

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**



**Tese**

**Hidrogel de alginato funcionalizado para utilização como sistema de entrega  
em Odontologia**

**Fernanda Barbosa Leal**

Pelotas, 2017

**Fernanda Barbosa Leal**

**Hidrogel de alginato funcionalizado para utilização como sistema de entrega  
em Odontologia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração em Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Piva

Co-orientadores: Prof. Dr. Fabrício Aulo Ogliari  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adriana Fernandes da Silva

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

L435h Leal, Fernanda Barbosa

Hidrogel de alginato funcionalizado para utilização como sistema de entrega em odontologia / Fernanda Barbosa Leal ; Evandro Piva, orientador ; Fabrício Ogliari, Adriana Fernandes da Silva, coorientadores. — Pelotas, 2017.

58 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Dentística, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Hidrogel de alginato. 2. Microesferas. 3. Metacrilato. 4. Sistema de entrega. 5. Materiais dentários. I. Piva, Evandro, orient. II. Ogliari, Fabrício, coorient. III. Silva, Adriana Fernandes da, coorient. IV. Título.

Black : D151

Fernanda Barbosa Leal

Hidrogel de alginato funcionalizado para utilização como sistema de entrega em  
Odontologia

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 24/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Evandro Piva  
Doutor em Odontologia (Área de concentração: Materiais dentários) pela Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira  
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho  
Doutor em Odontologia (Área de concentração: Materiais Dentários) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño  
Doutor em Ciências (Área de concentração: Química) pela Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Cesar Henrique Zanchi  
Doutor em Ciências (Área de concentração: Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Nedel  
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (suplente)

Profa. Dra. Giana da Silveira Lima  
Doutora em Odontologia (Área de concentração: Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas (suplente)

## **Agradecimentos**

À **Universidade Federal de Pelotas**, na pessoa do Reitor Dr. Pedro Hallal.

À **Faculdade de Odontologia**, representada pela diretora Dra. Adriana Etges.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, coordenada pelo Dr. Rafael Ratto de Moraes.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Evandro Piva**, por acreditar no meu trabalho desde 2006 e compreender minha limitação de tempo para finalização deste trabalho com total apoio e incentivo, mostrando-se sempre disponível para me auxiliar. Obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador, que por anos foi meu orientador, **Prof. Dr. Fabrício Aulo Ogliari**, profissional extremamente competente com quem eu tive o prazer de conviver durante 10 anos, desde a iniciação científica admirando o seu conhecimento e capacidade criativa. Obrigada por me proporcionar oportunidades que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, desejo todo o sucesso nesta nova caminhada!

A minha co-orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Fernandes da Silva** pela imensa colaboração na parte biológica deste trabalho, sem sua ajuda isso não seria possível.

Ao **CDC-Bio**, laboratório onde vivi anos da minha vida, aprendendo, desenvolvendo e convivendo com pessoas especiais.

Ao laboratório de microbiologia pela realização dos testes biológicos deste trabalho.

A equipe do **Prof. Dr. Cesar Petzhold** da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela realização da Ressonância Magnética Nuclear.

Aos colegas e amigos **Carlos e Wellington**, pela ajuda no último ano desta etapa, contribuindo imensamente para desenvolvimento deste trabalho.

A colega e amiga **Carine Meereis**, parceira de todas as horas e empreitadas científicas. Foi quem ouviu minhas inquietações e esteve sempre presente para apoiar. Já sinto saudade da nossa convivência diária.

Aos demais colegas e amigos do PPGO, que tornaram esta caminhada mais leve e divertida!

Aos meus **pais e irmãos** por estarem sempre presentes, grandes incentivadores do meu trabalho! Amo vocês!

Ao meu noivo e companheiro **Guilherme**, por todo apoio, carinho e compreensão durante todos esses anos. Te amo!

***“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”***

***José de Alencar***

## **Notas Preliminares**

A presente tese foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2013, adotando o Nível de Descrição 3 – estrutura em “Capítulos não convencionais”, descrita no Apêndice D do referido manual. <<http://sisbi.ufpel.edu.br/?p=documentos&i=7>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

O projeto de pesquisa referente a essa tese foi aprovado no dia 15 de maio de 2014 pela Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Evandro Piva, Rafael Guerra Lund, Adriana Fernandes da Silva e Rodrigo Varella de Carvalho.



## Resumo

LEAL, Fernanda Barbosa. **Hidrogel de alginato funcionalizado para utilização como sistema de entrega em Odontologia**. 2017. 56f. Doutorado em Odontologia – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Terapias inovadoras têm sido avaliadas para reparo ou regeneração de tecidos e órgãos afetados por doença ou trauma. A liberação de drogas de forma direta sobre o tecido afetado pode melhorar a resposta ao tratamento, aumentando as chances de obtenção de sucesso. Uma alternativa inovadora seria a utilização de um material a base de hidrogel de alginato, um copolímero derivado de um polissacarídeo natural e que, devido as suas características como biocompatibilidade, hidrofília e baixo custo, tem sido utilizado em uma variedade de aplicações na área da saúde. Utilizado extensivamente como transportador de drogas e fator de crescimento, sua utilização pode possibilitar tratamentos mais biológicos com a indução de eventos que envolvem o reparo ou a regeneração de tecidos de interesse. O objetivo deste trabalho foi dividido em duas partes: o primeiro foi sintetizar e caracterizar microesferas de hidrogel de alginato contendo radicais de metacrilato para uso como sistema de entrega. O alginato metacrilado foi sintetizado por 24 horas e a conversão do produto foi seguida por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). O produto obtido após a purificação foi caracterizado por  $H^1$  RMN. Microesferas de alginato foram obtidas pela técnica de *spray* em solução de  $CaCl_2$  para crosslinking. Diferentes formulações que variaram quanto à funcionalização com metacrilato, fotoiniciadores e presença de quitosana, foram testadas. Ensaio da viabilidade celular foi investigado e o diâmetro médio das microesferas foi obtido por microscopia óptica. Na segunda etapa do trabalho foi realizada a prospecção tecnológica com a descrição da patente de invenção referente ao desenvolvimento de biomateriais contendo microesferas de alginato funcionalizado e com moléculas bioativas. As análises de FTIR e RMN confirmaram o sucesso da síntese de hidrogel de alginato contendo metacrilato. O ensaio da viabilidade celular demonstrou que todos os grupos possuem baixa citotoxicidade, com resultados semelhantes ao controle, e as microesferas apresentaram um diâmetro médio de 20 $\mu$ . Este estudo mostrou uma maneira simples e eficaz para obter microesferas de hidrogel de alginato contendo radicais metacrilato, com um elevado potencial para aplicação como sistema de entrega em materiais odontológicos.

**Palavras-chave:** hidrogel de alginato; microesferas; metacrilato; sistema de entrega; materiais dentários.

## Abstract

LEAL, Fernanda Barbosa. **Functionalized alginate hydrogel for system delivery in dentistry**. 2017. 56p. PhD in Dentistry. Graduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2017.

Innovative therapies have been evaluated for repair or regeneration of tissues and organs affected by disease or trauma. The drug release directly on the affected tissue can improve response to treatment, increasing the chances of obtaining therapeutic success. An alternative would be the use of alginate hydrogel, a copolymer derived from a natural biocompatible polysaccharide, because of their characteristics as biocompatibility, hydrophilicity and low cost, it has been used in a variety of applications in health. Used extensively as carrier of drugs and growth factor, its use can enable more biological treatments with the induction of events involving the repair or regeneration of tissues of interest. The aim of this work was divided into two parts: the first was to synthesize and characterize alginate hydrogel microspheres containing methacrylate radicals for use as delivery system. The alginate methacrylated was synthesized by 24 hours and product conversion was followed by spectroscopy of Fourier transform infrared (FTIR). The product obtained after purification was characterized by  $H^1$  NMR. Alginate microspheres were obtained by the spray-coagulation method in  $CaCl_2$  solution for cross-linking. Different formulations that ranged as far as methacrylate functionalization, photoinitiators, and presence of chitosan, were tested. Cell viability assay was investigated and the mean diameter of the microspheres was obtained by optical microscopy. In the second stage of work was held the technological prospecting with the description of the invention patent for the development of biomaterials containing functionalized alginate microspheres with bioactive molecules. FTIR and NMR analyses confirmed the successful synthesis of alginate hydrogel containing methacrylate. Cell viability assay showed that all groups have low cytotoxicity, with similar results to the control and microspheres showed an average diameter of 20  $\mu m$ . This study showed a simple and effective way to obtain alginate hydrogel microspheres containing methacrylate radicals, with a high potential for application as delivery system in dental materials.

**Key-words:** alginate hydrogel; microspheres; methacrylate; delivery system; dental materials.

## Sumário

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>1 Introdução .....</b>           | <b>11</b> |
| <b>2 Capítulo 1 .....</b>           | <b>14</b> |
| <b>3 Capítulo 2 .....</b>           | <b>31</b> |
| <b>4 Considerações finais .....</b> | <b>48</b> |
| <b>Referências .....</b>            | <b>49</b> |
| <b>Apêndices .....</b>              | <b>53</b> |

## 1 Introdução

Terapias biológicas têm sido desenvolvidas com foco no reparo ou regeneração de tecidos e órgãos afetados por doenças ou injúrias (MURRAY et al., 2002; TZIAFAS et al., 2000, 2004; SCHMALZ et al., 2014). Entre eles, recentes avanços na pesquisa biomédica direcionam para a concepção de novos métodos de tratamento odontológico, como os focados na regeneração dos tecidos dentais e maxilo-faciais. Com isso, novas abordagens têm sido desenvolvidas baseadas na compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que regulam processos como a dentinogênese, osteogênese, angiogênese, entre outros. O potencial para exploração clínica dessas novas abordagens é majoritariamente baseado em materiais com sistemas de entrega para liberação de moléculas bioativas ou fármacos (HUBBELL et al., 1996; LOHRMANN et al., 2000; PANTELIDIS et al., 2006; MASTERS et al., 2014; LICHTER et al., 2016).

Dentre os possíveis materiais a compor um sistema de entrega, o alginato é um copolímero derivado de um polissacarídeo natural (AUGST et al., 2006). Quando obtido em alta pureza e estéril proporciona aplicações biomédicas devido as suas características como fácil geleificação, biocompatibilidade, hidrofília e baixo custo (LEE et al., 2012). Desta forma são descritas aplicações na medicina (NOVIKOVA et al., 2006), farmacologia (TONNESEN et al., 2002), ciências biológicas (SONE et al., 2002) e na odontologia (DOBIE et al., 2002), além de ser amplamente utilizado na engenharia tecidual (NICODEMUS et al., 2008; PARK et al., 2009; SANTANA et al., 2013). Outra aplicação onde os alginatos têm sido investigados está relacionada a sistema de entrega de fármacos e citocinas. (DOBIE et al., 2002; TONNESEN et al., 2002; ZIMMERMANN et al., 2005). A fácil geleificação na presença de íons divalentes e em pH e temperatura fisiológicas favorecem a retenção de fármacos e também de fatores de crescimento como o TGF- $\beta$ 1 sequestrada na dentina e liberada em lesões cariosas, que cumpre papel importante no estímulo a formação de dentina reparativa e reacional, esclerose dentinária (mineralização intratubular), o controle do processo inflamatório e a formação de tecido mineralizado.

No entanto, sua utilização é limitada devido ao seu modo de obtenção por agentes químicos de reticulação. Normalmente, um estado de hidrogel em alginato é gerado através de ligações cruzadas iônicas entre os radicais do ácido carboxílico e os cátions bivalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  (SMIDSROD et al., 1990). Apesar das vantagens abordadas serem apropriadas para a inclusão de fatores de crescimento, estes hidrogéis ionicamente reticulados perdem sua integridade estrutural ao longo do tempo, pois os íons bivalentes são dissolvidos no meio aquoso durante o seu preparo (BAER et al., 2001), comprometendo sua estabilidade.

Recentemente, vários polímeros têm sido modificados com grupos funcionais fotopolimerizáveis para criar hidrogéis reticulados covalentemente (BRYANT et al., 2004; LEACH et al., 2003; Li et al., 2004). As vantagens deste método de fotorreticulação são a indução de transformações de fase líquido-sólidos do polímero sob condições fisiológicas, a reação independe dos níveis de cálcio, a possibilidade de polimerização *in situ* (ANSETH et al., 2002; VAN TOMME et al., 2008), maior controle da reação e aplicação direta em locais de difícil acesso. Além disso, esta tecnologia pode ser utilizada para manter a integridade estrutural e mecânica de hidrogéis de alginato tridimensionais (JEON et al., 2009 e 2010).

Para que um monômero possa ser fotopolimerizável tem de apresentar na sua estrutura grupos funcionais que possam ser induzidos a reagir perante uma fonte de luz, permitindo a sua reticulação ou apenas fotopolimerização (CORRALES et al., 2003). Trabalhos recentes substituíram os alcoóis secundários do alginato por radicais metacrilatos (SMEDS et al., 2001) que, na presença de fotoiniciadores compatíveis, formam radicais livres quando expostos à fonte de luz. Estes radicais livres, em seguida, interagem com os grupos altamente reativos de acrilato funcionais ao longo da cadeia polimérica, conduzindo à formação de reticulações covalentes (SMEDS et al., 2001; BURDICK et al., 2005). Esta reação pode ocorrer rapidamente, muitas vezes dentro de segundos, e depende das concentrações relativas de pré-polímero e do fotoiniciador bem como a intensidade e duração da exposição à luz (JEON et al., 2009 e 2010).

