para essas aplicações normalmente são compostas por 80% Ag, 19% Sn e 1% Cu (Pratalloy[®], Dentsply).

Os pinos metálicos são comumente utilizados para prover suporte mecânico e estabilidade às coroas protéticas a serem posteriormente instaladas. Esses pinos são cimentados no canal radicular previamente tratado e são de fundamental importância em casos clínicos em que a coroa dental encontra-se total ou parcialmente destruída. O preparo do canal e a instalação do pino devem ser criteriosamente executados pelo profissional para eliminar os riscos de que o próprio pino metálico provoque a fratura da raiz dental. Esse tipo de iatrogenia acarreta em perda não só da prótese como da raiz do elemento. A dureza do pino metálico e seu alto módulo de elasticidade exigem uma conduta cautelosa do profissional na execução do processo e instalação do pino a fim de evitar os danos à raiz dental remanescente.

Outra aplicação importante das ligas metálicas na odontologia é a confecção de coroas metálicas. Quando a coroa dentária encontra-se total ou parcialmente destruída por fratura ou ocorrência de cárie pode já não haver mais tecido para suportar uma restauração direta (executada em consultório pelo profissional através da inserção do material restaurador). O primeiro material a ser utilizado para a confecção de coroas protéticas foi o metal devido à sua resistência mecânica capaz de suportar as cargas mastigatórias a que os dentes estão expostos. Uma coroa protética é confeccionada em laboratório a partir de um modelo obtido após o preparo do elemento dental pelo cirurgião-dentista.

A crescente demanda por melhorias estéticas fez com que novos materiais fossem desenvolvidos e otimizados para o uso em odontologia. Ainda no século XIX são descritos relatos de estudos a cerca de incrustações de porcelana a serem utilizadas com finalidade estética. O método era baseado na trituração e adaptação da porcelana em dentes naturais preparados, mas só houve a utilização da porcelana como material restaurador efetivamente nas últimas décadas do século XX.

A porcelana apresenta hoje estética satisfatória, compatibilidade com os tecidos moles, condutibilidade térmica baixa e insolubilidade diante dos fluidos bucais. Por outro lado, a contração do material, a friabilidade sob esforços oclusais diretos, além do alto custo, são desvantagens que acabam tornando a porcelana um material com algumas limitações para a prática odontológica.

Na década de 60, Bowen desenvolveu um composto formado pelo Bis-GMA (Bisfenol-A metacrilato de glicidila), matriz orgânica com partículas de carga silanizadas que apresentava alto peso molecular e menor contração de polimerização, embora ainda exibisse alto risco de infiltração marginal.^{37,38} A partir da década de 80 houve o surgimento das resinas fotopolimerizáveis, que representaram um avanço entre os materiais restauradores odontológicos. Além de garantirem um resultado estético satisfatório essas resinas possibilitam o controle do tempo de trabalho pelo profissional na medida em que a reação de polimerização é desencadeada pela luz ultravioleta.

A matriz polimérica, que é a parte quimicamente ativa com monômeros que vão estabelecer ligações cruzadas no momento da polimerização conferindo resistência ao material, é comumente constituída pelo Bis-GMA (Bisfenol-A metacrilato de glicidila) ou UDMA (dimetacrilato de uretano). Existem ainda diluentes como o TEG-DMA (Dimetacrilato de trietileno gicol) ou EDMA (dimetacrilato de etileno gicol) que reduzem a viscosidade, embora aumentem a contração de polimerização do material após a reação

de polimerização. Para garantir o prolongamento da vida útil do material é adicionado um inibidor de polimerização, normalmente a hidroquinona.

São incorporadas à matriz polimérica partículas de carga (porção inorgânica) melhorando as propriedades físicas do material, possibilitando a diminuição da contração na polimerização e aumentando a resistência ao desgaste mecânico. As cargas comumente utilizadas são o quartzo, sílica coloidal, vidro de fluorsilicato de alumínio, além de bário e estrôncio. A adição dessas cargas garante ainda radiopacidade ao material possibilitando a avaliação clínica da resina utilizada através do monitoramento radiográfico.

Para iniciar o processo de polimerização a amina terciária reage com o peróxido de benzoíla ou luz com comprimento de onda de 470nm e ativa a canforoquinona (iniciador) reagindo mais eficazmente com as aminas terciárias.^{37,38}

A baixa resistência ao desgaste e o pouco brilho das resinas compostas em contraste com a excessiva dureza, grande friabilidade e altíssimo brilho das porcelanas, levaram os pesquisadores, no início da década de 80, a estudos sobre um material que fosse um intermediário entre ambos e apresentasse maiores semelhanças com o tecido dentário original.^{37,38}

Uma alternativa que tem garantido bons resultados tem sido os cerômeros, materiais modernos utilizados na odontologia formados por polímeros e carga cerâmica, que unem as vantagens das porcelanas odontológicas com a praticidade das resinas compostas. Trata-se de um material com variedade de tonalidades e que conta com propriedades mecânicas melhoradas em relação àquelas resinas compostas utilizadas nas restaurações dentárias por técnica direta. Os cerômeros são utilizados em coroas cimentadas sobre pinos metálicos, revestindo coroas metálicas ou ainda na confecção de coroas que dispensam a utilização de outro material.

Não só na prática odontológica como também na prática médica, outros materiais foram projetados para serem implantados no organismo como uma alternativa às limitações decorrentes da utilização de metais em determinadas situações que requerem, por exemplo, reabilitação estética.

Para um material substituir adequadamente o tecido ósseo é necessário ainda que apresente porosidade e que seja capaz de trocar íons com as adjacências, características essas presentes nas biocerâmicas, que surgiram então como um biomaterial para uso em processos que requeiram a restauração óssea.³⁹⁻⁴¹

Em 1894 surge a primeira cerâmica a ser utilizada como substituinte ósseo, o gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$). Por ser rapidamente absorvido pelo organismo e ter resistência mecânica

muito baixa, foi substituído, em 1920, por cerâmicas de fosfato tricálcico para a regeneração de defeitos ósseos e formação do novo tecido.³⁹⁻⁴¹

Com o passar do tempo surgiram diferentes materiais cerâmicos baseados no fosfato de cálcio, materiais esses cuja porosidade representa uma grande vantagem. Apesar de, isoladamente, o aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material a presença de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento do tecido através do biomaterial aumentando a resistência *in vivo*. A existência de poros possibilita que células oriundas do tecido adjacente migrem para o interior do material, resultando em um entrelaçamento que aumenta a resistência e a integração do implante no tecido possibilitando melhores condições para a neoformação tecidual.

A biocompatibilidade e similaridade química com o tecido ósseo propiciaram a utilização das cerâmicas baseadas na hidroxiapatita na medicina ortopédica e na prática odontológica. A hidroxiapatita constitui a porção mineral dos ossos e dentes do organismo, apresenta cálcio e fósforo em proporções muito similares às aquelas encontradas no tecido ósseo e exibe osteocondução quando implantada.

O uso clínico da hidroxiapatita sintética é bastante difundido, porém limitado devido a sua lenta biodegradação no organismo humano.^{39,40}

Em fraturas ósseas bastante circunscritas ou perdas ósseas muito reduzidas em regiões que não estejam submetidas a excessiva demanda funcional, o implante de hidroxiapatita pode ser utilizado como substituto do tecido ósseo perdido. Em contrapartida, quando é desejável a ocorrência de neoformação óssea, a utilização de hidroxiapatita torna-se limitada pela sua lenta biodegradação em organismo biológico. O implante de hidroxiapatita pode ser indicado, por exemplo, para fraturas na região do corpo da mandíbula, no entanto não é adequado para implantação no rebordo alveolar quando é necessário que esteja disponível um volume de tecido ósseo para receber um implante osseointegrável.

Na Idade Contemporânea inicia-se a utilização de polímeros nas Ciências da Saúde. Isto ocorre em razão destes sistemas complexos atingirem o auge com relação a sua caracterização e síntese somente no século XX.

As tendências atuais apontam para a combinação de materiais aproveitando os aspectos positivos e otimizando o prognóstico dos implantes, tanto do ponto de vista funcional quanto estético. Essas tendências incluem a combinação de núcleos metálicos, a melhoria dos polímeros por depósitos superficiais (como exemplo, cobertura com película de carbono), uso de matrizes semelhantes ao organismo (proteínas, cerâmicas bioativas,

cerâmicas biodegradáveis) e materiais absorvíveis como o polímero poli (ácido lático). Como exemplo dessa bem-sucedida combinação de materiais, temos a prótese de bacia, que substitui a articulação pélvica fraturada utilizando uma haste combinada a uma esfera metálica revestida por um material cerâmico como mostra a Figura. ⁴¹

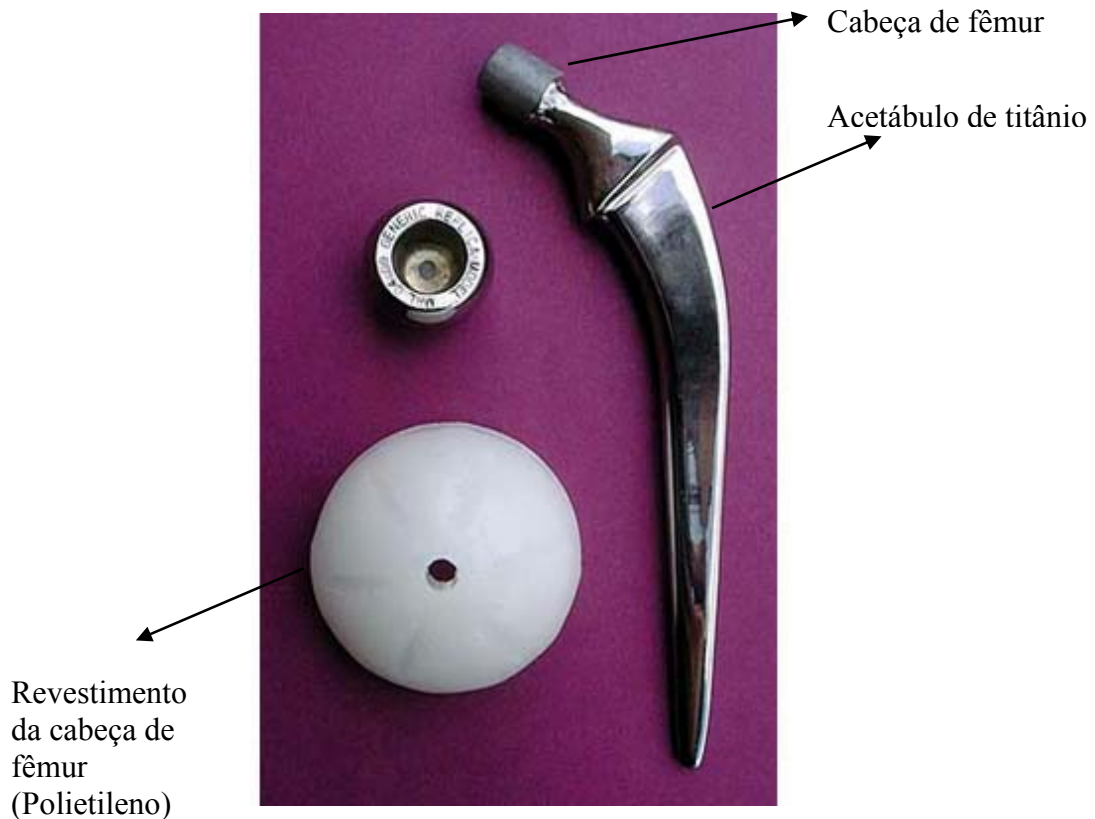


Figura 2.11: Representação esquemática de uma prótese de fêmur. ⁴²

A utilização de materiais sintéticos na prática clínica baseia-se em diferentes princípios da fisiologia óssea. Tais princípios envolvem a osteoindução, osteocondução e osteopromoção. ^{6,41,42}

A osteoindução é a propriedade das substâncias de induzir células indiferenciadas a diferenciarem-se em células osteoprogenitoras e estas em osteoblastos com posterior formação de novo tecido ósseo. A matriz óssea possui fatores protéicos indutores de diferenciação de novas células ósseas que foram designados BMP (proteína óssea morfogenética). Como exemplos dessa classe de materiais temos: osso autógeno, matriz orgânica de osso humano e bovino, fatores de crescimento, BMP.

Quando se trata de ocorrência de osteocondução o material sintético serve como arcabouço para a proliferação e migração de células osteoprogenitoras e sua posterior diferenciação em osteoblastos. No entanto, o material osteocondutor não promove a formação óssea quando implantado em tecido mole. As principais características de um bom material osteocondutor são a biocompatibilidade e a propriedade de reabsorção. Como exemplo de materiais osteocondutores, podemos citar a hidroxiapatita natural obtida de osso bovino, hidroxiapatita sintética, sulfato de cálcio, carbonato de cálcio e vidro bioativo.

A osteopromoção baseia-se na utilização de uma barreira física em forma de uma membrana de um material biocompatível recobrando a abertura do defeito ósseo e separando-o do tecido mole que é altamente proliferante. Esse tipo de membrana protege o defeito da invasão de células dos tecidos conjuntivo e epitelial adjacentes. O objetivo é dar tempo para que as células ósseas ocupem o espaço do defeito e formem posteriormente o novo tecido ósseo. Tais materiais podem ser reabsorvíveis ou não.^{6,41}

Membranas biocompatíveis, reabsorvíveis ou não, são muito empregadas na odontologia para estimular a regeneração óssea em defeitos ósseos na cavidade bucal e também nas áreas de traumatologia e ortopedia para tratamento de falhas ósseas. A utilização de membranas segue o princípio da regeneração óssea guiada, ou seja, a aplicação de uma barreira em forma de membrana em defeitos ósseos possibilita a osteopromoção. A membrana mantém a concentração dos fatores estimulantes da osteogênese, protege a área do defeito contra a invasão dos tecidos moles adjacentes altamente proliferantes e delimita a osteogênese no contorno ósseo desejado. Fatores como constituição, morfologia, textura de superfície, tamanho de poros e duração da integridade funcional podem influenciar no sucesso da utilização das membranas para a regeneração óssea.⁴³⁻⁴⁵

A membrana não absorvível de politetrafluoretileno é ainda a mais usada em odontologia devido às suas excelentes propriedades mecânicas, biocompatibilidade, facilidade de manipulação e oclusividade celular. Como se faz necessária uma segunda cirurgia para removê-la, pode haver indução de recessão gengival em casos de cirurgias periodontais.⁴⁶

Para eliminar a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico, membranas absorvíveis foram desenvolvidas, como as de poli (ácido lático), de poli (ácido glicólico) e de colágeno bovino. O colágeno parece apresentar baixa atividade antigênica e biocompatibilidade superior a outros polímeros naturais. Para retardar a absorção precoce das barreiras de colágeno no organismo, são empregados agentes que provoquem a

reticulação, tais como o glutaraldeído, formaldeído, resinas epoxídicas ou tratamento físico com irradiação por raios gama ou por ultravioleta.^{45,47}

Ao contrário de alguns tecidos biológicos que se regeneram pela formação de um tecido fibroso, o ósseo conta com um alto poder de regeneração, principalmente por estar sendo frequentemente remodelado com osteoclastos reabsorvendo o tecido e osteoblastos repondo uma nova matriz óssea.

Já as lesões ósseas muito extensas, por exemplo, lesões de tíbia e fêmur, os defeitos ósseos mandibulares ou na base do crânio ocasionados por volumosas massas tumorais não se regeneram por serem preenchidas rapidamente por tecido conjuntivo adjacente. Esse tecido tem velocidade de proliferação e migração celular maior que o tecido ósseo e sua matriz extracelular inibe a proliferação de células osteoprogenitoras. As células osteoprogenitoras são as células tronco do tecido ósseo. São células indiferenciadas que darão origem às células do tecido como osteoblastos, osteoclastos e osteócitos.

Quando ocorre a implantação de um material no organismo e obtém-se uma resposta biológica específica com adesão entre os tecidos adjacentes e o material implantado classifica-se o material como bioativo.⁶

Os biomateriais bioativos e os biodegradáveis surgem como uma necessidade do desenvolvimento de materiais sintéticos que promovam a neoformação óssea. Entretanto, é fato bem conhecido da literatura que um problema significativo com relação ao implante de biomateriais é a infecção hospitalar. Este problema se agrava ainda mais quando o material sintético está em contato com a medula óssea.

2.4 Infecção hospitalar e os polímeros com atividade antimicrobiana

As infecções hospitalares são as mais freqüentes e importantes complicações a que estão sujeitos os pacientes receptores de próteses.⁴⁸ A maioria das infecções é de origem endógena, ou seja, a contaminação ocorre na maioria das vezes no período intra-operatório tornando necessária a utilização de antibioticoterapia no período pós-implante. Esse procedimento apresenta as desvantagens inerentes ao uso de antibióticos, principalmente se for utilizada por tempo prolongado. O principal inconveniente é o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos utilizados.^{48,49}

Existem muitos trabalhos na literatura que utilizam revestimentos bioativos com propriedades antimicrobianas. Neste caso, os materiais utilizados como revestimento, tais como as biocerâmicas, garantem propriedades antimicrobianas ao implante aliadas às características mecânicas do material utilizado. Como exemplo, podemos citar o recobrimento de ligas metálicas com fosfato de cálcio, já utilizado clinicamente.⁵⁰

Muitos compostos bioativos para o combate da infecção resultante do implante de próteses foram desenvolvidos pela indústria farmoquímica. Dentre aqueles de maior significado clínico estão antibióticos como a vancomicina, cefalosporina, ampicilina e o metronidazol.⁴⁸

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídico usado no tratamento das infecções bacterianas; não produzido em ribossoma, mas sim por enzimas específicas. Não é absorvível no intestino e é administrada via intravenosa, exceto no tratamento de infecções do próprio intestino. A vancomicina é eficaz contra bactérias Gram-positivas e ineficaz contra *Streptococcus*. É um antibiótico usado como último recurso em casos de multi-resistência. O mecanismo de ação da vancomicina é a inibição da síntese da parede celular da bactéria. Com parede celular deficiente as bactérias não resistem às pressões osmóticas e morrem. Não haviam sido registrados casos de resistência à vancomicina até 2002. O surgimento de resistência à vancomicina, um dos últimos recursos para tratar *Staphylococcus* multi-resistentes, indica que existem cepas de *Staphylococcus* que são resistentes a todos os antibióticos em uso atualmente.⁵¹

As cefalosporinas formam um grupo de antibióticos beta-lactâmicos relacionados com as penicilinas, usados no tratamento de infecções bacterianas. Como todos os antibióticos beta-lactâmicos (como as penicilinas), as cefalosporinas interferem na síntese da parede celular de peptidoglicano via inibição de enzimas envolvidas no processo de transpeptidação. Há resistência em algumas cepas devido à disseminação de plasmídeos que codificam o gene da proteína beta-lactamase, que destrói o antibiótico antes que possa ter efeitos.

A primeira geração de cefalosporinas tais como a cefalotina, cefalexina, entre outras é efetiva contra algumas espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* embora não sejam a primeira escolha. Também eficazes contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. As cefalosporinas de segunda geração são mais eficazes contra bactérias Gram-negativas, mais resistentes à beta-lactamase. Podemos citar a cefuroxima, cefamandol, entre outras.

As cefalosporinas de terceira geração, dentre elas a cefotaxima, são muito eficazes contra Gram-negativas e em infecções hospitalares. As cefalosporinas de quarta geração apresentam mesma atividade contra Gram-negativas, mas mais potentes para Gram-positivas do que os de terceira geração. Neste caso, a cefipima e a cefpiroma são mais resistentes à degradação por beta-lactamase (mais eficazes contra estirpes parcialmente resistentes).⁵²

A ampicilina é uma penicilina semi-sintética, obtida a partir do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), de elevado consumo na medicina. A rota atual de produção conhecida como "rota química", utiliza solventes altamente tóxicos e baixas temperaturas e, portanto, está restrita a países com exigências ambientais limitadas (como China e Índia). Outros países apenas importam a ampicilina como princípio ativo para comercialização. Uma rota de produção por via enzimática está em desenvolvimento (utilizando a Penicilina G Acilase, PGA), conhecida como "rota verde", cujo objetivo é realizar a síntese em meio aquoso e em temperatura próxima a ambiente, permitindo que o composto seja produzido em outros países e com risco ambiental mais reduzido.⁵³

A ampicilina foi a primeira penicilina semi-sintética que mostrou ação contra bacilos gram-negativos abrindo o campo de penicilinas de amplo espectro. Por ser antibiótico bactericida, apresenta mecanismo de ação semelhante ao das outras penicilinas. Entretanto, a ampicilina tem maior afinidade a proteína fixadora da penicilina 3, que é responsável pela formação de septos no momento da divisão da célula bacteriana. Dessa forma, age sobre o microorganismo sensível em um prazo médio de 6 a 120 minutos.

A resistência dos microorganismos às penicilinas limita sua indicação na prática clínica. Os microorganismos tornam-se resistentes às penicilinas por inativação do antibiótico por beta-lactamases bacterianas, através do rompimento do anel beta-lactâmico do núcleo das penicilinas, redução na permeabilidade da membrana externa e, conseqüentemente, uma menor capacidade do antibiótico atingir as proteínas ligantes apropriadas ou alteração ou diferenças estruturais nas proteínas ligantes à penicilina. A resistência ao antibiótico pode ocorrer por um desses mecanismos ou combinação dos mesmos.⁵³

O metronidazol é uma penicilina ativa quase exclusivamente para microrganismos anaeróbicos. É menos ativo que a clindamicina para anaeróbios que não *Bacteroides fragilis*. A ação bactericida do metronidazol é devida ao fato de, ao penetrar na célula, ser 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. Com a ruptura da estrutura helicoidal do DNA, a célula bacteriana morre. O metronidazol afeta todas as células independentemente de estarem se dividindo ou não.⁵⁴

O metronidazol está indicado na profilaxia e tratamento das infecções causadas por bactérias anaeróbias como *Bacteroides fragilis* e outros bacteróides, *Fusobacterium sp*; *Clostridium sp*; *Eubacterium sp*. Está indicado, também, na prevenção e tratamento das infecções pós-cirúrgicas, nas quais os anaeróbios tenham sido identificados ou suspeitados.⁵⁵

A Figura 12 ilustra as estruturas químicas dos principais antibióticos utilizados na prática clínica pós-implante de próteses sintéticas.

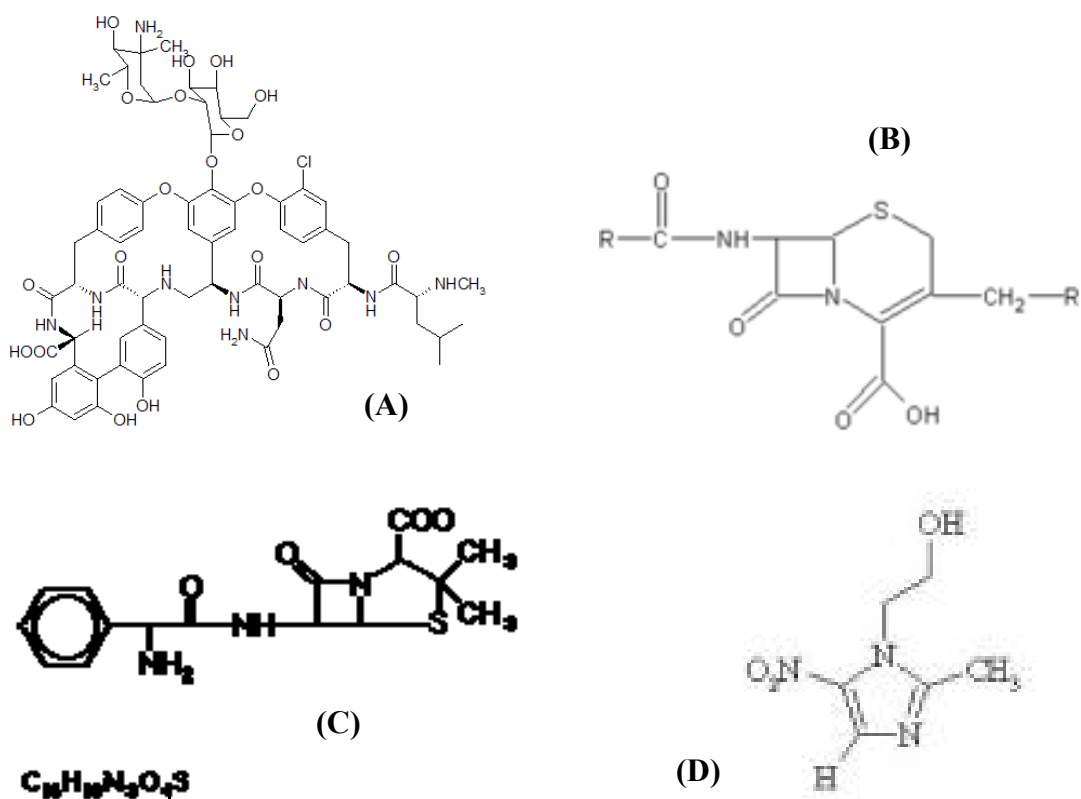


Figura 2.12: Estrutura química da vancomicina (A), cefalosporina (B), ampicilina (C) e metronidazol (D).^{52,56-58}

As infecções hospitalares podem levar a um processo de bacteremia transitória, a rejeição do material implantado e até mesmo ao óbito, além de elevar o custo do tratamento e o tempo de internação do paciente.

Em relação aos implantes odontológicos, a ocorrência de infecção interfere ainda na cicatrização óssea impossibilitando a ocorrência de osseointegração e acarretando a necessidade da realização de uma nova cirurgia ou até mesmo na rejeição definitiva do implante. Entende-se por osseointegração o processo em que ocorre uma fixação clínica e assintomática de materiais aloplásticos que são mantidos durante oclusão funcional.⁵⁹

A principal desvantagem da antibioticoterapia é o desenvolvimento de resistência ao fármaco, além de ocorrer também a depressão do sistema imunológico do paciente. Nas últimas três décadas tem-se procurado a obtenção de próteses intrinsecamente antimicrobianas. Neste caso, compostos bioativos como a hidroxiapatita, podem ser ligados covalentemente à prótese ou simplesmente revesti-la formando um filme com propriedades bioativas quanto à sua atividade antimicrobiana.

A indução do crescimento ósseo e o combate à infecção podem ser promovidos utilizando-se sistemas latenciados, especialmente projetados para uma função específica: a liberação de um hormônio de crescimento ou, o combate da infecção com a liberação de um antibiótico específico.

Sistemas para a liberação controlada de fármacos têm sido desenvolvidos para aumentar o crescimento ósseo e a regeneração no tratamento dos defeitos ósseos. Devido à pobre circulação sanguínea nos locais com defeitos ósseos, fármacos como antibióticos, antimicrobianos e fatores de crescimento precisam suprir as regiões afetadas.

Muitos transportadores têm sido desenvolvidos para encapsular fármacos, como polímeros biodegradáveis (sintéticos ou naturais) e as cerâmicas bioativas nas formas de partículas, membranas e matriz porosa.⁶⁰

Os sistemas de liberação controlada, freqüentemente descritos como “*drug delivery systems*”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional, tais como:⁶¹

- ✓ Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz;
- ✓ Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- ✓ Natureza e composição dos veículos variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura);
- ✓ Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);

- ✓ Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- ✓ Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas.

Observa-se na literatura que, de maneira geral, os principais fármacos utilizados no combate à infecção são os antibióticos, entretanto a utilização por tempo prolongado pode levar a ocorrência de resistência bacteriana ao fármaco.

A utilização de antimicrobianos para prevenir a infecção do local cirúrgico é um procedimento corriqueiro na prática clínica tanto na preparação para o procedimento operatório quanto no pós-cirúrgico.⁴⁹

O agente antimicrobiano deve estar presente nos tecidos manipulados quando há exposição aos microrganismos, ou seja, durante o procedimento cirúrgico sua concentração tecidual deve ser mantida embora alterações hemodinâmicas locais levem-na a decair. Embora raramente a contaminação do sítio operatório possa ocorrer após o término do procedimento, existe uma preocupação com o ambiente cirúrgico e com a profilaxia bacteriana.

Um antimicrobiano adequado deve exibir mínima toxicidade, baixo custo, induzir mínima ou nenhuma resistência bacteriana, ter farmacocinética adequada e possuir atividade contra a maior parte dos patógenos causadores de infecção.⁶²

Podem ser utilizados como agentes antimicrobianos para profilaxia cirúrgica a cefuroxina para infecções com enterobactérias de alta frequência ou em caso de necessidade de concentração no Sistema Nervoso Central e a cefalotina quando há necessidade de repetição intra-operatória. Há ainda algumas contra-indicações quanto a alguns antimicrobianos, pois com a utilização da vancomicina pode haver ocorrência de bactérias gram⁺ resistentes aos glicopeptídeos e a cefoxitina deve ter uso restrito na profilaxia cirúrgica e o tempo de uso não deve exceder 48 horas.

Algumas combinações de antimicrobianos são utilizadas como a clindamicina associada à gentamicina, cuja infusão rápida pode provocar bloqueio neuromuscular e interferir na recuperação pós-anestésica. Este efeito, no entanto, não ocorre com infusão lenta (20 a 30 minutos). A associação de ampicilina, gentamicina e metronidazol é considerada por alguns como um esquema de 1ª linha, embora perda em simplicidade e praticidade quando comparada aos fármacos utilizados isoladamente.⁶²

A Tabela 2 mostra alguns parâmetros a serem utilizados com relação ao uso de antibioticoterapia profilática para o combate de infecção.

Tabela 2.2: Parâmetros para antibioticoterapia profilática ⁶²

Parâmetro	Recomendação	Comentário
Objetivo da profilaxia	Prevenção da infecção no sítio cirúrgico	Não previne outras infecções. Eficácia limitada, não substitui outras medidas.
Início da profilaxia	Aproximadamente 1 hora antes do início da cirurgia ou na indução anestésica.	Profilaxia iniciada mais que 2 horas antes ou 3 horas após incisão não possui eficiência comprovada. Profilaxia em trauma obedece a normas diferentes.
Escolha do antimicrobiano	Deve ser pouco tóxico e não deve ser aquele utilizado para infecções hospitalares graves.	As cefalosporinas de 1 ^a e 2 ^a geração são, na maioria das situações, os que melhor se encaixam nesse contexto.
Dose inicial do antimicrobiano	Deve ser a dose tradicional do antimicrobiano	Para pacientes com peso ≥ 80 kg a primeira dose poderá ser o dobro da convencional.
Doses adicionais no intra-operatório	Devem ser realizadas em caso de perda maciça de sangue ou quando a duração do procedimento se prolonga	Repetição intra-operatória numa frequência maior do que em outras situações de uso do mesmo antimicrobiano é recomendada.
Duração da profilaxia	Na maioria das situações não deve exceder o período intra-operatório.	Mesmo em situações de risco ou em contaminações acidentais, o prolongamento da profilaxia não está associado a um melhor resultado clínico. Exceção em procedimentos selecionados, os quais não há consenso em literatura, como implante de prótese e cirurgia cardíaca.

É fato conhecido na literatura que os sistemas poliméricos a serem utilizados em processos de restauração óssea devem possuir como características fundamentais a biodegradabilidade e a bioreabsorção.

Entende-se por biodegradabilidade a degradação da macromolécula e dispersão do sólido *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, resultando em fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo.⁶³

Materiais bioreabsorvíveis degradam através da hidrólise de ligações éster ou amidas com conseqüente redução do peso molecular, sendo reabsorvidos *in vivo* e eliminados metabolicamente pelo organismo. Bioreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais.⁶³

2.5 Considerações finais

A necessidade crescente de substituir o tecido ósseo perdido ou lesionado do corpo humano tornou o estudo dos biomateriais um amplo campo de pesquisa na atualidade. A ocorrência de perda óssea, seja por causas naturais ou acidentais, resulta muitas vezes na necessidade de materiais que estimulem a neoformação do tecido perdido restaurando o organismo tanto estrutural quanto estética e funcionalmente.

Para que esses materiais sejam aceitos para essa finalidade é necessário que apresentem uma série de características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas compatíveis com sua aplicação, atoxicidade a fim de garantir longevidade necessária ao implante e remodelação tecidual.

Os biomateriais são necessários tanto na prática médica como odontológica e a ocorrência de infecções tem se tornado um fator limitante para sua aplicação.

A ocorrência de infecções é, atualmente, a principal causa de rejeição dos materiais implantados no organismo biológico, além de comprometer a saúde sistêmica do paciente.

Na grande maioria dos casos clínicos, constata-se que a contaminação ocorre no período intra-operatório sendo, portanto, de indiscutível importância a presença de um agente antimicrobiano no sítio cirúrgico.

Polímeros ou copolímeros biodegradáveis que apresentem atividade antimicrobiana têm sido merecedores de muitos estudos para aplicação como materiais enxertáveis por aliarem, às características de biomateriais, a capacidade de prevenirem a ocorrência de infecções pós-cirúrgicas.

Este trabalho baseia-se no estudo de um copolímero biodegradável que apresente simultaneamente propriedades antimicrobianas adequadas para implante em organismo biológico prevenindo a ocorrência de infecções.

2.6 Referências:

- [1]ROSSI, R.J.; ARUN, K.G. **Implantodontia - Bases Clínicas e Cirúrgicas**, Robe Editora, p.225, 1996.
- [2]LAURECIN C.T., KHAN Y. **Medicine**, 2002.
- [3]Universidade Federal de São Paulo, Unifesp Virtual, Guia de Histologia, disponível em <http://www.virtual.epm.br/material/histologia/histo/images/33.jpg>. Acesso em fevereiro de 2006.
- [4]Universidade Federal de Alfenas, Ciências Biológicas, imagens de histologia, disponível em <http://www.unifal-mg.edu.br/academico/material/CB/Histologia/osteoclasto.jpg>. Acesso em fevereiro de 2006.
- [5]Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise disponível em http://www.sbmm.org.br/galeria_0050.htm. Acesso em fevereiro de 2006.
- [6]BETTI, L.V.**Análise microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos**. Doutorado apresentado à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Bauru, 2004.
- [7]TERRY,T.M. Lecture notes: aminoacids and proteins <http://wwwfac.mcdaniel.edu/Chemistry/CH3321JPGs/Proteins/Collagen.jpg>. Acesso em fevereiro de 2006.
- [8]Universidade Federal de Alfenas, Ciências Biológicas, imagens de histologia, disponível em <http://www.unifal-mg.edu.br/academico/material/CB/Histologia/osso%20seco%20lixado.jpg>. Acesso em fevereiro de 2006.
- [9]JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: **Histologia Básica** 9ª ed., cap. 8, p. 111-128, Ed.Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.
- [10]BARBOZA,E.P.; CAÚLA,A.L.; MACHADO, F.O. Densidade óssea no planejamento em implantodontia, disponível em <http://www.odontogeral.hpg.ig.com.br/densidadeossea.html>. Acesso em fevereiro de 2006.
- [11]CANALIS, E. The hormonal and local regulation of bone formation. **Endocr. Rev.**, v.4, n.1, p.62-77, 1983.
- [12]DUONG,L.T.; RODAN,G.A. Regulation of osteoclast formation and function. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v.2, p. 95-104, 2001.

- [13]FULLER, K.; GALLAGHER, A.C.; CHAMBERS, T.J. Osteoclast resorption: stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.181, n. 1, p. 67-73, 1991.
- [14]KATCHBURIAN,E.; ARANA, V. Tecido ósseo. In: **Histologia e embriologia oral**. São Paulo, Panamericana, cap. 3, p. 40-75, 1999.
- [15]KAWAMOTO, S.; NAGAOKA, E. The effect of estrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. **J. Oral Rehabil.** v.27, n.7, p. 587-594, 2000.
- [16]KESSEL, R.G. Tecido conjuntivo: osso e formação óssea. In: **Histologia médica básica: a biologia das células, tecidos e órgãos**. Trad. M.c. Engelhardt, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap. 7, p. 129-145, 2001.
- [17]MANOLAGAS, S.C.; JILKA,R.L. Mechanisms of diseases: bone marrow, cytokines and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, v.332, n.5, p. 305-311,1995.
- [18]SCHENK, R.K. Bone regeneration: biologic basis. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R.K. **Guided bone regeneration in implant dentistry**, cap. 3, p.59-100, Quintessense Books, Chicago, 1994.
- [19]La nariz de Tycho Brahe, Grupo de Astronomía y Cosmología Academia de Ciencias Luventicus, 2003, disponível em <http://www.luventicus.org/articulos/03C004/index.html>, acessado em maio de 2006.
- [20]Biografias da Física, Tycho Brahe, disponível em http://www.conviteafisica.com.br/home_fisica/biografia/biografia_tycho.htm, acessado em maio de 2006.
- [21]CHATEL,P. **O Castelo das Estrelas**, Edusp, São Paulo, 1990.
- [22]ROSSI,R.J.; ARUN,K.G. **Implantodontia- Bases Clínicas e Cirúrgicas**, Robe Editora, p.225, 1996.
- [23]YUAN, H.; KURASHINA, K.; BRUIJN, J.D.; LY, Y. ; DE GROOT, K.; ZHANG, X. **Biomaterials**, v.20, p.1799-1806, 1999.
- [24]Folha on line, 06/02/2006, disponível em <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u14249.shtml>.
- [25]Grupo de apoios ao transplantado, medicamentos imunossupressores, disponível em http://www.abto.org.br/populacao/gat/medicamentos_imunossupressores.htm.
- [26]ABBAS, A.K.; POBER, J.S.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**, 4 ed, Ed. Revinter, 2002.

- [27]DANOVITCH, G.H. Immunosuppressant-induced metabolic toxicities. **Transplant. Rev.**, v.14, p.65-81, 2000.
- [28]VANRENTERGHEM, Y. Strategies to reduce or replace steroid dosing. **Transplant. Proc.**, v.31, p.7S-10S, 2000.
- [29]OJO, A.O.; HELD, P.J.; PORT, F.K. et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ., **NEJM**, v.349(10), p.931-940, 2003.
- [30]FRANCOIS, H.;DURRBACH, A.; AMOR, M.. et al. The long-term effect of switching from cyclosporin A to mycophenolate mofetil in chronic renal graft dysfunction compared with conventional management. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.18, p.1909-1916, 2003.
- [31]BARYALEI, M.; ZENKER, D.; PIESKE, B. et al. Renal function and safety of heart transplant recipients switched to mycophenolate mofetil and low-dose cyclosporine. **Transplant. Proc.**, v. 35, p.1539-1542, 2003.
- [32]GONWA, T.; MENDEZ, R.; YANG,H.C. et al. Randomized trial of tacrolimus in combination with sirolimus or mycophenolate mofetil in kidney transplantation: results at 6 months. **Transplant.**, v.;75, p.1213-1220, 2003.
- [33]SANAN, A; HAINES, S.J. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. **Neuros.**, v.40, n.3, p.588-603,1997.
- [34]Young's modulus, disponível em http://em.wikipedia.org/wiki/Young's_modulus. Acesso em maio de 2006.
- [35]BEARDSLEY,C.L.; HEINER,A.D.;MARSH,J.L.; .BROWN, T.D. Mechanical characterization of a bone fracture surrogate, 23rd annual meeting of the American Society of Biomechanics, University of Pittsburgh, 1999, disponível em <http://asb.biomech.org/onlineabs/abstracts99/059/index.html>
- [36]SILVA JR, P.E.; OREFICE, R.L. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli(metacrilatodemetila) **Polím. cienc. tecn.**, v.11, n.3, p.109-115, 2001.
- [37]BOWEN, R.L. Properties of silica reenforced polymer for dental restorations. **J. Amer. Dent. Ass.**, v. 66, n.1, p.57-64, 1963.
- [38]PHILLIPS, R.W. **Materiais Dentários**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.
- [39]CAMPOS, S.D.; CAMPOS, E.A.; SILVEIRA, C.B.; BINI, R.A. Biomateriais à base de Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ preparados com serragem e com glucose de milho: influência na porosidade e na cristalinidade **Cerâmica**, v.51, p.319 São Paulo, 2005.

- [40]MALMONGE, S.M.. Biomateriais: desenvolvimento e aplicações, Univ. Metodista de Piracicaba, disponível em <http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/palbiomat.ppt#266,1,Slide 1>. Acesso em novembro de 2005.
- [41]MORAES, P.C.; PADILHA FILHO, J.G.; CANOLA J.C.;SANTOS, L.A.; MACORIS, D.G.; ALESSI, A.C.;CASTRO, M.B.; DÓRIA NETO, F.A. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cir Bras** [serial online] 2004 Jul-Ag;19(4). Disponível em: <http://www.scielo.br/acb> . Acesso em fevereiro/2005
- [42]Medical replicas hips, Patient informations models, disponível em <http://www.medical-replicas.com/index.asp?next=hips>. Acesso em maio de 2006.
- [43]ZELLIN, G.; LINDE, A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J. Plast. Reconstr. Hand. Surg.**, v.31, p.97-104, 1997.
- [44]LINDE, A. et al. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J. Periodontol.**, v.64, n.11, 1116-128, 1993.
- [45]KELLOMÄKI, M. et al. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. **Biomaterials**, v.21, p.2495-2505, 2000.
- [46]ZELLIN, G.; LINDE, A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. **Biomaterials**, v.17, n.7, p.695-702, 1996.
- [47]LEE, C.H. et al. Biomedical applications of collagen. **Int. J. Pharm.**, v.221, p.1-22, 2001.
- [48]FERRAZ A.A.B.; FERRAZ, E.M. Antibioticoprofilaxia em cirurgia, Univ. Federal de Pernambuco , disponível em <http://www.cbc.org.br/atualizacao/fasciculos/121/antibioterapia.htm>. Acesso em março de 2006.
- [49]CORDAS C.M. Biomateriais: utilização e controle em meio fisiológico, disponível em http://www.proformar.org/revista/edicao_13/biomateriais.pdf
- [50]ANDRADE, A.L.; DOMINGUES,R.Z. Cerâmicas bioativas : estado de arte, **Quím. Nova**, v.29, n.1, p.100-104,2006.
- [51]Vancomicina, Wikipédia, a enciclopédia livre, disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Vancomicina>. Acesso em novembro de 2005.
- [52]Cefalosporina, Wikipedia, a enciclopédia livre, disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cefalosporina>. Acesso em novembro de 2005.
- [53]Ampicilina, Wikipedia, a enciclopédia livre, disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ampicilina>. Acesso em novembro de 2005.

