

**VIVIANNE CARVALHO DA CUNHA TRAJANO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OSTEOGÊNICA DA  
DOXICICLINA EM UMA MATRIZ DE COMPÓSITO  
BIODEGRADÁVEL DE POLI ( $\epsilon$ -CAPROLACTONA), POLI (ÁCIDO  
LÁTICO-CO-GLICÓLICO) E BIOCERÂMICA *in vitro***

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2012**

**VIVIANNE CARVALHO DA CUNHA TRAJANO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OSTEOGÊNICA DA DOX EM UMA MATRIZ  
DE COMPÓSITO BIODEGRADÁVEL DE POLI ( $\epsilon$ -CAPROLACTONA), POLI  
(ÁCIDO LÁTICO-CO-GLICÓLICO) E BIOCERÂMICA *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

**Área de concentração:** Clínica Odontológica

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria Esperanza Cortés Segura

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Célia Regina M. Lanza

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2012**

T766a Trajano, Vivianne Carvalho da Cunha  
2012 Avaliação da atividade osteogênica da doxiciclina em uma matriz de  
T compósito biodegradável de poli(ε-caprolactona), poli(ácido lático-co-  
glicólico) e biocerâmica in vitro / Vivianne Carvalho da Cunha Trajano.  
2012.  
155 f.: il.  
Orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura  
Co-orientadora: Célia Regina Moreira Lanza  
Dissertação ( Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Odontologia.  
1.Doxiciclina – Uso terapêutico - Teses. 2. Compômeros – Uso terapêu –  
tico – Teses. I. Cortés Segura , Maria Esperanza. II. Lanza, Célia Regina  
Moreira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de  
Odontologia. IV.Título.

BLACK D047

**Dedico a Deus, meu Pai, meu Amigo,  
sem Ele certamente seria impossível a  
realização deste trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Maria, muito obrigada pela vida e dedicação! Aos meus sogros, Nilson (*in memoriam*) e Rita, muito obrigada pelo apoio. Ao meu marido, Adriano, meu amor, companheiro de longa jornada, muito, muito obrigada por tudo. Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos. Família, vocês são minha mola propulsora.

À minha orientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Esperanza Cortés Segura, muito obrigada por tudo nos três anos de iniciação científica e nos dois anos do curso de mestrado. À minha co-orientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina M. Lanza, pelos conselhos e pela presença doce e tranquila.

Ao prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra Millan, muito obrigada ter me dado oportunidade de trabalhar no excelente Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais da Química (LEMB), que tornou possível a realização deste trabalho. Obrigada ao prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai. Kellen, muito obrigada pela parceria. Se não fosse você, eu não teria nem começado esta jornada. Aos colegas do LEMB: Alinne, Joel e Fred, obrigada pelos conselhos; Juliana, Sávio, Karina, Alfonso, Michelle, Jéssica, Diego Fernando, Kirla, Aina, Elgte, Arlete, Eliete, Filipe, Bárbara Bianca, Fernando, enfim, todos os companheiros do laboratório, obrigada.

Aos meus amigos do curso de mestrado, obrigada! Aos amigos da Odontologia, obrigada! Ana Paula, certamente você tornou os cursos de graduação e mestrado mais alegres. Ao meu amigo Bruno Lourenço, obrigada por pastilhar os materiais.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFMG, na pessoa do prof. Dr. Saul Martins de Paiva, pelo apoio. Às secretárias do Colegiado de Pós-Graduação, Laís, Beth e Zuleica, pela eficiência e ajuda.

Aos professores da graduação e pós-graduação, todos aqueles que participaram da minha formação durante o mestrado, muito obrigada!

Aos funcionários e pacientes da FOUFMG.

Às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e INCT/NanoBiofar, pelo apoio financeiro.

Aos ratos *Wistar* neonatos, que contribuíram para o desenvolvimento da Ciência.

Àqueles amigos e colaboradores que, de forma direta e indireta, colaboraram com a realização deste mestrado.

Desejo SUCESSO e agradeço a TODOS pela oportunidade que me deram de trabalhar, aprender e o apoio para continuar...

*“Não importa onde você parou... Em que momento da vida você cansou... O que importa é que é sempre possível e necessário recomeçar. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo... É renovar as esperanças na vida... É renovar as esperanças na vida e, o mais importante, acreditar em você de novo.*

*Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado... Chorou muito? Foi limpeza da alma... Ficou com raiva das pessoas? Foi para poder perdoá-las um dia... Sentiu-se só por diversas vezes? É porque fechou as portas até para os Anjos. Acreditou que tudo estava perdido? Era o início de sua melhora.*

*Aonde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto, queira o melhor do melhor. Se pensarmos pequeno, coisas pequenas teremos, mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor, o melhor vai se instalar em sua vida. Porque sou do tamanho daquilo que vejo e não do tamanho da minha altura.”*

**Carlos Drummond de Andrade**

## RESUMO

Compósitos de polímeros biodegradáveis e biocerâmicas são uma alternativa na área de engenharia de tecidos para regeneração óssea, visto que combinam a bioatividade das biocerâmicas com a flexibilidade dos polímeros. A doxiciclina (DOX) é um antibiótico de largo espectro, tem amplo uso como um auxiliar na terapia periodontal. DOX pode sofrer degradação sob oscilação do pH, calor e umidade, e efeitos tóxicos. Para superar estes problemas, sistemas de encapsulamento com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) permitem proteção da molécula e a sua liberação controlada, que reduzem a frequência de administração, concentração terapêutica eficaz e prolonga o seu efeito terapêutico para permitir a regeneração dos tecidos periodontais. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar compósitos de policaprolactona (PCL), poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA) e biocerâmica de fosfato de cálcio bifásico (BCP) carregados com DOX encapsulada em  $\beta$ CD para avaliar a sua biocompatibilidade e atividade sobre células osteoblastos. O compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD foi preparado com método de dupla de mistura. O PCL e o PLGA (50:50) foram dissolvidos em diclorometano (DMC) e adicionado BCP na razão 1:4 (PCL+PLGA/BCP) com adição de DOX ou DOX/ $\beta$ CD em concentrações decrescentes entre 25 $\mu$ l/ml e 1 $\mu$ l/ml. A viabilidade celular/proliferação de osteoblastos foi avaliada utilizando o teste MTT (24h, 7 e 14 dias) e a atividade de fosfatase alcalina (FA) e colágeno foram avaliados com 7 e 14 dias e Von Kossa com 14 dias. A estrutura dos compósitos foi avaliada por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados obtidos após testes de MTT mostraram maior proliferação celular, na presença do compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD, concentração 25 $\mu$ l/ml, com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, em todos os tempos experimentais, sendo maior na segunda semana. Os resultados da FA mostraram que o compósito com DOX incluída apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle em todos os tempos experimentais, com maior aumento da FA observado na segunda semana. Estes resultados sugerem atividade dos osteoblastos durante a osteogênese, estando relacionada à deposição de matriz óssea por estas células. Os resultados da produção de colágeno pelas células osteoblásticas foi maior na presença do compósito e apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, apenas na segunda semana. Estes resultados sugerem que o aumento de secreção de colágeno está relacionado à atividade osteogênica. As células produziram mais colágeno no decorrer dos períodos analisados indicando que estas



células sofreram osteogênese até os 14 dias de cultivo, produzindo matriz extracelular na presença do compósito. Os resultados de marcação por Von Kossa das células submetidas à indução osteogênica na presença do compósito mostraram, visualmente, a atividade osteogênica das células, através da formação dos nódulos de mineralização no período de 14 dias. A avaliação da estrutura arquitetônica porosa do compósito pela MEV mostra que sua topografia superficial pode ser apropriada para o cultivo dos osteoblastos. Estes resultados permitem concluir que as células foram viáveis na presença do compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD, favorecendo proliferação celular e atividade osteogênica para sua aplicação na engenharia de tecidos ósseos.

**Palavras-chave:** Doxiciclina, Compósitos, Biocerâmica, Polímeros Biodegradáveis, Regeneração Óssea, Biomateriais, Osteoblastos.

## ABSTRACT

Composites of biodegradable polymers and bioceramics are an alternative in the area of tissue engineering for bone regeneration, since they combine the bioactivity of bioceramics with the flexibility of polymers. Doxycycline (DOX) is a broad spectrum antibiotic, has widespread use as an aid in periodontal therapy. DOX can suffer degradation under oscillation of pH, heat and humidity, and toxic effects. To overcome these problems, encapsulation systems with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) allows protection of the molecule and its controlled release, reducing the frequency of administration, effective therapeutic concentration and prolongs its therapeutic effect to allow for periodontal tissue regeneration. In this study, we evaluated composites of polycaprolactone (PCL), poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and bioceramics of biphasic calcium phosphate (BCP) loaded with doxycycline encapsulated in  $\beta$ CD to evaluate its biocompatibility and activity on osteoblast cells. The composite BCP / PCL / PLGA / DOX /  $\beta$ CD was prepared with double mixing method. The PCL and PLGA (50:50) were dissolved in dichloromethane (DMC) added and BCP in the ratio 1:4 (PCL + PLGA / BCP) with addition of DOX and DOX /  $\beta$ CD complex decreasing concentrations between 25 $\mu$ l/ml and 1 $\mu$ l/ml. Cell viability / proliferation of osteoblasts was assessed using the MTT test (24h, 7 and 14 days) and alkaline phosphatase (FA) and collagen were evaluated 7 and 14 days with Von Kossa and 14 days. The structure of the composites was evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM). The results of MTT after tests showed increased cell proliferation in the presence of the composite BCP / PCL / PLGA / DOX /  $\beta$ CD , 25 $\mu$ l/ml concentration, which was statistically significant ( $p < 0.05$ ) compared to control in all experimental times, being higher in the second week. The results showed that the composite FA with DOX included statistically different ( $p < 0.05$ ) compared to control in all experimental times, with greater increases in FA observed in the second week. These results suggest the activity of osteoblasts during osteogenesis and is related to bone matrix deposition by these cells. The results of collagen production by cells osteoblásticas was higher in the presence of composite and showed a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to control, only the second week. These results suggest that the increased secretion of collagen is related to osteogenic activity. The cells produced more collagen during the study periods indicates that these cells underwent osteogenesis up to 14 days of cultivation, producing the extracellular matrix in the presence of the composite. The results dialing Von Kossa cells undergoing osteogenic induction in the presence of the composite showed visually osteogenic

activity of the cells through the formation of nodules of mineralization within 14 days. The evaluation of the composite porous architectural structure by SEM shows that the surface topography can be suitable for the cultivation of osteoblasts. These results indicate that the cells were viable in the presence of the composite BCP / PCL / PLGA / DOX /  $\beta$ CD, promoting cell proliferation and osteogenic activity for its application in bone tissue engineering.

Keywords: Doxycycline, Composites, Bioceramics, Biodegradable Polymers, Bone Regeneration, Biomaterials, Osteoblasts.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1 Tecido ósseo.....	21
2.2 Osteoblastos.....	23
2.3 Engenharia de tecidos.....	26
2.4 Matrizes para Engenharia de Tecidos (Compósitos).....	28
2.5 Biomateriais.....	29
2.6 Liberação de fármacos.....	33
2.7 Sistemas de encapsulamento de fármacos.....	35
2.8 Polímeros.....	38
2.9 Biocerâmica: Fosfato de Cálcio Bifásico.....	44
2.10 Compósitos de PCL/PLGA/BCP.....	46
2.11 Antibióticos e Doença Periodontal.....	47
2.12 Sistemas de liberação controlada de antimicrobianos.....	56
2.13 Ensaios <i>in vitro</i> em cultura de células osteoblásticas.....	60
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>62</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
4.1 Objetivos Específicos.....	63
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
5.1 Delineamento do Estudo.....	64
5.2 Preparação dos Compósitos.....	65
5.2.1 Preparação dos compostos de inclusão.....	66
5.3 Cultivo de Osteoblastos.....	67
5.4 Meio de Cultura.....	67
5.5 Repicagem e semeadura de células em placas de 96 e 6 poços.....	68
5.6 Ensaio de metabolização de MTT.....	68
5.7 Ensaio da atividade de Fosfatase Alcalina (BCIP/NBT).....	70
5.8 Ensaio da produção de colágeno (Sircol Red).....	71
5.9 Ensaio da produção de nódulos de mineralização por coloração pelo método Von Kossa.....	73
5.10 Caracterização de Superfície e Estrutural da Matriz por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	73
5.11 Análise Estatística.....	73
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
6.1 Teste de viabilidade celular (MTT).....	75
6.2 Teste de viabilidade celular (MTT).....	76
6.3 Teste de viabilidade celular (MTT).....	77
6.4 Produção de fosfatase alcalina (BCIP/NBT).....	78
6.5 Síntese de colágeno ( <i>Sirius Red</i> ).....	80
6.6 Coloração por Von Kossa.....	80

<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>9 PERPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>112</b>

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

<b>Figura 1:</b> Esquema do ciclo celular de células osteogênicas progenitoras levando a (1) morte celular programada; (2) mitose e proliferação celular; ou (3) diferenciação terminal e formação de osteócito mineralizado.....	25
<b>Figura 2:</b> Técnica da Engenharia de Tecido.....	27
<b>Figura 3:</b> Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional x controlada.....	34
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da estrutura geral e tridimensional das Ciclodextrinas naturais $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ .....	37
<b>Figura 5:</b> Estrutura química da policaprolactona.....	43
<b>Figura 6:</b> Representação estrutural do PLGA.....	44
<b>Figura 7:</b> Estrutura química da doxicilina.....	54
<b>Figura 8:</b> Compósitos PLGA/PCL/BC/DOX/ $\beta$ CD.....	66
<b>Figura 9:</b> Redução de MTT à formazan.....	69
<b>Figura 10:</b> Visualização dos cristais de formazan formados após metabolização do MTT em grupo controle (somente osteoblastos) com aumento de 20X.....	69
<b>Figura 11:</b> Viabilidade celular dos osteoblastos pelos ensaios de MTT após 24 horas de tratamento com soluções de DOX pura e DOX/ $\beta$ CD nas concentrações: 1; 5; 10; e 25 $\mu$ g/mL.....	75
<b>Figura 12:</b> Viabilidade celular dos osteoblastos pelos ensaios de MTT após 24 horas de tratamento com compósito de DOX sem $\beta$ CD (BCP/PCL/PLGA/DOX) nas concentrações: 1; 5; 10; e 25 $\mu$ g/mL.....	76
<b>Figura 13:</b> Viabilidade celular dos osteoblastos pelos ensaios de MTT após 24 horas de tratamento com compósito de DOX encapsulada em $\beta$ CD (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD) nas concentrações: 1; 5; 10; e 25 $\mu$ g/mL.....	77
<b>Figura 14:</b> Viabilidade celular dos osteoblastos pelos ensaios de MTT após 24 horas, 7 e 14 dias de tratamento com compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25 $\mu$ g/mL.....	78
<b>Figura 15:</b> Visualização da produção de fosfatase alcalina por osteoblastos na presença do compósito. (A) formação de precipitado de aspecto arroxeadado no osteoblasto (20X). (B) formação de precipitado de aspecto arroxeadado formado nos osteoblastos sobre o compósito (75X).....	79

<b>Figura 16:</b> Produção de fosfatase alcalina por osteoblastos após 7 e 14 dias de tratamento com compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25 $\mu$ g/mL.....	79
<b>Figura 17:</b> Produção de colágeno por osteoblastos após 7 e 14 dias de tratamento com compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25 $\mu$ g/mL.....	80
<b>Figura 18:</b> Placa de 6 poços. Ensaio Von Kossa após 14 de incubação. Fileira A) controle (somente células). Fileira B) matriz (BCP/PCL/PLGA). Fileira C) compósito (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD).....	81
<b>Figura 19:</b> Visualização de estruturas mineralizadas por coloração do tipo Von Kossa. (A) Imagem de dois nódulos mineralizados após 14 dias de indução osteogênica na presença do compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD, concentração 25 $\mu$ g/mL. Aumento de 20X. B) Aumento de 400X.....	81
<b>Figura 20:</b> MEV do compósito (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD). A, B, C, D com aumento de 5X; E e F com aumento de 10X.....	82
<b>Figura 21:</b> Curva padrão do colágeno.....	120
<b>Quadro 1:</b> Delineamento experimental da terceira etapa. ....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BC	Biocerâmicas
$\beta$ CD	B-ciclodextrina
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina
BCP	$\beta$ - Fosfato tricálcio ( $\beta$ -tricalciumphosphate)
$\beta$ -TCP	$\beta$ -Tricalcio fosfato
BDD	Baixas doses de doxiciclina
BMP	Proteína morfogenética óssea (Bone Morphogenetic Protein)
CaSR	Calcium-Sensing Receptor
CD	Ciclodextrinas
CTL	Linfócito T citotóxico
CTM	Células-Tronco Mesenquimais
CMT	Composto derivado da tetraciclina
DMC	Diclorometano
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOX	Doxiciclina
EDTA	Ácido Tetracético Etilenodiamidina
FA	Fosfatase Alcalina
FDA	Food and Drug Administration
HA	Hidroxiapatita
HCl	Ácido clorídrico
KVp e mA	Quilovoltagem e miliampére
IL	Interleucina
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromid
MEC	Matriz extracelular
Mesh	Unidade de Medida Granulométrica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIC	Mínima Concentração Inibitória
MIN	Minociclina
ml, $\mu$ l	Mililitro, microlitro



MMP	Matrix metalloproteinases
NBT	Nitroblue tetrazólio clorídrico
PBSA	Tampão salina estéril sem cálcio
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PG	Prostaglandinas
PGA	Poli(ácido glicólico)
PH	Potencial de hidrogênio iônico
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PLA	Poli(ácido lático)
RAR	Raspagem e alisamento radicular
rpm	Rotações por minuto
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNA <sub>t</sub>	Ácido Ribonucléico transportador
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SBF	Simuladoras de Fluidos Corpóreos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SERPIN	Inibidor de protease de serina
SFB	Soro Fetal Bovino
SLF	Sistema liberador de fármacos
SLIBP	Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal
TC	Tetraciclina
TP	Terapia Periodontal
VEGF	Fator de crescimento vascular

## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida das populações de uma forma geral, estima-se que também aumente o número de indivíduos afetados por doenças crônico-degenerativas, que afetam o tecido ósseo, como a osteoporose. Além das doenças crônico-degenerativas, as deformidades congênitas como a doença de Paget e osteogênese imperfeita, representam um enorme custo social, além de um considerável gasto para o sistema de saúde pública. Deve-se considerar de grande relevância, os defeitos ósseos provenientes de patologias de origens variadas de traumas, tumor, infecções, doença periodontal, devido a razões estéticas e de reconstrução dessas estruturas (AIRES, 2008).

A perda óssea também está associada ao processo de envelhecimento e pode ser observada como resultado de variadas doenças metabólicas e de fraturas. Embora o tecido ósseo tenha uma considerável capacidade de regeneração, ainda existem muitas situações em que este processo está dificultado, constituindo um problema em cirurgia óssea reconstrutiva. O envelhecimento da população é acompanhado por uma redução natural das propriedades e atividades dos tecidos e órgãos que constituem o corpo. Uma evidência de tal fato pode ser visualizada através dos números cada vez maiores de cirurgias envolvendo patologias e falhas em tecidos e órgãos. Dentre as alternativas disponíveis para os procedimentos cirúrgicos ligados à reconstrução de tecidos e órgãos estão o autotransplante (enxerto autógeno), o aloenxerto (transplante entre indivíduos geneticamente diferentes, de uma mesma espécie), o xenoenxerto (enxerto cirúrgico de tecido de uma espécie para outra distinta) e os biomateriais.

Biomaterias são estruturas de suporte formadas de materiais biocompatíveis. O uso clínico de biomateriais osteocompatíveis e bioativos (material que induz uma resposta biológica específica, sendo o oposto de bioinerte) (LEGEROZ 2008), tem importantes aplicações na reparação e reconstrução óssea. Existem várias técnicas e materiais usados na preparação de reparo ósseo, porém deve-se avaliar o comportamento desse material quanto à estabilidade em ambiente fisiológico e resistência mecânica (ORÉFICE, 2006). Quando uma perda significativa de tecido ocorre como resultado de trauma ou da extirpação de tecido doente ou canceroso, uma abordagem alternativa para cura total é a utilização de recursos provenientes da engenharia de tecidos (LANGER; VACANTI, 1993; IKADA *et al.*, 2006).

A engenharia de tecido é baseada na criação de um novo tecido, semelhante ao tecido perdido, através da regeneração induzida ou da persuasão do organismo na sua própria cura através do endereçamento, ao local específico, de promotores de regeneração, tais como:

células, moléculas sinalizadoras, sinais mecânicos e uma estrutura de suporte (WILLIANS, 2006). Para regenerar o tecido ou órgão lesado, a engenharia de tecidos utiliza três ferramentas básicas: células, matrizes tridimensionais (3D) e fatores de crescimento. A definição mais ampla dessa técnica incluiria, entre seus objetivos, o desenvolvimento e a manipulação de implantes artificiais, de tecidos gerados em laboratório e/ou células e moléculas capazes de substituir ou estimular funcionalmente partes defeituosas ou lesadas (IKADA *et al.*, 2006; TABATA *et al.*, 2006).

Na engenharia de tecidos, as células colonizam a matriz 3D e são as responsáveis pela síntese de matriz extracelular (MEC) do novo tecido, enquanto a matriz 3D é responsável por fornecer um meio ambiente favorável à execução adequada das funções celulares. A maioria das células isoladas de órgãos é dependente de ancoragem. Assim, a presença de um material que possa agir como plataforma de adesão e promoção do crescimento celular é essencial.

Biomateriais são normalmente associados aos materiais colocados em contato com o tecido humano com o objetivo de recompor alguma parte danificada. Este tipo de material se diferencia de outros materiais por conter uma combinação de propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas que tornará viável a sua utilização no corpo humano (ORÉFICE, 2006). As diversas possibilidades de manipulação da estrutura e propriedades dos biomateriais e das suas interações com os sistemas vivos oferecem grandes oportunidades de concretização, com sucesso, de várias das metas associadas à reconstrução de tecidos e órgãos afetados por patologias ou outros tipos de falhas (HENCH, 1998). Uma abordagem para melhorar as propriedades mecânicas e químicas de biomateriais é a produção de compósitos orgânico-inorgânico, que é a associação de diferentes materiais para uma finalidade comum, buscando otimização de propriedades (LEGEROZ 2008).

Os compósitos podem ser semelhantes às MEC e capazes de estimular as células à diferenciação, visando assim, a recuperação do tecido lesado. De modo interessante, os compósitos 3D apresentam a vantagem de permitir um cultivo celular com definição espacial. Além disso, o desenvolvimento de compósitos artificiais para reconstrução óssea oferece diversas vantagens para estudos com células em relação aos demais tipos de materiais, devido a sua semelhança com o tecido ósseo (ARINZEH *et al.*, 2005). A regeneração do tecido ósseo feita por compósitos cerâmicos mostrou-se uma excelente alternativa em técnicas terapêuticas recentes, visto que favorecem a reposição óssea.

As biocerâmicas (BC) têm apresentado utilidade em reconstruções de grandes perdas ósseas faciais e ortopédicas, inclusive no tratamento de osteomielites, mostrando

condições satisfatórias em relação à resistência mecânica e módulo de elasticidade do tecido ósseo neoformado em função da osteocondução (processo no qual é provido um arcabouço micro e macroscópico para possibilitar a migração de elementos celulares envolvidos na formação óssea: células mesenquimais, osteoblastos, osteoclastos e vasculatura) (FITCH *et al.*, 1997) e osteoindução (processo de recrutamento de células mesenquimais circundantes que diferenciarão em células formadoras de cartilagem e osso, sob a influência de BMPs (URIST, 1980; STEVENSON, 1999), onde a bioação (capacidade do material de induzir a deposição de cristais de apatita sobre sua superfície (LEGEROZ 2008)) envolvida é a osteogênese (formação óssea sem a indicação de origem celular, ou seja, o osso neoformado pode se originar de células vivas do enxerto ou de células derivadas do hospedeiro) (STEVENSON, 1999). Uma definição mais estrita e mais comumente utilizada para osteogênese refere-se à formação óssea pelo transplante de células vitais (FITCH *et al.*, 1997) (RIPAMONTI, 1996).

O uso da BC está direcionado para o reparo fisiológico dos componentes celulares, contribuindo para a melhoria da qualidade do osso neoformado (HENCH *et al.*, 2000). Entre as biocerâmicas pesquisadas como matriz para engenharia de tecido ósseo está o fosfato de cálcio bifásico (BCP). A porosidade e interconectividade dos compósitos cerâmicos favorecem não só a adesão, a migração, proliferação e diferenciação, mas também a dispersão de nutrientes e metabólitos. (CHANG *et al.*, 2000). A matriz, por ser de natureza cerâmica e ter elevada porosidade, característica necessária às matrizes 3D, apresenta resistência mecânica relativamente baixa, o que limita o seu uso a alguns tipos de aplicação no tecido ósseo. Uma estratégia é a inserção de uma matriz polimérica flexível (WEN; WILKES, 1996; CHEN; WU, 2005). O desenvolvimento destes materiais compósitos permite combinar as propriedades biológicas das cerâmicas bioativas com a flexibilidade dos polímeros.

A BC associada a polímeros biodegradáveis foi pesquisada como material para ortopedia e recentes estudos realizados com estes biomateriais têm apontado seu enorme potencial para o uso em defeitos ósseos, promovendo a osteogênese ou neoformação de osso e facilitando sua reposição (RUHÉ *et al.*, 2006). A reposição óssea é uma função ativada por macrófagos, a partir dos tecidos ósseos adjacentes pela rápida absorção do  $\beta$ -Tricalcio fosfato ( $\beta$ -TCP) com o suporte inerte de hidroxiapatita (HA) densa (HASHIMOTO-UOSHIMA *et al.*, 1995). Os compósitos obtidos a partir de biocerâmicas e polímeros melhoraram as propriedades físicas dos dois materiais isoladamente, especialmente pelas características termoplásticas do polímero, diminuindo a fragilidade da cerâmica e permitindo sua utilização na prática clínica (PATARO *et al.*, 2007).

Associado ao biomaterial pode-se utilizar a tecnologia de sistemas de liberação controlada de fármacos (SLF), que representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. O objetivo dos SLF é manter a concentração do fármaco em sua faixa de ação terapêutica por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (GHANDEHARI; DANDU, 2007).

Nos SLFs de fármacos usam-se, normalmente, polímeros biodegradáveis. Dentre os principais polímeros biodegradáveis, atualmente bastante estudados e/ou utilizados na área biomédica, estão a policaprolactona (PCL) e o PLGA poli (ácido lático-co-glicólico). As propriedades biodegradáveis da PCL só foram identificadas em 1973 (Li *et al.*, 2005). Para facilitar a regeneração de tecido lesado, tem-se desenvolvido técnicas para implantação de matrizes colonizadas com as células do tecido em questão (LANGER, 2000). Assim, estes dispositivos compósitos BCP/Polímero apresentam grande potencial para serem usados como compósitos para engenharia de tecidos, sendo então necessária sua avaliação biológica *in vitro*.

O sucesso da utilização de um biomaterial pode estar comprometido por vários fatores locais que dependem das características do material, da manipulação durante o processo cirúrgico e da resposta do hospedeiro ao material implantado. O aparecimento de um processo infeccioso local é um fenômeno relativamente frequente que pode comprometer a regeneração tecidual e a osteointegração do implante (HENCH, 1998).

Assim, muitas vezes é necessária a utilização sistêmica de antibióticos para combater a infecção local. Dentre os diversos antibióticos utilizados clinicamente, as tetraciclinas (TCs), nomeadamente a Doxiciclina, apresentam um espectro antimicrobiano apropriado para o tratamento de infecções ósseas e uma eficácia clínica comprovada. Além do efeito anti-infeccioso, este fármaco parece exercer efeitos diretos no microambiente ósseo que, aparentemente, se traduzem por um efeito benéfico nos processos de regeneração tecidual (CHAUDHARY; AVIOLI, 1994). A caracterização destes efeitos a nível celular reveste-se de particular interesse, pois algumas das ações farmacológicas resultantes podem modular favoravelmente a resposta do hospedeiro, contribuindo para o sucesso do processo de regeneração óssea (SEYMOUR; AVIOLI; HEASMAN, 1992).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tecido Ósseo

O osso é um tecido que contém células vitais que produzem e respondem a vários estímulos externos e internos. Assim como outros tecidos conjuntivos, depois de formado, é continuamente destruído e renovado por atividade celular, em resposta a diversos fatores sistêmicos e locais e estresse mecânico. Esse processo de remodelagem ocorre através de ações coordenadas dos osteoclastos e dos osteoblastos que agem em porções discretas do tecido. O tecido ósseo é constantemente remodelado durante toda a vida. Estima-se que o esqueleto adulto seja totalmente renovado a cada quatro anos (PARFITT, 2002). Os fatores que regulam estes efeitos são gerados sistemicamente ou produzidos no local, tais como os metabólitos do ácido araquidônico, os fatores de crescimento e as citocinas (MUNDY, 1991; DZIAK, 1993).

O tecido ósseo pode ser categorizado em quatro componentes microestruturais: células, matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores sinalizadores solúveis (BUCKWALTER *et al.*, 1995). É constituído de 70% de componentes inorgânicos e 30% de componentes orgânicos. Nesta parte orgânica encontra-se 2% de células e 98% de matriz extracelular, onde o colágeno proteico fibroso é o principal elemento, perfazendo 95%. Os 5% restantes são representados por polissacarídeos, lipídeos e fosfolipídeos. Entre os componentes inorgânicos encontra-se o cálcio e o fosfato, que formam a hidroxiapatita (HA)  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$  e outros elementos como magnésio, sódio, potássio e, em menor concentração, zinco, manganês, flúor e molibidênio (KAPLAN, 1991).

Além de sua função de suporte e proteção, o tecido ósseo funciona como reservatório de minerais e sua complexa fisiologia é controlada por fatores hormonais, forças mecânicas, fatores de crescimento, citocinas e fatores piezoelétricos (TEN CATE, 1994). As etapas do desenvolvimento ósseo são fortemente reguladas por uma hierarquia de programas genéticos, endócrinos e mecânicos (BRACHVOGEL *et al.*, 2003). Não existe mais o antigo conceito de predeterminação genética imutável no que concerne a formação de tecido ósseo. Muitos caminhos de sinalização tem se mostrado de fundamental importância na comunicação inter-osteoblastos (NOMURA; TAKANO, 2000), gerando um campo de resposta muito maior do que o sítio estimulado. Células ósseas são organizadas em uma rede de interconexão que se

estende dos osteócitos enclausurados na matriz até os osteoblastos presentes na superfície óssea (TURNER; ROBLING; DUNCAN, 2002).

Os principais fenótipos celulares associados ao osso são o osteócito, o osteoblasto e o osteoclasto. O osteócito fica dentro da matriz extracelular, após esta ter sido por ele depositada sob a forma de osteoblasto. O osteoblasto é responsável pela formação óssea tanto do tecido osteóide, como da mineralização com a formação de cristais de HA. O osteoclasto é o responsável pela reabsorção óssea e é encontrado nos locais de maior atividade óssea, como em processos patológicos como fraturas, tumores ósseos primários e metástases de outros tumores nos ossos. O osteoblasto tem origem primária em uma célula mononuclear de linhagem sanguínea chamada células-tronco mesenquimais (CTMs), e o osteoclasto é derivado de um monócito macrófago, sendo que serão diferenciados de suas células de origem durante toda a vida. O tecido ósseo encontra-se em contínuo processo de deposição e reabsorção, regulado por uma série de hormônios e outros elementos (MARINHO, 1995).

Macroscopicamente, o osso é composto por tecido ósseo cortical, correspondente a 80% de seu peso total no organismo humano, mas ocupa apenas 50% da área, sendo encontrado principalmente na diáfise dos ossos longos. O restante da área é ocupado pelo tecido ósseo esponjoso, que corresponde aos demais 20% do peso. Quanto ao metabolismo, o osso esponjoso é oito vezes mais ativo, apresentando maior remodelação (BLACK, 1991).

Num estado fisiológico normal, existe um acoplamento entre reabsorção e formação relacionadas com a remodelagem óssea. Entretanto, em várias doenças metabólicas que podem acometer os ossos, como por exemplo, nas osteoporoses há um relativo excesso de destruição óssea comparada com sua respectiva formação, ocorrem anormalidades nesta coordenação. Isso é comumente causado pelo desequilíbrio entre os processos de reabsorção e neoformação óssea (MUNDY, 1991).

Os mecanismos que afetam o balanço entre reabsorção e formação não são completamente compreendidos. No entanto, há crescente evidência de que uma cascata complexa de eventos relacionando fatores autócrinos e parácrinos do hospedeiro estejam envolvidos na regulação desse metabolismo (MUNDY, 1991). O primeiro evento celular da sequência de remodelagem óssea consiste na formação e ativação dos osteoclastos, que exercem um papel regulatório dessa atividade. O tecido que é removido é, subsequentemente, repostado pela ação das células osteoblásticas, o que leva à formação de elementos da matriz orgânica e sua eventual mineralização (DZIAK, 1993).

Os eventos relacionados com a formação óssea incluem atração dos precursores de osteoblastos para o sítio do defeito ósseo, a partir de um processo de quimiotaxia, e

estimulação da proliferação e maturação destes precursores, os quais são capazes de sintetizar as proteínas ósseas, ou seja, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, fosfatase alcalina, proteoglicanos e outros componentes estruturais. Além disso, ocorre a síntese de fatores regulatórios de crescimento, os quais são estocados dentro da matriz óssea por curto período de tempo, quando então, acontece a mineralização dessa estrutura (MUNDY, 1991).

Quanto à destruição óssea, está claro que os osteoclastos podem tornar-se ativados por mudanças na superfície mineral do osso. São formados a partir de precursores hematopoiéticos da medula, os quais interagem com os elementos formadores do sangue, como linfócitos, monócitos e granulócitos. Após a maturação dos precursores, a fase de reabsorção óssea osteoclástica ocorre por um período de dez dias. Nos últimos anos, houve um aumento marcante na compreensão sobre o papel das citocinas geradas no ambiente ósseo. Estas citocinas podem ser geradas por células imunes, tais como os linfócitos e monócitos na cavidade medular ou por outras células ósseas, particularmente as células da linhagem osteoblástica (MUNDY, 1991).

A prostaglandina E2 (PGE2) é o principal metabólito do ácido araquidônico e pode ser produzida pela maioria das células. Possui efeito significativo sobre o metabolismo ósseo e seu possível papel na reabsorção óssea estimulada por IL-1 tem sido extensivamente estudado com resultados conflitantes (TATAKIS, 1993). Alguns estudos *in vitro* têm mostrado que a inibição da síntese de PG (prostaglandina) não tem efeito sobre a atividade de reabsorção óssea mediada por IL-1 (THOMSON; SAKLATVALA; CHAMBERS, 1986). Outros achados *in vitro* sugerem que, embora as PGs contribuam para o processo de reabsorção através do aumento do efeito da IL-1, esta não requer PGs para seu efeito de reabsorção (TATAKIS, 1993). As PGs estão envolvidas no recrutamento de osteoclastos estimulados por IL-1, podendo afetar as células progenitoras dos mesmos, além de promover sua diferenciação. De modo geral, as evidências sugerem que a IL-1 tem efeitos sobre a reabsorção dependentes e independentes de PGs (TATAKIS, 1993).

## 2.2 Osteoblastos

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese, deposição e mineralização da matriz extracelular óssea. Os mecanismos que governam estas atividades ainda são em grande parte desconhecidos (LANGER, 2000). Células-tronco, células osteoprogenitoras e seus precursores mesenquimais aparecem no embrião em grande quantidade. No organismo adulto verifica-se a presença dessas mesmas células, embora em número bem menor, e tudo indica



que elas contribuem para a reposição de osteoblastos no *turn over* ósseo e nos processos reparativos (YANG *et al.*, 2002). Sabe-se hoje que essa ação é regulada pela expressão diferenciada de genes ligados a proliferação e diferenciação das células ósseas (LANGER; VACANTI, 1993). Durante o processo de osteogênese, os osteoblastos são progressivamente transformados em osteócitos à medida que ficam aprisionados dentro das lacunas circundadas por matriz óssea produzida por eles (AUBIN, 2001).

Os osteoblastos não apenas iniciam como também controlam a mineralização óssea. Todas as células osteogênicas contribuem individualmente para o remodelamento ósseo. A interação entre elas controla a atividade e a intensidade deste remodelamento. Essa interação de contato célula-célula pode ser mediada por moléculas da família das integrinas ou pode ser mediada pela liberação de polipeptídeos que funcionam conectando-se a receptores específicos. Entre os fatores polipeptídicos conhecidos, uma família de citocinas pleiotrópicas que partilham um sinal comum desempenha um papel chave no remodelamento ósseo (HEYMANN, 2000). Desta família fazem parte, entre outras, a IL6 e a IL11 (GEORGES *et al.*, 2009).

A reparação tecidual óssea é um processo complexo que envolve respostas locais e sistêmicas. Frequentemente, essa reparação é mais lenta em relação à separação de tecidos moles, devido a diferente morfologia e composição entre os tecidos. O tecido ósseo possui uma enorme capacidade de regeneração na maioria dos casos, o que possibilita a restauração de sua arquitetura e função original. No entanto, existem algumas condições que dificultam essa capacidade de regeneração e a completa reparação pode não ocorrer, caso não haja um bom suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica ou ocorra alta proliferação de outros tecidos locais (PINHEIRO; LIMEIRA JUNIOR; GERBI, 2003). Os métodos tradicionais, tais como pinos intramedulares, revestimentos e fixadores externos, não exigem a implantação de enxerto ósseo, dependendo do local onde aconteceu a lesão para a síntese do osso. Conseqüentemente, defeitos ósseos que comprometam a recuperação total do osso lesado podem ser beneficiados pelas terapias baseadas em células que possuem potencial osteogênico, as quais seriam transferidas para o local da perda óssea.

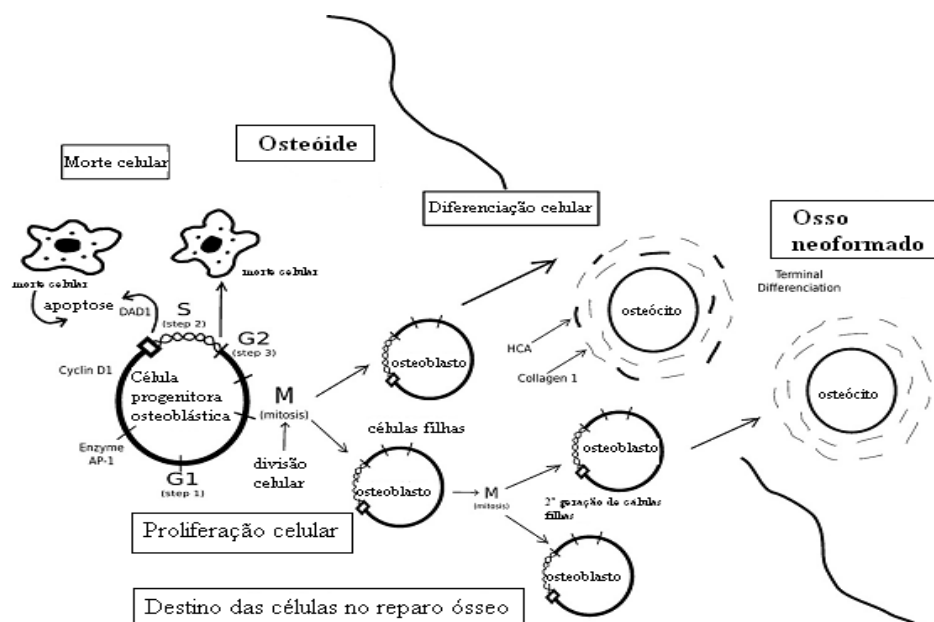
Quando lesões ou defeitos ósseos ocorrem nas mais variadas situações clínicas, a construção tecidual, que devolve a integralidade funcional e mecânica, constitui-se num passo necessário para a reabilitação do paciente. A maior parte dessas lesões, em virtude do seu potencial de regeneração espontânea, repara-se adequadamente pelo emprego de terapias conservadoras ou técnicas cirúrgicas convencionais. No entanto, procedimentos de enxertia e substituição óssea são frequentemente necessários, especialmente em ortopedia e em

intervenções bucomaxilofaciais, quando da existência de defeitos ósseos extensos decorrentes de traumas, procedimentos cirúrgicos e deformidades ósseas congênitas (CANCEDDA, 2003).

A regeneração óssea requer a interação de células, fatores de crescimento e matrizes extracelulares como o coágulo da fibrina. Assim, para efetivamente imitar o processo natural de reparação óssea, estratégias de engenharia de tecidos estão sendo desenvolvidas a fim de aperfeiçoar a indução da remodelação óssea utilizando matrizes tridimensionais (compósitos) biodegradáveis adequadas em relação à estrutura mecânica, proliferação e viabilidade das células, quando colonizadas em compósitos. O sucesso clínico das estratégias em engenharia de tecidos depende da existência de uma fonte de células para a geração de osteoblastos funcionais.