Trabalhos anteriores demonstraram a utilização de fonte de luz ultravioleta (UV) como um método alternativo para obtenção de polímeros com ligações cruzadas (ELISSEFF et al., 1999; SMEDS et al., 2001; BURDICK et al., 2005). No entanto, deve-se controlar o tempo de exposição e a extensão da área atingida para

assegurar que a viabilidade celular não seja afetada pelo excesso de produção de radicais livres ou de danos ao DNA causados pela luz UV (DINANT et al., 2013; CORTAT et al., 2013; MIRONI-HARPAZ et al., 2012). A fonte de luz azul, utilizada clinicamente na odontologia, seria uma alternativa para melhorar a viabilidade deste processo, tornando-o mais seguro.

Dessa forma, esta tese foi dividida em dois capítulos para abordar o assunto a partir do estado da arte e do estado da técnica. O objetivo do primeiro capítulo foi desenvolver e caracterizar um hidrogel de alginato funcionalizado com metacrilato com potencial de polimerização para aplicação como sistema de entrega de aplicação de interesse na odontologia. No segundo capítulo, com base no trabalho de prospecção tecnológica foi redigido um pedido de patente de invenção referente ao desenvolvimento de biomateriais contendo microesferas de alginato funcionalizado e com moléculas bioativas.

## **2 Capítulo 1**

### **Synthesis of a photocrosslink alginate microspheres containing methacrylate radicals**

Fernanda Barbosa Leal<sup>a</sup>, Carlos Enrique Cuevas Suárez<sup>a</sup>, Wellington Luiz de Oliveira da Rosa<sup>a</sup>, Fabrício Aulo Ogliari<sup>b</sup>, Adriana Fernandes da Silva<sup>b</sup>, Evandro Piva<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> DDS, Post-graduate Student, Faculty of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil

<sup>b</sup> DDS, PhD, Associate Professor, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

#### **Postal addresses**

*\*Corresponding author*

<sup>c</sup>Dr. Evandro Piva

E-mail address: [evpiva@pq.cnpq.br](mailto:evpiva@pq.cnpq.br)

Department of Restorative Dentistry, Federal University of Pelotas

Gonçalves Chaves St., 457, room 504

Zip Code: 96015-560, Pelotas, RS, Brazil.

+55 53 32256741 (134)

**Abstract**

The aim of this study was to describe the synthesis and microspheres obtantion from alginate hydrogel containing methacrylate monomers and characterize the microspheres for application as delivery system in dentistry. Methacrylated alginate was synthesized and the product conversion was followed by Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR). The product obtained after the purification was characterized by  $^1\text{H}$  NMR. Microspheres of alginate were obtained by the spray-coagulation method into solution of  $\text{CaCl}_2$  for cross-linking. Different formulations which varied about methacrylathe functionalization, photoinitiators, and presence of chitosan, were tested. Cell viability assay was investigated and a mean diameter of microspheres was obtained by optical microscopy. The FTIR and  $^1\text{H}$ NMR spectra confirmed the alginate hydrogel containing methacrylate obtained by synthesis. The cell viability assay demonstrates that all groups exhibited low cytotoxicity, with similar results to control and microspheres showed a mean diameter of  $20\mu$ . This study showed a simple and effective way to obtain microspheres of alginate hydrogel containing methacrylate monomers with a high potential for application as delivery system in dental materials.

Keywords: Microspheres; alginate hydrogel; spray-drying method; delivery system.



## 1 Introduction

Biological therapies have been developed with a focus on the repair or regeneration of tissues and organs affected by disease or injury [1-4]. Recent advances in biomedical research have led to the design of new methods of dental treatment, such as those focused on the regeneration of dental and maxillofacial tissues. Thereby, new approaches have been developed based on the understanding of molecular and cellular mechanisms that regulate processes such as dentinogenesis, osteogenesis, and angiogenesis. The potential for clinical exploration of these new approaches is largely based on materials with delivery systems for release of bioactive molecules or drugs [5-7].

Among the possible materials to compose a delivery system, alginate is a copolymer derived from a natural polysaccharide and, when obtained in high purity level and sterile it provides biomedical applications, due to its characteristics as easy gelling, biocompatibility, hydrophilicity and low cost [22], has been used in a variety of applications in medicine [23], [24] pharmacology, biological sciences [25] and in dentistry [26], in addition to being widely used in tissue engineering [27-29]. Furthermore, was also used extensively as carrier of drugs and growth factor [7-9] and can be an alternative for the treatment of deep cavity, because the incorporation of biologically active molecules in stomatologic materials, with alginate hydrogel as delivery system, can enable more biological treatments with the induction of events involving the repair or regeneration of tissues of interest, such as the formation of tertiary dentin, dentin sclerosis (intratubular mineralization), control of the inflammatory process and the formation of mineralized tissue. Alginate hydrogel microspheres system would promote the sustained and controlled slow release of biologically active molecules for long periods of time, as antibiotic, anti-inflammatory or growth factors.

However, its use is limited due to its production by chemical crosslinking agents. Typically, a state of hydrogels in alginate is generated through crosslinks between ionic radicals of the carboxylic acid and the divalent cations such as  $\text{Ca}^{2+}$  [30]. Although the advantages discussed are appropriate for the inclusion of growth factors, these hydrogels ionically reticulated lose their structural integrity over time because the bivalent ions are dissolved in an aqueous medium during its preparation [31], compromising your stability. Recently, various polymers have been modified with

photopolymerizable functional groups to create covalently crosslinked hydrogels [32-34]. The advantages of this method of photoreticulation are the induction of liquid-solid phase transformations of the polymer under physiological conditions, the reaction independent of the calcium levels, the possibility of in situ polymerization [35,36], greater reaction control and direct application in hard to reach places. In addition, this technology can be used to maintain the structural and mechanical integrity of three-dimensional alginate hydrogels [37, 38].

Previous work has demonstrated the use of ultraviolet (UV) light source as an alternative method for obtaining crosslinked polymers [42] [33, 40, 41]. However, exposure time and extent of the affected area should be controlled to ensure that cell viability is not affected by excess free radical production or DNA damage caused by UV light [43-45]. The blue light source, used clinically in dentistry, would be an alternative to improve the viability of this process, making it safer.

The aim of this study was to describe the synthesis and microspheres obtention from alginate hydrogel containing methacrylate monomers and characterize the microspheres for application as delivery system in dentistry.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Methacrylated alginate hydrogel synthesis

The synthesis of methacrylated alginate hydrogel followed similar procedures described previously [10-12]. In summary, alginic acid with low viscosity (Vetec, Sigma Aldrich, Brazil) was dissolved in deionized water to obtain a solution at 1 wt%. Anhydride methacrylic (Alfa Aesar, USA) with 20-fold excess was added slowly at 4°C and the pH of 8 was adjusted with NaOH 5 N for 24 h. The solution was washed with ethanol to remove remained methacrylic acid and anhydride methacrylic and the final product was recovered using a rotary evaporator and lyophilization.

### 2.2 Characterization of the methacrylated alginate synthesis

The obtained product was characterized by FTIR (Shimadzu Prestige 21 Spectrometer, Shimadzu, Japão) to observe the appearance of the peak at  $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$  corresponding the carbonyl (C=O) and the disappearance of the peak at  $3282\text{ cm}^{-1}$

cm<sup>-1</sup> corresponding the hydroxyl (OH). To confirm the functionalization with methacrylate groups, <sup>1</sup>H NMR spectra was obtained using deuterium oxide as solvent and as internal standard (NMR- Varian VXR, 300 MHz- Agilente Technologies, USA).

### 2.3 Preparation of alginate microspheres

An alginate solution (1.5 wt%) was prepared by dissolving sodium alginate in deionized water and magnetically stirring until the alginate powder has fully dissolved to form a clear and viscous solution. This solution was dropped by spray-coagulation method directly into crosslink solution (100 mM CaCl<sub>2</sub> in deionized water adjusted to pH 7.4) by agitation to obtain microspheres [13]. The microspheres were sieved through a 250 µm opening and were collected by centrifugation at 1200 rpm for 3 minutes (Quimis Q222TM108, Brazil).

Alginate/chitosan microspheres were prepared by complex coacervation using sodium alginate as a gel core. The same process described previously was used, and the crosslink solution was doped with chitosan particles at 1 wt% (Chitosan low molecular weight, Sigma Aldrich, Brazil). The microspheres were allowed to harden for at least 2 h by magnetically stirring before to centrifugation.

The photoinitiators are added in alginate solution at 5 wt% before the microspheres obtation. The photoinitiators tested are: BAPO - phenylbis (2,4,6-trimethylbenzoyl)-phosphine oxide; TPO - diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide; and Irgacure - 2-Hydroxy-4-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone, all used as received from Sigma Aldrich.

To avaluate the different characteristics, ten groups were formulated as described in Figure 1.

|  |  |
|--|--|
|  |  |
|--|--|

| Groups                                                                              | Composition                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
|    | 1.5% of alginate                                                   |
|    | 1.5% of alginate-methacrylate                                      |
|    | 1.5% of alginate and 1.0% of chitosan                              |
|    | 1.5% of alginate-methacrylate and 1.0% of chitosan                 |
|    | 1.5% of alginate-methacrylate and 5.0% of BAPO                     |
|    | 1.5% of alginate-methacrylate and 5% of TPO                        |
|  | 1.5% of alginate-methacrylate and 5% of IRGACURE                   |
|  | 1.5% of alginate-methacrylate; 1.0% of chitosan and 5% of BAPO     |
|  | 1.5% of alginate-methacrylate; 1.0% of chitosan and 5% of TPO      |
|  | 1.5% of alginate-methacrylate; 1% of chitosan and 5.0% of IRGACURE |

**Figure 1.** Study design of microspheres groups tested.

A: Alginate; M: Alginate-methacrylate; C: Chitosan; B: BAPO; T: TPO; I: IRGACURE

## 2.4 Cell viability assay

Cell viability assay was performed by adaptation to ISO 10993:2009. Mouse fibroblasts L929 ( $2 \times 10^4$  cells/well) were maintained in DMEM in 96-well plates for 24 h at 37° C in a CO<sub>2</sub> incubator under 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. Each material was previously incubated in 1 mL of DMEM at 37° C, pH 7.2 for 24 h, under static conditions to obtain the eluates (n=4). The same volume of spheres from each group

was dispensed into well. The groups with photoinitiator were photoactivated for 1 min (Bluephase, Ivoclar, USA) before to insert PBS. The positive control used was the untreated group (only fibroblast cells in DMEM, without eluate addition). The eluates from the specimens were applied in each well of 96-well plates previously prepared with mouse fibroblasts. The cytotoxicity produced by each different group was assessed with 24 h cell exposure time. After removing the eluates, 180  $\mu$ L of DMEM was added to 20  $\mu$ L of MTT solution and placed in each well. After 4 h of incubation at 37°C in darkness the blue formazan precipitate was extracted from the mitochondria using 200  $\mu$ L/well of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorption was determined using a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm. The cell viability data (absorbance) were analyzed using the program SigmaPlot 12 (Systat Inc, USA). One-way ANOVA was used to analyze cell viability. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

### *2.5 Microsphere size determination*

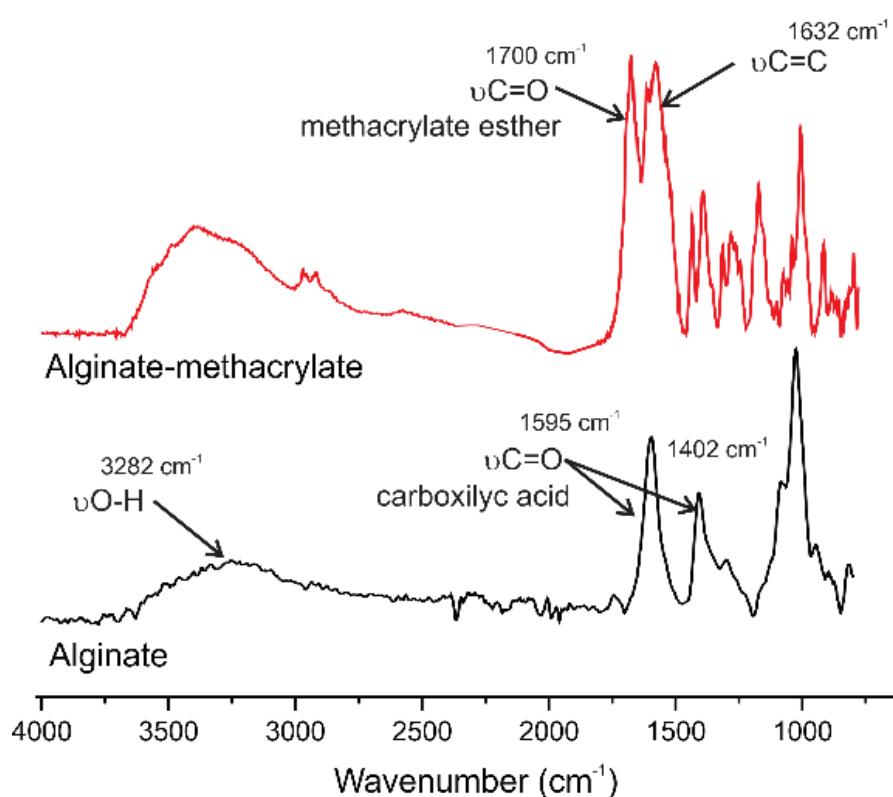
Measurements of the microspheres diameters were carried out with an inverted optical microscope (INV-100 Bel Photonics, Brazil) with Eurokam 5.0 camera. Microspheres were visualized under 100 $\times$  and 400 $\times$  magnification. Bel Capture software was used to perform image capture and the measurement of the average diameter of microspheres.

