

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA
BUCOMAXILOFACIAL

FERNANDO ANTONINI

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO rhGH INCORPORADO A MATRIZES DE
PLGA: ANÁLISE *IN VITRO* COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES
TEMPERATURAS E DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO DAS
MATRIZES**

Porto Alegre
2015

FERNANDO ANTONINI

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO rhGH INCORPORADO A MATRIZES DE
PLGA: ANÁLISE *IN VITRO* COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES
TEMPERATURAS E DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO DAS
MATRIZES**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

Porto Alegre
2015

À Deus, por me proporcionar saúde para
completar os sonhos da minha vida.

Aos meus pais Vera Marli Peters
Antonini e Luiz Antônio Antonini, por me
proporcionarem amor e carinho, e por
me guiarem na vida sem medirem
esforços para me fazer um filho feliz.

Aos meus irmãos Luciano e Rafaela,
pessoas muito importantes na minha
vida, pela compreensão, suporte e
amizade durante os momentos bons e
ruins. Apesar da distância sei que
sempre estiveram ao meu lado nesta
jornada.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por ter me acolhido e possibilitado a realização deste programa de pós-graduação.

À Faculdade de Odontologia da PUCRS, por ter acreditado nos meus esforços para o desenvolvimento deste projeto científico.

À Faculdade de Química da PUCRS, pela disponibilidade na utilização de seus laboratórios, em especial o Laboratório de Resinas e Organometálicos (LOR/PUCRS).

Ao meu orientador Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli, pela amizade, pela transmissão de conhecimentos acadêmicos e técnicos, e pela orientação e contribuição na construção deste trabalho.

Aos todos os professores da Faculdade de Odontologia da PUCRS, que de forma direta ou indireta contribuem para o desenvolvimento deste curso de Pós-Graduação.

À Prof^a Dra. Rosane Angélica Ligabue, pelo apoio em todas as etapas do desenvolvimento desta pesquisa.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS, por toda atenção dispensada aos alunos do programa.

À toda equipe do LOR/PUCRS, em especial a doutoranda Fabiana, por toda atenção e auxílio dispensado a mim e ao meu colega Henrique durante a fase experimental deste trabalho e, assim, ter permitido a conclusão deste trabalho.

Ao meu colega de Pós-Graduação, amigo e “irmão” Henrique do Couto Oliveira, por toda ajuda e compreensão durante todas as etapas deste projeto. Pessoa de coração imenso e capacidade profissional incontestável. Sua presença foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos outros colegas do curso de Pós-Graduação Alexandre Gerzson, Fernanda Boing, Marcelo Melo e Neimar Scolari, pelo compartilhamento de conhecimento durante estes 2 anos de aprendizado.

Aos amigos e eternos mestres Prof. Dr. Leandro Eduardo Klüppel e Prof. Dr. Nelson Luis Barbosa Rebellato, pelos exemplos de carisma, dedicação, humildade, perseverança, disciplina, responsabilidade e bondade, contribuindo acima de tudo para o meu desenvolvimento pessoal.

A todos os familiares, colegas de profissão e amigos que sempre estiveram presentes durante meu crescimento e desenvolvimento profissional.

*Escolha um trabalho que você ame e
não terás que trabalhar um único dia
em sua vida”*

Confúcio

Resumo

Objetivo: avaliar a estabilidade das formulações de PLGA 50:50 incorporadas com hormônio de crescimento recombinante humano (rhGH) sob diferentes períodos e temperaturas de armazenamento. **Materiais e métodos:** um total 27 matrizes de PLGA + rhGH foram confeccionadas utilizando 7,5g de PLGA e 1,33mg de rhGH. Vinte e quatro das 27 matrizes foram divididas igualmente em 4 grupos (I, II, III e IV), de acordo com o tempo de armazenamento, e em 2 subgrupos (A e F), de acordo com a temperatura de armazenamento previamente à sua degradação. As 3 matrizes restantes foram degradadas imediatamente após sua confecção (grupo 0). A concentração de rhGH liberado das matrizes foi mensurada em dias determinados através da análise de espectrofotometria de absorção UV-visível do sobrenadante removido do tubos de ensaio onde as matrizes foram degradadas. Uma curva de calibração definiu os valores de concentração de rhGH baseado nos valores finais de absorbância. Os dados obtidos foram submetidos à análises estatísticas descritivas e analíticas com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Resultados: em geral, as matrizes armazenadas por diferentes períodos de tempo seguiram o mesmo padrão de liberação de rhGH das matrizes do grupo 0, com picos de maior e menor liberação entre os dias avaliados e demonstrando uma liberação expressiva até o 14^o dia de degradação, mas sem diferenças estatisticamente significativas entre grupos do estudo. Apesar de constantemente haver maiores valores de absorbância para as matrizes do subgrupo F, o padrão de liberação de rhGH foi similar para os dois subgrupos, e não houve diferença estatisticamente significante entre os dois subgrupos comparados. A análise de pH revelou menor pH para as matrizes armazenadas em ambiente refrigerado, sem diferença estatística. **Conclusão:** as formulações de PLGA incorporadas com rhGH são estáveis. Até 28 dias, o tempo e a temperatura de armazenamento não influenciam na estabilidade da formulação.