Na estratégia da bioengenharia de tecido ósseo, o transplante autólogo de células é um dos mais prósperos conceitos em desenvolvimento. Esta técnica elimina a morbidade do sítio de doadores em intervenções que envolvem enxertia autóloga. Além de suprimir reações de imunogenicidade inerentes a procedimentos que utilizam enxertos alógenos, assim como evita o risco de insucessos que permeia regimes terapêuticos à base de implantes alopatícos na reconstrução das estruturas envolvidas (VACANTI *et al.*, 1998).

A Figura 1, adaptada de Hench, ilustra o esquema do ciclo celular de células osteogênicas progenitoras (HENCH, 2008).



**Figura 1:** Esquema do ciclo celular de células osteogênicas progenitoras levando a (1) morte celular programada; (2) mitose e proliferação celular; ou (3) diferenciação terminal e formação de osteócito mineralizado. Fonte: Hench, 2008.

Nesse sentido torna-se necessário estabelecer condições para que o tecido ósseo possa se regenerar em situações clínicas consideradas inóspitas, como em locais que apresentem suprimentos sanguíneos comprometidos, em áreas de difícil consolidação, em regiões que possuem defeitos com dimensões críticas e no levantamento de seio maxilar onde o tecido esteja completamente ausente. Para a maioria dessas aplicações, uma fonte celular é imprescindível (BOYAN *et al.*, 2003).

### **2.3 Engenharia de Tecidos**

A Engenharia de Tecidos é uma área científica em contínua expansão. Os desenvolvimentos conseguidos por esta área têm contribuído significativamente para diversos avanços no campo da medicina regenerativa. Esta ciência multi e interdisciplinar combina os conhecimentos de diversas outras áreas, como biologia, ciências da saúde, de engenharia e ciência dos materiais, com o objetivo de desenvolver substitutos sintéticos para tecidos humanos. Para se atingir este objetivo utilizam-se, de uma forma genérica, combinações específicas de células e compósitos. Juntos, células e compósitos geram um material cujas características podem ainda ser moduladas através do sistema de cultura utilizada (LLOYD-EVANS, 2004; BARBANTI, 2005).

A perda de tecidos por traumas ou doenças acomete a população de maneira geral e irrestrita. Aliado à evolução dos exames clínicos e de diagnósticos, atualmente é uma prática comum identificar as causas e o local da perda tecidual. Entretanto, apenas identificá-la não é suficiente, assim torna-se necessário uma ação corretiva que permita a recuperação da função restaurando ou mimetizando a função original (BOSCHI, 1995).

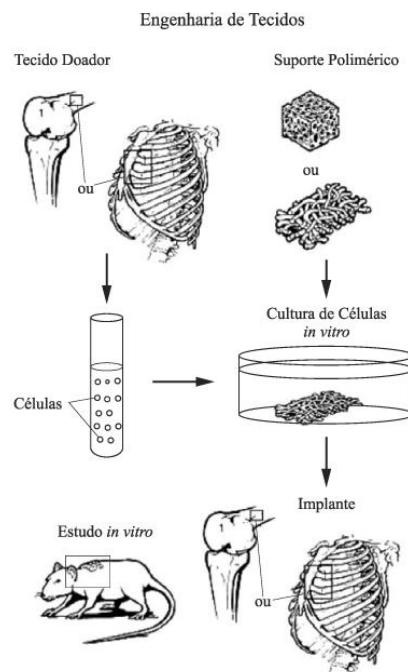
A reposição total e/ou parcial é feita através de duas alternativas: transplantes e implantes. Em relação aos transplantes, os tecidos ou órgãos podem ser obtidos de doadores vivos, como, por exemplo, no caso do coração, rins, etc.; ou de cadáveres, como no caso de ossos liofilizados e congelados. Em ambos os casos, torna-se necessário a utilização de fármacos imunossupressoras, para evitar a rejeição dos órgãos e de outros medicamentos que neutralizem a possível contaminação microbiológica (HENCH, 1998). A segunda alternativa é a utilização de um implante, dispositivo médico feito de um biomaterial que é intencionalmente inserido dentro do corpo, total ou parcialmente inserido abaixo da superfície epitelial (definição do Consenso da Sociedade Europeia de Biomateriais) (WILLIAMS, 1987). Nestes casos, o biomaterial pode ter origem distinta: biológica ou sintética. Na forma

sintética, os materiais devem ser produzidos com o intuito de serem biocompatíveis com o meio implantado, permitindo recuperar a função do sítio receptor (BARBANTI *et al.*, 2005).

Em função do tempo de permanência no corpo humano, os implantes podem ser classificados em dois grandes grupos, permanentes ou temporários. Implantes permanentes quase sempre geram inflamação crônica, sendo uma resposta tipicamente benigna a um corpo estranho, mas que podem conduzir a complicações clínicas mais severas, como a contração dos tecidos (GRIFFITH, 2002).

Os implantes são ferramentas da engenharia de tecidos, que consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos através do recrutamento de tecido do próprio paciente, que é associado em células e cultivado sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como compósitos (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc.). Os compósitos direcionam as células durante o processo de reparação ou regeneração dos tecidos. As células podem ser outra ferramenta da engenharia de tecidos, que podem ser conduzidas por moléculas bioativas, transferência de genes *ex-vivo* e outros fatores físicos na formação de novo tecido *in vitro*, para depois serem implantadas *in vivo*. Alternativamente, as células e as matrizes especiais, as quais podem conter moléculas bioativas tais como fatores de crescimento, podem ser combinadas *in vivo* para melhorar a reparação de tecidos (LANGER, 2003).

A Figura 2 ilustra o desenvolvimento idealizado da técnica da engenharia de tecidos (LLOYD-EVANS, 2004; BARBANTI, 2005).



**Figura 2:** Técnica da Engenharia de Tecido. Fonte: Barbanti, 2005.

## 2.4 Matrizes para Engenharia de Tecidos (Compósitos)

Os compósitos são uma associação de materiais para uma finalidade comum, buscando otimização de propriedades e têm sido usados no estímulo da formação de tecido ósseo e osteointegração (LEGEROS, 2008). A regeneração do tecido ósseo feita por compósitos cerâmicos mostrou-se como uma excelente alternativa em técnicas terapêuticas recentes. Além disso, o desenvolvimento de compósitos artificiais para reconstrução óssea oferece diversas vantagens distintas para estudos com células (ARINZEH *et al.*, 2005; UEMURA *et al.*, 2003).

Estes compósitos devem possuir unidades moleculares que possibilitem modificações e taxa controlada de biodegradação, não desenvolver toxicidade tóxica ou sistêmica, possuir propriedades para promover ou inibir interação célula-matriz e célula-célula, apresentar respostas imunes à inflamação. Além disso, deve ser um material de fácil produção, purificação ou aquisição e apresentar compatibilidade com substâncias químicas e soluções aquosas em condições fisiológicas (HOLMES, 1986).

Os compósitos devem ainda ser osteocondutores, promotores e integradores no que se refere à capacidade do enxerto conduzir o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras. Este compósito deve ser gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído pelo tecido ósseo neoformado. (SICCA *et al.*, 1990).

A osteoindução é a capacidade do enxerto induzir a diferenciação de células mesenquimais do leito receptor em osteoblastos, os quais promovem a formação de novo tecido ósseo. Este mecanismo está relacionado à atividade da *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), presente na matriz óssea (UEDA, 2003). A osteopromoção é a capacidade de formação óssea em tecidos que não sejam ósseos, tais como, tendões, ligamentos e tecido muscular (ZAFFE *et al.*, 2005). E por fim, a osteointegração, que é a capacidade do material substituto unir-se quimicamente sem a interposição de tecido fibroso. O enxerto é considerado osteogênico quando células ósseas vivas do próprio enxerto permanecem com capacidade de formação de novo tecido ósseo no leito receptor.

Considerado de forma integrada, tanto sob o aspecto da engenharia de materiais quanto ao tipo de tecido e reparo necessário, o primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa a seleção do suporte para as células. A seleção leva em consideração tanto o tipo e o local da lesão, como a sua extensão (BARBANTI, 2005). Esta estratégia permite que as células façam adesão ao suporte, proliferem e secretem matriz extracelular

específica do tecido ósseo, até obter-se um substituto artificial com características morfo-funcionais do tecido original, que pode finalmente ser transplantado para tratar o defeito em causa. Para que uma estratégia deste tipo seja bem sucedida, pelo menos três componentes fundamentais devem ser cuidadosamente estudados: o material de suporte (compósito), as células e o sistema de cultura *in vitro* (HUTMACHER, 2000). Ainda, a estabilidade e degradabilidade de compósitos nos fluidos corporais são aspectos importantes do comportamento de materiais para aplicações em Engenharia de Tecidos (PEREIRA *et al.*, 2005).

Quando células ósseas se aderem a um substrato sólido, o seu comportamento e função dependem das propriedades do biomaterial. As características superficiais e topografia, a superfície química e tratamento, bem como as características de degradação do biomaterial afetam a viabilidade celular, adesão e expansão, mas também influenciam a adsorção de moléculas biológicas secretadas das células ósseas que podem formar uma matriz extracelular que, por sua vez, ativam receptores da superfície celular e proteínas intracelulares envolvidas na transdução de sinais. Outro aspecto importante da implicação da interface célula-biomaterial na mecanotransdução óssea é a capacidade do biomaterial para adsorver biomoléculas secretadas pelas células ósseas ou de ser modificado de forma que estas biomoléculas farão parte da superfície do biomaterial (SIKAVITSAS; TEMENOF; MIKOS, 2001).

## **2.5 Biomateriais**

Os biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética que são utilizadas, de forma transitória ou permanente, como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo humano (CLINICAL APPLICATIONS OF BIOMATERIALS, 1982). Atualmente, o uso de biomateriais tem se tornado uma prática bastante empregada em diversas especialidades médicas e vários fatores têm incentivado o desenvolvimento de novos materiais com propriedades mais aprimoradas e adequadas à aplicação do implante e que executem sua função com êxito pelo período de tempo desejado. Dentre esses fatores, podem ser citadas a necessidade de se reduzir o número de cirurgias de revisão destinadas a substituir implantes danificados, o aumento da expectativa de vida da população e o aumento do número de acidentes traumáticos que implicam na substituição total ou parcial de tecidos.

Existem diversos tipos de dispositivos que podem ser classificados em: bioinertes; biodegradáveis e não biodegradáveis; dispositivos injetáveis; bioadesivos e compósitos, dependendo do material envolvido na sua concepção (MEDLICOTT *et al.*, 1994). Os materiais bioabsorvíveis são projetados para, após certo período de tempo em contato com o tecido vivo, serem consumidos lentamente pelo organismo, dando lugar ao tecido recuperado. Os materiais bioativos permitem uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo, possibilitando a formação de uma ligação de natureza química entre o tecido e o próprio material. Neste caso, o tecido é capaz de interagir intimamente com o material, depositando-se diretamente sobre a superfície do mesmo sem a intervenção da camada de tecido fibroso.

Dispositivos que não são biodegradáveis possuem a vantagem de permitir o controle do tempo de exposição do ambiente da bolsa periodontal ao fármaco. Entretanto, a principal limitação desse tipo de dispositivo é a necessidade de remoção do mesmo após o período de tratamento e vários problemas têm sido associados a esse procedimento (MEDLICOTT *et al.*, 1994). Normalmente, é necessária competência técnica para assegurar a retirada completa do dispositivo vazio, devido à possibilidade do aparecimento de efeitos indesejáveis, tais como inflamação do tecido local, resultantes do reconhecimento pelo sistema imune de um corpo estranho (fragmentos). Além disso, a remoção do dispositivo é acompanhada por um rápido declínio na concentração antibacteriana do fármaco (TONETTI *et al.*, 1998), o qual está frequentemente associado com recolonização da bolsa periodontal. Por outro lado, os dispositivos biodegradáveis possuem a grande vantagem de o paciente necessitar de apenas uma visita ao dentista para a inserção do dispositivo, que não precisa ser retirado, havendo diminuição das visitas clínicas e assegurando melhor adesão do paciente ao tratamento. Um número crescente de sistemas biodegradáveis tem sido desenvolvido com o objetivo de proporcionar liberação prolongada e/ou controlada de antimicrobianos, em concentração adequada.

Um biomaterial ideal deveria induzir uma rápida, previsível e controlada cicatrização dos tecidos hospedeiros (OLIVEIRA; NANJI, 2004). Os biomateriais podem ser usados para implantação permanente no corpo humano ou como um suporte temporário de células e tecidos. Em ambos os casos, a superfície desses materiais deve prover sinais químicos e físicos que guiem a diferenciação e agrupamento de células para formarem os novos tecidos (DIENER, 2005). Segundo Tengvall e Lundström (1992), alguns pré-requisitos são desejáveis para que um biomaterial seja aplicado em tecidos duros (ossos e dentes) e moles (tecido conjuntivo, epitelial, mucosa) como:

- Biocompatibilidade, que significa uma menor toxicidade intrínseca do material, baixa reatividade com macromoléculas, indução de resposta inflamatória ao longo do tempo e imunogenicidade;
- Biofuncionalidade, por exemplo, mecânica, que é diferente para osso, tecido mole ou próteses vasculares;
- Textura de superfície compatível com a adesão celular;
- Resistência à corrosão, para manter as propriedades mecânicas e impedir a degradação do material frente aos fluidos corporais, se for o objetivo do biomaterial;
- Bioadesividade, química, eletrostática e mecânica, com o intuito de promover uma ligação entre a órtese e o tecido adjacente, combinando um período apropriado de cicatrização, evitando uma encapsulação fibrosa do implante;
- Prevenir uma adesão bacteriana e/ou facilitar sua morte;
- Baixo custo e facilidade no processamento também são desejáveis.

O critério de seleção de biomateriais é baseado principalmente na aplicação a que se destinam. Em indicações ortopédicas e odontológicas, os materiais são componentes de implantes estruturais ou são usados para reparar defeitos ósseos. A escolha de um material para ser utilizado como biomaterial passa, necessariamente, pela análise de um conjunto de requisitos. Assim, um material apto a ingressar na classe de biomateriais deve apresentar biocompatibilidade e biofuncionalidade (PRADO DA SILVA, 1999).

### ➤ **Biocompatibilidade e Biofuncionalidade**

Entende-se por biocompatibilidade a capacidade de um material desempenhar uma aplicação específica, com uma resposta apropriada do organismo receptor e é principalmente controlada pelas características da superfície do material (WILLIAMS, 1987). A biofuncionalidade está associada às propriedades mecânicas (características da estrutura do material) e outras que estes materiais devem possuir para cumprir sua função com êxito e pelo tempo desejado. No entanto, os requisitos de biocompatibilidade e biofuncionalidade são raramente encontrados em um único material. Diversos estudos têm sido realizados a fim de, através do uso de compostos para recobrimentos, combinar a biocompatibilidade e as propriedades mecânicas de diversos materiais para obtenção de dispositivos mais adequados para aplicação biológica.



Conforme o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o teste de citotoxicidade *in vitro* deve ser o primeiro teste a ser realizado para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Entende-se por citotoxicidade a capacidade intrínseca do material de promover alteração metabólica de células em cultura, podendo esta culminar ou não em morte celular.

Os testes de citotoxicidade avaliam a resposta celular a um dado material quando este é inserido em um meio de cultura celular. O contato célula-material pode ser realizado de três formas: contato direto, contato indireto ou contato por extração. O contato direto é realizado colocando-se amostras do material a ser testado sobre uma monocamada celular ou semeando as células sobre a superfície das amostras. No contato indireto, utiliza-se uma camada intermediária entre a monocamada celular e as amostras a serem testadas. O material mais comumente utilizado como camada intermediária é o ágar e, neste caso, o teste é denominado teste de difusão sobre camada de ágar (“*agar overlay diffusion test*”). Já no contato por extração são utilizados veículos de extração para retirar amostras do material a ser testado. Os materiais mais utilizados como veículos de extração são: água destilada, solução salina, saliva artificial, fluido corporal simulado (*simulated body fluid/SBF*) e meio de cultura com soro (NAKAMURA *et al.*, 1995).

A biocompatibilidade dos materiais pode ser avaliada tanto por meio de testes *in vitro* quanto por testes *in vivo*. A realização destes testes tem como objetivo prever o comportamento dos materiais quando expostos a interações com células e fluidos do corpo humano. Embora a avaliação de como um material irá se comportar *in vivo* não possa ser completamente realizada através dos resultados de uma análise *in vitro*, esses testes permitem obter informações significativas em um período de tempo mais curto do que nos testes *in vivo*. Além disso, os testes *in vitro* apresentam algumas vantagens, tais como limitação do número de variáveis experimentais, a reprodutibilidade do processo e o baixo custo operacional para a sua realização (NAKAMURA *et al.*, 1995).

### ➤ **Bioatividade**

A bioatividade dos materiais está associada a sua capacidade de interagir com o tecido vivo e estimular processos físico-químicos dos sistemas biológicos capazes de permitir a integração do material no ambiente receptor. Quando um material bioativo é implantado no corpo humano, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorre na interface tecido-implante. Estas reações resultam em uma forte interação interfacial associada à formação de

uma camada de HA na superfície do implante (CAO; HENCH, 1996). A precipitação de fosfato de cálcio em soluções simuladoras de fluidos corpóreos (SBF) fornece um método para avaliar a bioatividade dos materiais *in vitro*, em decorrência do processo de tal precipitação ser similar ao de biomineralização. A HA é considerada a fase termodinamicamente mais estável em ambientes fisiológicos (XIONG; LENG, 2005).

## 2.6 Liberação de fármacos

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Sistema de liberação lenta, tardia ou retardada é um sistema onde o fármaco libera-se de forma mediata e com um tempo pré-fixado. Quando um fármaco é aplicado neste tipo de sistema, os níveis sanguíneos se mantêm dentro da faixa terapêutica durante um intervalo de tempo maior, assim é mais eficaz do que as formas convencionais. O nível de efeito descreve um platô ao longo do tempo na dose terapêutica que diminui lentamente. Os implantes representam os SLFs destinados à inserção em tecidos ou órgãos. Entre os anos 60 e 80, foram desenvolvidos os primeiros sistemas implantáveis para liberação de fármacos.

Os sistemas de liberação, frequentemente descritos como “*drug delivery systems*”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (LANGER, 1990; MIRTH, 1987):

- 1 - Possibilita o controle e monitoramento dos níveis de fármaco no sítio de aplicação;
- 2 - Meio útil de liberar na cavidade oral um fármaco que não é absorvido no sistema gastrointestinal (por exemplo, clorexidina);
- 3 - Possibilita a obtenção de altas concentrações de fármaco no local a ser tratado até 100 vezes maiores, quando comparadas com os níveis plasmáticos após a administração sistêmica;
- 4 - Pode mascarar o sabor e odor desagradável de determinados fármacos e evitar o aparecimento de manchas nos dentes;
- 5 - Uso de agentes antimicrobianos que não permitem o uso sistêmico;
- 6 - Reduz o risco de resistência bacteriana em outras áreas do corpo;
- 7 - Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco em concentrações terapêuticas a partir da degradação da matriz;

- 8 - Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- 9 - Natureza e composição dos veículos variada e não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura);
- 10 - Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- 11 - Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- 12 - Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas;
- 13 - Quando são usadas as matrizes biodegradáveis para a liberação de fármacos, eliminam a necessidade de retirar o dispositivo de liberação;
- 14 - Maior adesão do paciente ao tratamento.

Desde que cada fármaco possua uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica. Os SLFs têm o objetivo de prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos, liberar a quantidade suficiente de fármaco no sítio alvo e manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado necessário para ser eficiente e preciso, utilizando-se de uma única dosagem (GHANDEHARI; FARREL, 2011). Para desenvolver diferentes formas de dosagem, materiais carreadores têm sido utilizados visando à proteção do princípio ativo e evitar a decomposição ou dissolução das moléculas de antibióticos e impedir efeitos indesejáveis das formulações. A diferença de concentração plasmática efetiva, em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser visualizada na Figura 3.



**Figura 3:** Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional x controlada.  
**Fonte:** Ghandehari, 2003.

Ao longo da fase de desenvolvimento de produtos nanotecnológicos é indicado empregar o procedimento de liberação *in vitro* para selecionar excipientes para as formulações, proporcionando uma atividade terapêutica adequada. Pode-se considerar que os estudos de liberação proporcionam dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os fármacos (SATO *et al.*, 2007).

Tanto a liberação imediata como a liberação sustentada têm sido relatadas para descrever o comportamento dos sistemas nanoestruturados. No caso dos produtos de aplicação tópica, ambas as características são interessantes: a liberação imediata pode ser útil para melhorar a penetração de uma substância e a liberação sustentada é importante para substâncias ativas potencialmente irritantes em concentrações elevadas ou que devam suprir a pele por um período prolongado de tempo. A liberação do fármaco depende da dessorção do fármaco da superfície das partículas, da difusão do ativo através da matriz, da difusão através da parede polimérica, da erosão da matriz polimérica ou da combinação dos processos de difusão e erosão (JENNING; SCHAFFER-KORTING; GOHLA, 2000).

## 2.7 Sistemas de encapsulamento de fármacos

A inclusão molecular é um método para melhorar as propriedades de um medicamento já existente, com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais, diminuir a concentração do medicamento e diminuir o número de aplicações de um determinado arsenal terapêutico e, dessa forma, obter maior adesão do paciente (RAJEWSKI; STELLA, 1996). Os principais sistemas transportadores usados para preparar estes sistemas são: as macromoléculas (albumina, anticorpos monoclonais, ciclodextrinas, dextrano, glicoproteínas), as células

(eritrócitos, linfócitos) e as vesiculares (liposomas, nanocápsulas, nanoesferas, sistemas de emulsão múltiplos) (LANGER; PEPPAS, 2003).

Particularmente, a ciência e a tecnologia do encapsulamento constituem um dos exemplos de como a aplicação de uma técnica em determinado campo pode ser estendida a outros (FILHO, 2011). A encapsulação é bastante utilizada nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética por permitir a proteção de substâncias lábeis e voláteis, o controle da liberação do fármaco, contribuindo para a melhoria na biodisponibilidade e redução da dose terapêutica e toxicidade.

Uma alternativa para mascarar propriedades físico-químicas, melhorar a interação fármaco/membrana e facilitar a absorção é fazer uso de polímeros para encapsulação de fármacos. A adsorção de polímeros aos fármacos é um fenômeno importante, pois pode alterar sua hidrofobicidade, facilitando sua redispersão em água, além de alterar o direcionamento a alvos específicos do organismo. Além disso, as ciclodextrinas podem ser empregadas em SLFs (CORTÉS, 1999).

#### ➤ **Ciclodextrinas (CD's)**

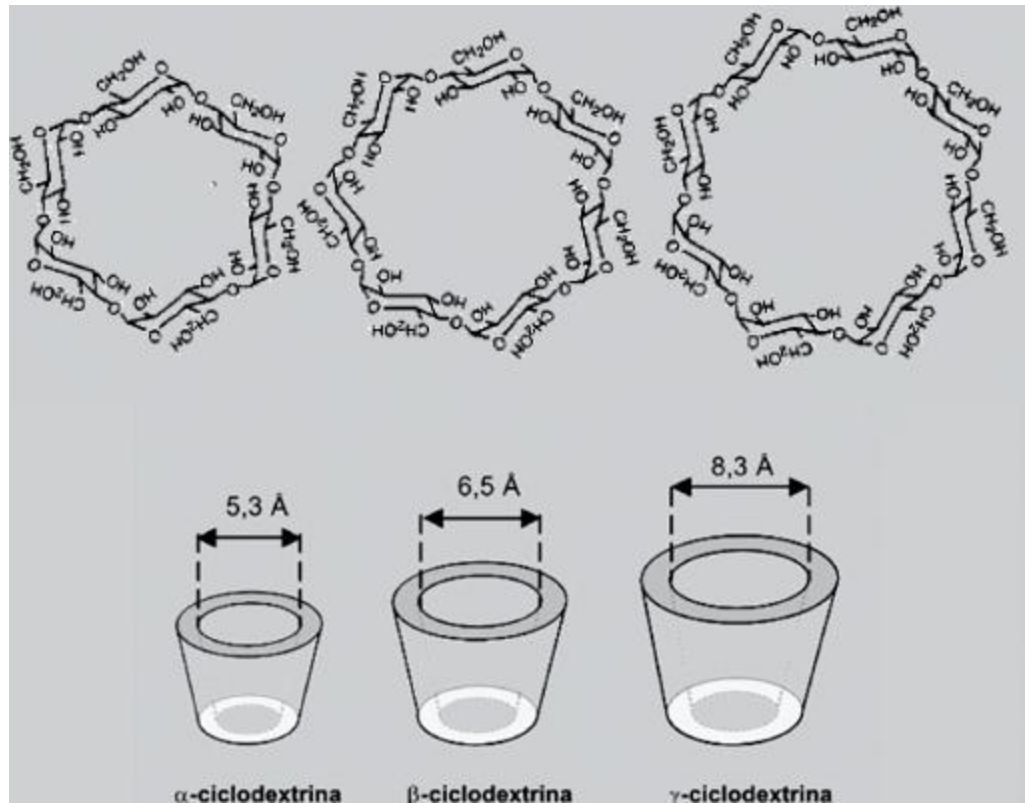
As ciclodextrinas (CD's) são oligossacarídeos cíclicos compostos de unidades de dextroses (glicoses) com formato cone truncado. Estruturalmente, as CD's apresentam duas regiões distintas: uma cavidade hidrofóbica e a parte externa hidrofílica devido a presença das hidroxilas livres na parte externa das CD's. Esse arranjo estrutural das moléculas de glicose nas CD's possibilita a utilização desses compostos como hospedeiros na formação de compostos de inclusão. A presença de uma cavidade hidrofóbica e de grupos hidroxilas livres na parte externa da molécula permite a "dissolução" em meio aquoso de compostos (hóspedes) de baixa solubilidade. Esse aspecto molecular tem possibilitado a utilização de ciclodextrinas em diferentes áreas da ciência e tecnologia, sendo o principal domínio de aplicação a indústria farmacêutica, em função da possibilidade de obtenção de novos fármacos com propriedades físicas e químicas diferentes.

As CD's naturais são:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Figura 4) têm vinte e um grupos hidroxila e todos esses grupos podem ser considerados pontos iniciais para modificações estruturais, e vários grupos funcionais têm sido introduzidos em sua estrutura. Seus derivados sintéticos, como a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina estão sendo estudados pela sua capacidade de formar compostos de inclusão com moléculas alojadas em sua estrutura (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998; YUE *et al.*, 2004). O encapsulamento de uma substância nestas moléculas pode levar à

mudança em propriedades da substância em questão: solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade e biodisponibilidade (HIRAYAMA *et al.*, 2002).

Tomando por base o diâmetro de sua cavidade, a  $\alpha$ -ciclodextrina tem um diâmetro pequeno para que possa incluir a maior parte dos princípios ativos, ao passo que a  $\beta$ -ciclodextrina e, melhor ainda, a gama-ciclodextrina sirvam a este propósito, uma vez que possuem cavidade de maior diâmetro quando comparadas à  $\alpha$ -ciclodextrina. Em relação à solubilidade em água, a menos solúvel é a  $\beta$ -ciclodextrina. A gama-ciclodextrina seria a mais interessante para o uso farmacêutico, mas seu alto custo torna difícil sua utilização em escala industrial. Os principais derivados de ciclodextrina são os obtidos com a  $\beta$ -ciclodextrina (SZEJTLI, 1988; MASSON *et al.*, 1998; LOFTSSON; MASSON, 2001).

As CD's apresentam menor velocidade de absorção e distribuição e excreção mais lenta pelos pulmões. Sua biotransformação pode ser comparada à do amido, contudo a velocidade é menor, o que se explica pelo fato de as ciclodextrinas não serem hidrolisadas pelas  $\beta$ -amilases. As CD's são excretadas pelas fezes em sua forma inalterada (SZEJTLI, 1988). A maior parte do fármaco incluído na CD é absorvida no estado ativo livre. Ciclodextrinas quimicamente modificadas aumentam a absorção das substâncias que interagem com elas, apresentando maior aplicabilidade, constituindo novos carreadores em liberação controlada para fármacos pouco solúveis em água, incluindo peptídeos e fármacos com estrutura proteica. O uso combinado dessas diferentes ciclodextrinas e seus aditivos farmacêuticos pode aperfeiçoar as propriedades do fármaco e sua eficácia terapêutica (HIRAYAMA *et al.*, 2002).



**Figura 4:** Representação esquemática da estrutura geral e tridimensional das Ciclodextrinas naturais  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .  
**Fonte:** Szejtli, 1998.

As principais vantagens do uso das CD's são: estrutura química bem definida, com locais de modificação ou conjugação química; a disponibilidade das CD's em diferentes tamanhos; são inócuas; possuem atividade farmacológica; aumento da solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade das moléculas hóspedes (fármacos); correção do odor e sabor desagradáveis do fármaco; redução da ação irritante do fármaco sobre as mucosas gástrica e intestinal, de efeitos adversos e de interações medicamentosas; a capacidade de formar compostos de inclusão, isto quer dizer, moléculas que resultam da soma de dois compostos, um dos quais (a molécula hóspede) está situado na cavidade da molécula sem significativamente modificar sua estrutura (RICCI; MARCHETTI, 2006).

As CD's podem formar complexos de inclusão com uma variedade notável de espécies iônicas e moleculares, dentre as quais muitos princípios ativos de importância fundamental na área farmacêutica. Os complexos de CD's por possuírem uma estrutura cristalina protegem a molécula hóspede, prevenindo a degradação natural dos princípios ativos e intensificando os seus efeitos. Estes complexos de inclusão apresentam propriedades novas e/ou melhoramento das já existentes (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998; SZEJTLI, 1988). Outra característica que as tornam extremamente interessantes é que elas podem formar um SLF e melhorar a liberação do fármaco (BORGMAN, 1986; CORTÉS, 1999). Ao encapsular

temporariamente os princípios ativos, as CD's permitem a “liberação controlada” de seu conteúdo, desta forma contribuindo para a melhora da biodisponibilidade.

## 2.8 Polímeros

A aplicação de materiais poliméricos para propósitos médicos cresce muito rapidamente e tem sido evidenciada em diversos campos, como engenharia de tecidos, implante de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia, reparo ósseo e outros.

Os polímeros podem ser: polímeros naturais, que são sempre biodegradáveis, como o colágeno, a celulose e a quitosana e são muito utilizados como matrizes em liberação de fármacos; polímeros naturais modificados, que frequentemente levam muito tempo para degradar, mas isto pode ser resolvido adicionando-se grupos polares às cadeias, que por serem mais lábeis podem diminuir o tempo de degradação; e polímeros sintéticos, que são também largamente utilizados.

Os polímeros sintéticos fazem parte do cotidiano e representam uma das classes de materiais mais versáteis que existem, apresentando inúmeras aplicações, entre as quais, no setor farmacêutico (AULTON, 2005; SWARBRICK, 2007; LIU; MAHESHWARI; KIICK, 2009). Dada a relevância dos polímeros na produção de medicamentos e cosméticos, e a importante contribuição que estes agregam ao desempenho das formulações, faz-se necessário conhecer um pouco mais sobre estes componentes.

Os polímeros ditos bioativos e biomiméticos também veem sendo pesquisados. Materiais biomiméticos são definidos como aqueles que podem interagir, seletivamente, com o microambiente biológico, mimetizando-o. Os polímeros bioativos são aqueles capazes de interagir com receptores celulares, via reconhecimento biológico, proporcionando respostas específicas (TADDEI, 2005).

Os polímeros terapêuticos são aqueles aos quais são atribuídas propriedades terapêuticas. O controle da funcionalização e arquitetura de polímeros sintéticos permite que estes se liguem a receptores específicos, presentes em patógenos ou células, promovendo reconhecimento ou comunicação, respectivamente, desencadeando a modulação de respostas inflamatórias, adesão celular ou transdução de sinais. Polímeros contendo fármacos enxertados também são, frequentemente, denominados terapêuticos (LIU; MAHESHWARI; KIICK, 2009).



### ➤ **Polímeros Biodegradáveis e Biorreabsorvíveis**

Polímeros biodegradáveis podem ser definidos como aqueles onde todos seus componentes orgânicos sofrem total biodegradação macromolecular *in vivo*, por ação de enzimas, micro-organismos ou células (BARBANTI, 2005; NAIR; LAURENCIN, 2007). O termo biodegradável é utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Os polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo (YU *et al.*, 2010).

Polímeros biorreabsorvíveis são materiais e dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*, ou seja, materiais que são totalmente eliminados pelas rotas metabólicas do organismo. São materiais que podem ser dissolvidos nos fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição da massa molecular. Por exemplo, este é o caso da lenta dissolução de implantes solúveis nos fluidos orgânicos. Um polímero pode ser biorreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas totalmente. O uso de polímeros biorreabsorvíveis como suporte nos biomateriais para testes *in vitro* ou *in vivo* vem tendo destaque na engenharia de tecidos (YU *et al.*, 2010).

Dentre os principais polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis atualmente bastante estudados e utilizados na área biomédica estão o poli (ácido lático) (PLA), o poli (ácido glicólico) (PGA), a policaprolactona (PCL) e o copolímero do ácido lático e glicólico, o poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA) (ORÉFICE, 2006).

### ➤ **Polímeros em sistemas de liberação de fármacos**

A seringa pode ser considerada o primeiro SLF da história. A partir dos anos 60, seringas hipodérmicas feitas de vidro, introduzidas em 1853, começaram a ser substituídas por seringas de plástico. Polímeros empregados na fabricação de seringas devem ser transparentes, apirogênicos, de elevada molhabilidade, com alta estabilidade química e de barreira e resistentes à esterilização por radiação gama ou óxido de etileno. Os materiais não devem causar coagulação e reações imunológicas quando em contato com tecidos e fluidos biológicos (ZELENESTKII, 1972).

Cerca de 40% das moléculas farmacologicamente ativas são rejeitadas, devido, principalmente, à reduzida solubilidade e biodisponibilidade. Para contornar tais problemas, polímeros biodegradáveis, capazes de modular a liberação do fármaco, surgiram como alternativas eficazes (QIU; BAE, 2006). Matrizes poliméricas biodegradáveis são, em geral, biocompatíveis e degradam *in vivo* em fragmentos menores que podem ser excretados pelo corpo. Estes produtos de degradação não devem ser tóxicos e não causar resposta inflamatória. Outra característica importante é a degradação ocorrer em um razoável período de tempo, requerido pela aplicação. Se a matriz polimérica não degrada dentro do corpo, ela deve ser cirurgicamente removida, implicando em um alto custo e risco para o paciente. Neste sentido, a síntese de polímeros biodegradáveis contribuiu para a melhoria destes sistemas, visto que eles não requerem remoção cirúrgica e apresentam poucos efeitos colaterais (PEPPES, 1987).

Sistemas poliméricos de liberação de fármacos são largamente utilizados 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. Os SLFs do tipo polimérico são classificados de acordo com vários mecanismos. Podem ser fundamentados em sistemas matriciais, reservatórios, gastrorretensivos, entre outros. Os sistemas controlados por difusão são os mais comuns (PEPPES, 1987; PEZZINI, 2007).

A cada dia são propostos novos sistemas baseados em polímeros sintéticos ou naturais, em hidrogéis, em polímeros biodegradáveis ou não, em polímeros bioadesivos, entre outros. Exemplos de SLF baseados em polímeros são os adesivos, os implantes, os dispositivos médicos e as formas farmacêuticas sólidas matriciais ou reservatórios. Os polímeros são incorporados em tais formas farmacêuticas visando diferentes funções, como mascarar odor e sabor desagradáveis, proteger o fármaco de condições agressivas do meio ambiente (luz e umidade) e do microambiente fisiológico, auxiliar no processo produtivo e para modular a liberação do fármaco (ALLEN; GENNARO, 2007).

### ➤ **Biorreabsorção**

É a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. O uso da palavra "biorreabsorção" é utilizado quando a eliminação é total. (LI, 1999; YU *et al.*, 2010).

### ➤ Biodegradação

O termo biodegradação descreve os processos envolvendo quebra de cadeia e modificações da massa molar e da solubilidade do polímero. Processos biológicos, físicos e químicos, podem atuar na biodegradação (HEALY, 1999; KOTWAL *et al.*, 2007). Vários fatores contribuem significativamente no tempo de degradação dos poliésteres, entre eles o tamanho e a forma do dispositivo, a cristalinidade e a massa molar do polímero (JALIL; NIXON, 1990). Embora a maioria dos polímeros seja susceptível de sofrer degradação sob certas condições, a grande maioria não sofre ataque no organismo, porque as condições fisiológicas não são particularmente agressivas à sua estrutura. Um tipo de degradação esperada no interior do organismo é a hidrólise, embora existam poucos polímeros com estruturas hidrolisáveis (RICCI; MARCHETTI, 2006).

A degradação *in vitro* ocorre essencialmente por erosão homogênea em dois estágios: o primeiro ocorre por cisão dos grupos ésteres da cadeia, acompanhada por perda da massa molecular, sendo sua duração dependente da massa molecular inicial. O segundo estágio começa na faixa de massa molecular abaixo de 15.000 Daltons e, além da perda em massa molecular, ocorre também perda da força de tensão. A degradação *in vitro* pode ser aumentada na presença da enzima lipase (PITT *et al.*, 1981).

A degradação *in vivo* é acelerada por esterases e por adsorção de proteínas plasmáticas. Esta adsorção faz com que as moléculas do polímero passem para uma forma expandida, aumentando a solubilidade e, conseqüentemente, acelerando a degradação. O processo de biodegradação e bioreabsorção do PCL são descritos na literatura como sendo uma sucessão de eventos. A biodegradabilidade do polímero é devida a susceptibilidade da ligação alifática éster à hidrólise, sendo os produtos gerados metabolizados pela via do ciclo do ácido tricarboxílico ou eliminados diretamente por excreção renal. Exposto aos fluidos aquosos do corpo, inicialmente o material sofre hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média (mM) e pela perda de suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração e à compressão (HUANG *et al.*, 2004).

A degradação da PCL em comparação com a de outros polímeros é lenta, tornando-o adequado para liberação de fármacos por longo período, estendendo-se por mais de um ano. A

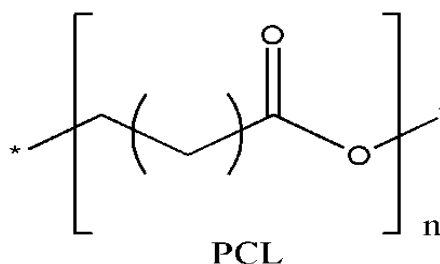
biodegradação desse polímero pode ser intensificada por copolímeros como o PLA, o PLGA e o PGA. A proposta do presente estudo foi colocar proporções iguais de PCL e PLGA em uma blenda contendo as propriedades vantajosas desses dois polímeros. O mecanismo da degradação *in vitro* dos polímeros bioreabsorvíveis tem sido avaliado nos últimos anos e demonstra ser um processo heterogêneo na extensão do material (Huang *et al.*, 2004).

Dentre os produtos da hidrólise das ligações ésteres, a presença de terminais ácidos catalisa a reação de degradação. É o chamado efeito autocatalítico dos PCL. 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, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada na parte central (SINHA *et al.*, 2004). Pode-se dizer que quanto maior a proporção de ácido lático no PLGA, maior a hidrofobicidade do copolímero e menor será a velocidade de degradação. A biodegradação deste polímero ocorre por erosão, por meio de clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando o ácido lático e glicólico. Estes ácidos, por serem metabólitos naturais do organismo, são incorporados ao ciclo de Krebs e eliminados na forma de gás carbônico e água (JALIL; NIXON, 1990).

A biodegradabilidade dos polímeros é um atributo explorado na modulação da liberação de fármacos, uma vez que é altamente desejável que um material introduzido no organismo seja eliminado depois de cumprida sua função, sem a necessidade de intervenções para sua retirada. Os produtos de degradação formados são metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou são excretados na urina (KOTWAL *et al.*, 2007). Polímeros de origem natural (biopolímeros) são passíveis de degradação *in vivo* por hidrólise ou ataque enzimático.

### ➤ **Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)**

A policaprolactona (PCL) (Figura 5) é um polímero biodegradável, biocompatível, hidrofóbico, da classe dos poliésteres alifáticos, aprovado para utilização em humanos (COOMBES *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2004), que tem sido estudado como polímero para sistemas de liberação de fármacos, pois além de não ser tóxico, possui também alta permeabilidade a vários fármacos. É obtido pela polimerização por abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona (ROSA *et al.*, 2002).



**Figura 5:** Estrutura química da policaprolactona.

A PCL é um polímero semicristalino, que possui temperatura de transição vítrea  $-60^{\circ}\text{C}$  e baixo ponto de fusão entre  $59$  e  $64^{\circ}\text{C}$ , dependendo da natureza dos cristais do PCL. O peso molecular médio das amostras de PCL pode variar de  $10000$  a  $42500$ , sendo classificado de acordo com o peso molecular. A PCL é solúvel à temperatura ambiente em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexano e 2-nitropropano; é pouco solúvel em acetona, 2-butano, acetato de etil, dimetilformamida e acetonitrila; e é insolúvel em água, álcool e éter dietil (SINHA *et al.*, 2004).

