



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – IMPLANTODONTIA**

SUZELI DIAS

**SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLGA
CONTENDO SINVASTATINA APLICÁVEIS EM
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

**FLORIANÓPOLIS
2018**

Suzeli Dias

**SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLGA
CONTENDO SINVASTATINA APLICÁVEIS EM
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia, Área de Concentração de Implantodontia
Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

FLORIANÓPOLIS
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dias, Suzeli

SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLGA
CONTENDO SINVASTATINA APLICÁVEIS EM REGENERAÇÃO
ÓSSEA / Suzeli Dias ; orientador, Ricardo de Souza
Magini, coorientador, Águedo Aragones, 2018.
63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em ,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. . 2. Regeneração Óssea. 3. Sinvastatina. 4.
PLGA. I. Magini, Ricardo de Souza. II. Aragones,
Águedo. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em , IV. Título.

Suzeli Dias

**SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLGA
CONTENDO SINVASTATINA APLICÁVEIS EM
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Odontologia – Área de concentração Implantodontia” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 26 de julho de 2018.

Prof.^a Dr.^a Elena Riet Correa Rivero
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Presidente da Banca Examinadora (Orientador)
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Karina Cesca
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui. Especialmente aos meus familiares.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não simboliza apenas o resultado de uma pesquisa científica, significa também uma evolução pessoal ao longo destes dois anos nessa maravilhosa profissão que é a Odontologia e, ainda, um outro desafio que aprendi a amar: a DOCÊNCIA, carreira que me ponho a seguir e durante a qual tenho muito a lapidar. Assim são as jornadas: termina-se uma e iniciam-se outras que já aspiro.

Neste período do Mestrado nunca estive sozinha, sempre pude contar com a esperança divina e o apoio das pessoas que estiveram ao meu lado. Por isso, quero agradecer todos aqueles que de certa forma, cruzaram meu caminho.

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me colocado nos lugares certos nas horas certas, em muitos momentos da minha jornada. Nos momentos difíceis, uma porta sempre se abria para que eu pudesse continuar com meus projetos e planos.

À minha Mãe, mulher da minha vida, que muitas vezes abriu mão dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Pelo seu zelo e seu exemplo de humildade e simplicidade. Seu apoio foi o que me deu, nos momentos difíceis, esperança para seguir em frente. És símbolo de amor maior e eterno.

Ao meu noivo Bruno Seemann Vieira, que muitas vezes ficou à minha espera e compreendeu minhas ausências neste período de dedicação, que me apoiou de forma integral todo o tempo. Dentre os presentes divinos que ganhei nesta vida, você certamente é um deles. Obrigada por preencher meu coração de amor e minha alma de esperança. És um exemplo de sabedoria e ética.

À minha querida irmã Suelen e meu cunhado João Henrique que sempre estiveram prontos para me apoiar e me alegrar nas horas que mais precisei. Amo vocês.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina que me acolheu desde minha graduação em Odontologia e tem me permitido evoluir como ser humano e como profissional, principalmente por todo o investimento que me proporcionou até então. Minha função será, certamente, contribuir para uma sociedade ética e promissora.

Ao meu orientador Professor Dr. Ricardo de Souza Magini, que apoiou, incentivou e me deu toda autonomia durante meu Mestrado, para que eu encontrasse e desenvolvesse habilidades que as

quais eu nem sabia tinha. Você é um grande Mestre, um Professor incrível e inspirador, com uma didática fantástica. Obrigada por tudo.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Águedo Aragones, que sempre esteve pronto para me ajudar nos momentos em que mais precisei, sempre sanando minhas dúvidas, e por me transmitir um pouco de suas habilidades laboratoriais.

À Professora Dra. Ariadne Cabral da Cruz, pela atenção que sempre dedica aquilo que se propõe a fazer, por sempre ajudar nos momentos mais cruciais.

Ao Professor Dr. Cesar Augusto Magalhães Benfatti, tenho muito carinho por você, obrigada por ter me proporcionado ensinamentos ao longo desta jornada. Você é um Professor admirável. Dotado de um coração gigante, sempre me compreendeu e apoiou.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Cardoso por contribuir com sua experiência didática e docente, permitindo que eu lapidasse essas habilidades ao longo do Mestrado. E por me permitir acessar conhecimentos que transcendem a Odontologia.

Ao Professor Dr. Marco Aurélio Bianchini por acreditar no meu trabalho clínico e me incentivar nas atividades docentes.

À Professora Dra. Elena Riet Correa Rivero pelo trabalho que vem desenvolvendo na Pós-Graduação da UFSC. Sua competência e responsabilidade admiráveis, são exemplos para seus alunos.

À Professora Dra. Andréia Pimenta que me acolheu no INTELAB para que eu pudesse realizar parte dos meus experimentos. Você é uma pessoa com uma energia contagiante e motivadora. Admiro muito seu trabalho.

À Dra. Karina Cesca que tive oportunidade de conhecer ao longo do meu mestrado, e com quem aprendi a desenvolver parcerias. Uma pessoa de um coração gigante. Sem você a realização deste trabalho seria mais difícil.

À Thaianne, Mestranda em Engenharia de Materiais, que me auxiliou neste trabalho para que eu pudesse realizar algumas análises.

Aos técnicos da Universidade Federal de Santa Catarina que nos auxiliam para que possamos desenvolver nossos projetos, especialmente à Silvane e Melissa, técnicas administrativas do CEPID.

A todos os meus amigos do CEPID. Ouvi falar que amigos são a família que Deus nos permitiu escolher, sendo assim vocês serão,

certamente, meus eternos irmãos. Sou muito grata a todos pelos ensinamentos e momentos que vivemos juntos, com vocês meus passos se tornaram mais leves durante essa caminhada. Guardarei todos vocês em meu coração: Gabriella Mercedes Peñarrieta Juanito, Karin Gisel Apaza Bedoya, Mariane Beatriz Sordi, Edwin Ruales Carrera, Nicolás Aguilerra, Raissa Curtareli, Marial Elisa Galarraga, Gabriel Leonardo Magrin, Fernanda Haverroth Shunemann, Bruna Correia, Renata Scheeren Brum, Miguel Alexandre Pereira Pinto Noronha de Oliveira, Rafael Cury Cecato, Carolina Morch, Carol Rafael, Patrícia Pauleto, Juam Felipe Dumes Montero, Hamid Yasdanpanah, Arthur Breno, Letícia Bins Ely, Nathalia Peres Jordão Pinto, Adriana Riva, Joaquin Lopes Chaves, Madalena Dias, Mario Escobar.

"Os problemas significativos com os quais nos deparamos não podem ser resolvidos no mesmo nível de pensamento em que estávamos quando eles foram criados."

(Albert Einstein)

RESUMO

O objetivo desse estudo foi sintetizar microesferas (MPs) de PLGA (50:50) e MPs de PLGA (50:50) contendo sinvastatina (PLGA/SIM), realizar a caracterização morfológica e química, avaliar seu comportamento durante a degradação. As MPs/SIM foram sintetizadas através do método de simples emulsão e evaporação do solvente contendo 0,03% de fármaco em relação massa/massa ao polímero. A morfologia das MPs de ambos os grupos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O tamanho das partículas foi obtido por difração a laser. As características das ligações químicas foram observadas através de espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR). Para degradação *in vitro* das MPs, foi avaliada absorção de água, perda de massa, e pH, e avaliada em MEV após cada período experimental (7, 30 e 60 dias). Foi possível obter uma morfologia das MPs lisas e homogêneas, com ausência de fissuras. O tamanho médio das partículas foi de 38,6 μ m (PLGA) e 542 μ m (PLGA/SIM). O espectro de FTIR foi compatível as características dos materiais. Não foi observado degradação nos primeiros 7 dias. Após 60 dias houve uma degradação de 87,34% e 88,16% para as MPs de PLGA e PLGA/SIM respectivamente. Absorção de mínima de água do grupo PLGA foi de 44,17% (S-5,65)/30 dias e máxima foi de 132,79% (S-31,08)/60 dias. Para o grupo PLGA/SIM foi de 43,84% (S-5,43)/30 dias e 156,91% (S-2,72). A variação do pH entre os grupo foi de PLGA -6.13 (S-0,01) a 2.54 (S-0,003) e para o grupo PLGA/SIM 5.82 (0,05) a 2.53 (S-0,003). Os resultados deste estudo sugerem que as microesferas de PLGA/SIM, apresentaram resultados satisfatórios no âmbito da síntese, caracterização e degradação e têm potencial para serem usadas como biomaterial em regeneração óssea.

Palavras chaves: Microesferas, PLGA, sinvastatina, regeneração óssea

ABSTRACT

The objective of this study was to synthesize PLGA microspheres (PLs) and PLGA MPs with simvastatin (PLGA / SIM), to perform a morphological and chemical characterization as well as its behavior during a degradation. The MPs/SIM were synthesized by the emulsion and evaporation method of 0.03% of drug in relation mass/mass to the polymer. The morphology of the MPs of both groups was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The size of the actions was obtained by laser diffraction. Chain characteristics were observed through Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR). *In vitro* degradation of MPs, were evaluated absorption of water, loss of mass, water and pH, and SEM evaluation after each experimental period (7, 30 and 60 days). It was possible to obtain a smooth and homogeneous Mph morphology, with no cracks. The mean size was 38.6 μ m (PLGA) and 542 μ m (PLGA/SIM). The FTIR spectrum was evaluated as a characteristic of the materials. No degradation was observed in the first 7 days. After 60 days, there was a degradation of 87.34% and 88.16% for PLGA and PLGA / SIM MPs, respectively. Minimum water absorption of the PLGA group was 44.17% (S-5.65) / 30 days and maximum was 132.79% (S-31.08) / 60 days. For the PLGA/SIM group it was 43.84% (S-5.43) / 30 days and 156.91% (S-2.72). The pH variance between the groups was PLGA -6.13 (S-0.01) to 2.54 (S-0.003) and for the PLGA/SIM group 5.82 (0.05) to 2.53 (S-0.003). The results of this study demonstrated PLGA/SIM microspheres showed satisfactory results in the context of the synthesis, characterization, and degradation. The synthesized materials revealed potentials to be used as biomaterial in bone regeneration.