Palavras-chave¹: hormônio de crescimento, PLGA, biomateriais.

¹ Descritores em Ciências da Saúde (DeCS); disponível em <http://www.decs.bvs.br>

Abstract

Objective: to evaluate the stability of PLGA 50:50 formulations incorporated with recombinant human growth hormone (rhGH) under different storage time and temperatures. **Material and Methods:** a total of 27 microspheres of PLGA + rhGH were prepared using 7.5g of PLGA and 1,33mg of rhGH. Twenty-four of the 27 samples were equally divided into 4 groups (I, II, III and IV), according to the storage time, and two subgroups (A and F), according to the storage temperature prior to degradation. The remaining 3 samples were degraded immediately after its preparation (group 0). The concentration of rhGH released from the matrices was measured by UV-visible spectrophotometry absorption analysis. A calibration curve defined rhGH concentration values based on the final absorbance values. All collected data were submitted to descriptive and analytical statistical analysis with a confidence interval of 95% ($p < 0.05$). **Results:** in general, the samples stored for different periods of time followed similar rhGH release rate of the samples belonged to group 0, with peaks of major and minor release rates and showing an important release until the 14th day of degradation, but no statistically significant differences between the study groups. Although higher absorbance values were constantly found for the matrices in subgroup F, the pattern of rhGH release was similar and no statistically significant difference was evident between the subgroups compared. The pH analysis revealed a lower pH for the matrices stored refrigerated, with no statistical difference. **Conclusion:** PLGA + rhGH formulations are stable. Until the 28th day, storage time and temperature do not affect the stability of the formulation.

Key words: growth hormone, PLGA, biomaterials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Gráfico ilustrativo da taxa de degradação de matrizes de PLGA com diferentes concentrações de polímeros PGA/PLA.....	25
Figura 2: Desenho esquemático – Espectrofotometria UV-Visível.	38
Figura 3: Ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) - Purasorb®– PURAC.....	44
Figura 4: Hormônio de crescimento humano recombinante - Saizen®	45
Figura 5: Agitação magnética da mistura rhGH + PLGA em solvente (THF)	47
Figura 6: Moldes de silicone onde as matrizes de PLGA e PLGA + rhGh foram vertidas. Dimensão = 10mm de diâmetro x 2mm de profundidade	47
Figura 7: Imersão das matrizes em solução tampão fosfato salino dentro de tubos de ensaio.....	50
Gráfico 1: Curva de calibração.....	54
Gráfico 2: Demonstração geral do padrão de liberação de rhGH nos diferentes grupos do estudo, considerando os dias de avaliação de degradação das matrizes.....	56
Gráfico 3: Demonstração geral do padrão de liberação de rhGH nos diferentes grupos do estudo, considerando os dias de avaliação de degradação das matrizes.....	57
Gráfico 4: Comparação entre valores médios de ABS em diferentes dias de avaliação,.....	61
Gráfico 5: Comparação entre valores médios de concentração de rhGH liberado das matrizes em diferentes dias de avaliação do estudo para os subgrupos A e subgrupos F.	62
Gráfico 6: Comparação entre valores médios de concentração de rhGH liberado das matrizes em diferentes dias de avaliação do estudo para os subgrupos A e subgrupos F.	62
Gráfico 7: Níveis médios de concentração de rhGH liberado das matrizes de PLGA em cada grupo do estudo, comparando os subgrupos A e F.	63
Gráfico 8: Padrão de absorção de luz (absorbância) nos diferentes dias de degradação das matrizes armazenadas em temperatura ambiente.....	65