Dentre os polímeros utilizados, a PCL se destaca devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas e por ser um polímero semicristalino, possui degradação mais lenta quando comparado aos polímeros amorfos. Desse modo, é possível aumentar a eficácia de algumas substâncias em função do aumento da concentração das mesmas em sítios específicos e/ou a redução dos efeitos tóxicos em sítios não específicos (DAI *et al.*, 2009).

A PCL é um material mais resiliente que outros polímeros, com características melhores para reparação óssea por manter as propriedades físicas da matriz por pelo menos seis meses (CIAPETTI *et al.*, 2003; TADDEI *et al.*, 2005). Shantz, Chim e Whiteman (2007) usaram uma matriz tridimensional de PCL com liberação controlada de fator 1 derivado de células tronco (SDF-1) para engenharia de tecidos. Teoh *et al.* (2007) desenvolveram uma matriz tridimensional de arquitetura única para mediar uma favorável adesão, proliferação e diferenciação celular. A matriz bioativa de PCL-20%TCP foi usada no tratamento de defeitos ósseos de tamanhos críticos na mandíbula de cachorros e os resultados foram melhorados com a adição de PRP (plasma rico em plaquetas) à matriz. A PCL é usada em combinação com outros polímeros para a manipulação da taxa de liberação de fármacos, bem como para melhorar sua resistência, habilidade e adesão (SINHA *et al.*, 2004).

### ➤ Poli (ácido lático-co-glicólico) PLGA

O copolímero derivado do ácido lático e glicólico (PLGA), assim como a PCL, é um polímero biodegradável, biocompatível sintetizado por uma reação de condensação, através da abertura do anel dos dímeros cíclicos (ácido lático e/ou ácido glicólico), representados na Figura 6. Entretanto, apresenta maior velocidade de degradação se comparado a PCL (COOMBES *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2004).

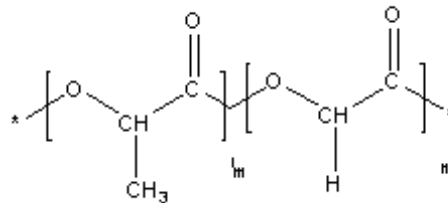


Figura 6: Representação estrutural do PLGA.

## 2.9 Biocerâmica: Fosfato de Cálcio Bifásico

Materiais cerâmicos usados com finalidade biológica são chamados biocerâmicas (BC). As BC à base de fosfato de cálcio são usadas para substituição óssea. Elas têm diferentes tipos de apresentação como grãos, blocos, compósitos, cimentos ou revestimentos em implantes ortopédicos e odontológicos. Podem ser classificadas em bioinertes, bioativas e biorreabsorvíveis (SHIKINAMI; OKUNO, 1999).

As BC podem ser usadas como andaimes na engenharia de tecidos para regeneração óssea ou dentinária (EL-GHANNAM, 2005). Os fosfatos de cálcio são similares à composição do osso e têm a propriedade de osteocondução e bioatividade. A osteocondução funciona como guia para o osso recém formando e a bioatividade é a ligação diretamente ao osso, formando uma única interface forte, promovendo a formação de uma camada de carbonato de hidroxiapatita, que atrai as proteínas que ligam as células, proliferando e diferenciando-se e formando novo osso (biomineralização).

*In vivo*, a biocerâmica de fosfato mostrou excelente biocompatibilidade: a estrutura micro-macro porosa, bifásica, ou seja, uma fase mais estável hidroxiapatita (HA) e outra mais solúvel tricálcio fosfato (TCP), apresentam melhores resultados como materiais de preenchimento ósseo (LIN *et al.*, 1998). Os fosfatos de cálcio podem ser usados também como suporte na engenharia de tecidos para regeneração óssea ou dentinária, em razão da sua

semelhança na composição e por formar uma única interface forte. Sua propriedade bioativa promove a formação de uma camada de carbonato de hidroxiapatita, que atrai proteínas aderindo células e, conseqüentemente, a proliferação e a diferenciação da matriz, resultando na biomineralização (osteoindução) (LEGEROS, 1988; 2008).

As biocerâmicas, bifásicas micro-macro porosas, são compostas por 35% de  $\beta$ -TCP (BCP), fase mais solúvel e 65% de HA, fase menos solúvel das biocerâmicas. Esse biomaterial apresenta macroporos intercomunicantes, na faixa de 50-400  $\mu\text{m}$ , que induzem uma resposta orgânica mais efetiva, forte ligação e crescimento tecidual intrínseco. Também apresenta microporos intercomunicantes, inclusive com os macroporos, na faixa de 1  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$  que aumentam o contato tecidual, a solubilidade e a capacidade de trocas com os líquidos orgânicos, além de poros intermediários de 10  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$ . Essa estrutura arquitetônica porosa está indicada como um eficaz e importante veículo condutor e liberador de fármacos ou outras substâncias por um período determinado, assim como sua topografia superficial permite atividade metabólica osteoblástica e expressão desejável dos fenótipos de neoformação tecidual (WYKROTA *et al.*, 1998). Os poros presentes na biocerâmica podem ser obtidos por métodos físicos ou químicos; eles interligam os macro e microporos semelhantes ao tecido ósseo favorecendo à osseointegração (LEGEROS *et al.*, 2003; LEGEROS, 2008).

A formação óssea pode acontecer diretamente à superfície do material, obtendo-se uma forte adesão ao tecido ósseo. Por outro lado, a osteoindução é considerada como uma propriedade dos materiais que induzem a formação de tecido ósseo. No passado, essa propriedade foi descrita somente com relação a materiais que continham fatores proteicos osteoindutivos, como as proteínas morfogenéticas (BMPs). Em princípio, qualquer material cerâmico que é suficientemente biocompatível e biodegradável pode ser usado como um implante em tecido vivo. O material cerâmico é capaz de prover uma superfície de fosfato de cálcio, *in vitro* ou *in vivo*, apresentando essa estrutura de superfície específica. É desejável que o material cerâmico seja capaz de adsorver os agentes biologicamente ativos, como fatores de crescimento, BMP's, etc., *in vitro* ou *in vivo*. Exemplos de materiais cerâmicos incluem fosfato de cálcio, biovidros e materiais que contêm cálcio, fosfato e/ou biovidros (RIPAMONTI; DUNEAS, 1996).

Entretanto, as hidroxiapatitas apresentam algumas limitações, como: 1) limitada capacidade de suportar carga de torção; 2) a pouco adequada tolerância de corte; e 3) uma reabsorção mínima quando as hidroxiapatitas puras, policristalinas são usadas. Por essas razões, o seu uso em regiões esqueléticas submetidas a altos esforços são limitadas, o que já

não acontece da mesma forma com as octacálcio fosfato bifásicas micro/macroporosas. Com isso, tem-se uma grande utilização nos reparos e/ou reconstruções das perdas ósseas em geral em odontologia e medicina (RIPAMONTI; DUNEAS, 1996).

## **2.10 Compósitos de PCL/PLGA/BCP**

Apesar das propriedades de biocompatibilidade e bioatividade de algumas cerâmicas, suas aplicações como matrizes para o crescimento ósseo são limitadas por possuírem baixa tenacidade, ou seja, baixa capacidade de deformação plástica. Uma forma de melhorar as propriedades mecânicas de cerâmicas e vidros é aumentar a tenacidade através da sua combinação com polímeros biodegradáveis, formando um compósito. Agregando as propriedades biológicas das cerâmicas com as propriedades mecânicas dos polímeros, compósitos têm sido desenvolvidos, na busca de uma matriz ideal. Vários trabalhos mostram a bioatividade das matrizes em bases poliméricas e biocerâmicas (CIAPETTI *et al.*, 2003; KIM; KNOWLES; KIM, 2004; PATARO *et al.*, 2007).

Muitos compósitos de polímero com BCP podem ser usados para conferir diferentes características e controlar suas propriedades como: biocompatibilidade; absorção de água para expor superfícies ou tecidos à liberação de fármacos tais como antibióticos, antiinflamatórios, hormônios e fatores de crescimento de tecidos; porcentagem de degradação e propriedades mecânicas, fazendo destes materiais desejáveis para aplicação médica (REIS *et al.*, 2007). O compósito polimérico e biocerâmico biodegradável serve para a proliferação das células ósseas (BLACK, 1991). Kim, Knowles e Kim (2004) estudaram compósitos formados por PCL em uma matriz cerâmica de hidroxiapatita e tetraciclina (TC) em diferentes proporções de cerâmica, polímero e fármaco. Eles constataram que a cinética de liberação e as propriedades mecânicas são dependentes da razão entre os constituintes do compósito.

## **2.11 Antibióticos e Doença Periodontal**

Os biofilmes bacterianos têm um importante impacto clínico, o que tem inspirado muitos pesquisadores a investigar os mecanismos reguladores, formação e dissolução destes sistemas com o objetivo principal de identificar as ações específicas dos agentes quimioterápicos (JEFFERSON, 2004). Os biofilmes, principalmente o oral, que é o mais complexo do organismo, apresentam propriedades dinâmicas intrínsecas, que são constantemente moduladas por fatores ambientais e biológicos, como a dieta e o sistema



imune do hospedeiro (GU *et al.*, 2005). A saúde bucal é muito importante para a manutenção da saúde global do organismo humano. No entanto, vários problemas, tais como neoplasias, disfunções glandulares, cáries e doença periodontal, acometem a cavidade oral.

O termo “doença periodontal” define várias doenças associadas com o periodonto (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996). A doença periodontal ou periodontite é causada pela infecção dos tecidos periodontais de suporte (ligamento periodontal, cemento, osso alveolar) decorrente do acúmulo de placa bacteriana, que pode resultar na perda progressiva de inserção conjuntiva e osso alveolar (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2000). O caráter destrutivo das doenças periodontais e sua progressão são dependentes da presença da placa bacteriana supra e subgingival. Em resposta a esta infecção, o hospedeiro representa um papel importante na patogenia da doença periodontal através da produção de enzimas e outros mediadores endógenos da resposta inflamatória, sendo responsável por grande parte da destruição tecidual observada através de parâmetros clínicos e histopatológicos. Afeta virtualmente a maioria da população mundial, sendo a maior fonte de perda de dente após os 25 anos de idade (LINDHE, 1999).

A bolsa periodontal pode ser definida pelo aprofundamento patológico do sulco gengival (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996) entre a gengiva e o dente, que causa retração da gengiva marginal e o desenvolvimento de um ambiente ideal para o crescimento, na superfície da raiz do dente e na camada mais externa do cemento, de bactérias anaeróbias e outros microrganismos responsáveis pela doença (SEYMOUR; AVIOLI; HEASMAN, 1992). Ocorre em função do acúmulo de componentes microbianos da placa dental e do cálculo, sendo limitada de um lado pelo dente e do outro pelo tecido gengival que se acumula no interior das áreas subgingivais do periodonto (MONBELLI *et al.*, 1996).

Ao se decidir pelo uso de antibióticos no tratamento periodontal, três fatores devem ser considerados: a classificação da doença periodontal, os prováveis microrganismos envolvidos e as possíveis condições sistêmicas do hospedeiro. Segundo Mylotte (1990), a escolha do antibiótico também deve levar em consideração o microrganismo causador, a sua suscetibilidade e a toxicidade comparada entre os diversos agentes a serem utilizados. Apesar disso, insucessos na terapia antimicrobiana podem ocorrer e podem estar relacionados à escolha inadequada do antibiótico, falha no cálculo da dosagem do mesmo, incapacidade do antibiótico penetrar nos sítios da infecção, fatores locais desfavoráveis, limitada vascularização local ou diminuição do fluxo sanguíneo, falta de colaboração do paciente e custo do tratamento (DAHL *et al.*, 2006).

Antibióticos podem ser bactericidas ou bacteriostáticos. Os principais antibióticos bacteriostáticos são: ácido nalidíxico, eritromicina, lincomicina, nitrofuranos e tetraciclina (TC). Os agentes antibacterianos são classificados nos seguintes grupos: inibidores da síntese da parede celular; antagonistas de folato; inibidores da síntese de proteínas; quinolônicos e antissépticos do trato urinário; fármacos antimicobactérias; antibióticos com ação predominante sobre protozoários. Os inibidores da síntese de proteínas podem ser divididos nos seguintes grupos de fármacos: aminoglicosídeos; TCs; macrolídeos; anfenicóis; lincosamidas (GOLUB *et al.*, 1994).

O nome tetraciclina está relacionado à existência de quatro anéis fusionados com um sistema de duplas ligações conjugadas que formam estes compostos, derivados de diversas espécies de *Streptomyces*. As substituições nestes anéis levam às variações farmacocinéticas. Os principais fármacos deste grupo são: TC, doxiciclina (DOX), minociclina (MIN). São bacteriostáticas, inibem a síntese proteica bacteriana, possuem largo espectro e apresentam-se eficazes contra Gram-positivos e Gram-negativos, cocos, aeróbios e anaeróbios e possuem a capacidade de interagir com tecidos dentários (GOLUB *et al.*, 1994).

A TC, a DOX e a MIN são frequentemente empregadas no tratamento de infecções clínicas humanas tanto na medicina quanto na odontologia. Na medicina, o uso da TC tem sido promissor no tratamento da osteoporose e osteoartrite avançada. Compostos modificados de TC podem inibir um colapso celular em casos de câncer e desordens médicas caracterizadas por excessiva atividade de metaloproteinase (MOMBELLI; SAMARANAYAKE, 2004).

As TCs têm sido largamente usadas como terapia adjuvante nas periodontites (PRESHAW, 2004). Embora inicialmente atribuída a suas propriedades antimicrobianas, a eficácia clínica das TCs na periodontite se deve à sua atividade anti-inflamatória intrínseca. Foi na década de 80 que Golub e colaboradores, em estudos *in vitro e in vivo*, verificaram que as TCs possuíam propriedade anti-inflamatória ao inibir a atividade das MMP por um mecanismo independente de sua eficácia antimicrobiana. As MMPs são uma família de endopeptidases, enzimas colagenolíticas (colagenases, gelatinases, estromelisinases), zinco-proteases dependentes, que estão envolvidas em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo embriogênese, remodelação do tecido, inflamação e tumores, destruição do colágeno, estrutura básica do periodonto, e podem facilitar a aderência de fibronectina à superfície radicular, o que facilita a regeneração de ligamento periodontal. Além disso, as MMPs desempenham um papel essencial na proliferação e diferenciação de

populações celulares dos tecidos conjuntivos, incluindo as osteoblásticas (CHOI; HAN; ROODMAN; ADAM, 2001).

Acredita-se que as TCs exercem seus efeitos anti-proteolíticos, tanto por inibição direta de MMPs quanto por inibição da sua expressão (de sua síntese). A inibição direta que exercem sobre este grupo de enzimas deve-se à sua capacidade de ligação aos íons metálicos ( $\text{Ca}_{+2}$ ,  $\text{Zn}_{+2}$ ) presentes nas MMP, uma vez que essas enzimas requerem íons  $\text{Zn}_{+2}$  no seu sítio ativo e íons  $\text{Ca}_{+2}$  para estabilizar a sua conformação molecular, que são necessários para a sua atividade de degradação da matriz. A eficácia de inibição da TC contra MMPs depende do tipo de TC, da MMP e do PH. Assim, ao inibirem diretamente a ação da collagenase, as TCs diminuem de forma indireta a taxa de reabsorção óssea, pois são potentes inibidores da função osteoclástica (VERNILLO *et al.*, 1994).

A inibição indireta das MMPs pelas TCs se dá pela inibição de proteases de serina. As MMPs podem inativar os inibidores de proteases de serina (SERPINs), e a inibição de MMP com DOX ou compostos derivados da TC (CMTs) preserva SERPINs, bloqueando, assim, a atividade de proteases de serina. Outra propriedade não antimicrobica das TCs bem caracterizada é a sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS em excesso são produzidos sob muitas condições patológicas e podem conduzir à destruição oxidativa ou disfunção de muitos constituintes celulares, pois são altamente reativos. As TCs eliminam os radicais livres, semelhante à ação da vitamina E. O anel de fenol das TCs é a chave para as capacidades de remoção de ROS destes compostos (GOLUB *et al.*, 1994).

Existe um crescente corpo de evidências sugerindo que as TCs possuem propriedades anti-apoptóticas. Num estudo de THOMPSON (1999), verificou-se que a DOX aumentou a sobrevivência de neurônios do hipocampo após isquemia cerebral em gerbils, e essa proteção foi associada com a inibição da expressão da caspase-1 por estabilização mitocondrial. Estudos demonstram que o bloqueio diretamente dentro da cascata apoptótica pode salvar miócitos e reduzir o tamanho do infarto.

Cada membro da família das TCs têm semelhanças e propriedades que as diferencia umas das outras, como meia vida e lipofilicidade. Em geral, há uma relação direta entre lipofilicidade e atividade contra bactérias Gram-positivas. A lipofilicidade da TC, DOX e MIN (minociclina) foi determinada como sendo 0,025; 0,600; e 1,1, respectivamente (COLAIZZI *et al.*, 1969). Lipofilicidade também afeta a distribuição nos tecidos. A DOX apresenta MIC ( $\text{IC}_{50}=15 \mu\text{M}$ ) menores que a MIN ( $\text{IC}_{50}=190 \mu\text{M}$ ) ou que as TCs ( $\text{IC}_{50}=350 \mu\text{M}$ ), indicando que seria necessária uma dose muito menor deste medicamento para inibir em 50% os níveis de collagenase de um determinado sítio quando comparadas com as doses

necessárias de MIN e TC, demonstrando que DOX é a mais potente, mais ativa em menores concentrações (BURNS *et al.*, 1989; GUIMARÃES, 1997). Além disso, as TCs modulam a resposta do hospeiro, a inibição de formação de radicais oxigenados, derivados de neutrófilos, a regulação da expressão de reguladores pró-inflamatórios e citocinas, o aumento da produção de colágeno, a ativação dos osteoblastos e da formação óssea (PRESHAW, 2004).

Recentemente, comprovou-se que a DOX inibe a atividade das MMPs, bem como a proliferação celular de células mononucleares e também diminui a resposta blastogênica de linfócitos em pacientes periodontais. Grenier *et al.* (2002) sugeriram que a DOX tem potencial para inibir proteinases bacterianas, as quais contribuem para degradação tecidual durante a periodontite.

A observação de que TCs modificadas, como a DOX, podem inibir a atividade de colagenases por um mecanismo independente de sua eficácia antimicrobiana, tem justificado estudos desse agente na periodontite experimental, especialmente a DOX, considerada a mais potente anti-colagenase das TCs. É considerada o inibidor mais potente e não seletivo de MMPs. A superioridade relativa da DOX como um inibidor de MMP é devido à sua maior afinidade para  $Zn^{2+}$  em comparação com TC ou MIN (BURNS *et al.*, 1989). Foi proposto que a DOX possa se ligar próximo ao  $Zn^{2+}$  no sítio catalítico e romper a ligação entre esse íon e o cálcio, bloqueando, assim, o sítio ativo e inibindo a atividade das MMPs. Isso pode decorrer da diminuição da estabilidade do RNAm para MMPs (PETERSON, 2004).

A DOX é o único inibidor de MMPs aprovado para uso clínico pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) para o tratamento de doenças periodontais em dose “subantimicrobiana”, ou seja, em doses que produzem concentrações plasmáticas menores do que as requeridas para sua ação antimicrobiana (LEE *et al.*, 2004). Além disso, o uso da DOX tem demonstrado efeitos benéficos no tratamento de outras doenças em que as MMPs desempenham papéis patológicos, tais como aneurisma aórtico abdominal, infarto agudo do miocárdio e câncer de colo. Castro *et al.* (2010) mostraram que a DOX pode inibir o remodelamento vascular induzido pela hipertensão arterial.

A liberação apropriada de um fármaco em função da dosagem é de importância crítica para sua eficácia. Para planejar a forma e dosagem mais apropriada, vários tipos de materiais carreadores estão sendo desenvolvidos para liberação da quantidade necessária do fármaco ao sítio por um período, obtendo eficiência e eficácia (HIRAYAMA *et al.*, 2002). O uso de antimicrobianos locais utilizando-se doses subantimicrobianas de DOX, associada à raspagem e alisamento radiculares, foi mais efetivo que somente os procedimentos mecânicos,

ressaltando que o período de exposição a estas doses pode ser maior, sem causar resistência dos microrganismos periodontopatogênicos (PRESHAW; HEFTI; BRADSHAW, 2005).

A capacidade da TC em concentrar-se em tecidos é bem conhecida. Os dentistas podem tirar vantagem da elevada concentração de DOX na saliva. Estudos demonstraram que SLF de antimicrobianos mantêm altas concentrações do fármaco nas bolsas periodontais por 10 dias. O uso de uma dose maior num período mais curto foi defendido por Goodson *et al.* (1991). Entretanto, alguns autores recomendaram baixas dosagens de DOX (BDD), isto é, subantimicrobianas (20 mg, duas vezes por dia), por um longo período, com intuito de inibir a ação das collagenases do hospedeiro. As BDD reduzem a perda de inserção e a atividade excessiva de collagenase no fluido gengival sem alterar a microbiota da cavidade oral (GOLUB *et al.*, 1994; PRESHAW, 2004). Desta forma, a inibição da atividade das MMPs seria então responsável pelas propriedades anti-colagenases protetoras das TCs e não pelos efeitos antimicrobianos.

O intervalo de concentração selecionada é de importância clínica. Estudos farmacocinéticos mostraram que, após absorção oral de 200 mg de DOX (dosagem terapêutica habitual), a concentração plasmática atingiu 3 µg/mL após 2 horas e foi mantida acima de 1 µg/mL por 8-12 horas. Níveis mais elevados foram encontrados no fluido crevicular gengival (FCG) (2 a 3 µg/mL), podendo atingir concentrações superiores a 10 µg/mL, ou seja, níveis mais elevados do que a mínima concentração inibitória (MIC) da maioria dos patógenos periodontais. Por outro lado, dosagem terapêutica de BDD resultou em pico de concentrações séricas de cerca de 0,8 µg/mL e permaneceu estável em torno de 0,48 µg/mL (WALKER *et al.*, 2000).

A habilidade da DOX de controlar a atividade da collagenase tem apontado um novo protocolo para a terapia periodontal (TP). Administrações orais de 5 a 20 mg/kg/dia de DOX durante 6 meses estão relacionadas com a redução da gravidade de danos aos tecidos periodontais. Quando associadas à TP, têm demonstrado melhoras nos parâmetros clínicos, sem evidências de resistência às tetraciclinas (PRESHAW, 2004). Nessa dose, a DOX produz níveis sanguíneos máximos de 0,2-0,3 µg/ml. Nesse esquema, não se altera a microbiota oral nem se observaram efeitos colaterais comumente observados com os antibióticos, como surgimento de microrganismos resistentes, possivelmente pelo fato de que as concentrações plasmáticas de DOX que se obtêm para eficácia antibiótica de 2 a 6 µg/ml não foram alcançadas com a dose estabelecida (MARTINDALE, 1999).

Usando-se um modelo de periodontite em ratos, observou-se que o tratamento com DOX, nas doses de 2,5, 5 ou 10 mg/kg/dia, durante 7 dias, reduziu de forma significativa a

perda óssea alveolar neste modelo. A redução na perda óssea foi acompanhada por redução no número de osteoclastos e preservação do cimento. Essa redução pode ser devido a um efeito direto da DOX sobre estas células, promovendo apoptose destas células (BETTANY *et al.*, 2000). Em estudos como os de Grevstad e Boe (1995), no qual a administração sistêmica de DOX em ratos retardou o recrutamento de osteoclastos no sítio da doença após o ato cirúrgico, resultando na inibição da destruição do tecido ósseo. Outro mecanismo modulador que poderia estar associado a este resultado é a inibição da atividade da colagenase demonstrada por Crout *et al.* (1996).

Foi também demonstrado que DOX aplicada localmente, onde se observa efeitos sistêmicos mínimos, apresentou efeitos benéficos sobre a osteogênese em cães submetidos à lesão óssea induzida mecanicamente e reduziu a produção de colagenase por osteoblastos e osteoclastos após cirurgia dental. Ratificando outros estudos, demonstrou-se que BDD são capazes de reduzir a perda óssea inflamatória e que esse efeito não está relacionado à sua atividade antimicrobiana, evitando, desta forma, o risco do surgimento de resistência bacteriana e minimizando os efeitos colaterais gastrintestinais geralmente associados com a administração prolongada de DOX. Além disso, a DOX pode inibir a degradação da cartilagem de forma que pode ser útil no tratamento da osteoartrite, forma comum de artrite associada com dor e incapacidade devido à degradação da cartilagem (BEZERRA *et al.*, 2002).

Antibióticos de tetraciclina, incluindo DOX, têm sido utilizados para tratar doenças de reabsorção óssea, em parte por causa de sua atividade para suprimir osteoclastogênese induzida pelo receptor ativador do fator nuclear Kappa B ligante (RANKL). Estudos anteriores relataram que a DOX é capaz de diminuir a perda óssea e aumentar a formação de osso (WILLIAMS *et al.*, 1996). No entanto, a seu mecanismo inibitório preciso permanecia obscuro.

Pela primeira vez, Franco em 2011, em um estudo realizado *in vitro* e *in vivo*, confirmaram que a DOX inibe a indução da RANKL na osteoclastogênese, por seu efeito inibitório sobre a atividade da enzima MMP-9, sem afetar a expressão da proteína MMP9, independente da cascata de sinalização MAPK-NFATc1. Estes autores confirmaram que a inibição de MMP-9 por esses fármacos (TCs ou CMTs) é a única responsável pela repressão de RANKL na osteogênese. A MMP-9 funciona como gene efetor da expressão dos osteoclastos e, como tal, funciona como um regulador da osteogênese. Eles confirmaram também que apenas os compostos da família das TCs, incluindo DOX, possuem efeito inibitório sobre RANKL, que a DOX não afeta a homeostase do metabolismo ósseo

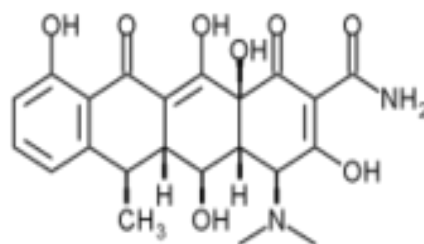
sistêmico. Em resumo, estes resultados indicaram: 1) o efeito não antibiótico e antiinflamatório da DOX são a partir da inibição da MMP; 2) MMP-9 é induzida durante a fase de diferenciação de osteoclastos e 3) DOX pode suprimir a expressão da fase final dos genes da osteoclastogênese (mais de 48 h da estimulação RANKL), isto é, TRAP e catepsina K, moléculas necessárias para a reabsorção do osso (ONG, 2002).

A diferenciação de osteoclastos a partir de células precursoras de osteoclastos e a ativação da reabsorção óssea, função dos osteoclastos maduros, são eventos que necessitam de RANKL e seu fator M-CSF para induzir a expressão de RANK, um receptor para RANK. A Ligação do RANKL ao RANK leva ao recrutamento do fator TNF de receptor para o domínio citoplasmático de RANK, o qual, por sua vez, resulta na ativação de cascatas de sinalização distintas mediada por quinases ativadas por mitógenos (proteína MAPKs) (LORENZO *et al.*, 2008).

Bettany *et al.* (2000) demonstraram que os TCs e CMTs podem induzir diretamente a apoptose celular em osteoclastos. Além disso, Holmes *et al.* (2004) revelaram que a DOX e CMTs podem regular a osteoclastogênese *in vitro* a partir de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com receptor ativador de NF- $\kappa$ B ligante (RANKL) e colônia de macrófagos estimulando o fator (M-CSF). Esta evidência sugere que acumular TCs ou CMTs pode suprimir a reabsorção óssea através da inibição não só da atividade lítica da enzima de osteoclastos (isto é, a inibição da atividade MMPs), mas também a sua diferenciação em RANKL.

### ➤ **Doxiciclina**

A DOX (HCl hemietanolato hemiidratada), cujo nome comum é cloridrato de doxiciclina e a denominação científica é a-6-deoxy-5-hydroxytetracycline monohydrate, tem aspecto de pó amarelo cristalino, é facilmente solúvel em água e metanol, pouco solúvel em etanol, praticamente insolúvel em éter, dissolve em soluções de hidróxidos alcalinos e carbonatos. A DOX apresenta elevado grau de lipossolubilidade, pouca afinidade de ligação ao cálcio e é altamente estável no soro humano. É um antibiótico de amplo espectro, derivado sintético da TC, subgrupo cloranfenicol. A sua fórmula química é:  $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot H_2O$  (TOLEDO *et al.*, 2007).



**Figura 7:** Estrutura química da doxicilina.

A DOX possui, na sua estrutura, grupos amins, carbonila e hidroxila, o que lhe garante alta polaridade (TOLEDO *et al.*, 2007). Devido a sua estrutura polar, a DOX tem mais afinidade com a solução do que com a membrana, por isso há maior liberação do fármaco para o sistema. Como a DOX é lipofílica e excretada pela bile, sujeita ao ciclo entero-hepático, apresenta longa duração (entre 11 a 23 horas em pacientes normais), atinge os vários órgãos e fluidos do organismo, incluindo o microambiente ósseo. A TC possui ação curta (entre 8 a 9 horas em pacientes normais) (GUIMARÃES, 1997).

Quanto à sua farmacocinética, a DOX administrada por via oral é completamente absorvida e se liga em grau variável às proteínas plasmáticas. O pico médio dos níveis séricos foi de 2-6 µg/ml após 2 horas, diminuindo para 1,45 µg/ml após 18h. Oferece absorção segura e tempo prolongado de meia-vida. Esta propriedade permite frequência de administração menor. A DOX se difunde por todo organismo e atinge concentrações elevadas nos rins, fígado, baço e pulmão e excretadas na urina e fezes em altas concentrações sob a forma biologicamente ativa. A excreção renal de DOX é de aproximadamente 40% após 72 horas em indivíduos com a função renal normal (clearance de creatinina de 75 ml/min). Esta porcentagem pode ser reduzida para um valor de até 1-5% após 72 horas em indivíduos com insuficiência renal grave (TOLEDO *et al.*, 2007).

Ao contrário de outras TCs, a absorção da DOX não é alterada pela ingestão de alimentos ou leite. Apresenta a vantagem de ser indicada a pacientes com distúrbios renais, pois não se acumula no organismo. Quando comparada a outras TCs, a DOX é absorvida e excretada mais lentamente sendo sua ação mais prolongada. As concentrações obtidas no pulmão são quase duas vezes superiores à concentração plasmática, o que demonstra a ação do fármaco no órgão alvo. Sua boa biodisponibilidade permite que baixas concentrações no plasma sejam suficientes para se atingir a MIC para a maioria das bactérias de destino. Sua excreção, sob forma inalterada, ocorre pelos sistemas urinário e digestivo (TOLEDO *et al.*, 2007).



É fundamentalmente bacteriostática e acredita-se que ela exerça ação antimicrobiana pela inibição da síntese proteica. Age no metabolismo de bactérias impedindo sua nutrição, suscetibilidade adequada ao fármaco, desenvolvimento e reprodução. Sugere-se, ainda, ação na membrana citoplasmática bacteriana. Sua propriedade lipossolúvel facilita-lhe a difusão através da membrana celular dos microrganismos susceptíveis, permitindo que ela se ligue à subunidade 30S do ribossomo, inibindo a formação do complexo t-RNA-aminoacil-RNA-ribossomo e impedindo, conseqüentemente, a translação bacteriana (TOLEDO *et al.*, 2007).

A DOX é ativa contra uma ampla variedade de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. É indicada em infecções causadas principalmente por microrganismos: *Rickettsia*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Plasmodium falciparum*, *Campylobacter* e outros. Quando a penicilina é contraindicada, a DOX é um fármaco alternativo no tratamento de infecções causadas por *Treponema pallidum*, *Clostridium sp*, *Actinomyces sp* e outros. É útil como adjuvante na amebíase intestinal aguda, na acne severa e na conjuntivite de inclusão. É indicada na prevenção da leptospirose, no tratamento e prevenção seletiva da cólera, na prevenção da diarreia de viajante e da malária (TOLEDO *et al.*, 2007).

Dentre as reações adversas: não deve ser utilizada durante a gravidez por atravessar a barreira placentária e ser encontrada nos tecidos fetais e no leite materno em doses relativamente altas, podendo provocar reações adversas graves no feto e lactentes. Quanto às interações medicamentosas, o uso concomitante de 200 mg de DOX com álcool, barbitúricos, carbamazepina e fenitoína pode causar a diminuição da sua meia-vida. Deve-se evitar o uso de DOX e de penicilina ao mesmo tempo e o uso concomitante de DOX e contraceptivos orais pode reduzir a eficácia destes últimos (TOLEDO *et al.*, 2007).

## **2.12 Sistemas de liberação controlada de antimicrobianos**

A terapia utilizada no tratamento para conter a infecção localizada ou generalizada da doença periodontal tradicional constitui os meios mecânicos ou químicos. Os meios mecânicos de controle da placa supragengival incluem o uso do fio dental e escova dentária, ambos praticados pelo paciente, e o controle do biofilme subgengival, através de um meticuloso desbridamento periódico da bolsa (curetagem), raspagem e aplainamento radicular (RAR), realizados pelo dentista (LINDHE, 1999).

Segundo Badersten *et al.* (1984), o tratamento mecânico deve ser considerado o padrão ouro e um pré-requisito para o controle das infecções periodontais, na maioria dos

casos é suficiente para reestabelecer a saúde periodontal. Os meios químicos incluem a administração de fármacos seja por via sistêmica, irrigação subgingival ou por meios de bochechos com colutórios ou enxaguatórios bucais.

Entretanto, às vezes, o objetivo desses tratamentos não é alcançado visto que algumas variáveis podem estar presentes e relacionadas a falhas na eliminação dos patógenos. Devido à: dificuldade de acesso dos raspadores periodontais à base da bolsa periodontal, visto que na periodontite grave a profundidade da bolsa excede 5 mm, podendo chegar a 12 mm (MEDLICOTT *et al.*, 1994); variações anatômicas radiculares; fatores técnicos e sistêmicos modificadores da resposta do hospedeiro; formação de nichos de microrganismos entre as raízes dentais dificultando e/ou impossibilitando o acesso durante os procedimentos mecânicos e a capacidade de alguns destes em adentrarem nos tecidos conjuntivos e recolonizar as superfícies dentárias após a terapia, principalmente quando combinado com um controle de placa supragengival deficiente (KINANE; RADVAR, 1999). Essas limitações da terapêutica permitem que bolsas refratárias ao tratamento se reativem, fato que tem levado cientistas a procurar solução alternativa ao tratamento medicamentoso com repetidas administrações de agentes antimicrobianos de ação sistêmica ou local (SLOTS; RAMS, 1992).

A administração sistêmica ou local de agentes antimicrobianos constitui uma alternativa para complementar a terapia mecânica convencional, no intuito de atuar sobre a microbiota patogênica, assim como na modulação da resposta inflamatória do hospedeiro, limitando a destruição tecidual. Ambas as formas apresentam vantagens e desvantagens. A via sistêmica tem a capacidade de alcançar sítios dentais e não dentais e, além de atuar sobre as bactérias que invadem os tecidos, atua também de forma direta e indireta na resposta do hospedeiro (SEYMOUR; AVIOLI; HEASMAN, 1992).

Na administração sistêmica de antimicrobianos as concentrações terapêuticas são alcançadas no sítio da infecção por curtos períodos de tempo após uma dose simples (MEDLICOTT *et al.*, 1994). No entanto, ela não pode ser utilizada por um longo período de tempo. Muitos efeitos colaterais indesejáveis podem surgir, tais como náuseas, vômito, diarreia, gastrite, úlceras, outros transtornos digestivos, alergias e desenvolvimento de resistência pelos microrganismos e baixas concentrações no sítio da doença, aumentando a razão risco/benefício (CIANCIO *et al.*, 1992).

O tempo de permanência de soluções de agentes antibacterianos diretamente no interior da bolsa periodontal é curto, mesmo utilizando dispositivos de irrigação adequados, portanto, administrações frequentes são requeridas para a manutenção das concentrações na

bolsa periodontal (MEDLICOTT *et al.*, 1994). Dessa maneira, a aderência ao tratamento por parte do paciente é um fator limitante para assegurar a eficácia clínica do tratamento.

Devido a todos esses problemas e para minimizar a ocorrência dos insucessos terapêuticos, a adição de antimicrobianos liberados no interior da bolsa periodontal pode reduzir microrganismos patogênicos ou modular a resposta inflamatória e dessa forma limitar a destruição tecidual. A bolsa periodontal é um reservatório natural que permite a inserção de um dispositivo de liberação, sendo que os benefícios que podem ser adquiridos baseiam-se na liberação do agente terapêutico no local a ser tratado e a manutenção dos níveis adequados de fármaco por um período estabelecido de tempo (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996). Portanto, uma possível aplicação para SLF de antimicrobianos seria na periodontia. O uso desses agentes antimicrobianos deve ser considerado como um adjunto importante aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR) e em condições clínicas específicas.

Os mecanismos de liberação local podem ser divididos em liberação sustentada ou controlada, de acordo com a duração de liberação do medicamento (LANGER, 1990). Para que o medicamento se torne efetivo contra microrganismos periodontopatogênicos, é necessário que o mesmo atinja o interior da bolsa, mantenha sua concentração e permaneça por um período de tempo suficiente para sua ação. Um mecanismo de liberação local consiste de um reservatório do fármaco e de um elemento limitante que controla o padrão de liberação do medicamento. O objetivo é manter concentrações efetivas dos agentes quimioterápicos no sítio por longos períodos. Dessa forma, antimicrobianos de uso local podem ter um papel importante em sítios que responderam pobremente à terapia mecânica.

Goodson *et al.* (1991) foram os primeiros a desenvolver um sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal (SLIBP), sugerindo que a utilização de um supositório de liberação controlada de um fármaco colocado na bolsa poderia ser altamente efetiva para a administração de agentes antibacterianos na terapia periodontal (TP). A liberação de fármaco intrabolsa periodontal é uma categoria de liberação local na cavidade oral (MEDLICOTT *et al.*, 1994). Desde então, um número crescente de sistemas biodegradáveis ou não têm sido desenvolvidos com o objetivo de proporcionar liberação prolongada e controlada de antimicrobianos, em concentração adequada, no interior da bolsa periodontal.

A administração do fármaco no interior da bolsa periodontal é uma alternativa para minimizar a distribuição deste no organismo e, por conseguinte, aumentar a sua concentração no local a ser tratado e diminuir os efeitos colaterais e citotóxicos, menor número de aplicações e, em casos de dispositivos biodegradáveis, a vantagem de não ter que retirá-los. A

liberação lenta e estável controla e disponibiliza elevadas concentrações do fármaco no interior da bolsa periodontal, em níveis terapêuticos, por diversos dias para suprimir microrganismos periodontopatogênicos. Além disso, esses dispositivos têm se mostrado biocompatíveis, atenuando os efeitos tóxicos e colaterais dos fármacos. A aplicação desses sistemas aumenta a eficácia dos agentes antimicrobianos quando associadas ao tratamento periodontal mecânico (LANGER; PEPPAS, 2003).

A produção de dispositivos mais próximos das condições ideais, bem como conhecer os mecanismos pelo qual esses agentes interagem com as células do organismo, continua sendo objetivo farmacológico. O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos ou o aprimoramento dos já existentes é um desafio, em especial aqueles destinados ao tratamento da bolsa periodontal devido às restrições impostas pela anatomofisiologia do local. Estudos têm demonstrado a eficácia e vantagens de SLFs de antimicrobianos em relação aos fármacos tradicionais (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996):

1. Os antimicrobianos de uso local são recursos coadjuvantes na terapia mecânica e/ou cirúrgica da doença periodontal;
2. Apresenta propriedade de manutenção da sua concentração por um período de tempo maior, diminuindo o risco de efeitos colaterais dos fármacos, bem como a possibilidade de conduzir à resistência bacteriana.

A TC é o fármaco mais empregado no sistema de liberação local, apresentando melhores resultados clínicos. No desenvolvimento de SLBP, devem ser consideradas as características anatomo-fisiológicas da bolsa periodontal, pois ela é naturalmente irrigada pelo fluido crevicular gengival. Em pessoas com doença periodontal, a taxa média de fluxo do fluido crevicular em sítios individuais está aumentada. Geralmente, um fluxo alto resultará em uma difusão mais rápida do fármaco do dispositivo de liberação. Assim, a taxa de liberação deve ser mais alta no estágio inicial da liberação, para que seja atingido o nível terapêutico o mais rápido possível, mantendo-se durante todo o período de tratamento (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996).

Outro parâmetro a ser considerado é a absorção do fármaco. Um fármaco com baixa capacidade de penetração através dos tecidos da mucosa pode alcançar altas concentrações e prolongar esses níveis elevados no interior da bolsa. O tamanho e a profundidade da bolsa são também importantes na formulação do sistema. Como a profundidade média de uma bolsa com periodontite grave é de 5 a 12 mm, o dispositivo não pode ser grande. Além disso, o dispositivo (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996):

- Deve ser de fácil aplicação por parte do profissional (dentista);

- Não deve ser volumoso e nem causar desconforto ou irritação;
- Deve possuir características físicas que facilitem a inserção rápida dentro da bolsa, causando o mínimo de dor ao paciente;
- Não deve causar interferência na higiene oral diária do paciente;
- Não pode gerar problema no padrão de dieta do paciente.