- [54]CAMPOS,T. **Principais antibióticos usados em odontologia- metronidazol**, disponível em <http://www.farmaonline.ufg.br/modules.php?name=News&file=article&sid=51>. Acesso em fevereiro de 2006.
- [55]Bulário Eletrônico da Anvisa, disponível em <http://bulario.bvs.br/index.php?action=search.2004032517143702685377000157&mode=dir&letter=M>. Acesso em novembro de 2005.
- [56]<http://sitemaker.umich.edu/mc7/files/vancomycin.png>
- [57]Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Medicina de Bogotá, disponível em <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/images/ampicil.gif>. Acesso em fevereiro de 2006.
- [58]BAUMANN, K. Chemometrik & QSAR in Würzburg, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie disponível em <http://www.pharmazie.uni-wuerzburg.de/AKBaumann/arzneistoffanalytik/Structures/Metronidazol.jpg>. Acesso em fevereiro de 2006.
- [59]FIGUEIREDO, C.M.S. Doença periodontal em implantes ósseo-integrados, **Medcenter.com-Implantodontia**, disponível em <http://odontologia.com.br/artigos/doença-periodontal-em-implantes.html>, acessado em março de 2006.
- [60]KIM, H.W.; KNOWLES, J.C.; KIM, H.E. Hydroxyapatite poly(e-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**, v.25 p. 1279-1287, março-abril 2004
- [61]AZEVEDO, M.M.M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. Disponível em http://lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqs_monografias_marcelo_nanoesferas.pdf. Acesso em janeiro/2005
- [62]MACHADO, A.; FERRAZ, A.A.B.; FERRAZ, E.; ARRUDA, E.; NOBRE, J.; KONHEWICZ, L.R.; PIMENTEL, M.L.; LEÃO, M.T.C.; TRABASSO, P.; GRIMBAUM, R. Prevenção da infecção hospitalar, Sociedade Brasileira de Infectologia, 2001, disponível em http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/065.pdf
- [63]VERT, M.; LI, M. S.; SPENLEHAUER, G.; GUERIN, P. **J. Mater. Sci.**, v.3, p.432, 1992.

3. APLICAÇÕES DE POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS EM MEDICINA/ODONTOLOGIA

Inicialmente, o interesse por polímeros biodegradáveis está baseado em sua resistência à biodegradação e relativa inércia. Uma ênfase especial tem sido dada à obtenção de polímeros baseados no amido.^{1,2} O amido é um polissacarídeo com cerca de 1.400 resíduos de glicose que funciona como substância de reserva para muitas plantas. O grão de amido é uma mistura de dois polissacarídeos: amilose e amilopectina.^{1,2}

A amilose é uma macromolécula constituída de 250 a 300 resíduos de D-glicopirranose, ligadas por pontes glicosídicas α -1,4, que conferem a molécula uma estrutura helicoidal. A amilopectina é uma macromolécula, menos hidrossolúvel que a amilose, constituída de aproximadamente 1400 resíduos de α -glicose ligadas por pontes glicosídicas α -1,4, ocorrendo também ligações α -1,6. A amilopectina (Figura 1) constitui, aproximadamente, 80% dos polissacarídeos existentes no grão de amido.

O amido é sintetizado em estruturas vegetais denominadas plastídeos: cromoplastos das folhas e amiloplastos de órgãos de reserva, a partir da polimerização da glicose, resultante da fotossíntese.^{1,2}

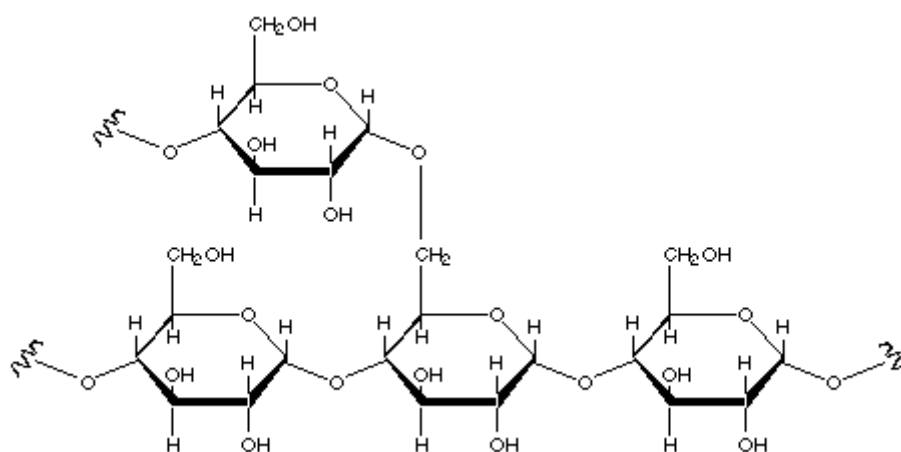


Figura 3.1: Estrutura da amilopectina.

O amido é encontrado na forma de grãos nas sementes, caules, raízes de várias plantas como trigo, mandioca, arroz, milho, feijão, batata e outras constituindo, portanto, uma matéria-prima inesgotável no meio ambiente. O amido é encontrado abundantemente

na natureza graças ao cultivo extensivo e intensivo de cereais, é renovável, de baixo custo e pode ser convertido química, física e biologicamente em compostos úteis à indústria.

Em face ao contexto atual, uma nova tecnologia vem revolucionando o mercado de descartáveis: é o amido termoplástico, produzido a partir do amido. O amido, sob pressão e temperatura adequadas, e na presença de um agente plastificante, pode ser gelatinizado, e sob efeito de cisalhamento se transformar em um material fundido, denominado amido termoplástico.

O estudo para o emprego do amido termoplástico na substituição do plástico convencional (de origem petroquímica) destinado a algumas aplicações específicas vem ganhando força e recebendo considerável atenção no cenário dos recursos renováveis.³

Quando biodegradado ou incinerado o amido libera CO₂ para a atmosfera. Estas características do amido têm despertado um interesse acentuado pelo mercado de polímeros convencionais através da sua incorporação em misturas poliméricas.

Recentemente as pesquisas têm se voltado para o estudo do uso do amido derivado do milho em misturas com os polímeros biodegradáveis PCL (poli (caprolactona)), PHB (poli (hidroxibutirato)) e PHBV (poli (hidroxibutirato-co-valerato)). Objetiva-se a obtenção de novos materiais que apresentem uma maior velocidade de degradação, ou seja, a obtenção de materiais que após o seu descarte minimize os danos ao ambiente. Além disso, esses polímeros teriam um custo mais baixo, uma vez que o amido é um material de baixo custo (valor estimado de U\$ 0,50/kg).^{4,5}

A incorporação do amido em polímeros biodegradáveis provoca mudanças na morfologia sendo constatado que as propriedades mecânicas são reduzidas significativamente com o porcentual de amido incorporado.^{4,5} No entanto, a incorporação de cerca de 25% em massa de amido tem permitido a obtenção de materiais com valores de módulo de elasticidade razoáveis para a utilização como, por exemplo, plásticos biodegradáveis^{3,4}

Os biomateriais poliméricos e seus compósitos podem ser classificados em bioestáveis, parcial ou totalmente biodegradáveis. Os primeiros causam uma resposta tecidual mínima, mantêm suas propriedades durante anos e são praticamente inertes. Os implantes totalmente absorvíveis, por outro lado, são capazes de serem totalmente eliminados pelo organismo após sofrerem hidrólise.

Os polímeros parcialmente absorvíveis são também hidroliticamente instáveis, mas não são metabolizados e eliminados pelo organismo não dispensando uma segunda cirurgia para retirada do implante após cicatrização do tecido.⁶

Segundo a *American Standard for Testing and Methods* (ASTM-D-833), polímeros biodegradáveis são polímeros degradáveis nos quais a degradação resulta primariamente da ação de microrganismos como, por exemplo, bactérias, fungos e algas de ocorrência natural. Frequentemente derivam desse processo CO₂, componentes celulares microbianos, entre outros.⁷

Com o avanço das pesquisas após a década de 60, os polímeros hidroliticamente instáveis, ou biodegradáveis, passaram a despertar interesse das áreas médica e farmacêutica, permitindo aplicações no encapsulamento de drogas para liberação controlada no organismo do paciente, implantação de pequenas partes do corpo como cartilagens, pequenos enxertos de vasos sanguíneos, substituição de válvulas cardíacas e substituição temporária de tecidos aguardando a regeneração. A capacidade dos polímeros biodegradáveis se adequarem a diferentes situações e a flexibilidade de se projetar polímeros com características únicas garantiram uma diversidade de aplicações desses materiais como biomateriais há mais de 50 anos.⁶⁻⁸

Além de ser biocompatível, um sistema de liberação de drogas implantado no organismo deve ter componentes quimicamente inertes, não carcinogênicos, hipoalergênicos, mecanicamente estáveis e não devem causar resposta inflamatória no local da aplicação. O direcionamento do fármaco a sítios-alvo específicos no organismo é claramente identificável e bastante estável por não ser reconhecido por macrófagos do sistema de defesa. Os polímeros utilizados para implante podem ser biodegradáveis ou não, podendo ser classificados em matriciais (ou monolíticos) e reservatórios.

Nos sistemas biodegradáveis poliméricos matriciais o fármaco encontra-se disperso na matriz ou adsorvido na sua superfície e é liberado por difusão pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou ambos. A taxa de liberação depende da escolha do polímero. No caso de polímeros não-degradáveis a liberação ocorre por difusão lenta pela matriz.

Nos polímeros utilizados como reservatórios, o fármaco encontra-se em uma cavidade central envolta por uma membrana polimérica que controla sua taxa de liberação. Esse sistema inclui membranas, cápsulas, monocápsulas, lipossomos e fibras ocas. Quando são utilizados polímeros não-biodegradáveis a liberação do fármaco ocorre também apenas por difusão pela membrana.^{9,10}

Os sistemas controlados quimicamente usam a erosão dos polímeros que resulta na absorção dos resíduos pelo organismo. Quando existem ligações covalentes entre o fármaco e o polímero pode haver liberação por quebra da ligação pela ação da água ou de enzimas.

Os sistemas biodegradáveis requerem controle no que diz respeito à cinética de degradação do polímero, que deve permanecer constante para que seja obtida liberação controlada do fármaco *in vivo*. Variáveis como pH e temperatura podem promover alterações na velocidade de degradação do implante.

Os principais fatores responsáveis por alterações no período de degradação dos polímeros biodegradáveis são:⁹

- Estrutura química e composição do sistema
- Distribuição da massa molecular do polímero
- Presença de monômeros e oligômeros
- Tamanho e forma da superfície do sistema
- Morfologia dos componentes do sistema (amorfo, semicristalino, cristalino)
- Local de implantação do sistema
- Mecanismo de hidrólise.

As Figuras 2 e 3 ilustram as diferentes formas farmacêuticas e mecanismos de liberação de fármacos de matrizes poliméricas.

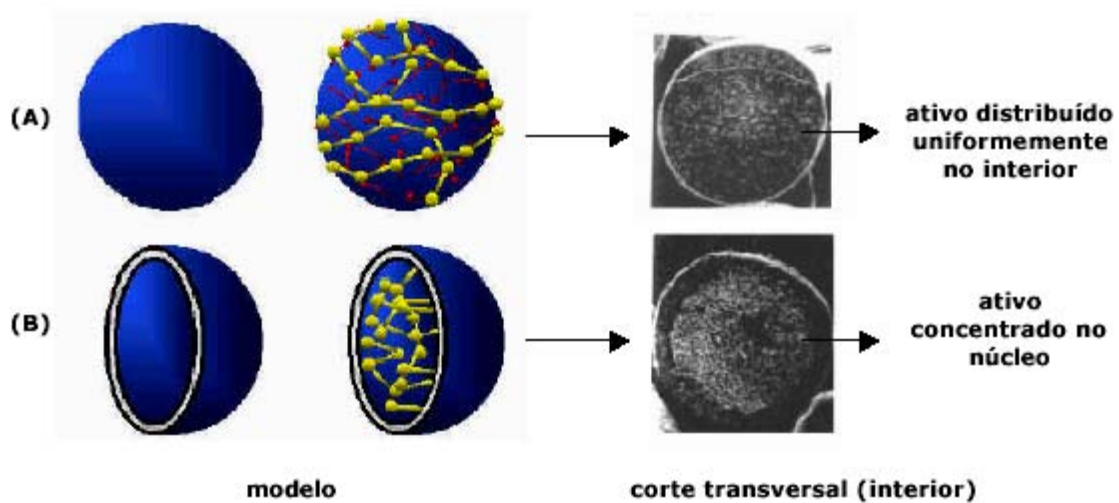


Figura 3.2: Exemplos das diferentes formas farmacêuticas de liberação controlada: (A) esfera (sistema matricial) e (B) cápsula (sistema reservatório).

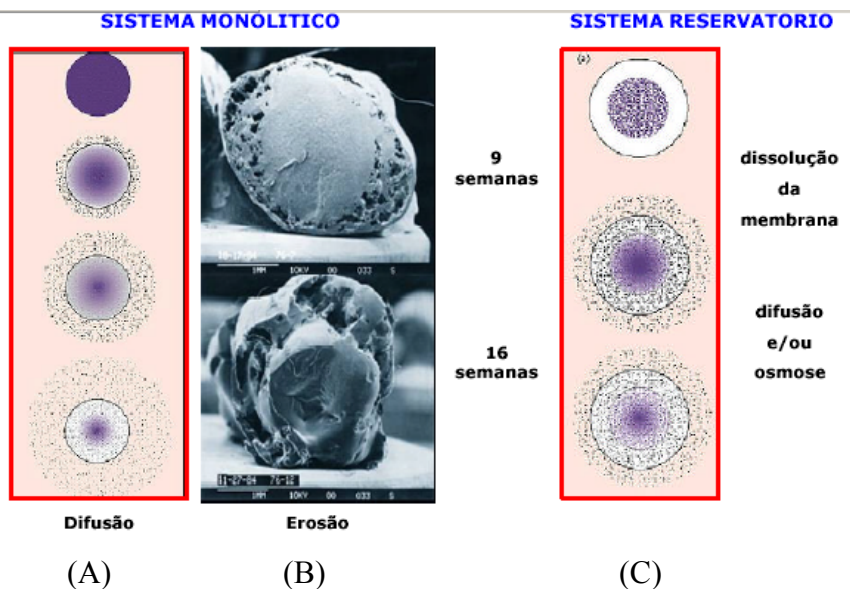


Figura 3.3: Mecanismos de liberação do princípio bioativo por difusão (A), erosão (B) e liberação pelo sistema reservatório (dissolução ou difusão) (C).

O interesse por polímeros biodegradáveis tem crescido muito nos últimos anos mundialmente apesar do alto custo de produção desses polímeros em relação aos polímeros sintéticos convencionais. A criação de polímeros passíveis de sofrerem degradação natural constitui uma alternativa ao processo de reciclagem.

O Brasil tem posição privilegiada como produtor de biopolímeros. O PHB obtido a partir da sacarose é um método de custo reduzido com matéria-prima abundante, sendo o Brasil o único país que produz este biopolímero por fermentação do açúcar da cana. O plástico produzido a partir do PHB pela planta-piloto é exportado para Estados Unidos, Alemanha e Japão.¹¹

Empresas de grande porte como a Du Pont, Bayer, Basf, 3M, Sony entre outras têm investido nas pesquisas para a produção de biopolímeros no Brasil e no exterior, muitas vezes em parceria com universidades.⁷

O Instituto Nacional de Propriedade Industrial aliado à Universidade Federal de Minas Gerais patenteou a técnica de encapsulamento de insulina em microesferas de polímeros biodegradáveis derivados dos ácidos glicólico e lático. Essa técnica constitui um avanço no modo de aplicação do medicamento podendo ser administrado na forma de aerossol em substituição às injeções subcutâneas aplicadas em pacientes diabéticos.¹² O

microencapsulamento da insulina resulta em estabilidade do hormônio e facilita a absorção pelo organismo, além de conforto na aplicação e eficiência do tratamento. As doses aplicadas poderão ser menores e o efeito mais satisfatório, uma vez que os alvéolos pulmonares são mais facilmente permeáveis que o tecido conjuntivo. Não há, no entanto, empresa no país que se interesse pela produção desse tipo de inovação tecnológica.¹²

Na área oftalmológica foram desenvolvidos implantes em forma de bastão para serem instalados na porção posterior do olho.¹² Enquanto o material polimérico se degrada no organismo, fármacos são liberados. Por enquanto, as pesquisas com o implante oftalmológico se concentram nos medicamentos destinados ao tratamento das uveítes. Trata-se de uma inflamação do trato uveal, composto pela íris, corpo ciliar e coróide (membrana situada na frente da retina). Denominam-se uveítes também as inflamações em estruturas adjacentes, como a retina e o nervo óptico. O tratamento convencional para essa inflamação consiste em colírios à base de corticóide. Entretanto, na maioria das vezes, essa prática não gera resultados, tornando-se necessária a utilização do medicamento por via oral ou injeções intra-oculares. Além de dolorido, o tratamento quase nunca dá bons resultados e é causa de cegueira em grande proporção da população afetada. O tratamento usando material polimérico biodegradável representaria neste caso um avanço em termos de conforto e segurança para o paciente.¹²

Os polímeros sintéticos têm sido reconhecidos e estudados na engenharia de tecidos biológicos bem como para a obtenção de compósitos para utilização em implantes e reconstruções ósseas, principalmente devido à sua biodegradabilidade e boa interação com o organismo biológico.

Tanto os polímeros naturais quanto os sintéticos têm sido utilizados em sistemas poliméricos de liberação de drogas e não só permitem uma liberação lenta e gradual do ingrediente ativo, como também podem possibilitar o direcionamento a alvos específicos do organismo, como sítios de inflamação ou tumor.

A liberação controlada de fármacos é conveniente ao paciente, seja do ponto de vista de seu conforto e adesão ao tratamento, seja do menor custo em hospitais, com menor necessidade de internações, remoções cirúrgicas de implantes e complicações pós-cirúrgicas. No entanto, uma dificuldade seria interromper a ação farmacológica do medicamento, no caso de intoxicação ou alguma intolerância, inclusive com risco de acúmulo do fármaco se não for acompanhada convenientemente a sua farmacocinética.

Os polímeros naturais, à base de proteínas, como as albuminas bovina e humana, o colágeno e a gelatina têm uso restrito devido à atividade antigênica marcante e a maior

susceptibilidade à degradação que acarreta em uma permanência prolongada de fragmentos no organismo.⁹

Dentre os polímeros biodegradáveis abordados pela literatura e mais utilizados na área médica podemos citar o poli (ácido lático), polietilenoglicol, poli (hidroxibutirato) e poli (ϵ -caprolactona). A Figura 4 mostra a crescente utilização desses polímeros como biomateriais.

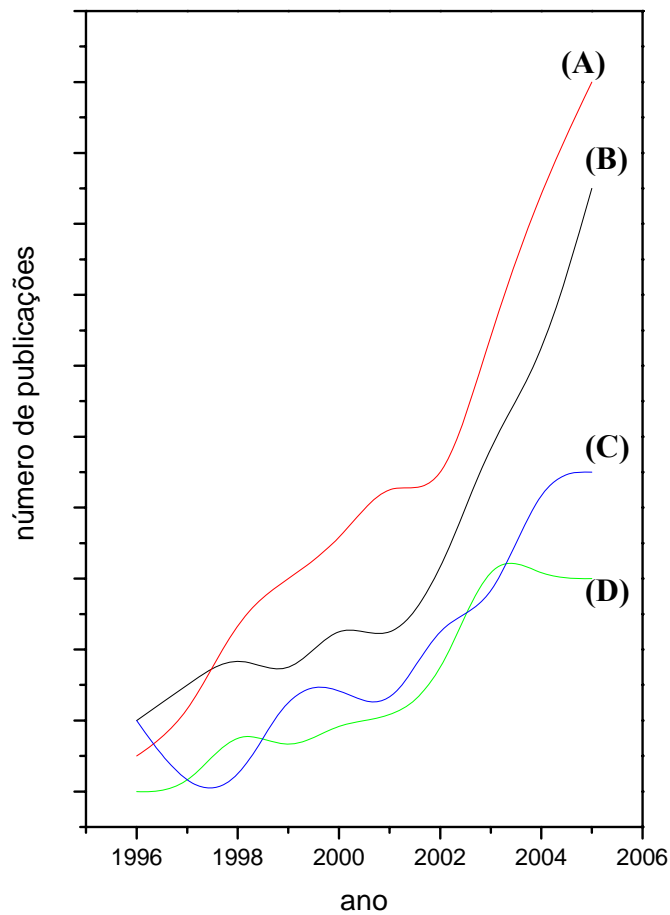


Figura 3.4: A evolução nas pesquisas sobre a aplicação dos polímeros biodegradáveis na medicina. Fonte: Science Direct. PEG (A), PLA (B), PCL (C), PHB (D).

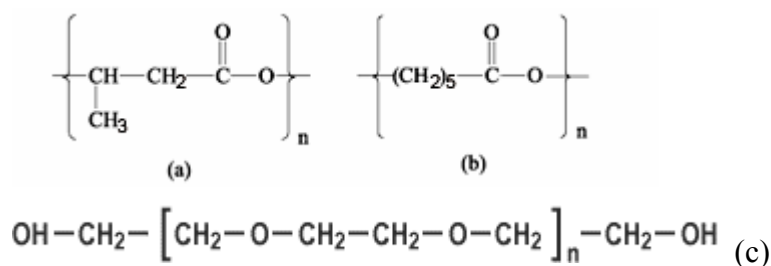


Figura 3.5: Estrutura química do PHB (a), PCL (b), PEG (c)

O poli (ácido lático) (PLA) é um poliéster relativamente hidrofóbico instável em presença de umidade, biodegradável a subprodutos atóxicos e produzido a partir de recursos renováveis. O PLA possui isômeros L-D, o isômero L (PLLA) é biocompatível, biologicamente inerte, tem longo tempo de biodegradação e boas propriedades mecânicas. Os produtos da degradação do PLLA (CO₂ e H₂O) são reabsorvidos pelo organismo fazendo parte do metabolismo dos carboidratos. Trata-se de um polímero injetável amplamente utilizado em cirurgias dermatológicas por estimular a produção de colágeno. Tem sido utilizado em cirurgias de reconstrução de tecidos lesionados ou perdidos por fortalecer o tecido remanescente e devolver forma a face do indivíduo.^{13,14}

Os polímeros derivados do ácido lático e glicólico têm recebido muita atenção nas pesquisas a cerca de polímeros biodegradáveis alternativos, sendo que o órgão norte-americano *Food and Drug Administration* (FDA) já aprovou estes polímeros para utilização como sistema de liberação de drogas, uma vez que existem diversos estudos demonstrando sua baixa toxicidade.

Os polímeros derivados do ácido lático proporcionam boas propriedades mecânicas, baixa capacidade alergênica, baixa toxicidade, excelente biocompatibilidade e uma cinética previsível de biodegradação despertando atenção de vários pesquisadores quanto às suas possíveis aplicações em tecnologia farmacêutica.⁶

Os polímeros derivados do PLA são obtidos por reação de condensação através da abertura do anel dos dímeros cíclicos (ácido lático e/ou glicólico). A polimerização ocorre por um período de 2 a 6 horas sob temperatura de 175°C utilizando como catalisador principalmente o cloreto estanhoso. Durante o processo pode ser adicionado álcool laurílico para o controle da massa molecular do polímero resultante.

A biodegradação do poli(ácido lático) ocorre por erosão ou por clivagem da cadeia polimérica por glicólise liberando ácido lático. A presença do grupo metila (CH₃) no

polímero derivado do ácido láctico confere maior hidrofobicidade quando comparado ao derivado do ácido glicólico.⁹

A utilização de polímeros de ácido láctico na área médica começou nos EUA na década de 60. Até então os polímeros não atraíam a atenção dos pesquisadores devido ao processo de biodegradação em contato com água. Por volta de 1966 pesquisadores norte-americanos perceberam que a partir de moléculas de ácido láctico poderiam criar um polímero não tóxico, degradável e facilmente metabolizado pelo organismo. A partir de então, pinos metálicos usados em fraturas ósseas começaram a ser substituídos pelos pinos obtidos a partir de ácido láctico.¹⁵

Os polímeros utilizados nas pesquisas com encapsulamento de insulina são derivados dos ácidos láctico e glicólico, tal como os utilizados na confecção de fios biodegradáveis para sutura. Esses polímeros são também utilizados na área oftalmológica na forma de um bastão biodegradável inserido na parte posterior do olho cuja confecção é baseada na composição do pó contendo o fármaco e o polímero.¹²

O poli (hidroxibutirato) (PHB) (Figura 5) é um polímero natural de uma classe dos polímeros termoplásticos produzidos por síntese microbiana. Neste caso o microrganismo utiliza o PHB como reserva para a obtenção de carbono e como fonte de energia para o caso da ausência de um ou ambos. Os polímeros dessa classe, poli (hidroxialcanoatos), em condições apropriadas de cultura bacteriana são acumulados na forma de grânulos intracelulares de PHB, gerando um polímero com propriedades semelhantes às dos polímeros de origem petroquímica, com a vantagem de serem susceptíveis a biodegradação no ambiente por microrganismos nele existentes em curto espaço de tempo após o descarte. O tempo de degradação médio do PHB é de 6 a 12 meses.¹⁶

O PHB tem sido produzido no Brasil a partir da sacarose presente no açúcar.¹⁷ Foi desenvolvido um processo que facilita a obtenção desse polímero a partir do bagaço de cana hidrolisado, um resíduo da cana da indústria de álcool e açúcar para ser utilizado na fabricação de embalagens ambientalmente corretas.

As características físicas e mecânicas do PHB, tais como resistência à água, permeabilidade aos gases, estabilidade à radiação ultravioleta, são semelhantes às de alguns polímeros sintéticos que têm o petróleo como matéria-prima, mas oferecem o benefício de se decompor muito mais rapidamente quando descartados do que os polímeros convencionais.¹⁸

O PHB pode ser utilizado como matéria prima num vasto campo de aplicações, principalmente naqueles setores em que características como pureza e biodegradabilidade

são necessárias, a exemplo da área médico-farmacêutica. Por ser biocompatível e facilmente absorvido pelo organismo humano, pode ser empregado na fabricação de fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas que liberam gradualmente o fármaco na corrente sanguínea.¹⁷

O poli (etilenoglicol) (PEG) (Figura 5) é um polímero biodegradável amplamente difundido na área farmacêutica, tem peso molecular adequado, baixa densidade relativa e é solúvel em água. O PEG é muito utilizado na indústria farmacêutica e em formulações cosméticas.

Hidrogéis constituídos de PEG combinado à poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP) e ágar são utilizados como membranas para uso tópico, no tratamento de lesões de pele. São membranas reticuladas por radiação ionizante utilizadas como dispositivos médicos para uso tópico. A principal vantagem desta metodologia está na capacidade da radiação promover a reticulação em condições razoavelmente brandas, sem qualquer aditivo, além de promover a esterilização simultânea.¹⁹

O PEG tem sido utilizado como modificador de proteínas. A enzima lipase da *Candida rugosa* foi modificada com metóxi (polietileno glicol)-p-nitrofenil carbonato (NPC-mPEG). A lipase modificada reteve em 98% a atividade hidrolítica, em comparação com a não modificada. A modificação de proteínas se dá em função da otimização das características dessas proteínas para utilização em biotecnologia e aplicações biomédicas.²⁰

Para que materiais poliméricos possam ser utilizados como biomateriais é necessário que exibam características combinadas de biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e resistência mecânica adequada para implantação no organismo biológico.

Recentemente uma intensa atividade em pesquisa e desenvolvimento de materiais baseados no polímero poli (ϵ -caprolactona) tem sido observada. A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster bioreabsorvível com um enorme potencial para aplicações na medicina ortopédica. Este polímero possui vantagens significativas quando comparado ao poli (ácido lático) tais como seu baixo custo e a possibilidade de sua síntese em escala industrial. Muitos estudos atualmente estão sendo dirigidos para a obtenção de compósitos de PCL para utilização na prática clínica.

O projeto de sistemas biodegradáveis deve ser centrado não somente na obtenção do polímero, mas também na sua bioatividade quanto ao processo de restauração óssea e resistência ao ataque microbiano. É fato bem conhecido na literatura que o principal desafio no caso dos implantes sintéticos é a ocorrência de infecção, que eleva o custo do

tratamento devido à utilização de antibióticos ou ao maior tempo de internação ou leva o paciente ao óbito.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa tem se voltado para o projeto de copolímeros biodegradáveis com propriedades antimicrobianas que contribuam para a prática clínica, no sentido de eliminar o uso da antibioticoterapia, dado seu elevado custo e efeitos colaterais associados que reduzem a qualidade de vida do paciente.

3.1 Considerações finais:

Os cirurgiões ortopédicos estão amplamente familiarizados com os dispositivos metálicos para a fixação de fraturas, osteotomias e artroses. Entretanto, os implantes metálicos não estão isentos de complicações, decorrentes de fixação óssea. Eles deveriam ser removidos após a consolidação óssea, devido ao fenômeno de *stress-shielding* e podem provocar dor devido a sua localização subcutânea.

De acordo com a lei de Wolff (1892), a remodelação óssea ocorre sobre estresse, porém na presença de fixação rígida, através de implante metálico, este absorveria a maioria da tensão, ficando pequena parcela para o osso. Concomitante a tais fatos, poderia ocorrer osteoporose abaixo do implante, com diminuição da resistência óssea; liberação de íons metálicos dos dispositivos de fixação, reação do tipo corpo estranho e migração tardia dos parafusos metálicos.

O interesse pelo desenvolvimento de novos materiais utilizados em enxertos com função de restaurar, remodelar ou mesmo reforçar estruturas ósseas cresceu significativamente nas últimas décadas. Atualmente o uso desses materiais é bastante comum em obturações, após a curetagem de lesões cavitárias de tumores ósseos benignos e malignos, em revisões protéticas, principalmente do quadril em preenchimentos de falhas de continuidade devido a fraturas cominutivas ou esmagamentos, pseudartroses e osteomielites.

O emprego de enxerto de osso autógeno fresco, considerado por muitos médicos como material de eleição, traz alguns problemas como limitação do material, lesão ou enfraquecimento de outras estruturas ósseas e riscos inerentes a esse tipo de intervenção.

Os bancos de ossos (osso homogêneo) também apresentam problemas tais como alterações das propriedades mecânicas, dificuldades técnicas de esterilização e estocagem, além, dos custos elevados que essas técnicas acarretam.

A ausência de um substituto biológico que atenda perfeitamente às necessidades clínicas levou diversos pesquisadores a procurarem biomateriais sintéticos, para eventuais substituições ósseas. Materiais como gesso e cimento acrílico (polimetacrilato de metila) vêm sendo utilizados ao longo do tempo, mas apresentam inconvenientes mecânicos e biológicos.

Materiais compósitos e alguns polímeros reabsorvíveis também vêm sendo estudados e testados. Atualmente, desenvolveram-se biocerâmicas inertes reabsorvíveis e

bioativas como a hidroxiapatita sintética, fosfato tricálcico e os biovidros, respectivamente, com características vantajosas para o paciente.

Nas duas últimas décadas, vem aumentando o interesse pelo desenvolvimento de dispositivos de fixação totalmente degradáveis com propriedades mecânicas semelhantes às do osso. Os polímeros sintéticos biodegradáveis têm sido usados como sutura há mais de 20 anos e suas propriedades físicas e químicas são bem conhecidas.

Vários estudos experimentais com implantes biodegradáveis, em cirurgia ortopédica, têm sido publicados nos últimos anos e a efetividade de dispositivos biodegradáveis utilizados na fixação de fraturas tem sido comprovada pela prática médica.

A busca de um copolímero biodegradável com propriedades antimicrobianas contribuiria para a consolidação da fratura ao mesmo tempo em que reduziria o risco de rejeição pelo organismo, melhorando significativamente o prognóstico do implante.

3.2 Referências:

- [1]Wikipedia, a enciclopédia livre, disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Amido>. Acesso em novembro de 2005.
- [2]Química dos Polímeros e Aplicações - Parte II , disponível em http://www.systemmud.com.br/index.php?pg=literatura&sub=literatura_home&artigo=lit_002. Acesso em janeiro de 2006.
- [3]DA RÓZ, A. L Plástico Biodegradável preparado a partir de Amido, **Polímeros** v.13 no.4 São Carlos Oct./Dec. 2003.
- [4]Rosa, D.S.; Franco, B. L. M.; Calil, M.R Biodegradabilidade e Propriedades Mecânicas de Novas Misturas Poliméricas, **Polímeros** v..11 n.2 São Carlos, 2001.
- [5]Rosa, D.S. ;. Chui, Q.S.H; Pantano Filho, R. ;Agnelli, J. A. M Avaliação da biodegradação de poli- β -(hidroxibutirato), poli- β -(hidroxibutirato-co-valerato) e poli- ϵ -(caprolactona) em solo compostado, **Polím. Ciênc. Tecn.**, v.12, n.4, p.311-317, 2002.
- [6]SOARES, A.Q et al Polímeros biodegradáveis: novas perspectivas para as ciências farmacêuticas, **Rev. Eletr. Farm.**, vol2(2), 202-205, 2005.
- [7]FEYNMAN, R.P. **Da pedra lascada aos nanomateriais**, Instituto Inovação, disponível em www.institutoinovacao.com.br/estudos/estudomateriais.pdf. Acesso em setembro de 2005.
- [8]OREFICE,R.L. **Biopolímeros e polímeros biodegradáveis**, Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos, Universidade Federal de Minas Gerais, disponível em <http://www.demet.ufmg.br/docentes/rodrigo/biopolimeros.htm> Acesso em novembro de 2005.
- [9]FIALHO, S.L. et al Biodegradable implants for intraocular drug delivery, **Arq. Bras. Oftalmol.**, 66:891-6, 2003.
- [10]DURAN, N. ; AZEVEDO, M.M.M. **O que é nanobiotecnologia? Atualidades e perspectivas.** Disponível em http://www.ifi.unicamp.br/extensao/arq_down/nanobiotecnologiadoc. Acesso em janeiro de 2005.
- [11]SANTOS, Y.E. Produção de planta-piloto é exportada para EUA, Alemanha e Japão, disponível em <http://www.ipt.br/institucional/imprensa/midia/?ID=260>. Acesso em maio de 2006.

- [12] Cápsula com microesfera biodegradável reduz desconforto terapêutico; **Portal da Retina**, disponível em <http://www.portaldaretina.com.br/home/noticias.asp?id=86>. Acesso em novembro de 2005.
- [13] BEISER, I.H.; KANAT, I.O. Biodegradable internal fixation. A literature review **J. Am. Pediatric. Med. Association**, v.80, p.72-75, 1990.
- [14] IANNACE, S.; AMBROSIO, L.; HUANG, S.J.; NICOLAIS, L. Poly(3-Hydroxybutyrate)-co-(3-Hydroxyvalerate)/Poly-L-lactide blends: thermal and mechanical properties, **J. Appl. Polym. Sci.** v.54, p.1525-1536, 1994.
- [15] Polímeros ampliam sua utilização na área médica; **Ciência, Tecnologia & Meio Ambiente**, disponível em http://www.radiobras.gov.br/ct/1997/materia_211197_8.htm. Acesso em setembro de 2005.
- [16] COUTINHO, B.C et al **A importância e as vantagens do PHB**, <http://www.cefetrn.br>. Acesso em novembro de 2005.
- [17] Brasil aperfeiçoa plástico que não agride meio ambiente, **Ciência & Tecnologia**, http://www.radiobras.gov.br/ct/2002/materia_111002_3.htm. Acesso em novembro de 2005.
- [18] PHB- plástico biodegradável, disponível em <http://inventabrasilnet.t5.com.br/plastico.htm>. Acesso em novembro de 2005.
- [19] ROGERO, S.O. et al. Citotoxicidade *in vitro* das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 59, p.1-5, 2000.
- [20] ZACCHIGNA, M.; DI LUCA, G.; LASSIANI, L.; VARNAVAS, A.; BOCCÙ, E. Properties of methoxy(polyethylene glycol)-lipase from *Candida rugosa* in organic solvents **II Farmaco**, v.53, p. 758-763, 1998.

4. POLI (CAPROLACTONA) – GENERALIDADES

4.1 Constituição química e métodos de síntese

Alguns biomateriais são projetados para degradarem no organismo de maneira controlada por um período de implantação pré-determinado, de acordo com uma função particular. ¹ O polímero a ser utilizado como material implantável, por exemplo, em sistemas de liberação controlada de fármacos ou que sejam utilizados como arcabouço para sustentação de neoformação tecidual não devem exibir biodegradabilidade acelerada.

A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) tem sido alvo de intensas pesquisas na área de polímeros bioreabsorvíveis devido à combinação de suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. A Figura 1 mostra o crescente interesse por esse polímero em função das publicações de artigos científicos ao longo de quase uma década.

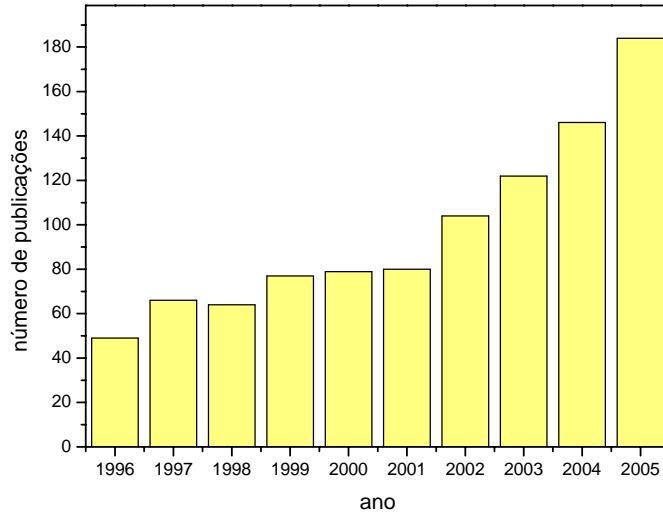


Figura 4.1: Artigos científicos publicados sobre a PCL nos últimos 10 anos. Fonte: Science Direct

Observa-se uma tendência de crescimento exponencial no número de publicações científicas ($N^{\circ}(P)$) da PCL para propósitos biomédicos em função do ano considerado (x) cuja equação prevista é dada por:

$$N^{\circ}(P) = 43,731e^{0,1309x}$$

Vários métodos de síntese do PCL têm sido propostos destacando-se a polimerização aniônica, iniciação radicalar ou por abertura de anel. Entre os vários métodos de polimerização, a polimerização por abertura de anel de lactonas cíclicas é uma importante alternativa, pois o processo não gera grupos que possam limitar a conversão do monômero em polímero.²

A recente introdução de enzimas para a síntese do PCL em solventes orgânicos é atrativa por desenvolver uma tecnologia sustentável e por seu potencial de sintetizar materiais não disponíveis por métodos químicos. A Novozyme-435, lipase B da *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa, tem sido efetiva para catalisar a polimerização por abertura de anel do monômero ϵ -caprolactona.^{2,3} Neste sentido, a utilização de líquidos iônicos como solvente orgânico para conversão enzimática do monômero ϵ -CL tem sido enfatizado pela literatura principalmente por não promoverem uma desativação enzimática como a que ocorre com alguns solventes, como por exemplo, o metanol. A literatura aponta como líquidos iônicos utilizados para a polimerização por abertura de anel da ϵ -caprolactona o PF_6 e BF_4 , que combinam o mesmo cátion com diferentes ânions. As reações experimentais foram conduzidas com lipase B *C. antarctica* imobilizada (Novozym 435). Esses solventes não apresentaram um avanço em relação às características dos polímeros obtidos com a utilização do tolueno devido à limitada miscibilidade do polímero obtido.³ Entretanto, o poder carcinogênico do tolueno aliado à sua baixa volatilidade contribuiu para a seleção do método enzimático como uma boa alternativa para a obtenção de PCL isento de resíduos do solvente aromático.

O crescimento da cadeia do poliéster em sistemas de iniciação enzimática envolve provavelmente a abertura do anel do monômero por ataque nucleofílico da lipase, rompendo a ligação C-O e a propagação da polimerização acontece pela adição de monômero ao fim da cadeia polimérica ativa.^{2,4}

Em geral, a polimerização por abertura de anel da ϵ -CL iniciada por complexos de ferro são exemplos de polimerização por mecanismo de coordenação-inserção. Estudos indicam que o complexo L_2^1Fe tenha alta atividade catalítica para polimerização por abertura de anel da ϵ -CL. A produção do polímero foi aumentada proporcionalmente ao aumento do tempo de polimerização enquanto o peso molecular médio foi reduzido. Essa

redução no peso molecular médio pode indicar uma reação de transesterificação inter ou intramolecular durante o processo de polimerização, embora o complexo de ferro deva inibir a reação de polimerização.⁵

De maneira geral, as policaprolactonas são obtidas pela polimerização via abertura do anel da ϵ -caprolactona na presença de álcoois; variando-se o álcool reagente, obtêm-se as caprolactonas dióis, trióis ou polióis, normalmente usadas na produção de poliuretanos de alta resistência ou de poliuretanos termoplásticos (TPUs).⁶ A reação de polimerização da poli(caprolactona) por abertura do anel da ϵ -caprolactona é ilustrada na Figura 2.