Keywords: Microspheres, PLGA, simvastatin, bone regeneration

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Preparo prévio à análise em MEV dos *stubs* contendo o material a ser analisado, após o recobrimento com pó de ouro 38
- Figura 2** – Imagem das microesferas de PLGA/SIM, obtidas após a síntese, por microscopia eletrônica de varredura. Imagem A com ampliação de 500x. B com ampliação de 1000x. Imagem C com ampliação de 2000x..... 39
- Figura 3** – Imagem das microesferas de PLGA, obtidas após a síntese, por microscopia eletrônica de varredura. Imagem A ampliação de 500x (observar a presença de um aglomerados de partículas). Imagem B com de ampliação de 1000x. Imagem C com de ampliação de 2000x..... 41
- Figura 4** – Imagem das microesferas de PLGA, obtidas após a síntese, por microscopia eletrônica de varredura. Imagem A ampliação de 500x (observar a presença de um aglomerados de partículas). Imagem B com de ampliação de 1000x. Imagem C com de ampliação de 2000x..... 42
- Figura 5** – Gráfico representativo da análise do tamanho das microesferas da amostra PLGA/SIM..... 43
- Figura 6** – Gráfico representativo da análise do tamanho das microesferas da amostra PLGA/SIM..... 43
- Figura 7** – Espectros de transmitância de FTIR das microesferas de PLGA/SIM, PLGA e SIM.....44
- Figura 8** – Comparação dos valores da perda de massa entre os grupos nos períodos de 7, 30 e 60 dias de incubação em PBS (pH 7,4 a 37 °C). Os valores representam a média \pm erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$ 46
- Figura 9** – Amostras de PLGA após 7 dias de ensaio de degradação. Nos aumentos de A-200x, B-1000x, C-2000x..... 46
- Figura 10** – Amostras de PLGA após 60 dias em ensaio de degradação. Nos aumentos de A-200x, B-500x, C-1000x, D-2000x..... 47
- Figura 11** – Amostras de PLGA/SIM após 7 dias de ensaio de degradação. Nos aumentos de A-200x, B-500x, C-1000x, D-2000x..... 48

Figura 12 – Amostras de PLGA/SIM após 60 dias em ensaio de radiação. Nos aumentos de A-200x, B-500x, C-1000x, D-2000x..... 49

Figura 13 – Absorção de água das microesferas de PLGA e PLGA-SIM após 7, 30 e 60 dias de incubação em PBS (pH 7,4 e 37 °C). Os valores representam a média ± erro padrão da média comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$ 50

Figura 14 – pH da solução PBS após a degradação das microesferas de PLGA e PLGA/SIM após 7, 30 e 60 dias de incubação em PBS (pH 7,4 a 37 °C). Os valores representam a média ± erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$ 52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Bandas de absorção por infravermelho 49
- Tabela 2** – Os valores representam a médias da perda de massa das amostras e o desvio padrão dos grupos PLGA e PLGA/SIM dos grupo 7, 30 e 60 dias..... 54
- Tabela 3** – Os valores representam a médias percentuais de absorção de água das amostras de cada grupo PLGA e PLGA/SIM nos períodos de 7, 30 e 60 dias.....55
- Tabela 4** - Os valores representam a médias do pH das amostras e o desvio padrão dos grupos PLGA e PLGA/SIM dos grupo 7, 30 e 60 dias.....56

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
~	Congruente
S	Desvio padrão
≥	Maior ou igual
°C	Graus Celsius
µm	Micrometro(s)
ALP	Fosfatase alcalina (Alkaline Phosphatase)
BMP	Proteína óssea morfogenética (Bone Morphogenetic Protein)
BMP2	Proteína óssea morfogenética 2 (Bone Morphogenetic Protein 2)
CEPID	Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários
DCM	Diclorometano
Et al.	E outros (Et alii)
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
HA	Hidroxiapatita
HMG-CoA	hidroxi-metilglutaril coenzima A
L	Litro
MEV ou SEM	Microscópio eletrônico por varredura (Scanning Electron Microscopy)
mg	Miligramas
ml	Mililitros
m/m ou w/w	relação entre massas (weight/weight)
nm	Nanômetro
O/W	Oil-in-Water
PBS	Tampão salina-fosfato (Phosphate Buffered Saline)
PLGA	Ácido polilático-co-glicólico
PVA	Álcool polivinílico (Polivinil acetate)
RANKL	Receptor ativador do ligante NFκβ (Receptor activator of NFκβ ligand)
rhBMP2	Proteína óssea morfogenética recombinante humana 2 (recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species)
Runx2	Fator de transcrição relacionado ao Runt 2
SIN ou SIM	Sinvastatina (Simvastatin)
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alfa)
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UK	Reino Unido (United Kingdom)

USA	Estados Unidos da América (United States of America)
	Ultravioleta
P	alfa tricálcio fosfato
Mphs	
Microesferas	

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	Justificativa.....	33
	2.1 Relevância Clínica.....	33
3	Hipóteses.....	33
4	Objetivos	33
	4.1 Objetivo geral	33
	4.2 Objetivos específicos.....	33
5	Metodologia	35
	5.1 Materiais utilizados.....	35
	5.2 Síntese das microesferas PLGA contendo sinvastatina	
	35	
	5.3 Caracterização das microesferas	35
	5.3.1 Avaliação da morfologia.....	35
	5.3.2 Diâmetro das partículas por difração a laser.	36
	5.3.3 Avaliação química.....	37
	5.4 Degradação das microesferas	37

6	Resultados.....	39
6.1	Caracterização das microesferas.....	39
6.1	Morfologia das partículas por MEV	39
6.1.1	Tamanho das partículas por difração a laser.	40
6.1.2	Espectrometria de Infravermelho Transformada de Fourier – FTIR	41
6.1.3	Degradação das partículas	43
7	Discussão.....	51
8	CONCLUSÕES.....	55
	Referências	57

1 INTRODUÇÃO

Alicerçada nos estudos longitudinais de casos clínicos que apresentam elevados índices de sucesso e sobrevivência, a implantodontia tem se tornado uma prática cada vez mais comum para realizar reabilitações orais. Entretanto, a perda do tecido ósseo pode dificultar ou impossibilitar a posição tridimensional do implante (1,2).

A perda óssea dos maxilares pode advir de vários fatores como consequência da doença periodontal, traumas, patologias e, principalmente, pela perda do elemento dentário e da nutrição proporcionada pelo ligamento periodontal. Isso resulta em uma reabsorção óssea fisiológica da crista óssea pós-extração em altura e largura, já comprovada em estudos *in vivo* e clínicos longitudinais (3–5).

Se nenhum procedimento for realizado visando compensar esta perda, poderá haver prejuízos estéticos e funcionais ao paciente. Estudos já comprovam que o preenchimento do alvéolo antes ocupado pelo elemento dental se mostra eficaz para compensar a perda da crista óssea. No entanto, não existe um consenso na literatura sobre qual seria a melhor técnica e o melhor substituto para esta abordagem (5–7).

Para tentar recuperar ou minimizar essas perdas, técnicas regenerativas do tecido ósseo tem sido utilizadas antes ou durante a instalação dos implantes dentários desde o final do século XX, na tentativa de recuperar o tecido ósseo perdido e possibilitar as reabilitações implantossuportadas (8–10). Dentre as opções que se encontram viáveis para uso clínico, podemos citar os autoenxertos, homoenxertos, xenoenxertos ou materiais sintéticos, também chamado de aloplásticos (11).

Os enxertos autógenos se mostram bastante promissores, tendo em vista que possuem as três propriedades para formação óssea (osteogênese, osteoindução e osteocondução), além de excelente biocompatibilidade. Atualmente, busca-se reduzir a morbidade associada à utilização deste tipo de enxerto ocasionada pela coleta em um sítio doador. Como outras desvantagens associadas, podemos citar a limitada quantidade do enxerto e as complicações decorrentes da coleta, assim como a taxa do volume de reabsorção imprevisível e mais rápida apresentada, o que pode desfavorecer a utilização destes enxertos (4).

Frente às dificuldades associadas a obtenção e a utilização dos enxertos autógenos, biomateriais xenógenos são uma alternativa viável,

para substituição ou complementação dos enxertos autógenos, sendo utilizados em escala mundial. Contudo, questionamentos são levantados a respeito do risco, mesmo que pequeno, da transmissão da Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), causada por uma forma especial de proteína chamada príão ou príon. Quando transmitida ao homem, essa proteína causa uma doença semelhante (uma variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) e provoca uma encefalopatia degenerativa, caracterizada inicialmente, por excitabilidade, coceiras, ataxia e morte em indivíduos expostos a estes materiais (12).

A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar, que envolve a tríade células, moléculas sinalizadoras (fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas e fármacos sintéticos osteoindutores) e carreadores (colágeno, osso e materiais sintéticos). A engenharia tecidual busca integrar os princípios de engenharia, química e biologia para o desenvolvimento de possíveis alternativas visando restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos (13).