## **3 Results**

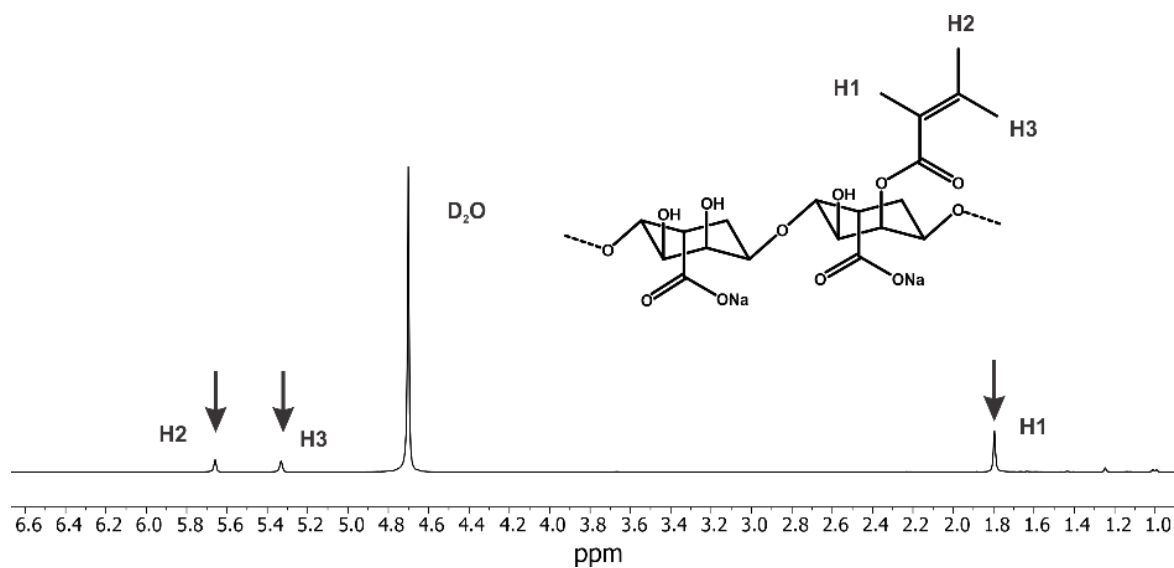
FTIR and  $^1\text{H}$  NMR confirmed the methacrylation of sodium alginate (Figure 2 and 3). The Figure 2 shows the FTIR spectra of unmodified and modified sodium alginate. This figure indicates the presence of carbonyl at  $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$  and decreased peak of hydroxyl at  $\sim 3282\text{ cm}^{-1}$ . The spectrum of sodium alginate show distinctive bands around 1595 and  $1402\text{ cm}^{-1}$ , which corresponds to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of carboxylate salt groups of alginate. Additionally, successful methacrylation can be confirmed by NMR (Figure 3), the signals at 1.9 ppm caused by the methyl protons ( $-\text{CH}_3$ ) derived from the methacrylate group as well as the corresponding olefinic protons at 5.25 and 5.7 ppm ( $\text{C}=\text{CH}_2$ ) and the peak at 4.8 ppm indicate deuterium oxide (solvent and internal standard).

Figure 4 shows the percentage of cell viability assessed after 24h. The untreated group (cell control without eluate resin) was considered equal to 100%. There was no statistical difference between evaluated groups, and all groups showed similar cell viability to positive control (untreated group), none of the compounds were considered to be cytotoxic to the assessed cell type.

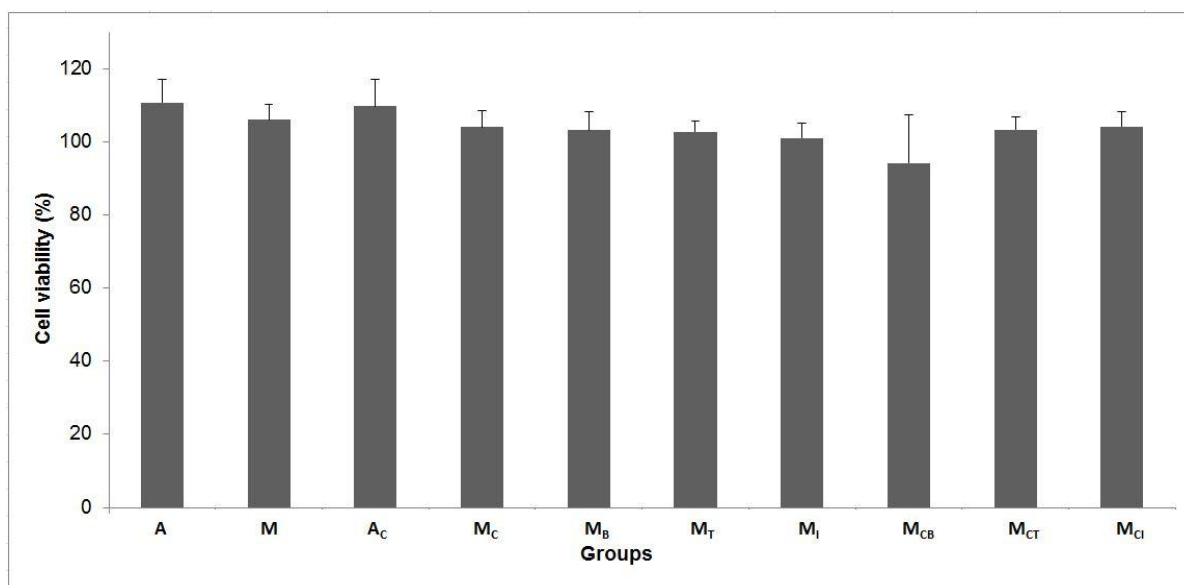
The size distribution and diameters of the microspheres can be observed in figure 5. Hydrogels had spherical or spheroidal morphology, with variations in the particle size distribution.



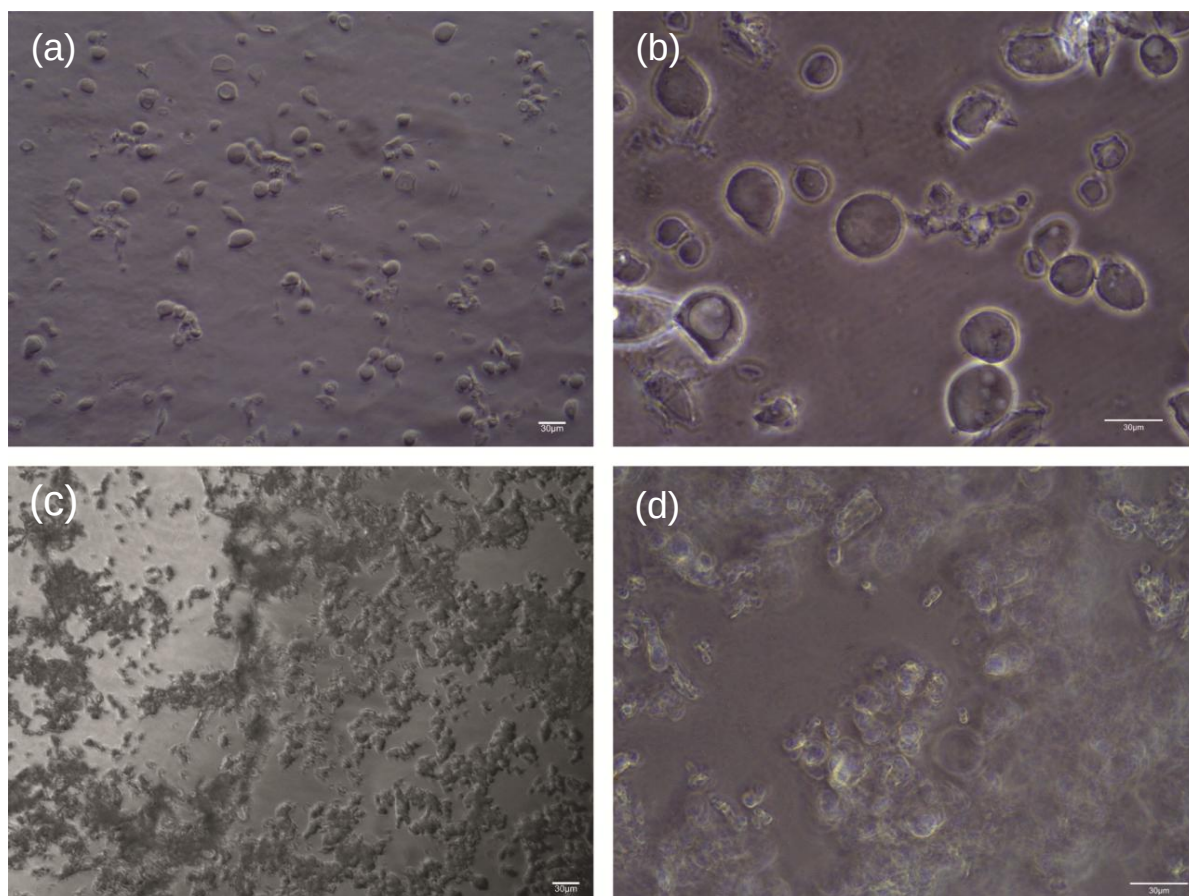
**Figure 2.** FTIR spectra of unmodified and modified sodium alginate.



**Figure 3.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of alginate-methacrylate.



**Figure 4.** Cell viability and standard deviation (%) of experimental materials untreated group (cell control without eluate). There was no statistically significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).



**Figure 5.** Inverted optical microscope images of alginate-methacrylate microspheres at 100 and 400x magnification. (a) and (b) microspheres of alginate-methacrylate; (c) and (d) microspheres of alginate-methacrylate with chitosan.

#### 4 Discussion

It was possible to synthesize and to obtain microspheres of alginate hydrogel functionalized with methacrylate radicals. Alginate is a natural, acidic polysaccharide extracted from algae and is composed of units of  $\beta$ -D-mannuronic acid and  $\alpha$ -L-guluronic acid and as a result of their characteristics as biocompatibility, hydrophilicity and low cost have been used extensively as drug and growth factor carriers [7-9]. Microspheres of alginate have been used to deliver a variety of bioactive molecules, with the advantages that include the protection of therapeutic molecules from degradation and reaction in the body, small particle volume allowing for easy administration through injection, and control of solute diffusion by the manipulation of the physical properties of the material. However, these hydrogels typically share a similar problem with many other hydrogel systems regarding delivery of small bioactive factors [14, 15]: the immobilization and controlled release of growth factors from the hydrogels in scaffolds can be achieved due to rapid diffusion out of the



water-swollen network [19–21] and is thus not sustained over a long period of time. Although alginate can be a suitable biomaterials for delivery system of proteins the time-space release of growth factors should be controlled at levels for cellular signalization. Otherwise burst release can happen and a growth factor like VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) delivered at high concentration can lead to leakage of blood from vessels by enhance permeability and consequently hemorrhagic effect. Due to tissue engineering requires tailored materials according to therapy strategy several alternatives have been investigated to control the pharmacokinetics of growth factor delivery (e.g. dual layer coating of microspheres ) [13], multilayer film coating [16] inclusion of chitosan [17], additional crosslinked treatments.

As a strategy for control the slow release of growth factors immobilized in alginate microspheres is the use of alginate methacrylated hydrogel since, the degree of methacrylation of the alginate can control the degradation rates and selective mechanical properties [18]. Basically an increase in crosslinking density may give rise to a decrease in the degree of swelling and an increase in the stiffness of the hydrogel [19] and consequently different kinetics release for target growth factor or drug immobilized.

FTIR spectrum of sodium alginate show distinctive bands around 1595 and 1402  $\text{cm}^{-1}$ , which corresponds to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of carboxylate salt groups of alginate. These characteristics bands still appear into the FTIR spectrum of the alginate methacrylate because reaction substitution was performed on the hydroxyl group. Previous studies have reported the substitution of secondary alcohols in alginate to methacrylate radicals via anhydride chemistry [10, 11], and this method proved to an effective route to obtain alginate methacrylated. In addition, the broad band at 3282  $\text{cm}^{-1}$ , which corresponds to O-H stretching vibration is still present because hydroxyl substitution by methacrylate groups do not reach 100% yield, in accordance with other studies that have demonstrate low degree of methacrylation, around 7%, 6% [11], and 20% [20]. Although it may be a limitation for photocrosslinking, can be a desirable aspect, to facilitate the degradation of microspheres to release of the bioactives molecules, and can explain the good result for cell viability obtained for alginate-methacrylate group (M).

The most common gelation of alginate microspheres occurs through ionic crosslinking, when divalent cations, such as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ , or  $\text{Ba}^{2+}$  interact with  $\alpha$ -L-

guluronic acid forming ionic bridges between adjacent alginate chains [21, 22]. Ionic crosslinking offers control of material properties through the concentration of calcium and alginate as well as the alginate molecular weight. Furthermore, the crosslinking method used to obtain the hydrogels is important as it should not damage or denature any encapsulated bioactive factors or be toxic to incorporated or surrounding host cells [14]. A wide variety of crosslinking approaches have been explored [23].