Há três décadas, vários sistemas reservatórios ou matriciais foram investigados. Um SLIBP pode ser classificado em biodegradável e não biodegradável, dependendo do material envolvido na sua concepção. Dispositivos que não são biodegradáveis possuem a vantagem de permitir o controle do tempo de exposição do ambiente da bolsa ao fármaco. Entretanto, a principal limitação desse tipo de dispositivo é a necessidade de competência técnica para assegurar a retirada completa do dispositivo vazio após o período de tratamento, devido à possibilidade de inflamação do tecido local, resultante do reconhecimento pelo sistema imune de corpo estranho (fragmentos) (MEDLICOTT *et al.*, 1994).

Por outro lado, os dispositivos biodegradáveis possuem a grande vantagem de o paciente necessitar de apenas uma visita ao dentista para a inserção do dispositivo, que não precisa ser retirado, assegurando melhor adesão do paciente ao tratamento. Muitos polímeros são capazes de inibir enzimas proetólíticas e/ou modular a permeabilidade tecidual (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996). Um polímero ideal para um SLIBP deve possuir as seguintes características:

- Seus produtos de degradação devem ser atóxicos e não absorvíveis através do tecido da bolsa;
- Não deve ser irritante ou causar inflamação;
- Preferencialmente formar ligação não-covalente com a mucina das superfícies epiteliais;
- Deve aderir rapidamente no tecido úmido;
- Deve permitir a fácil incorporação do fármaco e não oferecer impedimento à sua liberação;
- Deve permitir a flexibilidade da forma farmacêutica, facilitando a inserção na bolsa com o menor desconforto possível;
- Deve garantir estabilidade da forma farmacêutica durante o tempo de estocagem;

- O custo não deve ser alto, permitindo a produção de dispositivos viáveis economicamente.

### 2.13 Ensaio *in vitro* em cultura de células osteoblásticas

Como a variedade de produtos a serem avaliados tem crescido muito, há necessidade de se estudar novas metodologias e escolher entre elas a que possa responder melhor quanto à presença de possíveis elementos tóxicos. A biocompatibilidade dos materiais odontológicos tem sido motivo de grande interesse na atualidade. Vários são os materiais que permanecem em contato com os tecidos orgânicos por períodos prolongados (WIGG *et al.*, 1997). A biocompatibilidade dos materiais pode ser avaliada por testes *in vitro* e *in vivo*.

Os testes *in vitro* podem não representar a situação real de um material. Contudo, eles podem promover resultados preliminares relacionados à interação entre o material e o corpo biológico, de forma rápida e eficiente, minimizando a necessidade de testes em animais (DAGUANO; SANTOS; ROGERO, 2007). Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente.

Os testes *in vitro* surgem como uma promissora e importante tentativa de substituição dos modelos animais nos ensaios biológicos. No entanto, apesar do desenvolvimento de grande variedade de métodos alternativos experimentais, estes ainda não substituem a experimentação animal em sua totalidade, mesmo quando se pretende reproduzir o mais próximo possível o que aconteceria *in vivo* (VALÉRIO *et al.*, 2005).

Segundo Matta *et al.* (2004), a base dos experimentos *in vitro* é definir as pequenas quantidades de fármaco que atravessam as membranas ou que ficam retidos nas mesmas. Para isso, a utilização de um método analítico sensível, o qual possa viabilizar o experimento, é de grande importância. Estudos *in vitro* são realizados de modo que o fármaco seja liberado da formulação onde está veiculado e se difunda para uma solução receptora, a qual deve garantir condições termodinâmicas favoráveis ao fármaco (JORGE; GIAMPAOLO; PAVARINA, 2004).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo*, tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos num período mais curto e são facilmente realizáveis (JORGE; GIAMPAOLO; PAVARINA, 2004). Análises

farmacocinéticas de liberação *in vitro*, partindo de sistemas nanoestruturados, têm colaborado para o entendimento sistemático e quantitativo de fármacos vetorizados, proporcionando dados mais significativos para compreensão desses sistemas (MATTA *et al.*, 2004). Fármaco vetorizado é definido como uma substância que tem uma liberação seletiva para sítios fisiológicos específicos, órgãos, tecidos ou células, onde a atividade farmacológica é requerida.

Os princípios da cultura celular começaram a ser definidos no início do século XX, quando pesquisadores começaram a manter em meio de cultura fragmentos não desagregados de tecido e observar que ocorriam mitoses na periferia desses fragmentos. Em meados do século, já se estabeleciam experimentos com células dispersadas dos tecidos originais (ROSE, 1970; BUTLER; BENGHUZZI, 2003). Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados, utilizando-se culturas celulares.

A determinação da citotoxicidade pode ser através de avaliação qualitativa ou quantitativa. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais, pois com eles é possível distinguir entre células vivas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (DAGUANO; SANTOS; ROGERO, 2007).

O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados, atualmente usados. Estudos com estes métodos demonstraram que os testes *in vitro* em culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade (DAGUANO; SANTOS; ROGERO, 2007).

### 3 JUSTIFICATIVA

Considerando-se os aspectos clínicos e biológicos, a DOX tem vasto uso como auxiliar na terapia periodontal. Apesar disso, existe a necessidade de prolongar seu efeito terapêutico para permitir a reparação dos tecidos periodontais. O sistema de liberação controlada de DOX/ $\beta$ CD apresenta-se como uma alternativa para tratar as superfícies dentais e as superfícies afetadas pela doença periodontal, estimulando a formação de tecido ósseo e de um substrato para inserção de fibras colágenas de tecido conjuntivo. O uso desse composto de inclusão por empregar baixas concentrações de DOX, apresenta baixa toxicidade e ao mesmo tempo mantém efetividade antimicrobiana. Compostos supramoleculares de DOX/ $\beta$ CD apresentam atividade antimicrobiana em concentrações mais baixas que as convencionais, ainda que se mantenha a mesma concentração de DOX.

No entanto, pouco se conhece sobre as interações destes compostos na atividade osteogênica da DOX e da DOX/ $\beta$ CD. A inclusão molecular em ciclodextrinas, mantendo as mesmas quantidades de DOX indiferentemente da razão molar empregada, provoca mudanças na organização molecular destes compostos, que podem se organizar em complexos supramoleculares. Este trabalho fundamenta-se no desenvolvimento de um novo biomaterial que possibilite o tratamento regenerativo ou reparador de defeitos ósseos. Até o presente momento, o padrão-ouro no reparo de ossos danificados e restauração da forma e função natural é a coleta do tecido do próprio paciente de um sítio doador e transplante para o sítio receptor (autoenxerto). Entretanto, nem sempre isto é possível. O objetivo futuro desta pesquisa é que o novo material elimine a necessidade de dois sítios cirúrgicos em um mesmo paciente.



## 4 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a viabilidade, estrutura e atividade osteogênica da DOX encapsulada em  $\beta$ -ciclodextrina incluída em dispositivos de liberação controlada a base de PCL/PLGA/BC *in vitro*.

### 4.1 Objetivos Específicos

1. Preparar os compostos de inclusão da DOX com e sem  $\beta$ CD em PCL/PLGA;
2. Determinar o efeito dose/resposta dos compósitos de DOX no crescimento de osteoblastos *in vitro*;
3. Testar a influência do compósito de DOX na proliferação e viabilidade dos osteoblastos de cultura primária pelo método MTT;
4. Avaliar a atividade osteogênica da DOX através dos ensaios de fosfatase alcalina, ensaio de colágeno e Von Kossa;
5. Avaliar a porosidade dos compósitos por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento do Estudo

O estudo experimental foi dividido em quatro fases. A metodologia, bem como os resultados, são apresentados em quatro experimentos distintos:

1. Avaliação da viabilidade celular, *in vitro*, através do MTT de 24h, na presença de soluções de DOX pura e DOX/ $\beta$ CD em água destilada nas concentrações: 1; 5; 10; e 25 $\mu$ g/mL para avaliar qual solução promoveu maior viabilidade celular.
2. Avaliação dos compósitos BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD e BCP/PCL/PLGA/DOX, na concentração de 25 $\mu$ g/mL, para determinar qual compósito promoveu maior viabilidade celular através do MTT de 24h.
3. Avaliação do compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração de 25 $\mu$ g/mL através de testes de viabilidade/proliferação celular pelo MTT e de atividade da fosfatase alcalina e colágeno após 7 e 14 dias e da mineralização por Von Kossa após 14 dias.
4. Avaliação da estrutura física dos compósitos por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a fim de analisar o tamanho e a interconectividade dos poros.

Para a realização de todos os testes *in vitro*, foram utilizados osteoblastos de cultura primária extraídos da calvária de ratos *Wistar* machos neonatos de até 5 (cinco) dias de vida. Os ensaios foram realizados em hexaplicatas (n=6) nos três grupos, de acordo com o quadro abaixo:

**Quadro 1:** Delineamento experimental da terceira etapa.

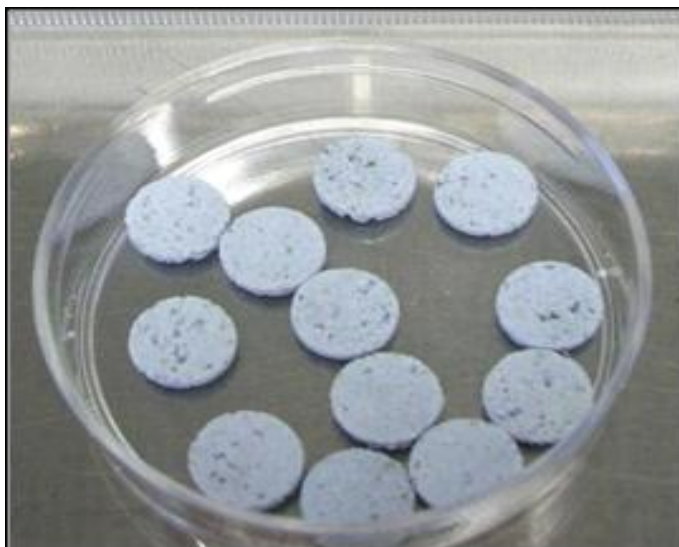
GRUPOS	TESTES <i>in vitro</i>		
	VIABILIDADE CELULAR	ATIVIDADE METABÓLICA	
	MTT (24h, 7 e 14 dias)	FOSFATASE ALCALINA E SÍNTESE DE COLÁGENO (7 e 14 dias)	VON KOSSA (14 dias)
PCL/PLGA/BCP/DOX/ $\beta$ CD	6	6	6
PCL/PLGA/BCP	6	6	6
Controle	6	6	6

Legenda: PCL = policaprolactona; PLGA = Poli (Ácido láctico-co-glicólico); BCP = Biocerâmica; DOX = Doxiciclina;  $\beta$ CD =  $\beta$ -ciclodextrina; Controle = cultura de osteoblastos sem nenhum material de teste, apenas no meio de cultivo.

## 5.2 Preparação dos Compósitos

Para a preparação dos compósitos utilizou-se os seguintes materiais:

- Biocerâmica de fosfato de cálcio bifásica (Fosfato (Tri)-Cálcio ( $\beta$ TCP)-Hidroxiapatita (HA)). 60:80 Mesh. Fabricante: Osteosynt® EINCONBIO. Lote: 177/2011.
- Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL). Fabricante: Birmingham Polymers®, Inc. USA Lote: D02042.
- Poli (Ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) 50/50. Fabricante: Birmingham Polymers®, Inc. USA. Lote: D99101.
- Diclorometano (DMC) Teor: 99.5% Densidade: 1.320–1.328 g/ml a 20°C. Fabricante: Quimex®. Lote: 24684.
- Doxiciclina PA. Fabricante: Sigma®.
- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) (Cerestar®, USA).



**Figura 8:** Compósitos PLGA/PCL/BC/DOX/ $\beta$ CD.

### 5.2.1 Preparação dos compostos de inclusão

Antes da preparação do compósito PCL/PLGA/BCP/DOX/ $\beta$ CD, foi preparado o composto de inclusão DOX/ $\beta$ CD na razão molar 1:1 pelo processo de liofilização de soluções aquosas empregando-se o equipamento *Savant Modulo D-Freeze Dryer* da *Thermo-Electron Corporation*®, tomando como base os métodos previamente descritos na literatura para inclusão em ciclodextrinas (CORTÉS *et al.*, 2001). Foram preparadas, inicialmente, soluções aquosas de cloridrato de DOX (PM: 480,99g/mol) deixadas sob agitação constante a 40° C durante meia hora e foram acrescentadas a estas soluções aquosas de  $\beta$ -ciclodextrina (PM: 1135g/mol) na massa indicada. A seguir, as soluções resultantes foram distribuídas em tubos Falcon de 15mL, congeladas em nitrogênio líquido e levadas à sublimação.

O compósito foi preparado utilizando-se PCL e PLGA e a biocerâmica de fosfato de cálcio bifásica (BCP) de granulometria 60x80 Mesh na razão 1:4, respectivamente. Em 10 ml de diclorometano foram adicionados 0,84 mg de DOX/ $\beta$ CD. Esta massa de DOX/ $\beta$ CD foi determinada para que a concentração de 25 $\mu$ g/mL de DOX fosse normalizada. Foram adicionados 300mg (50:50) de PCL e PLGA, sob agitação magnética, em béquer fechado, durante 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionadas 1200 mg de BCP, permanecendo sob agitação a temperatura ambiente. Posteriormente, a fim de moldar a mistura obtida, esta foi colocada em tubos de vidro com espessura interna de 0,7 mm, permanecendo por 48 horas. As amostras cilíndricas dos compósitos foram pastilhadas utilizando lâminas para microtomia, tendo as pastilhas espessura de 0,5mm de diâmetro.

Posteriormente as pastilhas obtidas foram esterilizadas utilizando o óxido de etileno (CURAR® - Centro de Esterilização Especializada Ltda., Belo Horizonte - MG).

O compósito PCL/PLGA/BCP/DOX/ $\beta$ CD serviu como grupo teste para todos os experimentos, tendo como controles os grupos PCL/PLGA/BCP e cultura de osteoblastos sem nenhum material de teste, apenas no meio de cultivo.

### 5.3 Cultivo de Osteoblastos

Os osteoblastos foram isolados da calvária de 06 ratos *Wistar* machos neonatos de até 5 dias de vida, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram anestesiados e a incisão coronal foi feita expondo as duas metades da calvária. A calvária foi retirada e colocada em tampão salina estéril sem cálcio e sem magnésio (PBSA). O tecido ósseo foi cortado em pequenos pedaços e colocado em tripsina/EDTA 0,25% a 37% por 5 minutos, seguido de três digestões enzimáticas de 2 mg/ml de colagenase a 37% por 20 minutos cada. Os sobrenadantes resultantes da primeira digestão enzimática da tripsina e da colagenase foram desprezados, os quais possivelmente continham outros tipos celulares. Os outros três sobrenadantes produziram uma suspensão de células com grande proporção de osteoblastos. A centrifugação foi realizada em centrífuga (Jouan CR-412®) por 10 minutos a 14000 rpm. As células resultantes foram ressuspensas em meio de cultura DMEM, colocadas em garrafas de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas a 37°C em atmosfera úmida de 95% ar e 5% de CO<sub>2</sub>. Durante os experimentos, as células foram monitoradas diariamente, observando-se o aspecto microscópico da cultura e coloração do meio.

### 5.4 Meio de Cultura

O meio de cultivo de osteoblastos foi preparado utilizando-se *Dulbecco's Modified Eagle Medium* sem vermelho de fenol (DMEM D290E; Sigma-Aldrich® Co. LLC. - USA), suplementado com 1,2 g/l de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB Sigma-Aldrich® Co. LLC. - USA). O SFB foi previamente inativado por aquecimento em banho-maria a 60°C, durante 60 minutos. Foram acrescentados ao meio 1% de antibiótico-antimicótico. Após a preparação do meio, o pH foi ajustado para 7,2. Posteriormente, o meio foi submetido à filtração utilizando-se membrana de 0,22  $\mu$ m. Este procedimento se deu em ambiente estéril (capela de fluxo laminar).

### 5.5 Repicagem e semeadura de células em placas de 96 e 6 poços

Ao atingirem um grau de confluência superior a 90%, as culturas foram submetidas à ação enzimática de tripsina. Para isso, duas lavagens com PBS 0,15M foram feitas. Posteriormente, acrescentou-se às culturas 2 ml de tripsina/EDTA (etilenodiaminotetraacético) a 1% (1 ml de tripsina 0,25%/EDTA 0,06% Sigma-Aldrich® Co. LLC. - USA), sendo as garrafas com as culturas de células incubadas por 10 minutos nas condições previamente descritas, até que as células se soltassem completamente. Ao final deste processo, a ação da tripsina foi neutralizada pela adição de 3 ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Numa próxima etapa, estas células foram novamente plaqueadas, obedecendo a razão de uma garrafa inicial para três garrafas finais ou de  $1,5 \times 10^5$  células/poço.

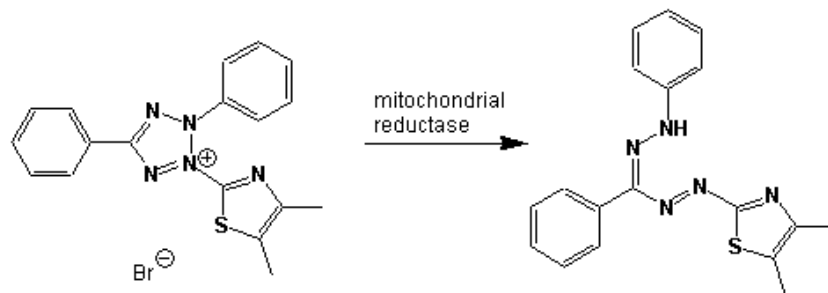
Os osteoblastos estavam prontos para serem usados em testes com os biomateriais após dois ou três repiques. As culturas eram novamente tripsinizadas e contadas no microscópio de luz invertido (BEL Photonics®, BEL Equipamentos Ltda., Piracicaba - SP), com auxílio de Câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram semeadas em placas de 96 e 6 poços à razão de  $1,5 \times 10^5$  células/poço em cultura de monocamada e tridimensional com o meio por 24 horas em incubadora úmida a temperatura constante a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, a fim de permitir que as células aderissem à placa (OGAWA *et al.*, 2004). Após esse período, o biomaterial era colocado em contato para ser avaliado no período de 24 horas, 7 e 14 dias.

### 5.6 Ensaio de metabolização de MTT

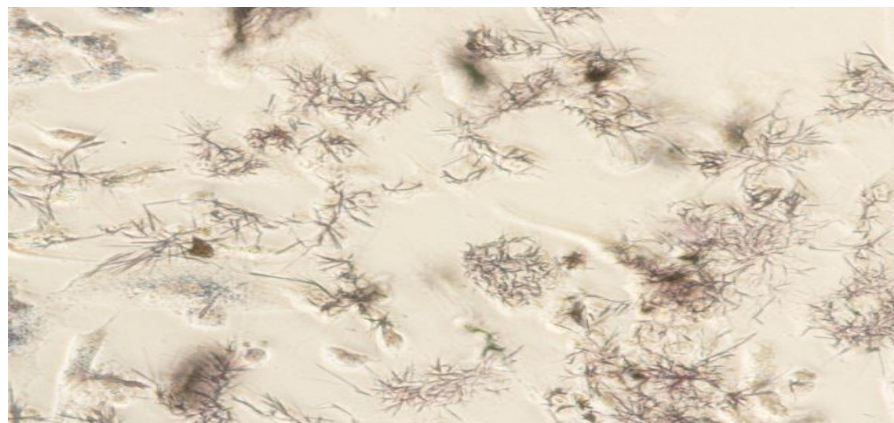
As culturas celulares foram caracterizadas relativamente à proliferação/viabilidade celular pelo ensaio do MTT, atividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos minerais, colágeno e Von Kossa.

O ensaio de sal de tetrazólio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide) (*Mosmann Toxicity Test*) (Invitrogen®/Vybrant MTT, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) é um ensaio colorimétrico padrão que mede mudanças na cor para medição da atividade mitocondrial de células viáveis, sendo sensível para avaliar a citotoxicidade de agentes medicinais e de outros materiais. O MTT é incorporado pelas células metabolicamente ativas, produzindo cristais de formazan de cor púrpura que se acumulam no seu interior (VALÉRIO *et al.*, 2005).

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT amarelo, o qual é reduzido a um produto insolúvel roxo, cristais de formazan, os quais são formados proporcionalmente à atividade do succinato desidrogenase no interior das mitocôndrias das células vivas. Este produto de coloração púrpura é acumulado dentro da célula. Uma solução de solubilização composta de dodecil sulfato de sódio e ácido clorídrico (SDS/HCL) é adicionada para dissolver o produto de formazan roxo insolúvel e, após solubilização, a absorção da solução colorida pode ser quantificada em espectrofotômetro na absorbância de 570 nm. Alterações na atividade mitocondrial celular resultam em mudanças na quantidade de formazan produzido e, conseqüentemente, na absorbância, o que permite quantificar a citotoxicidade do tratamento de maneira indireta (MOSMANN, 1983). Essa redução só acontece quando as enzimas mitocondriais redutase estão ativas, portanto a conversão está diretamente relacionada ao número de células vivas. Quando a quantidade de formazan roxo produzido por células tratadas com um agente é comparada com a quantidade de formazan produzido por células de controle não tratadas, a efetividade do agente em causar a morte de células pode ser deduzida (VALÉRIO *et al.*, 2004).



**Figura 9:** Redução de MTT à formazan.



**Figura 10:** Visualização dos cristais de formazan formados após metabolização do MTT em grupo controle (somente osteoblastos) com aumento de 20X.

A viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT após 24 horas de incubação na presença de cada amostra e a proliferação dos osteoblastos, após 7 e 14 dias. Em cada ensaio, as células das placas foram lavadas com PBS (2x). Em seguida, foram supridas com meio base sem vermelho de fenol (100 µl) e 10 µl de MTT (5 mg/ml) e incubadas por 4 h a 37°C em atmosfera umidificada de CO<sub>2</sub> 5% e ar 95%. A formação dos cristais de formazan foi observada ao microscópio invertido de luz (BEL Photonics®, BEL Equipamentos Ltda., Piracicaba - SP). Após o período de incubação, 100 µl de 10% SDS/HCl (dodecil sulfato de sódio/ácido clorídrico) foram acrescentado nos grupos para solubilização dos cristais. As placas foram agitadas à temperatura ambiente durante 1 minuto para dissolver os cristais de formazan e incubadas por 24 horas em estufa nas condições previamente descritas. Após a incubação, a leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiscan Spectrum®, Vantaa, Finland) foi realizada a 570 nm.

### **5.7 Ensaio da atividade de Fosfatase Alcalina (BCIP/NBT)**

A fosfatase alcalina óssea é uma ectoenzima presente na superfície externa da membrana celular, onde exerce sua atividade e está envolvida nos processos de mineralização tecidual (WENNBERG *et al.*, 2000). Funciona como um marcador bioquímico do metabolismo ósseo, que retrata a formação ou a reabsorção óssea. É uma glicoproteína específica encontrada na superfície dos osteoblastos. Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação (fosfatase alcalina óssea) na realidade medem produtos decorrentes da ação destas células. Os marcadores de formação são todos eles frutos da síntese osteoblástica. Sua função ainda não está totalmente elucidada, porém seu papel na mineralização do esqueleto está confirmado. A avaliação da atividade sérica da fosfatase alcalina óssea é um marcador ósseo que fornece informações úteis do remodelamento ósseo na osteoporose, na doença de Paget e no acompanhamento de terapias preventivas e de reposição hormonal ou de outras terapias antiabsortivas (VALÉRIO *et al.*, 2005). As alterações encontradas na hipofosfatasia, doença devida a uma mutação no gene codificador da enzima, predominantemente na osteomalácia, sugerem fortemente que a enzima tenha papel fundamental na mineralização (GLEZER *et al.*, 2006).

A produção de fosfatase alcalina pelo osteoblasto pode ser um dos parâmetros usados em modelos *in vitro* para avaliar o efeito do biomaterial sobre a atividade do tecido ósseo. O ensaio de fosfatase alcalina (coloração celular por BCIP) foi realizado para verificar a porcentagem de osteoblastos no cultivo celular e também para verificar se as células



estavam em fase proliferativa. Este ensaio é baseado na reação cromogênica iniciada pela clivagem do grupo de fosfato BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt) pela fosfatase alcalina presente nas células. Esta reação produz um próton o qual reduz NBT (*Nitro-Blue Tetrazolium Chloride*) em um precipitado arroxeadado insolúvel. A presença de fosfatase alcalina nas células provoca a hidrólise do grupo fosfato do composto BCIP, gerando compostos redutores que reagem rapidamente com o NBT, formando, dessa forma, um precipitado arroxeadado insolúvel.

As células foram plaqueadas na concentração de  $1,5 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços por um período de 7 e 14 dias. O sobrenadante de cada poço foi removido e passado para outra placa. Na placa contendo as células, seguiu-se o protocolo utilizando o kit Invitrogen® (Invitrogen/Vybrant, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Primeiramente, foram preparadas as soluções (Anexo 1), em seguida as células foram lavadas 2 vezes com PBS (0,15 M estéril). Em seguida, foram colocadas 60 µl de solução BCIP/NBT (1:1) (as duas soluções foram misturadas no momento do uso) em cada poço. A placa foi incubada por 2 horas. Após esse período, foram acrescentadas 60 µL da solução 10% SDS/HCL. Incubou-se durante 24 horas em estufa nas condições previamente descritas. Após incubação, a densidade ótica foi lida por espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiscan Spectrum®, Vantaa, Finland) a 595 nm.

### **5.8 Ensaio da produção de colágeno (*Sircol Red*)**

O colágeno, também conhecido como gelatina, é uma das maiores moléculas proteicas do organismo humano. Encontra-se presente na estrutura dos tecidos conjuntivos, cartilagosos e fibrosos, como pele, ossos, tendões, dentes, vasos sanguíneos, músculos, unhas, cabelos, articulações (líquido sinovial), entre outros, representando mais de 30% das proteínas presentes no organismo. Sua composição de aminoácidos é bastante específica, sendo formada principalmente por glicina e prolina. Para a síntese de colágeno, é necessário que estes aminoácidos sejam agrupados e hidroxilados. Para que esta reação ocorra, é fundamental a presença do ácido ascórbico (vitamina C) para a ativação da enzima que irá catalisar este processo (CORMACK, 1991; VALÉRIO *et al.*, 2005). Colágeno é uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz celular do tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas. No homem, existem pelo menos 28 tipos de colágeno, possuindo diferentes funções (CORMACK, 1991).

No caso das células ósseas, ocorrerá mineralização da fibra colágena juntamente com outras proteínas não colagenosas também secretadas pelos osteoblastos. Para que isso ocorra, haverá a necessidade da ação da fosfatase alcalina que desfosforilará algumas fosfoproteínas nas regiões de conexão. O cálcio e o fosfato podem precipitar pela regulação membrano-símile dos osteoblastos, são extraídas vesículas, com dupla membrana, ricas destes dois íons e que seriam derivadas do aparelho de Golgi por cisão parcial. É sabido que o metabolismo ósseo pode ser avaliado pela análise da síntese de colágeno, possibilitando estudo e controle de possíveis alterações. Também possibilita avaliar a interação entre o tecido ósseo e biomateriais com diferentes características, pela quantificação da síntese de colágeno pelos osteoblastos, que podem ser estimulados ou inibidos por substâncias liberadas pelos biomateriais no meio (ANSELME, 2000).

Realizou-se a detecção de colágeno pelo Método de Sircol (TULLBERG-REINERT; JUNDT, 1999). O ensaio para quantificação de colágeno pode ser realizado no sobrenadante de culturas de osteoblastos ou nas células fixadas nas placas de cultura. O princípio do método consiste na determinação de cor gerada pela reação do colágeno com um corante aniônico, o *sirus red*. Esse corante possui na molécula um grupo sufônico que interage com o colágeno formando um composto insolúvel, vermelho.

As células foram plaqueadas na concentração de  $1,5 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços por um período de 7 e 14 dias. Seguiu-se o protocolo segundo o kit Invitrogen®: colocou-se 1 ml de sobrenadante de cada grupo estudado no *ependorff* cônico. Adicionou-se 200 µl do reagente “*Isolation & Concentration Reagent*” gelado (4°C), misturou-se o conteúdo invertendo o tubo. Os tubos foram colocados em uma estante dentro de um recipiente preenchido pela metade com mistura de água e gelo. Incubou-se durante 24 horas a 4°C, na geladeira. Removeram-se os tubos da estante sem agitar seus conteúdos. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos. Usou-se a micropipeta para remover levemente 1 ml do sobrenadante de cada tubo.

Em seguida, adicionou-se 1 ml do reagente “*Sircol Dye*” e o *ependorff* foi colocado no agitador mecânico por 30 minutos. Posteriormente, foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e a tampa foi limpa com algodão para remover resquícios do corante. No tubo foram colocados 750 µl do reagente “*Ácido-Sal Wash*” gelado. E novamente foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o tubo foi limpo com algodão para retirar o excesso de reagente. Adicionou-se 250 µl do reagente “*Alkali*”. O tubo foi colocado por 5 minutos no agitador mecânico.

Transferiu-se 200 µl do conteúdo para a placa de 96 poços. A leitura foi realizada a 555 nm no espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiscan Spectrum®, Vantaa, Finland).

### **5.9 Ensaio da produção de nódulos de mineralização por coloração pelo método Von Kossa**

Para determinar se as células diferenciadas em osteoblastos produziam nódulos mineralizados *in vitro*, foi realizado o teste de Von Kossa no décimo quarto dia de cultivo. Von Kossa é um método específico para visualizar a calcificação. É um ensaio colorimétrico muito útil na detecção de mineralização dentro da matriz.

As soluções primeiramente foram preparadas (Anexo 2). Em seguida, o meio dos poços foi aspirado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com 100 µl formaldeído 10% por 5 min. O fixador foi removido e as células lavadas com água Milli-Q. Adicionou-se 200 µl de Nitrato de Prata 5% e deixou-se a placa por 1 hora dentro da capela de fluxo com a luz ultravioleta ligada. Lavou-a 3 vezes com água Milli-Q. Adicionou-se 200 µl de Tiosulfato de Sódio 5% por 3 minutos. Em seguida, o Tiosulfato foi removido e adicionou-se 200 µl de Safranina 1% por 30 segundos. A análise visual dos nódulos foi realizada através da objetiva de 10x do microscópio invertido de luz (BEL Photonics®, BEL Equipamentos Ltda., Piracicaba - SP).

### **5.10 Caracterização de Superfície e Estrutural da Matriz por Microscopia Eletrônica de Varredura**

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitiu a caracterização microestrutural da superfície para avaliação qualitativa da interconectividade, da conformação e do tamanho de poros. As amostras foram recobertas com ouro (*Sputter Coater - SPI Supplies*) por 90 segundos, 13 mA. As imagens foram adquiridas usando o Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL 6360LV®), 15kV, 750mA do Departamento de Física – ICEX – UFMG.

### **5.11 Análise Estatística**

Os dados apresentados neste trabalho são o resultado de três experimentos separados, sendo que, para cada conjunto de ensaios, foram utilizadas três linhagens diferentes de células osteoblásticas. Em cada um dos experimentos e para cada um dos ensaios bioquímicos foram efetuadas seis réplicas. As médias e desvios padrões dos resultados foram calculados e

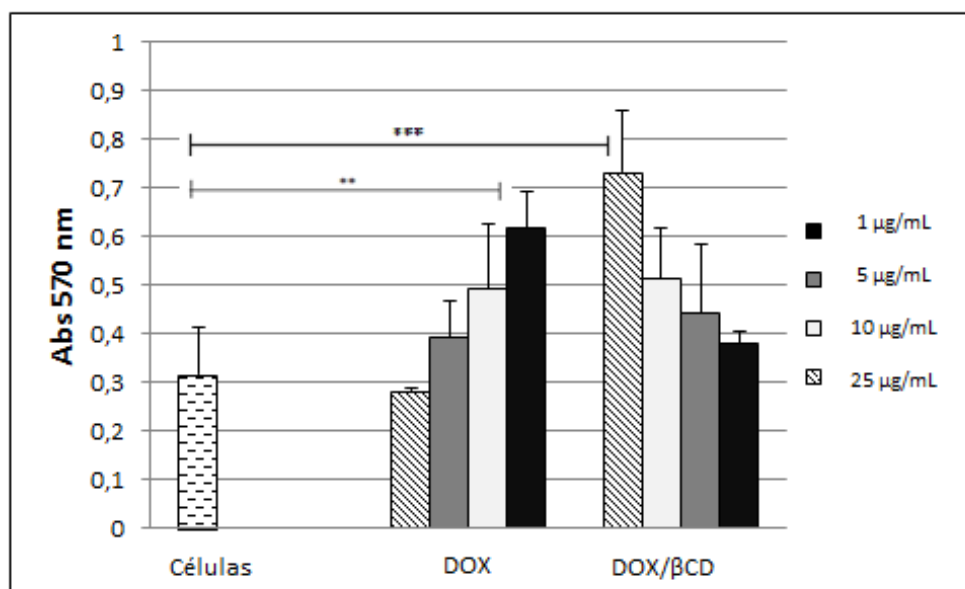
analisados pelo programa *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software®, CA, USA). A partir dos dados obtidos foram realizadas análises estatísticas pelo método análise das variâncias (ANOVA), seguido pelo método de Bonferroni para verificar as diferenças entre os grupos em que os valores de  $p \leq 0.05$ , foram considerados significativos.

## 6 RESULTADOS

### FASE 1: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS SOLUÇÕES DA DOX PURA E DA DOX NO COMPOSTO DE INCLUSÃO DOX/ $\beta$ CD 1:1 EM CULTURA DE OSTEÓBLASTOS

#### 6.1 Teste de viabilidade celular (MTT)

No presente trabalho, empregou-se a DOX encapsulada em  $\beta$ -ciclodextrina, considerada uma ciclodextrina neutra. O resultado obtido através do teste de MTT para verificar qual solução DOX pura ou DOX encapsulada em  $\beta$ CD (DOX/ $\beta$ CD) promoveu maior viabilidade celular *in vitro* está representado na Figura 11.



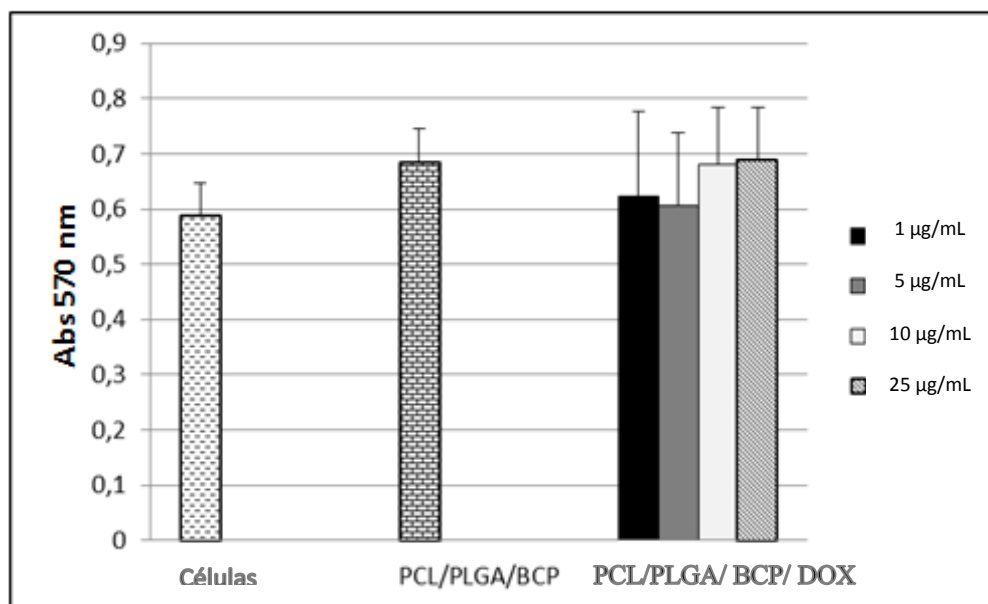
**Figura 11:** Viabilidade celular dos osteoblastos pelos ensaios de MTT após 24 horas de tratamento com soluções de DOX pura e DOX/ $\beta$ CD nas concentrações: 1; 5; 10; e 25  $\mu$ g/mL.

Os resultados apresentados na Figura 11 sugerem que a exposição de células osteoblásticas cultivadas em concentrações baixas de DOX (1-5  $\mu$ g /mL), na ausência de  $\beta$ CD, estimularam a proliferação celular, apresentando diferença estatisticamente significativa na concentração de 1  $\mu$ g/mL em relação ao controle. Apenas a concentração de 25  $\mu$ g/mL foi citotóxica. Entretanto, ao se incluir a DOX na  $\beta$ CD, a concentração de 25  $\mu$ g/mL foi capaz de induzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a proliferação celular dos osteoblastos em relação ao controle, apresentando resultado semelhante à concentração de 1  $\mu$ g/mL sem  $\beta$ CD. A proliferação celular foi diminuindo gradativamente nos osteoblastos tratados com 5 e 1  $\mu$ g/mL DOX/ $\beta$ CD, não apresentando diferença estatisticamente significativa.

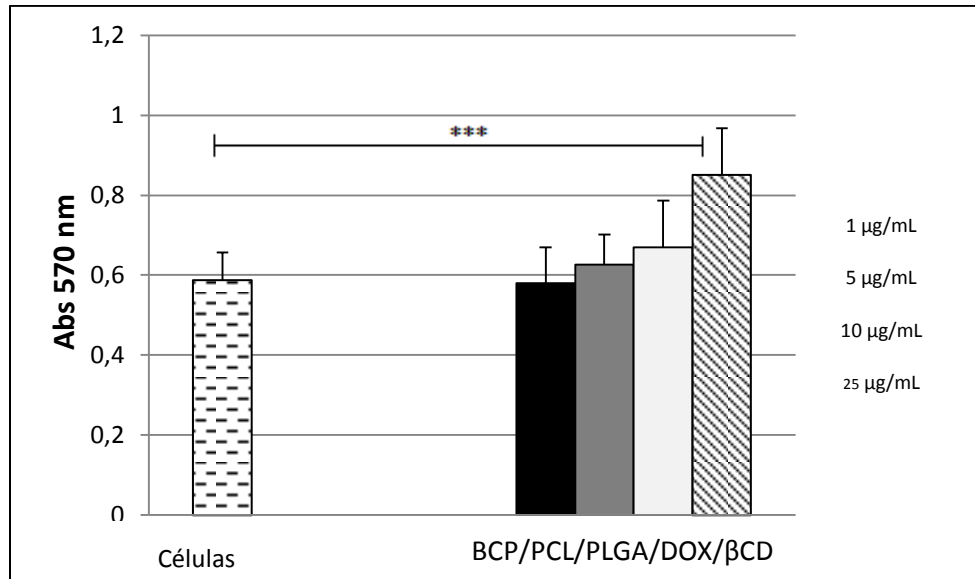
## FASE 2: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPÓSITOS (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD e BCP/PCL/PLGA/DOX) EM CULTURA DE OSTEÓBLASTOS

### 6.2 Teste de viabilidade celular (MTT)

Avaliações da viabilidade celular *in vitro* dos compósitos, através dos testes de MTT, na presença de DOX pura (BCP/PCL/PLGA/DOX) e DOX encapsulada em  $\beta$ CD (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD) após 24 horas estão representadas nas Figuras 12 e 13.



**Figura 12:** Viabilidade celular dos osteoblastos pelos ensaios de MTT após 24 horas de tratamento com compósito de DOX sem  $\beta$ CD (BCP/PCL/PLGA/DOX) nas concentrações: 1; 5; 10; e 25  $\mu$ g/mL.



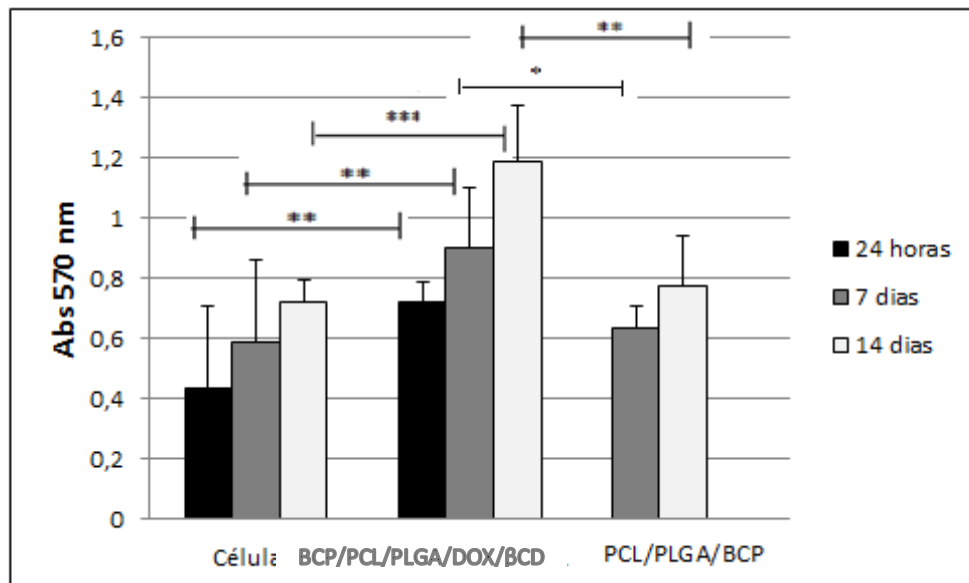
**Figura 13:** Viabilidade celular dos osteoblastos pelos ensaios de MTT após 24 horas de tratamento com compósito de DOX encapsulada em  $\beta$ CD (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD) nas concentrações: 1; 5; 10; e 25  $\mu$ g/mL.