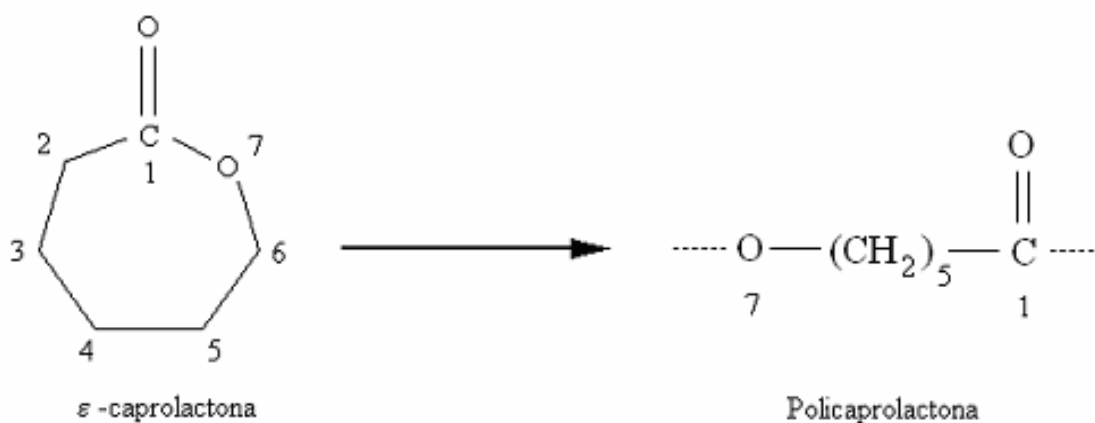


Figura. 4.2: Reação de polimerização por abertura de anel do monômero ϵ -caprolactona.

4.2 Principais utilizações do PCL na medicina e odontologia

Recentemente o polímero PCL tem se destacado por suas aplicações como matriz para o crescimento celular na engenharia de tecido ósseo, demonstrando possuir as propriedades mecânicas necessárias para servir como um arcabouço em enxertos aloplásticos, onde as propriedades mecânicas têm que ser mantidas até que o processo de restauração do tecido biológico se complete.⁷

A poli (ϵ -caprolactona) é um poliéster linear com caráter hidrofóbico como resultado da presença de cinco grupos metilênicos não-polares e um único grupo éster relativamente polar em cada unidade que se repete. Tem alta permeabilidade, natureza semicristalina, alta solubilidade, baixo ponto de fusão e estabilidade ao calor.^{8,9}

O PCL é um polímero reabsorvível que, devido à sua biocompatibilidade, é aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em seres humanos, sendo atualmente utilizado como um material de sutura e em sistemas de liberação controlada de fármacos.

Um biomaterial polimérico a ser implantado no organismo humano muitas vezes tem sido associado a um aditivo que absorve a raios X, uma vez que materiais poliméricos não são radiopacos, o que dificulta o acompanhamento da interação entre o material e o organismo biológico. Muitos dos aditivos utilizados para a obtenção de polímeros radiopacos são compostos minerais como sais de bário ou dióxido de zinco, entretanto, as propriedades do polímero podem ser afetadas pela incorporação desses aditivos, além do risco de ocorrência de toxicidade sistêmica à medida que ocorre a biodegradação. Outro método para tornar o polímero biodegradável radiopaco é ligar covalentemente à cadeia polimérica um agente que promova o radiocontraste, como o iodo.

Recentemente foi proposto um método para modificar quimicamente as cadeias alifáticas do PCL, baseado na ativação aniônica do polímero pela remoção de um próton do grupo metileno utilizando uma base não nucleofílica, como diisopropilamida de lítio (LDA). Utilizando-se o iodo como uma espécie eletrofílica obtém-se o copolímero I-PCL pela substituição do iodo na cadeia polimérica (Figura 3).¹⁰

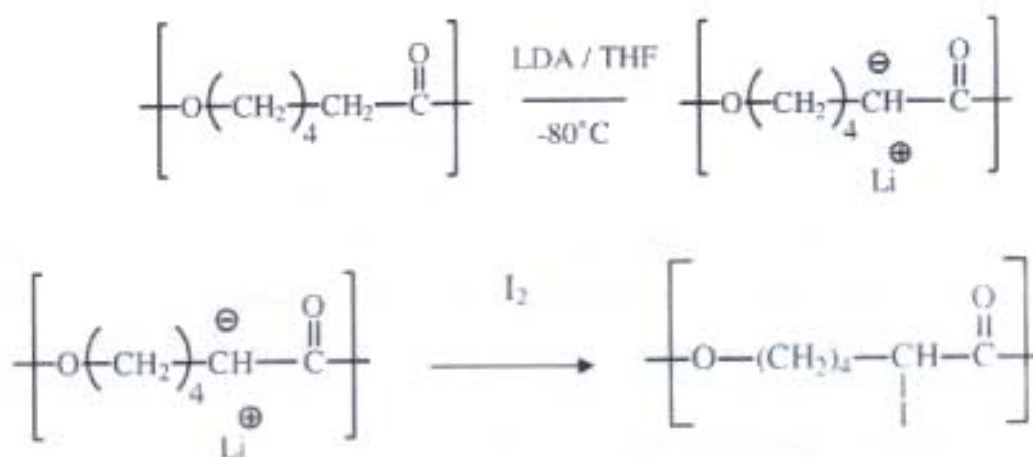


Figura 4.3: Esquema de adição de radiocontraste à PCL

Foi observado que a radiopacidade obtida esteve relacionada ao conteúdo de iodo no polímero. A adição de iodo resultou ainda em uma grande degradação hidrolítica devido à baixa cristalinidade e baixa massa molar do PCL. A literatura indica, pela análise de

difração de raios X, cristalinidade de 50% para o PCL enquanto a adição de iodo como radiocontraste reduziu para 42% a cristalinidade do polímero.¹⁰

A bioatividade da poli (ϵ -caprolactona) pode ser examinada pela formação de apatita em sua superfície quando imersa em SBF (*Simulated Body Fluid*), fenômeno este denominado de mineralização.¹¹ O fluido fisiológico simulado, ou SBF é uma solução cuja composição química foi desenvolvida por Kokubo e outros na década de 90 para simular as condições fisiológicas do organismo nos ensaios *in vitro*.¹² A Tabela 1 mostra a composição química do SBF.

Tabela 4.1: Composição da solução SBF (mg.L^{-1})¹²

	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl	HCO ₃	HPO ₄	SO ₄ ²⁻
PLASMA	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	148,0	4,2	1,0	0,5

Foi proposto um processo alternativo no qual o polímero é utilizado como substrato, sendo alternada e repetidamente imerso em solução com íons cálcio e íons fosfato. A apatita formada por esse processo é, entretanto, diferente estruturalmente da apatita óssea. Uma apatita similar à encontrada no osso pode ser obtida se depositada a partir de SBF com concentração iônica aproximadamente igual à do plasma sanguíneo humano.⁷ Assim, tem-se observado a formação de uma fina camada de apatita na superfície da poli (ϵ -caprolactona) mantida em SBF por 24 horas após o polímero ter sido previamente tratado com NaOH_{aq} em meio aquoso e dopado alternadamente com íons cálcio e fosfato. O compósito resultante apatita-PCL exibiu osteocondutividade, boa biocompatibilidade e biodegradabilidade.⁷

A superfície polimérica do PCL pode ser modificada com grupos funcionais que induzam a nucleação da apatita a partir da imersão em SBF. Grupos funcionais como Si-OH, Ti-OH, carboxila e carboxilato têm sido usados como grupos funcionais para promover a mineralização a partir da deposição de apatita no polímero.¹¹

O PCL também pode ser utilizado para a obtenção de compósitos a fim de obter materiais que aliem propriedades biocompatíveis e resistência mecânica. No sistema híbrido PCL/sílica o conteúdo do polímero pode ser aumentado em até 80% sem redução

do módulo de elasticidade, mas com uma redução significativa da habilidade de mineralização.¹¹

O polímero PCL tem sido utilizado para melhorar as propriedades mecânicas da hidroxiapatita. Para se aliar as propriedades de osteocondutividade e bioatividade, hidroxiapatita e PCL têm sido combinados para a obtenção do compósito HA-PCL.¹³

Tem-se observado na literatura que o PCL propicia a proliferação e diferenciação de fibroblastos e osteoblastos em cultura celular.¹⁴ A mais importante função dos osteoblastos é a mineralização do tecido, que é regulada por muitos fatores locais, entre os quais as proteínas morfogenéticas do osso (BMP). As BMP têm a função de induzir a diferenciação de células da linhagem osteoblástica e, portanto, aumentam o número de células maduras e acentuam a função de diferenciação dos osteoblastos. As BMP regulam o crescimento e a diferenciação das linhagens celulares de condroblastos e osteoblastos “in vitro”.

Arcabouços de PCL com fosfato de cálcio provaram ser osteocondutores, bioativos e atóxicos para células “in vitro”.¹⁴ A observação de adesão celular e colonização do arcabouço foram evidências de sua osteocondutividade. Ensaio “in vitro” sugerem que os compósitos PCL - fosfato de cálcio são biocompatíveis apresentando boa adesão e proliferação celular evidenciando osteocondutividade.¹⁴ A osteocondutividade, como já mencionado, é a capacidade das células migrarem, aderirem e proliferarem-se dando seqüência à síntese da matriz óssea.¹⁴

4.3 Propriedades biodegradáveis da poli (ϵ -caprolactona)

A biodegradabilidade deve ser um requisito para um material sintético que será utilizado no reparo ósseo, uma vez que a melhor maneira de se reparar um defeito ósseo é estimulando-se o próprio tecido ao auto-reparo. Para que ocorra uma substituição óssea ideal as propriedades mecânicas devem ser mantidas, ou seja, a degradação deve ocorrer num ritmo no qual seja possível que a regeneração óssea possa formar um tecido com as propriedades mecânicas mais próximas do tecido original.¹¹

A poli (ϵ -caprolactona) é um poliéster semicristalino alifático dotado de uma variedade de propriedades biocompatíveis como atoxicidade e reabsorção após período apropriado de implantação.¹⁵ A taxa de biodegradação da PCL pode variar

consideravelmente de acordo com as condições de sua síntese. O PCL e seus copolímeros possuem excelentes propriedades químicas e mecânicas que podem ser utilizadas para uma variedade de aplicações biomédicas.⁷

A principal peculiaridade deste polímero advém do seu mecanismo de biodegradação por hidrólise da ligação do éster e formação de produtos de decomposição que são intermediários normais do metabolismo celular. Como já foi citado anteriormente a taxa de decomposição da PCL pode variar de acordo com a copolimerização e com a sua formulação.¹⁵

Devido às suas baixas propriedades mecânicas, os compósitos PCL - material inorgânico têm sido preparados para aplicações clínicas mais específicas. As características de biodegradação da PCL são ressaltadas quando este polímero está associado em compósitos com cargas inorgânicas, como ocorre com a sílica híbrida. A PCL é, neste caso, responsável pela biodegradabilidade do sistema, portanto o controle da biodegradação dependerá do conteúdo do polímero no sistema. Este controle, no entanto, implica na determinação de um compósito PCL/sílica bioativo e biodegradável, ou seja, o controle do conteúdo do polímero não deve implicar em perda de bioatividade e propriedades mecânicas que sejam significativas para a recuperação do tecido biológico.¹¹

Considerando o compósito PCL-Si, é comprovado que a hidrofiliabilidade e a biodegradabilidade podem ser atribuídas à fase sílica e a fase polimérica, respectivamente. Quando mantido em SBF este compósito mostra a formação de uma camada de apatita de baixa cristalinidade podendo-se produzir também camada de apatita semelhante ao osso. Reafirma-se, portanto, a possibilidade de aplicar a PCL como substituto ósseo bioativo e reabsorvível.¹⁶

De modo geral, os copolímeros do PCL possuem um tempo de reabsorção maior que o poli(ácido glicólico) (PGA). Tais copolímeros podem ser úteis para o projeto de sistemas com tempo de reabsorção modulados, úteis para longos ou curtos intervalos de tempo para a regeneração óssea.

Devido à combinação única de biocompatibilidade, permeabilidade e biodegradabilidade, os polímeros e copolímeros do PCL são aplicados na medicina principalmente como sutura biodegradável e próteses reabsorvíveis.^{15,17,18}

O PCL é também utilizado na produção de materiais microporosos e pinos para reparos ósseos craniofaciais e maxilofaciais. Copolímeros em bloco de PCL-co-PGA (monocryl[®]) oferecem menor rigidez que o PGA puro para ser utilizado como material de sutura (Figura 4).⁹

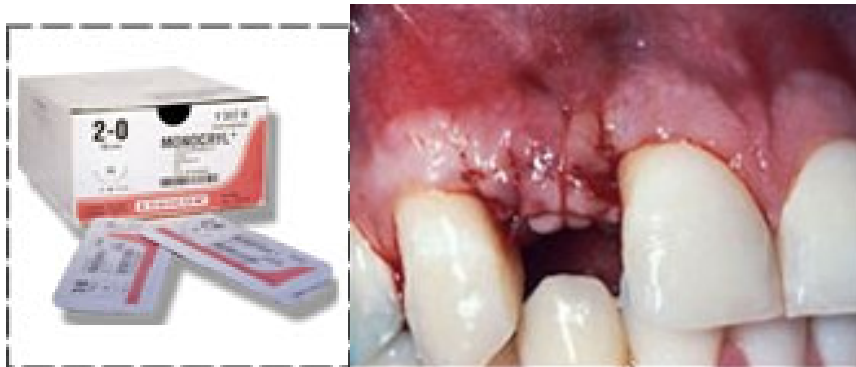


Figura 4.4: Embalagem comercial do fio de sutura Monocryl¹⁹ e sutura após exodontia²⁰

Na odontologia a poli (ϵ -caprolactona) é base de um composto termoplástico utilizado para obturação de canais radiculares no tratamento endodôntico oferecendo estabilidade hidrolítica e grau de resistência ao corte superiores aos cones de guta percha tradicionais.

Devido ao seu caráter hidrofóbico o PCL degrada mais lentamente permitindo a liberação de fármacos que devem ser ativos ao longo do tempo. Estudos têm sido realizados para encapsulamento de isoniazida, um agente microbiano, obtendo microesferas e nanoesferas com baixa polidispersividade para aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos.²¹

Observa-se na literatura um aumento significativo de sistemas de liberação controlada de fármacos baseados no polímero PCL. Tais estudos apontam para um aumento da eficácia terapêutica, redução da toxicidade e melhora do processo de administração ao paciente apresentando um avanço terapêutico em questões de segurança e comodidade.

4.4 Utilização da poli (ϵ -caprolactona) conjugada com agentes antimicrobianos

A maior causa do fracasso de implante de materiais sintéticos no organismo humano é a rejeição provocada pelo desenvolvimento de infecções sistêmicas que podem comprometer a saúde geral do paciente e levar ao óbito.

Não foi observada na literatura uma quantidade de trabalhos sobre PCL bioativo quanto à atividade antimicrobiana.²²⁻²⁵

O desenvolvimento de um PCL bioativo com relação às suas propriedades antimicrobianas pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de próteses implantáveis. Neste sentido, o PCL poderia atuar como um sistema de liberação controlada de um agente bioativo com propriedades antimicrobianas, prevenindo a proliferação bacteriana local.

Um princípio ativo natural que nos chama a atenção do ponto de vista da química farmacêutica é o eugenol. O eugenol possui a estrutura química de um fenol, um antisséptico clássico cujo uso na prática clínica remonta há pelo menos 1 século.

4.5 Considerações finais

As publicações científicas da última década evidenciam um interesse crescente pelo polímero poli(ϵ -caprolactona). A poli (ϵ -caprolactona) surgiu recentemente como um polímero adequado para uso na engenharia de tecidos biológicos pela combinação de sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas satisfatórias para utilização como arcabouço em enxertos ósseos.

A biodegradação da PCL por hidrólise resulta em subprodutos que são intermediários normais do metabolismo celular, por isso pode ser utilizada em aplicações biomédicas como suturas biodegradáveis, próteses reabsorvíveis e sistemas de liberação controlada de fármacos. O caráter hidrofóbico leva a uma degradação lenta, ideal para o projeto de sistemas de liberação controlada de compostos que devem permanecer bioativos por longos períodos, além de favorecer a osseointegração.

Alguns compósitos baseados no polímero PCL são apontados na literatura com o intuito de otimizar as propriedades mecânicas e biocompatíveis associando o polímero biodegradável com sílica, hidroxiapatita ou fosfato de cálcio.

A associação das características físico-químicas próprias da poli(ϵ -caprolactona) com agentes antimicrobianos incorporados poderia maximizar seu uso em aplicações biomédicas solucionando problemas relacionados à ocorrência de infecções. Neste trabalho procuramos associar as já conhecidas propriedades biocompatíveis do PCL e as vantagens de seu uso em implantes biológicos a um agente microbiano, a fim de apresentar uma alternativa para tratamentos de lesões ou defeitos do tecido ósseo. O agente antimicrobiano selecionado neste trabalho foi o fitoterápico eugenol. Uma discussão sobre a origem e as propriedades bioativas deste composto é assunto do próximo capítulo.

4.6 Referências

- [1] SAAD, B.; NEUENSCHWANDER, P.; UHLSCHMID, G.K.; SUTER, U.W. New versatile, elastomeric, degradable polymeric materials for medicine. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 293-301, 1999.
- [2] HE, F.; LI, S.; GARREAU, H.; VERT, M.; ZHUO, R. Enzyme-catalyzed polymerization and degradation of copolyesters of ϵ -caprolactone and γ -butyrolactone. **Polym**, v.46, p. 12682-12688, 2005.
- [3] MARCILLA, R.; GEUS, M.; MECERREYS, D.; DUXBURY, C.J.; KONING, C.E.; HEISE, A. Enzymatic polyester synthesis in ionic liquids. **Eur. Polym. J.**, v.42, p. 1215-1221, 2006.
- [4] PEREZ, Y.; HIERRO, I.; SIERRA, I.; GOMEZ-SAL, P.; FAJARDO, M.; OTERO, A. Polymerization of ϵ -caprolactone using bulky alkoxo-titanium complexes and structural analysis of $[\text{Ti}(\text{OBorneoxo})_2\text{Cl}_2(\text{thf})_2]$. **J. Organ. Chem.**, v.691, p.3053-3059, 2006.
- [5] CHEN, M.Z.; SUN, H.M.; LI, W.F.; WANG, Z.G.; SHEN, Q.; ZHANG, Y. Synthesis, structure of functionalized N-heterocyclic carbene complexes of Fe(II) and their catalytic activity for ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone. **J. Organ. Chem.**, v.691, p.2489-2494, 2006.
- [6] Glossário de termos básicos em ciência dos polímeros, IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry, 1996, <http://www.iq.ufrgs.br/solid/glossario.doc>. Acesso em novembro de 2005.
- [7] OYANE, A.; UCHIDA, M.; CHOONG, C.; TRIFFITT, J.; JONES, J.; ITO, A. Simple surface modification of poly(ϵ -caprolactone) for apatite deposition from simulated body fluid. **Biomaterials**, article in press, setembro 2004.
- [8] DE QUEIROZ, A. A. A.; FRANÇA, É. J.; ABRAHAM, G. A.; ROMÁN, J. S. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone by iodine charge-transfer complex. **J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.** v.40 p. 714, 2002.
- [9] Polímeros biodegradables com aplicaciones en suturas quirúrgicas biblioteca.upc.es/PFC/arxiu/migrats/34111-4.pdf
- [10] NOTTELET, B.; COUDANE, J.; VERT, M. Synthesis of an X-ray opaque biodegradable copolyester by chemical modification of poly (ϵ -caprolactone). **Biomaterials**, v.27, p.4948-4954, 2006.

- [11]RHEE,S.H. Bone-like apatite-forming ability and mechanical properties of poly(e-caprolactone)/silica hybrid as a function of poly(e-caprolactone) content. **Biomaterials**, v.25, p.1167-1175, 2004.
- [12]KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, Y. Solutions able to reproduce in vivo surface structure changes in bioactive glass-ceramic:A-W³, **J. Biom. Mat. Research** v.24, p.721-734, 1990.
- [13]KIM, H.W.; KNOWLES,J.C.; KIM, H.E. Hydroxyapatite poly (e-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**, v.25 p. 1279-1287, 2004.
- [14]RAL,B.; TEOH,S.H.; HO,K.H.; HUTMACHER,D.W., CAO,T.; CHEN, F.;YACOB,K. The effect of rhBMP-2 on canine osteoblasts seeded onto 3D bioactive polycaprolactone scaffolds. **Biomaterials**, v.25 p.5499-5506, 2004.
- [15]RHEE,S.H., CHOI,J.Y., KIM,H.M. Preparation of a bioactive and degradable poly(e-caprolactone)/silica hybrid through a sol-gel method. **Biomaterials**, v.23 p.4915-4921, 2002.
- [16]KLOSS, J.R.; DE TONI, F.; SILVA, M.R.X.; AKCELRUD, L.; OLIVEIRA, A.F.C.; ZAWADZKI, S.F. **Avaliação da morfologia de poliuretanos à base de PCL**, disponível em www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/1426. Acesso em novembro de 2005.
- [17]CYRAS, V.P. **Relación estructura, propiedades y procesamiento del material compuesto biodegradable obtenido a partir de policaprolactona/almidón y fibra sisal**, Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales, Universidad nacional de Mar Del Plata, tese de doutorado em Ciencia dos Materiais, junho/2001, disponível em www.materiales-sam.org.br. Acesso em novembro de 2005.
- [18]BAMONTE, E.; OLAZAR, L. **La era de los polimeros**, disponible em www.cnba.uba.ar/acad/quimica/act_5/10%20polimeros.pdf. Acesso em novembro de 2005.
- [19]Endocenter, material médico e hospitalar, disponível em <http://www.endocenterpe.com.br/ethicon.html>. Acesso em fevereiro de 2006.
- [20]Ridge augmentation with a folded acellular dermal matrix allograft : a case report , disponível em <http://www.thejcdp.com/issue007/fowler/05fowler.htm>. Acesso em novembro de 2005.

- [21] OLIVEIRA, A.F.; DURAN, N. **Encapsulação de isoniazida em micro e nanoesferas de poli(ϵ -caprolactona)**, disponível em www.prp.unicamp.br/pibic/xcongresso/pdfN/131.pdf - Resultado Adicional. Acesso em novebro de 2005.
- [22] D. S. Jones, J. Djokic, S. P. Gorman The resistance of polyvinylpyrrolidone–Iodine–poly(ϵ -caprolactone) blends to adherence of Escherichia coli **Biomaterials**, v.26(14), p.2013-2020, 2005.
- [23] D. S. Jones, J. Djokic, C. P. McCoy, S. P. Gorman Poly(ϵ -caprolactone) and poly(ϵ -caprolactone)-polyvinylpyrrolidone-iodine blends as ureteral biomaterials: characterisation of mechanical and surface properties, degradation and resistance to encrustation in vitro **Biomaterials**, v.23(23), p.4449-4458, 2002.
- [24] H. Lboutounne, J. Chaulet, C. Ploton, F. Falson, F. Pirot Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate **J. Control. Release**, v. 82 (2-3), p. 319-334, 2002.
- [25] G. L. Y. Woo, M. W. Mittelman J. P. Santerre Synthesis and characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer, **Biomaterials**, v. 21 (12), p. 1235-1246, 2000.

5. EUGENOL : OBTENÇÃO E APLICAÇÕES

5.1 Histórico sobre a utilização do eugenol

As especiarias tiveram um papel importante na história. Pelo seu valor, já foram moeda de troca; hoje são reconhecidas pelas suas propriedades curativas. A palavra "especiaria" deriva do latim *species*, que significa "frutos da terra". Mesmo tendo sido um condimento essencialmente alimentar, hoje também são conhecidas as suas aplicações terapêuticas. .

O cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) é uma planta originária das Ilhas Molucas (ou Malucas, do malaico Maluku) e foi uma das primeiras especiarias a ser comercializada.

As ilhas Molucas são um arquipélago de ilhas vulcânicas que fazem parte da Indonésia, localizado entre os Celebes e a Nova Guiné (Figura 1). É limitado ao sul pelo Mar de Arafura, a oeste pelos Mares de Bauda e das Molucas, ao norte pelo Mar das Filipinas e a noroeste pelo Mar das Celebes. Estas ilhas eram conhecidas no século XVI como Ilhas das Especiarias e uma delas foi invadida em 1511 por Afonso de Albuquerque.

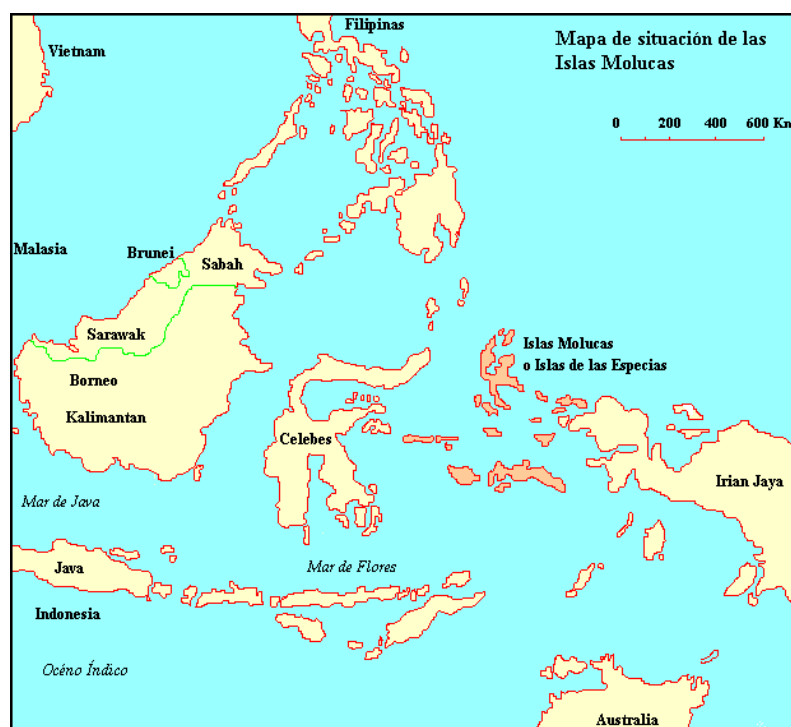


Figura 5.1: Localização geográfica das Ilhas Molucas. ¹

O cravo-da-índia foi uma das especiarias mais valorizadas no mercado do início do século XVI, sendo um quilograma de cravo equivalente a 7 gramas de ouro. O cravo (Figura 2) é o botão floral seco, contendo cerca de 15% de óleo essencial cujo principal componente é o eugenol, daí seu odor característico.

No século XVI, quando chegaram às Ilhas Molucas, os portugueses imediatamente dominaram as plantações, destruindo aquelas que não podiam vigiar de perto. Esse monopólio fez com que o preço do cravo-da-índia no mercado ficasse muito alto.

Os holandeses que sucederam aos portugueses agiram da mesma forma e ganharam o monopólio ao destruir todos os craveiros-da-índia, exceto aqueles que cresciam em uma ilha de sua propriedade denominada Aubon. Finalmente, a França rompeu o monopólio e, no começo do século XIX, a planta já era cultivada em grandes plantações em muitas regiões tropicais. No Brasil, o cravo-da-índia é cultivado principalmente no nordeste, com destaque para a Bahia.

O óleo do cravo-da-índia é usado há muito tempo no Ocidente devido às suas propriedades anestésicas e antibacterianas locais, que provêm do seu óleo volátil: o eugenol.

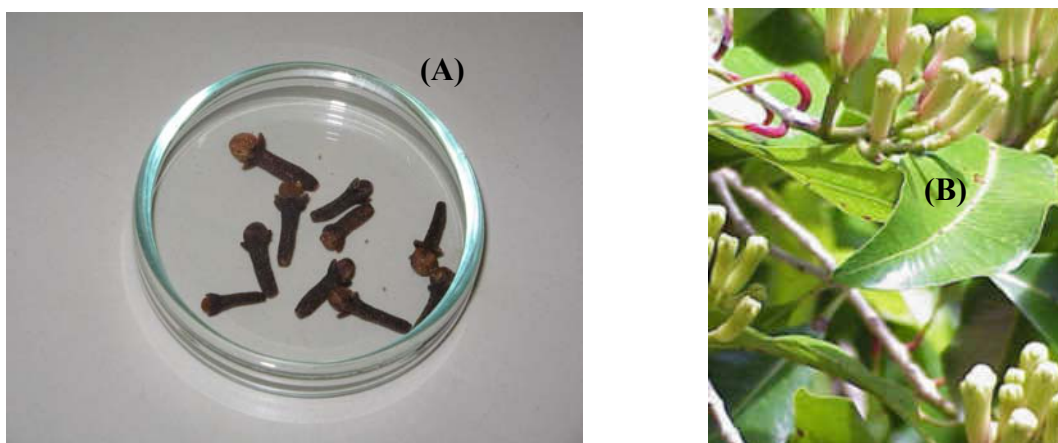


Figura 5.2: Cravo-da-índia comercializado (A) e botões floríferos do cravo (B).²

O eugenol (Eg) (4-alil-2-metoxifenol) é um composto fenólico cuja concentração no óleo essencial do cravo chega a 95%. Esse óleo volátil é obtido através da destilação por arraste de vapor dos botões floríferos e pedúnculos florais do cravo da família das mirtáceas.³

O eugenol é um composto fenólico que tem como isômero o isoeugenol, no qual a dupla ligação migra para uma posição conjugada com o anel benzênico (Figura 3). Os produtos dessa reação têm aplicações farmacêuticas e cosméticas em uma variedade de composições florais para fragrâncias. ⁴

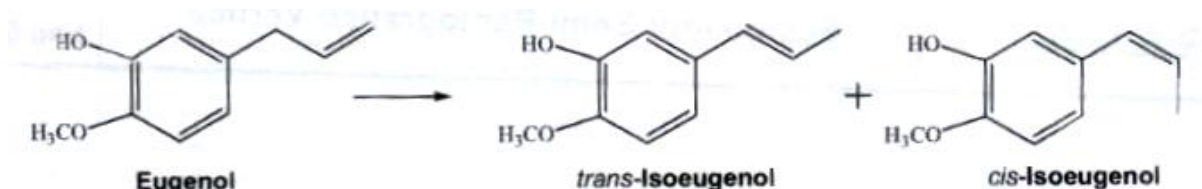


Figura 5.3: Isômeros do eugenol.

A obtenção de isômeros do eugenol é geralmente conduzida em meio homogêneo usando KOH em soluções alcoólicas a altas temperaturas, NaOH, KF, compostos contendo Mg, Ni, Co, Cu, Zn combinados a Al, Fe, Cr, V, La. Alguns métodos podem ser utilizados para síntese de isômeros do eugenol, tais como: precipitação seqüencial, co-precipitação, adição reversa e adição instantânea. A síntese por co-precipitação mostrou melhor conversão e formação apenas de isômeros *cis* e *trans* com maior proporção em volume *trans/cis*. A Figura 4 ilustra a isomerização do eugenol na presença de MgAl. ⁴

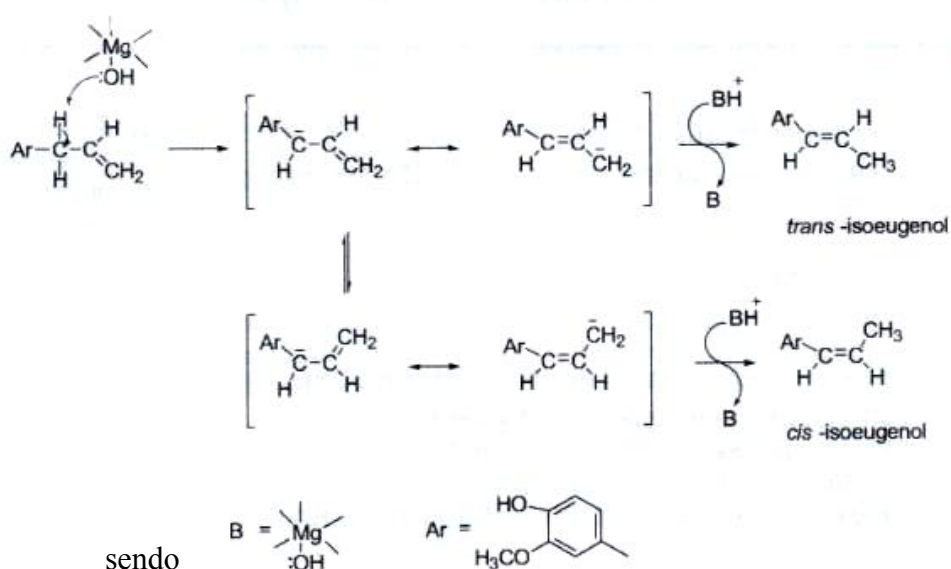


Figura 5.4: Condução da reação de isomerização do eugenol.

Eugenol e isoeugenol pertencem à família do fenol e exibem atividade antimicrobiana e antioxidante. Por terem ocorrência natural levam vantagem em relação aos antioxidantes sintéticos no tocante à toxicidade, que embora existente é menos lesiva aos tecidos do que os produtos sintéticos. O eugenol e seus isômeros são conhecidos por inibirem radicais livres mediadores da peroxidação lipídica através de seus radicais fenólicos.⁵

Uma das propriedades atribuídas ao eugenol é o alívio da dor de origem dentária. Trata-se de um bloqueador da condução nervosa que, em baixas concentrações, é capaz de reduzir a transmissão sináptica neuromuscular. Vários estudos concluíram que o eugenol inibe a ciclooxigenase, inibindo a síntese das prostaglandinas e favorecendo o efeito analgésico e anestésico.⁶

Baixas concentrações de eugenol inibem a atividade nervosa de modo reversível, atuando como um anestésico local. No entanto, a exposição a altas concentrações (10^{-2} a 10^{-3} mol/L) de eugenol bloqueia irreversivelmente a condução nervosa indicando um efeito neurotóxico.⁶

Tendo o óleo essencial de cravo propriedades analgésicas e antissépticas, pode ser utilizado para anestesiar a dor de origem dentária apenas temporariamente, pois não age sobre a cárie podendo causar necrose se utilizado isoladamente. Portanto, o eugenol é medida paliativa para anestesiar a dor de dente por algumas horas. Deve ser evitado seu uso interno por ser irritante para as mucosas e deve ser evitado também em feridas expostas por ser alergênico.⁷

Trabalhos na literatura apontam que o eugenol também tem propriedades antissépticas, de estimulante cardíaco, circulatório, digestivo, respiratório e anti-espasmódico.⁷

Diluído em óleo vegetal à concentração de até 1% (até 12 gotas do óleo essencial para 30mL de óleo vegetal) pode ser usado como óleo de massagem para dores musculares, artrites e reumatismo.

O óleo essencial de cravo pode ser usado juntamente com outros óleos essenciais para inalação no caso de gripes e resfriados sendo indicada a proporção de 3 gotas de óleo de cravo, 2 de eucalipto e 1 gota de alfazema para um litro de água.³

O eugenol é utilizado na odontologia em reação com o Óxido de Zinco, em vários procedimentos dentários, tais como:

- ✓ Forramento (proteção do complexo dentina-polpa) em restaurações profundas
- ✓ Curativo auxiliar da recuperação da polpa inflamada

- ✓ Restaurações provisórias
- ✓ Obturação de canais radiculares
- ✓ Agente de cimentação temporária ou permanente de incrustações, coroas ou prótese fixa.
- ✓ Cimentos cirúrgicos
- ✓ Pasta para moldagem de prótese total
- ✓ Curativos em alvéolos



Figura 5.5: Embalagem comercial do pó de óxido de zinco e eugenol

A mistura de óxido de zinco e eugenol (Figura 5) proporciona fácil manipulação, inserção e remoção, apresentando boa resistência à compressão. É também o curativo ideal nas hiperemias pulpares e pulpites devido às suas qualidades analgésicas e antissépticas. Associado à guta percha, material termoplástico composto predominantemente por uma resina vegetal, é utilizado para obturação dos canais radiculares (Figura 6).⁸

A hiperemia pulpar é uma inflamação reversível que representa a reação a um agente agressor. Quando não há a remoção do agente causal, a inflamação evolui para um quadro irreversível, a pulpite, que requer a remoção da polpa (pulpectomia).



Figura 5.6: Cones de gutta percha, de diferentes diâmetros, para obturação dos canais radiculares.

Os cimentos baseados no óxido de zinco e eugenol são os seladores de canal radicular mais comumente utilizados.

O eugenol é fracamente ionizável e sua reação com o óxido de zinco é uma clássica reação ácido-base resultando na formação do sal e eugenolato de zinco.⁹

O cimento de óxido de zinco e eugenol consiste em grânulos de óxido de zinco em uma matriz de eugenolato de zinco com unidades ligadas por forças de Van der Waals e interações entre as partículas, tratando-se de um cimento mecanicamente frágil. Quando em contato com o meio aquoso (a saliva, por exemplo) ocorre a hidrólise do eugenolato de zinco resultando na liberação de eugenol e hidróxido de zinco.⁶

A liberação do eugenol não é essencialmente afetada pela proporção pó/líquido do cimento, mas sim pela espessura da dentina remanescente entre a câmara pulpar e a cavidade que recebeu o cimento. A difusão do eugenol da dentina é dependente ainda da quantidade de cálcio presente e na ligação entre o eugenol e a matriz orgânica da dentina, principalmente o colágeno. Estudos têm revelado que as concentrações de eugenol que se difundem pela dentina não possuem toxicidade.⁶

Muitas pesquisas nos últimos anos têm revelado que o eugenol pode reduzir o risco de cânceres específicos. Derivados fitoquímicos de frutas e vegetais referidos como agentes preventivos incluem o eugenol.¹⁰ Tais compostos mostraram suprimir a

proliferação de células cancerígenas além de inibir fatores de crescimento, induzir apoptose, inibir angiogênese, suprimir a expressão de proteínas anti-apoptóticas e inibição da ciclo-oxigenase 2.¹⁰

Estes agentes quimiopreventivos têm recentemente sido estudados em medicina alternativa para reverter a resistência química e radiológica em pacientes submetidos a tratamentos contra o câncer tendo potencial para serem usados como adjuntos na terapia desta doença. Apesar de sua corrente utilização, o eugenol pode acarretar, quando utilizado em altas concentrações, em diferentes tipos de toxicidade, como danos diretos aos tecidos, dermatites, reações alérgicas e disfunções hepáticas. A severidade do dano é proporcional ao tempo de exposição, dose e concentração do fenol. O eugenol puro ou em concentrações superiores a 10^{-4} mol/L inibe a migração celular e modifica a síntese das prostaglandinas afetando a respiração celular, atividade mitocondrial e alteração da atividade enzimática da membrana celular.⁶

5.2 Atividade antimicrobiana do eugenol

É fato bem conhecido na literatura que os óleos essenciais obtidos de materiais vegetais (flores, botões, sementes, galhos, cascas, ervas, madeiras, frutas e raízes) possuem atividade antibacteriana. O eugenol é um composto fenólico que tem mostrado atividade bactericida na medida em que inibe a respiração e divisão celular. Neste caso, a parede celular bacteriana é desnaturada pela presença do próton que causa a lise bacteriana.⁶

O eugenol é tido como o componente dos óleos essenciais que melhor reduz a atividade bacteriana, inibindo dessa forma o crescimento de *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.* por mais de 30 dias.^{8,11}

Um possível mecanismo da atividade antimicrobiana do copolímero PCl-co-Eg é ilustrado na Figura 7.

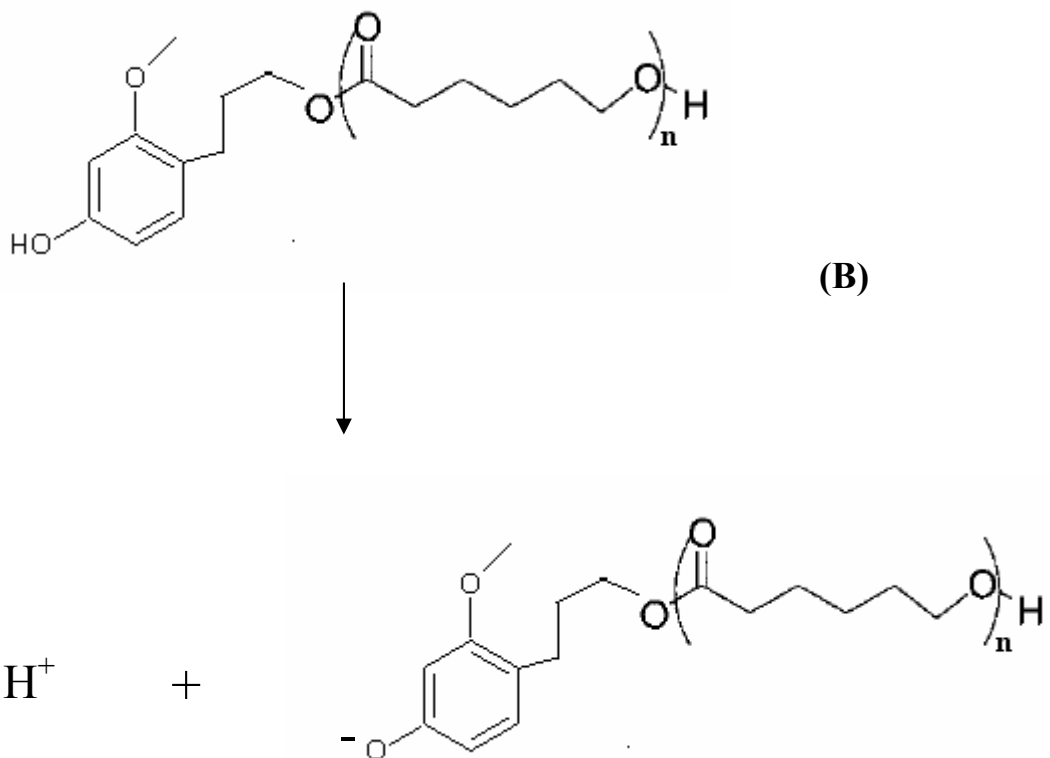
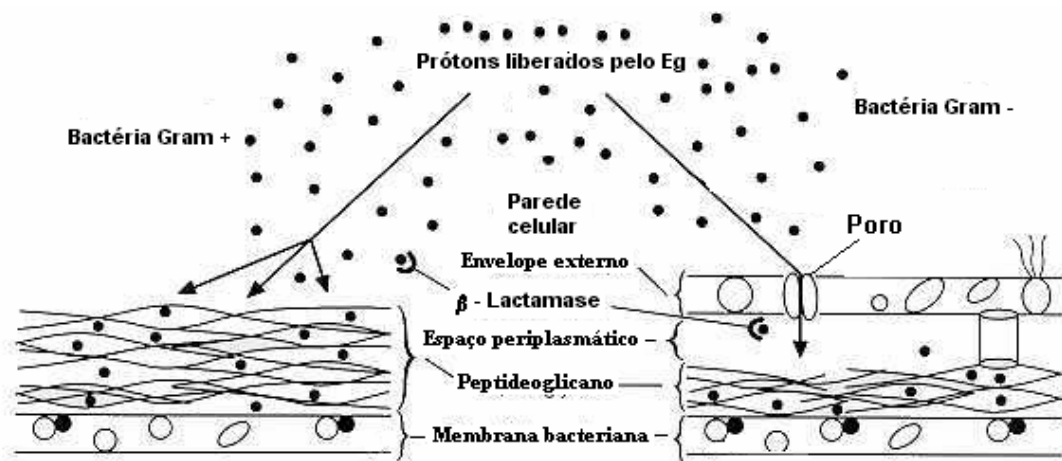


Figura 5.7: Mecanismos da atividade antimicrobiana do eugenol (A) e ionização do copolímero PCL-co-Eg com liberação do próton (B).