Photocrosslinking has emerged as a popular method for crosslinking hydrogels. Recently, various polymers have been modified with photopolymerizable functional groups to create covalently crosslinked hydrogels [32-34]. The advantages of this method of photoreticulation are the induction of liquid-solid phase transformations of the polymer under physiological conditions, the reaction independent of the calcium levels, the possibility of *in situ* polymerization [35,36], greater reaction control and direct application in hard to reach places. In addition, this technology can be used to maintain the structural and mechanical integrity of three-dimensional alginate hydrogels [37, 38].

In order for a monomer to be photopolymerizable it must have functional groups which can be induced to react to a light source, allowing its cross-linking or photopolymerization only [24]. Recent works have replaced the secondary alginate alcohols with methacrylate radicals [11] which, in the presence of compatible photoinitiators, form free radicals when exposed to the light source. These free radicals then interact with highly reactive acrylate functional groups along the polymer chain, leading to the formation of covalent crosslinks [10, 11]. This reaction can occur rapidly, often within seconds, and depends on the relative prepolymer and photoinitiator concentrations as well as the intensity and duration of light exposure [18, 25].

Previous studies tested *in situ* photocrosslinkable polymers and may provide an alternative method for hydrogel formation [26-28]. This method utilizes ultraviolet (UV) light to initiate a free radical polymerization reaction that forms covalent crosslinks between functional methacrylate groups along the backbone of the polymer chains [10, 11]. Photocrosslinking allows creation of alginate hydrogels independent of calcium levels and is also a convenient means for controlling gelation timing and kinetics; such techniques have been implemented in many materials. Furthermore, the advantages of this photocrosslinking method are the use of a light

source that induces fluid–solid phase transformations of the polymer under physiologic conditions using a biocompatible photoinitiator. The limitation of photocrosslinking techniques is that the process exposes the cells to UV light, chemical photoinitiators that may be cytotoxic in precursor or radical form, and organic solvents that may be required to dissolve the photoinitiators in the polymer precursor solution; photogenerated molecules can also perturb the construct by generation of temperature changes or gas bubbles. Furthermore, photoinitiators sensitive to UV light need long time of photoactivation when compared with photoinitiators sensitive to blue light source, as used in dental materials [23].

Photoinitiators cytotoxicity has the potential to greatly impact the applicability of photocrosslinked hydrogel for scaffolds or drug delivery systems. Irgacure has been used extensively for UV photocrosslinking of tissue-engineered scaffolds owing to its efficient photodissociated radical and low cytotoxicity in native form, ~90% of cellular viability is expected [29, 30]. Due to this, the Irgacure was chosen as control, and the cytotoxicity was similar to other studies, showing cell viability higher than 90%. The photoinitiators tested in this study (BAPO and TPO) are type I, that generate radicals by fragmentation of the photoinitiator molecule and not requiring the addition of a coinitiator, that frequently show higher cytotoxicity. Previous studies showed that the addition of coinitiators had no effect on the final conversion of monomers, and good results have been obtained when compared with conventional photoinitiator system used in dentistry (CQ+EDAB) [31, 32]. Furthermore, this system have been identified in eluates of methacrylate-based materials showing cytotoxic effects such as increase in the amount of intracellular formation of reactive oxygen species (ROS) [33], increase in the intracellular glutathione (GSH) content [34], and breaks in the integrity of DNA in cultured cells [35]. These results were decisive to choosing the photoinitiators to preliminary tests and BAPO, TPO and alginate-methacrylate group showed similar results for cell viability to untreated group and control (Irgacure), >90% for all groups tested. Since it was not used a photoactivation protocol in present design our findings suggest that the formulation of calcium cross linked methacrilated alginate with the concentration of initiation system used was not cytotoxic for cell tested.

Chitosan, a natural cationic polymer, have innumerable biological properties described, but antioxidant capacity, antimicrobial, inhibition of biofilm formation, anti-inflammatory and healing [36-38] are perhaps the most relevant for dentistry.

Chitosan has a hydrophilic surface promoting cell adhesion, proliferation, and differentiation, and evokes a minimal foreign body reaction on implantation [39, 40]. The results for cell viability demonstrate the low cytotoxicity of chitosan when used to coating microspheres of alginate. Due to its characteristics, it has attracted more researchers to evaluate its properties for use in tissue engineering and drug delivery systems. Coating alginate microspheres with polycationic polymers as chitosan, which increases retention at the site of application, has been commonly used to control the disintegration of alginate microspheres and extend the drug release.

The alginate/chitosan microspheres can be produced by different methods [41, 42], and in this study were prepared by complex coacervation using sodium alginate as a gel core. A one-step method where a complex coacervate membrane is formed at the interface between the alginate and chitosan solutions when the alginate solution is dropped directly into a solution of calcium chloride mixed with chitosan. The use of dental materials containing chitosan can reduce the number of microorganisms present, delay the formation of biofilms, accelerate the healing process and potentiate the antimicrobial activity of other materials. However, further studies for a more complete understanding of the interaction of chitosan with other components present in dental materials are needed to better evaluate its action in this area. In addition the mean size of 20 micrometers can be considered small and suitable for mixtures with stem cells, growth factors and other materials in injectable scaffolds.

Although the microspheres are widely used, the main disadvantages using the procedure to obtain them include complicated industrial scale-up [43], inhomogeneous physical hydrogels [44] and difficulties in obtaining lower size microparticles, which are preferred for stabilizing the fragile structure of the drug and controlling delivery kinetics. The spheres with appropriate size are required to immobilization capacity and the stability of the biomolecules. The spray-coagulation method showed to be suitable to obtain microspheres with mean size of 20  $\mu\text{m}$  of alginate crosslinked by calcium ions is an alternative for these limitations. Further studies about kinetics release, bioactivity, surface layer cell-interactions and light activation protocols are required for characterization and development of new delivery system for dental applications.

## Conclusion

This study showed an effective way to obtain small size and regular microspheres of methacrylated alginate with potential to be used as delivery system in injectable scaffolds for dentistry application.

## 6 References

1. Murray, P.E., et al., *Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. **13**(6): p. 509-20.
2. Schmalz, G. and A.J. Smith, *Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies*. J Endod, 2014. **40**(4 Suppl): p. S2-5.
3. Tziafas, D., *The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration*. Caries Res, 2004. **38**(3): p. 314-20.
4. Tziafas, D., A.J. Smith, and H. Lesot, *Designing new treatment strategies in vital pulp therapy*. J Dent, 2000. **28**(2): p. 77-92.
5. Chen, W., Y. Tabata, and Y.W. Tong, *Fabricating tissue engineering scaffolds for simultaneous cell growth and drug delivery*. Curr Pharm Des. **16**(21): p. 2388-94.
6. Strom, T.A., et al., *Endodontic release system for apexification with calcium hydroxide microspheres*. J Dent Res. **91**(11): p. 1055-9.
7. Tonnesen, H.H. and J. Karlsen, *Alginate in drug delivery systems*. Drug Dev Ind Pharm, 2002. **28**(6): p. 621-30.
8. Dobie, K., et al., *Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro*. Connect Tissue Res, 2002. **43**(2-3): p. 387-90.
9. Zimmermann, H., et al., *Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation*. J Mater Sci Mater Med, 2005. **16**(6): p. 491-501.
10. Burdick, J.A., et al., *Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks*. Biomacromolecules, 2005. **6**(1): p. 386-91.
11. Smeds, K.A. and M.W. Grinstaff, *Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation (vol 54, pg 115, 2000)*. Journal of Biomedical Materials Research, 2001. **55**(2): p. 254-255.
12. Rouillard, A.D., et al., *Methods for photocrosslinking alginate hydrogel scaffolds with high cell viability*. Tissue Eng Part C Methods, 2011. **17**(2): p. 173-9.
13. Khanna, O., et al., *Generation of alginate microspheres for biomedical applications*. J Vis Exp, (66).

14. Jeon, O., et al., *Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin*. J Control Release, 2005. **105**(3): p. 249-59.
15. Sakiyama-Elbert, S.E. and J.A. Hubbell, *Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix*. J Control Release, 2000. **69**(1): p. 149-58.
16. Guillot, R., et al., *Assessment of a polyelectrolyte multilayer film coating loaded with BMP-2 on titanium and PEEK implants in the rabbit femoral condyle*. Acta Biomater. **36**: p. 310-22.
17. Baysal, K., et al., *Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: preparation, characterization and application for cell growth purposes*. Int J Biol Macromol. **59**: p. 342-8.
18. Jeon, O., et al., *Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties*. Biomaterials, 2009. **30**(14): p. 2724-34.
19. Anseth, K.S., et al., *The influence of comonomer composition on dimethacrylate resin properties for dental composites*. J Dent Res, 1996. **75**(8): p. 1607-12.
20. Matricardi, P., et al., *In situ cross-linkable novel alginate-dextran methacrylate IPN hydrogels for biomedical applications: mechanical characterization and drug delivery properties*. Biomacromolecules, 2008. **9**(7): p. 2014-20.
21. Boontheekul, T., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution*. Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2455-65.
22. Drury, J.L., R.G. Dennis, and D.J. Mooney, *The tensile properties of alginate hydrogels*. Biomaterials, 2004. **25**(16): p. 3187-99.
23. Hennink, W.E. and C.F. van Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(1): p. 13-36.
24. Corrales, T., et al., *Free radical macrophotoinitiators: an overview on recent advances*. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2003. **159**(2): p. 103-114.
25. Jeon, O., et al., *Biodegradable, photocrosslinked alginate hydrogels with independently tailorable physical properties and cell adhesivity*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(9): p. 2915-25.
26. Anseth, K.S., et al., *In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery*. J Control Release, 2002. **78**(1-3): p. 199-209.
27. Leach, J.B., et al., *Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds*. Biotechnology and Bioengineering, 2003. **82**(5): p. 578-589.
28. Li, Q., et al., *Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin sulfate*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2004. **68A**(1): p. 28-33.
29. Bryant, S.J., C.R. Nuttelman, and K.S. Anseth, *Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro*. J Biomater Sci Polym Ed, 2000. **11**(5): p. 439-57.
30. Williams, C.G., et al., *Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation*. Biomaterials, 2005. **26**(11): p. 1211-8.

31. Albuquerque, P.P., et al., *Color stability, conversion, water sorption and solubility of dental composites formulated with different photoinitiator systems*. J Dent. **41 Suppl 3**: p. e67-72.
32. Meereis, C.T., et al., *BAPO as an alternative photoinitiator for the radical polymerization of dental resins*. Dent Mater. **30**(9): p. 945-53.
33. Atsumi, T., et al., *The production of reactive oxygen species by irradiated camphorquinone-related photosensitizers and their effect on cytotoxicity*. Arch Oral Biol, 2001. **46**(5): p. 391-401.
34. Engelmann, J., et al., *ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **75**(2): p. 272-6.
35. Volk, J., et al., *Non-irradiated campherquinone induces DNA damage in human gingival fibroblasts*. Dent Mater, 2009. **25**(12): p. 1556-63.
36. Azuma, K., et al., *Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides*. J Funct Biomater. **6**(1): p. 33-49.
37. Friedman, A.J., et al., *Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens*. J Invest Dermatol. **133**(5): p. 1231-9.
38. Tan, H., et al., *The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus*. Biomaterials. **33**(2): p. 365-77.
39. Hutmacher, D.W., J.C. Goh, and S.H. Teoh, *An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications*. Ann Acad Med Singapore, 2001. **30**(2): p. 183-91.
40. Suh, J.K. and H.W. Matthew, *Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2589-98.
41. Daly, M.M., Knorr, D., *Chitosan-alginate complex coacervate capsules: Effect of calcium chloride, plasticizers, and polyelectrolytes on mechanical stability*. Biotechnol. Prog., 1988. **4**: p. 76-81.
42. Huguet, M.L., Dellacherie, E., *Calcium-alginate beads coated with chitosan: Effect of the structure of encapsulated materials on their release*. Process Biochem., 1996. **31**: p. 745–751.
43. Poncelet, D., Poncelet de Smet, B., Beaulieu, C., Neufeld, R.J., *Scale-up of gel microcapsule and microcapsule production in cell immobilization*. Goosen, M.F. (Ed.), Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization., 1992.
44. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **944**: p. 62-73.