Os dados obtidos após testes de MTT com diferentes grupos de compósitos de DOX pura e na presença da matriz BCP/PCL/PLGA sugerem que nenhum grupo apresentou diferença significativa em relação ao controle, nem entre eles (Figura 12). Entretanto, ao se incluir a DOX na  $\beta$ CD ao compósito, apenas a concentração de 25  $\mu$ g/mL foi capaz de induzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a proliferação celular dos osteoblastos em relação ao controle. A proliferação celular aumentou gradativamente nos osteoblastos tratados com aumento da concentração. Entre os compósitos, maior diferença significativa ocorreu entre 1  $\mu$ g/mL e 25  $\mu$ g/mL. Seguida da diferença significativa entre 5  $\mu$ g/mL e 25  $\mu$ g/mL e da observada entre 10  $\mu$ g/mL e 25  $\mu$ g/mL (Figura 13).

### **FASE 3: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OSTEOGÊNICA DO COMPÓSITO (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD) EM CULTURA DE OSTEOBLASTOS**

#### **6.3 Teste de viabilidade celular (MTT)**

Verificado que o compósito contendo DOX/ $\beta$ CD, na concentração 25  $\mu$ g/mL, induziu maior viabilidade celular e diferença estatística significativa em relação ao controle, o mesmo foi escolhido para avaliar atividade osteogênica nos demais testes *in vitro*. Os resultados obtidos foram descritos na Figura 14.



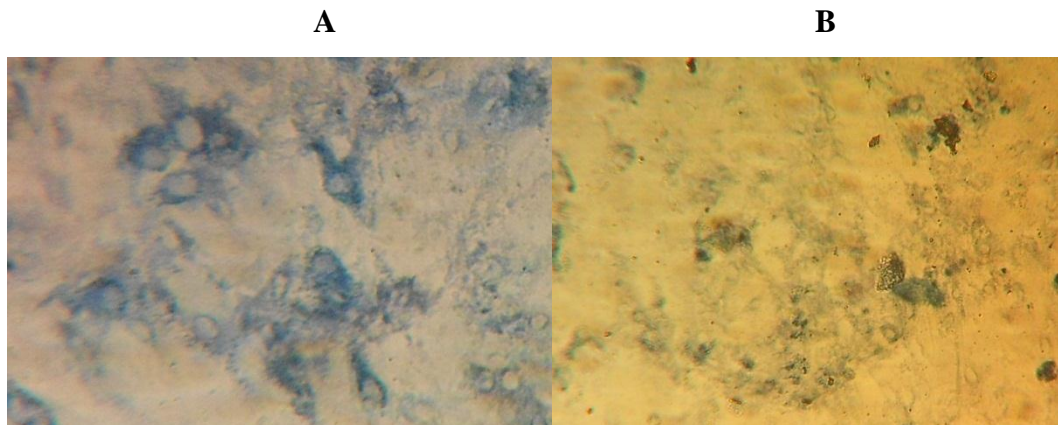
**Figura 14:** Viabilidade celular dos osteoblastos pelos ensaios de MTT após 24 horas, 7 e 14 dias de tratamento com compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/βCD na concentração 25 μg/mL.

Os resultados obtidos após os testes de MTT, como mostra a Figura 14, sugerem que a proliferação das células osteoblásticas, na presença do compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/βCD na concentração 25 μg/mL, foi maior e apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, em todos os tempos experimentais (24 horas, 7 e 14 dias), sendo maior após 14 dias. As células permaneceram viáveis e proliferando até esse período. Entretanto, o compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/βCD na concentração 25 μg/mL foi maior e estatisticamente significativo em relação à matriz BCP/PCL/PLGA em 7 dias, sendo maior após 14 dias.

#### 6.4 Produção de fosfatase alcalina (BCIP/NBT)

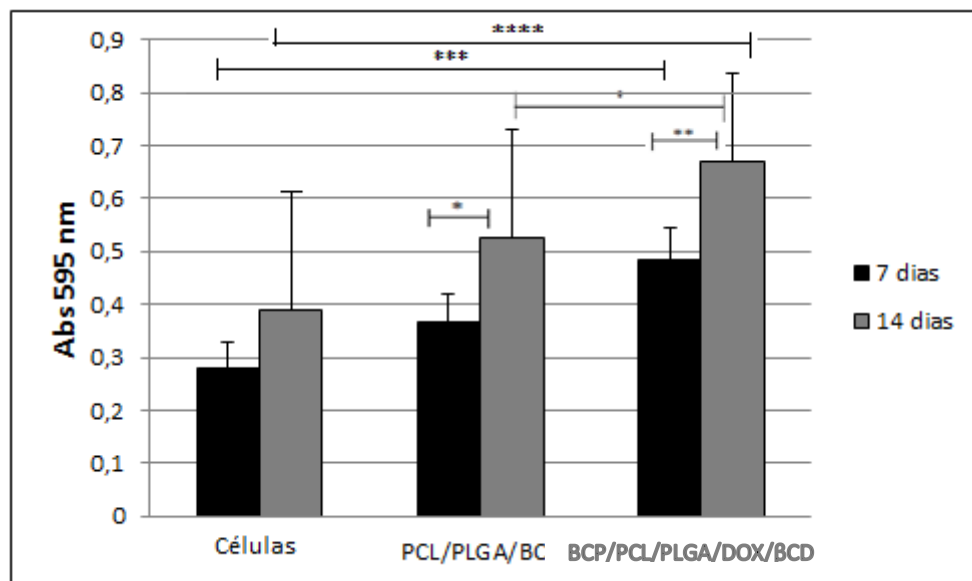
A Figura 15 mostra fotomicrografias dos osteoblastos apresentando precipitação dos sais de *nitro blue tetrazolium* que evidenciam a atividade da fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina estava presente tanto no controle quanto na presença do compósito.





**Figura 15:** Visualização da produção de fosfatase alcalina por osteoblastos na presença do compósito. (A) formação de precipitado de aspecto arroxeadado no osteoblasto (20X). (B) precipitado de aspecto arroxeadado formado nos osteoblastos sobre o compósito (75X).

Os resultados obtidos pela medição da fosfatase alcalina foram descritos na Figura 16.



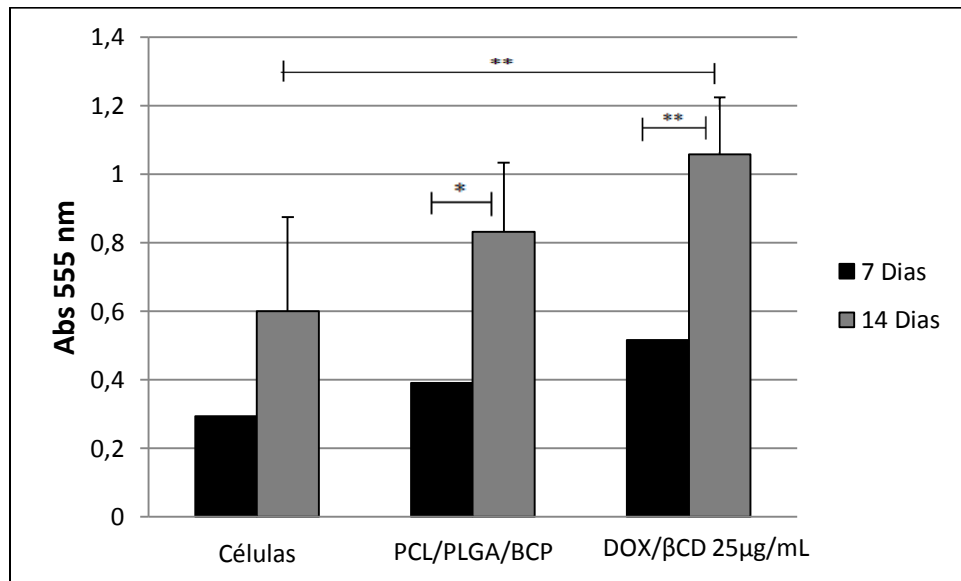
**Figura 16:** Produção de fosfatase alcalina por osteoblastos após 7 e 14 dias de tratamento com compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25  $\mu$ g/mL.

Os resultados apresentados na Figura 16 sugerem que a produção de fosfatase alcalina (FA) pelas células osteoblásticas, na presença do compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25  $\mu$ g/mL, foi maior e apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, em todos os tempos experimentais (7 e 14 dias), mostrando uma produção maior na avaliação de 14 dias tanto em relação ao controle quanto ao período de 7 dias. A matriz BCP/PCL/PLGA não apresentou diferença significativa em relação ao controle, porém após o período de 14 dias apresentou diferença

significativa em relação à matriz de 7 dias. Além disso, o compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25  $\mu$ g/mL foi maior e estatisticamente significante em relação à matriz no período de 14 dias.

### 6.5 Síntese de colágeno (*Sirius Red*)

A produção de colágeno total das células osteoblásticas quantificada em cada grupo está descrita na Figura 17.

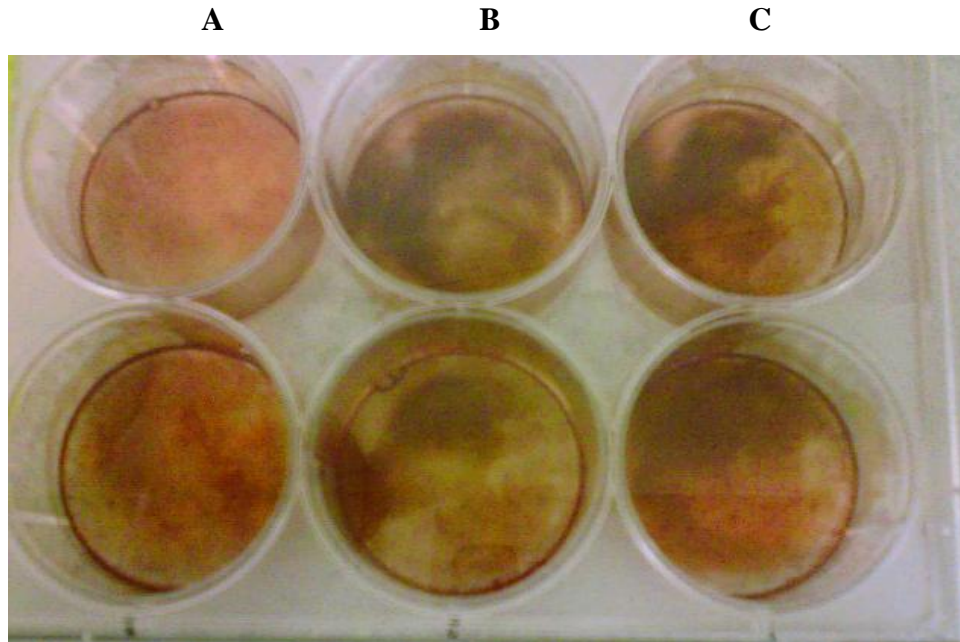


**Figura 17:** Produção de colágeno por osteoblastos após 7 e 14 dias de tratamento com compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25  $\mu$ g/mL.

Os resultados apresentados na Figura 17 sugerem que a produção de colágeno pelas células osteoblásticas, na presença do compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25  $\mu$ g/mL, foi maior e apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle apenas após 14 dias. A produção de colágeno, na presença do compósito, após o período de 14 dias foi maior e significativa em relação ao período de 7 dias. A matriz BCP/PCL/PLGA não apresentou diferença significativa em relação ao controle, porém após o período de 14 dias apresentou diferença significativa em relação à matriz no período de 7 dias.

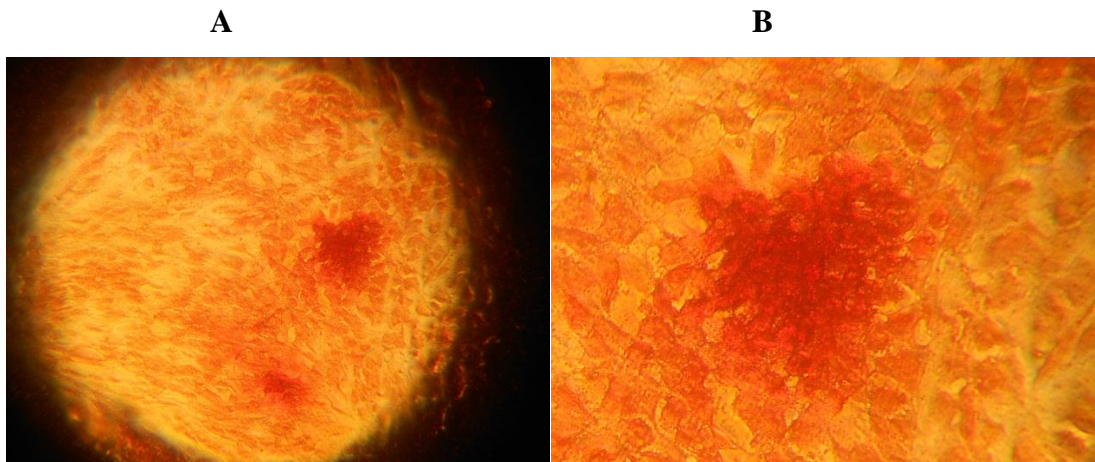
## 6.6 Coloração por Von Kossa

A Figura 18 mostra o ensaio de Von Kossa realizado para avaliar a atividade osteogênica do compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD em cultura de osteoblastos após 14 dias. Essa coloração tem como finalidade obter uma constatação quanto à formação de estruturas mineralizadas, indicadoras de células de linhagem osteogênica.



**Figura 18:** Placa de 6 poços. Ensaio Von Kossa após 14 de incubação. Fileira A) controle (somente células). Fileira B) matriz (BCP/PCL/PLGA). Fileira C) compósito (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD).

A Figura 19 mostra a marcação das células pelo Von Kossa, indicando a presença de nódulos de mineralização.

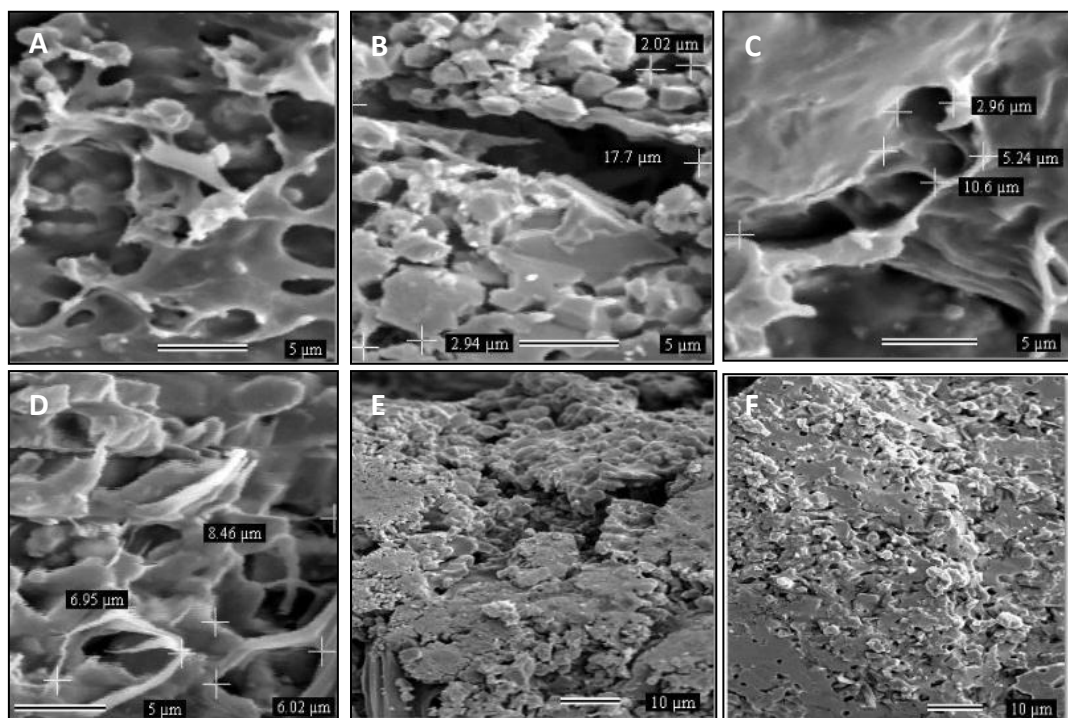


**Figura 19:** Visualização de estruturas mineralizadas por coloração do tipo Von Kossa. (A) Imagem de dois nódulos mineralizados após 14 dias de indução osteogênica na presença do compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD, concentração 25  $\mu$ g/mL. Aumento de 20X. B) Aumento de 400X.

As Figuras 18 e 19 apresentam os resultados de marcação por Von Kossa das células submetidas à indução osteogênica na presença do compósito. Na apresentação dos resultados, o núcleo ficou corado de vermelho, o citoplasma de rosa e o cálcio de preto. Verificou-se apenas visualmente a atividade osteogênica das células, através da formação dos nódulos de mineralização no período de 14 dias. Resultados similares foram observados para a marcação das células cultivadas no grupo controle e na presença da matriz BCP/PCL/PLGA. Estes resultados comprovam a atividade osteogênica dos osteoblastos, porém faz-se necessário a realização de outros testes comprobatórios, que não foram possíveis neste trabalho.

#### FASE 4: AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA DE MATRIZES (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD)

A análise descritiva realizada por MEV mostrou que o compósito apresentou microporos intercomunicantes na faixa de 1  $\mu$ m e 10  $\mu$ m (Figura 20 C, D), que aumentam o contato tecidual, a solubilidade, absorção de moléculas e a capacidade de trocas com os líquidos orgânicos. Também apresentam intermediários de 10  $\mu$ m a 50  $\mu$ m (Figura 20 B), que aumentam a adesão dos osteoblastos. Esta estrutura arquitetônica porosa torna esta biocerâmica um veículo condutor e liberador de fármacos e substâncias, sua topografia superficial permite atividade metabólica osteoblástica e expressão dos fenótipos (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) adequados para as etapas dos fenômenos de neoformação tecidual.



**Figura 20:** MEV do compósito (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ cd). A, B, C, D com aumento de 5X; E e F com aumento de 10X.

## 7 DISCUSSÃO

Baseado nos princípios de liberação controlada de fármacos, de Engenharia de Tecidos associados a polímeros biodegradáveis e biocerâmicas como suporte mecânico e buscando a concentração ideal que favorecesse a atividade osteogênica da DOX, foi proposta a avaliação do compósito de DOX encapsulada em  $\beta$ CD em matrizes de PCL/PLGA/BCP *in vitro*.

No presente trabalho, hipotetizou-se que os compósitos BC/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD favoreceriam a indução osteogênica. Os resultados obtidos após os testes de MTT (Figura 11) sugeriram que a exposição de células osteoblásticas cultivadas em baixas concentrações de DOX (1-5  $\mu$ g/mL) sem  $\beta$ CD estimularam a proliferação celular, sendo maior e apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. A concentração de 25  $\mu$ g/mL foi citotóxica. Estes resultados corroboram aos resultados de Guimarães (1997), Gomes (2006) e Coelho (2006). Estes autores concordam em afirmar que a concentração de 25  $\mu$ g/mL de DOX pura (livre, não encapsulada) não favorece o crescimento celular, além de ser citotóxica. No entanto, no presente estudo, quando um compósito contendo o composto de inclusão de DOX foi formado com  $\beta$ CD, a concentração de 25  $\mu$ g/mL mostrou uma maior proliferação de células. Estes resultados sugeriram que uma dose citotóxica de DOX livre, quando encapsulada em ciclodextrinas, formou um novo composto que, além de não ser citotóxico, promoveu a proliferação celular.

As TCs são frequentemente utilizadas em preparações de liberação prolongada, situação em que as concentrações do fármaco que se obtêm nas bolsas periodontais são muito mais elevadas que as observadas com a utilização sistêmica destes compostos e, normalmente, superiores aos 25-50  $\mu$ g/ml (COELHO *et al.*, 2006). Para este autor, no caso da utilização deste tipo de preparações, deve considerar-se a possibilidade de ocorrência de efeitos citotóxicos nas células locais, nomeadamente do ligamento periodontal e osso alveolar. No entanto, na presente pesquisa, a concentração de 25  $\mu$ g/ml de DOX/ $\beta$ CD mostrou-se não citotóxica *in vitro*. Estes resultados sugeriram que, além das suas propriedades antimicrobianas e anti-colagenolíticas, este antibiótico, quando utilizado em baixas concentrações, atua como promotor da proliferação das células osteoblásticas, corroborando com os achados de Gomes (2006).

Os resultados do presente estudo *in vitro* estão de acordo com os relatados por vários autores que investigam metabolismo da patologia óssea em modelos animais. O modelo em

rato foi usado por Golub *et al.* (1994) para simular osteopenia induzida por diabetes, onde ele verificou que a situação patológica foi significativamente melhorada com a TC.

Ao longo do tempo, muitas ações têm sido descritas para as TCs, como efeito: antibiótico; antiapoptótico; antiprotease; anti-inflamatório; capacidade de agir como catadores de radicais de oxigênio e formação óssea. Vários relatos indicam formação óssea por TCs. A maioria das investigações foi baseada em doenças ósseas induzidas por modelos animais. Um estudo recente de POLSON *et al.*, (2005), avaliou o efeito da TC sobre as características morfológicas da remodelação óssea normal, em macacos e também encontraram aumento da atividade osteoblástica e osteoide em osso alveolar. Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a formação óssea, redução da decomposição do tecido conjuntivo e da reabsorção óssea pelas TCs (GARLET *et al.*, 2004).

Os dados obtidos após testes de MTT com diferentes grupos de compósitos de DOX pura (Figura 12) sugeriram que nenhum grupo apresentou diferença significativa em relação ao controle, nem entre eles (Anexo 4). Entretanto, ao se incluir a DOX na  $\beta$ CD no compósito (Figura 13), apenas a concentração de 25  $\mu$ g/mL foi capaz de induzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a proliferação celular dos osteoblastos em relação ao controle (Anexo 5). A proliferação celular foi aumentando gradativamente nos osteoblastos tratados com aumento da concentração.

Quando o compósito constituído de biocerâmica, blenda de PCL e PLGA e de mesma concentração 25  $\mu$ g/ml foi avaliado na presença da  $\beta$ CD, este apresentou diferença significativa em relação ao controle. Esta diferença pode ser devido ao encapsulamento da DOX. A inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina, além de propiciar sua liberação controlada, atenua a citotoxicidade do fármaco, bem como o sabor desagradável e o manchamento dental da DOX, possibilitando o seu uso por um período mais prolongado em baixas concentrações, além de aumentar a proliferação de osteoblastos.

Vários trabalhos têm mostrado uma melhor ou uma maior atividade do fármaco encapsulado, comparado à sua forma livre (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998; SZEJTLI, 1988). Estes complexos são mais estáveis em relação à decomposição por luz, calor e radicais livres. Fármacos que são capazes de formar estes complexos de inclusão estão mais protegidos da desestabilidade físico-química (LOFTSSON; MASSON, 2001). Compostos de inclusão de clorexidina- $\beta$ -ciclodextrina, assim como antibióticos incluídos, como as TCs, têm mostrado ser até quatro vezes mais efetivos que os fármacos correspondentes livres (CORTÉS *et al.*, 2001; DINIZ, 2007).

Pataro *et al.* (2003) concluíram que a ciclodextrina modula a liberação de TC garantindo sua substantividade e liberação de maneira contínua e biologicamente ativa, sem causar danos morfológicos à superfície dentinária. Estes autores sugerem que o emprego do composto de inclusão em baixas concentrações poderia diminuir os efeitos adversos da TC como a coloração dentária. Nos SLC da TC a partir da inclusão em ciclodextrinas, as baixas concentrações do fármaco empregadas alcançaram doses terapêuticas (CORTÉS *et al.*, 2001; PATARO *et al.*, 2003).

Sistemas compósitos combinam as propriedades de mais de uma classe de dispositivos. Dessa maneira, há a possibilidade de se poderem selecionar as características de diferentes grupos, combinando-os dentro de um único sistema, como, por exemplo, partículas poliméricas de copolímeros, associadas a antibióticos. As preparações compostas por polímeros biodegradáveis apresentam maior potencial de eficácia e aplicação prática (MEDLICOTT *et al.*, 1994).

Estes sistemas se caracterizam pela dissolução ou encapsulamento de fármacos em uma matriz polimérica. O fármaco fica isolado do meio externo por uma barreira física que impede sua dissolução rápida pelos fluidos biológicos. A forma ativa do fármaco vai sendo liberada de maneira controlada (à medida que o polímero degrada) e lenta. Estes sistemas têm sido utilizados para melhorar o crescimento ósseo e sua regeneração no tratamento de defeitos ósseos (KIM; KNOWLES; KIM, 2004).

Os polímeros biodegradáveis são amplamente empregados como SLFs. Nos últimos anos, vários produtos e processos foram desenvolvidos, a fim de se obter SLF, objetivando controlar a velocidade de liberação do fármaco, manter seu nível terapêutico por um período de tempo maior e também dirigir sua ação a um sítio específico. Tais características promoveriam redução de efeitos adversos e tóxicos, além da redução do número de administrações e maior adesão do paciente ao tratamento (LIMA *et al.*, 1999).

Os poliésteres alifáticos, poli (caprolactona) PCL e copolímeros dos ácidos lático e glicólico (PLGA) são os polímeros que sofrem biodegradação em meio biológico, são mais explorados em SLFs, além de formarem blendas. Este último apresenta um menor tempo para completa degradação *in vivo*, implicando em menor probabilidade de reações adversas, decorrentes, muitas das vezes, de fragmentos cristalinos liberados, cujo tempo de degradação seja excessivamente longo. Na prática, copolímeros de ácido lático e glicólico são os mais vantajosos e mais utilizados em SLF. Uma das vantagens é o menor tempo, devido à amorfização provocada pela quebra da regularidade entre as cadeias na presença do monômero em copolímeros de l-lactide com 25-70% em glicolide (REZENDE *et al.*, 2005).



A incorporação de BCP em dispositivos poliméricos oferece uma estrutura mineral que disponibiliza íons Cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e Fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) para a neoformação óssea, além de neutralizar os subprodutos ácidos da degradação polimérica. As biocerâmicas bifásicas (fosfato tricálcico e hidroxiapatita) são usadas para induzir a formação de tecido ósseo mineralizado e em cirurgia para reconstrução óssea. Os efeitos cruciais da HA podem ser visto na sua capacidade para aumentar o crescimento ósseo, adicionalmente pode facilitar a conversão do tecido fibroso em tecido ósseo. Segundo Ciapetti *et al.* (2003), a HA quando presente na estrutura do compósito, apresenta característica osteocondutora.

Diversos estudos mostram que a associação das características de rápida absorção do  $\beta$ -TCP com o suporte inerte de HA densa propiciou uma ativa reposição óssea, ativada por macrófagos, a partir dos tecidos ósseos adjacentes (HASHIMOTO-UOSHIMA *et al.*, 1995). Os trabalhos de Wykrota *et al.* (1998), em um estudo longitudinal de 14 anos utilizando a biocerâmica Osteosynt® para reconstruções de grandes perdas ósseas faciais e ortopédicas, inclusive no tratamento de osteomielites, mostraram condições satisfatórias em relação à resistência mecânica e o módulo de elasticidade do tecido ósseo neoformado. No estudo de Lobo *et al.* (2009), foi demonstrada a superior osteoindução intrínseca da biocerâmica Osteosynt® quando usada na forma granular para preenchimento de defeitos ósseos de 5 mm de diâmetro em fêmeas de coelhos, comparado-as com os grupos sem preenchimento.

A associação de materiais poliméricos e cerâmicos com características semelhantes aos tecidos alvo que se deseja substituir, a presença de porosidades, o controle da degradação, além da adição de DOX com liberação controlada e sustentada, permitem obter materiais que potencialmente apresentam as vantagens de estimular a reparação óssea, a atividade dos osteoblastos e aumento da densidade óssea (GORDON *et al.*, 1997). Trabalhos anteriores focaram no desenvolvimento de compósitos de biocerâmicas com polímeros (KIM; KNOWLES; KIM, 2004).

Em uma pesquisa em 2010, Gala-Garcia *et al.* (2010) sugeriram que BC/PLGA tem sido usado como andaime devido ao processo de biodegradação de PLGA. A degradação do polímero e a BC favoreceram o crescimento de tecido pulpar adjacente à exposição. Estes autores também concluíram que BC/PLGA é biocompatível com os fibroblastos humanos e aos macrófagos peritoneais, que a BC de composição bifásica pode ter agido como um estímulo fisiológico e âncora para neoformação de tecido. A viabilidade celular de fibroblastos humanos e da cultura de macrófagos peritoneais em contato com BC/PLGA materiais observada no estudo pode ser explicada pela biocompatibilidade de ambos os constituintes do material compósito. Além disso, os dados obtidos no estudo sugeriram que



BC/PLGA é um bom material com possível uso como agente de proteção pulpar direta, pois foi capaz de estimular reorganização do tecido pulpar e a formação de barreira de um tecido mineralizado que preencheu com sucesso a exposição da polpa.

Os resultados obtidos após testes de MTT após 24 horas, 7 e 14 dias de tratamento com compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD, concentração 25  $\mu$ g/mL, observados na Figura 14, sugeriram que a proliferação das células osteoblásticas, na presença do compósito, foi maior e apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, em todos os tempos experimentais (24 horas, 7 e 14 dias), sendo maior após 14 dias e que as células permaneceram viáveis e proliferando até esse período (Anexo 6). Os presentes resultados mostraram que, para uma dada dose, o efeito sobre a proliferação celular é tempo-dependente, isto é, um efeito inibitório inicial seguido por uma indução na proliferação celular com o decorrer do tempo.

Gomes *et al.* (2006) confirmam os resultados desta pesquisa, onde existiu um período proliferativo, que aumentou gradativamente com o tempo verificado nos períodos de 7 a 14 dias, seguido de um período de indução osteogênica onde houve diferenciação e redução da proliferação após a confluência celular. Segundo Gala-Garcia *et al.* (2010), estes resultados poderiam ser devido às hidrólises simultâneas de um polímero/cerâmica que pode ter fornecido um melhor ambiente fisiológico para odontoblastos que o polímero ou BC. Quanto mais comprometida com a diferenciação, menor é a capacidade proliferativa das células (MOUNTFOURD *et al.*, 2008). Ainda segundo este autor, a redução da capacidade proliferativa é apenas um estágio intermediário na maioria dos tecidos, ou seja, um balanço entre a diferenciação e a proliferação celular.

O compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25  $\mu$ g/mL foi maior e estatisticamente significante em relação à matriz BCP/PCL/PLGA em 7 dias, sendo maior após 14 dias. Estes resultados podem ser atribuídos à presença do composto de inclusão DOX/ $\beta$ CD no compósito, como já discutido anteriormente.

Os resultados da produção de fosfatase alcalina por osteoblastos após 7 e 14 dias de tratamento com compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25  $\mu$ g/mL, representados na Figura 16, sugeriram que a produção de FA pelas células osteoblásticas foi maior e apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, em todos os tempos experimentais (7 e 14 dias), mostrando uma produção maior na avaliação de 14 dias tanto em relação ao controle quanto ao período de 7 dias (Anexo 7). Gomes *et al.* (2006) também observaram que os níveis de FA do controle aumentaram com tempo de incubação de 14 dias, diminuindo significativamente após isso. A matriz BCP/PCL/PLGA,

assim como no teste de MTT, não apresentou diferença significativa em relação ao controle, porém após o período de 14 dias apresentou diferença significativa em relação à matriz de 7 dias. Além disso, o compósito foi maior e estatisticamente significativo em relação à matriz no período de 14 dias. Os valores de atividade de fosfatase alcalina observados neste estudo também se apresentaram elevados, desempenhando um papel essencial no processo de mineralização e proporcionando níveis elevados de íons fosfato para início da deposição mineral (SHIGA *et al.*, 2003).

Verificou-se um aumento na FA com o decorrer dos tempos experimentais, sendo maior no período de 14 dias. Em todos os grupos, as culturas contendo o compósito tiveram aumento gradativo em relação aos respectivos grupos controles de cada semana em estudo. Os resultados obtidos por este estudo estão de acordo com os dados encontrados na literatura (VALÉRIO *et al.*, 2005; MACHADO; VENTURA, 2007; BREYNER *et al.*, 2010, BOELONI *et al.*, 2009). Durante os 14 dias de diferenciação, a atividade da FA foi detectada, mostrando o estado ativo das células. A atividade da FA é uma indicação de diferenciação osteoblástica durante a osteogênese. A presença de FA na membrana das células está correlacionada com a deposição de matriz óssea pelos osteoblastos (OCARINO *et al.*, 2008).

Acredita-se que essa enzima possa facilitar o processo de mineralização pela clivagem dos grupamentos fosfato, levando tanto à diminuição da efetividade dos inibidores locais da calcificação quanto a um aumento ainda maior da concentração de fosfato nos locais de mineralização. Para que uma matriz orgânica seja mineralizada, é necessário que a mesma sofra a ação da FA para disponibilizar sítios de deposição do fosfato de cálcio nas fibras da matriz (TEN CATE, 1994). Portanto, essa enzima é um importante marcador da atividade fisiológica de osteoblastos, uma vez que, se a secreção da FA estiver diminuída ou inibida, haverá um bloqueio no processo de mineralização.

Estudos já demonstraram que a produção de FA pelos osteoblastos em contato com diferentes biomateriais tem um comportamento alterado, dependendo da composição destes (BEST; SIM; DOWNES, 1997), sendo então a verificação qualitativa e quantitativa da secreção desta enzima um parâmetro importante para análise dos efeitos causados no tecido ósseo, uma vez que ela reflete a atividade osteoblástica (HAJIME *et al.*, 1993). Um aumento na produção de FA já foi demonstrado quando os osteoblastos estão em presença de apatitas (NISHIO; AKIYAMA; KOBUKO, 2000). Quando comparado ao grupo controle, observou-se um aumento significativo na formação de precipitado de sais de *nitro blue tetrazolium* solubilizados provenientes da reação nos osteoblastos na presença do compósito. Este aumento apresentou diferença estatisticamente significativa.

Os resultados da produção de colágeno por osteoblastos após 7 e 14 dias de tratamento com compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD na concentração 25  $\mu$ g/mL, apresentados na Figura 17, sugeriram que a produção de colágeno pelas células osteoblásticas foi maior e apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, apenas após 14 dias (Anexo 8). A produção de colágeno, na presença do compósito, após o período de 14 dias foi maior e significativa em relação ao período de 7 dias. A matriz BCP/PCL/PLGA, assim como nos testes anteriores, não apresentou diferença significativa em relação ao controle, porém após o período de 14 dias apresentou diferença significativa em relação à matriz no período de 7 dias.

Observou-se o aumento gradativo da secreção de colágeno com o decorrer do tempo de cultura em meio osteogênico. Este resultado pode indicar que o compósito estimulou a proliferação celular, como verificado no processo de metabolização do MTT e na produção de FA pelas células cultivadas na presença do compósito em meio osteogênico. Zuk *et al.* (2002) concordam que pode-se relacionar o aumento de secreção de colágeno observado à atividade osteogênica, já que o teste de colágeno total é realizado para avaliar a osteogênese, uma vez que células de linhagem osteogênica são sabidamente produtoras de colágeno.

Na presente pesquisa, as células produziram mais colágeno no decorrer dos períodos analisados indicando que estas células sofreram osteogênese até os 14 dias de cultivo em meio osteogênico, produzindo matriz extracelular na presença do compósito. A alta atividade de produção de colágeno precede a calcificação da matriz óssea *in vitro* e *in vivo* e pode indicar que uma matriz inicial de colágeno precisa ser formada previamente para que a mineralização possa ocorrer. Esses dados corroboram com o encontrado por Gerstenfeld *et al.* (1988).

Ao comparar os resultados do compósito (BCP/PCL/PLGA/DOX/ $\beta$ CD) em relação ao compósito (BCP/PCL/PLGA), verificou-se que a produção de colágeno na presença da DOX/ $\beta$ CD foi superior. Uma possível explicação para esta observação pode ser relacionada à diferente velocidade de degradação deste compósito. Valério *et al.* (2005) concordam que este material não pode ser tratado termicamente, como ocorre no caso do compósito de vidro, devido à presença da fase polimérica. Assim, pode-se esperar que a rede inorgânica do material compósito seja mais aberta e mais susceptível à degradação.

O colágeno é um componente de matriz extracelular que promove adesão celular e está presente nos mais diversos tecidos. É secretado por diversos tipos celulares, dentre eles, os osteoblastos. Sua detecção pode ser realizada analisando o sobrenadante celular. Os osteoblastos secretam uma matriz colágeno-proteoglicana que é capaz de se ligar a sais de cálcio. Através dessa ligação, a matriz osteóide se torna calcificada. A produção de colágeno,

portanto, é um evento importante para o processo de ossificação e a sua medição pode ser considerada um indicador de osteogênese (MACHADO; VENTURA, 2007).

No processo de reparação óssea, é de fundamental importância que as células estejam viáveis e proliferando em alta taxa, uma vez que é necessário um rápido preenchimento do espaço lesado para evitar formação de tecido fibroso. A produção aumentada de colágeno estimulada pelo compósito pode favorecer a rápida reconstituição óssea quando isso for desejável. Esse fator é de extrema importância em termos de formação de um pré-tecido ósseo, pois a produção de colágeno aumentada em relação ao grupo controle permitiria um rápido preenchimento da matriz (VALÉRIO *et al.*, 2005).

Estudos em modelos animais com doença de deficiência óssea mostraram que as TCs aumentam a síntese de colágeno tipo I. Além disso, estudos recentes demonstraram que esses agentes podem também aumentar a síntese de colágeno em tecidos moles. É bem conhecido que uma matriz colagenosa estável é importante para a progressão da diferenciação dos osteoblastos. Estudos mostram que a inibição da síntese de colágeno ou a sua degradação aumentada conduz a um comprometimento da célula osteoblástica (PORNPRASERTSUK *et al.*, 2005). Deste modo, a modulação da matriz extracelular por TCs poderia favorecer a proliferação celular osteoblástica. É sabido que as células osteoblásticas respondem ao íon cálcio dependente da concentração, em relação à proliferação e expressão de vários marcadores, incluindo a síntese de colágeno de tipo I. Uma variedade de estudos sugerem que o íon cálcio, atuando através do seu receptor (CaSR), é um regulador chave da célula osteoblástica. Deste modo, as flutuações locais nos níveis de íons cálcio, associado à propriedade das TCs na quelação do cálcio, podem modular o comportamento das células osteoblásticas (DVORAK *et al.*, 2004).

Para identificação de estruturas mineralizadas, foi realizado o processo de coloração do tipo Von Kossa, como observado nas Figuras 18 e 19 que apresentam os resultados de marcação por Von Kossa das células submetidas à indução osteogênica na presença do compósito após 14 dias. Na apresentação dos resultados, o núcleo ficou corado de vermelho, o citoplasma de rosa e o cálcio de preto. Verificou-se apenas visualmente a atividade osteogênica das células, através da formação dos nódulos de mineralização no período de 14 dias. Nas duas semanas, as células osteoblásticas foram progressivamente incorporadas pela matriz mineralizada e incapazes de proliferar. Resultados similares foram observados para a marcação das células cultivadas na ausência do compósito (grupo controle) e na presença da matriz (BCP/PCL/PLGA).

As culturas de células osteoblásticas em atividade osteogênica coraram-se positivamente para esse tipo de coloração. Após duas semanas da adição de meio indutor osteogênico, puderam ser observadas, na cultura, formações mineralizadas semelhantes a nódulos ósseos, corroborando com os achados por outros autores. Na literatura, autores afirmam que a positividade de formação de estruturas mineralizadas para Von Kossa é indicadora de células de linhagem osteogênica, bem como de suas precursoras (SUGIURA; KITO; ISHIGURO, 2004; OGAWA *et al.*, 2004).

Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina (1970) documentaram a capacidade osteogênica *in vitro* e *in vivo* de células derivadas da medula de roedores. Quando cultivadas em condições que permitam a mineralização, as colônias eram avaliadas pela formação de “nódulos ósseos”. Huang e colaboradores (2004) relataram que estas estruturas visualizadas a partir da segunda semana e que atingiram maior número a partir da quarta semana de indução, ocorriam nas culturas de células-tronco mesenquimais extraídas da medula de ratos. Entretanto, a simples observação destas estruturas nas culturas do presente trabalho permitiu notar que se formaram nódulos de mineralização em meio osteogênico a partir da segunda semana de cultivo, evidenciando a diferenciação em osteoblastos.