O uso do ácido polilático-co-glicólico (PLGA) foi aprovado pela *Food and Drug Administration (FAD)* e pela *Agência Européia de Medicamentos (EMA)* em vários sistemas de distribuição, e pode ser utilizado no campo da Engenharia Tecidual. Disponível no mercado com pesos moleculares diferentes, sua degradação pode variar de vários meses ou anos dependendo do seu peso molecular. É um biopolímeros sintético hidrofóbico, biocompatível, atóxico que apresenta excelentes propriedades físico-químicas, incorporação e liberação de substâncias, fazendo-o um bom material osteocondutor. Durante a biodegradação, os produtos resultantes da hidrólise das suas ligações éster (ácido lático e o ácido glicólico) são similares aos monômeros endógenos que irão ser degradados pelas rotas metabólicas (11,14).

Além do peso molecular, outros fatores influenciam na degradação do polímero de PLGA, como o pH do meio, a temperatura e a relação entre ácido lático e o ácido glicólico. (15). Quando a proporção dos copolímeros é de 50:50 é observada uma degradação que ocorre de forma mais rápida (16).

O PLGA tem sido utilizado na indústria farmacêutica como um carreador para substâncias bioativas. Pode-se atribuir como uma das principais vantagens deste polímero, a possibilidade do perfil de liberação de determinada substância poder ser controlado através de parâmetros como peso molecular e a relação entre seus co-polímeros ácido lático e ácido glicólico (15).

A partir dos pioneiros trabalhos de Urist (1965), foi possível a utilização das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP's) em

regenerações ósseas. As BMPs estão presentes na matriz extracelular e são utilizadas atualmente como fatores de crescimento na regeneração óssea. Através de uma complexa indução gênica, propiciam a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células osteogênicas, o que possibilitará a formação de tecido ósseo (17–19).

O uso da rhBMP2 exógena não induz um estímulo adequado à osteoindução por ser requerida uma quantidade seis vezes maior do que a BMP endógena, além de ser uma modalidade de tratamento que apresenta alto custo e riscos. Dentre eles destacam-se a falta de controle na atuação desses fatores (devido à cinética de liberação complexa), o uso de dosagens não fisiológicas, a duração da expressão dos genes, imunogenicidade e segurança a longo prazo, o que exige cautela na sua utilização (20,21).

Devido a estas dificuldades no uso das BMP's exógenas, têm-se procurado alternativas com menores riscos e custos, que sejam capazes de proporcionar a osteoindução, regulando favoravelmente os fatores de crescimento intrínsecos e que possam ser associados a substitutos osteocondutores, sem afetar a eficácia da regeneração óssea, buscando sim favorecê-la. Como alternativa osteoindutora, têm-se estudado e utilizado as estatinas, aprovadas pela *Food and Drug Administration (FDA)* e com custo reduzido 16.000 vezes frente às rhBMP2, devido à sua fácil sintetização (22).

As estatinas são moléculas estáveis, não susceptíveis à degradação proteolítica. Podem ser originárias de culturas de fungos (lovastatina, pravastatina e sinvastatina) ou sintéticas (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, pitvastatina e rosuvastatina). O mecanismo de ação das estatinas reside na sua capacidade em inibir a redutase da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima da HMG-CoA, bloqueando a conversão do HMG-CoA em mevalonato e impedindo, a síntese do colesterol endógeno. Desta maneira, muito utilizadas no tratamento da hipercolesterolemia, um fator de risco para aterosclerose (23).

Mundy *et al.* (1999) foram os primeiros a citarem a sinvastatina como estimulador da formação óssea *in vivo*. Quando injetada subcutaneamente na calvária de ratos, houve aumento na largura óssea, além de ter-se obtido aumento do volume de osso esponjoso na tíbia quando administrada oralmente. A sinvastatina demonstrou capacidade de aumentar o nível de expressão de BMP's em células ósseas e estimular a formação óssea (22,24,25).

Nas linhas celulares osteoblásticas, estudos *in vitro* confirmaram que a sinvastatina eleva o nível de expressão de BMP2 e o fator de crescimento vascular endotelial para acelerar a diferenciação dos

osteoblastos, além de elevar a expressão de osteopontina, colágeno tipo I, sialoproteína óssea e osteocalcina (26).

Maciel-Oliveira *et al.* (2011) avaliaram o uso de sinvastatina em gel em defeitos criados no processo alveolar de ratos. Foi observada uma formação óssea mais rápida nos defeitos tratados com sinvastatina, porém houve ausência de osteoclastos nas amostras (27). Um estudo *in vitro*, mostrou que as estatinas inibiram a reabsorção óssea por meio da supressão da cascata do mevalonato, bloqueando a prenilação de moléculas sinalizadoras essenciais para a atividade osteoclástica (28).

Moon *et al.* (2011), mostraram que a sinvastatina inibiu a formação de osteoclastos, induzida pela cascata de RANKL, por meio da inibição da sinalização induzida pelas espécies ativas de oxigênio (ROS) (29). A sinvastatina parece também inibir a indução de metaloproteinase-9, relacionada à reabsorção óssea (30).

A maior limitação à sua aplicação clínica é o meio apropriado de entrega e liberação. Baixas doses de sinvastatina podem não ter impacto na formação óssea, enquanto que altas dosagens podem levar à uma citotoxicidade e estimulação do processo inflamatório, atrasando o reparo tecidual. Estudo realizado *in vivo* por Encarnação e colaboradores (2012) avaliou o reparo ósseo em defeitos criados na calvária de ratos tratados com sinvastatina incorporada a arcabouços de PLGA+HA e a sinvastatina isolada, ambas na concentração de 4 mg/mL. Após 60 dias, foi observado formação óssea semelhante ao controle e aumento da expressão de citocinas inflamatórias e nos tecidos adjacentes (31).

Em uma revisão da literatura os autores concluíram que a liberação local da sinvastatina pode aumentar a formação óssea e acelerar o processo de cicatrização de defeitos ósseos e que a estimulação da neoformação óssea é dependente da dose de fármaco utilizada. Sendo assim, são necessários estudos para determinar as concentrações locais necessárias para promover a regeneração óssea (32).

Um estudo no qual foi realizado defeitos na ulna de coelhos, onde foram tratados com arcabouços de sulfato de cálcio incorporado com sinvastatina, mostrou efeitos benéficos na regeneração óssea, semelhantes aos obtidos com rhBMP2, demonstrando, que o fármaco é osteoindutor com grande potencial para a engenharia tecidual óssea (33).

O PLGA produzido sob o formato de microesferas tem sido amplamente utilizado como sistema carreador de fármacos e em aplicações médicas regenerativas, principalmente devido à sua biocompatibilidade e degradação. A sinvastatina encapsulada por

microesferas de PLGA é de fácil fabricação quando adquiridas pelo método de simples emulsão/dupla emulsão e evaporação do solvente. Além disso apresenta alta eficácia de encapsulamento do fármaco e sua característica de biodegradação permite uma lenta liberação do fármaco por até um mês (34–36). No estudo *in vitro* de Bao *et al.* (2011), foi demonstrado que as microesferas com sinvastatina promoveram a agregação e proliferação celular, o que permite o seu uso como carreador na regeneração do tecido ósseo. Essa conclusão foi confirmada pelos estudos *in vivo* de Naito *et al.* (2014), no qual os autores observaram que este material, incorporado a um arcabouço de osso sintético, aumentou a formação óssea em defeitos criados na calvária de coelho (34,36).

Na prática clínica, existem esforços para proporcionar uma recuperação bem-sucedida das feridas cirúrgicas, a fim de promover um pós-operatório mais favorável ao paciente. Isso também proporciona, no âmbito da Implantodontia, um tratamento reabilitador em um menor espaço de tempo. Um dos fatores fundamentais para atingir estes objetivos é garantir à região da ferida cirúrgica um aporte sanguíneo através de neovascularização, para que nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento cheguem até o local, permitindo também as trocas metabólicas das células do tecido ósseo (4,17).

Existem vários relatos de trabalhos que mostram a eficácia da sinvastatina encapsuladas por microesferas de PLGA, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, na regeneração óssea quando incorporadas a arcabouços de diferentes proporções de copolímeros, porém não foi encontrado o comportamento degradativo nessa proporção de PLGA associado a dosagem do medicamento que será utilizado nesse trabalho (23,26,35).

Partindo do princípio que para que seja realizado a instalação de implante há necessidade de uma área onde exista estrutura óssea vital. O presente estudo visa realizar a síntese, caracterização e avaliação do comportamento degradativo das microesferas de PLGA associadas à sinvastatina para serem utilizadas como um biomaterial em regenerações ósseas.

2 JUSTIFICATIVA

2.1 Relevância Clínica

As propriedades osteoindutoras da sinvastatina associadas as propriedades osteocondutoras do PLGA podem otimizar a regeneração do tecido ósseo. Este estudo apresentará a síntese, a caracterização, e a degradação *in vitro* da sinvastatina encapsulada por microesferas de PLGA. Na apresentação favorável dos resultados, comparada e compatível com a literatura, seguirá para estudos *in vivo*, seguidos de ensaios clínicos. A visão fornecida no presente estudo será útil, para a aplicabilidade em reconstruções óssea onde defeitos de tecido ósseo dificultam ou impedem tratamentos reabilitadores, assim como para a regeneração óssea de defeitos recorrentes de doenças periodontais e peri-implantares. Caso a hipótese nula seja rejeitada, este biomaterial terá potencial para continuação dos estudos *in vivo* e ensaios clínicos.

3 HIPÓTESES

H0: O uso de microesferas de PLGA com sinvastatina encapsulada, desenvolvida nesse estudo, não apresentará resultados satisfatórios no âmbito da síntese, caracterização e degradação *in vitro*.

H1: O uso de microesferas de PLGA com sinvastatina encapsulada, desenvolvida nesse estudo, apresentará resultados satisfatórios no âmbito da síntese, caracterização e degradação *in vitro*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Objetivo deste projeto foi realizar a síntese, a caracterização e a análise da degradação *in vitro* de microesferas PLGA contendo SIM.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Sintetizar as microesferas do copolímero de PLGA e encapsular o fármaco sinvastatina pelo método de simples emulsão seguida da evaporação do solvente, obtendo dois grupos: o grupo PLGA e o grupo PLGA/SIM.