Nos últimos anos o governo brasileiro tem aumentado o interesse por produtos bioativos de origem natural, devido às dúvidas em relação à segurança dos produtos sintéticos. Atualmente são conhecidos mais de 300 óleos essenciais dos quais a maior parte é utilizada em escala comercial nas áreas de cosméticos, perfumes, fitoterapia, condimentos e nutrição devido às suas propriedades antibacteriana, antimicótica, antiparasitária, antiséptico, inseticida, entre outras.

O eugenol é um óleo volátil da *Mirtácea arbórea Caniophyllus aromaticus* cujas propriedades antibacterianas, antimicrobianas, inibição inflamatória, anestésica, antioxidante já estão consolidadas pela literatura.¹¹

Tendo em vista que bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no desenvolvimento de materiais implantáveis, é notória a necessidade de se encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microorganismos.

O Brasil é atualmente um grande exportador de eugenol. No entanto, o país não utiliza este princípio bioativo em química fina para a produção de materiais destinados à área médica.

É fato reconhecido que as plantas medicinais são a base para o desenvolvimento de fitomedicamentos ou obtenção de produtos com elevado potencial de mercado e valor agregado.

Atualmente, avanços na área de biotecnologia têm permitido a bioprospecção de genes e de novas moléculas que aumentaram o interesse da indústria farmacêutica pela nossa flora medicinal.

Estima-se que 2/3 da diversidade biológica mundial esteja nas zonas tropicais, sendo representada no Brasil por aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores. O processo de colonização trouxe ao país muitas espécies utilizadas pelos europeus e africanos que somados ao conhecimento tradicional de nossas populações indígenas tornaram o Brasil um país privilegiado quanto à utilização de plantas medicinais.

A exploração do eugenol para a síntese de polímeros bioativos com relação às suas propriedades antimicrobianas e biodegradáveis representam um desafio inicial para este grupo de pesquisa: a produção de fitopolímeros bioativos.

5.3 Considerações finais

A busca por produtos bioativos naturais para substituição de produtos sintéticos nas áreas médica e farmacológica é uma tendência da ciência atual. No Brasil, a riqueza em plantas medicinais é vantajosa nesse aspecto tornando viável no futuro a produção de produtos bioativos naturais em escala comercial e minimizando os efeitos indesejados inerentes ao uso de produtos sintéticos no organismo.

O eugenol é um importante e reconhecido agente antimicrobiano extraído do cravo-da-índia que possui propriedades de analgesia e qualidades antibacterianas. Por tratar-se de um composto fenólico, a liberação de prótons de sua estrutura desnatura a parede celular bacteriana causando a morte do microrganismo.

Na odontologia o eugenol é amplamente utilizado na prática clínica em restaurações provisórias, curativos, obturações dos canais radiculares e agente de cimentação. Em baixas concentrações atua de forma reversível na percepção da sensação de dor e não apresenta risco de toxicidade ao organismo humano.

Suas características antimicrobianas o tornam um importante fármaco de escolha para ser associado a polímeros para sistemas de liberação controlada, podendo ser utilizado em reparos ósseos minimizando o risco de ocorrência de infecções em materiais implantados.

Neste trabalho, propomos a utilização do eugenol como princípio bioativo em associação à poli(ϵ -caprolactona) a fim de reduzir a ocorrência de infecção após a implantação do material no organismo biológico levando em consideração as propriedades antimicrobianas do composto fenólico, bastante reconhecidas e já sedimentadas na prática odontológica.

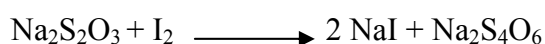
5.4 Referências

- [1]Lenguas del Mundo, disponível em <http://www.proel.org/mundo/halmahera.htm>. Acesso em abril de 2006.
- [2]Flores & Folhas- cravo-da-índia, disponível em <http://www.jardimdeflores.com.br/floresefolhas/A20cravoindia.htm>. Acesso em janeiro de 2006.
- [3]SILVA A.R. Óleo de cravo: ótimo analgésico, **Medicina Complementar**, disponível em <http://www.vidaintegral.com.br/complem/aromaterapia4.php>
- [4]KISHORE,D.; KANNAM,S. Double bond migration of eugenol to isoeugenol over as synthesized hidrotalcites and their modified forms, **Applied Catalysis A: General**, v.270, p. 227-235, 2004.
- [5]GUHA,S.N.; PRIYADARSINI,K.I. Kinetic and redox characteristics of phenoxy radicals of eugenol and isoeugenol: A pulse radiolysis study. **Int. J. Chem. Kinetics** v. 32 (1), p. 17-23, 1999.
- [6]ESCOBAR, R. G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Rev. Cub. Estomatol.**, v.39, n.2, p.139-156, 2002.
- [7]www.patriciospq.com.br, acessado em fevereiro de 2005
- [8]PNR, N.; HENRY, S.; CANO, V.; VERA,J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. **Oral Surg. Med. Path. Radiol. Endodont.**, v.99 p.231-252, 2005.
- [9]CAMPS, J.; POMMEL,L.; BUKIET,F.;ABOUT,I. Influence of the powder/liquid ratio on the properties of zinc oxide-eugenol-based root canal sealers. **Dent. Mat.**, v.20, p.915-923, 2004.
- [10]DORAI, T.; AGGARWAL, B.B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy.**Cancer Let**, v.215 p.129-140, 2004..
- [11]BURT,S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **Int. J. Food Microb.**,v.94 p.223-253, 2004.

6.1 Síntese do copolímero PCL-co-Eg.

O copolímero poli (ϵ -caprolactona-co-eugenol) (PCL-co-Eg) foi sintetizado através da polimerização induzida por reação de complexo de transferência de carga (CTC) conforme trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa anteriormente.¹ O monômero ϵ -caprolactona (Aldrich Co) foi adicionado ao reator de polimerização na concentração de 10-20 mM. Eugenol (Néon Co) foi adicionado ao sistema contendo a ϵ -caprolactona no intervalo de concentrações de 1mM a 3mM. Após homogeneização, iodo ressublimado (Quimesp Ltda) foi adicionado ao sistema reacional no intervalo de concentrações de 0,20-0,60 mM. A reação de polimerização foi conduzida isotermicamente por 8 horas em atmosfera ambiente sendo interrompida pela adição de etanol para precipitação do copolímero resultante, PCL-co-Eg.

O iodo residual foi removido do copolímero após tratamento com solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Merck) 1M e agitação constante por 24 horas à temperatura ambiente (25°C) O iodo livre (I_2) reage com a solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ segundo a reação:²



O copolímero PCL-co-Eg foi então lavado com água destilada e deionizada para remoção do NaI e $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$, desidratado em etanol e seco sob vácuo a temperatura ambiente até atingir peso constante.

O copolímero resultante foi caracterizado por técnicas físico-químicas e bioquímicas. As técnicas físico-químicas envolveram a espectroscopia eletrônica UV/Vis, microscopia eletrônica de varredura (MEV), a ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN), análise térmica (calorimetria exploratória diferencial - DSC) e a cromatografia de permeação em gel (GPC).



Figura. 6.1: Espectrofotômetro UV/Vis Cary 50 utilizado na caracterização do sistema ϵ -CL:I₂ e Eg-I₂

A composição de Eg no copolímero foi estudada por ressonância magnética nuclear de prótons (¹H-RMN, Bruker 200 MHz). O solvente utilizado para as amostras foi o clorofórmio deuterado.

O copolímero obtido foi caracterizado quanto à distribuição de peso molecular por cromatografia de permeação em gel em HPLC da Waters modelo 510. Na análise por GPC, o solvente THF foi utilizado como eluente (fluxo 1,0 mL.min⁻¹, pressão 550 psi). A curva de calibração foi determinada com polietileno glicol (PEG) de pesos moleculares 194, 960, 4250, 18.600, 64.700 e 450.000 g.mol⁻¹, respectivamente.³⁻⁵ O sistema analítico consistiu de um cromatógrafo HPLC-510 da Waters equipado com detector 2414 (índice de refração). Foram utilizadas colunas de Pígel acopladas em série (10⁴ Å + 10³ Å + 10² Å, tamanho da partícula =5µm). O volume de injeção da amostra foi de 20µL. A aquisição e tratamento dos dados cromatográficos foram efetuados com software SW da Waters Breeze 3.3. A empresa Petroquímica União /SP gentilmente realizou as análises por GPC.³⁻⁵

As características térmicas do copolímero foram estudadas através da análise térmica (Metler TA 4000).

A microestrutura do copolímero com relação à morfologia dos pós obtidos foi estudada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL)

Os princípios fundamentais envolvidos em cada técnica de caracterização físico-química são discutidos a seguir.

6.2 Caracterização Físico-Química

6.2.1 Cromatografia de Permeação em gel

A cromatografia é uma técnica da química analítica utilizada para a separação de misturas e substâncias baseada no princípio da adsorção seletiva. Esta técnica foi descoberta em 1906 pelo botânico Mikahail Tswett, mas passou a ser amplamente utilizada após a década de 30.⁶ A descoberta da técnica se deu quando Tswett obteve clorofilas (pigmentos encontrados em plantas) adicionando um extrato de folhas verdes em éter de petróleo sobre uma coluna com carbonato de cálcio em pó em um tubo de vidro vertical. Os componentes individuais da mistura migraram para baixo enquanto a solução percolou pela coluna, esses componentes migraram em diferentes taxas de velocidade resultando numa marcação em gradientes horizontais de cores ao longo da coluna.⁶

A cromatografia tornou-se então um método de separação físico no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. A cromatografia ocorre como resultado de processos repetidos de adsorção e desorção durante o movimento dos componentes da amostra ao longo da fase estacionária, e a separação é devida à diferença de constantes de distribuição de cada um dos componentes da amostra. A distinção entre os principais métodos cromatográficos é feita em termos das propriedades da fase móvel.

Na cromatografia de permeação em gel (GPC) a separação de diferentes moléculas em solução é realizada com base na diferença do seu tamanho efetivo ou volume hidro-dinâmico (Figura 2). A separação ocorre com a injeção da solução em fluxo contínuo de solvente que passa por géis altamente porosos. O fenômeno ocorre porque as moléculas com pesos moleculares menores entrarão nos poros menores mais facilmente, enquanto as maiores precisarão de menor tempo de eluição para percorrer a coluna. Essa técnica é utilizada principalmente para a determinação do peso molecular do polímero.⁷

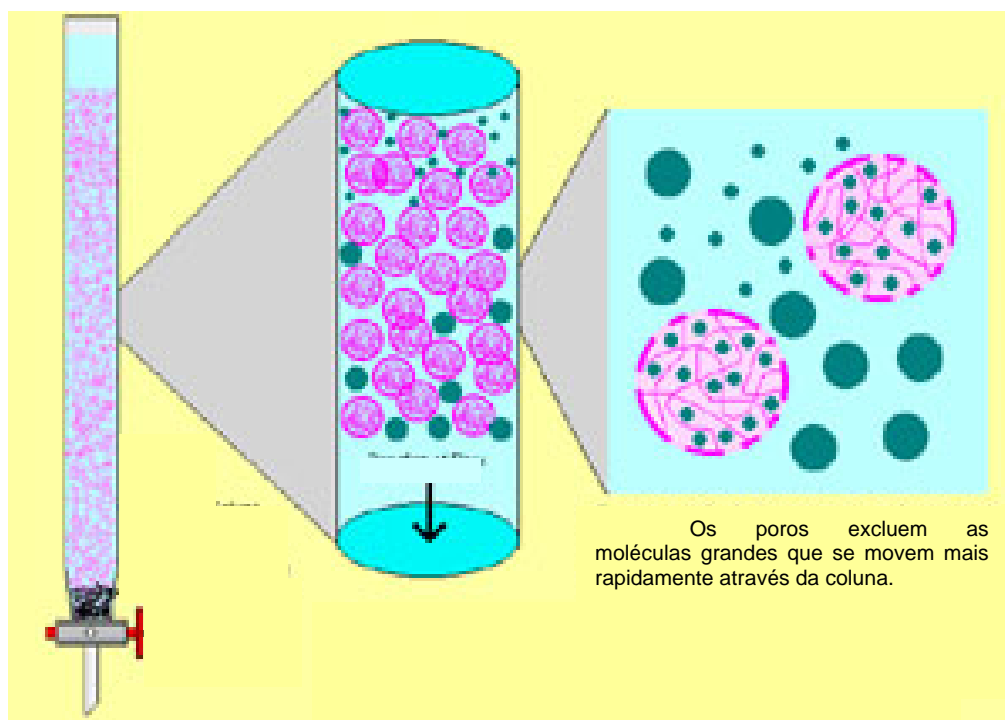


Figura 6.2: Fundamento da técnica de GPC. ⁸

A técnica GPC tem sido utilizada como uma técnica relativamente rápida e segura para determinar a distribuição de massa molar (MWD) de polímeros. No equipamento de GPC, em geral, os padrões são escolhidos tendo em vista o polímero a ser analisado. Foi observado por Grubisic *et al.* que a separação por cromatografia era devida ao volume hidrodinâmico das macromoléculas e demonstrou-se a existência de uma correlação linear entre o volume de eluição de diferentes polímeros e o logaritmo do volume hidrodinâmico viscosimétrico $M[\eta]$, onde M é massa molar e $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, independente da composição química ou arquitetura do polímero em estudo. ⁹

A determinação do peso molecular do copolímero PCL-co-Eg foi efetuada em um equipamento GPC da Waters modelo 510, conforme ilustra a Figura. 3.



Figura 6.3: Equipamento para cromatografia de permeação em gel (GPC) Waters, modelo 510 utilizado neste trabalho. O equipamento pertence à Petroquímica União/SP.

6.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H -RMN) ¹⁰⁻¹²

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é reconhecidamente a técnica mais importante para a investigação a nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria. Em particular é um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido. A RMN ocupa, igualmente, um lugar de destaque no campo da análise qualitativa e quantitativa e sua aplicação estende-se desde a análise de componentes em produtos alimentícios até a análise de fluidos biológicos e metabolitos em tecidos e órgãos de seres vivos, de modo não invasivo e não destrutivo. A caracterização espacial do sinal de RMN da água (juntamente com o desenvolvimento acelerado das capacidades de computação) permitiu, também, um grande desenvolvimento da imagem por ressonância magnética, hoje uma das técnicas fundamentais em medicina e noutras áreas.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é o estudo de transições entre os níveis de energia do núcleo quando colocado em um campo magnético. O núcleo do átomo é constituído de prótons e nêutrons. O princípio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) se baseia no fato de que núcleos com número ímpar de prótons, nêutrons ou ambos terão um spin nuclear intrínseco, isto é; tem momento angular. A Tabela 1 apresenta alguns dos isótopos que possuem espectro de RMN.

Tabela 6.1: Número quântico de spin para alguns núcleos atômicos.

Número de Prótons	Número de Nêutrons	Número Quântico de Spin	Exemplos
Par	Par	0	^{12}C , ^{16}O , ^{32}S
Ímpar	Par	1/2	^1H , ^{19}F , ^{31}P
Ímpar	Ímpar	3/2	^{11}B , ^{35}Cl , ^{79}Br
Par	Ímpar	1/2	^{13}C
Par	Ímpar	3/2	^{127}I
Par	Ímpar	5/2	^{17}O
Ímpar	Ímpar	1	^2H , ^{14}N

Quando elementos com número quântico de spin, como o hidrogênio, são expostos a um campo magnético estático, forte e homogêneo, os núcleos dos átomos se comportam como magnetos e seus *spins* se alinham na direção do campo aplicado (Figura 4).

Rigorosamente, núcleos não apresentam spin, mas sim momento angular (exceção feita somente ao núcleo do isótopo 1 do hidrogênio, que é constituído de um único próton). Embora o spin possa ser considerado um momento angular, por terem ambos as mesmas unidades e serem tratados por um formalismo matemático e físico semelhante, nem sempre o oposto ocorre. O spin é intrínseco, ao passo que objetos compostos têm momento angular extrínseco. Contudo, motivos históricos levaram a esse abuso de linguagem, tolerado em textos não rigorosos. Um motivo a mais de complicação é o fato de que a moderna física de partículas e campos considera que certas partículas, antes pensadas como elementares (e, portanto possuindo spin), sejam compostas (próton e nêutron compostos de quarks). Assim, fica um tanto impreciso o limite entre os casos onde se deva usar o termo spin e os casos onde se deva usar o termo momento angular.

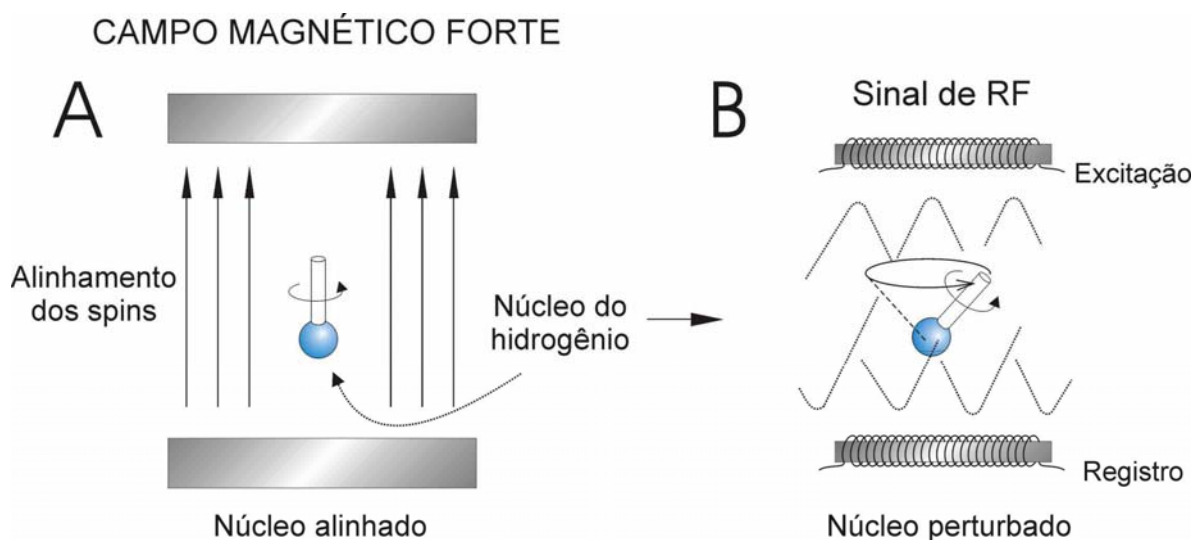


Figura 6.4: O efeito de um campo magnético externo sobre o núcleo do hidrogênio.

O alinhamento dos spins dos núcleos pode ser perturbado por um pulso curto de ondas de rádio (RF) que serve para tirar os spins do núcleo de sua orientação paralela ao campo magnético e para fornecer a energia necessária para movimentos do tipo giroscópio dos spins dos núcleos, denominados de *precessão*. Quando o pulso de RF é retirado, o núcleo tende a voltar para sua situação original e, assim fazendo, libera energia em forma de ondas de rádio. A frequência dessas ondas de rádio é distinta para diferentes espécies de átomos, assim como para um dado átomo em diferentes meios químicos ou físicos. Portanto, os núcleos ressonantes tornam-se transmissores de ondas de rádio com frequências características e revelam sua presença no polímero pelos seus sinais RF.

Uma carga girando como a de um núcleo $^1\text{H}_1$ gera um campo magnético que tem um momento magnético a ele associado. Tal núcleo pode ser considerado como a barra de um ímã. Quando um campo magnético externo (H_0) é aplicado, o núcleo tenta alinhar seu momento magnético ao longo da direção do campo. O número quântico de spin do núcleo é designado por I , havendo $2I + 1$ orientações e correspondentes níveis de energia possíveis para um núcleo magnético relativo ao campo externo.

Um próton de $^1\text{H}_1$ tem um número quântico de spin de $\frac{1}{2}$; tendo portanto 2 orientações possíveis, paralelo e antiparalelo ao campo magnético externo. Na ausência de um campo magnético, cada próton tem a mesma energia nuclear de spin e os spins são orientados em direções caóticas. Na presença de um campo magnético, os spins do próton

são alinhados paralelos ou antiparalelos ao campo e a diferença de energia entre estas duas orientações (ΔE) é proporcional à intensidade do campo magnético externo, H_0 :

$$\Delta E = h\nu = \frac{h\gamma}{2\pi} H_0 \quad (1)$$

sendo γ = a razão giromagnética (uma constante para um dado núcleo), H_0 é a intensidade do campo magnético externo e h é a constante de Planck. Esta variação no espaçamento entre níveis de energia (E) como função da intensidade do campo aplicado (H_0) é mostrada na Figura 5.

De acordo com a equação 1 quando prótons são colocados em um campo magnético que tem uma intensidade fixa, haverá uma frequência definida separando os dois níveis de energia. Na prática um campo de 14.100 Gauss requer uma frequência de 60 MHz de energia (da região de radiofrequência do espectro eletromagnético) para a transição entre as orientações. Em um campo de 23.500 Gauss, 100 MHz são necessários; para um campo de 47.000 G, 200 MHz são necessários. É importante notar que 60 MHz corresponde à uma quantidade muito pequena de energia ($6 \cdot 10^{-3} \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}$), significando que o número de moléculas no estado fundamental é ligeiramente superior ao número de moléculas no estado excitado.

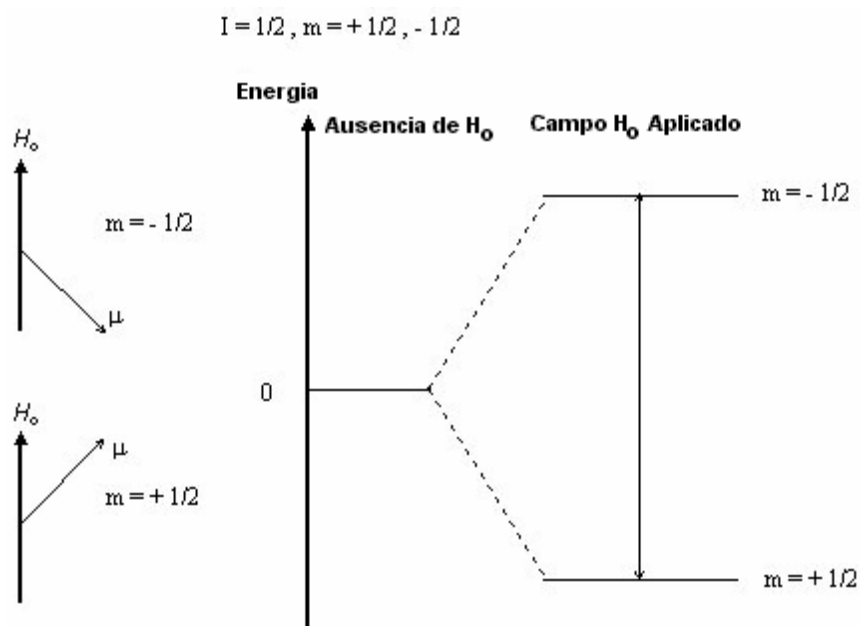


Figura 6.5: Separação dos níveis de energia de spin para um núcleo em função de um campo magnético externo (H_0).

Para obter-se um espectro RMN de uma amostra, esta é colocada no campo magnético no espectrômetro e um campo de radiofrequência é aplicado, passando-se uma corrente por uma espira que envolve a amostra. O campo magnético é aumentado aos poucos e a excitação ou oscilação dos núcleos de uma orientação para outra é detectada como uma tensão induzida, resultando na absorção de energia do campo de radiofrequência. Portanto, um espectro de RMN é um gráfico de voltagem induzida contra a varredura do campo magnético. A área sob o pico depende do número total de núcleos que estão oscilando.

A energia absorvida por um núcleo pode ser liberada por relaxamento spin-spin, no qual a energia de spin é transferida a um núcleo vizinho, ou por relaxamento spin-rede, no qual a energia do spin é convertida em energia térmica. Os núcleos são, deste modo, excitados do estado de spin mais baixo ao mais alto por um campo de radiofrequência. Eles retornam espontaneamente ao estado de energia mais baixo para serem excitados novamente e assim por diante.

Se o núcleo de hidrogênio é parte de uma molécula e esta molécula é colocada em um campo magnético, o campo induz uma circulação de elétrons em torno do próton em um plano perpendicular ao campo externo. Esta carga circulante, por sua vez, gera um campo magnético induzido na região do núcleo que está geralmente oposta ao campo externo. Esta carga circulante por sua vez gera um campo magnético induzido na região do núcleo que está geralmente oposta ao campo externo. Os elétrons que envolvem o próton são ditos blindarem o próton se o campo induzido se opõe ao campo externo, como apontado pela Figura 6. Neste caso, os elétrons blindam o núcleo dos efeitos do campo externo.

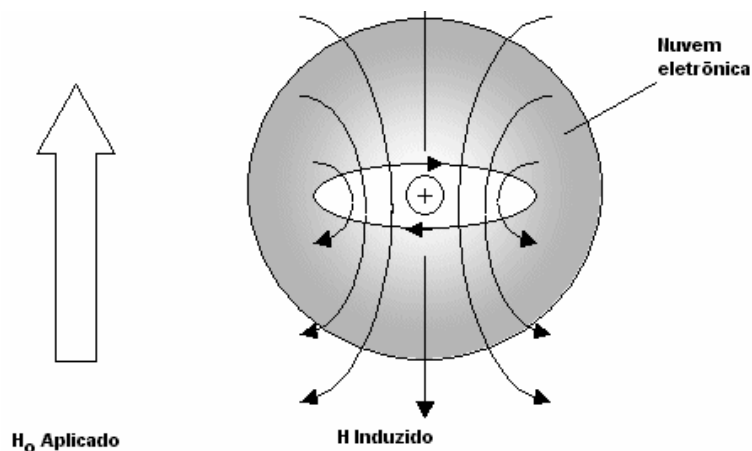


Figura 6.6: Blindagem (H induzido) causada por elétrons circulando em torno do núcleo em plano perpendicular ao campo externo (H_0).

Por outro lado, os elétrons são ditos desblindarem o núcleo se o campo induzido aumenta o campo externo. Núcleos de hidrogênio em ambientes diferentes possuem densidade eletrônica maior ou menor em torno deles, e são blindados ou desblindados em proporções diferentes por elétrons que circulam. O resultado é que o próton é sujeito a um campo magnético líquido ou efetivo:

$$H_{\text{efetivo}} = H_{\text{externo}} - H_{\text{induzido}} \quad (2)$$

Quando ocorre a varredura do campo magnético, nem todos os prótons oscilam na mesma intensidade do campo. A intensidade do campo na qual oscilam depende de quanto eles são blindados, o que por sua vez, depende dos ambientes químicos.

Como o campo magnético efetivo sentido pelo núcleo é levemente afetado (perturbação essa geralmente medida em escala de partes por milhão) pelos débeis campos eletromagnéticos gerados pelos elétrons envolvidos nas ligações químicas (o chamado ambiente químico nas vizinhanças do núcleo em questão), cada núcleo responde diferentemente de acordo com sua localização no objeto em estudo, atuando assim como uma sonda sensível à estrutura onde se situa.

Pelo fato da blindagem ser dependente do ambiente químico, as intensidades de campo necessárias à absorção de energia por diferentes prótons são ditas serem deslocadas quimicamente em relação à algum padrão. O tetrametil silano (TMS), $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ é o padrão usual. Normalmente o TMS é dissolvido na amostra e usado como referência interna. O deslocamento químico de um certo núcleo de hidrogênio é a diferença entre a intensidade de campo na qual o próton absorve e a intensidade de campo na qual os prótons do padrão TMS absorvem. A escala delta (δ) tem sido utilizada em espectroscopia RMN como unidade de deslocamento químico. O deslocamento químico observado no espectro RMN (em unidades Hz) é dividido pela frequência (em Hz) do espectrômetro usado, fornecendo em partes por milhão (ppm):

$$\delta = \frac{\text{deslocamento observado (Hz)} \cdot 10^6}{\text{frequência do espectrômetro (Hz)}} \quad (\text{ppm}) \quad (3)$$

Neste trabalho, o copolímero de enxerto PCL-co-Eg foi caracterizado por espectroscopia de RMN de prótons (^1H -RMN) utilizando-se um equipamento Bruker 300 MHz do Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros do “Consejo Superior de Investigación Científica” – ICTP/CSIC-Madri/Espanha, instituto este onde o orientador

desta dissertação, prof. Alvaro A.A. de Queiroz é pesquisador visitante. As amostras do copolímero foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) sendo utilizado como referência interna o tetrametil silano (CH_3)₄Si. A Figura 7 ilustra os equipamentos de RMN utilizados neste trabalho.



(A)



(B)

Figura 6.7: Equipamento de RMN Bruker 300 MHz (A) e Bruker 500 MHz (B) do ICTP/CSIC. Nota-se em (B) a introdução da amostra no equipamento de RMN.

6.2.3 Análise Térmica (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica térmica muito utilizada para a caracterização da cristalinidade e da transição vítrea em biomateriais. O princípio da técnica consiste na caracterização das alterações cristalinas ocorrida no material em função da temperatura. Tem sido muito utilizada na indústria farmacêutica para teste de pureza das amostras de fármacos.^{7,13}

Na análise por calorimetria diferencial de varredura DSC, quando uma amostra sofre uma transição térmica, um circuito termoeletrônico permite comparar a temperatura da

amostra com relação à temperatura de um sistema de referência e, deste modo, é gerado um sinal proporcional e a área sob a curva registrada no gráfico obtido é uma medida direta do calor desta transição.⁷

As diferenças no fluxo de calor na substância e referência são medidas em função da temperatura da amostra enquanto as duas estão submetidas a um programa de aquecimento a temperatura controlada. Para se obter os dados de calorimetria exploratória diferencial são utilizados o método de compensação de potências ou de fluxo de calor. No primeiro a amostra e o material referência são aquecidos por aquecedores separados sendo que suas temperaturas são mantidas iguais enquanto as temperaturas são variadas (aumentadas ou diminuídas) linearmente. Já no método de fluxo de calor a diferença desse fluxo sobre a amostra e a referência é medida conforme a temperatura é alterada, sendo aumentada ou diminuída, de maneira linear.

Na técnica DSC de compensação de potências são usados dois fornos independentes para aquecimento da amostra e da referência. São encontrados modelos comerciais nos quais os fornos estão embutidos em um sistema de dissipação de calor de temperatura controlada, acima deles estão os suportes para amostra e referência com termômetros de resistência de platina embutidos para monitorar as temperaturas dos dois materiais continuamente. São empregados dois circuitos de controle para a obtenção de termogramas diferenciais para controlar a temperatura média e a temperatura diferencial. No caso da temperatura média, um programador fornece um sinal elétrico proporcional à temperatura média desejada para os suportes da amostra e da referência em função do tempo. Este sinal é então comparado computacionalmente com a média dos sinais dos detectores da amostra e da referência embutidos nos suportes. No circuito de temperatura diferencial os sinais da amostra e da referência advindos do sensor de platina são alimentados em um amplificador diferencial por um circuito que compara ambos determinando qual é o maior. A saída do amplificador ajusta as potências de entrada aos dois fornos de tal modo que suas temperaturas sejam mantidas idênticas, isto é, ao longo do experimento amostra e a referência são isotérmicas. Um sinal proporcional à diferença entre a potência de entrada dos dois fornos é transmitido ao sistema de aquisição de dados. A diferença na potência é a informação normalmente expressa em gráfico em função da temperatura da amostra.

Na análise por DSC de fluxo de calor, o calor flui tanto na amostra como na referência através de um disco de constantan termoelétrico aquecido eletricamente. Sobre esse disco são colocadas plataformas sobre as quais são posicionadas painéis de alumínio

para amostra e referência. O fluxo diferencial de calor na amostra e referência é monitorado por termopares de área de Chromel/constantan, formados pela junção entre a plataforma de constantan e os discos de Chromel, conectados na parte de baixo das plataformas. O fluxo diferencial de calor entre os dois pratos é diretamente proporcional à diferença na saída das junções dos termopares. A temperatura da amostra é estimada por meio da junção Chromel/alumel sob o disco da amostra. ¹³

As amostras deste trabalho foram seladas em um porta-amostra (“panela”) de alumínio de DSC para amostras sólidas. Tipicamente, a massa utilizada em cada análise variou entre 5 e 10mg. Os copolímeros PCL-co-Eg foram analisados a 10°C/min sob fluxo de nitrogênio. Os experimentos foram feitos segundo o programa: i) aquecimento a partir da temperatura ambiente até 120°C e tratamento isotérmico nesta temperatura por 5 minutos; ii) resfriamento até -120°C e estabilização nesta temperatura durante 5 minutos; iii) aquecimento até 120°C.

Após a eliminação da história térmica do material, as amostras foram resfriadas a uma taxa de 3°C/min até a temperatura ambiente. Medidas realizadas com padrões índio e estanho permitiram observar alta repetitividade e a reprodutibilidade do equipamento de DSC, tanto em relação ao perfil da curva obtida como em relação aos valores de temperatura das transições de primeira ordem (fusão). O equipamento utilizado neste trabalho é ilustrado na Figura 8.



Figura 6.8: Equipamento para análise térmica Metler TA 4000.

6.2.4 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

Os primeiros microscópios eletrônicos apresentavam a limitação das imagens serem geradas somente em duas dimensões, referindo-se exclusivamente ao interior do material, não sendo possível observar a superfície das amostras. Para superar essa limitação Knoll, em 1935, gerou a primeira imagem por varredura de elétrons. Pelo novo método, o feixe não era fixo, mas varria a amostra a ser observada através de uma seqüência de linhas. Os elétrons que são espalhados pela superfície são captados por sensores que geram a imagem, ou seja, ao contrário do microscópio de transmissão, no microscópio eletrônico de varredura (MEV) a imagem é processada e não gerada diretamente. Em 1938 o alemão von Ardenne publicou o primeiro trabalho propondo o novo método, mas as pesquisas acabaram sendo interrompidas, quando seu primeiro protótipo foi destruído por um bombardeio em 1944. Assim, o primeiro microscópio eletrônico de varredura acabou surgindo somente em 1947, na Universidade de Cambridge, construído por Charles Oatley.

O MEV trouxe a possibilidade de observar estruturas que estavam inacessíveis pelo microscópio ótico, além de gerar uma série de sinais através do choque dos elétrons, uma radiação ionizante de alta energia, com os átomos da amostra. Entre esses sinais temos os raios-X, cujos comprimentos de onda são característicos de cada espécie atômica. Dessa forma os microscópios eletrônicos podem gerar análises químicas de cada fase simultaneamente à geração das imagens, o que representa um grande avanço na área de caracterização de materiais.¹⁴

A Microscopia Eletrônica de Varredura permite portanto, a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas. A técnica (Figura 9) consiste na incidência de um feixe de elétrons de alta energia na superfície da amostra onde, após interação, parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de elétrons retroespalhados (BSE) ou nesta interação a amostra emite elétrons produzindo a chamada imagem de ES (elétrons secundários). Ocorre também a emissão de raios-X que fornece a composição química elementar de um ponto ou região da superfície, possibilitando a identificação de praticamente qualquer elemento presente.⁹ A Figura 10 ilustra o equipamento utilizado neste trabalho.

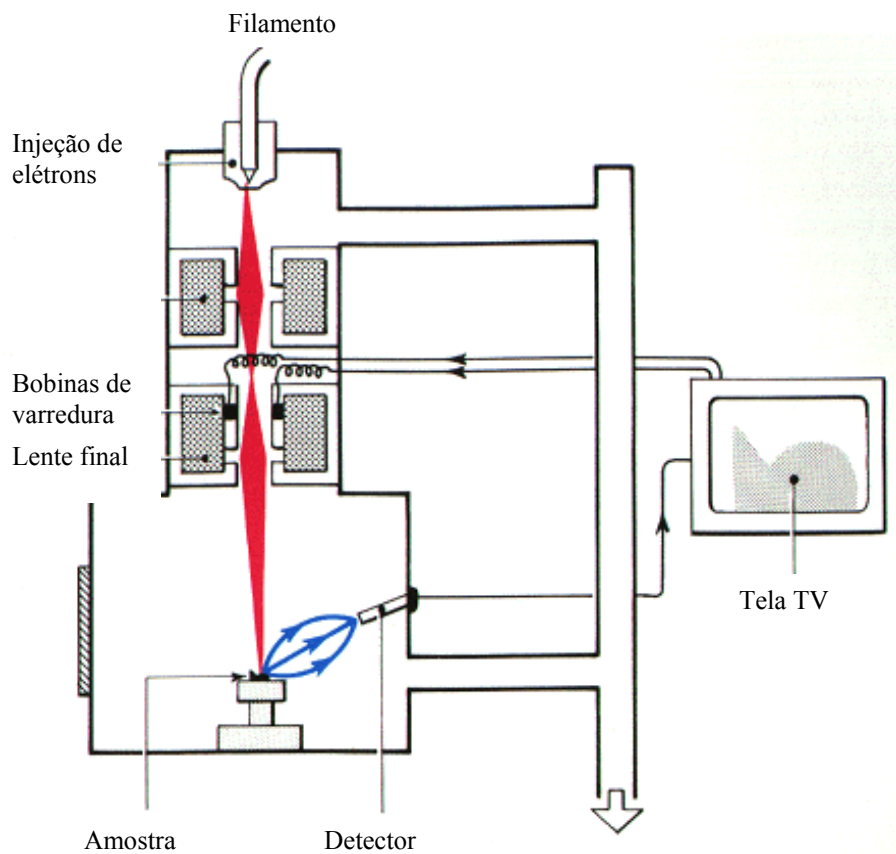


Figura 6.9: Fluxograma da técnica MEV.



Figura 6.10: Microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips XL 30 (IPEN/USP).

6.3 Caracterização Bioquímica

A utilização de materiais sintéticos em contato com o fluido biológico requer desses materiais algumas características biológicas fundamentais para que o tecido, ou mesmo a função biológica sejam restaurados no organismo humano.

Neste trabalho selecionaram-se como características desejáveis ao biomaterial difusão do fluido biológico, baixa citotoxicidade, biodegradabilidade, ausência de resposta inflamatória e atividade antimicrobiana. As técnicas “in vitro” que visam o estudo de tais propriedades biológicas são descritas a seguir.

6.3.1 Difusão de fluido biológico

Pastilhas de 7,5mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura foram obtidas após prensagem uniaxial dos pós do PCL e seu copolímero PCL-co-Eg. As pastilhas foram obtidas após prensagem de 0,100g do pó do copolímero em molde de aço inoxidável 316NL e pressão de 191,5N/m².

As amostras das pastilhas de PCL e PCL-co-Eg foram mantidas sob imersão em solução fisiológica (NaCl 0,9%, pH 7,4) à temperatura constante de 37°C para avaliação de sua absorção de água. A solução fisiológica simula as condições encontradas no organismo biológico no qual o material estaria exposto aos fluidos corpóreos.

A absorção de água foi determinada gravimetricamente de acordo com a expressão:

$$\% \text{fluido absorvido} = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

6.3.2 Degradação “in vitro”

Pesquisas a cerca de materiais bioativos envolvem também o interesse em suas características de biodegradabilidade. Entende-se por biodegradação a capacidade do material

ser degradado pela ação de enzimas. Um biomaterial que seja utilizado para promover ou guiar um reparo ósseo deve sofrer degradação à medida que o tecido é neoformado.

Para análise da ocorrência de biodegradação bem como da velocidade em que ocorre esse processo foram utilizadas pastilhas do polímero e do copolímero PCL-co-Eg. As pastilhas foram mantidas sob imersão em solução fisiológica à temperatura constante de 37°C e posteriormente mantidas em dessecador, sendo esse processo alternado a cada 24 horas, a fim de avaliar a ocorrência de perda de massa devido a processos hidrolíticos.

O estudo da biodegradabilidade dos copolímeros PCL-co-Eg também foi realizado após a imersão em solução PBS, pH 7,4 a 37°C contendo as enzimas lipase (45 U.mL⁻¹) e coleterol estearase (40 U.mL⁻¹). O procedimento para análise da hidrólise enzimática foi também baseado na imersão e dessecação das amostras como no ensaio para degradação em solução fisiológica.