Apesar da capacidade osteogênica de células osteoblásticas *in vitro* ser comprovada através de ensaios como azul de trypan, produção de FA, dosagem de colágeno, marcação por Von Kossa e TC, imunofluorescência e *Real Time* PCR com marcadores específicos como osteocalcina e por diversos outros pesquisadores, vastamente relatados na literatura, apenas células não são capazes de formar tecidos funcionais. É necessária uma matriz que funcione como suporte para colonização e otimização da diferenciação osteogênica de células-tronco, além de permitir um crescimento celular ordenado (CANCEDDA, 2003).

Acredita-se que a matriz exibiu um comportamento osteoindutor e osteocondutor em cultura de células odontoblásticas, ou seja, o compósito não só permitiu a viabilidade celular como favoreceu a proliferação das células que estavam se diferenciando, fato observado nos experimentos de viabilidade celular. Esse resultado pode ter interferido diretamente nos resultados referentes à FA e colágeno devido à proliferação celular e à atividade osteogênica no período de 14 dias decorrente da presença do compósito.

A MEV dos compósitos mostrou uma estrutura altamente porosa com microporos intercomunicantes, inclusive com os microporos, na faixa de 1  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$  (Figura 20 C, D), que aumentam o contato tecidual, a solubilidade, absorção de moléculas e a capacidade de trocas com os líquidos orgânicos, além de poros intermediários de 10  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$ , conforme se observa na Figura 20B, que aumentam a adesão dos osteoblastos (WYKROTA *et al.*,

1998). Essa estrutura arquitetônica porosa está indicada como um importante veículo condutor e liberador de fármacos ou outras substâncias por um período determinado, assim como sua topografia superficial permite atividade metabólica osteoblástica e expressão desejável dos fenótipos de neoformação tecidual.

Diversos estudos demonstraram que uma microestrutura altamente porosa, caracterizada por distribuição dos poros, aumenta a superfície para o acesso das células ao interior desses poros e fornece o espaço necessário para a migração destas. O tamanho do poro é o fator chave que promove uma distribuição uniforme de células. Além disso, a presença de poros interconectados melhora a difusão dos metabólitos e produtos secretados pelas células (DESAI, 2000; MOK *et al.*, 2003).

Arcabouços porosos com uma grande razão da área pelo volume são necessários para maximizar o espaço para a adesão e crescimento celular, produção de matriz extracelular e vascularização. Para se conseguir uma grande área por volume necessária para a ancoragem de células, poros pequenos são preferíveis, desde que o tamanho dos poros seja maior que o diâmetro de uma célula em suspensão, tipicamente 10 $\mu$ m. Entretanto, poros maiores podem ser requeridos para a migração celular, crescimento e produção de matriz extracelular, como os compósitos apresentados neste estudo (TEMENOFF *et al.*, 1999).

A porosidade é um fator crítico para a migração celular e elaboração de uma matriz óssea. Boyan *et al.* (1996) reportaram que os osteoblastos preferem poros com tamanhos variando de 200 a 400 $\mu$ m de diâmetro para facilitar a migração, adesão e proliferação. Coombes *et al.* (2004) relatam que o crescimento ósseo foi observado em um dispositivo de polímero poroso quando o tamanho médio destes era de 450 $\mu$ m, e que em poros menores que 100 $\mu$ m formou tecido conectivo e que em poros maiores que 1000 $\mu$ m ocorreu migração vascular significativa. Esse fato pode ser explicado pela curvatura do poro que provê ótima compressão e tensão nos mecanorreceptores celulares, permitindo que eles migrem para as aberturas de tamanhos específicos. (BAKSH e DAVIES, 1999).

Andaimes de materiais orgânicos e inorgânicos biodegradáveis para a engenharia de tecidos óssea devem apresentar macroporosidade, que diminui o problema da oclusão dos poros e a não adesão celular em um estágio *in vitro* da engenharia de tecidos. Além disso, deve haver uma intercomunicação dessas macroporosidades para permitir o crescimento ósseo de uma forma tri-dimensional por toda a estrutura. Essa propriedade pode ser otimizada em um estágio *in vitro*, através do emprego de condições de cultura dinâmicas (BAKSH e DAVIES, 1999).

A microporosidade influencia na performance biológica dos fosfatos de cálcio *in vivo*, uma vez que a taxa e distribuição da osteogênese por volta e ao longo do enxerto são afetadas pelo número e tamanho dos canais intercomunicantes. A porosidade pode afetar importantes propriedades mecânicas de um polímero. Pode reduzir sua maleabilidade e aumentar sua fragilidade (BAKSH e DAVIES, 1999).

Fosfatos de cálcio como a hidroxiapatita são conhecidos por serem osteocondutores e bioativos. Isto significa que eles agem como um modelo ao longo do qual pode ocorrer o crescimento ósseo (PATARO *et al.*, 2007). Chu, Zhu e Yin (2006) mostraram que a associação de osteoblastos a um compósito de constituição 20% de BCP e 80% de hidroxiapatita sintética induziu a formação de tecido osteóide em subcutâneo de coelhos mais rapidamente, se comparados ao grupo que continha células mesenquimais indiferenciadas.

Goshima e Caplan (1991a, 1991b) estão entre os primeiros cientistas que mostraram que a associação de CTMs de ratos a uma cerâmica bifásica resulta em um forte potencial osteogênico. Após a implantação dessas cerâmicas com percentagem majoritária de fosfato e cálcio associada às CTMs, Goshima e Caplan (1991a, 1991b) observaram, entre os poros da cerâmica, tecido ósseo formado a partir da segunda semana de implantação em dorso de ratos.

Dentre os vários estudos realizados em sítio ectópico intramuscular e subcutâneo, os trabalhos de Kruyt *et al.* (2004a, 2004b) demonstraram que foi possível colonizar osteoblastos em um andaime de cerâmica bifásica em subcutâneo de cabras e que as dimensões dos poros do compósito em estudo desempenharam um papel fundamental nas propriedades de osteocondução e diferenciação osteogênica das CTMs. Ele também comparou dois grupos: o primeiro grupo apenas com o compósito sem células e o segundo grupo com compósito colonizado verificando formação de tecido osteóide a partir da segunda semana no grupo contendo células (KRUYT *et al.*, 2004a, 2004b).

As propriedades osteogênicas são características exclusivas referentes a materiais orgânicos ou aos enxertos autógenos, os quais são capazes de estimular o crescimento ósseo, oriundo de células transferidas do interior do enxerto. A neoformação óssea é processada diretamente a partir dos osteoblastos. Nos primeiros três dias após a instalação do enxerto, inicia-se uma intensa atividade celular, quando os capilares podem ser vistos penetrando no enxerto, devido ao processo de angiogênese (KUSIAK; WHITAKER, 1985).

Visando reparar defeitos em variados sítios ósseos, utiliza-se de osso autógeno em muitos casos clínicos, porém nem sempre essa escolha é adequada, pois estes ossos nem sempre estão disponíveis ou adequados para casos específicos, como substituição de grandes áreas do osso que necessitam ser substituídas ou em pacientes que já sofreram vários

procedimentos cirúrgicos em reconstrução óssea. Outra questão é a viabilidade de obtenção de osso humano em quantidade, isento de vírus como o da AIDS e da hepatite B, aliada à proibição pelas leis de vários países de comercialização de órgãos humanos ou de suas partes.

Essa dificuldade tem levado ao lançamento no mercado de diversos biomateriais como alternativa no tratamento de lesões ósseas permanentes (GOLDBERG; SMITH, 2004). Estes autores também verificaram que os resultados clínicos dos procedimentos dos enxertos ósseos dependem de muitos fatores, incluindo o tipo e os métodos de fixação, o local e o estado do hospedeiro.



## 8 CONCLUSÕES

A concentração de 25 µg/mL de doxiciclina livre favoreceu de forma significativa todos os parâmetros de osteogênese analisados, sendo esses maiores após o encapsulamento molecular em β-ciclodextrina. Além disso, a microestrutura obtida mostrou porosidade apropriada para a proliferação celular de osteoblastos sugerindo que o compósito BCP/PCL/PLGA/DOX/βCD é promissor para a utilização na engenharia de tecido ósseo.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

As pesquisas envolvendo a aplicação do compósito BCP/PLGA/PCL/DOX/ $\beta$ CD estão na sua fase inicial e uma de suas possíveis aplicações seria na engenharia de tecidos. Em função dos resultados obtidos nesse trabalho, sugere-se realizar experimentos *in vivo* para avaliar histologicamente a ação do compósito sobre o tecido ósseo, o qual representaria a continuidade de pesquisa com biomateriais. Sugere-se ainda a realização de testes microbiológicos, de liberação controlada e do período de degradação. Em consequência, obter uma evidência científica mais forte que permita saber a real eficácia na utilização do compósito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. *et al.* **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms**. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2007.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. The role of controlled drug delivery for periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, p. 125-140, 2000.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 667-81, 2000.
- ARINZEH, T. L. *et al.* A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. **Biomaterials**. v. 26, n. 17, p. 3631-8, 2005.
- AUBIN, J. E. Regulation of osteoblast formation and function. **Rev. Endocr. Metab. Disord.** v.2, n. 1, p. 81-94, 2001.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BADERSTEN, A. *et al.* Effect of nonsurgical periodontal therapy. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 11, p.63-76, 1984.
- BAKSH D, DAVIES JE. Design Strategies for 3-Dimensional In Vitro Bone Growth in Tissue-Engineering Scaffolds. In: **Davies JE. Bone Engineering**. Toronto: Rainbow Grafic; 1999. p. 488-95
- BARBANTI, S. H. *et al.* 2005. Polímeros reabsorvíveis na Engenharia de Tecidos - artigo de revisão. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.
- BEST, S.; SIM, B.; DOWNES, S. The dependence of osteoblastic response on variations in composition and physical properties of hydroxyapatite. **J. Mat. Sci.**, v. 8, p. 97-103, 1997.
- BETTANY, N. M. *et al.* Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. **Bone**, v. 27, p. 75-80, 2000.
- BEZERRA, M. M. *et al.* Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Fortaleza, v. 35, n. 5, p. 613-616, mar. 2002.
- BLACK J. Composition and structure of bone. In: NETTER, F. H. **The collection of medical illustrations: musculoskeletal system**. New Jersey. 1991. p.171- 172.
- BOELONI, J. N. *et al.* Dose-Dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic, 2009.
- BOSCHI, A. O. O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial? **Anais...** 50º Congresso Anual da ABM, São Pedro - São Paulo, 1995.

BOYAN, B. D. *et al.* Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, v.17, n. 2, p. 137-146, 1996.

BOYAN, B. D. *et al.* Bone and cartilage tissue engineering. **Clin Plast Surg.**, Philadelphia, v. 26, n.1, p. 81-91, 2003.

BORGMAN R.J. Biodisponibilidade, dosagens e novas formas de apresentação. Craig RC, Stitzel RE. **Farmacologia Moderna** 4ª Ed. São Paulo: Roca Livraria Ltda; 1986. Cap.6.

BRACHVOGEL, B. *et al.* Annexin A5 is not essential for skeletal development. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, n. 8, p. 2907-13, 2003.

BREYNER, N. M. *et al.* Effect of a three-dimensional chitosan porous scaffold on the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. **Cells Tissues Organs**, v. 191, n. 2, p. 119-28, 2010.

BUCKWALTER, J. A. *et al.* Bone Biology. Part I. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 77, p. 1256-1260, 1995.

BURNS FR, STACK MS, GRAY RD, PATERSON CA. Inhibition of purified collagenase from alkali- burned rabbit corneas. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 30: 1569–1575, 1989.

BUTLER, K. R. Jr.; BENGHUZZI, H. A. Morphometric analysis of the hormonal effect on tissue-implant response associated with TCP bioceramic implants. **Biomed. Sci. Instrum.**, v. 39, p. 535-40, 2003.

CANCEDDA, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biol.**, v. 22, p. 81-91, 2003.

CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive Materials. **Ceramica International**, v. 22, p. 493-507, 1996.

CAO H and Kuboyama N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering **Bone** (2010) 386-95.

CASTRO, M. M. *et al.* Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. **Matrix Biol.**, v. 29, n. 3, p. 194-201, 2010.

CHANG, C. C. *et al.* Monoclonal phenotypic profile of myeloid cells in granulocytic sarcoma by immunohistochemistry. Correlation with blast differentiation in bone marrow. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 114, n. 5, p. 807-11, 2000.

CHAUDHARY, L. R.; AVIOLI, L.V. Dexamethasone regulates IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ -induced interleukin-8 production in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. In: **Calcif. Tissue Int.**, v. 55, p. 16-20, 1994.

CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, n.33, p. 6565-78, 2005.

CHOI, S. J.; HAN, J. H.; ROODMAN, G. D. ADAM8: a novel osteoclast stimulating factor. **J. Bone Miner. Res.**, v. 16, p. 814-822, 2001.

CHU CL, X. X., Zhu JC, Yin ZD. (2006). "In vivo study on biocompatibility and bonding strength of hydroxyapatite-20vol%Ti composite with bone tissues in the rabbit." **Biomed Mater Eng.** 16(3): 203-13.

CIANCIO, S. G. *et al.* Tissue concentration and localization of tetracycline following site-specific tetracycline fiber therapy. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, p. 849-853, 1992.

CIAPETTI, G. *et al.* Osteoblast growth and function in porous poly  $\epsilon$ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3815-3824, 2003.

CLINICAL APPLICATIONS OF BIOMATERIALS. **NIH Consens Statement**, v. 4, n. 5, p. 1-19, nov. 1982.

COELHO, M. J.; PINA, C.; FERRAZ, M. P. Efeito da doxiciclina e da minociclina em células osteoblásticas humanas: estudos *in vitro*. CEBIME D, Faculdade de Ciências da Saúde – UFP, 2006.

COLAIZZI JL, KLINK PR. pH-Partition behavior of tetracyclines. **J Pharm Sci** 58: 1184–1189, 1969.

COOMBES, A. G. A. *et al.* Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 315-325, 2004.

CORMACK, D. H. **Histologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

CORTÉS, M. E. **Estudo dos compostos de inclusão tipo hospedeiro convidado entre a clorexidina e a  $\beta$ -ciclodextrina: Avaliação *in vitro***. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

CORTÉS, M. E. *et al.* The chlorhexidine:beta-ciclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. **J. Inclusion Phen Macrocylic Chem**, v. 40, p. 297- 302, 2001.

CROUT, R. J. *et al.* The cyclic regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 506-514, may 1996.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Citotoxicity analysis of bioceramics for use in systems of implantations. **Revista Matéria**, v. 12, p. 134-9, 2007.

DAHL, E. L. *et al.* Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite Plasmodium falciparum. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 3124-3131, 2006.

DAI, N. T. *et al.* Human single-donor composite skin substitutes based on collagen and polycaprolactone copolymer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 386, n. 1, p. 21-25, 2009.

DESAI, T. A. Micro-and nanoscale structures for tissue engineering constructs. **Med. Eng. Phys.**, v. 22, p. 595-606, 2000.

DIENER A. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 383-392, 2005.

DINIZ, H. F. **Nanoagregados baseados em ciclodextrinas em associação com a tetraciclina:** caracterização físico-química e avaliação antimicrobiana. 2007. Tese (Mestrado). Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG, 2007.

DVORAK, M. *et al.* Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. **PNAS**, v. 101, p. 5140-5, 2004.

DZIAK, R. Biochemical and molecular mediators of bone metabolism. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 407-15, 1993.

EL-GHANNAM, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. **Expert Rev. Med. Devices**, v. 2, n. 1, p. 87-101, jan. 2005

FARREL, S.; HESKETH, R. P. An introduction to drug delivery for Chemical Engineers. Disponível em: <<http://engineering.eng.rowan.edu/~hesketh/hesketh/cee%20drug%20delivery.pdf>> Companies involved in polymeric drug delivery.htm> Acesso em: julho de 2011.

FILHO, N. A., OLIVEIRA, A. G. Sistemas de micro/nanoencapsulamento de fármacos. Disponível em: <<http://www.farmabrasil.hpg.ig.com.br/fisqui9.htm>> Acesso em: julho de 2011.

FITCH, W. M., R. M. BUSH, C. A. BENDER, and N. J. COX. 1997. Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:7712– 7718.

FRANCO, N.C. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. *e x p e r i m e n t a l c e l l r e s e a r c h* 3 1 7 ( 2 0 1 1 ) 1 4 5 4 – 1 4 6 4

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. O desenvolvimento de colônias de fibroblastos em culturas de monocamada de guinea-pig medula óssea e baço. **Cell Tissue Kinet**, v. 3, p. 393-403, 1970.

GALA-GARCIA, A. *et al.* Bioceramic/poly (glycolic)-poly (lactic acid) composite induces mineralized barrier after direct capping of rat pulp tissue. **Braz. Oral Res.**, v. 24, p. 8-14, 2010.

GARLET G. *et al.* Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, p. 671-9, 2004.

GENNARO, A. R. Remington: the science and practice of pharmacy. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2007.

GEORGES, S. *et al.* Proteases and bone remodeling. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n. 1, p. 29-41, 2009.

GERSTENFELD, L. *et al.* Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralisation in cultures of chicken embryo osteoblasts. **J. Cell Biol.**, v. 106, p. 979-89, 1988.

GHANDEHARI, H. **Phar 535**: controlled drug release. Disponível em: <[https://rxsecure.umaryland.edu/courses/PHAR535/lecture\\_handouts/Intro\\_CR/Introduccion%20to%20Controlled%20Drug%20Delivery.pdf](https://rxsecure.umaryland.edu/courses/PHAR535/lecture_handouts/Intro_CR/Introduccion%20to%20Controlled%20Drug%20Delivery.pdf)>. Acesso em julho de 2011.

GHANDEHARI, H.; DANDU R. Delivery of bioactive agents from recombinant polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 1008-1030, 2007.

GLEZER, A. S. *et al.* Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitivity bioassay". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 91, p. 1048-1055, 2006.

GOLDBERG, M.; SMITH, A. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp. A biological basis for repair and tissue engineering. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 15, n. 1, p. 13-27, jan. 2004.

GOLUB, R. T. *et al.* A non-antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in rats. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 732, p. 96-111, 1994.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells. **Archives of oral biology**, v. 5, n. 2, p. 251-259, 2006.

GOODSON, J. *et al.* Multi-center evaluation of tetracycline fiber therapy: I. Experimental design, methods and baseline data. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 26, p. 361-370, 1991.

GORDON, E. *et al.* A zinc based self setting ceramic bone substitute for local delivery of testosterone. **Biomed. Sci. Instrum.**, v. 33, p. 131-6, 1997.

GOSHIMA, J, G. V.; CAPLAN, A. I. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 269, p. 274-83, 1991a.

GOSHIMA, J, G. V.; CAPLAN, A. I. Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. **Biomaterials**, v. 12, n. 2, p. 253-8, 1991b.

GRENIER, D. *et al.* Inhibition of proteolytic, serpinolytic, and progelatinase-b activation activities of periodontopathogens by doxycycline and the non-antimicrobial chemically modified tetracycline derivatives. **J. Periodontol.**, v. 73, p. 79-85, 2002.

GREVSTAD, H. J.; BOE O. E. Effect of doxycycline on surgically induced osteoclast recruitment in the rat. **J. Oral Sciences**, Bergen, v. 103, n. 3, p. 156-159, jan. 1995.

GHANDEHARI, H. Phar 535: controlled drug release. Disponível em <[https://rxsecure.umaryland.edu/courses/PHAR535/lecture\\_handouts/Intro\\_CR/Introductio n%20to%20Controlled%20Drug%20Delivery.pdf](https://rxsecure.umaryland.edu/courses/PHAR535/lecture_handouts/Intro_CR/Introductio n%20to%20Controlled%20Drug%20Delivery.pdf)>. Acesso em julho de 2011.

GRIFFITH, A. W. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. Review. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 2, p. 237-68, 2002.

GU, F. *et al.* In situ and non-invasive detection of specific bacterial species in oral biofilms using fluorescently labeled monoclonal antibodies. **J. Microbiol. Methods**, v. 62, p. 145-60, 2005.

GUIMARÃES, S. Tetraciclina e cloranfenicol. In: GARRETT, J., OSSWALD, W., GUIMARÃES, S. (ed.). Terapêutica Medicamentosa e suas bases farmacológicas. **Manual de Farmacologia e Farmacoterapia**, v. 2, p. 935-944, Porto Editora, 1997.

HAJIME, O. *et al.* Osteogenic differentiation of stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. **J. Biom. Mat. Res.**, v. 27, p. 401-7, 1993.

HASHIMOTO-UOSHIMA, M. *et al.* Clinical and histologic observation of replacement of biphasic calcium phosphate by bone tissue in monkeys. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 15, p. 204-213, apr.1995.

HEALY, K. E. Molecular engineering of materials for bioreactivity. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 4, p. 381-387, 1999.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v.19, n. 16, p. 1419-1423, 1998.

HENCH, L. L. Genetic design of bioactive glass. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 7, p. 1257-1265, 2008.

HENCH, L. L. *et al.* Bioactive materials to control cell cycle. **Mat. Res. Innovat.**, v. 3, p. 313-323, 2000.

HEYMANN, D. Cytokine family and bone cells. **Cutokyne**, v. 12, p. 1455-1468, 2000.

HIRAYAMA, F. *et al.* Yclodextrin conjugate based controlled release system: repeated and prolonged releases of ketoprofen after oral administration in rats. **J. Control Release**, v. 82, p. 407-16, 2002.

HOLMES, K. *et al.* Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. **Bone**, v. 35, p. 471-478, 2004.

HOLMES, R. E. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in metaphyseal defects: a histometric study. **Journal Bone Joint Surger**, v. 68A, n. 4, p. 904-911, 1986.

HUANG, M. H. *et al.* Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of epsilon-caprolactone in the presence of poly (ethylene glycol). **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 69, n. 3, p. 417-427, jun. 2004.



HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, n. 21, v. 24, p. 2529-43, 2000.

IKADA, Y. *et al.* Challenges in tissue engineering. **J.R.Soc Interface**, v. 3, p. 589-601, 2006.

JALIL, R.; NIXON, J. R. Biodegradable poly(lactid acid) and poly(lactide-co-glycolid) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. **J. Microencapsul.**, v. 7, n. 3, p. 297-325, 1990.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **Microbiol. Letters**, v. 236, p. 163-73, 2004.

JENNING, V.; SCHAFFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **Journal of Controlled Release**, v. 66, p. 115-126, 2000.

JORGE, J. H.; GIAMPAOLO, E. T.; PAVARINA, A. C. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 33, p. 65-8, 2004.

KAPLAN, F. S. Physical factors in bone remodeling. In: NETTER, F. H. **The collection of medical illustrations: musculoskeletal system**. New Jersey: Summit, 1991. p.187.

KIM, H. W.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. E. Hydroxyapatite/ poly ( $\epsilon$ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone compósito for drug delivery. **Biomaterials**, v. 25, n. 7-8, p. 1279-1287, 2004.

KINANE, D. F.; RADVAR, M. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 70, p. 1-7, 1999.

KOTWAL, V. B. *et al.* Biodegradable polymers: Which, when and why? **Indian J. Pharmaceut. Sci.**, v. 69, p. 616-625, 2007.

KRUYT, M. C. *et al.* Genetic marking with the DeltaLNGFR-gene for tracing goat cells in bone tissue engineering. **J. Orthop. Res.**, v. 22, n. 4, p. 697-702, 2004a.

KRUYT, M. C. *et al.* Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. **J. Orthop. Res.**, v. 22, n. 3, p. 544-51, 2004b.

KUSIAK J. F.; WHITAKER L. A. The early revascularization of membranous bone. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 76, n. 4, p. 510-6, 1985.

LANGER R. New methods of drugs delivery. **Science**, v. 249, p. 1527-33, 1990.

LANGER R. Tissue engineering (Review). **Molecular Therapy**, v. 1, n. 1, p. 12-15, 2000.

LANGER, R.; PEPPAS, N.A. Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology. **AICHE J.**, New York, v. 49, n. 12, p. 2990-3006, 2003.

LANGER R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering (Review). **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-6, 1993.

- LEE, H. M. *et al.* Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. **J. Periodontol.**, v.75, n. 3, p. 453-63, 2004.
- LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Ad. Dent. Res.*, v. 2, n. 1, p. 164-180, aug. 1988.
- LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem. Rev.*, v. 108, n. 11, p. 4742-4753, nov. 2008.
- LEGEROS, R. Z. *et al.* Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 14, n. 3, p. 201-209, mar. 2003.
- LI, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 48, n. 3, p. 342-353, apr. 1999.
- LI, W. J. *et al.* Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous compósito. **Biomaterials**, v. 26, n. 25, p. 5158-5166, 2005.
- LIMA K. M; JÚNIOR, J. M. R. Poly-dl-lactide-co-glycolide microsphere as a controlled release antigen delivery system. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 171-180, 1999.
- LIN, F. H. *et al.* Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde crosslinked. **Biomaterials**, v. 19, p. 905-917, may. 1998.
- LINDHE, J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- LIU, S., MAHESHWARI, R., AND KIICK, K. L. Polymer Therapeutics, **Macromolecules**, 42(1), 3-13 (2009).
- LLOYD-EVANS, M. Regulation tissue engineering. **Materials Today**, p. 48, may 2004.
- LOBO, S. E. *et al.* Quantification of bone mass gain in response to the application of biphasic bioceramics and platelet concentrate in critical-size bone defects. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 20, n. 5, p. 1137-1147, may 2009.
- LOFTSSON, T.; MASSON, M. M. Cyclodextrins in topical drug formulations: Theory and practice. **Int. J. Pharmaceutics**, v. 225, p. 15-30, 2001.
- LORENZO, M. *et al.* Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. **Endocr. Rev.**, v. 29, p. 403-440, 2008.
- MACHADO, C. B.; VENTURA, J. M. 3D chitosan-gelatin-chondroitin porous scaffold improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Biomed. Mater.**, v. 2, n.2, p. 124-31, jun. 2007.
- MARINHO, R. M. **Climatério**. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica, 1995.

MARTINDALE. **The complete drug reference**. 32. ed. Ed. Parfitt, K. Pharmaceutical Press, p. 202-227, 1999.

MASSON, M. *et al.* Stabilization of ionic drugs through complexation with non ionic and ionic cyclodextrins. **Int. J. Pharmaceutics**, v. 164, n. 1-2, p. 45-55, 1998.

MATTA, E. N. R. *et al.* Cytotoxicity Evaluation in vitro of Orthodontic Elastic Showing Superficial Treatment. **J. Bras. Ortodon. Ortop. Facial**, v. 9, p. 587-93, 2004.

MEDLICOTT, N. J. *et al.* Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 13, p. 181-203, 1994.

MEN, Y. *et al.* Induction of a cytotoxic T lymphocyte response by immunization with a malaria specific CTL peptide entrapped in biodegradable polymer microspheres. **Vaccine**, Amsterdam, v. 15, n.12/13, p. 1405-1412, 1997.

MIRTH, D. B. Controlled-release therapeutic systems:technology applicable to the treatment of oral disease. **Adv. Dent. Res.**, v. 1, n. 1, p. 109-18, 1987.

MOK, P. L. *et al.* Isolation and identification of putative mesenchymal stem cells from bone marrow. **Malays J. Pathol.**, v. 25, n. 2, p. 121-7, 2003.

MOMBELLI, A. *et al.* Topographic distribution of black-pigmenting anaerobes before and after periodontal treatment by local delivery of tetracycline. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, p. 906-913, 1996.

MOMBELLI, A.; SAMARANAYAKE, L .P. Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. **Int. Dent. J.**, v. 54, n. 1, p. 3-14, feb. 2004.

MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n.1, p. 255-63, 1983.

MOUNTFORD J. C. *et al.* Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. **Transfusion Medicine**, v. 18, p. 1-12, 2008.

MUNDY, G. R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. **J. Periodontal Res.**, v. 26, p. 213-7, 1991.

MURTY, M. V. S.; GRULKE, E. A, BHATTACHARYYA D. Polymer Degad. **Stab.**, v. 61, p. 421, 1998.

MYLOTTE, J. M. General principles of antiinfective therapy. In: GENCO, R. J.; GOLDMAN, H. M.; COHEN, D. W. **Contemporary periodontics**. St Louise: The CV Mosby Company, 1990.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. **Progr. Polymer Sci.**, v. 32, p.762, 2007.

NAKAMURA, M. *et al.* The In vitro Testing of Cytotoxicity and Cell Adhesion of Biomaterials in Dental Field". In: **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**, part B: Applications, New York: Marcel Dekker, v. 2, p.1431-1468, 1995.

NISHIO, K.; AKIYAMA, H.; KOBUKO, T. The effect of alkali and heat treated titanium and apatite formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells". **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 52, p. 652-661, 2000.

NOMURA, S; TAKANO, T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. **Matrix Biol.**, v. 19, p. 91-96, 2000.

OCARINO, N. M; *et al.* Behavior of stem cell stained by 4,6 diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) in culture. **Cell Biology and Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 175-83, 2008.

ONG, S. M. Doxycycline inhibits bone resorption by human interface membrane cells from aseptically loose hip replacements. **The journal of bone and joint surgery**, 2002.

OGAWA, R. *et al.* Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. **J. Nippon Med. Sch.**, v. 71, n. 4, p. 240-1, 2004.

OLIVEIRA, P. T.; NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 403-413, 2004.

ORÉFICE, R. L. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p. 59-250; 283-298; 479-506.

PARFITT, A. M. Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. **J. Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 2, n. 6, p. 499-500, 2002.

PATARO, A. L. **Avaliação Biológica de Compósitos de Polímeros Biodegradáveis em uma Matriz fosfato com Adição de TC**. 2005. Dissertação (Mestrado). Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia - UFMG, 2005.

PATARO, A. L. *et al.* Surface effects and desorption of tetracycline supramolecular complex on bovine dentine. **Biomaterials**, v. 24, p. 1075-80, 2003.

PATARO, A. L. *et al.* Polymer: bioceramic composites optimization by tetracycline addition. **Int. J. Pharm.**, v. 336, n. 1, p. 75-81, 2007.

PEPPES, N. A. **In Hydrogels in Medicine and Pharmacy**. CRC Press, Inc.: Boca Raton, 1987.

PEREIRA, M. M. *et al.* Cytotoxicity evaluation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams prepared by the sol-gel method. **Key Engineering Materials**, v. 284, p. 589-592, 2005.

PETERSON, J. T. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. **Heart Fail Rev.**, v. 9, p. 63-79, 2004.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, p. 491, 2007.

PINHEIRO, A. L. B.; LIMEIRA JUNIOR, F. A., GERBI, M. E. M. Effect of 830 nm laser light on the repairs of bone defects grafted with inorganic bovine bone and calcified cortical osseous membrane. **J. Clin. Laser Med.**, v. 21, p. 383-388, 2003.

PITT, C. G. *et al.* Aliphatic polyester. 2. The degradation of poly(D-L-lactide), poly( $\epsilon$ -caprolactone) their copolymers in vivo. **Biomaterials**, v. 2, p. 215-220, 1981.

POLSON, A. *et al.* Enhancement of alveolar bone formation after tetracycline administration in squirrel monkeys. **J. Appl. Res. Clin. Dentist**, p. 32-42, 2005.

PORNPRASERTSUK, S. *et al.* Overexpression of lysyl hydroxylase-2b leads to defective collagen fibrillogenesis and matrix mineralisation. **J. Bone Miner Res.**, v. 20, p. 81-7, 2005.

PRADO DA SILVA, M. H. Recobrimento de titânio com hidroxiapatita: desenvolvimento de processo de deposição eletrolítica e caracterização biológica *in vitro*. Tese (Doutorado) - COPPE/UFRJ, 1999.

PRESHAW, P. M. Antibiotics in the treatment of periodontitis. **Dent. Update**, v. 31, n. 8, p. 448-456, oct. 2004.

PRESHAW, P. M.; HEFTI, A. F.; BRADSHAW, M. H. Adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 32, p. 610-616, 2005.

QIU, L. Y.; BAE, Y. H. Polymer architecture and drug delivery. **Pharm. Res.**, v. 23, p.1-30, 2006.

RAJEWSKI, R. A; STELLA, V. J. Pharmaceutical Application of cyclodextrins. In vivo drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 11, p. 1142-69, nov. 1996.

REIS, R. L. *et al.* Materials in particulate form for tissue engineering: Applications in bone. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, v. 1, p. 97-109, 2007.

REZENDE, T. M. *et al.* Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. **Int. Endod. J.**, v. 38, n. 12, p. 896-903, dec. 2005.

RICCI, E. J.; MARCHETTI, J. M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, p.187-195, 2006.

RIPAMONTI U; DUNEAS N. Tissue engineering of bone by osteoinductive biomaterials. **Material Research Society Bulletin**, v. 21, p. 36-39, 1996.

ROSA, D. S. *et al.* Evaluation of PHB, PHB-V and PCL biodegradation in composted soil. **Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 311-317. 2002.

ROSE, G. G. Atlas of vertebrate cells in tissue culture. **Academic Press**, 1970.

RUHÉ, P. Q. *et al.* Porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composite for reconstruction of bone defects. **Tissue Eng.**, v. 12, n. 4, p. 789-800, apr. 2006.

SATO, M. E. O. *et al.* Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SEYMOUR, R. A.; AVIOLI, R. A., HEASMAN, P.A. Drug, Diseases and the Periodontium. **Oxford Medical Publications**, p. 180-186, 1992.

SHANTZ, J. T.; CHIM, H.; WHITEMAN, M. Cell Guidance in Tissue Engineering: SDF-1 Mediates Sites-Directed Homing of Mesenchymal Stem cells within Three-Dimensional Polycaprolactone Compósitos. **Tissue Engineering**, v. 13, p. 2615-2624, 2007.

SHIGA, M. *et al.* Ascorbic acid induces collagenase-1 in human periodontal ligament cells but not in MC3T3-E1 osteoblast-like cells: potential association between collagenase expression and changes in alkaline phosphatase phenotype. **J. Bone Miner Res.**, v. 18, p. 67-91, 2003.

SHIKINAMI, Y.; OKUNO, M. Bioreabsorbable devices made of forget composites of hydroxiapatyte (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. **Biomaterials**, v. 20, n. 9, p. 859-877, may. 1999.

SICCA, C. M. *et al.* A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease: *in vitro* release study. **J. Periodontol.**, v. 61, n. 7, p. 393-8, 1990.

SIKAVITSAS, V. I.; TEMENOF, J. S.; MIKOS, A. G. Biomaterials and bone mechanotransduction. **Biomaterials**, v. 22, p. 2581-2593, 2001.

SINHA, V. R. *et al.* Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **Int. J. Pharm.**, v. 278, n. 1, p. 1-23, 2004.

SLOTS, J.; RAMS, T. E. Microbiology of periodontal disease. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M. A. (ed.). **Contemporary oral microbiology and imunology**. St. Louis: C V Mosby Co., 1992. p. 425-443.

SOSKOLONE, W. A.; FREIDMAN, M. F. Intra-periodontal pocket drug delivery systems. In: RATHBONE, M. J. (ed.). **Oral mucosal drug delivery**. New York, v. 74, p. 359-379, 1996.

STEVENSON S: Biology of bone grafts. **Orthop Clin N Am** 1999; 30(4):543-551.

SUGIURA, F.; KITO, H.; ISHIGURO, N. Osteogenic potencial of rat mesenchymal stem cell after several passages. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 316, p. 233-39, 2004.

SWARBRICK, J. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. England: Informa Healthcare, 2007.

SZEJTLI J. **Cyclodextrin Technology**. Netherland:Kluwer, 1988. p. 1-170.

SZEJTLI J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Review**, v. 98, n. 5, p. 1743-53, 1998.

TABATA, Y. *et al.* Biomaterial technology for tissue engineering applications. **J. R. Soc. Interface**, v. 6, p. 311-324, 2006.

TADDEI, P. *et al.* In vitro mineralization of bioresorbable poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/apatite composites for bone tissue engineering: a vibrational and thermal investigation. **Journal of Molecular Structure**, v. 744, n. 47, p. 135-143, 2005.

TATAKIS, D. N. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 416-31, 1993.

TEMENOFF JS, LU L, MIKOS AG. Bone-Tissue Engineering Using Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds. In: **Davies JE. Bone Engineering**. Toronto: Rainbow Grafic; 1999. p. 454-61.

TEN CATE, A. R. **Oral histology**. Mosby, 1994.

TEN CATE A.R. **Oral histology: Development, Structure and Function**. Mosby Inc, 2003.

TENGVALL, P.; LUNDSTRÖM I. Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. **Clinical Materials**, v. 9, n. 2, p. 115-134, 1992.

TEOH, S. H. *et al.* In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone-20% tricalcium phosphate composite compósitos for bone engineering. **Materials Science and Engineering**, p. 293-298, 2007.

THOMASIN, C. *et al.* Tetanus toxoid and synthetic malaria antigen containing poly(lactide)/poly(lactide-co - glycolide) microspheres: importance of polymer degradation and antigen release for immune response. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 41, p. 131-145, 1996.

THOMSON, B. M; SAKLATVALA, J.; CHAMBERS, T. J. Osteoblasts mediate interleukin-1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. **J. Exp. Med.**, v. 164, p. 104-12, 1986.

THOMPSON rw, baxter bt. Mmp inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. *Ann n y acad sci.* 1999;878:159-78.

TOLEDO, L. C. *et al.* Book of abstract of 4th international conference on science and technology of composites materials. 2007.

TONETTI, M.S. *et al.* Local delivery of tetracycline: from concept to clinical application. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 11, p. 969- 977, nov. 1998.

TULLBERG-REINERT, H.; JUNDT, G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with Sirius-Red based colorimetric microassay. **Histochem Cell Biol.**, v. 112, p. 271-6, 1999.

TURNER, C. H.; ROBLING, A. G.; DUNCAN, R. L. Do bone cells behave like a neuronal network? **Calcify Tissue Int.**, v. 70, p. 435-442, 2002.

UEDA, M. Maxillofacial bone regeneration using tissue engineering concepts. **Dentistry in Japan**, v. 39, p. 199-207, 2003.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chem. Rev.**, v. 98, n. 5, p. 2045-76, 1998.

UEMURA, T. *et al.* Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. **Biomaterials**, v. 24, p. 2277-86, 2003.

URIST MR: Bone transplants and implants. **In: Urist MR, ed. Fundamental and clinical bone physiology.** Philadelphia: Lippincott, 1980; 331-368.

VACANTI, J. P. *et al.* Beyond Transplantation. **Arch Surg**, Chicago, v. 123, p. 545-549, 1998.

VALÉRIO, P. *et al.* Characteristic of Osteoblast Vacuole Formation in the Presence of Ionic Products from BG60SDissolution. **Key Engineering Materials**, Suíça, v. 254, p. 773-776, 2004.

VALÉRIO, P. *et al.* Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foam. **Journal of Material Science: Material in Medicine**, v. 16, p. 851-56, 2005.

VERNILLO, A. T. *et al.* The nonantimicrobial properties of tetracycline for the treatment of periodontal disease. **In: Current Science**, p. 111-118, 1994.

WALKER, C.B. *et al.* The effects of sustained release doxycycline on the anaerobic flora and antibiotic-resistant patterns in subgingival plaque and saliva. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 5, p. 768-774, may 2000.

WEN, J. Y.; WILKES, G. L. Organic/inorganic hybrid network materials by the sol-gel approach. **Chem. Mat.**, p.1667, 1996.

WENNERBERG, C. *et al.* Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 10, p. 1879-1888, 2000.

WIGG, M. D. *et al.* Extrabuccal orthodontic elastic: citotoxicity evaluation. **Ortodontia Gaúcha**, v. 1, p. 151-7, 1997.

WILLIAMS, S. *et al.* Minocycline prevents the decrease in bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized aged rats. **Bone**, v. 19, p. 637-644, 1996.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials.** Proceedings of a consensus conference of the European society for biomaterials, Chester, England: Elsevier, 1987.

WILLIAMS, D. F. To engineering is to create: the link between engineering and regeneration. **Trends in Biotechnol**, v. 24, n. 1, p. 4-8, 2006.

WYKROTA, L. L. *et al.* Clinical evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic use in orthopaedic lesions. **Bioceramics**, v. 11, p. 614-644, nov. 1998.



XIONG, L., LENG, Y., Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. **Biomaterials**, v. 26, p. 1097-1108, 2005.

YANG, Y. *et al.* Morphological behavior of osteoblast- like cells on surface- modified titanium in vitro. **Biomaterials**, v. 23, p. 1383-1389, 2002.

YU, N. Y. *et al.* Biodegradable poly (alphahydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering. **J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.**, v. 93, n. 1, p. 285-295, apr. 2010.

YUE, I. C. *et al.* A novel polymeric delivery device for the treatment of periodontal disease. **Biomaterials**, v. 25, p. 3743-50, 2004.

ZAFFE, D. *et al.* Some considerations on biomaterials and bone. **Micron**, v. 36, n. 7-8, p. 583-92, 2005.

ZELENESTKII, V. E. - **J. Biomed. Eng.**, 6, p.91 (1972).

ZUK, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279-95, 2002.