### **3 Capítulo 2**

## **COMPOSIÇÕES PARA SISTEMAS DE ENTREGA FOTOPOLIMERIZÁVEIS CONTENDO HIDROGEL COM METACRILATO**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A invenção refere-se a composições para sistemas de entrega fotopolimerizáveis. Em particular, a presente invenção refere-se a composições biomédicas, mais particularmente odontológicas, que contenham hidrogel de alginato funcionalizado com radicais metacrilato para sistemas de entrega fotopolimerizáveis com luz visível, sendo passível de ser utilizado em sistemas adesivos, cimentos e compósitos. As composições apresentam variadas aplicações em Odontologia; em endodontia, cirurgia, prótese dentária, dentística, ortodontia, odontopediatria, periodontia, implantodontia. O biomaterial pode servir de sistema de entrega de moléculas bioativas, fármacos, fitoterápicos e hormônios.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

Terapias biológicas têm sido desenvolvidas com foco no reparo ou regeneração de tecidos e órgãos afetados por doenças ou injúrias (MURRAY, 2002; TZIAFAS, 2000, 2004; SCHMALZ, 2014). Entre eles, recentes avanços na pesquisa biomédica direcionam para a concepção de novos métodos de tratamento odontológico, como os focados na regeneração dos tecidos dentais e maxilo-faciais. Com isso, novas abordagens têm sido desenvolvidas baseadas na compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que regulam processos como a dentinogênese, osteogênese, angiogênese, entre outros. O potencial para exploração clínica dessas novas abordagens é majoritariamente baseado em materiais com sistemas de entrega para liberação de moléculas bioativas ou



fármacos (HUBBELL et al., 1996; LOHRMANN, 2000; PANTELIDIS et al.; 2006; MASTERS, 2014; LICHTER et al., 2016). A patente US 5455041 (1993), por exemplo, reivindica um método para induzir a regeneração de tecido periodontal ósseo e do cimento com a aplicação de um fator de crescimento diretamente sobre a superfície óssea tratada. Já a patente americana US 7309232 (2003) descreve um método para regeneração de tecido dentário utilizando *scaffolds* contendo moléculas bioativas como TGF- $\beta$ , BMP, entre outros. Enquanto a patente CN 103767881A apresenta um material com microesferas contendo proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) e seu método para aplicação e liberação contínua sobre a polpa. Contudo, diferente do disponível no estado da técnica, o desenvolvimento de um novo sistema de entrega fotopolimerizável contendo hidrogel com metacrilato poderia melhor controlar a liberação tempo-espacial de moléculas (como fatores de crescimento, fitoterápicos, fármacos, hormônios) de maneira a induzir a melhor resposta biológica de interesse.

Entre as maneiras de controlar a cinética de liberação de moléculas estão descritos uso de matrizes de colágeno (KIKUCHI et al., 2007, KOIKE et al., 2014, LI; SAE-LIM, 2007, RUTHERFORD, 2001, SIX; LASFARGUES; GOLDBERG, 2002), de gelatina (GOLDBERG et al., 2001, ISHIMATSU et al., 2009, SIX et al., 2002), de agarose (CHAUSSAIN et al., 2009), de alginato de sódio (OLIVA-RODRIGUEZ et al., 2011), entre outros. A otimização da quantidade de proteínas ideal, e da velocidade adequada de sua liberação, pode ser combinada com sistemas de entrega específicos (ISHIMATSU, et al., 2009, KIKUCHI, et al., 2007). Nesse contexto, algumas patentes descrevem o uso de materiais contendo proteínas bioativas em microesferas, hidrogéis, sistemas de entrega e *scaffolds*, como os documentos US 0148486 (2005), US 0148538 (2010), US 8454980 (2011), CN 103767881 (2014). Dentre os possíveis materiais a compor um sistema de entrega, o alginato é um copolímero derivado de um polissacarídeo natural biocompatível (AUGST, 2006) que devido as suas características como biocompatibilidade, hidrofília e baixo custo (LEE, 2012), tem sido utilizado em uma variedade de aplicações na medicina (NOVIKOVA, 2006), farmacologia (TONNESEN, 2002), ciências biológicas (SONE, 2002) e na odontologia (DOBIE, 2002), além de ser amplamente utilizado na engenharia tecidual (NICODEMUS, 2008; PARK, 2009; SANTANA, 2013). Também foi utilizado extensivamente como transportador de drogas e fator de crescimento devido as suas características (DOBIE, 2002; TONNESEN 2002; ZIMMERMANN,

2005). Por causa disso, pode ser uma alternativa para o tratamento de lesões cavitárias profundas, pois a incorporação de moléculas biologicamente ativas em materiais odontológicos, com o hidrogel de alginato como sistema de entrega, pode possibilitar tratamentos mais biológicos com a indução de eventos que envolvem o reparo ou a regeneração de tecidos de interesse, como a formação de dentina terciária, a esclerose dentinária (mineralização intratubular), o controle do processo inflamatório e a formação de tecido mineralizado. Além de poder ser utilizado na formulação de adesivos, cimentos, compósitos, hemostáticos, enxertos ósseos, entre outros.

Entre as patentes que descrevem o uso de hidrogéis, a patente US5986043 (1996) reivindica um material fotopolimerizável e biodegradável para liberação de fármacos e adesão tecidual, e a patente US 8097269 refere-se a um material bioativo com composição sol-gel para entrega de fármacos e melhora da adesão de superfícies orgânicas e inorgânicas. No entanto, a utilização do hidrogel de alginato é limitada devido ao seu modo de obtenção por agentes químicos de reticulação. Normalmente, um estado de hidrogel em alginato é gerado através de ligações cruzadas iônicas entre os radicais do ácido carboxílico e os cátions bivalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  (SMIDSROD, 1990). Estes hidrogéis ionicamente reticulados perdem sua integridade estrutural ao longo do tempo, pois os íons bivalentes são dissolvidos no meio aquoso durante o seu preparo (BAER, 2001). Recentemente, vários polímeros têm sido modificados com grupos funcionais fotopolimerizáveis para criar hidrogéis reticulados covalentemente (BRYANT, 2004; LEACH, 2003; LEE, 2004). As vantagens deste método de fotorreticulação são a indução de transformações de fase líquido-sólidos do polímero sob condições fisiológicas. A reação independe dos níveis de cálcio, e a possibilidade de polimerização *in situ* (ANSETH, 2002; VAN TOMME, 2008) permite um maior controle da reação e aplicação direta em locais de difícil acesso. Além disso, esta tecnologia pode ser utilizada para manter a integridade estrutural e mecânica de hidrogéis de alginato tridimensionais (JEON, 2009 e 2010). Para que um monômero possa ser fotopolimerizável, ele tem que apresentar na sua estrutura grupos funcionais que possam ser induzidos a reagir perante uma fonte de luz, permitindo a sua reticulação ou apenas fotopolimerização (CORRALES, 2003). Trabalhos recentes substituíram os alcoóis secundários do alginato por radicais metacrilatos (SMEDS, 2001) que, na presença de fotoiniciadores compatíveis, formam radicais livres quando expostos à fonte de luz.

Estes radicais livres, em seguida, interagem com os grupos altamente reativos de acrilato funcionais ao longo da cadeia polimérica, conduzindo à formação de reticulações covalentes (SMEDS, 2001; BURDICK, 2005). Esta reação pode ocorrer rapidamente, muitas vezes dentro de segundos, e depende das concentrações relativas de pré-polímero e do fotoiniciador bem como a intensidade e duração da exposição à luz (JEON, 2009 e 2010).

Trabalhos anteriores demonstraram a utilização de fonte de luz ultravioleta (UV) como um método alternativo para obtenção de polímeros com ligações cruzadas (ELISSEFF, 1999; SMEDS, 2001; BURDICK, 2005). No entanto, deve-se controlar o tempo de exposição e a extensão da área atingida para assegurar que a viabilidade celular não seja afetada pelo excesso de produção de radicais livres ou de danos ao DNA causados pela luz UV (DINANT, 2103; CORTAT, 2013; MIRONI-HARPAZ, 2012). A fonte de luz azul, utilizada clinicamente na odontologia, seria uma alternativa para melhorar a viabilidade deste processo, tornando-o mais seguro. Dessa forma, poderia ser utilizado no desenvolvimento de biomateriais com potencial de regeneração e reparo tecidual com a incorporação de moléculas bioativas, fármacos, hormônios e fitoterápicos.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A invenção compreende a inédita utilização de hidrogel de alginato funcionalizado com radicais metacrilato como sistemas de entrega passível de fotopolimerização com luz visível para aplicação odontológica e biomédica. Ela tem o objetivo de prover hidrogel de alginato em forma de película ou de esferas com capacidade de carreamento e liberação de moléculas bioativas, fármacos, fitoterápicos e/ou hormônios para aplicações biomédicas, e mais particularmente odontológicas. A incorporação dessas moléculas em materiais dentários pode possibilitar a indução de eventos que envolvem o reparo e regeneração tecidual, a diferenciação de células pulpares, a mineralização intratubular, a neoformação óssea, o controle de patologias periapicais, angiogênese, entre outros. Mais particularmente, as composições da presente invenção são indicadas para capeamento pulpar direto ou indireto, pulpotomia, apicificação, reabsorção radicular, reparo de perfurações, reparo de lesões de furca, retro-obturação, hipersensibilidade

dentinária, reparo de defeitos ósseos críticos e não críticos, obturação do canal radicular, periimplantite, perda óssea periodontal, entre outros.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a composições biomédicas, e mais especificamente odontológicas, que compreendem hidrogel de alginato funcionalizado com radicais metacrilato passível de fotopolimerização com luz visível, a fim de promover efeitos terapêuticos para cimentos, adesivos, resinas, selantes, materiais restauradores, enxertos ósseos, entre outros, através da liberação controlada de moléculas.

O hidrogel de alginato funcionalizado com metacrilato pode ser utilizado como sistema de entrega na forma de gel, membrana, película e esfera, sem se restringir a essas formas. O biomaterial pode ser ainda autoativado, fotoativado, quimicamente ativado ou de presa dual. Como alternativa, é possível a apresentação do produto na forma de pó e líquido, sendo possível também a apresentação em gel já contendo o alginato funcionalizado com metacrilato e com moléculas incorporadas. As moléculas podem vir encapsuladas nas microesferas para que após o rompimento da estrutura possa ocorrer a liberação dos princípios ativos. Além disso, os princípios ativos podem estar dispersos na matriz do alginato. A apresentação como “pó e gel” ou “líquido e gel” pode ser utilizada, para que os fotoiniciadores sob a forma de pó ou em solução sejam incorporadas no gel contendo o material no momento da aplicação. Como outra alternativa, o material pode ter apresentação na forma de solução aquosa, como para medicações intracanaais, em que os as esferas de alginato podem já vir incorporadas na solução, ou serem misturadas no momento do uso.

Outros agentes podem ser incorporados na presente invenção dependendo da aplicação do material. Esses aditivos incluem agentes antimicrobianos, antiinflamatórios, radiopacificadores, extratos naturais, anestésicos, entre outros. Na Tabela 1 estão descritos exemplos de possíveis aditivos para sistemas de entrega de materiais odontológicos.

**Tabela 1.** Exemplos de possíveis aditivos na composição

| <b>Aditivo</b>            | <b>Exemplo</b>                                      |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Radiopacificadores</b> | Óxido de bismuto, óxido de tantálio, tungstanato de |

|                                                                |              |                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                |              | cálcio, zircônia, fluoreto de itérbio, partículas de carga de vidro contendo bário, estrôncio, zinco.                                                                                                                               |
| <b>Antimicrobianos</b>                                         |              | Amônios quaternários, derivados de pirazóis, metacrilatos funcionalizados, clorexidina, monômeros antibacterianos (como MDPB), Cloreto de benzalcônio, Cloreto de Cetilpiridínio, Partículas de Prata, Triclosan.                   |
| <b>Extratos naturais (antimicrobianos, anti-inflamatórios)</b> | <b>anti-</b> | Óleos essenciais de copaíba, de butiá, de vitis, de cardol, de cardenol, de orégano, de aroeira, de alho, de própolis;                                                                                                              |
| <b>Proteínas</b>                                               |              | TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3; FGF-2; BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7; DSP; DPP; DMP-1; MEPE; IGF-1; PDGF; VEGF; EGF; HGF; GDNF; BDNF; PGF; ADM; Proteínas extraídas dos tecidos (como de dentes e ossos) |
| <b>Outros</b>                                                  |              | Antiinflamatórios, corticosteroides, agentes hemostáticos, analgésicos, anestésicos                                                                                                                                                 |

## EXEMPLOS

Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos, na sequência são apresentados os métodos de obtenção e os resultados. Ainda são apresentados exemplos de concretizações dos materiais, não sendo objetivo do presente relatório limitar a invenção apenas a estas concretizações.

### Síntese do hidrogel de alginato funcionalizado

Alginato metacrilado foi sintetizado através da esterificação de grupos hidroxila, com base nos protocolos anteriormente descritos (BURDICK et al., 2005; SMEDS; GRINSTAFF, 2001). Resumidamente, uma solução a 1% de alginato de baixa viscosidade (Vetec, Sigma, Brasil) foi preparada com água deionizada e anidrido metacrílico (Alfa Aesar, Hard Hill, MA) com 20% em excesso, foi adicionado lentamente à solução a 4°C e o pH foi ajustado a 7 usando NaOH 5N. A reação ocorreu por 24 h, o excesso de anidrido metacrílico foi removido e o produto final recuperado por rotavapor e liofilização.

FTIR and  $H^1$  RMN confirmaram a obtenção do alginato metacrilato (Figura 1 e 2). A Figura 1 apresenta o espectro de FTIR do alginato sem e com a modificação pelo metacrilato e indica a presença da carbonila em  $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$  e a diminuição do

pico da hidroxila em  $\sim 3282\text{ cm}^{-1}$ . O espectro do alginato de sódio apresenta bandas distintas nas regiões de  $1595$  and  $1402\text{ cm}^{-1}$ , que correspondem ao estiramento simétrico e assimétrico do carboxilato de alginato. Além disso, na Figura 2 os picos em  $1.9\text{ ppm}$ ,  $5.25$  e  $5.7\text{ ppm}$  indicam o sucesso da síntese. O pico em  $4.8\text{ ppm}$  indica a água deuterada, utilizada como solvente e padrão interno.