6.3.3 Estudo da atividade antimicrobiana

Uma das principais complicações pós-cirúrgicas no que se refere a materiais sintéticos implantados no organismo é o desenvolvimento de infecções. A adesão de microrganismos nas superfícies desses materiais resulta no desenvolvimento de colônias bacterianas que podem levar não só ao comprometimento do enxerto como do estado de saúde do paciente. Um material bioativo deve, portanto, prevenir esse tipo de complicação.

No compósito PCL-co-Eg o antimicrobiano eugenol foi introduzido com o objetivo de atuar como um agente bactericida, prevenindo infecções pós-operatórias e otimizando o prognóstico do enxerto. O eugenol é amplamente utilizado na área odontológica em tratamentos de canal (endodontia), restaurações profundas, cimentações de próteses, cimentos pós-cirúrgicos em intervenções periodontais devido às suas reconhecidas propriedades antimicrobianas. Trata-se de um composto fenólico que através de seu grupamento hidroxila atua na parede celular bacteriana desnaturando proteínas e causando a morte deste organismo.

Dentre os microrganismos encontrados nas superfícies de implantes estão a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bactérias essas presentes na secreção salivar.

Escherichia coli pode ser encontrada na flora intestinal humana advinda da alimentação, água ou até mesmo ar contaminados. Trata-se de uma bactéria gram – que pode ser encontrada em cirurgias do trato gastrointestinal ^{3,15}

O *Staphylococcus aureus* é comumente encontrada em infecções hospitalares. Por estar relacionada a ambientes cirúrgicos é detectada em diversos tipos e locais de implantes. Trata-se de uma bactéria gram +. ^{4,5,16-18.}

Para o ensaio da atividade antimicrobiana utilizou-se o método de Kirb-Bauer, recomendado pelo “Center For Disease Control” (EUA) para determinação de sensibilidade aos antimicrobianos por fornecer resultados correlacionáveis com as diferentes concentrações inibitórias mínimas sanguínea e urinária ¹⁹⁻²¹

Como preparo das placas, o meio é fundido e resfriado a 45°C. Foram distribuídas alíquotas de 50 a 45mL em placas de 150 mm que foram esfriadas sobre superfícies planas para formar uma camada uniforme de meio com 4 mm de altura. O meio padronizado é o de Muller-Hinton e o pH deve ser 7,2 -7,4.

Para o preparo do inóculo foram emulsionadas 4 colônias iguais em 5ml de caldo de triptose, incubadas por 4 hs a 37°C e ajustada a suspensão para o padrão 0,5 da escala de Mc Farland: 0,5ml de BaCl₂ a 1% + 99,5ml H₂SO₄ a 1% que corresponde a 1,5x10⁸ microrganismos por mL. Um cotonete estéril foi embebido no inóculo e a suspensão bacteriana foi espalhada homoganeamente sobre a superfície do meio, após alguns minutos foram colocadas as pastilhas do polímero e do copolímero PCL-co-Eg em diferentes concentrações de eugenol. As amostras foram previamente esterilizadas com raios gama (R γ) na dose de 25 KGy para que fosse excluída qualquer possibilidade de contaminação durante o preparo das pastilhas. As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 18hs para posterior leitura dos resultados com base no diâmetro da zona de inibição de crescimento bacteriano encontrada para cada amostra. ^{22,23}

6.3.4 Citotoxicidade

A norma ISO 10993 formula as regras e sugere alguns testes para avaliar os efeitos biológicos adversos de materiais (metais, cerâmicas, polímeros ou compósitos) utilizados em dispositivos médicos. Segundo a parte 1 da referida norma, o teste de citotoxicidade *in vitro* deve ser um dos ensaios iniciais para avaliar a biocompatibilidade de qualquer

biomaterial. Após a verificação da ausência de toxicidade, o estudo da biocompatibilidade do biomaterial pode prosseguir com a realização de outros ensaios *in vitro* (genotoxicidade, hemocompatibilidade, etc.) e *in vivo* em animais de laboratório (sensibilidade, implante, etc.). Algumas vantagens do teste de citotoxicidade incluem a rapidez, a sensibilidade (capacidade de distinguir entre materiais tóxicos e não tóxicos) e o baixo custo.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* se baseiam no contato do biomaterial ou do seu extrato com uma cultura celular de mamíferos. As alterações celulares são verificadas por diferentes mecanismos tais como a incorporação de um corante vital ou a inibição da formação de colônias celulares. A viabilidade celular é o parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade do material. As membranas celulares podem ser danificadas por muitas substâncias, resultando na diminuição da captura de um corante vital. Assim, a quantificação das células vivas, danificadas ou mortas pode ser efetuada pela intensidade de cor da cultura celular em um espectrofotômetro.

No presente trabalho o teste de citotoxicidade foi baseado na avaliação quantitativa de células viáveis depois de expostas ao extrato do biomaterial, e pela incubação com um corante supravital chamado MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolio) e um reagente de acoplamento eletrônico PMS (metassulfato de fenazina). O MTS é bioreduzido por células a um produto formazan que é solúvel no meio de cultura do tecido. A análise colorimétrica do corante incorporado é, então, realizada. A quantidade de MTS (marcador da viabilidade celular) absorvida pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura.(CORY A.H., 1991). A toxicidade induzida pela amostra sob teste é medida em uma faixa de concentrações de extrato do biomaterial e a concentração que produz uma redução em 50% da absorção de MTS é tomada como o parâmetro de toxicidade.

O extrato do biomaterial foi preparado de acordo com a ISO 10993-5, que preconiza uma razão entre a área da superfície e o volume do veículo de extração no intervalo de 0,5 a 6,0 cm²/mL. Amostras de 4 cm² foram esterilizadas por autoclavagem a 120⁰ C por 20 min e então 4 mL de RPMI 1640 foram adicionados e incubados a 37⁰ C por 48 h. O extrato obtido foi empregado no teste de citotoxicidade com uma cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO K1).

As células CHO foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Uma microplaca de cultura celular com 96 poços foi preparada com diluições crescentes (100, 50, 25, 12,5, e 6,25%)

do extrato do biomaterial (50 µl/poço, 4 poços/cada diluição). Em seguida, 50 µl da suspensão celular (3000 células) foram dispensadas nos poços. Colunas de controle de quatro poços foram preparadas com o meio sem células (branco) e meio mais células (controle negativo). A microplaca foi incubada sob atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após 72h, 20 µl de uma mistura (20:1) de 0,2% de MTS e 0,09% de PMS em PBS (solução tamponada de fosfato) foi adicionada aos poços e deixada por 2 h. A incorporação do corante foi medida pela leitura de absorbância a 490nm em leitor de microplacas contra a coluna do branco. O índice de citotoxicidade (IC_{50%}) foi estimado por interpolação, como a concentração do extrato que resulta em 50% de inibição da absorção de MTS, após a construção de um gráfico com a média de porcentagem de células vivas contra a concentração do extrato (%). Paralelamente ao ensaio, uma solução de fenol 0,3% e o polímero PEAD foram usados, respectivamente, como controles positivo e negativo.

6.3.5 Hiperemia

Diferentes materiais sintéticos orgânicos e seus híbridos orgânico-inorgânicos têm sido utilizados como implantes na medicina ²⁶. Do ponto de vista da bioengenharia o enxerto ideal seria aquele cuja topologia fosse consistente com o tecido biológico, deveria ser facilmente obtido e moldado e de baixo custo. Do ponto de vista bioquímico o material sintético “candidato” a biomaterial deveria causar o mínimo de reação tecidual não induzindo ou causando a inflamação. ²⁷

Neste trabalho a atividade inflamatória do copolímero PCL-co-Eg foi avaliada medindo-se a atividade da fosfatase alcalina no exsudato pós-implante, segundo metodologia experimental descrita por Marchant e outros ²⁸. Foram utilizados 10 ratos Wistar albinos, adultos, machos, sadios, com peso variando entre 250 e 300 gramas, alojados no biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Complutense de Madrid-Espanha. Os animais foram alocados em gaiolas apropriadas, máximo de cinco por gaiola, e receberam ração própria para ratos e água ad libitum.

Todos os animais do experimento foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico. A tranquilização foi realizada com mistura de fentanil-droperidol (Inoval) na dose de 0,3 mL/kg por via intramuscular e após 10 minutos foi feita indução anestésica com associação de tiletamina e zolazepam (Zoletil-50) na dose de 0,4 mL/kg de peso vivo.

Na manutenção da anestesia foi empregado o agente inalatório halotano. Cerca de 100 mg de microesferas do copolímero PCL-co-Eg pré-esterilizadas permaneceram em solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) a 37°C por 4 horas antes do implante. O copolímero de PCL-co-Eg foi implantado subcutaneamente no nível da panniculus carnosus. Após a recuperação de sua atividade física, os ratos foram recolocados em suas gaiolas e não sofreram restrição alimentar.

Amostras do exsudato (0,5 mL) foram periodicamente aspiradas sob condições estéreis apropriadas e a atividade da fosfatase alcalina foi medida por espectrofotometria segundo método descrito na literatura²⁸. Neste sentido, a fosfatase alcalina foi medida utilizando como substrato o p-Nitrofenil fosfato 0,01 M em tampão de dietanolamina 1M a pH 10,25. A intensidade da cor produzida, que é proporcional à atividade enzimática, é lida em 405 nm. Uma unidade de fosfatase alcalina foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de p-nitrofenol em 1 minuto a 37 °C e pH 10,25. Silicone grau médico foi escolhido como material para o grupo controle por ser um dos materiais sintéticos mais extensivamente empregado na medicina.

Considerando que a introdução de um corpo estranho no tecido biológico comumente induz uma reação mediada predominantemente por macrófagos, o exsudato também foi analisado quanto à presença destas células fagocíticas derivadas dos monócitos sanguíneos. Para a contagem dos macrófagos foram adicionados 100 µL de uma solução corante de cristal violeta a 900 µL de exsudato. O número total de células por mililitro foi contado em câmara de Neubauer. A média dos quatro cantos da câmara, multiplicada por 10⁴, forneceu o número total de células por mililitro de exsudato. Realizou-se a contagem diferencial de células, avaliando-se a porcentagem de macrófagos após contagem de 400 células em microscópio óptico comum, em aumento de 400 vezes, utilizando-se as colorações de Shorr e Giemsa. Nas lâminas que apresentaram muitos aglomerados celulares, a contagem diferencial foi feita, preferencialmente, na periferia.

Para análise dos resultados relativos a hiperemia causada pelos materiais (silicone e PCL-co-Eg} foi aplicado teste estatístico através de provas não paramétricas (análise de variância, seguida do teste de Friedman)²⁹. O grau de significância estabelecido foi de 5% (p<0,05).

6.4 Referências

- [1] DE QUEIROZ, A. A. A.; FRANÇA, É. J.; ABRAHAM, G. A.; ROMÁN, J. S. Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone by Iodine Charge-Transfer Complex. **J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.** v.40, p. 714, 2002.
- [2] <http://www.ucc.ie/academic/chem./dolchem/html/elem/elem053.html>, acesso em junho de 2006.
- [3] CHRIST, T L **Heterocyclic Chemistry**, 2ªed., Longman Scientific, London, 1992, p.22
- [4] CIAPETTI, G; AMBROSIO, L.; SAVARINO, L.; GRANCHI, D.; CENNI, E.; BALDINI, N.; PAGANI, S.; GUIZARDI, S.; CAUSA, F.; GIUNTI, A. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study , **Biomaterials.**, v.24, p.3815-3824,2003
- [5] DE ALMEIDA, K.A.; DE QUEIROZ, A.A.A. **Key Engin. Mat.**, v.16, p.589-592, 2004.
- [6] Separação de Compostos por Cromatografia disponível em <http://members.tripod.com/alkimia/cromatografia.htm>
- [7] KLAUSS, P. disponível em <http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/tcc%20Pri.Pdf>. Acesso em dezembro de 2004.
- [8] <http://whale.wheelock.edu/bwcontaminants/Gpc2.jpg>. Acesso em junho de 2006.
- [9] MOREIRA J. C; SILVA, I. F.; WANG, S. H.; BALOGH, D.T. Determinação das constantes K e da equação de Mark-Houwink de poli(p-acetóxiestireno), **Polímeros** v.14 n.2 São Carlos, 2004
- [10] KLEIN, I. Ressonância Nuclear Magnética em Químicas, Departamento de Química Geral e Inorgânica, Instituto de Química de Araraquara – UNESP, 1987 , disponível em <http://inorgan221.iq.unesp.br/quimgeral/nmr87/rmn87.htm>
- [11] Elementos de espectroscopia, disponível em http://www.chemkeys.com/bra/md/ede_5/edl_14/aanrdu_2/aanrdu_2.htm. Acesso em novembro de 2005.
- [12] Os princípios básicos na espectroscopia no infravermelho e Ramam , disponível em <http://laqqa.iqm.unicamp.br/IVRAman.htm>. Acesso em novembro de 2005.
- [13] SPEYER, R. **Thermal analysis of materials**, CRC Press, Nova York, v.5, 1993.
- [14] BARROS, A Quântica e a ciência dos materiais , disponível em <http://www.comciencia.br/reportagens/fisica/fisica12.htm>. Acesso em novembro de 2005.

- [15] GANDLER, J.R.; PATAI, S. In **The Chemistry of Double Bonded Functional Groups**, New York: John Wiley & Sons, v.2, part 1, 1989, p.734.
- [16] DE ALMEIDA, K.A.; DE QUEIROZ, A.A.A.; HIGA O.Z.; ABRAHAM, G.A.; SAN ROMÁN J. **J. Biomed. Mat. Re.** Part A, v.68, n.3, p.473-478, 2003.
- [17] SHELANSKI, H.A.; SHELANSKI, M.V. **J. Int. Coll. Surg.** V.25, p.727-734, 1956
- [18] LARSON, F. **Comm. Rep.**, v.15, n.6, p.25-35, 1987.
- [19] Center For Disease Control-Antimicrobial Susceptibility Tests, National Nosocomial Infection Study, Quartely Report, April 1974.
- [20] BAUER, A.; KIRB, W.M., SHERRIS, J.C. e cols Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, **Am. J. Clin. Path.** 36:493-496, 1976.
- [21] ROCHA, H.; ZULIANI, M.E.; TRABULSI, L. Antibiograma, **Rev. Microb.** 3(1) 51-60, 1972.
- [22] LOURIA, D.B. The Speciation Polemic: An analysis of the Debate Largely from an Epidemiologic Point of View *In* Lorian, V.- **Significance of Medical Microbiology in the Care of Patients**, Baltimore, The Williams and Wilkins Col, 1977, p 36-42.
- [23] MC CABE, W.R. Enterobacteriaceae: Clinical Significance of Speciation, *In* Lorian, V. **Significance of Medical Microbiology in the Care of Patients**, Baltimore, The Williams and Wilkins Col, 1977, p.87-95.
- [24] BOREFREUND, E.; PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR-90), **J. Tissue Culture Meth.** 9, 7-9, 1984.
- [25] BARLTROP, J.A. et al. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4,5-dimethylthiazol)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium, inner SALT (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. **Bioorg. & Med. Chem. Lett.** 1, 611, 1991.
- [26] WILLIAMS, D.F. Biomaterials and biocompatibility: An introduction. In: Williams, D.F. **Fundamental aspects of biocompatibility**. Florida, CRC Press, 1990.
- [27] WILLIAMS, D.F. Review tissue-biomaterial interactions. **J.Mater.Sci.** 22: 3421-45, 1987.
- [28] MARCHANT, R.; HILTNER, A.; HAMLIN, C.; RABINOVITCH, A.; SLOBODKIN, R.; ANDERSON, J.M. In vivo biocompatibility studies. I. The cage implant system and a biodegradable hydrogel. **J. Biomed. Mater. Res.** 17: 301-325, 1983.
- [29] ALTMAN, DG; GARDNER, MJ. **Statistics with confidence**. England: British Medical Journal Books; p 28-35, 2000.

7.1 Porcentual de conversão de polimerização do monômero ϵ -CL a PCL.

Neste trabalho o polímero poli(ϵ -caprolactona) foi obtido a partir da polimerização por abertura do anel do monômero ϵ -CL induzida por iodo à temperatura ambiente (25°C). Neste caso, efetuou-se a polimerização em massa do monômero ϵ -CL para análise da dependência da conversão do ϵ -CL em PCL em função do tempo. Para tanto, o sistema reacional foi preparado a partir da mistura de 0,037 mol de ϵ -CL (Sigma) e 0,3 mmol de I₂ (ressublimado, Sigma). Após reação o polímero obtido foi purificado por lavagem do polímero resultante com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) para remoção do iodo livre e precipitação sucessiva em etanol seguido de secagem sob vácuo à temperatura ambiente (298K) até peso constante.

O percentual de conversão foi calculado através da expressão:

$$\% \text{ Conversão} = \frac{m_{\text{monômero}}}{m_{\text{polímero obtido}}} \times 100 = \frac{m_{\epsilon\text{-PCL}}}{m_{\text{PCL}}} \times 100 \quad (1)$$

A polimerização de ϵ -caprolactona (ϵ -CL) se dá pela transformação de um complexo de transferência de carga (CTC) entre o iodo e o monômero. O complexo ϵ -CL:I₂ introduz uma tensão no anel, levando à sua abertura e havendo conseqüentemente o mecanismo de propagação da polimerização. O mecanismo de propagação da polimerização do ϵ -CL é ilustrado na Figura 1.

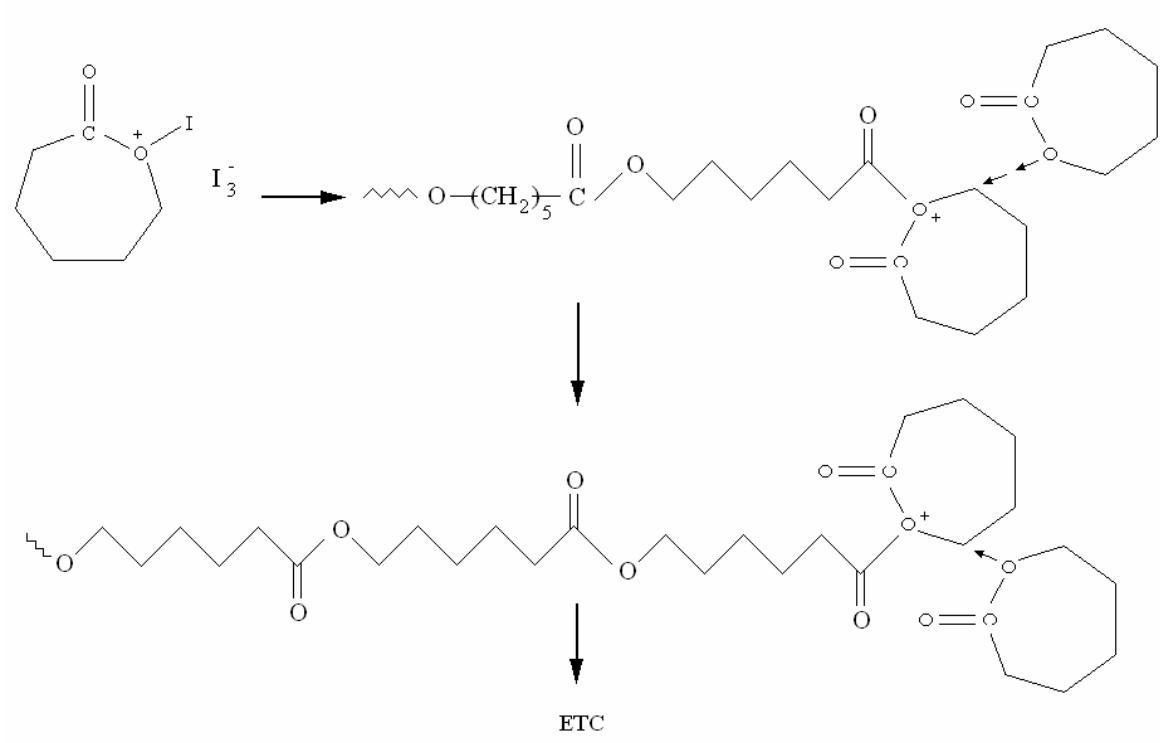
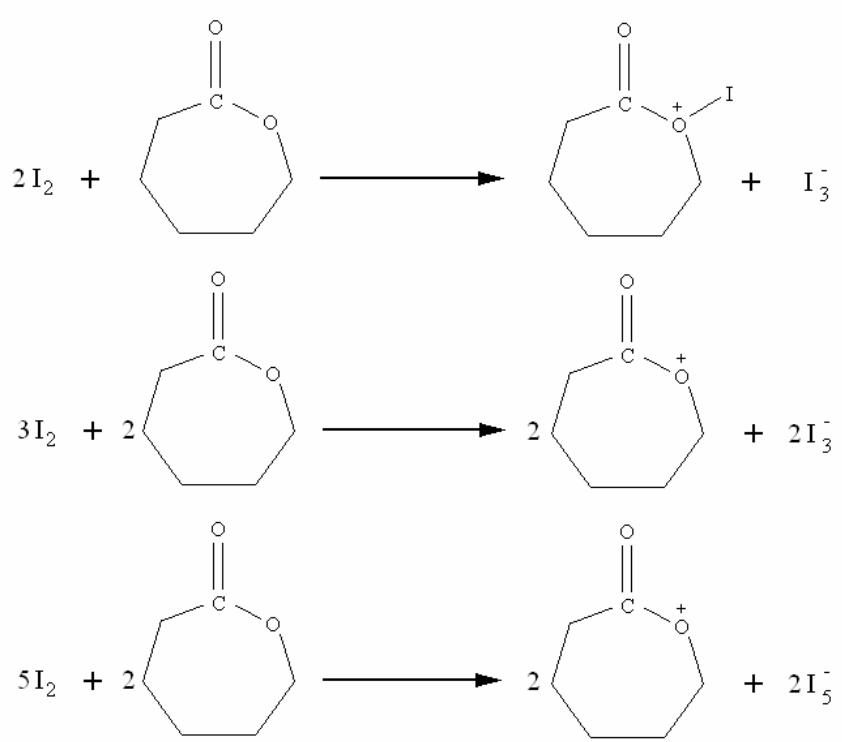


Figura 7.1: Processo de polimerização por abertura do anel da poli (ϵ -caprolactona) com o iodo.

A Figura 2 ilustra o percentual de conversão do monômero ϵ -CL em policaprolactona em função do tempo à temperatura de 25°C e a 50°C.

Pode-se observar que o sistema à temperatura de 25°C apresenta uma baixa velocidade reacional, levando-se em consideração que são necessárias aproximadamente 12 horas para se obter 90% de conversão. Nota-se ainda que a partir de 12 horas de reação o percentual de conversão não sofre grandes alterações, tornando-se praticamente constante.

Com o aumento da temperatura para 50°C o comportamento da conversão tem alteração considerável, tendo sido observado um menor percentual de conversão relativamente à temperatura ambiente.

Neste trabalho observou-se que a reação de abertura de anel do monômero ϵ -CL pelo I_2 é exotérmica ($\Delta H < 0$). Conseqüentemente, a elevação da temperatura acima de 25°C pode deslocar termodinamicamente a reação uma vez que $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Tal deslocamento de equilíbrio poderia causar uma diminuição no grau de conversão, conforme foi observado experimentalmente.

É importante ressaltar que a baixas temperaturas o rendimento do processo também é baixo. Isto leva a crer que outros fatores como a formação de agregados moleculares entre solvente e polímero poderia exercer um efeito mais significativo no grau de conversão. Entenda-se neste caso por solvente o próprio monômero ϵ -CL.

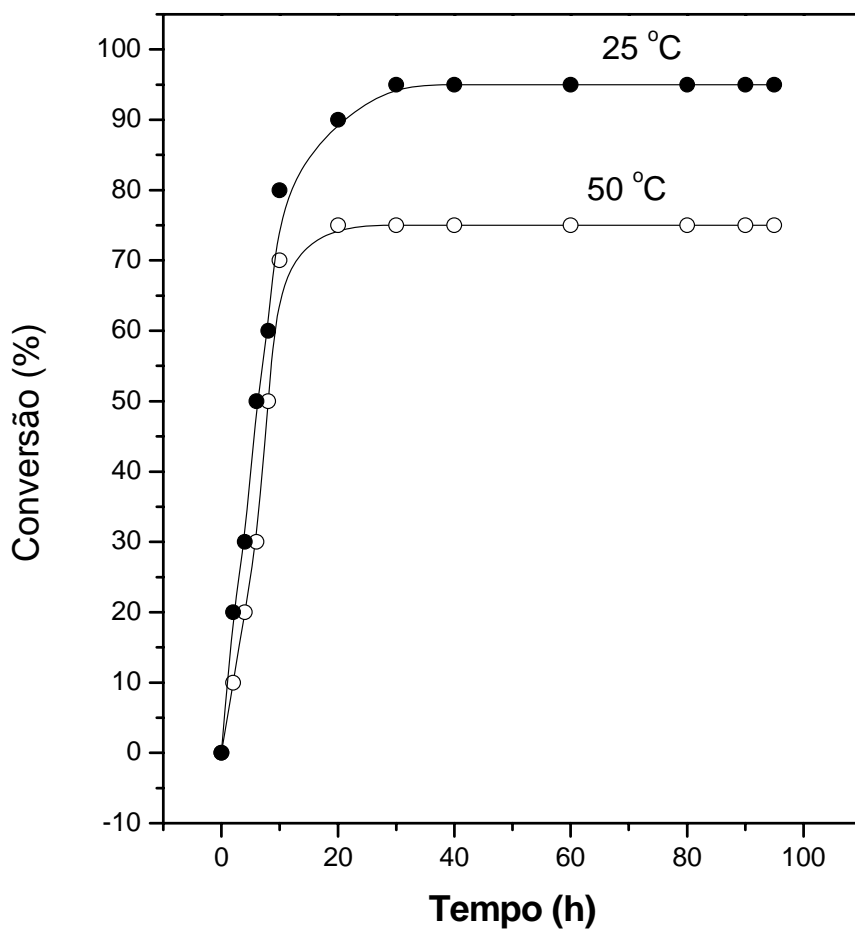


Figura 7.2: Dependência do percentual de conversão para polimerização em massa do monômero ϵ -CL em PCL em função do tempo e da temperatura do sistema reacional.

As Figuras 3-5 ilustram os espectros vibracionais (FTIR) do PCL, do eugenol e do copolímero PCL-co-Eg. As bandas de absorção são apresentadas na Tabela 1.

Verificou-se que os valores obtidos para as frequências vibracionais dos grupos funcionais característicos do PCL e eugenol estão em boa concordância com os valores observados na literatura.^{1,2}

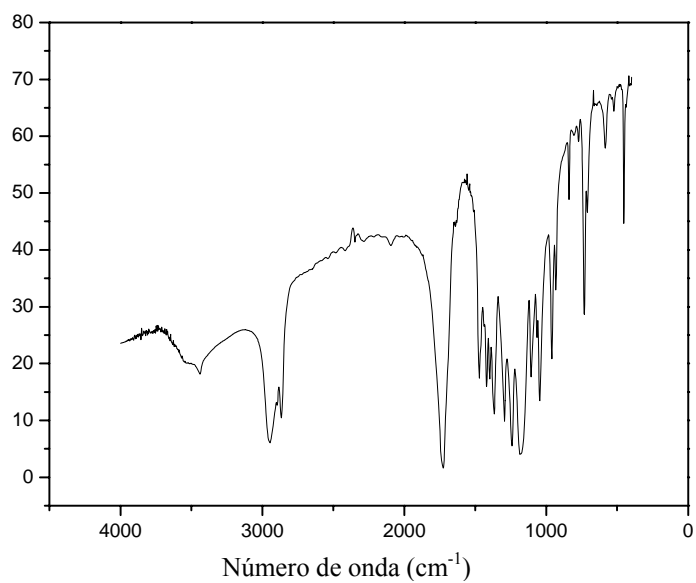


Figura 7.3: Espectro vibracional do PCL. O espectro foi obtido após dispersão de 100mg da amostra em pastilhas de KBr.

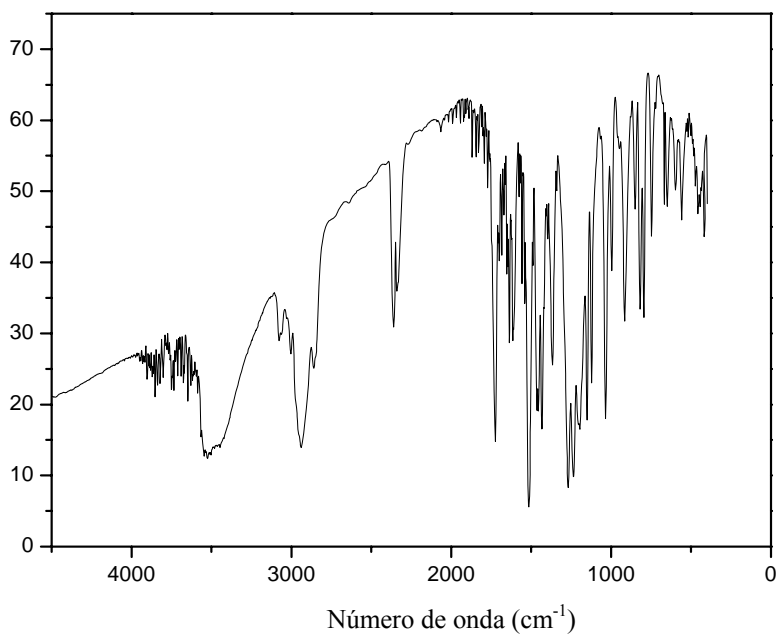


Figura 7.4: Espectro vibracional do eugenol.

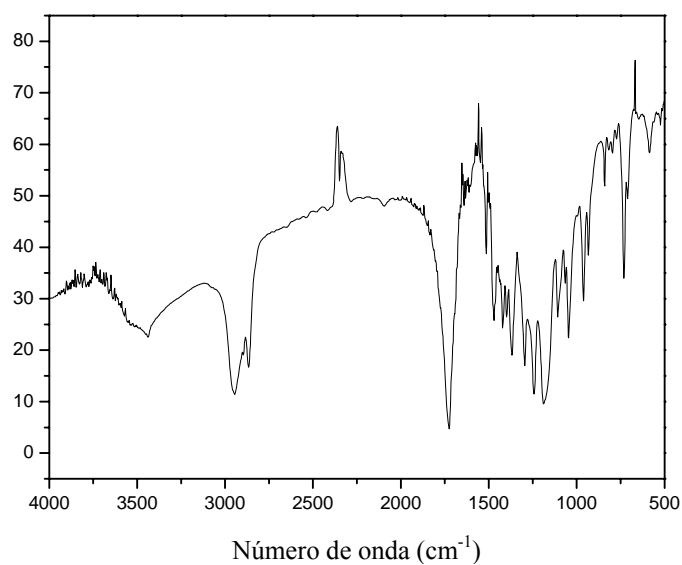


Figura 7.5: Espectro vibracional do copolímero PCL-co-Eg (18%Eg).

Tabela 7.1: Bandas de absorção relativas ao espectro FTIR do PCL

		Abreviação
2949	Estiramento assimétrico do CH ₂	$\nu_{as} \text{CH}_2$
2865	Estiramento simétrico do CH ₂	$\nu_s \text{CH}_2$
1727	Estiramento da carbonila	$\nu (\text{C}=\text{O})$
1293	Estiramento do C-O e C-C na fase cristalina	ν_{cr}
1240	Estiramento assimétrico da ligação C-O-C	$\nu_{as} (\text{C-O-C})$
1190	Estiramento OC-O	$\nu (\text{OC-C})$
1170	Estiramento simétrico COC	$\nu_s (\text{COC})$
1157	Estiramento simétrico C-O e C-C na fase amorfa	ν_{am}

Tabela 7.2: Bandas de absorção relativas ao espectro FTIR do eugenol

		Abreviação
3520 e 3460	Estiramento do O-H	ν (OH)
1370	Estiramento do anel com deformação no plano do O-H	-----
1209	Deformação no plano do O-H	-----
794	Provavelmente um modo inativo no infravermelho ativado pelo acoplamento com deformação do O-H fora do plano	-----
480-450	Deformação do grupo O-H fora do plano	-----

A Figura 6 ilustra o gráfico obtido através da técnica de GPC para o processo de polimerização por transferência de carga do monômero ϵ -CL. A Figura 7 ilustra a evolução do peso molecular do PCL em função do tempo de polimerização. Observa-se uma significativa diminuição do peso molecular em função do tempo de polimerização. A diminuição do peso molecular pode ser devido ao aumento da viscosidade do meio reacional que limita significativamente a difusão de radicais, uma característica dos sistemas de polimerização em massa.

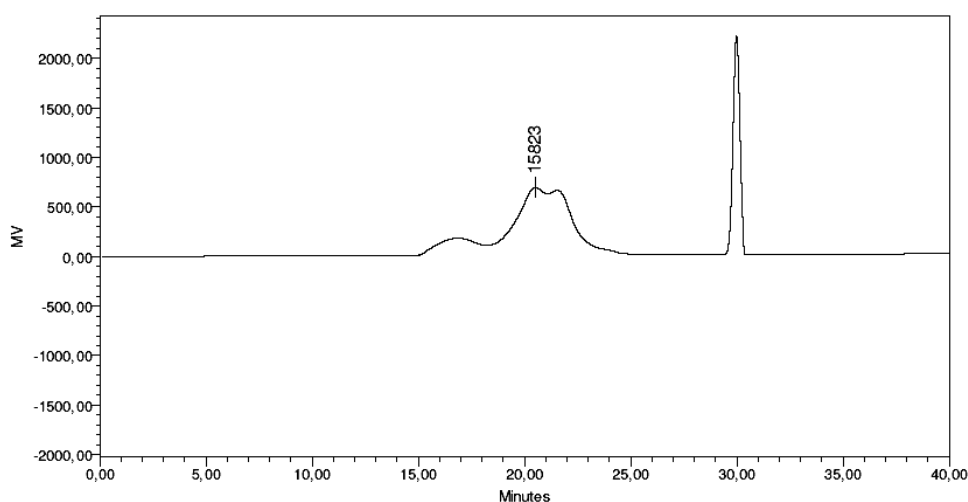


Figura 7.6: Análise do GPC do polímero PCL polimerizada via CTC após 121 horas de polimerização.

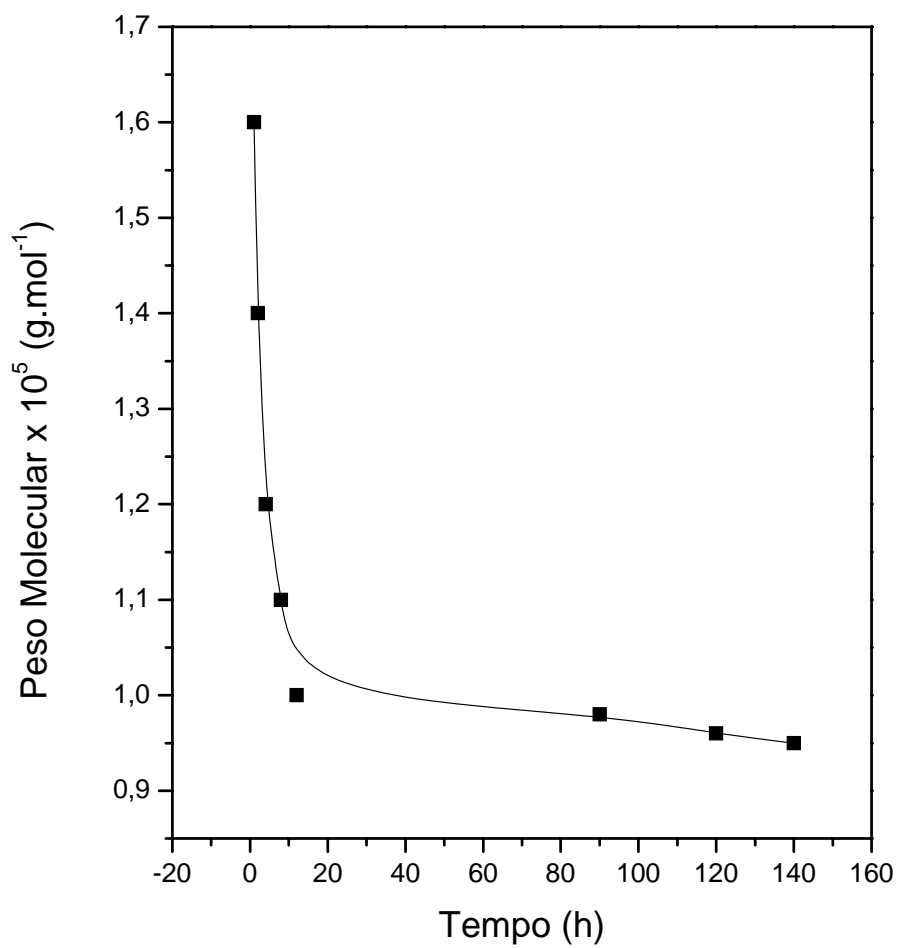


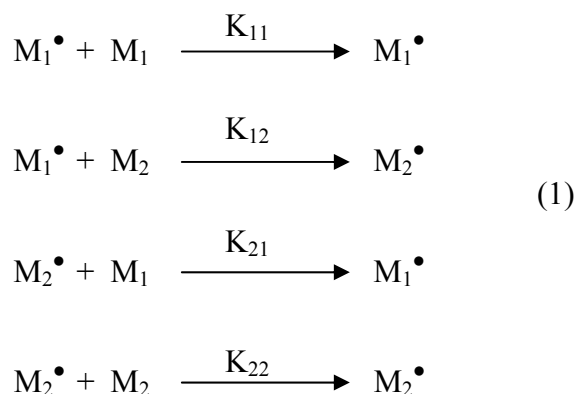
Figura 7.7: Evolução do peso molecular do polímero PCL em função do tempo.

7.2 Análise da composição dos copolímeros obtidos

As reações de copolimerização radicalar ocorrem através de etapas conhecidas como: iniciação, propagação e terminação.

Na etapa de iniciação geram-se radicais primários geralmente como consequência de decomposição térmica do iniciador. Os radicais primários reagem com os monômeros formando radicais monoméricos capazes de continuar o crescimento pela adição de novas unidades monoméricas na etapa de propagação.

Se a reatividade macroradical em crescimento não depender da natureza da unidade monomérica terminal que suporta o radical livre, o esquema cinético da etapa de propagação pode esquematizar-se de acordo com as equações:



sendo M_1^\bullet e M_2^\bullet os macroradicais em crescimento e K_{11} , K_{12} , K_{21} e K_{22} representam as constantes de velocidade de propagação das espécies méricas que se adicionam à cadeia.

As velocidades de consumo dos monômeros são dadas por:

$$-\frac{d[M_1]}{dt} = k_{11}[M_1^\bullet][M_1] + k_{21}[M_2^\bullet][M_1] \quad (2)$$

$$-\frac{d[M_2]}{dt} = k_{22}[M_2^\bullet][M_2] + k_{12}[M_1^\bullet][M_2] \quad (3)$$

A razão entre as equações (2) e (3) fornecem:

$$\frac{d|M_1|}{d|M_2|} = \frac{k_{11}|M_1^\bullet||M_1| + k_{21}|M_2^\bullet||M_1|}{k_{22}|M_2^\bullet||M_2| + k_{12}|M_1^\bullet||M_2|} \quad (3)$$

A eliminação das concentrações dos radicais $|M_1^\bullet|$ e $|M_2^\bullet|$ pode ser efetuada considerando-se que a etapa de propagação alcança rapidamente um estado no qual a concentração total de radicais se mantém constante (condições de estado estacionário). Neste caso, as velocidades de conversão do monômero a copolímero serão iguais:

$$k_{12}|M_1^\bullet||M_1| = k_{21}|M_2^\bullet||M_1| \quad (4)$$

substituindo-se (4) na equação (3) temos:

$$\frac{d|M_1|}{d|M_2|} = \frac{(k_{11}/k_{12})|M_1| + |M_2||M_1|}{(k_{22}/k_{21})|M_2| + |M_1||M_2|} \quad (4)$$

A razão entre as constantes cinéticas para os processos cinéticos de homopropagação e co-propagação denomina-se relações de reatividade dos correspondentes monômeros:

$$r_1 = \frac{k_{11}}{k_{12}} \quad \text{e} \quad r_2 = \frac{k_{22}}{k_{21}} \quad (5)$$

A equação (4) conhece-se como equação de composição do copolímero e tem sido comprovada experimentalmente para a determinação das relações de reatividade de um grande número de pares monoméricos.

A composição do copolímero quanto aos conteúdos de eugenol e ϵ -CL foi determinada a partir dos correspondentes espectros de $^1\text{H-NMR}$. As Figuras 8-10 mostram os espectros do PCL, Eg e PCL-co-Eg respectivamente.

Para o cálculo da composição consideramos as intensidades das integrais do sinal do grupo éster a 6,8 ppm e o sinal dos prótons aromáticos a 1,5 e 2,5 ppm para determinar a fração molar de caprolactona e eugenol no copolímero, respectivamente.

Considerando a equação (4) as concentrações $|M_1^\bullet|$ e $|M_2^\bullet|$ podem ser substituídas pelas correspondentes frações molares, obtendo-se a expressão:

$$\frac{f_1}{f_2} = \frac{F_1}{F_2} \frac{r_1 F_1 + F_2}{F_1 + r_2 F_2} \quad (6)$$

sendo F_1 e F_2 as frações molares do monômero na alimentação e f_1 e f_2 as frações molares no copolímero.

Fineman e Ross propuseram uma expressão linearizada da equação (b) para o cálculo das correspondentes relações de reatividade:³

$$\frac{F}{f} (f - 1) = r_1 \frac{F^2}{f} - r_2$$

sendo $F = F_1/F_2$ e $f = f_1/f_2$.