- 2) Caracterizar as microesferas de ambos os grupos quanto à morfologia inicial através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), quanto à espectrometria de infravermelho transformada de Fourier – FTIR e quanto ao diâmetro médio das partículas por difração a laser pelo Mastersizer.
- 3) Quantificar a proporção de degradação das microesferas, através da perda de massa, de ambos os grupos, em meio aquoso no período de 7, 30 e 60 dias. E observar a morfologia da degradação em MEV.
- 4) Quantificar a hidratação, através da absorção de água das microesferas, de ambos os grupos, em meio contendo PBS no período de 7, 30 e 60 dias .
- 5) Avaliar o pH das soluções, de ambos os grupos, em meio aquoso após o período de degradação.

5 METODOLOGIA

5.1 Materiais utilizados

PURASORB PDLG 5002 (DL – lactide/glycolide copolymer) (50L:50G) foi adquirido da PURAC biochem (Gorinchem, Province South Holland, Holland). Sinvastatina ($\geq 98\%$ HPLC) foi obtida da AK Scientific, (Germany). Álcool polivinílico (PVA - $(C_2H_4O)_n$) foi adquirido da Sigma-Aldrich, (Canadá). Tampão salina-fosfato (PBS – 9,88 g/L, ph 7,4) adquirido da Kasvi, (Brasil). Clorofórmio p.a. (99,9% HPLC) obtido da Vetec, (Brasil).

5.2 Síntese das microesferas PLGA contendo sinvastatina

As microesferas de PLGA com SIM foram sintetizadas no Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos - CERMAT/UFSC pelo método de simples emulsão seguida da evaporação do solvente (O/W). Inicialmente, 4,45 g de PLGA foram dissolvidos em 178 mL de clorofórmio $CHCl_3$ numa concentração de 5% m/m, sob agitação constante até sua total dissolução. Em seguida 1,49 mg de SIN foi adicionada à solução para obtenção da relação de 0,03% m/m entre fármaco e polímero (fase interna). A solução obtida foi gotejada lentamente de forma manual utilizando uma pipeta em 1650 mL de água destilada contendo PVA dissolvido a 1% (fase contínua), sob agitação de 800 rpm em agitador magnético em temperatura de 21 °C a 760 mmHg. Para completa evaporação do solvente, a mistura foi mantida sob agitação constante por uma noite. As amostras foram coletadas por decantação, lavadas três vezes com água, secas e armazenadas em temperatura de 21 °C por 24 horas. A síntese das microesferas de PLGA sem SIM ocorreu de maneira similar, no entanto não foi adicionada a primeira solução de SIM.

5.3 Caracterização das microesferas

5.3.1 Avaliação da morfologia

Para avaliação da morfologia, as amostras foram posicionadas em *stubs* com fitas de carbono, recobertas por ouro (Fig. 1), e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM-6390LV, Akishima, Tóquio, Japão), a 10 kV, com aumentos de 500x, 1000x e

2000x no Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos - CERMAT/UFSC.



Figura 1– Preparo prévio à análise em MEV dos *stubs* contendo o material a ser analisado, após o recobrimento com pó de ouro.

5.3.2 *Diâmetro das partículas por difração a laser*

Para determinar o tamanho mínimo, máximo e médio das microesferas, 10 mg de partículas de cada grupo foram dispersas em água destilada e por difração a laser foram medidas através do Mastersizer (Malvern Mastersizer 3000™ - The Particle Size Analyzer, Ltd., UK) do Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia da UFSC. Para análise do tamanho das partículas foi utilizado o equipamento Mastersizer (Malven) que utiliza a técnica de espalhamento de luz laser de baixo ângulo (LALLS – *Low Angle Laser Light Scattering*), conhecida por espelhamento de luz. A mensuração é realizada através da medição dos ângulos de difração do raio laser, que estarão relacionados ao tamanho das partículas (ISSO13320, 1999). A Figura 2 representa de maneira ilustrativa como ocorre a mensuração das partículas (37–40).

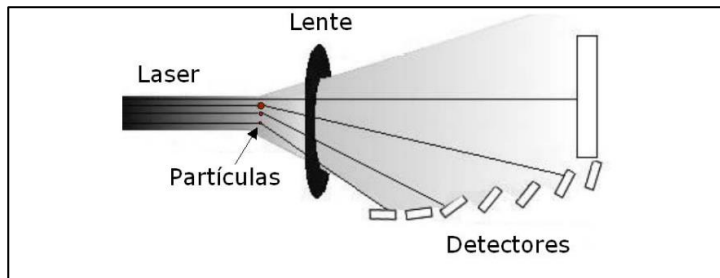


Figura 2 –Ilustração do processo de mensuração das partículas por difração a laser. (Adaptado de França 2018?)

5.3.3 Avaliação química

Para avaliar qualitativamente a característica estrutural das microesferas poliméricas, no que se refere à detecção de grupos funcionais e das ligações presentes nas amostras, foi realizado espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Cary 600 Series FTIR Spectrometer, Agilent Technologies, USA).

5.4 Degradação das microesferas

O ensaio de degradação *in vitro* das microesferas de ambos os grupos foi realizado em triplicata, observando os parâmetros de absorção de água, perda de massa e pH. Em cada micro tubo foi incubado 0,1 mg de microesferas de PLGA ou PLGA/SIM em tampão fofato-salino/PBS (phosphate buffered saline) a 37 °C e pH 7,4 sob agitação periódica diária (12/12hs), durante os períodos de 7, 30 e 60 dias.

As amostras foram primeiramente pesadas (0,100mg de MPs), foi determinada assim a sua massa inicial (m_0). Posteriormente, foram imersas em 2 mL de PBS a 37 °C. O valor de pH da solução de PBS foi verificado ao final de cada período de experimental, sendo o sobrenadante armazenado para verificação do pH (OMEGA™, Campinas, São Paulo, Brasil) As amostras de cada grupo foram retiradas no período proposto e centrifugadas. As microesferas foram lavadas delicadamente com água destilada e centrifugadas novamente. Ao final, as amostras foram pesadas determinando-se a massa úmida (mt_w), congeladas a -80 °C por 24 horas, liofilizadas por 48 horas e pesadas novamente, determinando assim a massa seca (mt).

Em cada tempo, após a liofilização, as microesferas de PLGA e de PLGA/SIM foram caracterizadas morfologicamente por MEV, conforme previamente discutido (item 5.3.1).

A absorção de água (%) e a perda de massa (%) para cada amostra foi então determinada pela equação:

$$\text{Absorção de água (\%)} = \frac{mt_w - mt}{mt} * 100$$

A perda de massa das amostras foi determinado por

$$\text{Ganho de massa (\%)} = \frac{mt - m_0}{m_0} * 100$$

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização das microesferas

6.1 Morfologia das partículas por MEV

Após o processo de síntese das microesferas de PLGA/SIM e PLGA, foram obtidas imagens por MEV (Fig. 3 e Fig. 4 respectivamente), onde é possível observar semelhança entre as microesferas de ambas as amostras, apresentando homogeneidade das superfícies, de formato esférico e liso, sem a presença de porosidades e fissuras na superfície. No tamanho de menor aumento (500x) é possível observar a formação de alguns aglomerados, que não chegam a apresentar coalescência das micropartículas, esse aspecto pode ser visto em ambas as amostras. Também foi observada a heterogeneidade quanto ao tamanho das partículas (polidispersas).

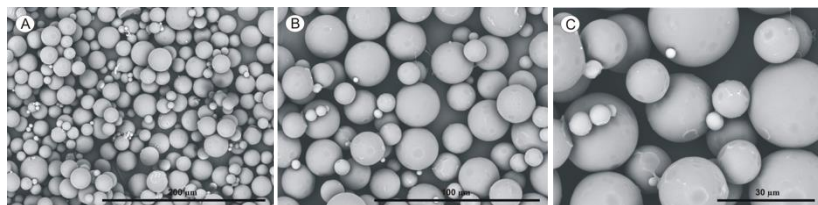


Figura 3 – Imagem das microesferas de PLGA/SIM, obtidas após a síntese, por microscopia eletrônica de varredura. Imagem A com ampliação de 500x. B com ampliação de 1000x. Imagem C com ampliação de 2000x.

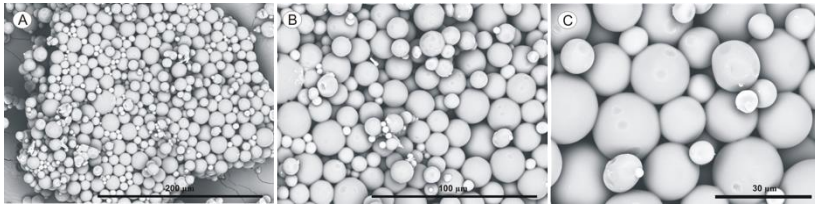


Figura 4 – Imagem das microesferas de PLGA, obtidas após a síntese, por microscopia eletrônica de varredura. Imagem A ampliação de 500x (observar a presença de um aglomerados de partículas). Imagem B com de ampliação de 1000x. Imagem C com de ampliação de 2000x.

6.1.1 *Tamanho das partículas por difração a laser*

Nesta análise, $d(0,1)$ representa o tamanho de partículas abaixo do qual se encontram 10% da amostra, $d(0,5)$ representa o tamanho de partículas abaixo do qual se encontram 50% da amostra. Considerado o tamanho médio das partículas da amostra, $d(0,9)$ representa o tamanho de partículas abaixo do qual se encontram 90% da amostra (38,40).