### **Obtenção das microesferas**

Uma solução de alginato (1,5%) foi preparada através da mistura com água deionizada sob agitação magnética até a obtenção de uma solução homogênea e viscosa. Essa solução foi dispensada diretamente na solução de reticulação (100 mM  $\text{CaCl}_2$  em água deionizada-pH 7,4) sob agitação para obtenção das microesferas. As microesferas foram dispensadas sobre peneira com abertura de  $250\text{ }\mu\text{m}$  e coletadas por centrifugação a 1200 rpm por 3 min (Quimis Q222TM108, Brazil).

Os fotoiniciadores foram adicionados na solução de alginato a 5% antes da obtenção das microesferas. Os fotoiniciadores testados foram: BAPO - phenylbis (2,4,6-trimethylbenzoyl)-phosphine oxide; TPO-diphenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphine oxide; and Irgacure - 2-Hydroxy-4-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone, todos da Sigma Aldrich. Para avaliar as diferentes características, dez grupos foram formulados como descrito na Figura 3.

### **Avaliação da viabilidade celular**

O ensaio de viabilidade celular foi realizado conforme adaptação da ISO 10993 (2009). Após 24 de contato das células de fibroblastos de ratos L929 com o eludato dos materiais, foi feita a avaliação da viabilidade celular com WST-1 (Roche, EUA). Todos os grupos avaliados apresentaram viabilidade celular semelhantes estatisticamente e superior a 90% (Figura 4), sendo que nenhum dos compostos foi considerado citotóxico para o tipo celular avaliado.

### **Determinação do tamanho das microesferas**

O diâmetro médio das microesferas foi mensurado através de microscópio óptico (INV-100 Bel Photonics, Brasil), sob magnificação de  $100\times$  e  $400\times$ . O diâmetro médio de  $\sim 20\text{ }\mu\text{m}$  das esferas pode ser visualizado na Figura 5.

### **EXEMPLO 1: Adesivo odontológico contendo microesferas de hidrogel de alginato metacrilato**

Como exemplo da aplicação do hidrogel de alginato funcionalizado em materiais odontológicos, a Tabela 2 exemplifica a formulação de um adesivo odontológico contendo microesferas de alginato funcionalizado com radicais metacrilato na composição, não se restringindo a ela. O adesivo é composto principalmente de monômeros hidrófobos, como o Bis-GMA e o TEGDMA, hidrófilos como HEMA, monômeros ácidos como GDMA-P, fotoiniciadores e solventes.

**Tabela 2.** Exemplo de adesivo odontológico contendo microesferas de hidrogel de alginato metacrilato na composição

| <b>Componente</b>                       | <b>Faixa ampla</b> | <b>Faixa preferencial</b> |
|-----------------------------------------|--------------------|---------------------------|
| <b>Bis-GMA</b>                          | 5-90% wt           | 40-60% wt                 |
| <b>TEGDMA</b>                           | 5-90% wt           | 40-60% wt                 |
| <b>HEMA</b>                             | 10-50% wt          | 20-30% wt                 |
| <b>GDMA-P</b>                           | 5-80% wt           | 10-30%wt                  |
| <b>Microesferas de Alginato</b>         | 1-90% wt           | 10-50% wt                 |
| <b>Fotoiniciadores (BAPO, TPO)</b>      | 0,5%-20% wt        | 3-10% wt                  |
| <b>Solvente (etanol, água, acetona)</b> | 5-90% wt           | 5-20% wt                  |

Além da aplicação do adesivo na forma convencional, a possibilidade de utilização se estende para uso direto sobre exposição pulpar, como camada de proteção e regeneração tecidual. Seja na forma injetável formando uma película/camada de hidrogel de alginato funcionalizado ou na forma de esferas de alginato metacrilato dispersas na matriz resinosa de adesivos autocondicionantes para liberação de moléculas bioativas como citocinas e fatores de crescimento, ou mesmo fármacos, como agentes anti-inflamatórios e antibacterianos.

### **EXEMPLO 2: Cimento endodôntico contendo microesferas de hidrogel de alginato metacrilato**

O hidrogel de alginato funcionalizado também pode ser utilizado em um cimento endodôntico. O material contendo microesferas de hidrogel de alginato funcionalizado pode ser preparado preferencialmente por mistura de metacrilato, dimetacrilatos, o sistema de iniciação como amina/peróxido (ativação química) e

canforoquinona/amina ou BAPO ou TPO (fotopolimerização), radiopacificadores e as microesferas na matriz inorgânica. Como exemplo, o material pode ser composto pelas pastas base e catalisadora (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3.** Exemplo de cimento endodôntico contendo hidrogel de alginato metacrilato na composição da pasta base

| Componente                                  | Faixa ampla | Faixa preferencial |
|---------------------------------------------|-------------|--------------------|
| <b>Bis-EMA 30</b>                           | 1-99%       | 60-80%             |
| <b>TEGDMA</b>                               | 1-85%       | 5-30%              |
| <b>Peg 400</b>                              | 1-50%       | 10-30%             |
| <b>Canforoquinona</b>                       | 0,1-30%     | 0,1-5%             |
| <b>DHEPT</b>                                | 0,1-30%     | 0,1-3%             |
| <b>Sílica</b>                               | 0,1-50%     | 0,1-10%            |
| <b>Radiopacificador</b>                     | 0,1-60%     | 15-30%             |
| <b>Microesferas de alginato metacrilato</b> | 10-70%      | 20-50%             |

**Tabela 4.** Exemplo de cimento endodôntico contendo hidrogel de alginato metacrilato - pasta catalisadora

| Componente                  | Faixa ampla | Faixa preferencial |
|-----------------------------|-------------|--------------------|
| <b>Bis-EMA 30</b>           | 1-99%       | 50-80%             |
| <b>TEGDMA</b>               | 1-85%       | 5-30%              |
| <b>Exotano 8</b>            | 1-50%       | 5-40%              |
| <b>Sulfínico</b>            | 0,1-35%     | 0,1-5%             |
| <b>Peróxido de benzoila</b> | 0,1-40%     | 0,1-2%             |
| <b>BHT</b>                  | 0,1-45%     | 0,1-5%             |
| <b>Sílica</b>               | 0,1-55%     | 0,1-15%            |
| <b>Radiopacificador</b>     | 0-80%       | 5-40%              |

Os presentes exemplos servem de prova de conceito da potencial aplicação e efeito dos materiais contendo hidrogel de alginato funcionalizado com radicais metacrilato fotopolimerizáveis para uso na área da saúde, mas especificamente em Odontologia. Tratou-se no presente relatório descritivo de uma invenção dotada de novidade, atividade inventiva, aplicação industrial e suficiência descritiva, preenchendo todos os requisitos determinados pela lei da propriedade industrial para obter a concessão da patente da invenção pleiteada.

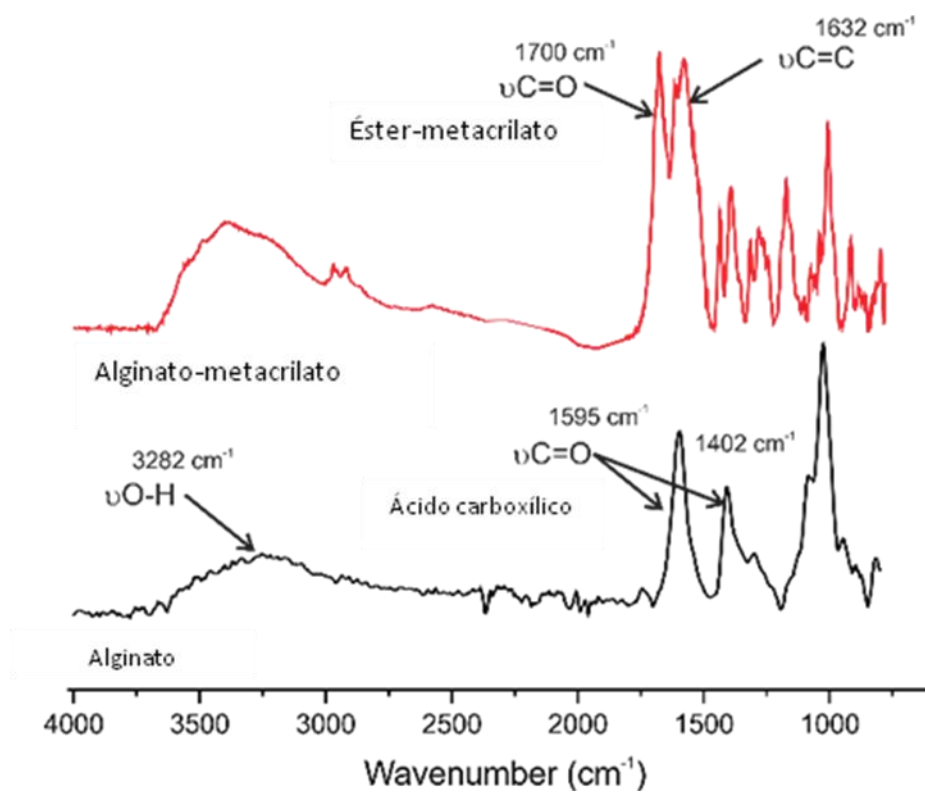


## REIVINDICAÇÕES

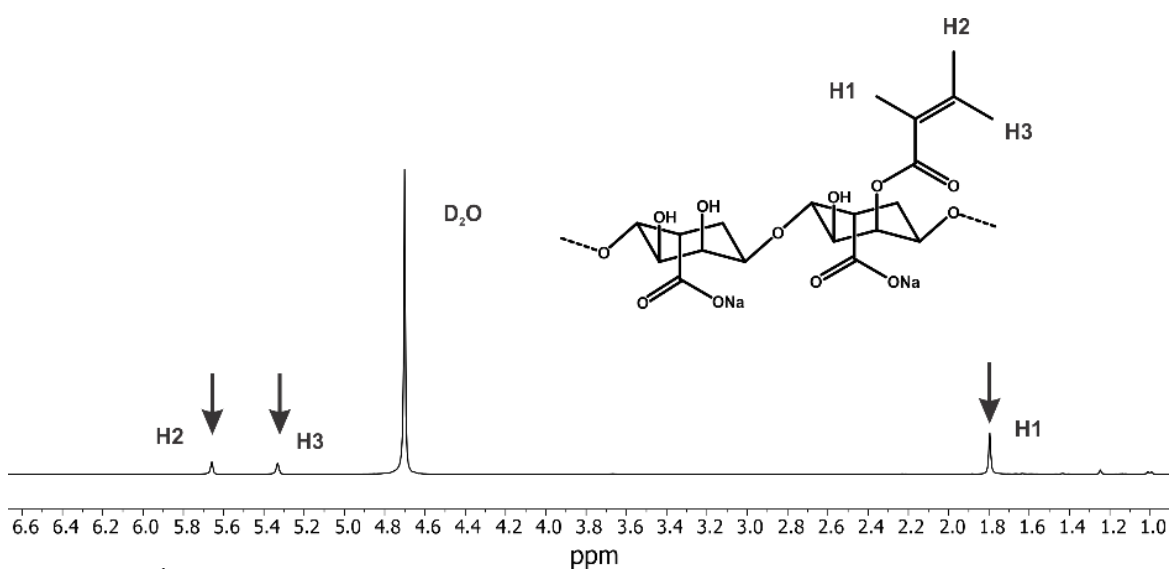
1. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** caracterizadas por possuir hidrogel de alginato funcionalizado com metacrilato na composição entre 0,1 e 99.9%.
2. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado em 1, **caracterizada pelo** fato de ser apresentada em dois componentes distintos, um compreendendo ao menos um biomaterial como adesivo, cimento, medicamento intracanal odontológico; e outro compreendendo hidrogel de alginato funcionalizado com metacrilatos que podem estar encapsulados em microesferas, nanotubos, vidros bioativos, entre outros.
3. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado em 1 e 2, **caracterizadas pelo** fato dos componentes serem apresentados na forma de: “pó e líquido”, “líquido e líquido”, “pastilha e líquido”, “pasta única”, “duas ou mais pastas”, “pó e pasta”, “líquido e pasta”, “gel/creme”, “pó e gel/creme”, “pasta e gel/creme”, “líquido e gel/creme”.
4. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado em 1 a 3, **caracterizadas pelo** fato de apresentar iniciadores como BAPO, TPO, canforoquinona, EDAB, benzodioxolas, peróxido de benzoíla, na composição de modo a tornar o material autoativado, fotoativado, quimicamente ativado ou de presa dual.
5. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado de 1 a 3, e ainda **caracterizado por** possuir radiopacificadores na composição como óxido de bismuto, óxido de tantálio, tungstanato de cálcio, zircônia, fluoreto de itérbio, partículas de carga de vidro contendo bário/estrôncio/zinco.
6. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado de 1 a 3 e ainda **caracterizado por** possuir fosfato de cálcio, fosfato tricálcio,  $\alpha$  fosfato tricálcio,  $\beta$  fosfato tricálcio, fosfato de cálcio bifásico, fosfato monocálcio, fosfato tetracálcio e/ou hidroxiapatita, osso bovino liofilizado, aluminato de cálcio, silicato de cálcio, agregado trióxido mineral, hidróxido de cálcio na composição.

7. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado de 1 a 3, e ainda **caracterizado por** possuir como princípios ativos na composição: agentes antiinflamatórios, agentes antimicrobianos, agentes antivirais, corticosteroides, agentes hemostáticos, agentes analgésicos, agentes anestésicos, agentes fitoterápicos, hormônios.
8. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado em 7, e ainda **caracterizado por** possuir como agentes antimicrobianos ou antivirais: amônios quaternários, derivados de pirazóis, metacrilatos funcionalizados (como metacrilato de prata, de zinco, de cobre, de estanho), clorexidina, MDPB (*12-methacryloyloxy dodecypyridinium bromide*).
9. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado em 7, e ainda **caracterizado por** possuir como agentes fitoterápicos extratos naturais como: óleos essenciais de copaíba, de butiá, de vitis, de cardol, de cardenol, de orégano, de aroeira, de alho, de própolis.
10. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado em 1 a 9, **caracterizada pelo** fato do material ser um sistema de entrega para materiais resinosos como adesivo odontológico, que contenha monômeros hidrófobos, monômeros hidrófilos, solvente e iniciadores além do hidrogel de alginato funcionalizado.
11. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado em 1 a 9, **caracterizada pelo** fato do material ser um sistema de entrega para um cimento endodôntico, que contenha monômeros, radiopacificadores, fotoiniciadores e hidrogel de alginato funcionalizado.
12. **COMPOSIÇÕES CONTENDO HIDROGEL DE ALGINATO METACRILATO FOTOPOLIMERIZÁVEL** como reivindicado em 1 a 9, **caracterizada pelo** fato de ser um cimento cirúrgico, um cimento ortodôntico, um cimento provisório, um material restaurador, um selante para fósulas e fissuras, um enxerto ósseo, um cimento periodontal, uma membrana para regeneração óssea ou periodontal, entre outros.

## FIGURAS



**Figura.1** Espectro de FTIR do alginato antes e depois da funcionalização com metacrilato.

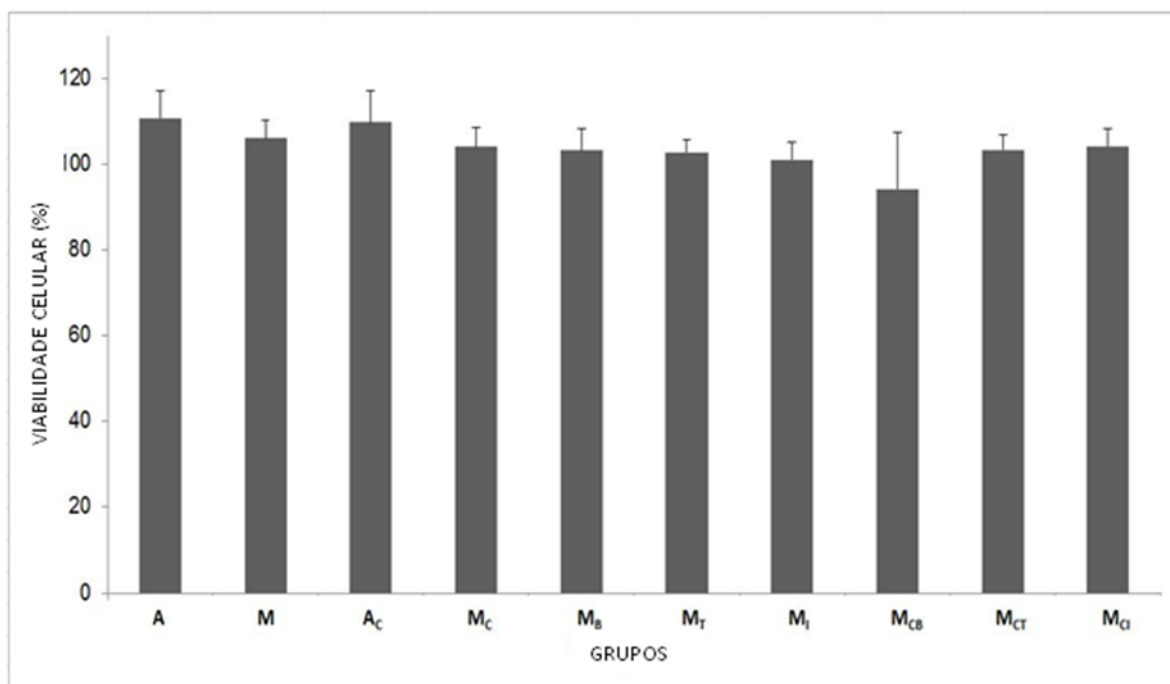


**Figura 2.** <sup>1</sup>H RMN do alginato funcionalizado com metacrilato.

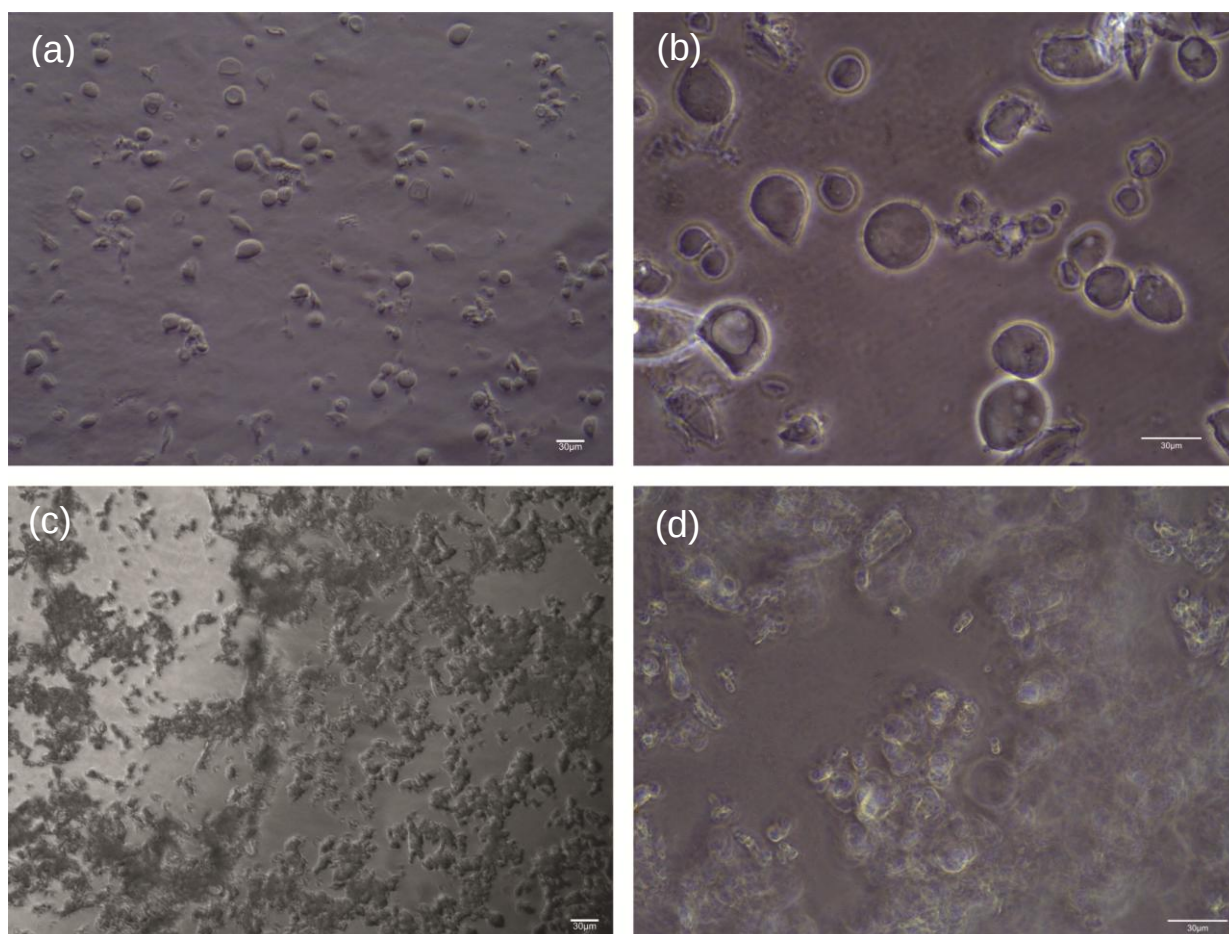
| Groups                                                                              | Composition                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
|    | 1.5% of alginate                                                   |
|    | 1.5% of alginate-methacrylate                                      |
|    | 1.5% of alginate and 1.0% of chitosan                              |
|    | 1.5% of alginate-methacrylate and 1.0% of chitosan                 |
|    | 1.5% of alginate-methacrylate and 5.0% of BAPO                     |
|   | 1.5% of alginate-methacrylate and 5% of TPO                        |
|  | 1.5% of alginate-methacrylate and 5% of IRGACURE                   |
|  | 1.5% of alginate-methacrylate; 1.0% of chitosan and 5% of BAPO     |
|  | 1.5% of alginate-methacrylate; 1.0% of chitosan and 5% of TPO      |
|  | 1.5% of alginate-methacrylate; 1% of chitosan and 5.0% of IRGACURE |

**Figure 3.** Grupos avaliados de microesferas de alginato.

A: Alginato; M: Alginato-metacrilato; C: Quitosana; B: BAPO; T: TPO; I: IRGACURE



**Figura 4.** Viabilidade celular e desvio-padrão(%) dos grupos testados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.** Microscopia óptica invertida das microesferas de alginato metacrilato em aumento de 100 e 400x. (a) e (b) alginato metacrilato; (c) e (d) alginato metacrilato com quitosana.

## REFERÊNCIAS

Anseth, K.S., et al., *In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery*. **Journal of Control Release**, 2002. 78(1-3): p. 199-209.

Augst, A.D., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as biomaterials*. **Macromolecular Bioscience**, 2006. 6(8): p. 623-33.

Baer, A.E., et al., *Collagen gene expression and mechanical properties of intervertebral disc cell-alginate cultures*. **Journal of Orthopaedic Research**, 2001. 19(1): p. 2-10.

Bryant, S.J., et al., *Crosslinking density influences chondrocyte metabolism in dynamically loaded photocrosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels*. **Annals Biomedical Engineering**, 2004. 32(3): p. 407-17.

Burdick, J.A., et al., *Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks*. **Biomacromolecules**, 2005. 6(1): p. 386-91.

Corrales, T., et al., *Free radical macrophotoinitiators: an overview on recent advances*. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry**, 2003. 159(2): p. 103-114.

Cortat, B., et al., *The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells*. **Photochemical & Photobiological Science**, 2013. 12(8): p. 1483-95.

Dinant, C., et al., *Enhanced Chromatin Dynamics by FACT Promotes Transcriptional Restart after UV-Induced DNA Damage*. **Molecular Cell**, 2013. 51(4): p. 469-79.

Dobie, K., et al., *Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro*. **Connective Tissue Research**, 2002. 43(2-3): p. 387-90.

Elisseeff, J., et al., *Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage*. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 1999. 104(4): p. 1014-22.

GANESAN, P.A.C.; BURI, M.; RENTSCH, S. Method for preparing aqueous suspensions of mineral materials using amines in combination with vinyl-carboxylic polymers. **US 0148538**, 2010.

GENCO, R.J.; CHO, M. Method for inducing periodontal tissue regeneration. **US 5455041**, 1993.

HUBBELL, J. A.; PATHAK, C. P.; SAWHNEY, A. S.; DESAI, N. P.; HILL-WEST, J. L. Photopolymerizable biodegradable hydrogels as tissue contacting materials and controlled-release carriers. **US 5986043 A**, 1996.

ISO Part 5 and Part 12: test for *in vitro* cytotoxicity, and sample preparation and reference materials **ISO 10993**. 2009 (E).

Jeon, O., et al., *Biodegradable, photocrosslinked alginate hydrogels with independently tailorable physical properties and cell adhesivity*. **Tissue Engineering Part A**, 2010. 16(9): p. 2915-25.

Jeon, O., et al., *Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties*. **Biomaterials**, 2009. 30(14): p. 2724-2734.

Leach, J.B., et al., *Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds*. **Biotechnology and Bioengineering**, 2003. 82(5): p. 578-589.

Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: properties and biomedical applications*. **Progress in Polymer Science**, 2012. 37(1): p. 106-126.

Li, Q., et al., *Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin sulfate*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2004. 68A(1): p. 28-33.

LICHTER, J.; TRAMMEL, A. M.; PIU, F.; YE, Q.; DURON, S. G.; DELLAMARY, L. A.; LEBEL, C.; HARRIS, J. P. Controlled release compositions for modulating free-radical induced damage and methods of use thereof. **US 9427472 B2**, 2014.

LOHRMANN, L. Insoluble gas-filled microspheres containing a hydrophobic barrier. **US 6063362 A**, 1998.

LU, H.; HASSELGREN, G.; MCALARNEY, M. Compositions and methods for treating pulp inflammations caused by infection or trauma. **US 0148486**, 2005.

MASTERS, D. B. Protein matrix materials, devices and methods of making and using thereof. **US 8871267 B2**, 2010.

Mironi-Harpaz, I., et al., *Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity*. **Acta Biomaterialia**, 2012. 8(5): p. 1838-48.

Murray, P.E., et al., *Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials pulp capping, and future therapies*. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, 2002. 13(6): p. 509-20.

Nicodemus, G.D. and S.J. Bryant, *Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications*. **Tissue Engineering Part B Reviews**, 2008. 14(2): p. 149-65.

PANTELIDIS, D.; BRAVMAN, J. C.; ROTHBARD, J.; KLEIN, R. L. Bioactive material delivery systems comprising sol-gel compositions. **US 8097269 B2**, 2006.

Park, H., et al., *Shear-reversibly crosslinked alginate hydrogels for tissue engineering*. **Macromolecular Bioscience**, 2009. 9(9): p. 895-901.