A representação gráfica de $F/f(f-1)$ em função de F^2/f origina uma linha reta cuja inclinação é igual a r_1 e o intercepto com a ordenada fornece o valor de $-r_2$.

Os valores da composição do copolímero (f) PCL-co-Eg obtidos a partir dos espectros de RMN são mostrados na Tabela 1.

As Figuras 8-10 mostram os espectros ^1H -RMN obtidos do homopolímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL), do eugenol e do copolímero PCL-co-Eg. A análise do espectro ^1H -RMN do copolímero evidencia a presença do eugenol em sua estrutura.

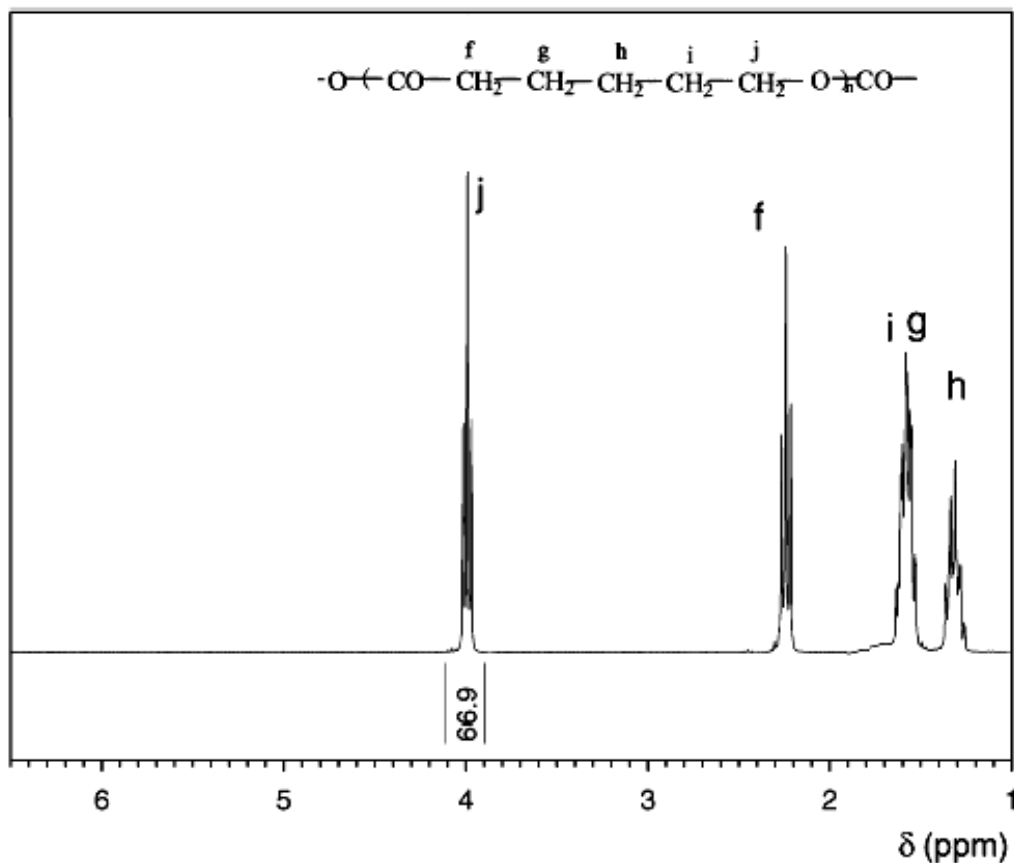


Figura 7.8: Espectro ^1H -RMN da poli(ϵ -caprolactona). Solvente CDCl_3 .

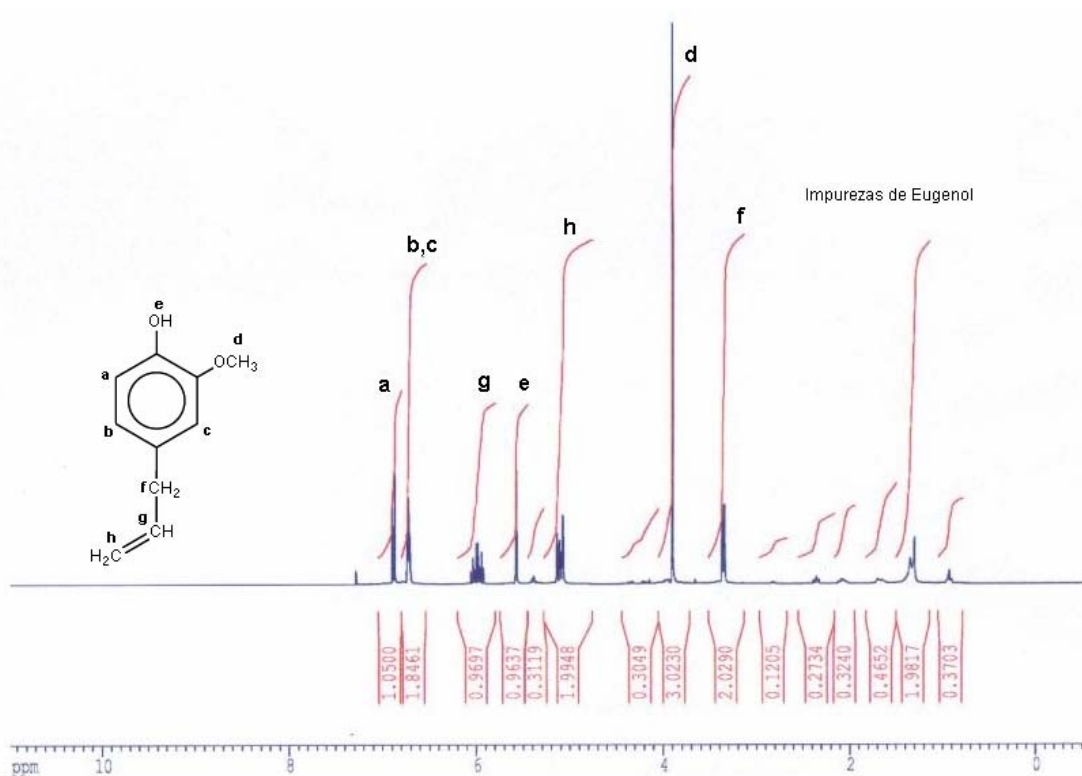


Figura 7.9: Espectros ^1H -RMN do eugenol. Solvente: CDCl_3 , temperatura: 25°C .

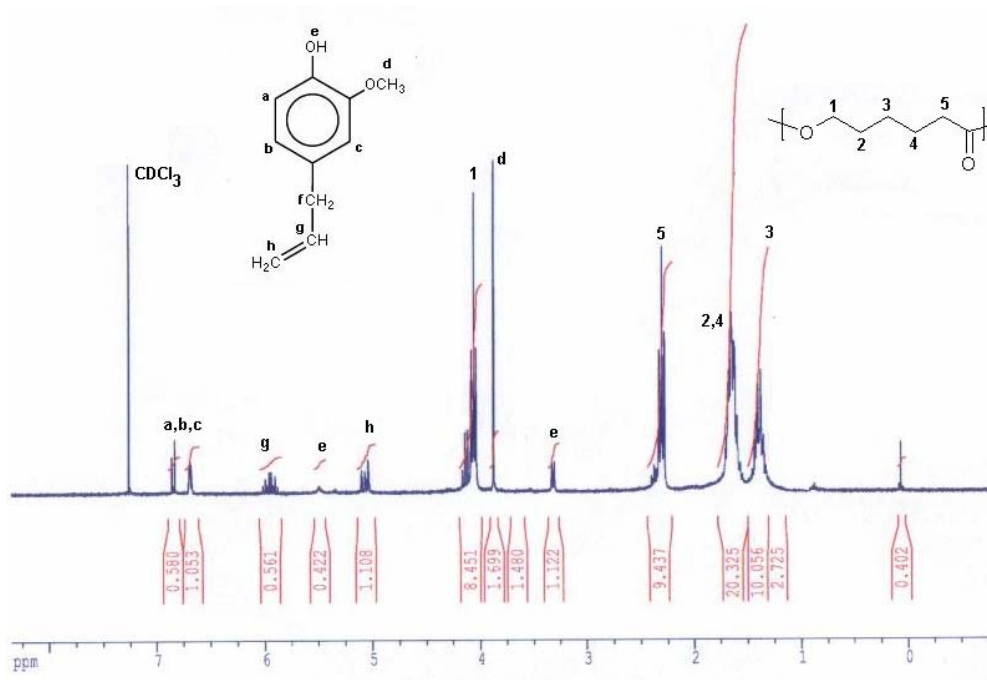


Figura 7.10: Espectro ^1H -RMN do copolímero PCL-co-Eg.

A aplicação dos dados de composição da Tabela 3 nas equações propostas de Fineman e Ross permite obter o gráfico representado na Figura 11.

Tabela 7.3: Copolimerização em massa entre Eg e ϵ -CL.

<i>Composição na alimentação</i>			<i>Composição no copolímero</i>	
Eg	ϵ-CL	Conversão (%)	Eg	ϵ-CL
0,15	0,85	6,2	0,05	0,95
0,30	0,70	6,0	0,10	0,90
0,50	0,50	5,9	0,20	0,80
0,70	0,30	6,8	0,30	0,70

Temperatura: 25°C , $[\text{I}_2] = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, precipitante: álcool etílico. Os resultados obtidos correspondem à média aritmética de 3 medidas. Resultados com desvio padrão superior a 0,01 foram desprezados.

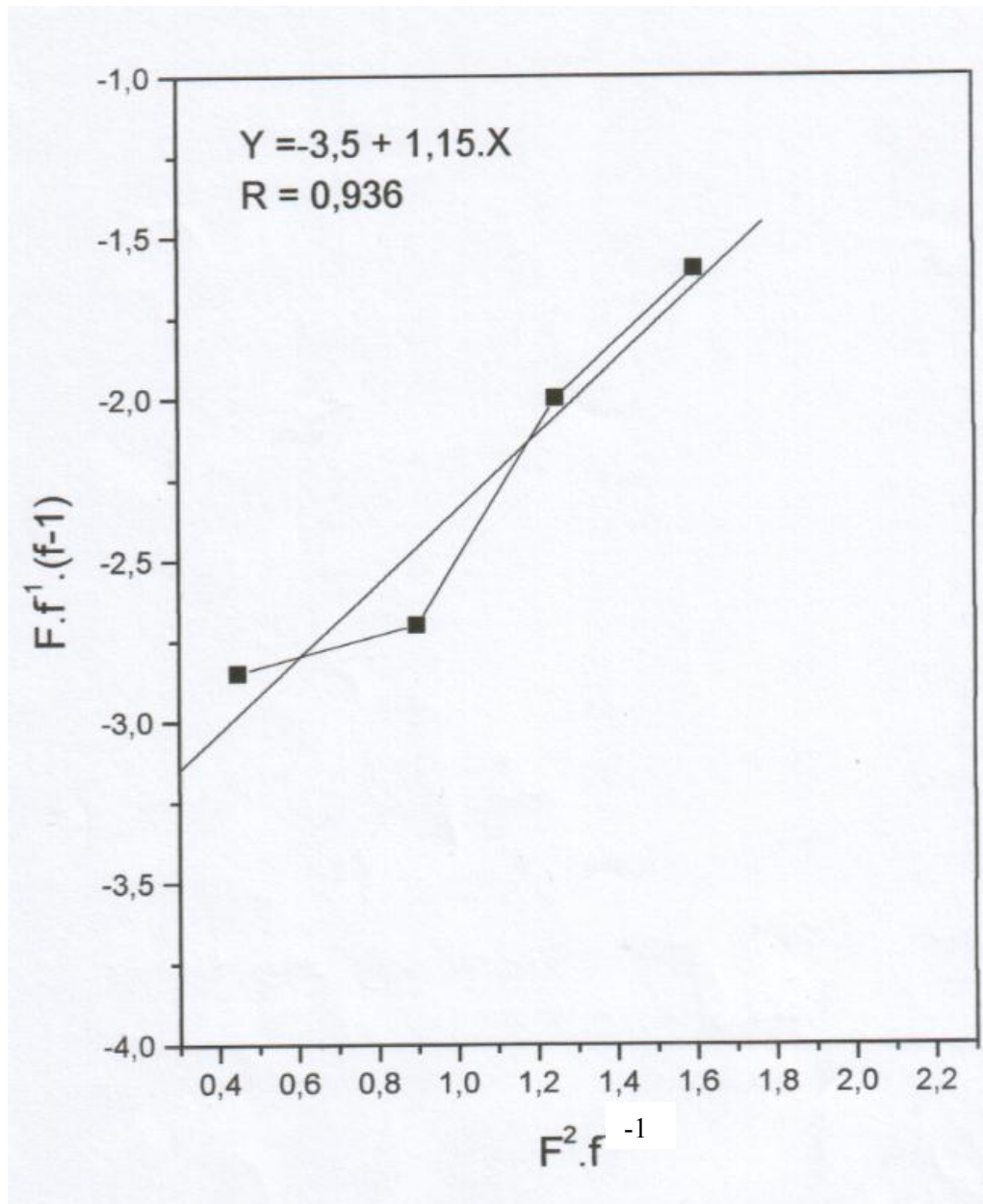


Figura 7.11: Diagrama de Fineman-Ross para a copolimerização radicalar de Eg com ϵ -CL

O gráfico obtido foi ajustado pelo método dos mínimos quadrados. As relações de reatividade para o Eg e o ϵ -CL calculadas a partir da Figura 11 foram 1,15 e 3,5, respectivamente.

O inverso das relações de reatividade indica as reatividades dos radicais livres correspondentes. O valor de $1/r_1 = 0,87$ indica que os radicais cujo extremo ativo em

crescimento é uma unidade de Eg são mais reativos frente a seu próprio monômero que frente ao ϵ -CL. O valor obtido $1/r_2 = 0,29$ indica que os radicais cujo extremo ativo em crescimento é uma unidade de ϵ -CL são mais reativos frente a seu próprio monômero que frente ao Eg. ⁴ Neste sentido, para uma determinada composição do meio reacional a tendência à formação de seqüências de ϵ -CL é relativamente maior que a formação de seqüências de Eg.

O produto das relações de reatividade indica de uma maneira geral a distribuição das unidades méricas no copolímero. Neste trabalho, o produto das relações de reatividade $r_1 \cdot r_2 = 4,03$ sugere que o copolímero PCL-co-Eg apresenta uma distribuição de unidades méricas essencialmente ao acaso.

7.3 Caracterização Físico-Química do Copolímero PCL-co-Eg

O processo de biodegradação e bioreabsorção dos polímeros bioabsorvíveis e biodegradáveis é descrito na literatura como sendo uma sucessão de eventos cujo mecanismo *in vivo* demonstra ser um processo heterogêneo na extensão do material. O processo é homogêneo inicialmente, gerando oligômeros solúveis em água em toda a extensão do material. Os produtos presentes na superfície da matriz são difundidos para o meio, entretanto, a baixa taxa de difusão dos produtos da reação no interior do material gera um acúmulo de ácidos (no caso de poliésteres) fazendo com que as estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada no centro.

Está amplamente demonstrado pela literatura que o comportamento dos polímeros bioabsorvíveis e biodegradáveis está intimamente ligado às suas propriedades físico-químicas e bioquímicas.

As propriedades físico-químicas como peso molecular do polímero, temperatura de transição vítrea e topologia podem ser fatores determinantes na cinética de degradação ou absorção de polímeros biodegradáveis/bioabsorvíveis no organismo biológico.

7.3.1 Temperatura de transição vítrea (Tg) do sistema PCL-co-Eg

Os polímeros amorfos podem ser considerados como líquidos subresfriados. Ao se esfriar um líquido a temperatura suficientemente baixas, sem que ocorra a cristalização, a mobilidade molecular própria do estado líquido se perde e o líquido subresfriado é convertido em um sólido rígido e indeformável que carece do ordenamento próprio dos cristais. Considera-se que o sólido aparentemente desordenado e carente de mobilidade molecular está em um estado denominado estado vítreo. Os polímeros são um exemplo típico de substâncias químicas que dão lugar ao estado vítreo por resfriamento do material fundido.

No estado amorfo, as macromoléculas apresentam conformações desordenadas, como no estado dissolvido. Separando estas distintas conformações, existem barreiras de energia de rotação (barreiras que separam os isômeros rotacionais de cada uma das ligações). Quando a temperatura é suficientemente elevada, a frequência de salto sobre as barreiras é grande e as macromoléculas passam rapidamente de uma conformação a outra. Se a temperatura é reduzida progressivamente, a variação conformacional se torna cada vez mais lenta (menos freqüente) e suas cadeias perdem sua flexibilidade uma vez que suas unidades perdem a mobilidade que lhes permite saltar de uma conformação a outra.

Se não houver cristalização, o polímero pode se esfriar sem que varie sua desordem. Nesse resfriamento chega-se a alcançar uma temperatura característica de cada polímero, que se denomina temperatura de transição vítrea, Tg. Abaixo da Tg a sua mobilidade molecular é tão pequena que as cadeias se tornam congeladas em conformações praticamente fixas.

A temperaturas inferiores a Tg o polímero mantém o caráter desordenado, mas devido à falta de mobilidade molecular o seu aspecto é o de um sólido rígido. Em temperaturas superiores à Tg o aspecto do polímero sólido é muito diferente, mostrando-se deformável devido à flexibilidade parcial de suas cadeias.

A transição vítrea dos polímeros biodegradáveis úteis para a ortopedia se encontra acima da fisiológica (37°C) e, nessa condição eles se encontram na forma cristalina. Esta característica é, também, um fator determinante da velocidade de degradação dos polímeros já que está relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas. Portanto, o polímero que apresenta maior Tg, geralmente se degrada mais lentamente.

Uma das técnicas mais utilizadas para a determinação da T_g é a calorimetria exploratória diferencial (DSC). A Figura 12 mostra os termogramas para o PCL e seus copolímeros PCL-co-Eg.

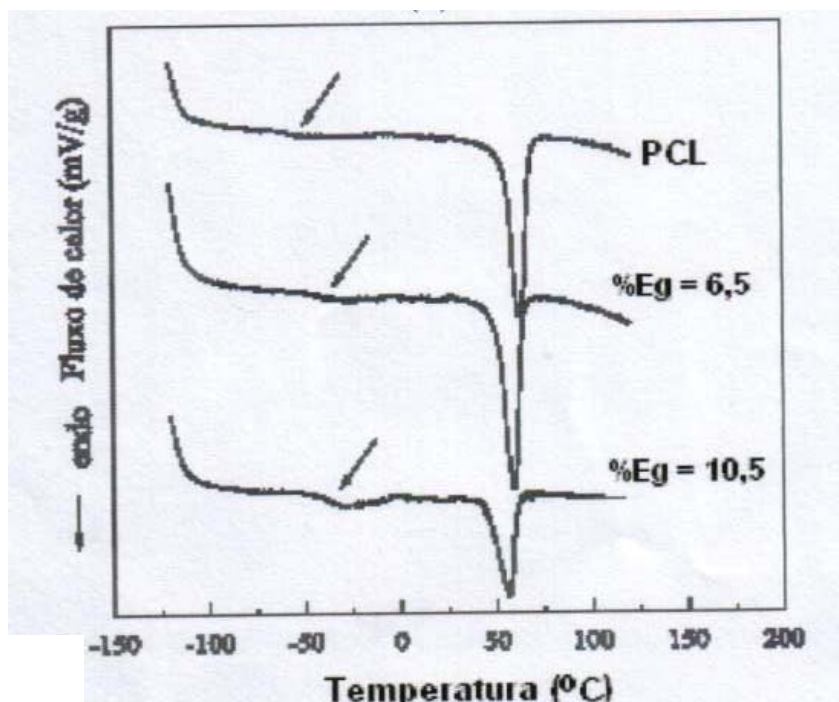


Figura 7.12: Termograma para o PCL e seus copolímeros PCL-co-Eg.

Supondo que o fenômeno da transição vítrea está controlado predominantemente por interações de curto alcance, as transições vítreas dos homopolímeros podem ser determinadas considerando uma contribuição aditiva dos pares monoméricos. Neste sentido, trabalhos na literatura indicam que a distribuição de seqüências na cadeia polimérica afeta a temperatura de transição vítrea aliada ao fato de que os efeitos em muitos copolímeros estatísticos podem ter uma origem intramolecular, como interações moleculares específicas entre unidades monoméricas adjacentes.⁵

Os efeitos microestruturais nas temperaturas de transição vítrea dos copolímeros foram considerados do ponto de vista matemático por Fox.⁶ A equação de Fox é dada por:

$$\frac{1}{T_g} = \omega_1 \left[\frac{1}{T_{g1}} - \frac{1}{T_{g2}} \right] + \frac{1}{T_{g2}} \quad (7)$$

sendo T_g , T_{g1} e T_{g2} as temperaturas de transição vítrea do copolímero, PCL e PCL-co-Eg, respectivamente; ω_1 representa as frações em peso de ϵ -CL nos copolímeros PCL-co-Eg. $T_{g1} = T_{g(\text{PEg})} = 130^\circ\text{C}$, $T_{g2} = T_{g\text{PCL}} = -65^\circ\text{C}$.

A Figura 13 mostra o diagrama obtido ao aplicar os dados experimentais ao tratamento proposto por Fox, de acordo com a equação (7). O desvio da equação de Fox e a elevação na temperatura de transição vítrea (T_g) podem ser devido à formação do copolímero ao acaso uma vez que estes copolímeros geralmente encontram uma maior dificuldade em se ordenar em um retículo cristalino. Isto deveria levar a pontos de fusão mais baixos maiores valores da relação do material amorfo para material cristalino e conseqüentemente valores de T_g 's mais baixos. Observando-se ainda a Figura 13 nota-se que os valores de T_g aumentam com o teor de eugenol no copolímero e que apresentam a mesma tendência dos valores obtidos teoricamente utilizando a equação de Fox. Os valores de T_g calculados pela equação de Fox são mais elevados que os valores obtidos experimentalmente. A presença de somente uma T_g corrobora os resultados de RMN, indicando que os copolímeros formados são randômicos.

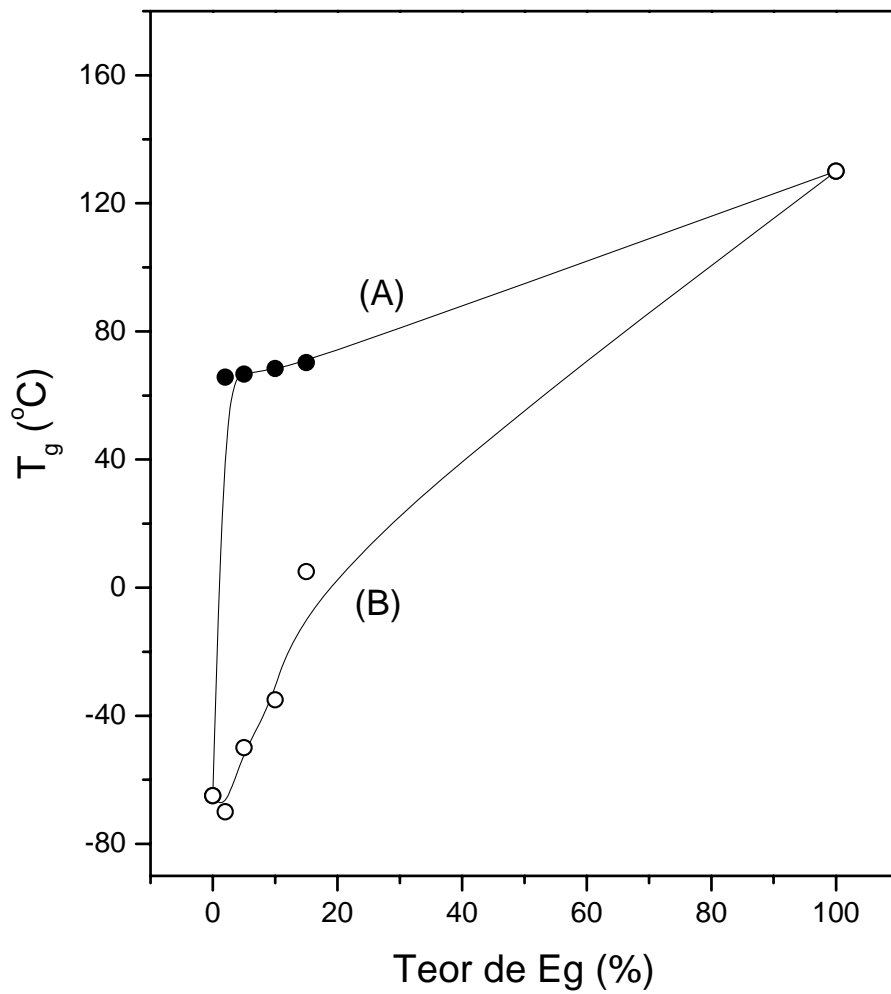


Figura 7.13: Variação da temperatura de transição vítrea dos copolímeros PCL-co-Eg em função do teor de Eg. Calculado de acordo com a equação de Fox (A) e obtido experimentalmente (B).

7.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 14 mostra a micrografia MEV dos copolímeros PCL e PCL-co-Eg, respectivamente. Observa-se uma estrutura porosa com diâmetro médio dos poros de 5 a 10 μ m. A porosidade pode favorecer o crescimento de tecidos através do material, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando a resistência do material *in vivo*. A existência de poros possibilita o estabelecimento de células que serão precursoras do novo tecido, ou seja, as células osteoprogenitoras encontram nos poros do material locais para se estabelecerem e darem origem a osteoblastos formadores de tecido ósseo.

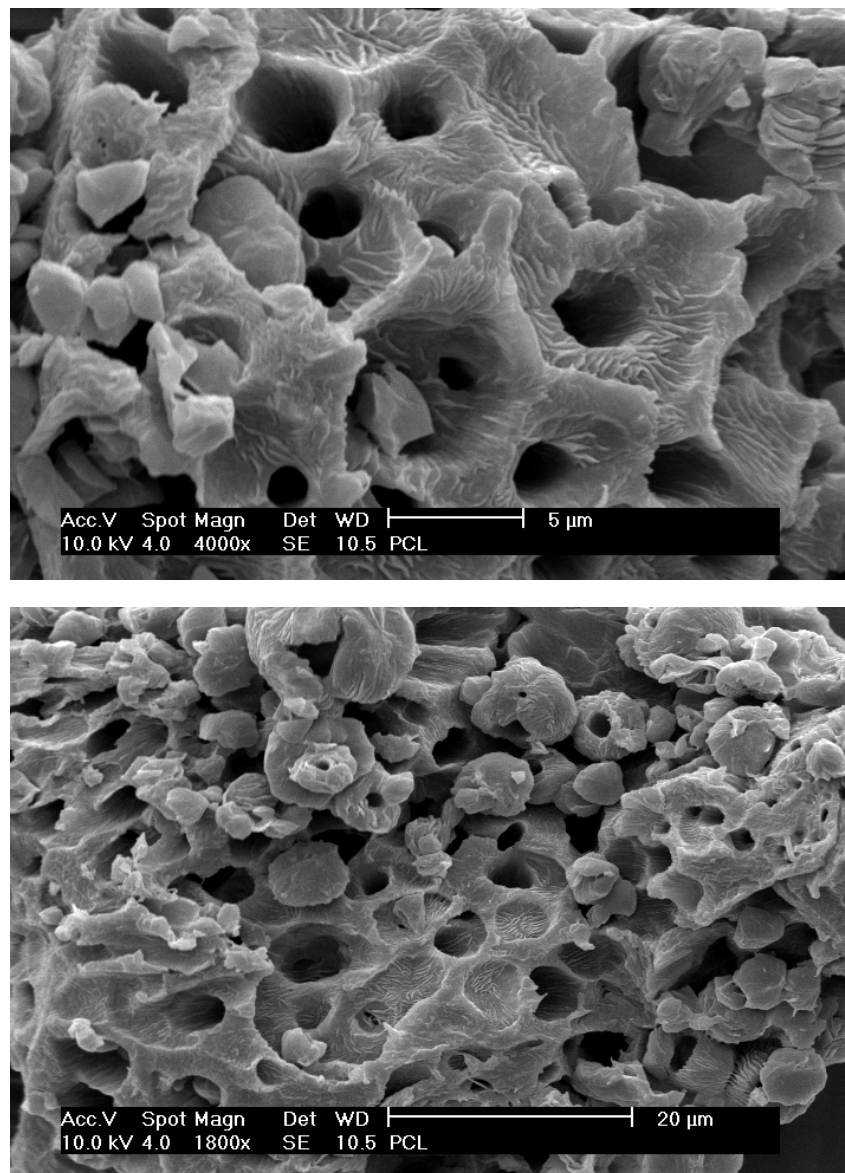


Figura 7.14: Micrografia de PCL e PCL-co-Eg. %Eg=10%/m.

7.4 Caracterização bioquímica

O trabalho de investigação descrito anteriormente tem como objetivo não somente a síntese de novos sistemas biodegradáveis/bioabsorvíveis e o estudo de sua microestrutura. É também objetivo deste trabalho a síntese de sistemas macromoleculares com potencial atividade antimicrobiana capazes de promover a restauração óssea. Por sua natureza química, os sistemas aqui sintetizados podem sofrer hidrólise por via enzimática através de mecanismos biodegradáveis dos quais participam enzimas como α -quimotripsina, esteanases, lípases, entre outras.

De acordo com a proposta deste trabalho, este tópico descreve o estudo dos processos de biodegradação em função da composição dos copolímeros PCL-co-Eg;

A atividade biológica do copolímero obtido foi estudada utilizando a relação quantitativa estrutura-química atividade biológica (QSAR).

7.4.1 Difusão de fluido fisiológico (intumescimento)

As características de absorção do copolímero foram avaliadas para prever o comportamento do polímero PCL e do copolímero PCL-co-Eg em contato com os fluidos corpóreos. As características de hidrofobicidade da poli (ϵ -caprolactona) foram reforçadas pela adição do eugenol, nota-se uma absorção percentual da solução fisiológica significativamente menor quando o antimicrobiano está presente na amostra. Após aproximadamente 5 horas de exposição nota-se uma estabilização no comportamento do copolímero PCL-co-Eg em relação à absorção de água.

A característica de hidrofobicidade do material torna-se importante quando consideramos que a presença de água é fator desfavorável para a ocorrência de osseointegração. A Figura 15 mostra a absorção de fluido fisiológico pelo PCL e PCL-co-Eg, respectivamente. Percebe-se que a incorporação do eugenol no PCL reduz significativamente a absorção de água, provavelmente devido à presença dos anéis aromáticos hidrofóbicos do Eg.

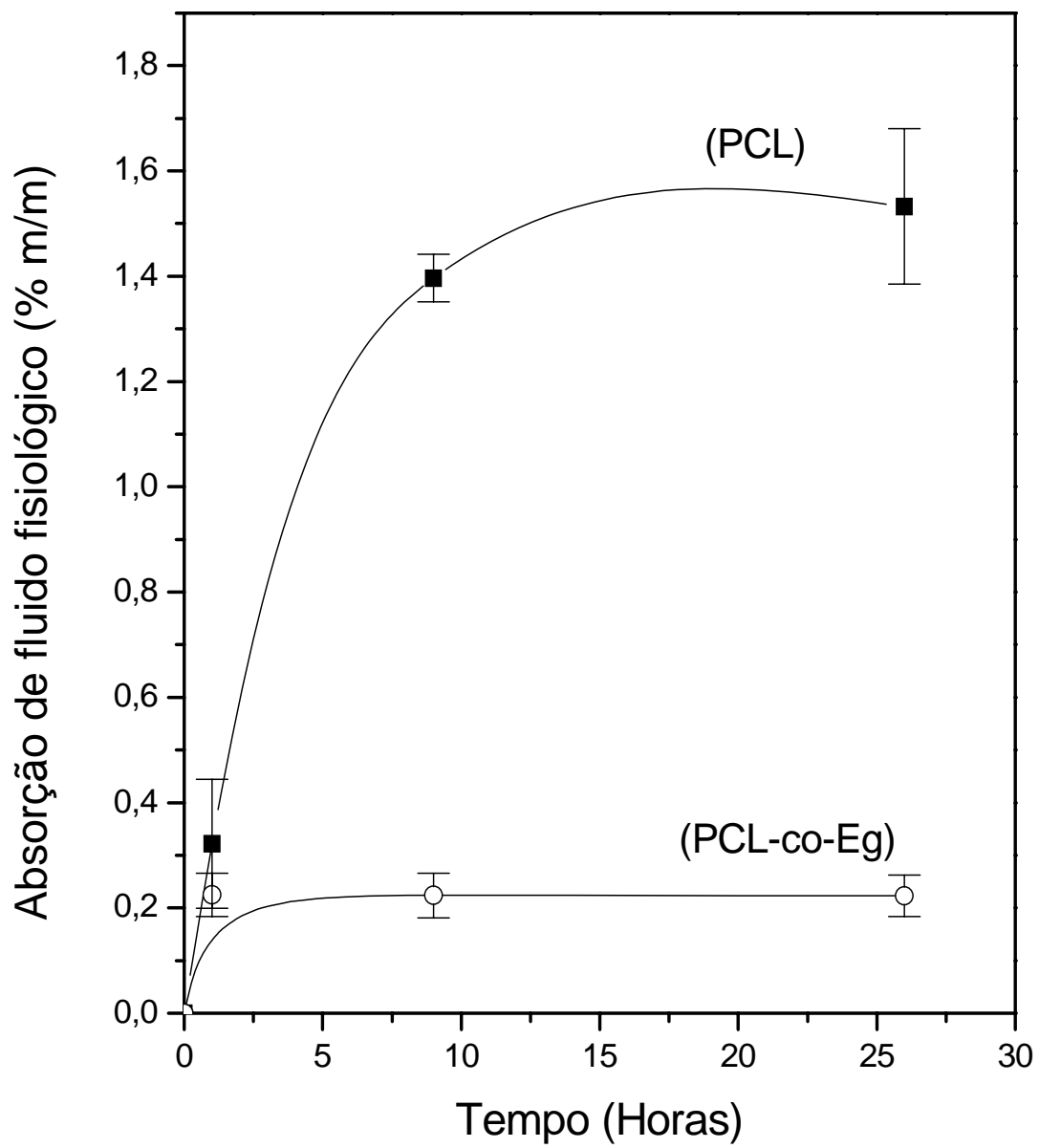


Figura 7.15: Curva de intumescimento da PCL e do copolímero PCL-co-Eg

7.4.2 Biodegradabilidade

Materiais biodegradáveis despertam grande interesse na medicina, odontologia, engenharia de tecidos tanto pela utilização com finalidade de regeneração de tecidos orgânicos como por não provocarem reações inflamatórias que sejam permanentes. Embora se trate de corpos estranhos que possam estar susceptíveis a adesão de microrganismos, os materiais biodegradáveis serão absorvidos pelo próprio organismo gradativamente representando uma importante vantagem no que se refere à saúde do paciente.

Após contato com o fluido biológico no organismo e hidrólise da cadeia polimérica as moléculas resultantes, de baixa massa molecular, podem ser absorvidas pelo organismo ou removidas pelo metabolismo. A biodegradação enzimática da PCL ocorre principalmente e primordialmente na superfície porque para as enzimas hidrofílicas é difícil a difusão no polímero hidrofóbico.

As Figuras 16 e 17 apresentam as curvas de perda de massa em função do tempo para a PCL e PCL-co-Eg, respectivamente. A derivada obtida aponta para uma máxima perda de massa por volta do 16º dia para o polímero e do 12º dia para o copolímero. O comportamento de biodegradação das amostras corrobora com aquele encontrado para PCL na literatura, pites na superfície após o 9º dia, alguma erosão superficial com desintegração inicial da estrutura no 16º dia e após o 23º dia perda da forma da amostra.⁷

A presença de eugenol parece acelerar as etapas do processo de hidrólise no copolímero PCL-co-Eg como observado nas Figuras 16 e 17. Essa aceleração pode ocorrer devido à ionização do grupo fenólico que produz um microambiente levemente ácido e propício à degradação da ligação éster presente no copolímero.

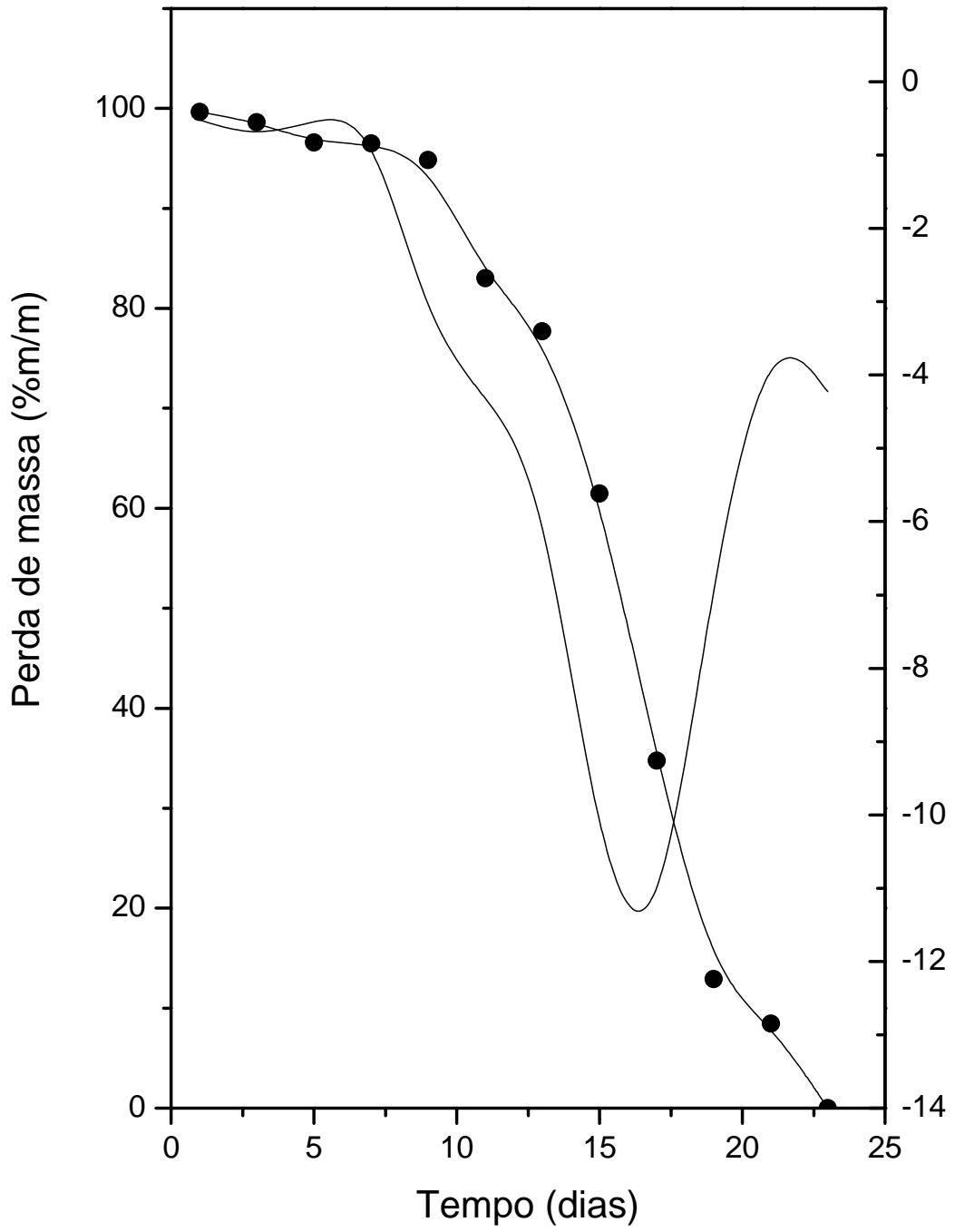


Figura 7.16: Curva de biodegradação da poli (ϵ -caprolactona)

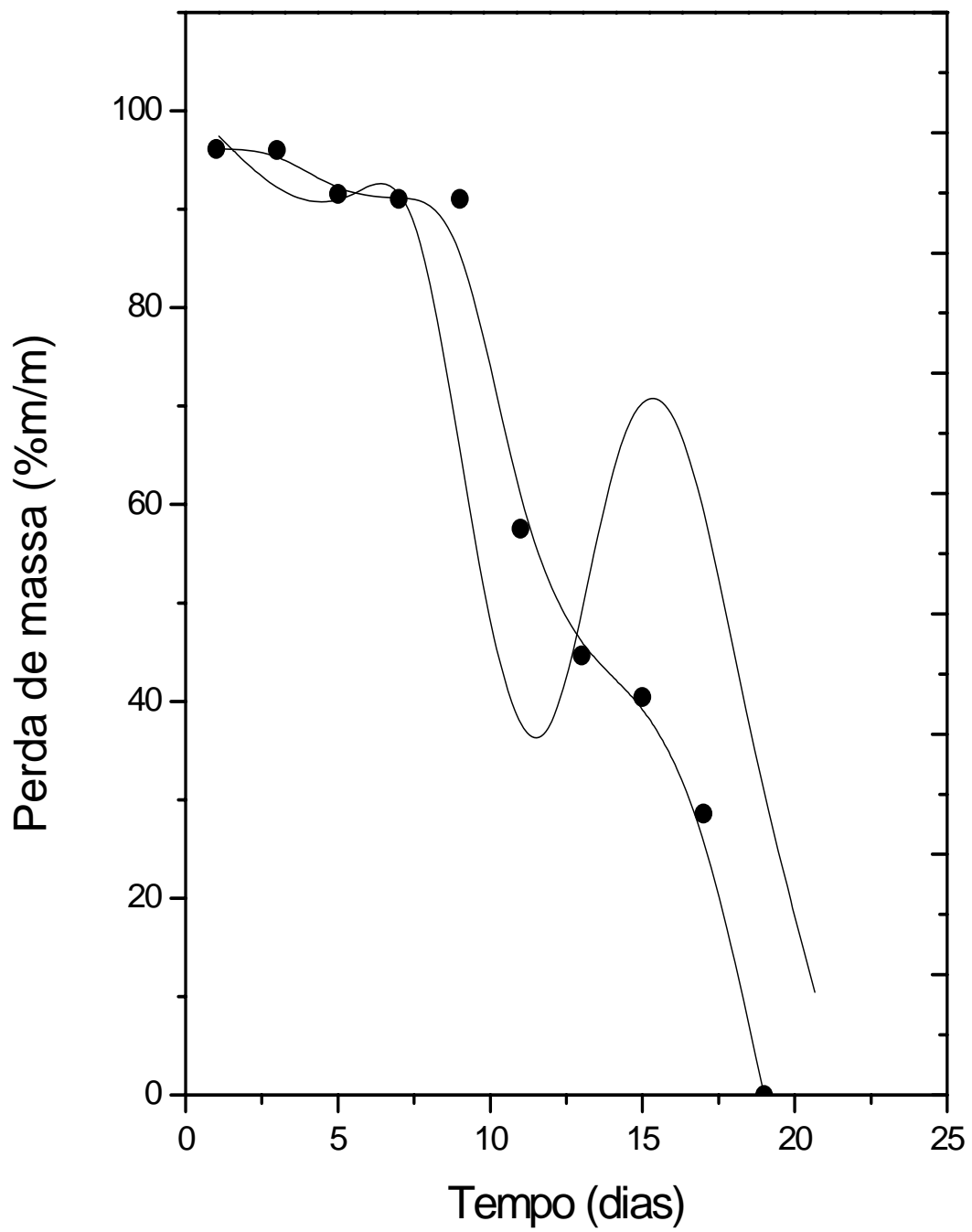


Figura 7.17: Curva de biodegradação da poli (caprolactona)-co-eugenol. Porcentual de Eg no copolímero : 6,5% (m/m).