Sendo assim, é possível observar que as microesferas de PLGA se encontraram dentro de uma faixa de tamanho micrométrico, variando entre 8,7 μm a 158,4 μm . Destes, 10% encontram-se com tamanho abaixo de 19,7 μm e 90% abaixo de 82 μm , com uma média de 38,6 μm para esta amostra (Fig. 5).

Na análise das microesferas de PLGA-SIM foi encontrado uma variação de 7,58 μm a 2187 μm . Observa-se que 10% encontra-se com tamanho abaixo de 68,97 μm e 90% abaixo de 1305 μm , com um tamanho médio de 542 μm (Fig. 6).

Figura 5 – Gráfico representativo da análise do tamanho das microesferas da amostra PLGA.

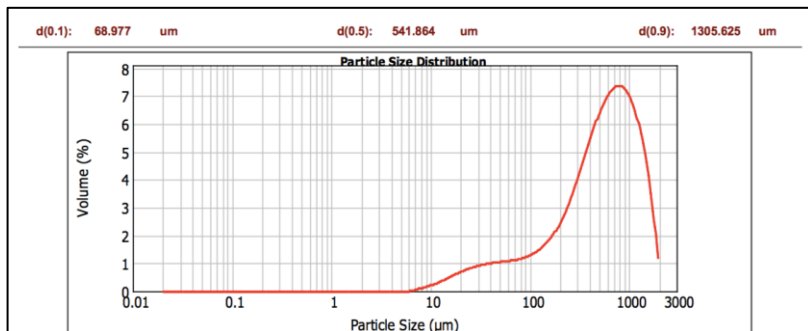


Figura 6 – Gráfico representativo da análise do tamanho das microesferas da amostra PLGA/SIM.

6.1.2 *Espectrometria de Infravermelho Transformada de Fourier – FTIR*

Os espectros de transmitância de FTIR do PLGA mostraram picos das vibrações de alongamento do C-H (2849 cm^{-1}), estiramento das ligações de C=O (1751 cm^{-1}), e estiramentos de ligações C-O (1134 cm^{-1}) que caracterizam o copolímero. O espectro FTIR da SIM mostrou estiramentos das ligações O-H (3548 cm^{-1}), estiramentos de ligações C-H (2940 cm^{-1}), estiramentos de ligações do grupo carbonila C=O (1668 cm^{-1}), e picos variando entre $1300\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ caracterizando ligações C-O e C-C. O espectro das microesferas onde a sinvastatina foi encapsulada apresentou espectros de transmitância semelhantes ao copolímero isoladamente (Mais detalhes podem ser observados na Figura 7). Não há sinais de novas ligações químicas na amostra PLGA/SIM mas as ligações características de cada composto se mantiveram. A Tabela 1 apresenta as bandas de absorção de onda.

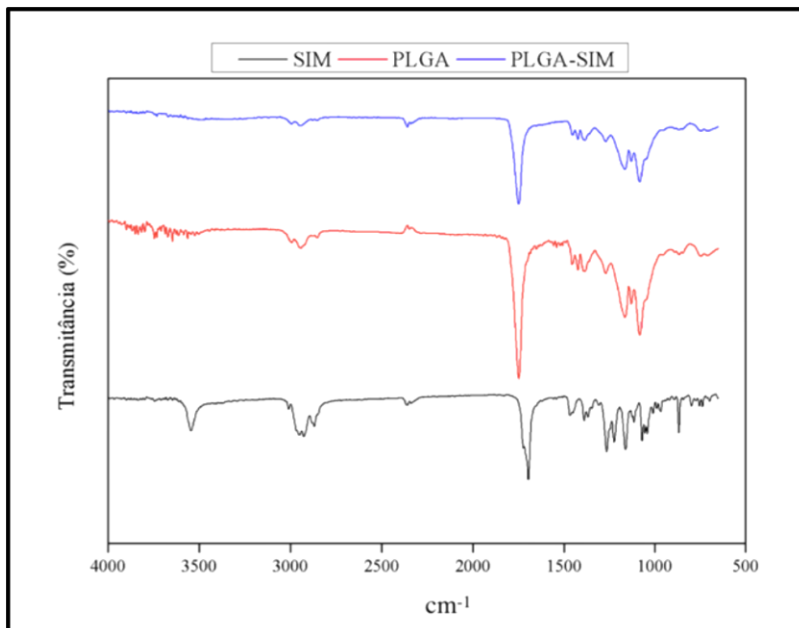


Figura 7 – Espectros de transmitância de FTIR das microesferas de PLGA/SIM, PLGA e SIM.

Tabela 1. Bandas de absorção por infravermelho .

Região de absorção (cm⁻¹)	Tipo de ligação
1300-800	C – O
1300-800	C – C
1250-1000	C – N
1900-1500	C = C
1850-1600	C = O
2150-2100	C ≡ C
2250-2080	C – D
3000-2850	C – H
3800-2700	O – H

Adaptado de SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006 (41).

6.1.3 *Degradação das partículas*

Os parâmetros observados durante a degradação das microesferas de PLGA e PLGA/SIM foram: absorção de água, perda de massa, e pH de ambos os grupos, nos períodos de 7, 30 e 60 dias. Na figura 8 observa-se os dados comparativos, de perda de massa, entre os grupos das amostras imersas em PBS. Observa-se que na primeira semana não houve degradação do polímero de ambos os grupos. Apesar de pequeno, houve um ganho de massa em ambos os grupos. Já no período de 30 dias, foi observado uma degradação representando 24,77% para o grupo PLGA e 26,63% para o grupo PLGA/SIM. Já para o período de 60 dias foi observada uma perda de massa mais intensa de 87,34% da massa do grupo PLGA e 88,16% da massa do grupo PLGA/SIM. A Figura 9 (A-C) mostra o aspecto morfológico das microesferas de PLGA após e período experimental da degradação após 7 e a Figura 10 (A-D) mostra o aspecto da degradação das amostras de PLGA após 60 dias. As Figuras 11 (A-D) e 12 (A-D) mostram o aspecto morfológico da degradação ocorrida no grupo PLGA/SIM nos períodos de 7 e 60 dias respectivamente. Não foi possível fazer o MEV do período de 30 dias, pois a amostra encontrava-se com uma consistência fluida semelhante a um gel.

Com exceção do primeiro período de observação, houve uma perda de massa progressiva nos grupos ao longo do tempo, sendo que, o grupo PLGA/SIM mostrou uma perda de massa ligeiramente maior quando comparado com o grupo PLGA, nos períodos de 30 e 60 dia. A Tabela 2 apresenta os dados o percentuais da perda de massa em cada período de observação.

Na avaliação da absorção de água, observou-se uma hidratação inicial de 68,52% para o grupo PLGA e 97,06% para o grupo PLGA/SIM. Em contraste, no período de 30 dias, a hidratação reduziu 44,17% e 43,84% para os grupos PLGA e PLGA/SIM, respectivamente. A maior hidratação foi observada no período de 60 dias, sendo de 132,79% para o grupo PLGA e 156,91% para o grupo PLGA-SIM, respectivamente (Figura 13 e Tabela 3).

Quanto a variação de pH das amostras, no período de 7 dias a média foi de 6,13 para as microesferas de PLGA e 5,82 para as microesferas de PLGA/SIM. No período de 30 dias, pode-se observar valores de 3,24 e 3,05 para as microesferas de PLGA e PLGA/SIM, respectivamente. Para o período de 60, foi observado 2,54 no grupo PLGA e 2,53 no grupo PLGA/SIM (Figura 14 e Tabela 4).

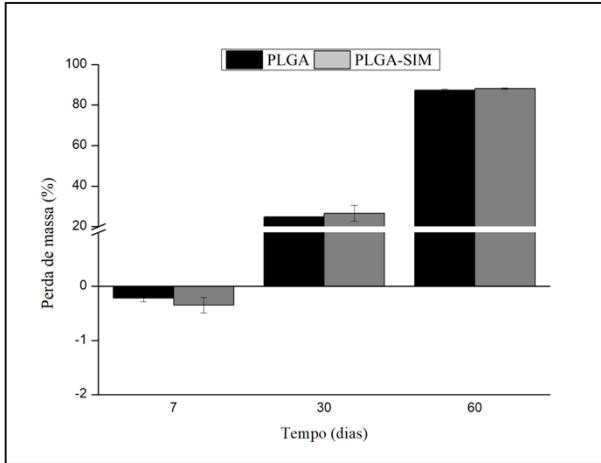


Figura 8 – Comparação dos valores da perda de massa entre os grupos nos períodos de 7, 30 e 60 dias de incubação em PBS (pH 7,4 a 37 °C). Os valores representam a média \pm erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

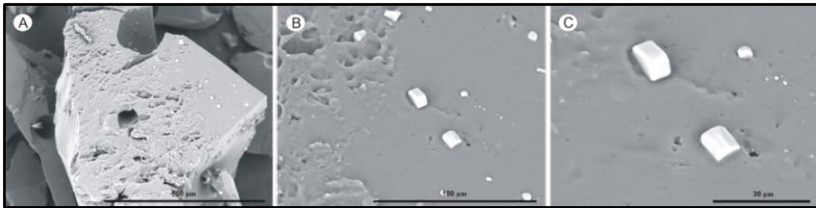


Figura 9 – Amostras de PLGA após 7 dias de ensaio de degradação. Nos aumentos de A-200x, B-1000x, C-2000x.