**ANEXO 1****ENSAIO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (BCIP/NBT)****SOLUÇÕES:**

- 1. Solução SDS/HCL:** 1g de SDS em 10 mL de HCL 0,01 M (igual ao do MTT). Colocar a solução em recipiente no ultrassom para melhor solubilidade.
- 2. Solução de BCIP:** 10 mg em 1 mL de solução tampão salina 10x (100 mM de  $MgCl_2$  pH 9,5)
- 3. Solução de NBT:** 10 mg em 1 mL de solução tampão salina 10x (100mM de  $MgCl_2$  pH 9,5)
- 4. Solução Tampão 10X (100mM de  $MgCl_2$  pH 9,5):** 15,60 g de Tris HCL MW 157.60g, 5,80 g de NaCl, 1,02 g de  $MgCl_2$ . Misturar em 900 mL de água destilada. Ajustar pH para 9,5 e completar volume para 1000 mL.

## ANEXO 2

**ENSAIO DA PRODUÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO POR  
COLORAÇÃO PELO MÉTODO VON KOSSA****SOLUÇÕES:**

1 - Solução de Nitrato de Prata 5%

Nitrato de Prata ..... 5 g  
Água destilada ..... 100 ml

2 - Solução de Tiosulfato de Sódio 5%

Tiosulfato de Sódio ..... 5 g  
Água destilada ..... 100 ml

3 - Solução de Safranina 1%

Safranina ..... 1 g  
Ácido Acético Glacial ..... 1 ml  
Água destilada ..... 99 ml

## ANEXO 3

**FASE 1: RESULTADOS REPRESENTAM MÉDIA ± SD DE TRIPLICATAS EM SEIS EXPERIMENTOS DISTINTOS (P <0,05) DA CITOTOXICIDADE (MTT) DAS SOLUÇÕES DA DOX PURA E DA DOX NOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO NAS CONCENTRAÇÕES: 1, 5, 10, E 25µG/ML EM CULTURA DE OSTEOLASTOS.**

One-way analysis of variance									
P value				P<0,0001					
P value summary				***					
Are means signif. different? (P < 0.05)				Yes					
Number of groups				9					
F				8,896					
R squared				0,7250					
ANOVA Table				SS	df			MS	
Treatment (between columns)				0,6753	8			0,08441	
Residual (within columns)				0,2562	27			0,009489	
Total				0,9315	35				
Bonferroni's Multiple Comparison Test				Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary		95% CI of diff
Column A vs Column B				-0,1089	1,581	No	ns		-0,3543 to 0,1365
Column A vs Column C				-0,2084	3,026	No	ns		-0,4538 to 0,03700
Column A vs Column D				-0,3375	4,900	Yes	**		-0,5829 to -0,09212
Column A vs Column E				-0,4523	6,567	Yes	***		-0,6977 to -0,2069
Column A vs Column F				-0,2330	3,383	No	ns		-0,4785 to 0,01237
Column A vs Column G				-0,1612	2,341	No	ns		-0,4067 to 0,08417
Column A vs Column H				-0,09598	1,393	No	ns		-0,3414 to 0,1494
Column A vs Column I				-0,03379	0,4905	No	ns		-0,2792 to 0,2116
Column B vs Column C				-0,09954	1,445	No	ns		-0,3450 to 0,1459
Column B vs Column D				-0,2287	3,320	No	ns		-0,4741 to 0,01675
Column B vs Column E				-0,3434	4,986	Yes	**		-0,5889 to -0,09803
Column B vs Column F				-0,1242	1,803	No	ns		-0,3696 to 0,1212
Column B vs Column G				-0,05237	0,7604	No	ns		-0,2978 to 0,1930
Column B vs Column H				0,01289	0,1871	No	ns		-0,2325 to 0,2583
Column B vs Column I				0,07508	1,090	No	ns		-0,1703 to 0,3205
Column C vs Column D				-0,1291	1,875	No	ns		-0,3745 to 0,1163
Column C vs Column E				-0,2439	3,541	No	ns		-0,4893 to 0,001513
Column C vs Column F				-0,02464	0,3577	No	ns		-0,2701 to 0,2208
Column C vs Column G				0,04717	0,6848	No	ns		-0,1982 to 0,2926
Column C vs Column H				0,1124	1,632	No	ns		-0,1330 to 0,3578
Column C vs Column I				0,1746	2,535	No	ns		-0,07079 to 0,4200
Column D vs Column E				-0,1148	1,666	No	ns		-0,3602 to 0,1306
Column D vs Column F				0,1045	1,517	No	ns		-0,1409 to 0,3499
Column D vs Column G				0,1763	2,559	No	ns		-0,06912 to 0,4217
Column D vs Column H				0,2416	3,507	No	ns		-0,003861 to 0,4870
Column D vs Column I				0,3037	4,410	Yes	**		0,05833 to 0,5492
Column E vs Column F				0,2193	3,183	No	ns		-0,02615 to 0,4647
Column E vs Column G				0,2911	4,226	Yes	**		0,04566 to 0,5365
Column E vs Column H				0,3563	5,173	Yes	***		0,1109 to 0,6017
Column E vs Column I				0,4185	6,076	Yes	***		0,1731 to 0,6639
Column F vs Column G				0,07181	1,042	No	ns		-0,1736 to 0,3172
Column F vs Column H				0,1371	1,990	No	ns		-0,1083 to 0,3825
Column F vs Column I				0,1993	2,893	No	ns		-0,04615 to 0,4447
Column G vs Column H				0,06526	0,9475	No	ns		-0,1802 to 0,3107
Column G vs Column I				0,1275	1,850	No	ns		-0,1180 to 0,3729
Column H vs Column I				0,06219	0,9029	No	ns		-0,1832 to 0,3076
Number of values	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Minimum	0,2729	0,3260	0,3135	0,5089	0,5901	0,4158	0,3157	0,3561	0,2382
25% Percentile	0,2755	0,3336	0,3580	0,5433	0,6151	0,4319	0,3275	0,3562	0,2387
Median	0,2832	0,3697	0,5009	0,6531	0,7344	0,4948	0,4122	0,3706	0,2913
75% Percentile	0,2875	0,4696	0,6126	0,6624	0,8537	0,6187	0,5903	0,4074	0,4177
Maximum	0,2889	0,4984	0,6467	0,6634	0,8787	0,6551	0,6332	0,4149	0,4427
Mean	0,2821	0,3910	0,4905	0,6196	0,7344	0,5151	0,4433	0,3781	0,3159
Std. Deviation	0,006667	0,07533	0,1368	0,07416	0,1233	0,1012	0,1404	0,02801	0,09760
Std. Error	0,003333	0,03766	0,06840	0,03708	0,06165	0,05059	0,07021	0,01400	0,04880
Lower 95% CI	0,2715	0,2711	0,2728	0,5016	0,5382	0,3541	0,2199	0,3335	0,1606
Upper 95% CI	0,2927	0,5108	0,7082	0,7376	0,9306	0,6761	0,6668	0,4226	0,4712

## ANEXO 4

**FASE 2: RESULTADOS REPRESENTAM MÉDIA ± SD DE TRIPLICATAS EM SEIS EXPERIMENTOS DISTINTOS (P <0,05) DA CITOTOXICIDADE (MTT) NA PRESENÇA DOS COMPÓSITOS DE DOX NÃO ENCAPSULADA EM BCD (BCP/PCL/PLGA/DOX) NAS CONCENTRAÇÕES: 1, 5, 10, E 25µG/ML EM CULTURA DE OSTEÓBLASTOS.**

One-way analysis of variance						
P value		0,4054				
P value summary		ns				
Are means signif. different? (P < 0.05)		No				
Number of groups		6				
F		1,053				
R square		0,1493				
Bartlett's test for equal variances						
Bartlett's statistic (corrected)		6,551				
P value		0,2562				
P value summary		ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)		No				
ANOVA Table						
		SS	df		MS	
Treatment (between columns)		0,05977	5		0,01195	
Residual (within columns)		0,3405	30		0,01135	
Total		0,4003	35			
Bonferroni's Multiple Comparison Test						
	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff	
1 vs Column B	0,01646	0,2675	No	ns	-0,1797 to 0,2126	
1 vs Column C	-0,05808	0,9442	No	ns	-0,2542 to 0,1381	
1 vs Column D	-0,06581	1,070	No	ns	-0,2620 to 0,1303	
1 vs Column E	-0,06107	0,9929	No	ns	-0,2572 to 0,1351	
1 vs Column F	0,03502	0,5694	No	ns	-0,1611 to 0,2312	
Column B vs Column C	-0,07453	1,212	No	ns	-0,2707 to 0,1216	
Column B vs Column D	-0,08227	1,337	No	ns	-0,2784 to 0,1139	
Column B vs Column E	-0,07753	1,260	No	ns	-0,2737 to 0,1186	
Column B vs Column F	0,01857	0,3019	No	ns	-0,1776 to 0,2147	
Column C vs Column D	-0,007735	0,1257	No	ns	-0,2039 to 0,1884	
Column C vs Column E	-0,002996	0,04870	No	ns	-0,1991 to 0,1931	
Column C vs Column F	0,09310	1,514	No	ns	-0,1030 to 0,2892	
Column D vs Column E	0,004739	0,07704	No	ns	-0,1914 to 0,2009	
Column D vs Column F	0,1008	1,639	No	ns	-0,09531 to 0,2970	
Column E vs Column F	0,09610	1,562	No	ns	-0,1000 to 0,2922	
Number of values	6	6	6	6	6	6
Minimum	0,4582	0,4252	0,5034	0,5410	0,6062	0,5185
25% Percentile	0,4905	0,4650	0,6093	0,6265	0,6136	0,5509
Median	0,6097	0,6389	0,6949	0,6811	0,6979	0,5711
75% Percentile	0,7405	0,7259	0,7721	0,7759	0,7362	0,6327
Maximum	0,8582	0,7358	0,7792	0,8108	0,7577	0,6934
Mean	0,6231	0,6066	0,6811	0,6889	0,6841	0,5880
Std. Deviation	0,1545	0,1321	0,1025	0,09490	0,06093	0,05968
Std. Error	0,06306	0,05395	0,04184	0,03874	0,02487	0,02436
Lower 95% CI	0,4610	0,4679	0,5736	0,5893	0,6202	0,5254
Upper 95% CI	0,7852	0,7453	0,7887	0,7885	0,7481	0,6507

## ANEXO 5

**FASE 2: RESULTADOS REPRESENTAM MÉDIA ± SD DE TRIPLICATAS EM SEIS EXPERIMENTOS DISTINTOS (P <0,05) DA CITOTOXICIDADE (MTT) NA PRESENÇA DOS COMPÓSITOS DE DOX ENCAPSULADA EM BCD (BCP/PCL/PLGA/DOX/BCD ) NAS CONCENTRAÇÕES: 1, 5, 10, E 25µG/ML EM CULTURA DE OSTEÓBLASTOS.**

Table Analyzed	Data 1				
One-way analysis of variance					
P value	0,0002				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	5				
F	8,113				
R square	0,5648				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	2,108				
P value	0,7159				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	0,2969	4	0,07421		
Residual (within columns)	0,2287	25	0,009148		
Total	0,5255	29			
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
Column A vs Column B	-0,04708	0,8526	No	ns	-0,2171 to 0,1229
Column A vs Column C	-0,09044	1,638	No	ns	-0,2604 to 0,07954
Column A vs Column D	-0,2718	4,922	Yes	***	-0,4418 to -0,1018
Column A vs Column E	-0,008158	0,1477	No	ns	-0,1781 to 0,1618
Column B vs Column C	-0,04336	0,7852	No	ns	-0,2133 to 0,1266
Column B vs Column D	-0,2247	4,069	Yes	**	-0,3947 to -0,05473
Column B vs Column E	0,03892	0,7048	No	ns	-0,1311 to 0,2089
Column C vs Column D	-0,1814	3,284	Yes	*	-0,3513 to -0,01137
Column C vs Column E	0,08228	1,490	No	ns	-0,08770 to 0,2523
Column D vs Column E	0,2636	4,774	Yes	***	0,09365 to 0,4336
Number of values		6	6	6	6
Minimum		0,4837	0,5194	0,5363	0,7144
25% Percentile		0,5016	0,5599	0,5489	0,7282
Median		0,5529	0,6357	0,6697	0,8491
75% Percentile		0,6879	0,6783	0,7920	0,9751
Maximum		0,6975	0,7400	0,8057	0,9966
Mean		0,5799	0,6270	0,6703	0,8517
Std. Deviation		0,09045	0,07525	0,1166	0,1164
Std. Error		0,03693	0,03072	0,04758	0,04751
Lower 95% CI		0,4850	0,5480	0,5480	0,7296
Upper 95% CI		0,6748	0,7059	0,7926	0,9738

## ANEXO 6

**FASE 3: RESULTADOS REPRESENTAM MÉDIA ± SD DE TRIPPLICATAS EM SEIS EXPERIMENTOS DISTINTOS (P <0,05) DA CITOTOXICIDADE (MTT) NA PRESENÇA DOS COMPÓSITOS DE DOX ENCAPSULADA EM BCD (BCP/PCL/PLGA/DOX/BCD) NA CONCENTRAÇÃO 25µG/ML, APÓS 14 HORAS, 7 E 14 DIAS DE INCUBAÇÃO, EM CULTURA DE OSTEOLASTOS.**

Number of values	8	8	6	8	6	4	4	4
Table Analyzed	Data 1							
One-way analysis of variance								
P value	< 0,0001							
P value summary	****							
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes							
Number of groups	8							
F	13,94							
R square	0,7092							
ANOVA Table	SS	df	MS					
Treatment (between columns)	1,868	7	0,2668					
Residual (within columns)	0,7657	40	0,01914					
Total	2,633	47						
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?			Summary	95% CI of di	
Column A vs Column B	-0,2844	4,111	Yes			**	-0,5159 to -0,0528	
Column A vs Column C	-0,1504	2,013	No			ns	-0,4005 to 0,0997	
Column A vs Column D	-0,2000	2,891	No			ns	-0,4315 to 0,0315	
Column A vs Column E	-0,4640	6,210	Yes			****	-0,7141 to -0,213	
Column A vs Column F	-0,2848	3,361	Yes			*	-0,5684 to -0,00115	
Column A vs Column G	-0,3344	3,947	Yes			**	-0,6180 to -0,0507	
Column A vs Column H	-0,7482	8,830	Yes			****	-1,032 to -0,464	
Column B vs Column C	0,1340	1,793	No			ns	-0,1162 to 0,384	
Column B vs Column D	0,08437	1,220	No			ns	-0,1472 to 0,315	
Column B vs Column E	-0,1797	2,405	No			ns	-0,4298 to 0,0704	
Column B vs Column F	-0,0003995	0,004715	No			ns	-0,2840 to 0,283	
Column B vs Column G	-0,05001	0,5903	No			ns	-0,3336 to 0,233	
Column B vs Column H	-0,4638	5,474	Yes			****	-0,7474 to -0,180	
Column C vs Column D	-0,04959	0,6637	No			ns	-0,2997 to 0,200	
Column C vs Column E	-0,3136	3,926	Yes			**	-0,5810 to -0,0462	
Column C vs Column F	-0,1344	1,504	No			ns	-0,4333 to 0,164	
Column C vs Column G	-0,1840	2,060	No			ns	-0,4829 to 0,115	
Column C vs Column H	-0,5978	6,693	Yes			****	-0,8967 to -0,298	
Column D vs Column E	-0,2640	3,534	Yes			*	-0,5142 to -0,0139	
Column D vs Column F	-0,08477	1,001	No			ns	-0,3684 to 0,198	
Column D vs Column G	-0,1344	1,586	No			ns	-0,4180 to 0,149	
Column D vs Column H	-0,5482	6,470	Yes			****	-0,8318 to -0,264	
Column E vs Column F	0,1793	2,007	No			ns	-0,1197 to 0,478	
Column E vs Column G	0,1297	1,452	No			ns	-0,1693 to 0,428	
Column E vs Column H	-0,2841	3,181	No			ns	-0,5831 to 0,0148	
Column F vs Column G	-0,04961	0,5071	No			ns	-0,3771 to 0,277	
Column F vs Column H	-0,4634	4,737	Yes			***	-0,7909 to -0,135	
Column G vs Column H	-0,4138	4,230	Yes			**	-0,7413 to -0,0863	
Minimum	0,2130	0,6085	0,5125	0,5147	0,8144	0,6308	0,7169	0,9030
25% Percentile	0,2292	0,6803	0,5170	0,5825	0,8282	0,6480	0,7247	0,9954
Median	0,2996	0,7349	0,5806	0,6557	0,8991	0,7307	0,7540	1,276
75% Percentile	0,7647	0,7500	0,6649	0,6791	0,9751	0,7886	0,8373	1,286
Maximum	0,8456	0,8235	0,6743	0,7344	0,9966	0,7975	0,8633	1,288
Mean	0,4376	0,7220	0,5880	0,6376	0,9017	0,7224	0,7720	1,186
Std. Deviation	0,2715	0,06284	0,06904	0,07006	0,07615	0,07328	0,06346	0,1886
Std. Error	0,09598	0,02222	0,02819	0,02477	0,03109	0,03664	0,03173	0,09432
Lower 95% CI	0,2107	0,6695	0,5156	0,5791	0,8218	0,6058	0,6710	0,8856
Upper 95% CI	0,6646	0,7745	0,6605	0,6962	0,9816	0,8390	0,8730	1,486

## ANEXO 7

**FASE 3: RESULTADOS REPRESENTAM MÉDIA ± SD DE TRIPLICATAS EM SEIS EXPERIMENTOS DISTINTOS (P <0,05) DA FOSFATASE ALCALINA POR OSTEOBLASTOS NA PRESENÇA DO COMPÓSITO DE DOX ENCAPSULADA EM BCD (BCP/PCL/PLGA/DOX/BCD ) NA CONCENTRAÇÃO 25µG/ML, APÓS 7 E 14 DIAS DE INCUBAÇÃO, EM CULTURA DE OSTEOBLASTOS.**

Table Analyzed	Data 1
One-way analysis of variance	
P value	< 0,0001
P value summary	****
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6
F	18,41
R square	0,5824

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	30,75
P value	< 0,0001
P value summary	****
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1,134	5	0,2268
Residual (within columns)	0,8134	66	0,01232
Total	1,948	71	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
Column A vs Column B	-0,08593	1,896	No	ns	-0,2240 to 0,05211
Column A vs Column C	-0,2048	4,518	Yes	***	-0,3428 to -0,06672
Column A vs Column D	-0,1097	2,421	No	ns	-0,2478 to 0,02832
Column A vs Column E	-0,2467	5,442	Yes	****	-0,3847 to -0,1086
Column A vs Column F	-0,3888	8,579	Yes	****	-0,5268 to -0,2508
Column B vs Column C	-0,1188	2,622	No	ns	-0,2569 to 0,01921
Column B vs Column D	-0,02379	0,5248	No	ns	-0,1618 to 0,1143
Column B vs Column E	-0,1607	3,546	Yes	*	-0,2988 to -0,02268
Column B vs Column F	-0,3029	6,683	Yes	****	-0,4409 to -0,1648
Column C vs Column D	0,09504	2,097	No	ns	-0,04300 to 0,2331
Column C vs Column E	-0,04189	0,9244	No	ns	-0,1799 to 0,09615
Column C vs Column F	-0,1840	4,061	Yes	**	-0,3221 to -0,04600
Column D vs Column E	-0,1369	3,021	No	ns	-0,2750 to 0,001106
Column D vs Column F	-0,2791	6,158	Yes	****	-0,4171 to -0,1410
Column E vs Column F	-0,1421	3,136	Yes	*	-0,2802 to -0,004107

Number of values	12	12	12	12	12	12
Minimum	0,2308	0,3104	0,4155	0,2336	0,3009	0,4782
25% Percentile	0,2385	0,3266	0,4326	0,2945	0,4152	0,5040
Median	0,2796	0,3500	0,4804	0,3457	0,5370	0,6439
75% Percentile	0,2996	0,3877	0,5155	0,5175	0,6536	0,8453
Maximum	0,3975	0,4762	0,5915	0,6198	0,7982	0,9377
Mean	0,2807	0,3667	0,4855	0,3905	0,5274	0,6695
Std. Deviation	0,04654	0,05186	0,05853	0,1265	0,1473	0,1672
Std. Error	0,01344	0,01497	0,01690	0,03652	0,04253	0,04827
Lower 95% CI	0,2512	0,3337	0,4483	0,3101	0,4338	0,5633
Upper 95% CI	0,3103	0,3996	0,5227	0,4708	0,6210	0,7758

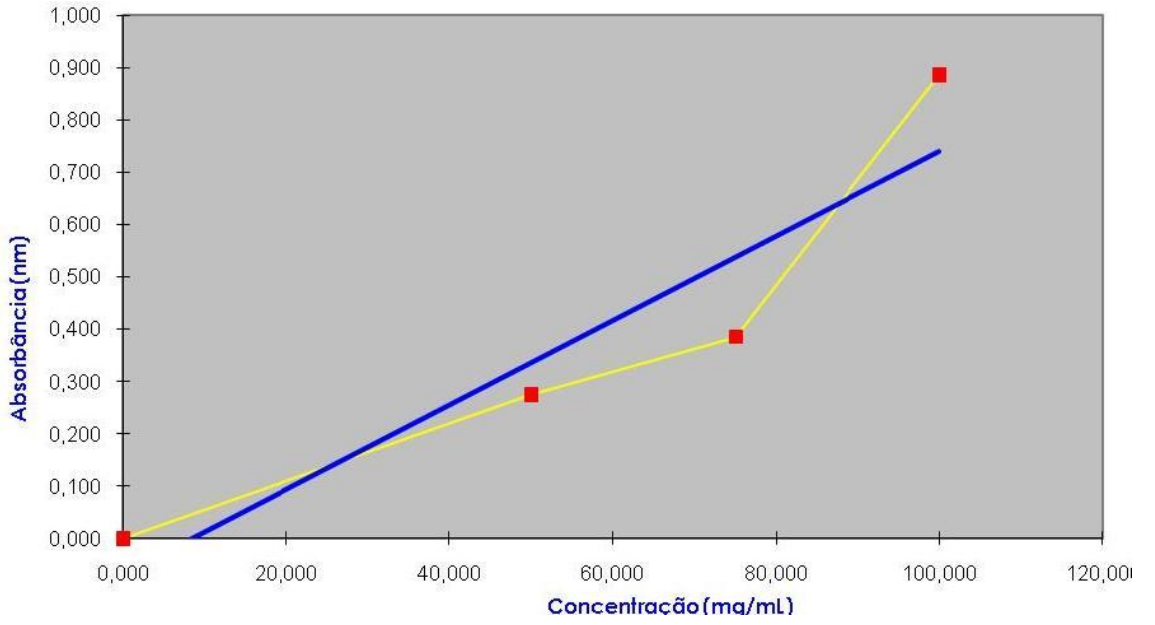


## ANEXO 8

**FASE 3: RESULTADOS REPRESENTAM MÉDIA  $\pm$  SD DE TRIPLICATAS EM SEIS EXPERIMENTOS DISTINTOS (P <0,05) DA SÍNTESE DE COLÁGENO POR OSTEOBLASTOS NA PRESENÇA DO COMPÓSITO DE DOX ENCAPSULADA EM BCD (BCP/PCL/PLGA/DOX/BCD) NA CONCENTRAÇÃO 25 $\mu$ G/ML, APÓS 7 E 14 DIAS DE INCUBAÇÃO, EM CULTURA DE OSTEOBLASTOS.**

Table Analyzed	Data 1				
One-way analysis of variance					
P value	< 0,0001				
P value summary	****				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	13,48				
R square	0,7893				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	1,626	5	0,3251		
Residual (within columns)	0,4340	18	0,02411		
Total	2,060	23			
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
Column A vs Column B	-0,09701	0,8835	No	ns	-0,4682 to 0,2742
Column A vs Column C	-0,2223	2,024	No	ns	-0,5935 to 0,1489
Column A vs Column D	-0,3055	2,782	No	ns	-0,6767 to 0,06568
Column A vs Column E	-0,5371	4,892	Yes	**	-0,9083 to -0,1659
Column A vs Column F	-0,7643	6,961	Yes	****	-1,135 to -0,3931
Column B vs Column C	-0,1253	1,141	No	ns	-0,4964 to 0,2459
Column B vs Column D	-0,2085	1,899	No	ns	-0,5796 to 0,1627
Column B vs Column E	-0,4401	4,008	Yes	*	-0,8113 to -0,06894
Column B vs Column F	-0,6673	6,077	Yes	***	-1,038 to -0,2961
Column C vs Column D	-0,08320	0,7577	No	ns	-0,4544 to 0,2880
Column C vs Column E	-0,3148	2,867	No	ns	-0,6860 to 0,05634
Column C vs Column F	-0,5420	4,936	Yes	**	-0,9132 to -0,1709
Column D vs Column E	-0,2316	2,110	No	ns	-0,6028 to 0,1395
Column D vs Column F	-0,4588	4,179	Yes	**	-0,8300 to -0,08767
Column E vs Column F	-0,2272	2,069	No	ns	-0,5984 to 0,1440

**ANEXO 9**  
**CURVA PADRÃO DE COLÁGENO**



**Figura 21:** Curva Padrão de Colágeno

## ANEXO 10

## ARTIGO SUBMETIDO EM 2012

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

**Structural and thermodynamical characterization of doxycycline: $\beta$ -cyclodextrine compound and its bacterial membrane interactions**

Journal:	Journal of Antimicrobial Chemotherapy
Manuscript ID:	JAC-2012-1130
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	25-Aug-2012
Complete List of Authors:	Suárez, Diego; Universidade Federal de Minas Gerais, Chemistry Department Consuegra, Jessica; Universidade Federal de Minas Gerais, Physiology and Biophysics Department Trajano, Vivianne; Universidade Federal de Minas Gerais, Restorative Dentistry Department Gontijo, Savio; Universidade Federal de Minas Gerais, Restorative Dentistry Department Guimarães, Pedro; Universidade Federal de Minas Gerais, Chemistry Department Cortés, Maria; Universidade Federal de Minas Gerais, Restorative Dentistry Department Denadai, Ângelo; Universidade Federal de Juiz de Fora, Chemistry Department Sinisterra, Rubén; Universidade Federal de Minas Gerais, Chemistry Department
Keywords:	Doxycycline, $\beta$ -cyclodextrine, Antibacterials, membrane interactions, Susceptibility, cytotoxicity

SCHOLARONE<sup>®</sup>  
Manuscripts

1 **Title: Structural and thermodynamical characterization of doxycycline:β-**  
2 **cyclodextrin compound and its bacterial membrane interactions**

3 **Running Title: Doxycycline:β-cyclodextrin bacterial interactions**

4

5 Diego F. Suárez<sup>a</sup>, Jessika Consuegra<sup>b</sup>, Vivianne C. Trajano<sup>b</sup>, Savio M.L. Gontijo<sup>b</sup>,  
6 Pedro P.G. Guimarães<sup>a</sup>, Maria E. Cortés<sup>b</sup>, Ângelo L. Denadai<sup>c</sup>, Rubén D. Sinisterra<sup>a\*</sup>.

7

8 <sup>a</sup>*Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de*  
9 *Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte – MG, Brazil.*

10 <sup>b</sup>*Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas - ICB,*  
11 *UFMG, Av. Antonio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte – MG, Brazil*

12 <sup>c</sup>*Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, UFMG,*  
13 *Avenida Pres. Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte - MG,*  
14 *Brazil. (Phone: +55-31-3409-2430, Fax: +55-31-3409-5700)*

15 <sup>d</sup>*Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares - MG. Av. Dr.*  
16 *Raimundo Monteiro de Rezende, no. 330, Centro, CEP: 35010-177, Governador*  
17 *Valadares-MG, Brazil".*

18

19

20

21 <sup>\*</sup>*Corresponding author: Avenida Pres. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais,*

22 *Brazil. Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais. CEP: 31270-901,*

23 *Phone: +55-31-34995778, Fax: +55-31-3499-5700*

24 *E-mail address: [sinisterra@ufmg.br](mailto:sinisterra@ufmg.br)*

25 **Synopsis**

26 **Objectives:** To characterize Doxycycline/ $\beta$ Cyclodextrin (DOX/ $\beta$ CD) inclusion  
27 compound and its in vitro antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. Finally  
28 DOX and DOX/ $\beta$ CD interaction with bacteria surface, and activation and cell  
29 proliferation assays on osteoblasts were performed to evaluate their cytotoxicity.

30 **Methods:** DOX/ $\beta$ CD chemical characterization in solid state was conducted by  
31 Thermogravimetric Analysis, Differential Thermal Analysis, and Fourier Transform  
32 Infrared and in solution by NMR, 2D ROESY and Isothermal Titration Calorimetry  
33 (ITC). Antimicrobial susceptibility was evaluated by MIC and MBC. DOX and  
34 DOX/ $\beta$ CD interaction with bacterial surface was evaluated through dynamic light  
35 scattering, zeta potential (ZP) and ITC. Compounds cytotoxicity evaluation on  
36 osteoblast was performed by MTT.

37 **Results:** Chemical characterization showed a DOX greater stability in  $\beta$ CD presence  
38 and inclusion by DOX aromatic side in  $\beta$ CD cavity. Complexation was enthalpy and  
39 entropy driven, occurring with low equilibrium constant. Increasing concentrations of  
40 DOX and DOX/ $\beta$ CD led an exponential decrease of the *S. aureus* size and a gradual  
41 neutralization of bacteria ZP. The  $\beta$ CD presence changes the thermodynamic profile of  
42 interaction, suggesting that  $\beta$ CD adhere to *S. aureus* membrane, acting as a local  
43 releasing device. DOX/ $\beta$ CD is more active against *S. aureus* with improved MIC and  
44 MBC values. The cellular viability tests showed that DOX/ $\beta$ CD is less toxic than pure  
45 DOX and increases the cellular proliferation.

46 **Conclusions:** DOX/ $\beta$ CD inclusion compound improved interaction is caused by  $\beta$ CD  
47 adhesion to bacteria surface due its ability to form hydrogen bond. Those are important  
48 findings to understand the drug-target mechanism and development of a new lower  
49 dosage antimicrobial formulation.

50 **Key words:** *Doxycycline,  $\beta$ Cyclodextrin, antimicrobial, membrane interactions,*  
51 *susceptibility, cytotoxicity*

52

### 53 Introduction

54 Doxycycline (Fig. S1) is a semi-synthetic antibiotic derived from oxytetracycline,  
55 commonly used for numerous intracellular and extracellular pathogens.<sup>1</sup> It inhibit  
56 bacterial growth through the inhibition of protein synthesis by its interaction with 30s  
57 ribosomal subunit and the subsequent blocking of the t-RNA binding to the docking  
58 sites. It has proven anti-inflammatory action, inhibits the activity of matrix  
59 metalloproteinases (MMPs)<sup>2</sup> and cell proliferation (especially mononuclear cells) and  
60 reduces the blastogenic response of lymphocytes.<sup>3</sup> DOX also stimulates the bone  
61 regeneration when it is affected by the inflammatory response in periodontal disease.<sup>4</sup>

62 Despite its broad-spectrum of action against aerobic and anaerobic bacteria, many  
63 groups of bacteria are reported to exhibit resistance against DOX.<sup>1</sup> Continued use of  
64 high doses of antibiotics generated resistances mechanisms such as those presented by  
65 *S. Aureus*<sup>5</sup> characterized by presenting complex processes of resistance as mutations in  
66 specific genes or acquisition of resistance mechanisms from other microorganisms  
67 through genetic exchange such as conjugation, translation or transformation.<sup>6</sup>

68 To overcome the drawbacks of bacterial resistance and chemical instability and  
69 minimize the harmful effects of tetracyclines, encapsulation systems are being  
70 developed with cyclodextrins, liposomes, nanospheres. However, the efficient  
71 development of these devices includes complex studies seeking to understand the  
72 molecular adsorption and joining processes between the membranes of target organism  
73 and the drug used to control it, using techniques such as isothermal titration calorimetry  
74 (ITC) and particle charge.<sup>7</sup> The ITC is a technique that allows knowing interaction  
75 between molecules, by measurement the heat liberated or absorbed during the process  
76 and determine the thermodynamic parameters as interaction constant, Gibbs energy,  
77 enthalpy and entropy.<sup>8, 9</sup>

78 Cyclodextrins (Fig. S2) are cyclic oligosaccharides composed of units of glucose  
79 that offer the following advantages: well-defined chemical structure with sites for  
80 chemical modification or conjugation; availability in different sizes; low toxicity;  
81 pharmacological activity; solubility; and capacity to form inclusion compounds.<sup>10</sup> The  
82 complexes formed by CDs are more stable with regard to degradation in the presence of  
83 light, heat, chemical instability and degradation due to hydrolysis.<sup>11</sup> Natural CDs are  
84 denominated  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  and the main derivatives are obtained from  $\beta$ -cyclodextrin.<sup>12</sup> We  
85 could find some works in the literature dealing with the DOX and cyclodextrins

86 pharmaceutical formulations as the DOX inclusion in  $\beta$ CD, Vargas-Estrada, *et al.* 2008,  
87 prepared an inclusion complex DOX/ $\beta$ CD, which may diminish or prevent tissue  
88 irritation by reducing the local concentration of free drug below the irritancy  
89 threshold.<sup>13</sup> Zi-xin He, *et al.* 2011, prepares a chemically and physically stable  
90 formulation of doxycycline and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) inclusion in  
91 an *in situ* thermally sensitive hydrogel for ophthalmic delivery.<sup>14</sup>

92 However, little is known regarding the physic-chemical characterization of the  
93 complex in solid state and solution and action mechanism of this inclusion compound  
94 and its electrostatic interaction with bacterial surface, which could be a directly relevant  
95 factor in DOX and DOX/ $\beta$ CD antibacterial activity.

96 The aims of the present study were to characterize the DOX/ $\beta$ CD inclusion  
97 compound in solid state by Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Thermal  
98 Analysis (DTA) and Fourier Transform Infrared (FTIR) and in solution by NMR 2D  
99 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY and Isothermal Titration Calorimetry (ITC). Beyond the chemical  
100 characterization, *in vitro* antimicrobial susceptibility against *S. aureus* was evaluated by  
101 MIC and MBC determination and direct interaction with bacteria were evaluated  
102 through dynamic light scattering (DLS), zeta potential measurements (ZP) and ITC.  
103 Finally, activation and cell proliferation assays on osteoblasts cells were performed in  
104 order to evaluate the cytotoxicity of DOX inclusion compounds.

## 105 **Materials and Methods**

### 106 *Chemicals*

107 Reagents were purchased from the following companies: Doxycycline  
108 hydrochloride from Sigma Chemical Company (St Louis, MO) and  $\beta$ CD from Xiamen  
109 Mchem Pharma, Xiamen China, and Brain Heart Infusion culture Broth from  
110 HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd. (India). All reagents were used as received without  
111 further purification.

### 113 *Inclusion compound preparation*

114 The 1:1 molar ratio DOX/ $\beta$ CD inclusion complex was prepared using the  
115 freeze-drying method and this was used for the physical-chemical characterization in  
116 solid state and in solution by NMR. Briefly, DOX and  $\beta$ CD were weight at a 1:1 molar  
117 ratio and dissolved in milli-Q<sup>®</sup> water. This aqueous solution of  $\beta$ CD and DOX was

118 stirred at 40 °C for 2 h and then submitted to the freeze-drying process to achieve the  
119 solid inclusion complex.

120

121 *Solid state analysis*

122 Solid state characterizations were performed using thermogravimetric analysis  
123 (TGA), and differential thermal analysis (DTA) and Fourier transformed infrared  
124 spectroscopy (FTIR). Data were recorded for DOXCl,  $\beta$ CD, DOX/ $\beta$ CD and a physical  
125 mixture (PM) of DOX and  $\beta$ CD at a molar ratio of 1:1.

126 TGA and DTA analysis were performed in duplicate using TGA/DTA modulus  
127 SDT, Q600 from TA Instruments. Samples of approximately 5 mg were placed in the  
128 analyser on open pans of aluminium oxide ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) and were heated from ambient (~25  
129 °C) to 700 °C at a rate of 10 °C  $\text{min}^{-1}$  and sensitivity of 1.0°C, in nitrogen gas with a  
130 flow rate of 50 mL/min.

131 FTIR spectra were recorded using a Perkin Elmer spectrometer (Spectrum GX;  
132 Perkin Elmer, Boston, MA, USA). The samples were prepared as KBr pellets. The  
133 scans were carried out from 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$  at a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  using 32 scans  
134 per sample.

135

136 *Nuclear Magnetic Resonance*

137  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts ( $\delta$ ) and 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY experiments were obtained  
138 using a Bruker DPX-400 Avance (400 MHz) spectrometer, at 300 K.

139 The solutions used were 2.0 mM of DOX and 2.0 mM (1:1) of DOX/ $\beta$ CD, both  
140 dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc ~99.9 % of isotopic purity). The  
141 HOD signal at  $\delta = 4.80$  was used as reference. No solid formation was observed in the  
142 solution during analysis. The 2D-ROESY experiments were recorded at spin lock of  
143 600 ms, which was previously calculated throughout the inversion-recovery sequence<sup>15</sup>  
144 <sup>16</sup>. The sample for this experiment was those prepared by freezing-drying method  
145 described above. Before the analyses by ROESY, the  $^1\text{H}$  NMR spectra of DOX was  
146 assigned according with Guerra, W. *et al.* 2006,<sup>17</sup> while  $^1\text{H}$  NMR spectra of  $\beta$ CD was  
147 assigned according with Schneider, H. J. *et al.* 1998.<sup>18</sup>

148

149

150



151 *Isothermal Titration Calorimetry*

152 Calorimetric titrations were carried out using a Nano-ITC Microcalorimeter  
153 from TA Instruments, at 298.15K. Experiments were recorded in order to obtain the  
154 thermodynamical parameters of complexation process between DOX and  $\beta$ CD and  
155 investigate the direct interaction of DOX and DOX/ $\beta$ CD against *S. aureus* ATCC  
156 27664.

157 In the complexation study, each titration experiment consisted of 49 successive  
158 injections of the DOX aqueous solution (70.0 mM) into the reaction cell charged with  
159 1.0 mL of  $\beta$ CD solution (4.0 mM), at time intervals of 300s. The first injection of 1.15  
160  $\mu$ L was discarded to eliminate diffusion effects from syringe material into the  
161 calorimetric cell. The subsequent injections were applied at constant volume of 5.15  $\mu$ L  
162 of DOX solution with stirring speed of 250 rpm. The raw data were analyzed by the  
163 Nano Analyze Data Analysis<sup>®</sup> software for ITC, version 2.1.9, after discounting the  
164 blank experiment (dilution of DOX in water). A one-site independent binding  
165 mathematical model was used to analyze the average stoichiometry (Fig. S3). The final  
166 data was exported to Microcal Origin 7.0.

167 In the interaction study of DOX or DOX/ $\beta$ CD against *S. aureus*, experiments  
168 consisted of 49 successive injections of 5.15  $\mu$ L of the DOX or DOX/ $\beta$ CD aqueous  
169 solutions (booth at 50 mg/mL of DOX) into the calorimetric cell containing 1.0 mL of  
170 *S. aureus* suspension ( $\sim 6 \times 10^8$  cfu), at time intervals of 600 s. The 1.15  $\mu$ L first  
171 injection was also discarded. The DOX concentration in the calorimeter cell varied from  
172 0.0 to  $\approx 10$  mg/mL, while the *S. aureus* concentration varied from  $\approx 6 \times 10^8$  cfu to  $\approx 4.8$   
173  $\times 10^8$  cfu. The final composition variable named  $X_t = C_{DOX}/CFU$  (as suggested by  
174 Monteiro, et al. 2011<sup>18</sup>) changed from 0.0 to 2.2 mg/mL.cfu Final data were obtained  
175 by subtraction of titration curves from dilution of DOX or DOX/ $\beta$ CD in aqueous  
176 solution without cells, being also exported to Microcal Origin 7.0.

178 *In Vitro Antimicrobial Susceptibility*

179 The antimicrobial tests of DOX, DOX/ $\beta$ CD and  $\beta$ CD were performed in  
180 accordance with the CLSI, 2011<sup>20</sup> to determine MIC values by microdilution method.  
181 *S. aureus* ATCC 27664 was inoculated in Brain Heart Infusion Broth (BHI) and  
182 incubated aerobically at 37 °C during 18 to 24 h. After incubation bacteria was adjusted  
183 to a concentration of  $\sim 5.0 \times 10^5$  cfu with Mueller Hinton Broth (MH), added to double

184 serial dilution of DOX, DOX/ $\beta$ CD or  $\beta$ CD (2500 to  $9 \times 10^{-3}$  mg/L) in 96-well plates,  
185 and incubated at 37 °C for a period of 18 to 24 h. The MIC was defined as the lowest  
186 concentration that prevented visible growth of the microorganism, determined with a  
187 spectrophotometer at 600 nm. MBCs were determined by plating the wells with the  
188 MIC as well as the dilution without visible growth of the microorganism and one below  
189 in BHI Agar. After 24 to 48 h of growth, the MBC was determined as the lowest  
190 concentration that did not permit visible growth on the surface of the agar. All MICs  
191 and MBCs assays were performed in triplicate.