7.4.3 Hidrólise enzimática

O polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL) tem sido utilizado em um amplo número de aplicações para a obtenção de materiais implantáveis na área médica. Tais aplicações incluem suturas cirúrgicas, sistemas para liberação controlada de fármacos, dispositivos ortopédicos e como suporte na engenharia de tecidos.

Exposto aos fluidos biológicos, o PCL pode inicialmente sofrer uma pequena hidratação através de interações do tipo íon-dipolo ou van der Waals entre as moléculas de água e as ligações éster e unidades metilênicas existentes no PCL.

Após a hidratação o polímero PCL sofre a degradação enzimática via processos biologicamente ativos uma vez que o corpo humano contém catalisadores biológicos denominados enzimas.

Estes compostos são capazes de hidrolisar as ligações éster do PCL, produzindo compostos de baixo peso molecular. Os produtos finais da degradação do PCL são oligômeros não tóxicos que podem ser dializados ou simplesmente metabolizados pelo organismo humano.⁸

Buscando uma avaliação inicial do comportamento do copolímero PCL-co-Eg pós-implante, estudos da degradação “in vitro” mostram-se como uma boa alternativa quando comparados aos estudos “in vivo”, fundamentais e necessários na sua aplicação como biomaterial. Ressalta-se que os ensaios “in vitro” envolvem custos menores e os produtos e subprodutos de degradação podem ser quantificados e monitorados de modo mais simples, relativamente aos ensaios “in vivo”.

Simulando as condições fisiológicas de osmolaridade e pH o estudo da biodegradabilidade do copolímero PCL-co-Eg foi efetuado em solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 contendo a enzima lipase.

A lipase é uma enzima da classe das hidrolases que exhibe atividade para quebra de ligações químicas do tipo éster de poliésteres insolúveis em água.⁹⁻¹¹

A maior perda de peso observada para a enzima lipase (Figura 18) pode estar associada à maior atividade da lipase na hidrólise de poliésteres insolúveis em água relativamente à colesterol estearase. Observa-se que a determinação das atividades enzimáticas está fora do escopo deste trabalho.

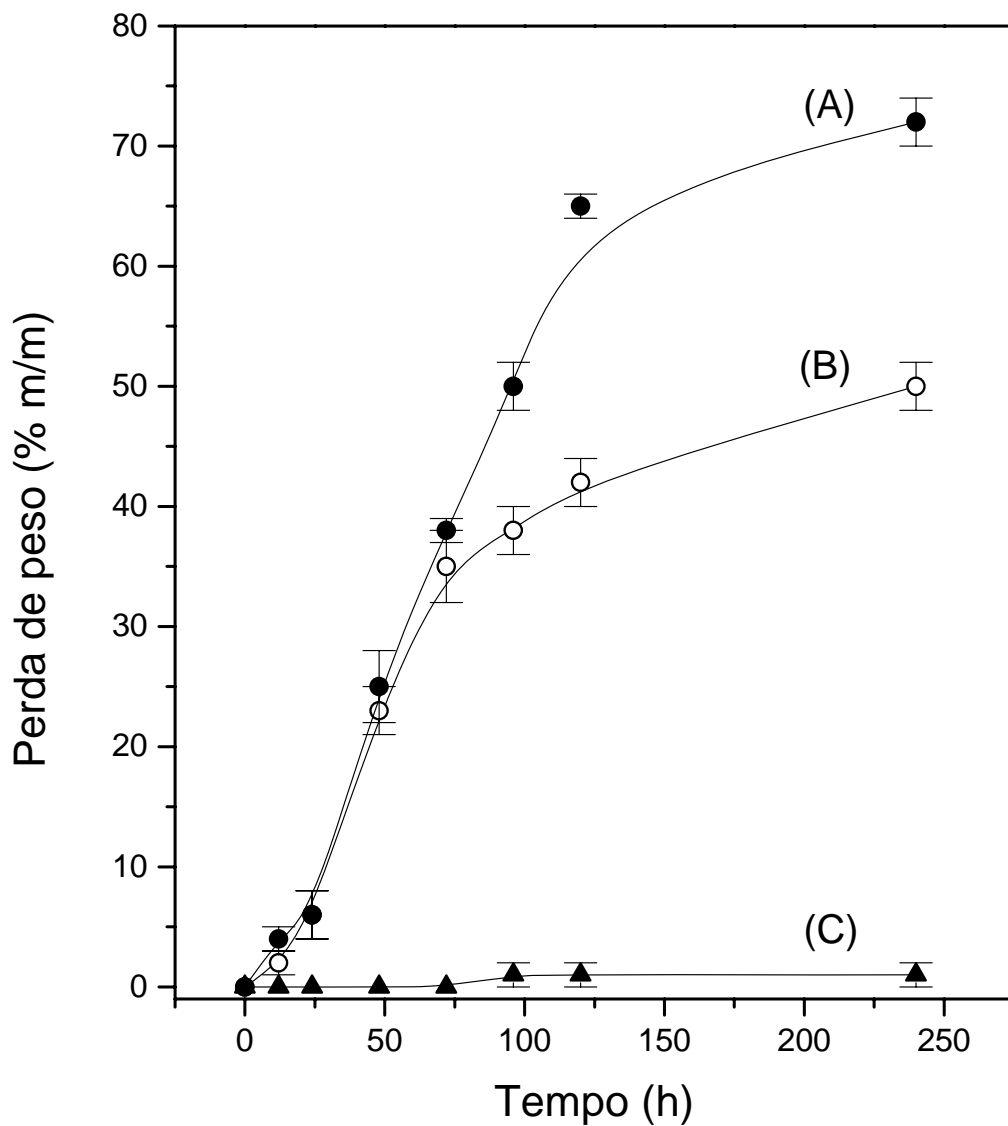


Figura 7.18: Análise de biodegradabilidade dos copolímeros PCL-co-Eg em solução fisiológica (PBS 0,1 M, pH 7,4) a 37 °C contendo 0,15% (m/V) das enzimas: Lipase (45 U.mL⁻¹) (A), colesterol estearase (40 U.mL⁻¹) (B) e PBS (C). Os valores correspondem à média de 3 medidas. As medidas com desvio padrão superior a 3% foram desprezadas. Porcentual de eugenol no copolímero: 10% m/m.

7.4.4 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de um material a ser utilizado com enxerto no organismo biológico é de indiscutível importância visto que a ocorrência de infecções deve ter consequências não só locais como sistêmicas. O desenvolvimento de microrganismos no sítio cirúrgico além de comprometer o reparo ósseo local pode levar a instalação de colônias bacterianas advindas do implante em outros locais do organismo comprometendo a saúde do paciente e podendo levar até mesmo ao óbito. A análise da propriedade antimicrobiana do compósito foi realizada com base no diâmetro da zona de inibição provocada pelo material.

A cepa pode ser considerada sensível ou resistente em função do diâmetro da zona de sensibilidade estabelecida para cada antimicrobiano. A Tabela 4 mostra o diâmetro padrão em mm para alguns antibióticos testados, servindo como um paralelo para comparação com os resultados que obtivemos com as amostras do compósito PCL-co-Eg.

Antimicrobiano	Diâmetro mínimo de sensibilidade (mm)
ampicilina	13-26
cloranfenicol	15
eritromicina	15
norfloxacina	16
penicilina	16-24
rifampicina	16
tetraciclina	17
gentamicina	13
vancomicina	12
cefalexina	16
clindamicina	17

Tabela 7.4: Diâmetro padrão para alguns antimicrobianos¹²

No copolímero PCL-co-Eg utilizado a unidade métrica correspondente ao eugenol (Eg) ioniza-se liberando o próton H^+ . Este após difusão no gel de ágar inibe o crescimento bacteriano através da desnaturação de proteínas e rompimento das membranas dos microrganismos. Quanto maior a área de alcance da difusão do eugenol maior será o halo de resistência ao crescimento bacteriano gerado pelo material.

A Figura 19 apresenta as placas utilizadas no ensaio bem como o halo de inibição gerado para cada amostra.

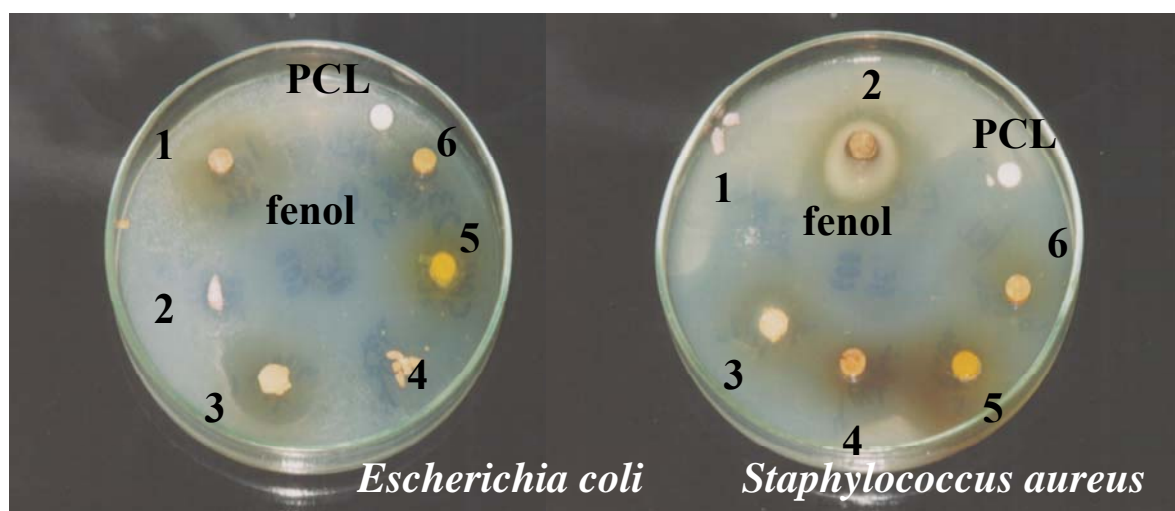


Figura 7.19: Ensaio antimicrobiano para *E.coli* e *S.aureus*. Os números (1-6) representam as concentrações de eugenol de cada amostra evidenciados nas Figuras 20 e 21. O fenol no centro da placa foi utilizado como controle.

As Figuras 20 e 21 relacionam as medidas dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos e as concentrações de eugenol presentes em cada amostra. Considera-se como halo total inibições superiores a 30 mm, ou seja, admite-se não haver qualquer desenvolvimento bacteriano na presença desses materiais. Percebe-se com base nas Figuras que percentuais de Eg no copolímero superiores a 6,5% podem ser considerados bactericidas para *E. coli* e *S. aureus* sendo tão eficiente na inibição do crescimento bacteriano quanto o fenol, utilizado como padrão neste trabalho.

No entanto, percentuais inferiores (3,5% e 5,5%) demonstraram um bom comportamento antimicrobiano uma vez que, com base nos halos gerados, notamos inibição no crescimento bacteriano superior a muitos antimicrobianos utilizados na prática médica, como ilustra a Tabela 4.

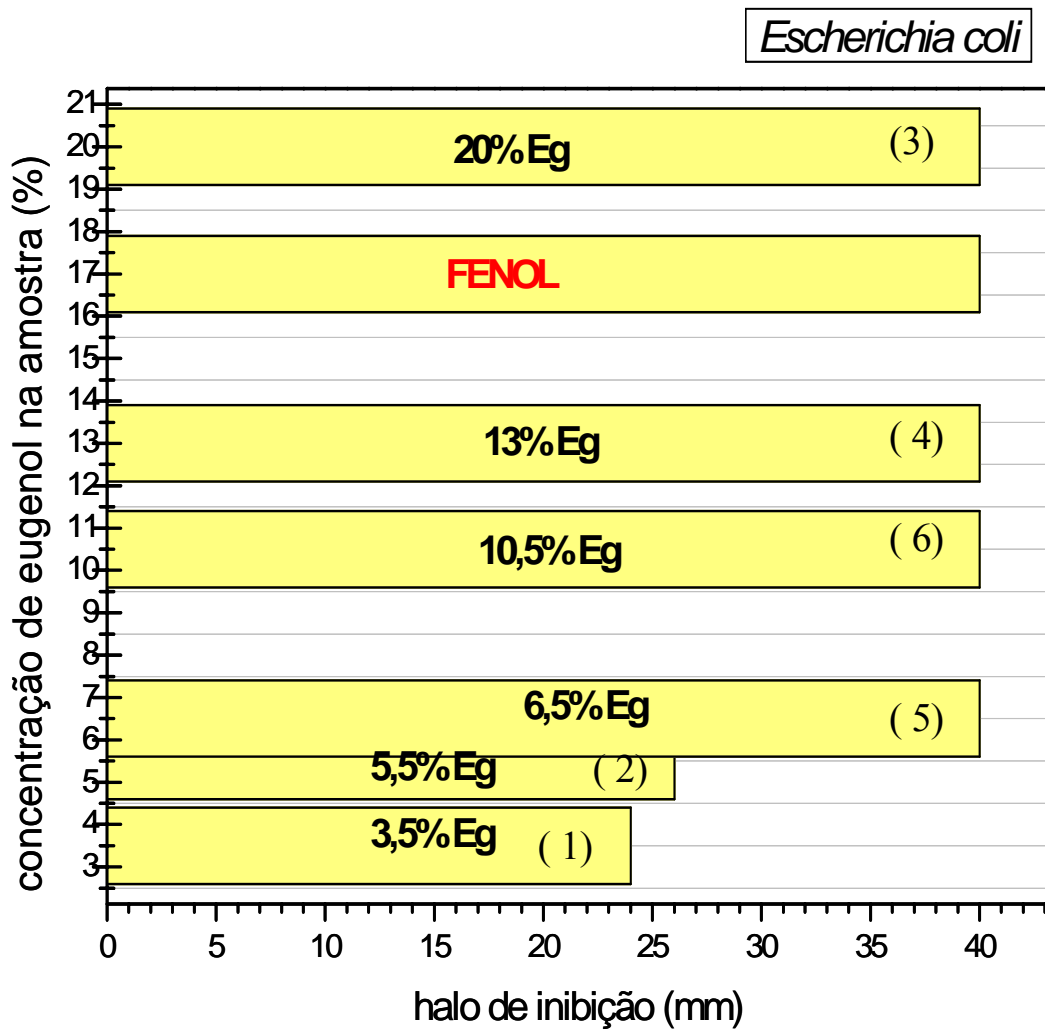


Figura 7.20: Resultados da inibição do crescimento bacteriano em função da concentração de Eg para *E.coli*.

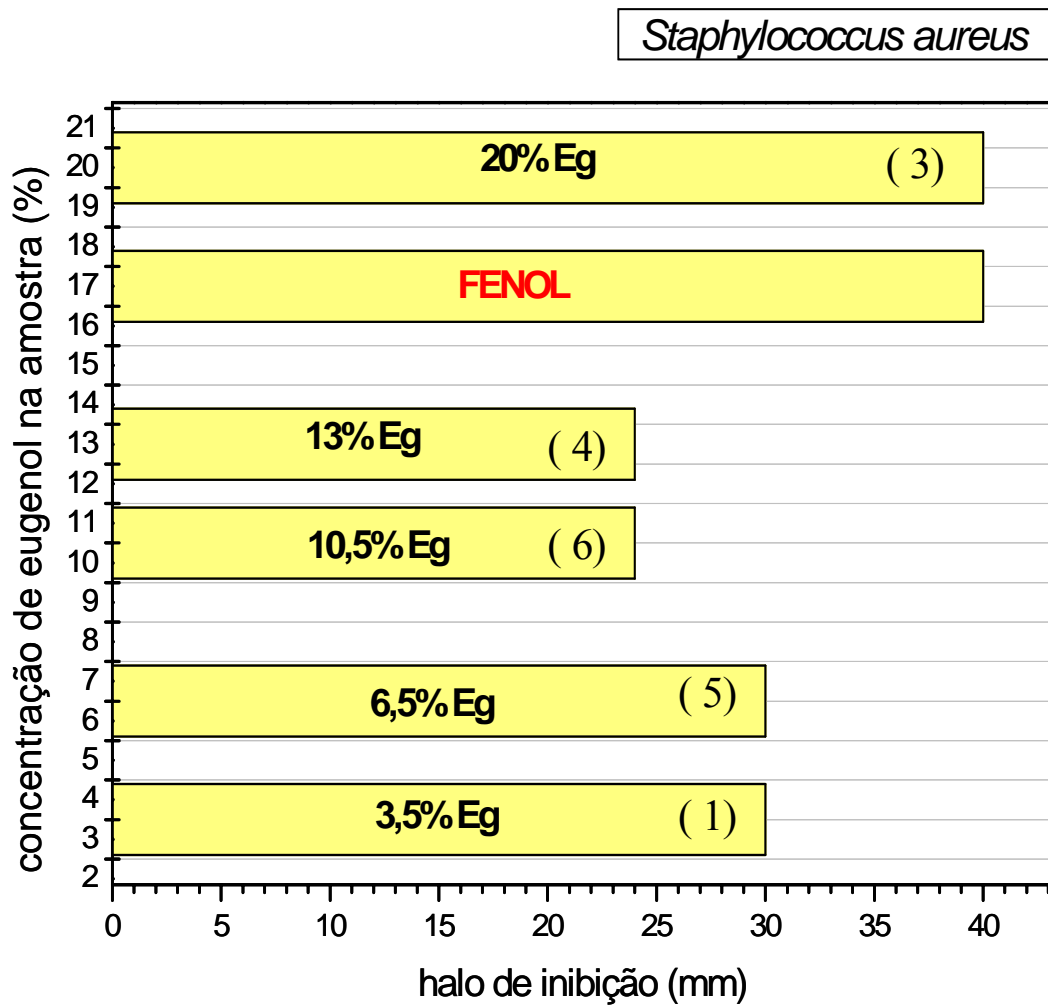


Figura 7.21: Resultados da inibição do crescimento bacteriano em função da concentração de Eg para *S.aureus*.

7.4.5 Relação estrutura química e atividade biológica¹³

Alguns métodos são propostos para relacionar a estrutura química à atividade biológica de determinados compostos, dentre eles a relação QSAR, do inglês *Quantitative Structure- Activity Relationship*. Esses estudos correlacionam afinidades de ligantes a seus sítios de ligação, seja proteína ou receptor de membrana, constantes de velocidade e outras atividades biológicas com certas características estruturais ou com propriedades moleculares, de grupo ou atômicas, tais como lipofilicidade, polaridade, propriedades eletrônicas. Equações de *QSAR* vêm sendo usadas, sobretudo, para descrever atividades biológicas entre séries diferentes de fármacos e candidatos a fármacos. Especialmente dados de inibição de enzimas têm sido correlacionados com as propriedades físico-químicas com sucesso. As pesquisas na área de QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) têm como principal objetivo a construção de modelos matemáticos que relacionem a estrutura química e a atividade biológica de uma série de compostos análogos

Para obter mais informações sobre os fatores que determinam a bioatividade dos copolímeros PCL-co-Eg foi realizada a modelagem molecular.

A modelagem molecular (MolM) compreende um número de ferramentas e métodos computacionais e teóricos que têm como objetivo entender e prever o comportamento de sistemas reais em seus mais diversos aspectos, tais como estruturas moleculares, propriedades do estado de transição e equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras.

Os métodos de MolM possibilitam a minimização de energia de moléculas, análise conformacional, simulações de dinâmica molecular, entre outros, e são aplicáveis de átomos isolados a biomacromoléculas. Um trabalho de MolM envolve basicamente três estágios:

- ✓ Seleção de um modelo que descreva, com a precisão desejada, interações inter e intramoleculares de um sistema;
- ✓ Realização dos cálculos e
- ✓ Análise dos resultados, validando ou rejeitando o modelo escolhido.

Deve ser enfatizado que variáveis como o tamanho do sistema (número de átomos) a ser estudado, a precisão dos resultados, o custo computacional e as condições de hardware utilizadas para realizar os cálculos devem ser cuidadosamente analisadas durante a aplicação dos métodos de mecânica computacional a um sistema em particular.

O desenvolvimento da MolM deveu-se em grande parte ao avanço dos recursos computacionais em termos de *hardware* e *software*. No passado, a utilização da MolM era restrita a um seleto grupo de pessoas que desenvolviam seus próprios programas. Atualmente não é mais necessário a um modelista compor seu próprio programa dada a variedade de pacotes computacionais comercializados através de grandes companhias e até mesmo de laboratórios acadêmicos, tais como Hyperchem, Chem3D ou Molecular Modeling Pro, dentre tantos. No entanto, qualquer que seja o pacote computacional adotado, os princípios que norteiam os cálculos efetuados podem ser classificados em duas grandes categorias:

- a) Métodos Clássicos - Mecânica Molecular, e
- b) Métodos Quânticos – semi-empíricos ou *ab-initio*

A estrutura tridimensional ideal de uma molécula será aquela em que os comprimentos e ângulos de ligações e ângulos diédricos, a interação com átomos não-ligados que provocam repulsão estérica e eletrostática, são determinados minimizando a energia de formação do sistema em estudo.

A escolha do método de minimização de energia depende de fatores relacionados ao tamanho da molécula, disponibilidade de parâmetros e dados armazenados e recurso computacional. Os modelos moleculares gerados pelo computador são resultantes de equações matemáticas que estimam as posições e propriedades dos elétrons e núcleos; os cálculos realizados exploram, de forma experimental, as características de uma estrutura, fornecendo uma molécula sob nova perspectiva. Qualquer que seja o método de cálculo utilizado, existem limitações inerentes aos princípios adotados, não existindo até este momento um método que se aplique indiscriminadamente a qualquer sistema molecular. Grosso modo, métodos de Mecânica Molecular ou semi-empíricos quânticos são mais rápidos que os *ab-initio*, mas são limitados a uma determinada classe de moléculas e fenômenos, pois dependem fortemente de base de dados já existentes para a parametrização desses métodos.

No processo de minimização de energia, a configuração 3D obtida não representa, necessariamente, a estrutura mais estável de determinada molécula. Neste processo, considera-se que uma configuração estável foi obtida quando o gradiente local de energia é inferior a um valor pré-estabelecido, configurando-se assim um mínimo de energia, e os cálculos são interrompidos. A Figura 22 ilustra que uma conformação "meta-estável" pode estar separada de outra, ainda mais favorável do ponto de vista energético, por uma barreira de energia, que o programa de minimização é incapaz de sobrepujar. Neste caso,

para identificar a conformação mais estável, com uma energia mínima global, é necessário gerar várias conformações de uma molécula e comparar os valores de energias obtidos a cada modificação.

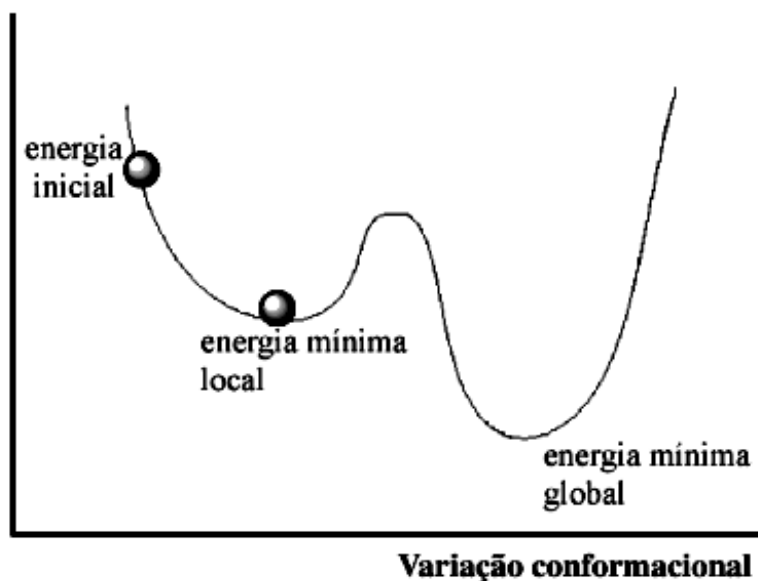


Figura 7.22: Energia mínima local e global obtidas pelo processo de minimização e dinâmica molecular, respectivamente.

Interações não previsíveis, relacionadas à sobreposição de orbital molecular, distribuição de densidade eletrônica ou interferências estéricas podem ser solucionadas pelos métodos computacionais. A minimização de energia e a análise conformacional são usadas interativamente para otimizar a geometria de uma molécula.

Além de fornecer dados estruturais, os cálculos teóricos são usados também com interesse químico e farmacológico, como para computar calores de formação de moléculas, distâncias interatômicas, energias eletrônicas de HOMO e LUMO, energias de ionização, densidades eletrônicas atômicas, cargas atômicas líquidas, ordens de ligação, momentos dipolo, entre outros.

A MolM fornece informações importantes para o processo de planejamento de fármacos. Ela permite a obtenção de propriedades específicas de um composto que podem

influenciar na interação com seu receptor. Como exemplo, pode-se citar o mapa de potencial eletrostático, o contorno da densidade eletrônica e as energias e os coeficientes dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO. Outras informações importantes também podem ser obtidas a partir da comparação estrutural entre diferentes moléculas, o que permite a geração de um índice de similaridade que pode ser correlacionado com a atividade farmacológica.

É importante ressaltar que um dos avanços mais importantes no planejamento e na proposição de novos materiais bem como protótipos de fármacos tem sido a utilização da modelagem molecular. Ela tem se tornado uma ferramenta indispensável não somente no processo de planejamento, mas também na otimização dos protótipos já existentes.

a) Mecânica Molecular

Na mecânica molecular, as equações da mecânica clássica são utilizadas para determinar as superfícies equipotenciais e as demais propriedades físicas de uma molécula. A molécula é descrita como um conjunto de átomos que interagem entre si através de forças resultantes da compressão ou distensão de ligações. As forças resultantes são aproximadamente descritas por osciladores harmônicos e resultam em potenciais proporcionais ao quadrado da deformação da ligação em questão. As distorções resultantes de processos de deformação angular, torsional e espacial também são consideradas, aproximando-se a energia potencial por séries truncadas de Fourier. A energia total do sistema é calculada somando-se a todas estas contribuições potenciais associados a interações eletrostáticas e Van der Waals entre átomos.. Os métodos de Mecânica Molecular mais difundidos – MM, AMBER, OPLS ou BIO+, diferem entre si quanto às parametrizações das diversas aproximações descritas acima. Um grande limitador do método consiste em que as equações obtidas por mecânica molecular consideram apenas o núcleo dos átomos e não incluem os elétrons nos cálculos. A energia da molécula de partida é calculada, de forma comparativa, com relação ao padrão metano (1 kJ/mol). A energia estérica não expressa quantidades absolutas, apenas diferenças de energia entre duas ou mais conformações. O processo de minimização de energia, com o uso da mecânica molecular, promove a modificação dos ângulos e comprimentos das ligações dos átomos originais e reconhece as mudanças que conduzem a estruturas mais estáveis, de menor energia estérica e os cálculos são interrompidos quando as modificações da estrutura mais estável, em relação à molécula original, não resultam em alteração considerável de energia.

Os métodos da mecânica molecular são métodos empíricos (baseados em valores experimentais); estão incluídos em programas tais como Spartan e SYBYL, incluindo os campos de força MMFF e CHARMM; são utilizados para moléculas com até 100.000 átomos. Dos três métodos citados anteriormente, demanda menos tempo computacional.

b) Métodos Quânticos

Em métodos quânticos, diferentemente do processo de mecânica molecular, são utilizadas as equações de física quântica para calcular as propriedades de uma molécula, a partir das interações entre os seus elétrons e núcleos. O movimento dos elétrons é considerado mais rápido e independente do núcleo e, uma vez que os elétrons giram em torno do núcleo, é possível descrever a energia eletrônica separadamente da energia nuclear. (aproximação de Born-Oppenheimer). A energia eletrônica é obtida a partir da resolução da equação de Schroedinger, e a solução correspondente ao estado de menor energia é chamada de estado fundamental dos elétrons.

Os métodos quânticos baseiam-se na resolução da equação de onda do elétron para a determinação dos parâmetros moleculares orbitais de fronteira, densidade eletrônica ou análise da população de Mulliken. A função de onda eletrônica de cada elétron é, dentro da aproximação de Born-Oppenheimer, a mesma para todos. Para uma posição fixa dos núcleos dos átomos constituintes do sistema, consiste na solução da equação de Schroedinger:

$$E_{K,e}(r_i) + V_{eN}(r_i, \bar{R}_\alpha) + V_{ee}(r_i) + V_{NN}(\bar{R}_\alpha)]\psi_{el}(r_i, \bar{R}_\alpha) = E(\bar{R}_\alpha)\psi_{el}(r_i, \bar{R}_\alpha) \quad (1)$$

onde $E_{K,e}$ é a energia cinética do elétron,

$V_{e,N}$ é a energia potencial associada à atração entre o elétron e os núcleos da molécula,

$V_{e,e}$ é a energia potencial associada à repulsão entre os elétrons e

$V_{N,N}$ é a energia potencial associada à repulsão entre os núcleos da molécula.

A Equação (1) tem várias soluções possíveis para a função de onda eletrônica (Orbital Molecular), cada qual associada a uma energia, a Energia Orbital. Dificilmente um Orbital Molecular tem uma expressão analítica simples, se é que esta expressão existe. Sendo assim, o Orbital Molecular é normalmente expresso como uma combinação linear de orbitais atômicos (1s, 2s, 2p_x,...) (Aproximação CLOA):

$$\phi_1 = c_{i1}1s_A + c_{i2}2s_A + c_{i3}2p_{xA} + \dots + c_{i4}1s_B + c_{i5}2s_B + c_{i6}2p_{xB} + \dots \quad (2)$$

Uma vez conhecidos os orbitais moleculares, a função de onda total deve levar em conta o Princípio de Exclusão de Pauli. Isto significa que a função de onda multi-eletrônica da molécula deve ser antissimétrica, com relação à permutação de 2 elétrons, o que pode ser obtido expressando a função de onda como o produto

$$\psi_{el} = \left\| \phi_1 \alpha \phi_1 \beta \dots \phi_i \alpha \phi_i \beta \dots \phi_n \alpha \phi_n \beta \right\| \quad (3)$$

b.1) Cálculos *ab-initio*

Posta da forma acima, a determinação dos estados eletrônicos de uma molécula parece simples, restando apenas a determinação dos coeficientes da expansão (2). Na verdade a determinação destes coeficientes requer a diagonalização de uma matriz, que resulta da imposição de normalização e ortogonalidade das diferentes funções de onda do sistema. Esta não é uma matriz diagonal, por causa da superposição de orbitais atômicos pertencentes a diferentes átomos da molécula em questão, dificultando enormemente a solução do problema. Esta dificuldade pode ser contornada pelo uso do Método de Hartree-Fock autoconsistente, que substitui os diversos termos da equação (1) por termos mais simples – a energia cinética de um elétron mais o potencial determinado pelos núcleos fixos e o potencial médio de todos os demais n-1 elétrons. A solução da equação resultante é feita de forma iterativa, da seguinte forma:

- ✓ determina-se um conjunto inicial de orbitais moleculares,
- ✓ determina-se um potencial médio inicial, e
- ✓ a partir do potencial médio, determina-se uma nova solução da equação de Schroedinger.

O processo acima é repetido até que a função de onda do elétron não sofra mais alterações significativas e se constitui na base de cálculo dos métodos *ab initio*. Os métodos *ab initio* são caracterizados pela introdução de um conjunto arbitrário de bases para a expansão dos Orbitais Moleculares, tais como STO-3G, 6-31+G*, 6-311++G**, entre outros.

O método de cálculo *ab initio* está incluído em diversos pacotes de modelagem molecular, como Gaussian e Gamess. Trata-se de um método puramente teórico e é utilizado para moléculas pequenas, com no máximo 100 átomos; sua desvantagem é o custo computacional (tempo), muito embora a velocidade do mesmo tenha sido

grandemente aumentada pela melhoria dos algoritmos de cálculo e da qualidade das bases disponibilizadas.

b.2) Cálculo semi-empíricos

Outra forma de se evitar o cálculo complexo envolvido na resolução completa da equação (1) é desprezar os termos menos relevantes e substituir seus efeitos por uma parametrização, que permita a reprodução de diferentes resultados experimentais. Por esta característica, estes métodos são conhecidos por Métodos Semi-Empíricos, tais como AM1 (austin model 1), MNDO3, CNDO, PM3 (parametric method 3). Cada método apresenta resultados confiáveis em situações específicas. Por exemplo, o MNDO, criado por Dewar e colaboradores, obtém bons resultados no cálculo do calor de formação, que é a propriedade que determina a geometria da molécula e também as reações químicas que ela participa. Trata-se de um conjunto de métodos bastante rápidos e capazes de trabalhar com moléculas compostas por até 1000 átomos, disponíveis em vários programas comerciais tais como o HyperChem ou Spartan.

Todos os cálculos, qualquer que seja o método adotado, são autoconsistentes e permitem calcular não somente a energia global da molécula, mas também a energia associada a cada um dos orbitais moleculares a partir dos quais se constrói a função de onda do elétron.

De todos os orbitais moleculares os orbitais de fronteira, ou orbitais HOMO-LUMO, são de fundamental importância na interpretação das propriedades moleculares de um sistema. O orbital HOMO, (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) ou Orbital Molecular Ocupado mais Alto é o último orbital que se encontra duplamente ocupado. Este orbital indica onde se encontra o par de elétrons que pode ser removido mais facilmente da molécula. Por sua vez o orbital LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) ou Orbital Molecular Vazio mais baixo, é o primeiro orbital que se encontra vazio e indica o lugar onde a molécula poderia aceitar mais facilmente.

De forma geral a reatividade das moléculas é controlada pelos orbitais de fronteira e pela densidade líquida de elétrons ao redor de cada átomo. As reações controladas por orbitais de fronteira, são representadas pela densidade eletrônica das camadas mais externas da molécula. Neste sentido, as energias de HOMO e LUMO são importantes no caso de reações radiculares, reações estas que governam as reações de polimerização abordadas neste trabalho.

As energias do HOMO e LUMO são descritores muito utilizados sendo demonstrado que estes orbitais têm um papel fundamental na reatividade dos compostos em muitos tipos de reação química bem como na determinação dos “gaps” das bandas eletrônicas nos sólidos. Estes orbitais também são responsáveis pela formação de muitos complexos de transferência de carga. De acordo com a teoria dos orbitais de fronteira em reações químicas, a formação do estado de transição se deve a interação entre os orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) das espécies reagentes. Portanto, o tratamento diferenciado para estes orbitais moleculares é baseado em princípios gerais que governam a natureza das reações químicas.

A energia de HOMO é diretamente relacionada ao potencial de ionização e caracteriza a suscetibilidade da molécula ao ataque de eletrófilos enquanto a energia de LUMO é relacionada à afinidade eletrônica e caracteriza a suscetibilidade ao ataque por nucleófilos.

O “gap” entre HOMO e LUMO, ou seja, a diferença de energia entre estes orbitais é um importante índice de estabilidade química e uma grande diferença entre HOMO e LUMO significa que a molécula tem alta estabilidade, ou baixa reatividade em reações químicas. Assim, de acordo com a teoria dos orbitais de fronteira para a reatividade, a maioria das reações química acontece na posição em que HOMO e LUMO dos respectivos reagentes podem ter a maior sobreposição. Neste caso, se a molécula é doadora de elétrons, a densidade de HOMO é crítica para a transferência de carga.

As Figuras 23-26 ilustram os orbitais de fronteira HOMO-LUMO para os monômeros eugenol e ϵ -caprolactona bem como para as cadeias oligoméricas de PCL, PEG e PCL-co-Eg. Como pode ser observado, o oxigênio tem uma grande participação no HOMO. No caso do eugenol, a diferença de energia entre o HOMO e o LUMO, por conta da influencia do sistema π é muito maior.

A polarizabilidade é uma medida da facilidade com que a nuvem eletrônica de um átomo pode ser distorcida, em função do efeito de dipolo de um campo elétrico externo, tendo desta forma uma maior dispersão de elétrons (maior deslocalização). Esta medida pode ser obtida através da diferença de energia $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$. Neste caso, quanto maior for a diferença de energia $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ menor será a polarizabilidade do monômero³. Neste trabalho, observaram-se os valores de $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ de 11,2 eV e 8,3 eV para os monômeros ϵ -caprolactona e eugenol, respectivamente. Esta observação sugere que o monômero ϵ -CL possui uma menor polarizabilidade, o que estaria de acordo com os

resultados experimentais de $^1\text{H-NMR}$. Neste caso, a espectroscopia de NMR indicou a obtenção de copolímeros PCL-co-Eg cuja composição é pobre em eugenol, indicando assim, a baixa polarizabilidade deste monômero e em boa concordância com os dados espectroscópicos.

A diferença de $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ entre os homopolímeros (PCL, PEG) bem como para o copolímero alternado de PCL-co-Eg foi muito pequena, pois as cadeias propagantes parecem possuir a mesma polarizabilidade. Mesmo assim, o oligômero do eugenol possui um ΔE significativamente menor que o homopolímero de PCL indicando que o monômero de eugenol apresenta uma forte tendência em formar homopolímeros. Talvez o efeito dos substituintes do anel aromático neste monômero leve a uma deslocalização dos elétrons o que favoreceria a formação de homopolímeros.

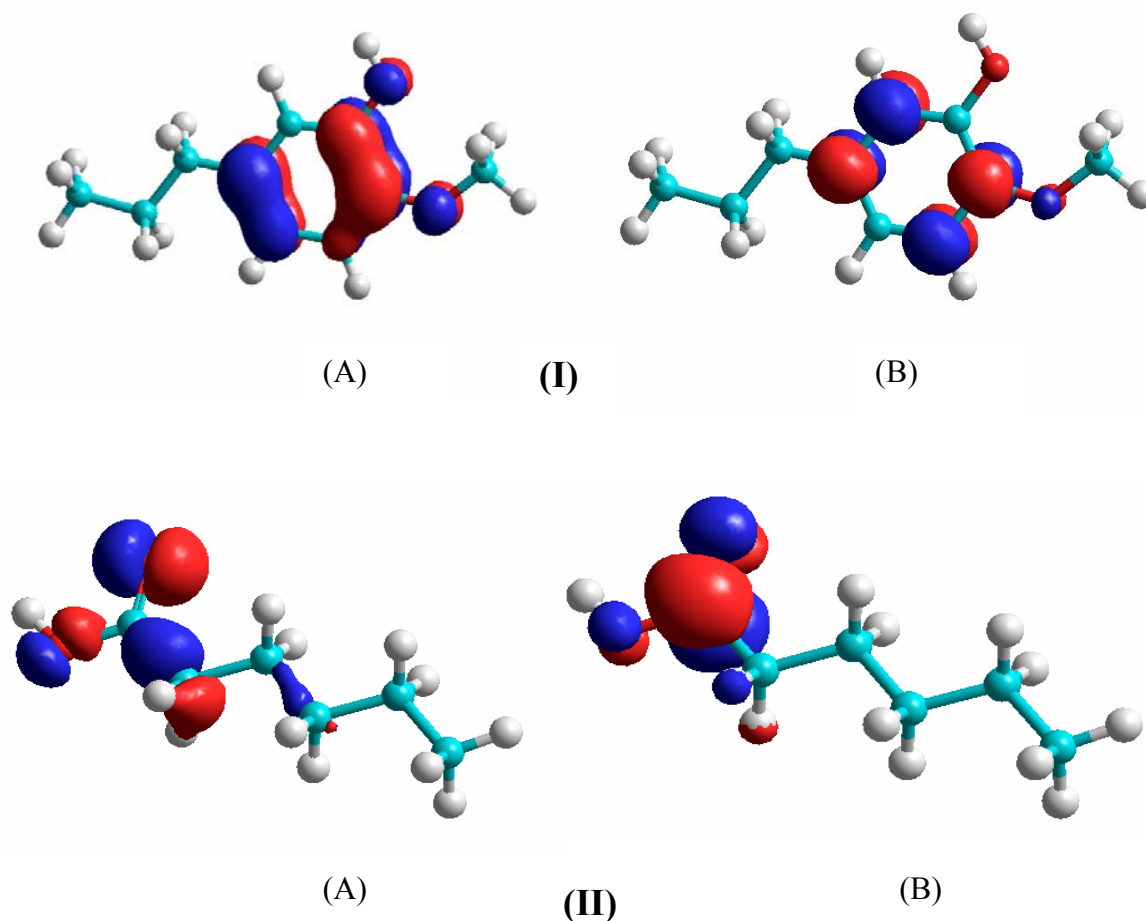


Figura 7.23: Orbitais de fronteira HOMO (A) e LUMO (B) para os monômeros eugenol (I) e ϵ -caprolactona (cadeia aberta)(II).