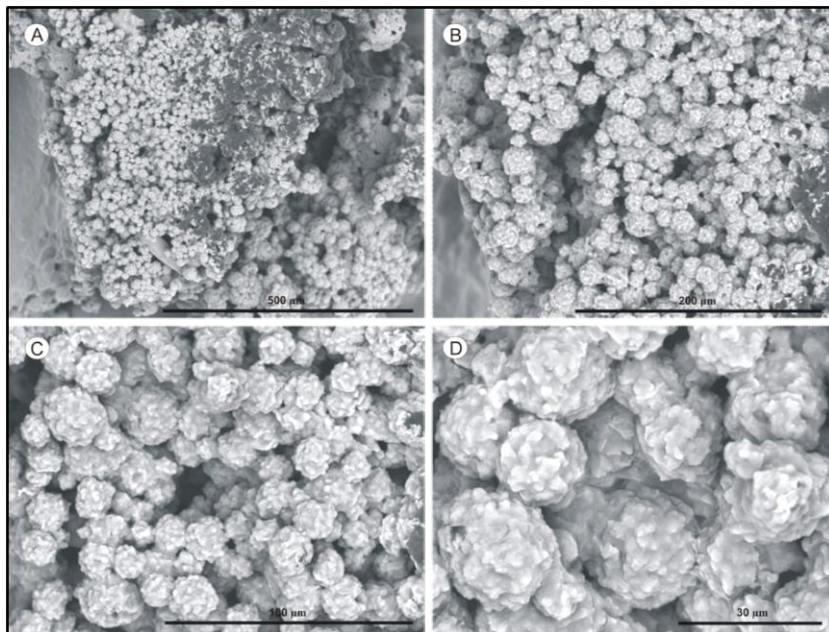


Figura 10 – Amostras de PLGA após 60 dias em ensaio de degradação. Nos aumentos de A-200x, B-500x, C-1000x, D-2000x.

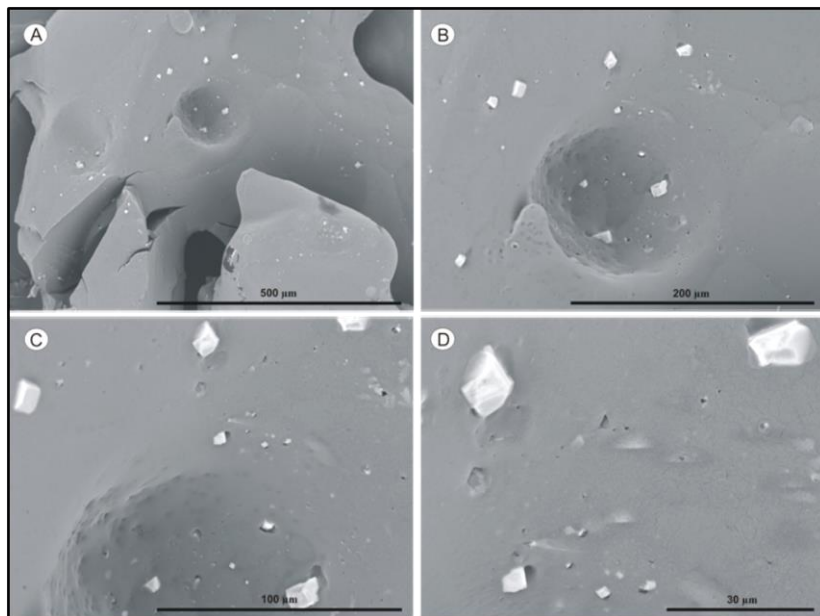


Figura 11 – Amostras de PLGA/SIM após 7 dias de ensaio de degradação. Nos aumentos de A-200x, B-500x, C-1000x, D-2000x.

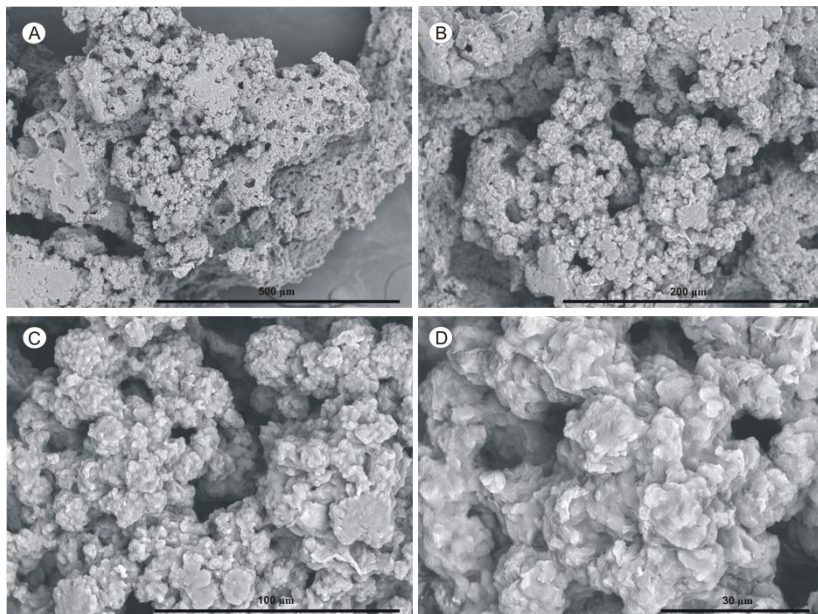


Figura 12 – Amostras de PLGA/SIM após 60 dias em ensaio de degradação. Nos aumentos de A-200x, B-500x, C-1000x, D-2000x.

Tabela 2 – Os valores representam a médias da perda de massa das amostras e o desvio padrão dos grupos PLGA e PLGA/SIM dos grupo 7, 30 e 60 dias

Amostra	Dias	\bar{x}	S
PLGA	7	-0,22	0,06
PLGA/SIM	7	-0,34	0,14
PLGA	30	24,77	0,28
PLGA/SIM	30	26,63	3,87
PLGA	60	87,34	0,14
PLGA/SIM	60	88,16	0,19

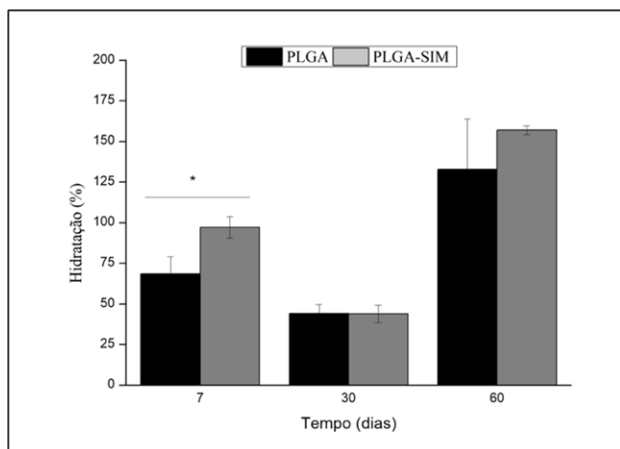


Figura 13 – Absorção de água das microesferas de PLGA e PLGA-SIM após 7, 30 e 60 dias de incubação em PBS (pH 7,4 e 37 °C). Os valores representam a média \pm erro padrão da média comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

Tabela 3 – Os valores representam a médias percentuais de absorção de água das amostras de cada grupo PLGA e PLGA/SIM nos períodos de 7, 30 e 60 dias.

Amostra	Dias	\bar{x}	S
PLGA	7	68,52	10,62
PLGA/SIM	7	97,06	6,55
PLGA	30	44,17	5,65
PLGA/SIM	30	43,84	5,43
PLGA	60	132,79	31,08
PLGA/SIM	60	156,91	2,72

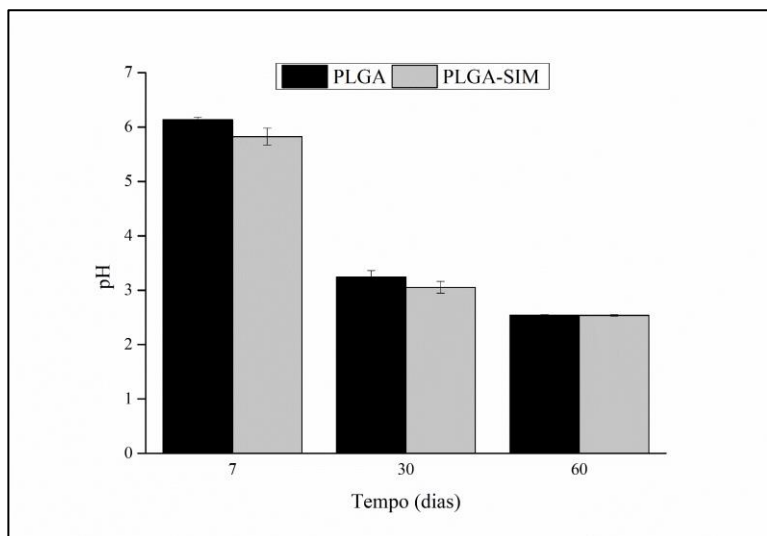


Figura 14 – pH da solução PBS após a degradação das microesferas de PLGA e PLGA/SIM após 7, 30 e 60 dias de incubação em PBS (pH 7,4 a 37 °C). Os valores representam a média \pm erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

Tabela 4 - Os valores representam a médias do pH das amostras e o desvio padrão dos grupos PLGA e PLGA/SIM dos grupo 7, 30 e 60 dias

pH								
Período de 7 dias			Período de 30 dias			Período de 60 dias		
	\bar{X}	S		\bar{X}	S		\bar{X}	
PLGA	6,13	0,01	PLGA	3,24	0,04	PLGA	2,54	0,003
PLGA/SIM	5,82	0,05	PLGA/SIM	3,05	0,04	PLGA/SIM	2,53	0,003

7 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi sintetizar microesferas de um biomaterial polimérico associado a um fármaco osteoindutor, que possa ser utilizado em regenerações ósseas, seja em defeitos alveolares, periodontais, peri-implantares, ou em reconstruções ósseas.