RUTHERFORD, B.; SOMOGYI, C.; WHITE, C.; RABINS, E. Methods for treating dental conditions using tissue scaffolds. **US 7309232**, 2003.

Santana, B.P., et al., *Preparation, modification, and characterization of alginate hydrogel with nano-/microfibers: a new perspective for tissue engineering*. **Biomedical Research International**. 2013: p. 307602.

Schmalz, G. and A.J. Smith, *Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies*. **Journal of Endodontics**, 2014. 40(4 Suppl): p. S2-5.

Smeds, K.A. and M.W. Grinstaff, *Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation (vol 54, pg 115, 2000)*. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2001. 55(2): p. 254-255.

Smidsrod, O. and G. Skjak-Braek, *Alginate as immobilization matrix for cells*. **Trends in Biotechnology**, 1990. 8(3): p. 71-8.

Sone, T., et al., *A novel gene delivery system in plants with calcium alginate micro-beads*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2002. 94(1): p. 87-91.

TAK, W. C.; CONNIE, K. S. K. Nano-calcium phosphate-coated polymethylmethacrylate-based co-polymer and coating process of the same. **CN 105315478**, 2015.

Tonnesen, H.H. and J. Karlsen, *Alginate in drug delivery systems*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2002. 28(6): p. 621-30.

Tziafas, D., A.J. Smith, and H. Lesot, *Designing new treatment strategies in vital pulp therapy*. **Journal of Dentistry**, 2000. 28(2): p. 77-92.

Tziafas, D., *The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration*. **Caries Research**, 2004. 38(3): p. 314-20.

Van Tomme, S.R., G. Storm, and W.E. Hennink, *In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications*. **International Journal of Pharmaceutics**, 2008. 355(1-2): p. 1-18.

WHITSON, S.W. Hydrogel bioscaffold and coating for bone and tooth repair. **US 8454980**, 2011.

YAQUING, Z.; TIEJUN, T.; XUE, C.; LEI, W.; WENXI, H. Dental pulp capping preparation and preparation method thereof. **CN 103767881 A**, 2014.

Zimmermann, H., et al. *Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation*. **Journal of Materials Science and Materials Medicine**, 2005.16(6):491-501.



#### 4 Considerações Finais

O hidrogel de alginato já vem sendo utilizado em diversos segmentos da área da saúde devido, principalmente, a sua biocompatibilidade e baixo custo. Além disso, uma nova tendência no desenvolvimento de materiais bioativos tem sido observada, aliada ao princípio da odontologia minimamente invasiva, o que aumenta a busca pelo material ideal. Apesar de todas suas vantagens, este material ainda apresenta limitações relacionadas à sua aplicação *in situ* que estimulam o desenvolvimento de métodos que permitam atingir um biomaterial que potencialize os efeitos de reparo e regeneração tecidual, seja biocompatível e que seu custo-benefício ainda persista. Devido a isso, foram desenvolvidas microesferas de hidrogel de alginato funcionalizado com metacrilato para aplicação como sistema de entrega em Odontologia. A funcionalização com radicais metacrilato permite a polimerização do material e a união a materiais restauradores, facilitando sua utilização direta no local de aplicação. Apesar de o material ter apresentado resultados preliminares promissores, novas pesquisas devem ser conduzidas a fim de otimizar o processo de obtenção do alginato funcionalizado e das microesferas, e a incorporação de medicamentos e fatores de crescimento, sendo utilizado como um sistema de entrega de fármaco. Dessa maneira, o uso de hidrogel de alginato funcionalizado com potencial de fotopolimerização, seja na forma de película ou de microesferas contendo substâncias bioativas, poderá promover uma resposta fisiológica induzida e programada em tratamentos para odontologia reparativa ou regenerativa.

## Referências

Anseth, K.S., et al., *In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery*. **Journal of Control Release**, 2002. 78(1-3): p. 199-209.

Augst, A.D., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as biomaterials*. **Macromolecular Bioscience**, 2006. 6(8): p. 623-33.

Baer, A.E., et al., *Collagen gene expression and mechanical properties of intervertebral disc cell-alginate cultures*. **Journal of Orthopaedic Research**, 2001. 19(1): p. 2-10.

Bryant, S.J., et al., *Crosslinking density influences chondrocyte metabolism in dynamically loaded photocrosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels*. **Annals Biomedical Engineering**, 2004. 32(3): p. 407-17.

Burdick, J.A., et al., *Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks*. **Biomacromolecules**, 2005. 6(1): p. 386-91.

Corrales, T., et al., *Free radical macrophotoinitiators: an overview on recent advances*. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry**, 2003. 159(2): p. 103-114.

Cortat, B., et al., *The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells*. **Photochemical & Photobiological Science**, 2013. 12(8): p. 1483-95.

Dinant, C., et al., *Enhanced Chromatin Dynamics by FACT Promotes Transcriptional Restart after UV-Induced DNA Damage*. **Molecular Cell**, 2013. 51(4): p. 469-79.

Dobie, K., et al., *Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro*. **Connective Tissue Research**, 2002. 43(2-3): p. 387-90.

Elisseeff, J., et al., *Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage*. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 1999. 104(4): p. 1014-22.

ISO Part 5 and Part 12: test for *in vitro* cytotoxicity, and sample preparation and reference materials **ISO 10993**. 2009 (E).

Jeon, O., et al., *Biodegradable, photocrosslinked alginate hydrogels with independently tailorable physical properties and cell adhesivity*. **Tissue Engineering Part A**, 2010. 16(9): p. 2915-25.

Jeon, O., et al., *Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties*. **Biomaterials**, 2009. 30(14): p. 2724-2734.

Leach, J.B., et al., *Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds*. **Biotechnology and Bioengineering**, 2003. 82(5): p. 578-589.

Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: properties and biomedical applications*. **Progress in Polymer Science**, 2012. 37(1): p. 106-126.

Li, Q., et al., *Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin sulfate*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2004. 68A(1): p. 28-33.

Mironi-Harpaz, I., et al., *Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity*. **Acta Biomaterialia**, 2012. 8(5): p. 1838-48.

Murray, P.E., et al., *Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials pulp capping, and future therapies*. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, 2002. 13(6): p. 509-20.

Nicodemus, G.D. and S.J. Bryant, *Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications*. **Tissue Engineering Part B Reviews**, 2008. 14(2): p. 149-65.

Novikova, L.N., et al., *Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation*. **Journal of Biomedical Materials Research A**, 2006. 77(2): p. 242-52.

Park, H., et al., *Shear-reversibly crosslinked alginate hydrogels for tissue engineering*. **Macromolecular Bioscience**, 2009. 9(9): p. 895-901.

Rouillard, A.D., et al., *Methods for photocrosslinking alginate hydrogel scaffolds with high cell viability*. **Tissue Engineering Part C Methods**, 2011. 17(2): p. 173-9.

Santana, B.P., et al., *Preparation, modification, and characterization of alginate hydrogel with nano-/microfibers: a new perspective for tissue engineering*. **Biomedical Research International**. 2013: p. 307602.

Schmalz, G. and A.J. Smith, *Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies*. **Journal of Endodontics**, 2014. 40(4 Suppl): p. S2-5.

Smeds, K.A. and M.W. Grinstaff, *Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation (vol 54, pg 115, 2000)*. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2001. 55(2): p. 254-255.

Smidsrod, O. and G. Skjak-Braek, *Alginate as immobilization matrix for cells*. **Trends in Biotechnology**, 1990. 8(3): p. 71-8.

Sone, T., et al., *A novel gene delivery system in plants with calcium alginate micro-beads*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2002. 94(1): p. 87-91.

Tonnesen, H.H. and J. Karlsen, *Alginate in drug delivery systems*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2002. 28(6): p. 621-30.

Tziafas, D., A.J. Smith, and H. Lesot, *Designing new treatment strategies in vital pulp therapy*. **Journal of Dentistry**, 2000. 28(2): p. 77-92.

Tziafas, D., *The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration*. **Caries Research**, 2004. 38(3): p. 314-20.

Van Tomme, S.R., G. Storm, and W.E. Hennink, *In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications*. **International Journal of Pharmaceutics**, 2008. 355(1-2): p. 1-18.

Zimmermann, H., et al. *Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation.* **Journal of Materials Science and Materials Medicine**, 2005.16(6):491-501.

## **Apêndices**

## **Apêndice A – Nota da Tese**

### **Alginato funcionalizado com potencial odontológico**

#### ***Functionalized alginate with dentistry potential***

A presente tese de doutorado desenvolveu microsferas de hidrogel de alginato funcionalizado com metacrilato para potencial aplicação como sistema fotopolimerizável de entrega de fármacos em materiais odontológicos. Hidrogel de alginato é um copolímero derivado de um polissacarídeo natural biocompatível que devido as suas características como biocompatibilidade, hidrofília e baixo custo tem sido utilizado em uma variedade de aplicações na área da saúde. A utilização de microsferas permite a incorporação de moléculas biologicamente ativas em materiais odontológicos, o que pode possibilitar tratamentos mais biológicos com a indução de eventos que envolvem o reparo ou a regeneração de tecidos de interesse, como a formação de dentina terciária, a esclerose dentinária (mineralização intratubular), o controle do processo inflamatório e a formação de tecido mineralizado.

**Campo da pesquisa:** Clínica Odontológica, dentística e materiais odontológicos.

**Candidato:** Fernanda Barbosa Leal, Mestre em Dentística pela Universidade Federal de Pelotas (2012)

**Data da defesa e horário:** 24/02/2017 às 9h.

**Local:** Auditório do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. 5º andar da Faculdade de Odontologia de Pelotas. Rua Gonçalves Chaves, 457.

**Membros da banca:** Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira, Prof. Dr. Rodrigo Varela de Carvalho, Prof. Dr. Neftali Carreño, Prof. Dr. Cesar Henrique Zanchi, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Nedel (Suplente), Profa. Dra. Giana da Silveira Lima (Suplente).

**Orientador:** Prof. Dr. Evandro Piva

**Co-orientadores:** Prof. Fabrício Aulo Ogliari, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Fernandes da Silva

**Informação de contato:** Fernanda Barbosa Leal, fernandableal@gmail.com, Rua Cidade de Barcelos, 547, Recanto de Portugal, Pelotas, RS, Brasil.

## **Apêndice B – Súmula do currículo do candidato**

### **Súmula do currículo**

Fernanda Barbosa Leal nasceu em 03 de agosto de 1986, em Pelotas, Rio Grande do Sul. Completou o ensino fundamental em Escola privada na mesma cidade e o ensino médio em Instituto Federal. No ano de 2006 ingressou na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), tendo sido graduada cirurgiã-dentista em 2010. No ano seguinte ingressou no Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), área de concentração Dentística, sob orientação do Prof. Dr. Fabrício Aulo Ogliari. Durante o período de graduação foi bolsista de iniciação científica sob orientação do professor Evandro Piva e co-orientação do professor mencionado acima, assim como da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Giana da Silveira Lima. Também desenvolveu atividade de monitoria na área de dentística sob orientação dos professores Alexandre Masotti e Patrícia Jardim. Além destas atividades, fez parte do projeto de extensão Prodente, para reabilitação de dentes tratados endodonticamente. Durante o período de mestrado foi bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e realizou trabalhos de desenvolvimento de materiais dentários. Já no período de doutorado foi bolsita FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) e trabalhou com desenvolvimento de materiais dentários biologicamente ativos.

### **Publicações:**

Stability of initiation systems in acidic photopolymerizable dental material. Meereis C, Leal F, Ogliari F. Dental Materials, 2016.

Effect of Antioxidants on the Dentin Interface Bond Stability of Adhesives Exposed to Hydrolytic Degradation. Gotti V, Feitosa V, Sauro S, Correr-Sobrinho L, Leal F, Stansbury J, Correr A. Journal of Adhesive Dentistry, 2015.

Strengthening of Porcelain Provided by Resin Cements and Flowable Composites. Spazzin A, Guarda G, Ogliari A, Leal F, Correr-Sobrinho L, Moraes R. Operative Dentistry, 2015.

Synthesis, characterization, and photocuring of siloxane-oxirane monomers. Leal F, Pereira C, Ogliari F. Journal of Polymer Science. Part A, Polymer Chemistry, 2015.



Chemical interaction of 10-MDP (methacryloyloxy-decyl-dihydrogen-phosphate) in zinc-doped self-etch adhesives. Feitosa V, Pomacondor C, Ogliari F, Leal F, Correr A, Sauro S. *Journal of Dentistry*, 2014.

BAPO as an alternative photoinitiator for the radical polymerization of dental resins. Meereis C, Leal F, LIMA G, PIVA E, Ogliari F. *Dental Materials*, 2014.

Sal de iodônio aumenta a resistência coesiva de uma resina experimental na presença de solvente. Leal F, Camargo A, Piva E, Ogliari F. *Polímeros*, 2013.

Iodonium salt improves the dentin bonding performance in an experimental dental adhesive resin. Leal F, Collares F, Lima G, Samuel S, Petzhold C, Ogliari F. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2012.

YbF<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> Fillers as Radiopacifiers in a Dental Adhesive Resin. Carreño N, Oliveira T, Piva E, Leal F, Lima G, Moncks M, Raubach C, Ogliari F. *Nano-Micro Letters*, 2012.

Effect of acidic monomer concentration on the dentin bond stability of self-etch adhesive. Leal F, Madruga F, Prochnow E, Lima G, Ogliari F, Piva E, Moraes R. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2011.