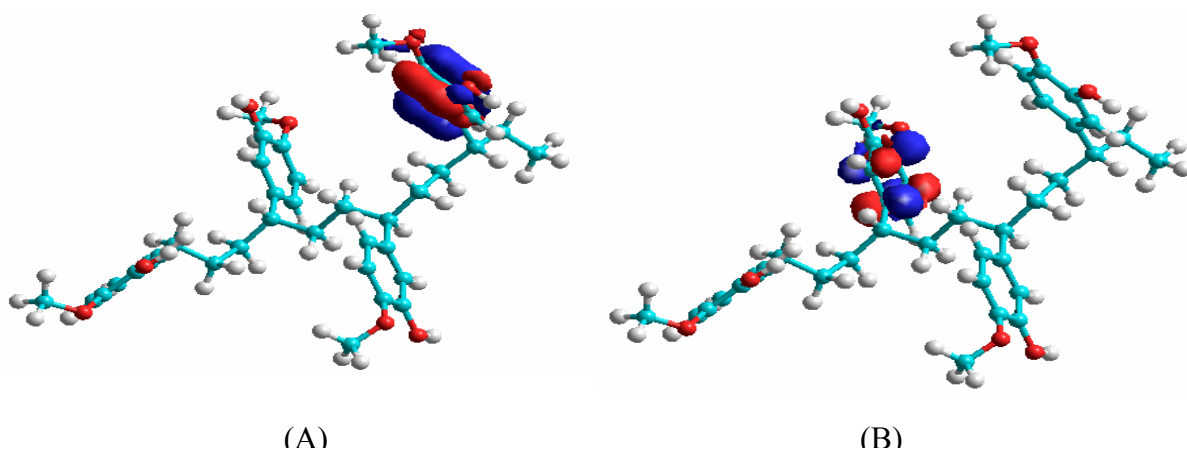


Figura 7.24: Orbitais de fronteira HOMO (A) e LUMO (B) para o oligômero poli(eugenol). Foram consideradas 4 unidades méricas repetitivas.

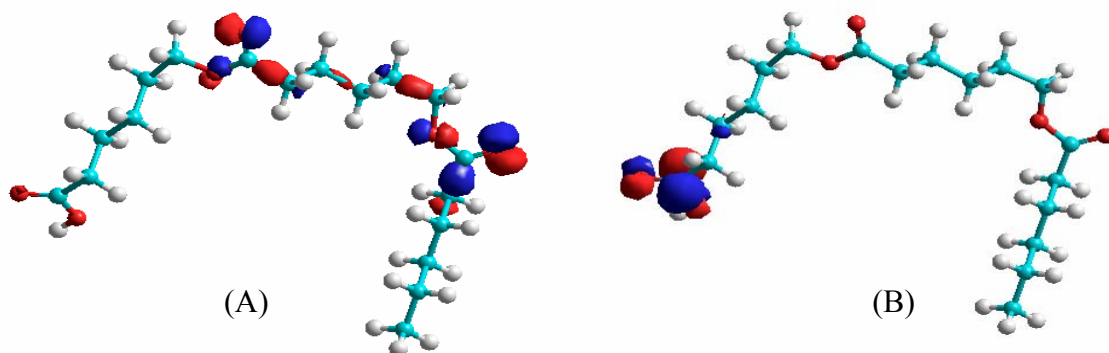


Figura 7.25: Orbitais de fronteira HOMO (A) e LUMO (B) para o oligômero poli(ϵ -caprolactona). Foram consideradas 3 unidades méricas repetitivas.

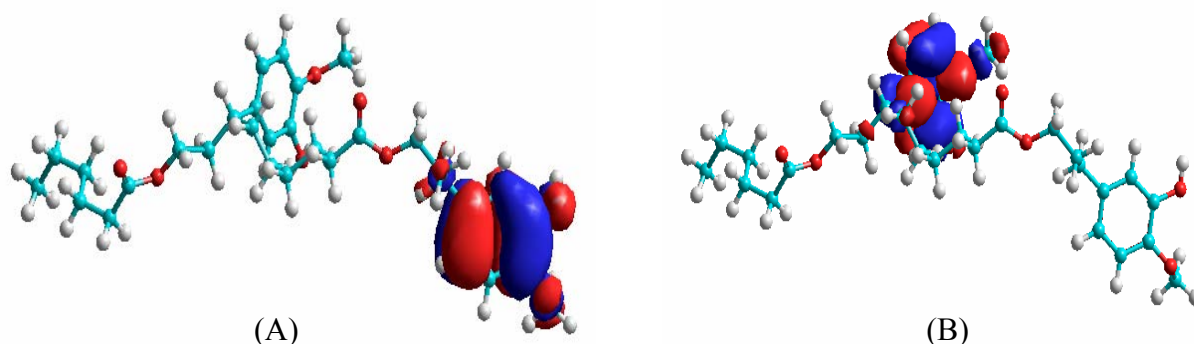


Figura 7.26: Orbitais de fronteira HOMO (A) e LUMO (B) para o copolímero alternado PCL-co-Eg. Foram consideradas 4 unidades méricas.

Outra das propriedades moleculares relevantes para a análise é a determinação da população de Mulliken, que fornece a carga em cada átomo, indicando se os átomos que compõe uma molécula apresentam um excesso ou deficiência de carga. Neste sentido a análise da população de Mulliken é uma forma quantitativa de identificar as regiões na molécula onde se acumula a carga eletrônica (suscetíveis a ataques eletrófilos) e as regiões que se encontram despopuladas de carga (susceptíveis a ataques nucleofílicos).

A distribuição total de elétrons de uma molécula é uma boa aproximação para determinar muitas propriedades moleculares, químicas e físicas. O procedimento consiste em usar cargas parciais atômicas as quais podem ser determinadas por procedimentos semi-empíricos. Neste trabalho, analisamos as cargas atômicas derivadas de populações Mulliken de orbitais atômicos o qual tem dado uma boa descrição da distribuição eletrônica.

A análise populacional de Mulliken é um método amplamente difundido na química molecular e baseia-se na teoria de orbitais moleculares, já descrita. Lembrando que a função de onda ψ_i é definida por um combinação linear de k orbitais moleculares, também chamados de funções de base, χ_μ ,

$$\psi_i = \sum_{\mu=1}^k (c_{i\mu} \chi_\mu) = c_{i1} \chi_1 + c_{i2} \chi_2 + \dots + c_{ik} \chi_k \quad (4)$$

considerando $C_{i\mu}$ como reais e apenas uma função de base χ_μ sobre cada átomo na molécula, a densidade de probabilidade associada a um elétron em ψ é dada por:

$$|\psi|^2 = c_{1i}^2 \chi_1^2 + c_{2i}^2 \chi_2^2 + \dots 2c_{1i}c_{2i} \chi_1 \chi_2 + 2c_{1i}c_{3i} \chi_1 \chi_3 + 2c_{2i}c_{3i} \chi_2 \chi_3 + \dots \quad (5)$$

Integrando a expressão anterior sobre todo o espaço tridimensional e normalizando ψ , a seguinte expressão é obtida:

$$1 = c_{1i}^2 + c_{2i}^2 + \dots 2c_{1i}c_{2i}S_{12} + 2c_{2i}c_{3i}S_{23} \quad (6)$$

sendo S_{12} as integrais de superposição definidas como:

$$S_{\mu\nu} = \int \chi_\mu \chi_\nu d\sigma_\mu d\sigma_\nu \quad (7)$$

Definindo q_μ^i como o produto da população líquida do elétron na orbital molecular ψ_i pela contribuição do orbital atômico χ_μ e $p_{\mu\nu}^i$ como a população eletrônica de recobrimento entre as orbitais atômicas χ_μ e χ_ν obtém-se as seguintes expressões são:

$$\begin{aligned} q_\mu^i &= c_{i\mu}^2 \\ p_{\mu\nu}^i &= 2c_{i\mu}c_{i\nu}S_{\mu\nu} \end{aligned} \quad (8)$$

No caso em que $p_{\mu\nu}^i(1) < 0$ tem-se um orbital antiligante, se $p_{\mu\nu}^i(1) > 0$ tem-se uma orbital ligante e caso $p_{\mu\nu}^i(1) = 0$ tem-se uma orbital não-ligante.

Somando as contribuições q^i e p^i a população líquida de Mulliken é dada por:

$$N_\mu(i) = q_\mu^i + \frac{1}{2} \sum_{\mu \neq \nu} p_{\mu\nu}^i \quad (9)$$

Fatores como a facilidade de cálculo e a possibilidade de obtenção da análise populacional de forma direta a um baixo custo computacional levaram à ampla difusão do método populacional de Mulliken em química quântica.

Em vez de observar a magnitude de cargas atômicas, procuraram-se efeitos da distribuição de cargas devido a pequenas, mas claramente distinguíveis mudanças conformacionais. A atenção principal foi direcionada para as modificações associadas com átomos específicos como resultado de mudanças conformacionais de toda a molécula ou de um grupo funcional. A metodologia que utilizamos consistiu em otimizar a geometria de oligômeros com métodos semi-empíricos, seguidos por cálculos *ab initio*, usando bases de alta qualidade (STO-3G, 4-31G, 6-31G**) e incluindo efeitos de correlação(MP), para o cálculo das cargas atômicas.

O estudo do mecanismo de copolimerização entre os monômeros ϵ -CL e Eg e da bioatividade do copolímero PCL-co-Eg pode tornar-se mais compreensível quando se analisam os mapas de potencial eletrostático destas moléculas.

O potencial eletrostático de uma molécula pode ser determinado selecionando-se um determinado número de pontos ao redor da molécula e em seguida desprezando-se os pontos que caem dentro do raio de van der Waals da molécula devido às distorções da proximidade do núcleo. Neste sentido, o potencial eletrostático (E_i) é dado por:

$$E_i = \sum_A^{n\u00FAcleo} \frac{Z_A}{R_{Ap}} - \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu} \int \frac{\phi^*_{\mu}(r) \phi_{\nu}(r)}{r_p} dr \quad \text{Fun\u00E7\u00F5es de base} \quad (10)$$

sendo A o n\u00FAcleo, Z o n\u00FAmero at\u00F4mico, R_{Ap} a dist\u00E2ncia entre o n\u00FAcleo e uma carga pontual, P a matriz de densidade e r_p \u00e9 a dist\u00E2ncia de separa\u00E7\u00E3o entre o el\u00e9tron e a carga pontual.

Uma superf\u00edcie para a qual o potencial eletrost\u00E1tico \u00e9 negativo indica uma regi\u00E3o na mol\u00e9cula sujeita a um ataque eletrof\u00EDlico. Simultaneamente \u00e0 an\u00E1lise populacional de Mulliken analisou-se neste trabalho o potencial eletrost\u00E1tico (2D e 3D) dos mon\u00F4meros, homopol\u00EDmeros e copol\u00EDmero PCL-co-Eg sendo os resultados apresentados nas Figuras 23-26.

Analisando-se as Figuras 27-31, observa-se que toda a densidade de carga negativa (regi\u00E3o azul no MEP) est\u00E1 concentrada nos \u00e1tomos de oxig\u00eanio do poli\u00e9ster e fen\u00F3lico (eugenol). Isto se d\u00E1 devido ao fato deste \u00e1tomo ser mais eletronegativo que o carbono, atraindo a densidade eletr\u00F4nica.

Os carbonos possuem uma baixa densidade de carga negativa, pois s\u00E3o mais eletronegativos do que os hidrog\u00eanios a que est\u00E3o ligados. Entretanto, como a diferen\u00E7a de eletronegatividade entre o carbono e o oxig\u00eanio \u00e9 maior do que entre o carbono e o hidrog\u00eanio, a densidade eletr\u00F4nica no carbono \u00e9 menor (n\u00E3o atrai significativamente a nuvem eletr\u00F4nica dos hidrog\u00eanios). Os \u00e1tomos de hidrog\u00eanio possuem densidade positiva, o que pode ser confirmado pelo mapa de potencial eletrost\u00E1tico (colora\u00E7\u00E3o avermelhada, Figuras 27-31). Isso porque est\u00E3o ligados aos \u00e1tomos de carbono (mais eletronegativos). Observa-se que o \u00e1tomo de hidrog\u00eanio fen\u00F3lico possui um car\u00e1ter \u00e1cido de Lewis (colora\u00E7\u00E3o vermelha) e, portanto pode sofrer dissocia\u00E7\u00E3o. Neste sentido, as correla\u00E7\u00F5es

entre as energias do HOMO e LUMO, potencial eletrostático e superfícies equipotenciais 2D permitem concluir que não existe uma alteração significativa no valor de pK_a do eugenol após sua copolimerização com o monômero ϵ -caprolactona, propiciando ao copolímero PCL-co-Eg a bioatividade característica do eugenol.

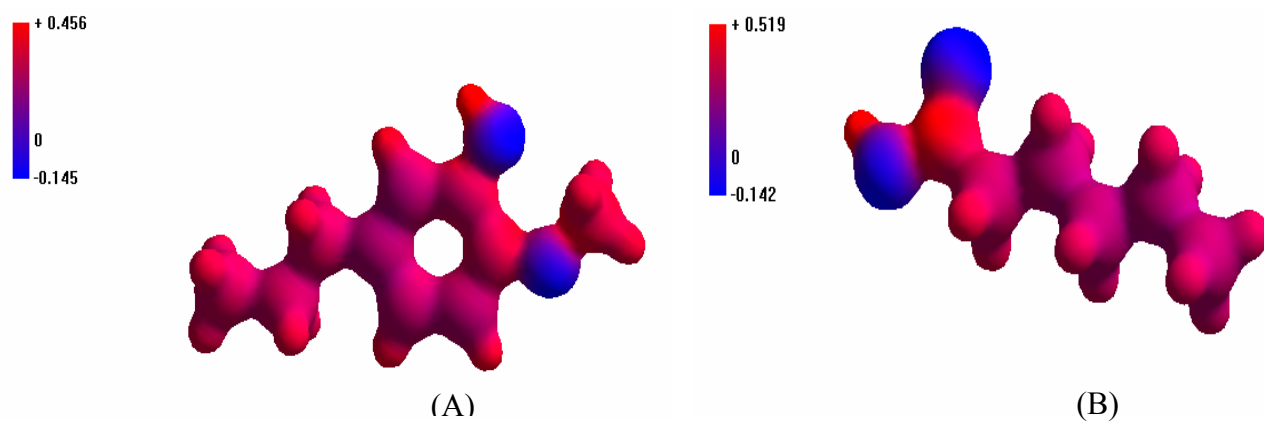


Figura 7.27: Superfícies equipotenciais para os monômeros eugenol (A) e ϵ -caprolactona (B).

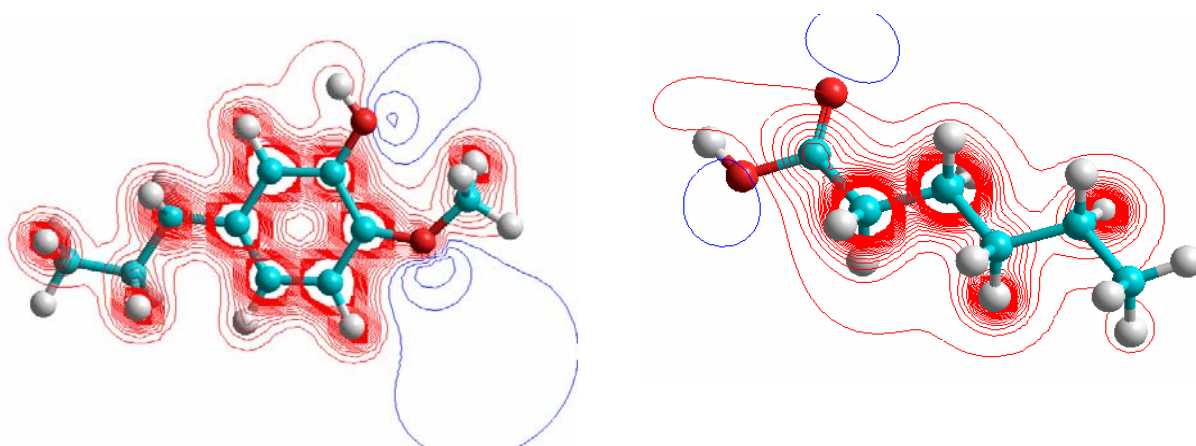


Figura 7. 28: Superfície equipotencial 2D para os monômeros eugenol (A) e ϵ -caprolactona (B).

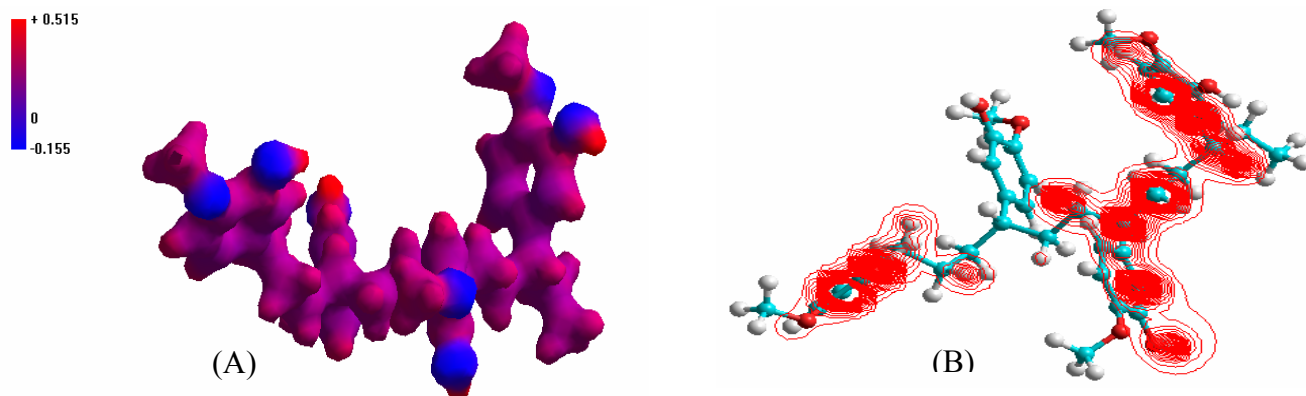


Figura 7.29: Potencial eletrostático (A) e superfície equipotencial 2D (B) para o oligômero de poli(eugenol).

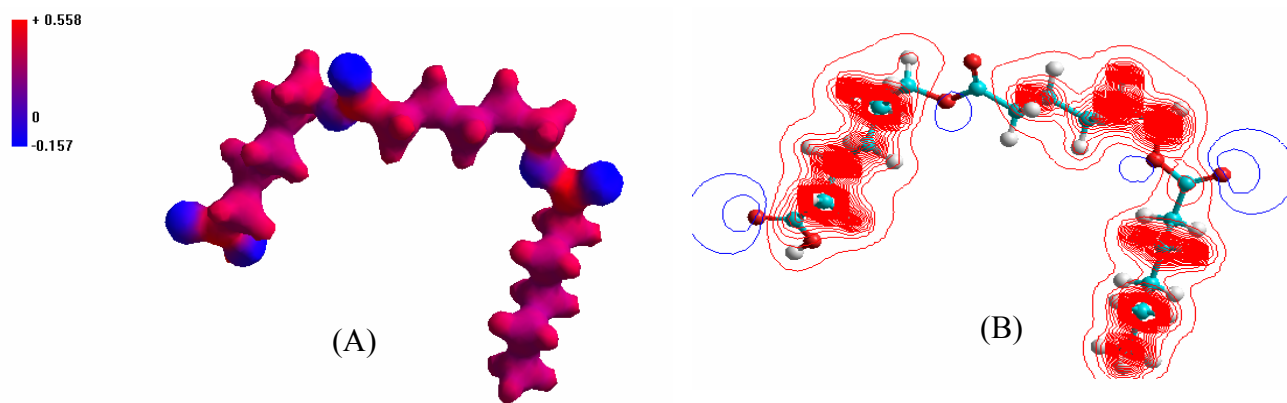


Figura 7.30: Potencial eletrostático (A) e superfície equipotencial 2D (B) para o oligômero de poli(ϵ -caprolactona).

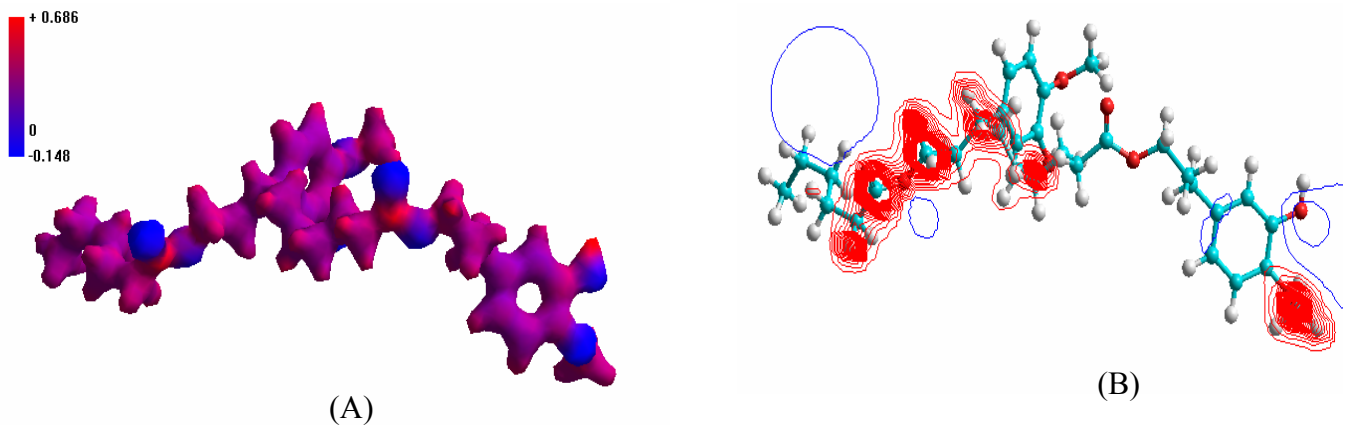


Figura 7.31: Potencial eletrostático (A) e superfície equipotencial 2D (B) para o copolímero alternado PCL-co-Eg.

7.4.6 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade representa uma fase importante de teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas mostrando se o material apresenta características de biomaterial quanto à sua interação com o tecido biológico.

Os ensaios de citotoxicidade podem apresentar resposta celular imediata (curto prazo) ou resposta a longo prazo. Os primeiros são associados a alta permeabilidade da membrana ou algum dano específico ao metabolismo das células. Aqueles que têm resposta a longo prazo implicam na retenção da capacidade de auto-renovação ou capacidade de sobrevivência celular em estado alternado (ex: mutação genética). Revelam a capacidade metabólica ou proliferativa das células após ou mesmo durante a exposição a agentes tóxicos. Os ensaios de curto prazo calculam a proporção de células viáveis expostas a procedimentos traumáticos.

Na Figura 32 são apresentadas as curvas de viabilidade celular das amostras do copolímero PCL-co-Eg e da PCL. Somente a amostra com concentração de eugenol em 10% apresenta comportamento semelhante ao controle positivo (fenol) demonstrando uma citotoxicidade significativa. As amostras de PCL e PCL-co-Eg (6,5% Eg) mostraram comportamento semelhante ao controle negativo (polietileno), com viabilidade celular superior a 50%, sendo compatível com a implantação em organismo biológico no tocante à toxicidade provocada.

O material utilizado como controle negativo não produz resposta tóxica, o objetivo de seu uso é demonstrar resposta de acompanhamento das células. O controle positivo produz uma resposta citotóxica objetivando demonstrar apropriada resposta do sistema testado.

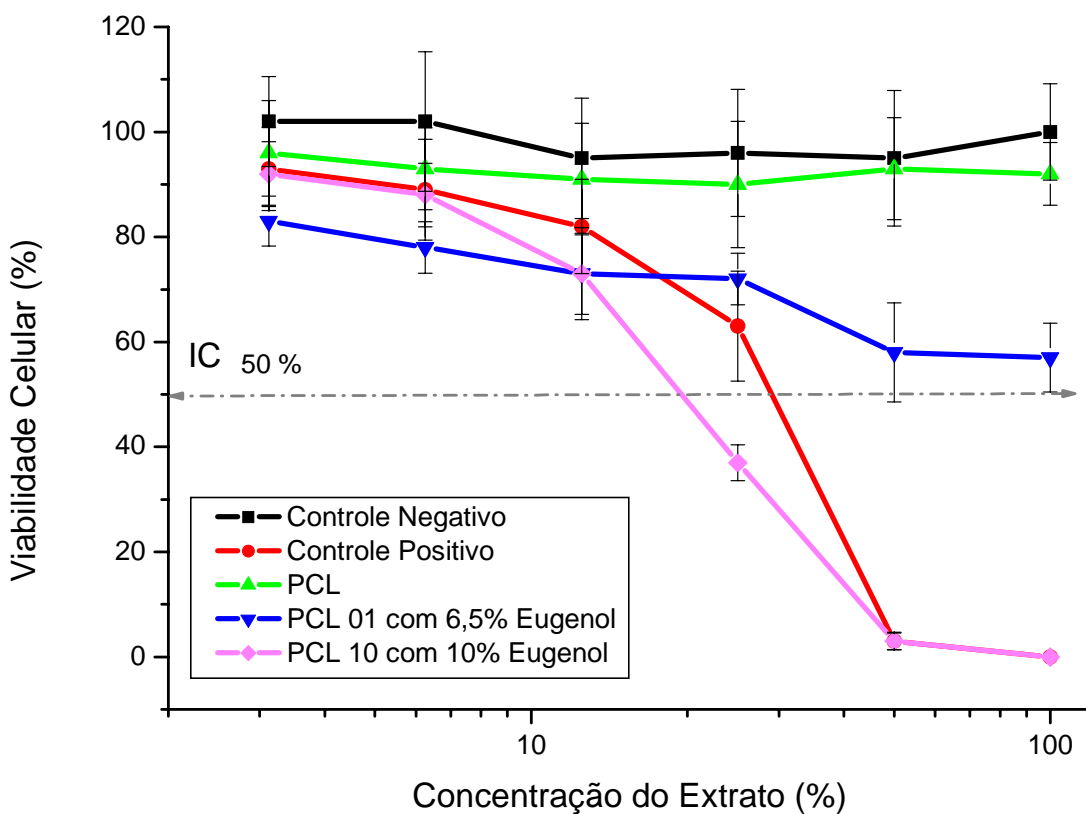


Figura. 7.32: Viabilidade celular após ensaio de citotoxicidade.

7.4.7 Atividade hiperêmica do copolímero PCL-co-Eg

A resposta inflamatória a um implante sintético é controlada pela produção e difusão de mensageiros químicos derivados dos tecidos danificados e do exsudato inflamatório agudo. Os macrófagos estão entre as principais células responsáveis pela inflamação crônica, exercendo vários papéis. Uma vez ativados, os macrófagos exercem um papel fagocítico e secretor fundamental na defesa contra o agente agressor e são importantes na imunidade mediada por células. É fato conhecido da literatura que os macrófagos secretam os mediadores da inflamação aguda (particularmente o fator de ativação das plaquetas e metabólitos do ácido araquidônico), proteases e enzimas hidrolíticas (que causam dissolução do material extracelular), citocinas (que estimulam a proliferação dos fibroblastos e síntese do colágeno) e os fatores de crescimento.

A Figura 33 ilustra a variação da concentração de macrófagos no exsudato com o tempo de implante. Após duas semanas do implante a população de macrófagos diminuiu significativamente, indicando imunossupressão do processo inflamatório.

É fato bem conhecido da literatura que uma série de enzimas contidas nos leucócitos e macrófagos é liberada no processo da inflamação, o que se traduz num aumento de sua atividade no local da reação inflamatória, enquanto que na zona de regeneração sua atividade é diminuída. A fosfatase alcalina é uma enzima presente nos leucócitos e macrófagos e por isso sua quantificação é de particular interesse para o estudo da relação entre o processo inflamatório e a biocompatibilidade dos materiais sintéticos.

O processo inflamatório pós-implante do copolímero de PCL-co-Eg foi avaliado levando-se em conta a atividade da enzima fosfatase alcalina relativamente ao controle (silicone de grau médico). Os resultados apresentados na Figura 34 sugerem que a biocompatibilidade do copolímero de eugenol é similar à do silicone grau médico, uma vez que a atividade da enzima fosfatase alcalina diminui significativamente em ambos os sistemas com relação ao tempo pós-implante.

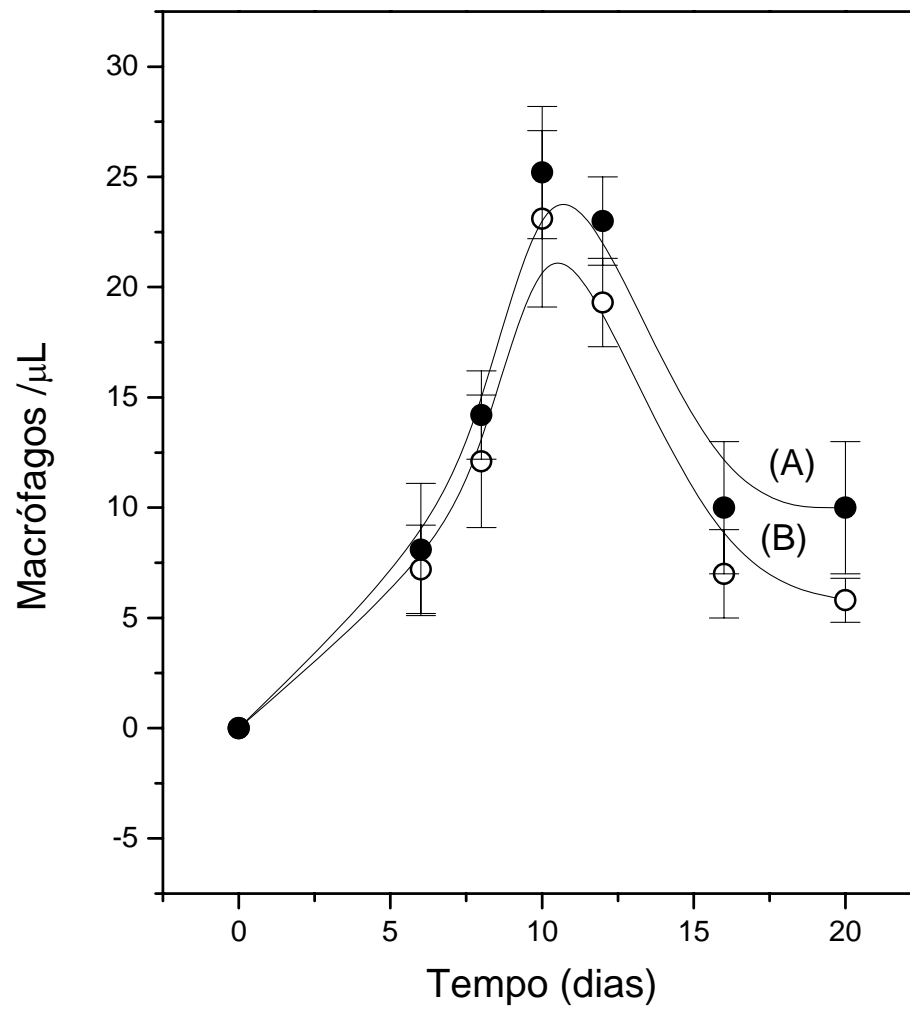


Figura 7.33: Variação na concentração de macrófagos no exsudato com o tempo de implantação do copolímero de PCL-co-Eg (A) e silicone grau médico (B).

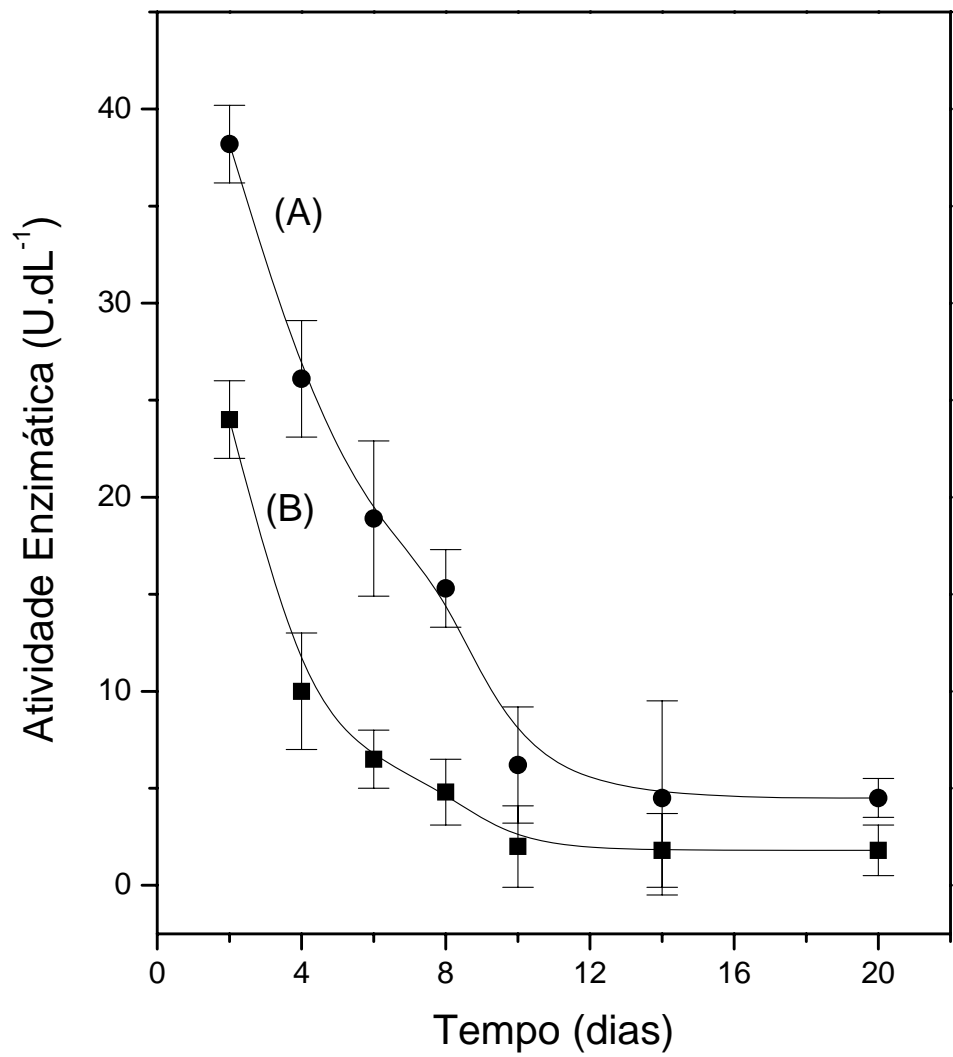


Figura 7.34: Atividade extracelular da fosfatase alcalina no exsudato de PCL-co-Eg (A) e silicone grau médico (B) em função do tempo de implante.

7.5 Considerações finais

O presente trabalho propôs-se a avaliar a viabilidade da aplicação do copolímero PCL-eugenol na odontologia, bem como estudar suas propriedades antimicrobianas e de biodegradação, além de caracterizar físico-quimicamente o copolímero.

A presença de eugenol no copolímero promoveu características antimicrobianas ao material no que se refere às bactérias estudadas (*E.coli* e *S.aureus*) apresentado inibição de crescimento bacteriano comparável ao encontrado em antimicrobianos utilizados corriqueiramente na prática clínica.

Simultaneamente concluímos que concentrações mínimas de eugenol no copolímero correspondentes aos percentuais 5,5% e 6,5% não induziram resposta citotóxica, atribuindo ao PCL-co-Eg propriedades antimicrobianas.

As características de biodegradação do copolímero PCL-co-Eg apresentam-se muito semelhante às do polímero PCL na ausência das enzimas hidrolíticas. Por outro lado, a biodegradação na presença das enzimas lipase e colesterol estearase indicou que a unidade métrica correspondente ao eugenol favorece a hidrólise do copoliéster.

Os copolímeros obtidos apresentaram uma baixa citotoxicidade hiperêmica relativamente ao silicone de grau médico.

7.6 Referências:

- [1] ELZEIN, T.; BROGJY, M.; SCHULTZ, J. Quantitative calculation of the orientation angles of adsorbed polyamides nanofilms, **Polym.**, v. 44, p.3649-3660, 2003.
- [2] WILSON,A.D.; MESLEY, R.J. Zinc oxide-eugenol cements : Infrared spectroscopic studies **J.Dent. Res.**, v.51(6), p.2581-88, 1972.
- [3]FIREMAN,M.;ROSS,S.D. **J.Polym. Sci.** v.5, p.259,1950.
- [4]ODIAN, G. **Principles of polymerization**. New York, Wiley Interscience, 2ªed.1985.
- [5]BARTON,J.M. **J. Polym. Sci.**, v.C30, p.573, 1970.
- [6]VAN KREVELEU, D.W. **Properties of polymers: their correlation with chemical structure: their numerical estimation and prediction from additive group contributions**. New York, Elsevier, 1990.
- [7]NOTTELET,B.; COUDANE,J., VERT,M. Synthesis of an X-ray opaque biodegradable copolyester by chemical modification of poly(ϵ -caprolactone), **Biomaterials**, v.27, p.4948-4954,2006.
- [8]ZHENG,X; WILNIE, C.A. **Polym. Degrad. Stab**, v.81.
- [9]CHAHINIAN, H.; NINI,I.; BOITARD, E.; DUBES, J.P.; COMEAN,L.C.; SARDA,I. Distinction between estearases and lípases : a kinetic study with vinyl esters and TAG, **Lipids** v.37, p. 653-662, 2002
- [10]SHIRAHAWA, H.; KAWAGUCHI, Y.; ALUDIN, M.S.; YASUDA,H. Synthesis and enzymatic degradation of high molecular weight aliphatic polyesters **J. Appl. Polym. Sci.** v.80, p. 340-347, 2001.
- [11]GAN,Z.; LIANG, Q.; ZHANG, J., JING,X. Enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) film in phosphate buffer containing lipases **Polym. Degradat. Stabil.** v.56, p. 209-213, 1997.
- [12]Center For Disease Control-Antimicrobial Susceptibility Tests, National Nosocomial Infection Study, Quartely Report, April 1974.
- [13]BAIRD,N. C. ; DEWAR, M.J.S. **J.Chem.Phys.**, 50,1262(1969).

8. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- ✓ A presença de eugenol no copolímero promoveu características antimicrobianas ao copolímero PCL-co-Eg no que se refere às bactérias estudadas (*E.coli* e *S.aureus*), apresentado inibição de crescimento bacteriano que pode viabilizar sua aplicação como material implantável em organismo biológico.
- ✓ Foi observado que concentrações mínimas de eugenol no copolímero (5,5% e 6,5%) não induziram resposta citotóxica, atribuindo ao PCL-co-Eg propriedades antimicrobianas. Os resultados para indução de crescimento bacteriano obtido para essas concentrações são semelhantes aos valores-padrão de muitos antimicrobianos comumente utilizados na prática médica.
- ✓ As características de biodegradação do copolímero PCL-co-Eg apresentam-se muito semelhante às do polímero PCL, no entanto a presença de enzimas hidrolíticas (lipase e colesterol estearase) indicou que a unidade mérica correspondente ao eugenol favorece a hidrólise do copoliéster.
- ✓ As relações entre as energias HOMO LUMO, o potencial eletrostático e as superfícies equipotenciais permitiram concluir que não existe uma alteração significativa no valor de pKa do eugenol após sua copolimerização com ϵ -CL, proporcionando ao copolímero PCL-co-Eg bioatividade própria do derivado fenólico.
- ✓ Os copolímeros obtidos apresentaram uma baixa citotoxicidade para concentrações de eugenol de 6,5%.
- ✓ Os copolímeros obtidos PCL-co-Eg apresentaram baixa atividade hiperêmica relativamente ao silicone grau médico.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

É fato que o desenvolvimento de novos materiais com propriedades biocompatíveis envolve uma grande interdisciplinaridade entre a física, química, biologia e a engenharia de materiais. Esta interdisciplinaridade por sua vez está implicitamente associada a uma instrumentação que na maior parte dos casos não está concentrada em um mesmo laboratório de pesquisa.

Durante a realização deste trabalho procuramos desenvolver pesquisas no sentido de se obter novos copolímeros que possuíssem atividade antimicrobiana e que, ao mesmo tempo, pudesse viabilizar sua aplicação à população de baixa renda.

Obviamente, embora certo número de caracterizações físico-químicas e bioquímicas esteja presente neste trabalho, entendemos que existe a necessidade de uma continuidade do mesmo uma vez que o binômio instrumentação-tempo nos privou desta resposta. Neste sentido, as seguintes perspectivas para um trabalho futuro são apontadas abaixo:

- A) Estudo da cristalinidade do copolímero por difratometria de raios X.
- B) Análise da atividade osteocondutora do copolímero PCL-co-Eg através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.
- C) Obtenção de pinos do copolímero PCL-co-Eg para possíveis aplicações como implante.
- D) Análise das suas propriedades mecânicas de pinos obtidos a partir do copolímero PCL-co-Eg.
- E) Determinação da distribuição de tamanhos de poros do PCL e PCL-co-Eg por porosimetria e verificação de sua influência na osteocondutividade.