A microencapsulação de um fármaco é uma técnica que visa encapsular substâncias sólidas ou líquidas no interior de matrizes poliméricas, com objetivo de controlar ou prolongar a liberação de um fármaco, diminuir flutuações plasmáticas, eliminar ou diminuir possíveis efeitos colaterais, proteger substâncias que degradam de maneira acelerada por ações enzimáticas, assim como, proteger os fármacos que degradam facilmente pelos fatores externos como na presença umidade, luz e oxigênio (42,43).

Neste estudo foi utilizado o polímero de PLGA (Ácido polilático-co-glicólico) como sistema de entrega (carreador) e liberação do fármaco sinvastatina. A biocompatibilidade e a biodegradabilidade fazem do PLGA um excelente carreador de fármacos. A liberação do fármaco pode ser controlada através da proporção molecular dos monômeros utilizados para sintetizar o polímero, para se evitar o chamado *brush*, efeito no qual o fármaco é liberado de maneira abrupta, explosiva, excedendo os limites de toxicidade (14,15).

A síntese das microesferas de PLGA, como sistema carreador do fármaco sinvastatina, foi obtida neste trabalho a partir do método de emulsificação e evaporação do solvente, no qual inicialmente o polímero e o fármaco foram solubilizados em solvente orgânico (fase interna) e posteriormente é obtida uma emulsão em solução aquosa contendo um surfactante (fase externa). A emulsão obtida por essa técnica é chamada óleo em água (O/A – O/W), sendo posteriormente evaporado o solvente orgânico da solução em temperatura ambiente sob agitação, o que leva a formação de microesferas/micropartículas que podem ser observadas nas Figuras 2A-C e 3A-C. Essa técnica é utilizada quando o polímero e o fármaco são insolúveis em água (44).

A sinvastatina é bastante utilizada para o tratamento das dislipidemias, atuando competitivamente inibindo a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, bloqueando desta maneira, a via do mevalonato. Através desse bloqueio ocorre, conseqüentemente, uma diminuição na produção de colesterol, sendo uma aliada no combate das doenças cardíacas (14).

Atuando localmente, a sinvastatina tem desempenhado um papel importante na regeneração óssea, com suas propriedades regulatórias da inflamação como diminuição da MMP-9, aumento de IL-10 assim como aumento da expressão de mRNA de Runx2, e nos níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fosfatase alcalina (ALP), e na expressão gênica das BMP-2. Devido a isso, tem despertado interesse de estudos (25,45).

A morfologia das microesferas observadas neste estudo, de ambos os grupos, apresentaram-se lisas, arredondadas, com ausência de porosidades e fissuras na superfície, em concordância com trabalhos na literatura, o que nos mostra que é possível obter sucesso com essa técnica para a sua síntese (34,46).

Contudo, a morfologia das microesferas pode ser afetada por alguns fatores como agitação da solução durante o preparo e constante dielétrica do solvente utilizado. Solventes com constante dielétrica mais baixa tendem a formar partículas maiores, que estará relacionada a capacidade de solubilizar o PLGA e a SIM. No nosso estudo foi utilizado o diclorometano, que apresenta uma constante dielétrica mais baixa quando comparada com outros solventes, como acetona ou acetonitrilo (42,47), o que pode explicar os tamanhos maiores nas amostras de PLGA/SIM, onde o tamanho médio das partículas foi de 542 μm . No trabalho de Zhang e col. 2015, foi utilizado a mesma proporção polimérica e semelhante técnica de preparo, as microesferas tiveram tamanho médio de 221,89 para as microesferas de PLGA e 217,95 para as microesferas de PLGA/SIM (23).

Enquanto Naito *et al.* (2014), utilizando o mesmo solvente, obtiveram microesferas com média de tamanho de 21 μm , mas observa-se que a rotação utilizada durante a síntese foi de quase 12 vezes maior a utilizada em nosso estudo (36), mostrando que existem vários fatores envolvidos que influenciaram no tamanho das partículas.

A concentração do PLGA no solvente pode explicar aglomeração das partículas. Avaliando a morfologia das microesferas em diferentes concentrações de diluição, Nath *et al.* 2013 perceberam que quanto menor a concentração da relação soluto/solvente, maior a dispersão das partículas, uma vez que não foi observado a presença de coalescência entre as microesferas (47).

Dentre as formas de entrega e liberação da sinvastatina, para aplicação local, encontra-se aplicação diluída em gel, em solução salina gel, encapsuladas por microesferas e até mesmo por nanoesferas, em concordância esses estudos mostram efeitos positivos no processo regenerativo do tecido ósseo, independente do carreador. No entanto, o

que se pode apresentar como vantagem das microesferas em relação aos demais sistemas, convém identificar que é possível associar o PLGA como um arcabouço que com o passar do tempo e seu processo de hidrólise liberara o fármaco de maneira controlada e contínua, proporcionando um estímulo a longo prazo e constante de indução (29,36,48,47,49).

O maior desafio é encontrar um equilíbrio em dose e liberação ideais, por isso o encapsulamento de sinvastatina por PLGA pode ser muito vantajoso, visto que é possível controlar a degradação do polímero manipulando a proporção de seus monômeros. Formulações que contenham predomínio de monômeros de ácido lático necessitam de um maior tempo para degradação, comportamento diferente ocorre quando essa proporção é de 50:50 dos monômeros, proporcionando assim uma liberação mais rápida (15).

A estrutura química do PLGA é mais suscetível à reação de hidrólise, já que em sua cadeia polimérica existe o mero (unidade que se repete dentro do polímero) proveniente do ácido glicólico, que possui um impedimento menor ao ataque das moléculas de H₂O. Durante a degradação do polímero, as ligações ésteres sofrem hidrólise originando cadeias menores (oligômeros até monômeros). Fatores como permeabilidade, solubilidade, composição química, mecanismo de hidrólise (não catalítico, autocatalítico, enzimático), morfologia (cristalina ou amorfa) tamanho, formato, porosidade, temperatura de transição vítrea (vítrea, emborrachado), peso molecular, fatores físicos (pH e força iônica) podem influenciar na degradação do polímero e consequentemente na liberação do fármaco (42).

Nesse estudo, foi utilizado a proporção 50:50 e nos primeiros 7 dias de ensaio não foi observado perda de massa. No entanto, no período de 30 dias essa perda foi mais de 20% do peso do polímero inicial, para ambos os grupos. Considerável perda de massa foi observada no período de 60 dias, atingindo quase 90% de perda da massa. O que é favorável em regeneração, visto que o objetivo final da regeneração estará calcada na reconstituição anatômica, morfológica e funcional do tecido ósseo perdido, e que ocorra a substituição do biomaterial por tecido ósseo vital para a instalação de implantes osseointegráveis. Permitindo assim uma osseointegração com elevados níveis de *bone implant contact* (BIC) e *bone area fraction occupation* (BAFO), dentro das limitações de cada técnica e de cada implante (50–52).

À medida que houve a degradação, o pH do meio tornou-se mais ácido, o que pode ser explicado pela característica ácida dos monômeros do polímero dispersos no meio. Estudo realizado por Zolnik *et al.*

(2007), interessados em investigar o efeito do pH ácido na degradação das MPs e liberação do fármaco, avaliou o comportamento de MPs de PLGA em meio neutro (7,4) e em meio com ácido (2,4). Perceberam que ao longo do tempo ocorreu uma degradação com características morfológicas erosivas até a formação de uma massa amorfa, e em meio ácido foi observado maior perda massa do polímero. O estudo relata que o baixo pH pode influenciar na quebra das ligações ésteres favorecendo a lise do polímero, o que corrobora os resultados desse estudo no qual é possível observar comportamento inversamente proporcional quando compara-se pH da solução e degradação das amostras (53).

No entanto, um pH elevado pode afetar o crescimento e a diferenciação celular. Terukina *et al.* (2016) avaliaram o comportamento celular de osteoblastos (MC3T3- E1) *in vitro*, em contato com microesferas (25 μ m) e nanoesferas (318 nm) de PLGA (75:25) carregadas com sinvastatina. Os autores observaram uma proliferação celular diminuída no grupo das nanoesferas, o que é explicado pela rápida degradação das nanoesferas expondo as células a uma maior quantidade dos seus metabólitos (ácido láctico e ácido glicólico).

8 CONCLUSÕES

Foi possível sintetizar as microesferas com sucesso pelo método proposto, atingindo uma morfologia adequada. Apesar de o PLGA ser um polímero hidrofóbico, apresentou uma hidratação intensa nos períodos inicial e finais de observação. A degradação bastante avançada nos dois últimos períodos de observação pode explicar o baixo pH do meio, devido a dispersão dos monômeros ácidos do polímero no meio. No que se refere aos objetivos deste estudo a hipótese nula foi rejeitada. Sendo assim, o uso de microesferas de PLGA com sinvastatina encapsulada, desenvolvida nesse estudo, apresentou resultados satisfatórios no âmbito da síntese, caracterização e degradação *in vitro*

REFERÊNCIAS

1. ADELL RAGNAR, BO ERIKSSON UL, PER-LNGVAR BRÅNEMARK TJ. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1990;v.5(n.4):p.347–59.
2. LAMBRECHT, J. T; FILIPPI, A; KÜNZEL, A. R; SCHIEL HJ. Long- term evaluation of submerged and nonsubmerged ITI solid-screw titanium implants: a 10-year life table analysis of 468 implants. **Int J Oral Maxillofac Implant**. 2003;v.18,(n.6):p.826–34.
3. ARAÚJO MG, LINDHE J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**. 2005;32(2):212–8.
4. CHIAPASCO M. Bone augmentation procedures in Implant Dentistry Bone Augmentation Procedures in. **Int J Oral Maxillofac Implants**.2009;(October):1–4.
5. ARAÚJO MG, DA SILVA JCC, DE MENDONÇA AF, LINDHE J. Ridge alterations following grafting of fresh extraction sockets in man: A randomized clinical trial. **Clin Oral Implants Res**. 2015;26(4):407–12.
6. VIGNOLETTI F, MATESANZ P, RODRIGO D, FIGUERO E, MARTIN C, SANZ M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. **Clin Oral Implants Res**. 2012;23(SUPPL. 5):22–38.
7. CARDAROPOLI D, L T, A R, L G, G C, CARDAROPOLI D, et al. Socket preservation using bovine bone mineral and collagen membrane: a randomized controlled clinical trial with histologic analysis. **Int J Periodontics Restorative Dent**. 2012;32(4):421–30.
8. DAHLIN C, LEKHOLM U, LINDE A. Membrane-induced bone augmentation at titanium implants. A report on ten fixtures followed from 1 to 3 years after loading. **Int J Periodontics Restorative Dent**. 1991;11(4):273–81.
9. DAHLIN C, LINDE A, GOTTLLOW J, NYMANN S. Healing of

Bone Defects by Guided Tissue Regeneration. **Plastic and reconstructive surgery**. 1988: 672-676.