192

#### 193 *Dynamic light scattering analysis*

194 Particle size and Zeta potential titrations were performed using Malvern Zetasizer  
195 Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). The average hydrodynamic diameter of  
196 *S. aureus* was measured using a Malvern Zetasizer Nano ZS particle analyzer with  
197 polyethylene square cells. An aqueous suspension of *S. aureus* ( $10^8$  cfu) was titrated by  
198 the addition of  $\approx 26$  aliquots (10.0  $\mu$ L) of aqueous solutions of DOX or DOX/ $\beta$ CD both  
199 at 10.0 mg/mL of DOX. The solutions used to suspend the cells were filtered (0.22  $\mu$ m  
200 filters, Millipore®) before use to remove any large particulate material. Sample  
201 suspensions were exposed to monochromatic light (10 mW He-Ne laser, wavelength  
202 632.4 nm) and the scattered light intensity was measured at an angle of 90°. The  
203 hydrodynamic diameters ( $D_h$ ) for each titration were calculated from the average of five  
204 independent measurements that were the mean of 30 counts. The reported  $D_h$  are the  
205 average of three independent titrations and the error bars are the standard deviation. As  
206 a control, the  $D_h$  values of *S. aureus* in pure water was measured before and after three  
207 hours and do not showed any change.

#### 208 *Zeta potential titrations*

209 The zeta potential (ZP) was determined using the Laser Doppler Velocimetry  
210 technique<sup>21</sup> with a disposable Cell Folded Capillary (DPS1060) at a scattering angle of  
211 90° at 25 °C. Titrations were conducted by  $\approx 26$  successive injections of 10  $\mu$ L aliquots  
212 of aqueous DOX or DOX/ $\beta$ CD solutions, both at 10.0 mg/mL of DOX, into 1.0 mL of  
213 aqueous *S. aureus* suspension ( $10^8$  cfu). The ZP values were obtained from the average  
214 of five independent measurements, each one obtained as the mean of five counts. The  
215 reported ZP values are the average of independent titrations.

216

217 *Cytotoxicity assays on osteoblast cell*

218 Osteoblasts were isolated from the calvaria of six Wistar rats by enzymatic  
219 digestion method of 3 days old. In brief after cut into small pieces, the calvaria bone  
220 was digested for 5 min with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma, St Louis, USA) and 3 times  
221 with 2% collagenase type II. The supernatant of the third last washes were centrifuged  
222 1000  $\times$ g for 5 min and the pellet was resuspended in 5 mL of DMEM (Sigma, St Louis,  
223 USA) medium supplement with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, NY, USA) and  
224 antibiotic (0.1 mg/mL of streptomycin and 100 U/mL de penicillin) and antimycotic  
225 solution (Gibco, NY, USA), bottles placed in cell culture and incubated at 37% in a  
226 humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. After confluence the cells were  
227 replicated and used on passage 2. These cells are distributed in a density of  $1 \times 10^5$ /cells  
228 in 96 wells culture plates in contact with the solutions of DOX, or its inclusion  
229 compound with  $\beta$ CD, at concentrations of 1.0  $\mu$ g/mL; 5.0  $\mu$ g/mL; 10.0  $\mu$ g/mL and 25.0  
230  $\mu$ g/mL, to be assessed within 24 h of culture. Cell viability of the osteoblasts is assessed  
231 by MTT assay after 96 h of incubation in the presence of each experimental substance.  
232 Approximately 60.0  $\mu$ L of MTT (5.0 mg/mL) are added to each well. Two hours later,  
233 cell morphology is assessed by the inverted optical microscope and the salts were  
234 solubilized to formazan by SDS 10% HCl. After incubation over night, the optical  
235 density measurement is made at 570 nm in a spectrophotometer (Multiskan MCC/340,  
236 Labsystems).

237

238 **Results and discussion**

239

240 *Solid state analysis*

241 The TGA/DTA curves for DOX,  $\beta$ CD, DOX/ $\beta$ CD and PM are shown in Figs. 1a  
242 and 1b. Transitions observed to free  $\beta$ CD was in agreement to those just cited by Jensen  
243 *et al.*<sup>23</sup> and to free DOX in agreement with Zi-xin He *et al.* work.<sup>14</sup> For the PM  
244 DOX/ $\beta$ CD (1:1), an initial endothermic peak, due dehydration of  $\beta$ CD, could be  
245 observed. However, decomposition of  $\beta$ CD at 300°C was not observed, suggesting  
246 inclusion upon heating. For DOX/ $\beta$ CD system, thermal profile was very different to the  
247 PM and free compounds, as consequence of different interactions in solid state.  
248 Dehydration ( $\approx$  70°C) and decomposition ( $\approx$  300°C) of  $\beta$ CD were not observed.

249 Moreover, loss of mass and the associated endothermic peak of DOX ( $\approx 160^\circ\text{C}$ ) was not  
250 present in TGA or DTA DOX/ $\beta$ CD experiments, suggesting greater stability of drug in  
251 presence of  $\beta$ CD.

252

253

**Insert Figures 1a and 1b**

254

255 FTIR spectra were obtained in order to investigate specific interactions between  
256 DOX and  $\beta$ CD in solid state. In the spectra depicted in Figure 2, it can be observed that  
257 the profile for DOX/ $\beta$ CD inclusion compound was not a simple superposition of the  
258 free species, or yet, the PM. Thus, interaction can be verified by changes in N-H and  
259 O-H absorption bands, which were more sharpening to DOX/ $\beta$ CD than pure  $\beta$ CD and  
260 PM, suggesting reduction in the total number of hydrogen bonds upon complexation.  
261 Comparing with free  $\beta$ CD and PM, a considerable reduction of  $\nu_{(\text{C-O})}$   $\beta$ CD stretching at  
262  $2924\text{ cm}^{-1}$  was also observed to DOX/ $\beta$ CD, corroborating the hypothesis about  
263 inclusion. Reduction of angular and axial DOX C-O bends, at  $1175\text{ cm}^{-1}$  and  $1130\text{ cm}^{-1}$   
264 and sharpening of C=O and C=C DOX stretches at  $1700$  and  $1600\text{ cm}^{-1}$  were observed. The  
265 data suggest strong disturbance of the CONH<sub>2</sub> group of DOX in solid state, as a  
266 consequence of hydrogen bindings and breakings upon DOX inclusion in  $\beta$ CD, these  
267 results are in accordance with the Zi-xin He *et al.* work.<sup>14</sup>

268

269

**Insert Figure 2**

270

**NMR ROESY**

272 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY is known to allow the observation of inter- and intra-molecular  
273 interactions until the 5 Å spatial proximity limit among the functional groups.<sup>23-25</sup> NMR  
274 2D-ROESY experiments allowed an investigation of specific interactions between DOX  
275 and  $\beta$ CD in supramolecular complex, allowing propose the way of inclusion of the  
276 DOX in  $\beta$ CD cavity. Figure 3 shows the expansion of contour map of ROESY where  
277 are observed cross peaks correlations between aromatic H<sub>7D</sub>, H<sub>4D</sub> and H<sub>6D</sub> DOX  
278 hydrogens (region at  $\delta \approx 6.5$  to  $7.6$ ) with H2, H3, H4, H5 and H6  $\beta$ CD hydrogens.  
279 These results indicate preferential inclusion by aromatic side once the presence of amide  
280 and tertiary amine groups in aliphatic group make them more hydrophilic and bulky,

281 hindering the interaction. Cross peak correlations, which could suggest inclusion by  
282 aliphatic side, were not observed.

283

284

#### Insert Figure 3

#### 285 *Isothermal Titration Calorimetry*

286 ITC experiment was used to evaluate the thermodynamic parameters of the  
287 supramolecular interactions between the species assuming the 1:1 stoichiometry, once  
288 the inclusion by aliphatic side is unlikely. Fig. 4 shows the DOX titration curve in  
289 water, after subtraction of the blank. The absence of sigmoid profile of ITC curve is  
290 typical of cyclodextrin systems, which exhibits weak interactions ( $K < 1000$ ).<sup>26-30</sup> The  
291 calculation of thermodynamic parameters was made through the non-linear fitting, using  
292 "independent sites model" present in Nano Analyze Data Analysis® software for ITC.

293 Equilibrium constant obtained by fitting was really low ( $K = 503$ ). It was observed  
294 that this process is enthalpy drove ( $\Delta_r H^\circ = -3.8$  kJ/mol) and occurs with increase of  
295 entropy ( $\Delta_r S^\circ = 11.6$  kJ/mol).<sup>31</sup> The enthalpy term was attributed to the binding of  
296 enthalpy rich water molecules released from the  $\beta$ CD cavity with bulk water molecules  
297 and the dipolar and hydrogen bonding interactions between DOX and  $\beta$ CD. The  
298 abnormal increase of entropy could be attributed to the rigidity of the free DOX due to  
299 DOX-DOX hydrogen bonding if compared with other more loose systems, upon  
300 host:guest interaction, and high desolvation of amine, amide and cetone hydrophilic  
301 groups upon inclusion.

302

303

#### Insert Figure 4

304

#### 305 *In Vitro Antimicrobial Susceptibility*

306 The results of *in vitro* Antimicrobial Susceptibility of DOX and DOX/ $\beta$ CD are  
307 shown in Table 1. DOX and DOX/ $\beta$ CD were found to be active against the Gram-  
308 positive bacterium *S. aureus* ATCC 27664. The DOX bacteriostatic activity reflected by  
309 the MIC, and the bactericide effect (MBCs) improve 6 and 3 double serial dilution,  
310 respectively when DOX was included in  $\beta$ CD. On the other hand, none inhibitory  
311 activity was found until the concentration of 500  $\mu$ g/mL when the MIC and MBC  
312 determination of a  $\beta$ CD solution was carried out.

313

314

## Insert Table 1

315

316 *S. aureus* plays an important role in human infections, nevertheless the efficacy  
317 of the current antibiotics used to treat them are limited, due to the presence of several  
318 resistance factors against these antibiotics.<sup>3</sup> *S. aureus* among other bacterial strains has  
319 developed what is called multi-drugs resistant forms, subsequent to antibiotic use,  
320 which does the therapeutic options for these microbes reduced, and periods of hospital  
321 care more extended and costly.<sup>32</sup> The low sensibility of *S. aureus* to the conventional  
322 treatment makes imperative the study of new antibiotic compounds with high  
323 antimicrobial activity at lower doses.

324 We found that DOX inclusion complexes with  $\beta$ CD were more active against *S.*  
325 *aureus* than pure DOX. This fact could be due to  $\beta$ CD adhesion to bacteria surface that  
326 acts synergically with the DOX. The *S. aureus*'s susceptibility to the tetracyclines is  
327 directly related to the antibiotic lipophilicity. The lipophilicity of tetracycline,  
328 doxycycline and minocycline are 0.025, 0.600 and 1.1, respectively, as determined by  
329 partitioning between octanol and aqueous buffer.<sup>33</sup>

330 In the present study pure DOX MIC value was higher than the value previously  
331 reported by Blackwood et al., 1970. The authors related tetracycline, doxycycline and  
332 minocycline MIC values against *S. aureus* were 0.21; 0.19 and 0.10  $\mu$ g/mL  
333 respectively.<sup>34</sup> Despite this, the bacterial strain can still be considered susceptible to the  
334 DOX when the MIC values are compared with the "MIC Interpretive Standards for  
335 *Staphylococcus* spp." of the CLSI 2011 guidelines. In these standards the  
336 *Staphylococcus* species are considered as susceptible to the DOX when the MIC values  
337 are  $\leq$  4.8  $\mu$ g/mL.<sup>20</sup>

338 These are important findings because it suggests a possible development of a  
339 new DOX formulation, using less quantity of antibiotic; which will have a positive  
340 impact in reducing bacterial exposure to antibiotic and thus the decrease in the  
341 generation of one of the causes of antibiotic resistance process.

342

343 *DLS of S. aureus cells*

344

345 In Figure 5a and 5b, the effect of DOX or DOX/ $\beta$ CD upon the hydrodynamic  
346 diameter ( $D_h$ ) of *S. aureus* is shown. The addition of aliquots of DOX to a *S. aureus*



347 suspension led to an exponential decrease of  $D_h$  up to a concentration of  $\approx 1$  mg/mL.cfu,  
348 which corresponds to the isoelectric point (see section 3.3.3). At molar concentration  
349 greater than  $\approx 1$  mg/mL.cfu, no change in  $D_h$  is observed. The DLS results can be  
350 explained by the permeabilization of cell surface by drug up to the saturation limit of  
351 surface, where the drug not more interacts with the cell surface.

352 Titration of DOX/ $\beta$ CD in *S. aureus* exhibited a more complex profile of reduction  
353 of  $D_h$ , suggesting participation of  $\beta$ CD in surface interaction. In the curve is observed  
354 attenuation at 0.3 mg/mL.cfu which correspond to the isoelectric point of cells. The  
355 attenuation persists up to 0.7 mg/mL.cfu, when diminish. At concentration of 1.5  
356 mg/mL.cfu, the  $D_h$  suffered an increase up to the 1.5 mg/mL.cfu of DOX, reducing  
357 again. Cyclodextrins are able to form large aggregates and such phenomenon occurs at  
358 range of 1.35 mg/mL ( $\approx 1$  mM).<sup>12, 24, 35-37</sup> Such aggregates could adhere on surface cells  
359 due the high possibility of hydrogen bond formation by CD, causing an increase of size.  
360 However, at high concentrations permeabilization of membrane could overcome the  
361 trend of self assembly, leading to the reduction of size. These observations could be  
362 explained by the higher efficacy of the DOX/ $\beta$ CD complex against *S. aureus* when  
363 compared with the free DOX.

364

#### 365 Insert Figure 5

366

#### 367 Zeta potential measurements of *S. aureus* cells

368 The normalized potential energy by charge units, named zeta potential,<sup>38</sup> was  
369 measured to *S. aureus* cells in order to evaluate the effect of cationic DOX in surface of  
370 gram positive microorganism (Fig. 6a and 6b).

371 *S. aureus* is a cell that contains a polysaccharide cellular wall which confers to the  
372 organism a strong resistance on different environment. Its negative first electric layer  
373 must be responsible to the interaction with cationic drug, once is observed an increase  
374 of ZP upon increase of DOX<sup>39</sup> and DOX/ $\beta$ CD concentration, from negative to positive  
375 values. Increase of ZP negative values toward of zero value is a result of neutralization  
376 of surface by cations DOX<sup>+</sup>, which cause an inversion of charge of cell, after the  
377 isoelectrical point (IP  $\approx 1$  mg/mL.cfu).

378 The cell wall of Gram positive bacteria is composed mainly of peptidoglycan  
379 molecules and some other organic compounds such as teichoic acid, teichuronic acid

380 polyphosphates, carbohydrates, glucosamine, galactosamine, alanine, lysine, diamino  
381 pimelic acid, serine and glycine.<sup>40,41</sup> Peptidoglycan molecules are assembled into fibers  
382 that are grouped in parallel with respect to the cell membrane, serving as binding  
383 support to teichoic and teichuronic acid, which are attached perpendicularly thereon.<sup>42</sup>  
384 In general, peptidoglycan molecules influence the surface charge of Gram positive  
385 bacteria generating a net negative charge produced by the presence of phosphoryl  
386 groups in the molecules of teichoic and teichuronic acid.<sup>43</sup> Our results show a net  
387 negative charge at the beginning of the experiment that change with the increasing  
388 concentration of doxycycline. This fact could be possibly due the bactericidal activity,  
389 where it acts on the components of cell walls destabilizing them and generating cell  
390 compartmentalization.

391 The isoelectrical point of cells upon DOX/ $\beta$ CD titration occurs at lower  
392 concentration than pure DOX, ( $IP_{DOX/\beta CD} = 0.16$  mg/mL.cfu) corroborating the  
393 participation of  $\beta$ CD in interaction with cells. Considering that in both experiments the  
394 range of DOX concentration was the same, being the only difference the presence or  
395 absence of  $\beta$ CD, is proposed that the interaction enhancement of inclusion compound  
396 against pure DOX is caused by adhesion the  $\beta$ CD on surface due its ability to form  
397 hydrogen bond that acts in a sinergical manner with ionic interactions between the  
398 cationic drug and anionic cellular surface, allowing a greater adhesion between the drug  
399 and the surface of the bacteria, generating low doses that disrupt the bacterial surface<sup>44</sup>.

400

401

#### Insert Figure 6

402

403 *Isothermal titration calorimetry of DOX or DOX/ $\beta$ CD against S. aureus*

404 Aiming to provide complementary information about the mechanism of  
405 interaction between the DOX, DOX/ $\beta$ CD and *S. aureus*, direct heat flow caused by  
406 stepwise injections of DOX or DOX/ $\beta$ CD solutions (50 mM of DOX) in 1.0 mL of *S.*  
407 *aureus* suspension at  $6 \times 10^8$  cfu were accomplished.

408 Figure 7 shows the titration curves after subtraction of respective blank  
409 experiments. Titration of DOX in *S. aureus* leaves to an endothermic signals up to the  
410 concentration of 1.0 mg/mL.cfu, which was attributed to be the IP in zeta potential  
411 measurements. This phenomenon could be explained to the breakdown of solvation  
412 structures around the negative cellular surface due by the electrostatic interaction with



413 cationic DOX. After the IP, weak interactions must be involved once heat flow is close  
414 to zero.

415 In presence of  $\beta$ CD, the heat profile is completely different than those observed  
416 with the pure DOX titration. Exothermic profile with a minimal at  $C_{DOX} = 0.2$   
417 mg/mL.cfu ( $Q = -2966 \mu\text{J}$ ), for DOX/ $\beta$ CD system was observed this is very close to the  
418 IP observed by zeta potential measurement. This heat signal inversion suggests an  
419 evidence of the DOX-bacteria mechanism interaction change caused by the inclusion of  
420 DOX in  $\beta$ CD. Cyclodextrins as cyclical oligosaccharides are molecules rich in hydroxyl  
421 groups which can form spontaneously hydrogen bonds with the several components of  
422 cellular membrane. It is well known that hydrogen bonds are always attractive, thus  
423 their formation are exothermic process. Our data of interaction between the DOX with  
424  $\beta$ CD obtained by the ITC corroborate the hypothesis about the action mechanism of  
425 DOX/ $\beta$ CD based on adhesion of  $\beta$ CD in cellular membrane, where acts as a local and  
426 sustained releasing device of DOX, improving its efficacy.

427

428

#### Insert Figure 7

429

#### 430 *Measurement of toxicity and Cell Proliferation Colorimetric Assay using MTT*

431 Figure 8 shows the evaluation of toxicity and cell proliferation by using MTT  
432 assay. The data suggest that exposure of osteoblastic cells cultured to 5 or 1  $\mu\text{g/mL}$  of  
433 pure DOX stimulated cell proliferation and 25  $\mu\text{g/mL}$  DOX was cytotoxic, confirming  
434 the findings of Gomes et al., 2007.<sup>4</sup> In contrast, 25  $\mu\text{g/mL}$  of DOX/ $\beta$ CD inclusion  
435 compound showed effectively cell proliferation, showing a lower cytotoxic compound  
436 in comparison with free DOX. These promissory results suggest that this compound  
437 could be use for a longer period at low concentrations and increases the proliferation of  
438 osteoblasts.

439 Furthermore, studies in vivo and in vitro have shown that DOX, can inhibit the  
440 collagenase activity by a mechanism independent of its antimicrobial efficacy.<sup>45</sup>  
441 Although the mechanism of this inhibition is not understood, the MMP inhibition by  
442 tetracyclines may be related to the ability of these drugs binding to metal ions ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  
443  $\text{Zn}^{+2}$ ), since these enzymes (collagenase and gelatinase) require ions  $\text{Zn}^{+2}$  at its active  
444 site and  $\text{Ca}^{+2}$  ions to stabilize their molecular conformation. Besides its anticollagenase

445 properties, tetracyclines are also potent inhibitors of osteoclast function and bone  
446 resorption.<sup>45</sup> Thus new potential uses could be explored with this inclusion compound.

447

448

Insert Figure 8

449

#### 450 Conclusions

451 In this study, structural and thermodynamic parameters of DOX/ $\beta$ CD complex  
452 were determined in order to understand the DOX and DOX/ $\beta$ CD interaction with *S.*  
453 *aurus* cells. The interaction of DOX and DOX/ $\beta$ CD with *S. aurus* cells showed an  
454 inversion of the surface charge and reduction of the microorganism size. In DOX/ $\beta$ CD  
455 system, these interactions are more complex, probably by the formation of DOX/ $\beta$ CD  
456 aggregates on the bacteria surface. These data suggest a permeabilization of *S. aurus*  
457 membrane, which could be correlated with the DOX and DOX/ $\beta$ CD MIC values against  
458 *S. aurus* where DOX inclusion complexes with  $\beta$ CD were more active than pure DOX.  
459 Finally, the cellular viability tests showed that DOX/ $\beta$ CD complexes are less toxic than  
460 free DOX, suggesting a high efficacious and promissory use of this compound in a  
461 broad pharmacology applications.

462

#### 463 Acknowledgements

464

465 The authors would like to acknowledge financial support from the Brazilian  
466 Research agencies: INCT-Nanobiofar (CNPq/MCT/FAPEMIG), CNPq and FAPEMIG.  
467 This work is a collaborative research project with members of the Rede Mineira de  
468 Química (RQ-MG), who are supported by FAPEMIG and CNPq Nanobiotecnology  
469 Network Nanofar.

470

#### 471 Transparency declarations

472 None to declare.

473

474

475

476

477

478 **References**

479

- 480 1. Seymour RA, Heasman PA. Tetracyclines in the management of periodontal-  
481 diseases - A review. *Journal of Clinical Periodontology* 1995; 22: 22-35.
- 482 2. Gueders MM, Bertholet P, Perin F et al. A novel formulation of inhaled  
483 doxycycline reduces allergen-induced inflammation, hyperresponsiveness and  
484 remodeling by matrix metalloproteinases and cytokines modulation in a mouse model of  
485 asthma. *Biochemical Pharmacology* 2008; 75: 514-26.
- 486 3. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G et al. Tetracyclines: a pleiotropic family of  
487 compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *American*  
488 *Journal of Physiology-Cell Physiology* 2010; 299: C539-C48.
- 489 4. Gomes PS, Fernandes MH. Effect of therapeutic levels of doxycycline and  
490 minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic  
491 cells. *Archives of Oral Biology* 2007; 52: 251-9.
- 492 5. Rybak MJ, Leonard SN, Rossi KL et al. Characterization of Vancomycin-  
493 Heteroresistant *Staphylococcus aureus* from the Metropolitan Area of Detroit,  
494 Michigan, over a 22-Year Period (1986 to 2007) (vol 46, pg 2950, 2008). *Journal of*  
495 *Clinical Microbiology* 2008; 46: 4119-.
- 496 6. Ito T, Okuma K, Ma XX et al. Insights on antibiotic resistance of  
497 *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resistance*  
498 *Updates* 2003; 6: 41-52.
- 499 7. Brandenburg K, Arraiza MD, Lehwarik-Ivetot G et al. The interaction of rough  
500 and smooth form lipopolysaccharides with polymyxins as studied by titration  
501 calorimetry. *Thermochimica Acta* 2002; 394: 53-61.
- 502 8. Jelesarov I, Bosshard HR. Isothermal titration calorimetry and differential  
503 scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of  
504 biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition* 1999; 12: 3-18.
- 505 9. Bouchemal K, Mazzaferro S. How to conduct and interpret ITC experiments  
506 accurately for cyclodextrin-guest interactions. *Drug Discovery Today* 2012; 17: 623-9.
- 507 10. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and  
508 future. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 1023-35.
- 509 11. Vyas A, Saraf S, Saraf S. Cyclodextrin based novel drug delivery systems.  
510 *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2008; 62: 23-42.

- 511 12. Lofsson T, Masson M, Brewster ME. Self-association of cyclodextrins and  
512 cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004; **93**: 1091-9.
- 513 13. Vargas-Estrada D, Gracia-Mora J, Sumano H. Pharmacokinetic study of an  
514 injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in calves. *Research*  
515 *in Veterinary Science* 2008; **84**.
- 516 14. He Z-x, Wang Z-h, Zhang H-h et al. Doxycycline and hydroxypropyl- $\beta$ -  
517 cyclodextrin complex in poloxamer thermal sensitive hydrogel for ophthalmic delivery.  
518 *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2011; **1**: 254-60.
- 519 15. Werner MH. Advance User's Guide, Brucker. <940712>. *Spectrospin AG*.  
520 Fallanden, 1994.
- 521 16. Rahman A. *One and Two Dimensional NMR Spectroscopy*. New York: Elsevier,  
522 1989.
- 523 17. Guerra W, Silva IR, Azevedo EA et al. Three new complexes of platinum(II)  
524 with doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline and their antimicrobial activity.  
525 *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2006; **17**: 1627-33.
- 526 18. Schneider HJ, Hacket F, Rudiger V et al. NMR studies of cyclodextrins and  
527 cyclodextrin complexes. *Chem Rev* 1998; **98**: 1755-85.
- 528 19. Monteiro AS, Miranda TT, Lula I et al. Inhibition of *Candida albicans* CC  
529 biofilms formation in polystyrene plate surfaces by biosurfactant produced by  
530 *Trichosporon montevidense* CLOA72. *Colloid Surf B-Biointerface* 2011; **84**: 467-76.
- 531 20. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-  
532 First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and  
533 Laboratory Standards Institute, 2011.
- 534 21. Mammal. ZNSU. Worcestershire, United Kingdom: Malvern Instruments, 2004.
- 535 22. Jensen CE, dos Santos RA, Denadai AM et al. Pharmaceutical composition of  
536 valsartan: beta-cyclodextrin: physico-chemical characterization and anti-hypertensive  
537 evaluation. *Molecules* 2010; **15**: 4067-84.
- 538 23. de Alvarenga ES, Lima CF, Denadai AML. Study of aqueous solution of  
539 sodium dodecyl sulfate and polyethyleneoxide 10000 by NMR NOESY. *Z Nanoforsch A*  
540 2004; **59**: 291-4.
- 541 24. Denadai AML, Santoro MM, Texeira AV et al. New insights regarding the  
542 cyclodextrin/AAS self-assembly: A molar ratio dependent system. *Mater Sci Eng C-  
543 Mater Biol Appl* 2010; **30**: 417-22.

- 544 25. Lula I, De Sousa FB, Denadai AML et al. Interaction between bradykinin  
545 potentiating nonapeptide (BPP9a) and beta-cyclodextrin: A structural and  
546 thermodynamic study. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological  
547 Applications* 2012; **32**: 244-53.
- 548 26. Denadai AM, Ianzer D, Alcantara AF et al. Novel pharmaceutical composition  
549 of bradykinin potentiating penta peptide with beta-cyclodextrin: physical-chemical  
550 characterization and anti-hypertensive evaluation. *Int J Pharm* 2007; **336**: 90-8.
- 551 27. de Paula WX, Denadai AM, Santoro MM et al. Supramolecular interactions  
552 between losartan and hydroxypropyl-beta-CD: ESI mass-spectrometry, NMR  
553 techniques, phase solubility, isothermal titration calorimetry and anti-hypertensive  
554 studies. *Int J Pharm* 2011; **404**: 116-23.
- 555 28. deSousa FB, Denadai AML, Lula ISe et al. Supramolecular self-assembly of  
556 cyclodextrin and higher water soluble guest: Thermodynamics and topological studies. *J  
557 Am Chem Soc* 2008; **130**: 8426-36.
- 558 29. Turnbull WB, Daranas AH. On the value of  $c$ : Can low affinity systems be  
559 studied by isothermal titration calorimetry? *J Am Chem Soc* 2003; **125**: 14859-66.
- 560 30. Denadai AM, Santoro MM, Lopes MT et al. A supramolecular complex between  
561 proteinases and beta-cyclodextrin that preserves enzymatic activity: physicochemical  
562 characterization. *BioDrugs* 2006; **20**: 283-91.
- 563 31. Rekharsky MV, Inoue Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins.  
564 *Chem Rev* 1998; **98**: 1875-917.
- 565 32. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance.  
566 *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2010; **74**.
- 567 33. Colaizzi JL, Klink PR. pH-partition behavior of tetracyclines. *Journal of  
568 Pharmaceutical Sciences* 1969; **58**: 1184-8.
- 569 34. Blackwood RK, English AR, Perlman D. Structure-Activity Relationships in the  
570 Tetracycline Series. *Advances in Applied Microbiology*: Academic Press, 1970; 237-66.
- 571 35. Coleman AW, Nicolis I, Keller N et al. Aggregation of Cyclodextrins - an  
572 Explanation of the Abnormal Solubility of Beta-Cyclodextrin. *J Includ Phenom Mol*  
573 1992; **13**: 139-43.
- 574 36. Messner M, Kurkov SV, Flavia-Piera R et al. Self-assembly of cyclodextrins:  
575 The effect of the guest molecule. *Int J Pharm* 2011; **408**: 235-47.

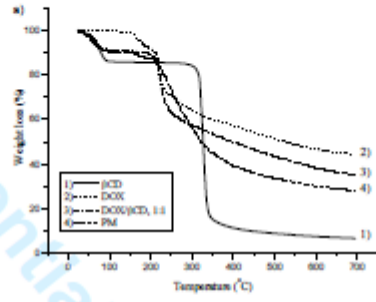
- 576 37. Denadai AM, Teixeira KI, Santoro MM et al. Supramolecular self-assembly of  
577 beta-cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine.  
578 *Carbohydr Res* 2007; **342**: 2286-96.
- 579 38. Elimelech M, Chen WH, Waypa JJ. Measuring the Zeta (Electrokinetic)  
580 Potential of Reverse-Osmosis Membranes by a Streaming Potential Analyzer.  
581 *Desalination* 1994; **95**: 269-86.
- 582 39. Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T et al. Increased resistance to cationic  
583 antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*.  
584 *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; **61**: 1266-9.
- 585 40. Strominger JL, Park JT, Thompson RE. Composition of the cell wall of  
586 *Staphylococcus aureus* - its relation to the mechanism of action of penicillin. *Journal of*  
587 *Biological Chemistry* 1959; **234**: 3263-8.
- 588 41. Cummins CS, Harris H. The chemical composition of the cell wall in some  
589 gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *Journal of*  
590 *General Microbiology* 1956; **14**: 583-600.
- 591 42. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and  
592 mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular*  
593 *Biology Reviews* 1999; **63**: 174-229.
- 594 43. Wilson WW, Wade MM, Holman SC et al. Status of methods for assessing  
595 bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of*  
596 *Microbiological Methods* 2001; **43**: 153-64.
- 597 44. Teixeira KI, Araujo PV, Almeida BRN et al. Ultrastructural changes in bacterial  
598 membranes induced by nano-assemblies beta-cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM,  
599 and TEM evaluation. *Pharm Dev Technol* 2012; **20**: 20.
- 600 45. Sorsa T, Golub LM. Is the excessive inhibition of matrix metalloproteinases  
601 (MMPs) by potent synthetic MMP inhibitors (MMPIs) desirable in periodontitis and  
602 other inflammatory diseases? That is: 'Leaky' MMPIs vs excessively efficient drugs.  
603 *Oral Diseases* 2005; **11**: 408-9.
- 604  
605  
606

## Figure Captions:

- 607  
608  
609 **Figure 1:** a) DTA curves of  $\beta$ CD (continuous line), DOX (dotted line), IC (dashed  
610 line), and PM - 1:1 DOX/ $\beta$ CD (dotted and dashed line); (b) TGA curves of  $\beta$ CD  
611 (continuous line), DOX (dotted line), IC (dashed line), and PM - 1:1 DOX/ $\beta$ CD (dotted  
612 and dashed line).
- 613 **Figure 2:** FTIR spectra of  $\beta$ CD, DOX, 1:1 DOX/ $\beta$ CD, Physical mixture of DOX and  
614  $\beta$ CD.
- 615 **Figure 3:** Expansion of the contour map NMR 2D-ROESY (400 MHz, spin lock = 600  
616 ms) of the DOX/ $\beta$ CD/D<sub>2</sub>O system.
- 617 **Figure 4:** Isothermal Titration Calorimetry of DOX 70 mM into cell charged with  $\beta$ CD  
618 4 mM, after subtraction of blank experiment (DOX 70.0 mM in water).
- 619 **Figure 5:** Hydrodynamic diameter ( $D_h$ ) of *S. aureus* cells as a function of concentration  
620 of (A) DOX concentration and (B) DOX/ $\beta$ CD concentration. The experiments were  
621 carried out by injection of aliquots of a 10 mg/mL aqueous solution in to *S. A* aqueous  
622 suspension ( $10^8$  CFU/mL).
- 623 **Figure 6:** Zeta potential of *S. aureus* cells as a function of concentration of (A) DOX  
624 and (B) DOX/ $\beta$ CD concentrations. The experiments were carried out by injection of  
625 aliquots of a 10 mg/mL aqueous solution in to *S. aureus* aqueous suspension ( $10^8$   
626 CFU/mL).
- 627 **Figure 7:** Isothermal Titration Calorimetry of DOX (open circles) and, DOX/ $\beta$ CD  
628 (filled squares) (both at 50 mg/mL of DOX) in 1.0 mL of *S. aureus* suspension at  $6 \times$   
629  $10^8$  CFU/mL, after subtraction of blank experiments.
- 630 **Figure 8:** Citotoxicity assay and proliferation stimulus on osteoblasts of DOX and  
631 DOX/ $\beta$ CD (1:1) by MTT after 96 h.
- 632



633



634

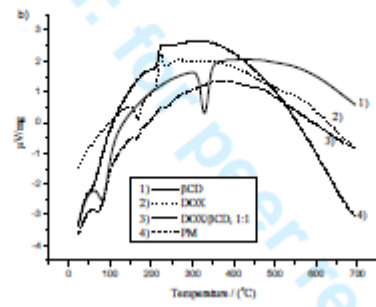


Fig. 1.

635

636

637

638



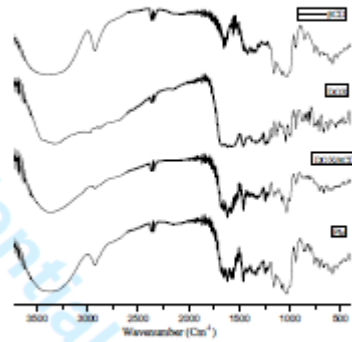


Fig. 2

639  
640  
641  
642  
643  
644

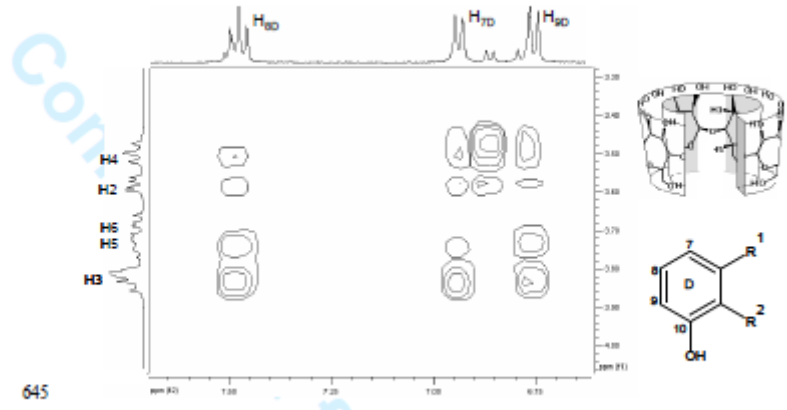


Fig. 3.

645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659

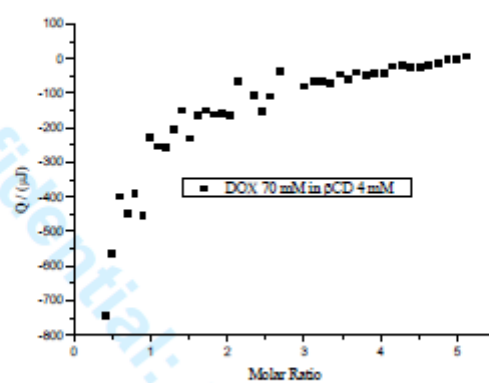
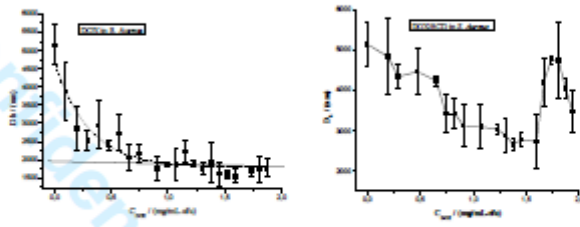


Fig. 4.

660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674

675



676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

Fig. 5.

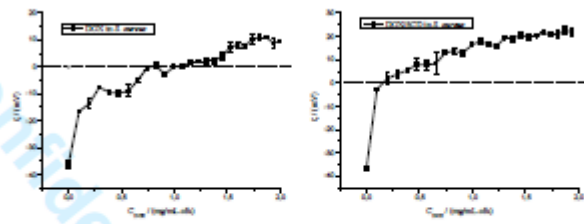
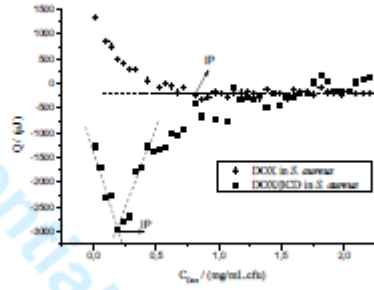


Fig. 6.

690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708

709



710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

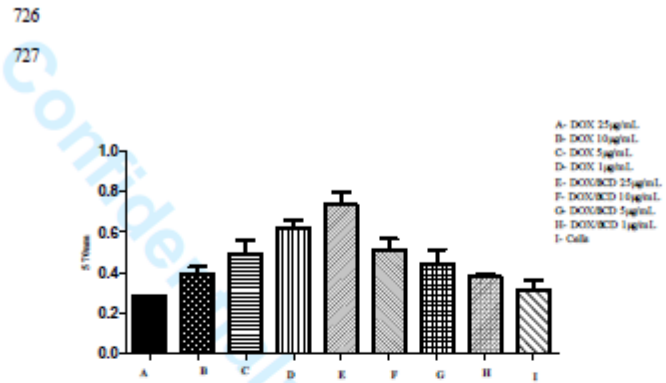
722

723

724

725

Fig. 7.



728

729 Fig. 8.

730

731

732

733 **Table 1**734 MICs and MBCs of DOX, DOX/ $\beta$ CD against *Staphylococcus aureus* ATCC 27664

	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)
DOX	1.22	625
DOX/ $\beta$ CD	< 0.009	78.12
$\beta$ CD	>500	>500

735  
736

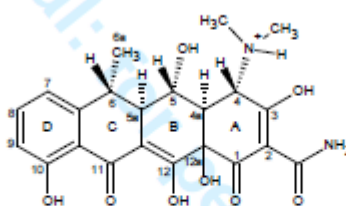


## Supporting Material

**Title:** Structural and thermodynamical characterization of doxycycline- $\beta$ -cyclodextrin compound and its bacterial membrane interactions

**Running Title:** Doxycycline- $\beta$ -cyclodextrin bacterial interactions

Diego F. Suárez<sup>a</sup>, Jessika Consuegra<sup>a</sup>, Vivianne C. Trajano<sup>b</sup>, Savio M.L. Gontijo<sup>b</sup>,  
Pedro P.G. Guimarães<sup>c</sup>, Maria E. Cortés<sup>b</sup>, Ângalo L. Denadai<sup>c</sup>, Rubén D. Sinisterra<sup>a\*</sup>.



**Figure S1.** Structure of the doxycycline (2-Naphthacenecarboxamide, 4- $\alpha$ -S-(dimethylamino)-1,4,4a- $\alpha$ -5,5a- $\alpha$ ,6,11,12a-octahydro-3,5- $\alpha$ ,10,12,12a-lpha-pentahydroxy-6- $\alpha$ -methyl-1,11-dioxo-).

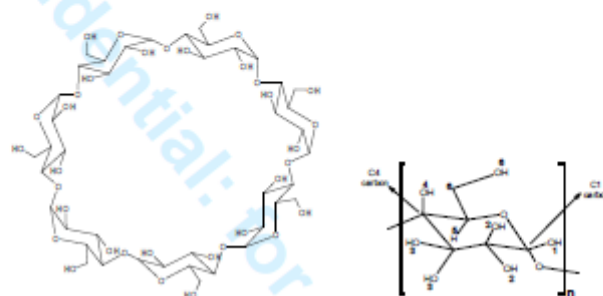


Figure S2. Structure of  $\beta$ -cyclodextrin

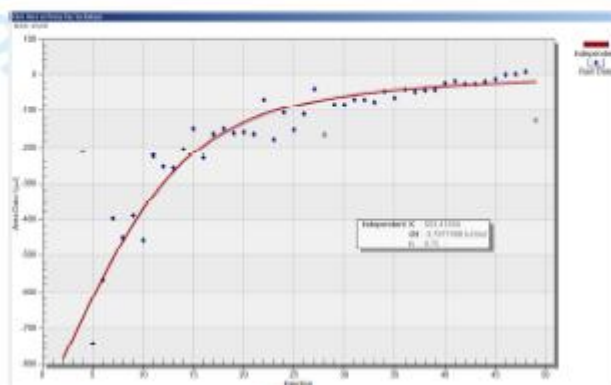


Figure S3: ITC experiment obtained by using of Nano Analyze Data Analysis® software.

## ANEXO 11

## CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM



UFMG

EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Maria Esperanza Cortes Segura,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OSTEOGÊNICA DA DOXICICLINA EM UMA MATRIZ DE COMPÓSITO DE, submetido a esta comissão pelo protocolo 184 / 2012, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 29/08/2012.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 30/08/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)