10. NYMAN S, LANG NP, BUSER D, BRAGGER U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1990;5(1):9–14.
11. BUSER D, MERICSKE-STERN R, BERNARD JP et al. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants **Clin Oral Impl Res**. 1997;8:161-172.
12. LAPLANCHE JL, DELASNERIE-LAUPRÊTRE N, BRANDEL JP, CHATELAIN J, BEAUDRY P, ALPÉROVITCH A LJ. Molecular genetics of prion diseases in France. French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies. **Neurology**. 1994;44(12):2347–51.
13. LUTOLF MP, HUBBELL JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. **Nat Biotechnol**. 2005;23(1):47–55.
14. DANHIER F, ANSORENA E, SILVA JM, COCO R, LE BRETON A, PRÉAT V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **J Control Release**. 2012;161(2):505–22.
15. TAI I-C, FU Y-C, WANG C-K, CHANG J-K, HO M-L. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/HAp microspheres enhances bone repair. **Int J Nanomedicine**. 2013;8:3895–904.
16. SAMADI N, ABBADESSA A, DI STEFANO A, VAN NOSTRUM CF, VERMONDEN T, RAHIMIAN S, et al. The effect of lauryl capping group on protein release and degradation of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) particles. **J Control Release**. 2013;172(2):436–43.
17. CHAPPARD D. Modelage et remodelage au cours de l'ostéointégration. **Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale**. 2013;114(3):159–65.
18. URIST MR. Bone: formation by autoinduction. **Science**. 1965;150(3698):893–9.

19. GRGUREVIC L, PECINA M, VUKICEVIC S, MARSHALL K. Urist and the discovery of bone morphogenetic proteins. **Int Orthop**. 2017;41(5):1065–9.
20. DRAGOO JL, CHOI JY, LIEBERMAN JR, HUANG J, ZUK PA, ZHANG J, et al. Bone induction byBMP-2 transduced stem cells derived from human fat. **J Orthop Res**. 2003;21(4):622–9.
21. PIGHIN JA1, ZHENG H, BALAKSHIN LJ, GOODMAN IP, WESTERN TL, JETTER R, KUNST L SA. American Association for the Advancement of Science 2013. 2013;306(800):702–4.
22. MUNDY G, GARRETT R, HARRIS S, CHAN J, CHEN D, ROSSINI G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**. 1999;286(5446):1946–9.
23. ZHANG HX, XIAO GY, WANG X, DONG ZG, MA ZY, LI L, et al. Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. **J Biomed Mater Res - Part A**. 2015;103(10):3250–8.
24. SUGIYAMA M, KODAMA T, KONISHI K, ABE K, ASAMI S, OIKAWA S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 2000;271(3):688–92.
25. OHNAKA K, SHIMODA S, NAWATA H, SHIMOKAWA H, KAIBUCHI K, IWAMOTO Y, et al. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun**. 2001;287(2):337–42.
26. NATH SD, LINH NT, SADIASA A, LEE BT. Encapsulation of simvastatin in PLGA microspheres loaded into hydrogel loaded BCP porous spongy scaffold as a controlled drug delivery system for bonetissue regeneration. **J Biomater Appl**. 2013;28(8):1151–63.
27. MACIEL-OLIVEIRA N, BRADASCHIA-CORREA V, ARANA-CHAVEZ VE. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*

Oral Radiol Endodontology. 2011;112(2):170–9.

28. STAAL A, FRITH JC, FRENCH MH, SWARTZ J, GÜNGÖR T, HARRITY TW, et al. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. **J Bone Miner Res.** 2003;18(1):88–96.
29. MOON HJ, KIM SE, YUN YP, HWANG YS, BANG JB, PARK JH, et al. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species. **Exp Mol Med.** 2011;43(11):605–12.
30. KIM SE, THANH THUY TT, LEE JH, RO JY, BAE YA, KONG Y, et al. Simvastatin inhibits induction of matrix metalloproteinase-9 in rat alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract. **Exp Mol Med.** 2009;41(4):277–87.
31. ENCARNACÃO I. Análise Do Uso De Simvastatina E Arcabouços De Plga+Ha no Reparo Ósseo De Defeitos Criados Na Calota Craniana De Ratos. 2012;
32. KHEIRALLAH M, ALMESHALY H. Simvastatin, dosage and delivery system for supporting bone regeneration, an update review. **J Oral Maxillofac Surgery, Med Pathol.** 2016;28(3):205–9.
33. HUANG X, HUANG Z, LI W. Highly efficient release of simvastatin from simvastatin-loaded calcium sulphate scaffolds enhances segmental bone regeneration in rabbits. **Mol Med Rep.** 2014;9(6):2152–8.
34. BAO TQ, HIEP NT, KIM YH, YANG HM, LEE BT. Fabrication and characterization of porous poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres for use as a drug delivery system. **J Mater Sci.** 2011;46(8):2510–7.
35. GENTILE P, NANDAGIRI VK, DALY J, CHIONO V, MATTU C, TONDA-TURO C, et al. Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan-gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. **Mater Sci Eng C.** 2016;59:249–57.
36. NAITO Y, TERUKINA T, GALLI S, KOZAI Y, VANDEWEGHE

- S, TAGAMI T, et al. The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect in the rabbit calvaria. **Int J Pharm.** 2014;461(1-2):157-62.
37. FRANÇA SCA, COUTO HJB. Análise Microgranulométrica – **Malvern E Sedigraph.** 2007;122.
38. MALVERN INSTRUMENTS, Getting Started, Manual MAN 0106, Issue 1.0, 1996a.
39. NO ISO13320, PARTICLE SIZE ANALYSIS – Laser Diffraction Methods Part 1: General Principles, ISO Standards Authority, 1999.Title.
40. MALVERN INSTRUMENTS, Sample Dispersion & Refractive Index Guide, Manual MAN 0079, Version 3.0, 1996b.
41. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE DJ. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed **Rio Janeiro Grup Gen - LTC**, 2006.
42. BAZZO GC, LEMOS-SENN A, GONÇALVES MC, PIRES ATN. Effect of Preparation Conditions on Morphology , Drug Content and Release Profiles of. **J Braz Chem Soc.** 2008;19(5):914-21.
43. GOLDSTEIN JL, BROWN MS. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature.** 1990;343(6257):425-30.
44. HAUSBERGER, G, A.; DELUCA P. Characterization of biodegradable poly (D , L-lactide- co-glycolide) polymers and microspheres. **Journal of Pharmocentral & Biorndrical Anulysis.** 1995;13(6):747-60.
45. PRADEEP AR, GARG V, KANORIYA D, SINGHAL S. Platelet-Rich Fibrin With 1.2% Rosuvastatin for Treatment of Intrabony Defects in Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial. **J Periodontol.** 2016;87(12):1468-73.
46. BING GU, XUANHAO SUN, FOTIOS PAPADIMITRAKOPOULOS DJ. Seeing is believing, PLGA microsphere degradation revealed in J Control Release J Control

Release. 2015;2(2):147–85.

47. NATH , DEB S, SON S, SADIASA A, KI Y, TAEK B. Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. **Int J Pharm.** 2013;443(1–2):87–94.
48. TERUKINA T, NAITO Y, TAGAMI T, MORIKAWA Y, HENMI Y, PRANANINGRUM W, et al. The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration in vitro and in vivo: Comparison of simvastatin-loaded PLGA microspheres and nanospheres. **J Drug Deliv Sci Technol.** 2016;33:136–42.
49. MAEDA T, MATSUNUMA A, KAWANE T, HORIUCHI N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2001;280(3):874–7.
50. STOCCHERO M, TOIA M, JINNO Y, CECCHINATO F, BECKTOR JP, NAITO Y, et al. Influence of different drilling preparation on cortical bone: A biomechanical, histological, and micro-CT study on sheep. **Clin Oral Implants Res.** 2018;(March):1–9.
51. GIL L, SARENDRANATH A, NEIVA R, MARÃO H, TOVAR N, BONFANTE E, et al. Bone Healing Around Dental Implants: Simplified vs Conventional Drilling Protocols at Speed of 400 rpm. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2017;32(2):329–36.
52. HENKEL J, WOODRUFF MA, EPARI DR, STECK R, GLATT V, DICKINSON IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. **Bone Res** . 2013;1(3):216–448.
53. ZOLNIK BS, BURGESS DJ. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. **J Control Release.** 2007;122(3):338–44.
54. Bing Gu, Xuanhao Sun, Fotios Papadimitrakopoulos and DJB. Seeing is believing, PLGA microsphere degradation revealed in PLGA microsphere/PVA hydrogel compositesite. **J Control**

Release. 2016;April 28;