Gráfico 9: Padrão de absorção de luz (absorbância) nos diferentes dias de degradação das matrizes armazenadas em temperatura refrigerada.	65
Gráfico 10: Comparação entre os valores médios de pH para os subgrupos do estudo.	66
Gráfico 11: Comparação entre os valores de pH dos subgrupos do estudo para cada dia de avaliação da degradação das matrizes.....	67
Quadro 1: Divisão dos grupos e alocação das amostras em cada grupo e subgrupo do estudo.....	49
Tabela 1: Valores das médias de absorbância (ABS) e erro padrão para as matrizes correspondentes a cada grupo do estudo.	55
Tabela 2: Resultados dos testes estatísticos realizados, considerando todos os valores de absorbância obtidos para as matrizes do estudo.....	57
Tabela 3: Valores das médias de ABS e desvio-padrão para as matrizes do subgrupo A dos grupos 0, I, II, III e IV.	59
Tabela 4: Informações de relevância estatística para as matrizes do subgrupo A dos grupos 0, I, II, III e IV. Teste Post Hoc de Bonferroni.....	59
Tabela 5: Valores das médias de ABS e desvio-padrão para as matrizes do subgrupo F dos grupos I, II, III e IV.....	60
Tabela 6: Informações de relevância estatística para as matrizes do subgrupo F dos grupos I, II, III e IV. Teste Post Hoc de Bonferroni.....	60
Tabela 7: Valores média de absorbância (ABS) para cada subgrupo dos grupos do estudo e valores de p para comparações entre os subgrupos.....	64
Tabela 8: Valores da médias de pH para as avaliações do subgrupo A e subgrupo F.....	66
Tabela 9: Valores médios de pH para os grupos do estudo (subgrupos A).....	68
Tabela 10: Comparação inter-grupos dos valores de pH para as matrizes dos subgrupos A.....	69
Tabela 11: Valores médios de pH para os grupos do estudo (subgrupos F).....	70
Tabela 12: Comparação inter-grupos dos valores de pH para as matrizes dos subgrupos F.....	70

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E SIGLAS

PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
LOR	Laboratório de Organometálicos e Resinas
PLGA	Poli (ácido lático-co-glicólico)
FDA	Food and Drug Administration
PLA	Poli (ácido lático)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PDLA	Poli (ácido D-lático)
PLLA	Poli (ácido L-lático)
THF	Tetrahidrofurano
PVA	Ácido polivinil
DCM	Diclorometano
GHh	Hormônio de Crescimento Humano
ST	Somatotropina
kDa	Kilodaltons
ng	Nanogramas
ml	Mililitros
rhGH	Hormônio de Crescimento Humano Recombinante
DNA	Ácido desoxirribonucléico
UV	Ultravioleta
A	Absorbância
ϵ	Coeficiente de extinção molar
l	Caminho óptico
c	Concentração da solução
λ	Comprimento de onda
®	Registrado
mg	Miligramas
cols	Colaboradores
pH	Potencial Hidrogeniônico

°C	Graus Celsius
dl/g	Decilitros por grama
UI	Unidades Internacionais
mm	Milímetros
g	Gramas
rpm	Rotações por minuto
µm	Micras
Ind.	Indústria
Com.	Comércio
Ltda	Limitada
PBS	Solução tampão fosfato salino
SP	São Paulo
ASTM	American Society for Testing and Materials
INTOX	Instituto de Tecnologia
ICH	International Conference on Harmonization
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
EUA	Estados Unidos da América
ABS	Absorbância
%	Percentual
p	Intervalo de confiança

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 OS BIOMATERIAIS	16
2.2 ARCABOUÇOS OSTEOCONDUTORES	16
2.3 OS POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	18
2.4 O ÁCIDO POLI-LÁTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA)	19
2.4.1 Propriedades físico-químicas	20
2.4.2 Farmacocinética e biodistribuição de moléculas	21
2.4.3 Técnicas de fabricação das matrizes de PLGA	21
2.4.4 Liberação de agentes farmacológicos (drogas, proteínas, peptídeos)	23
2.4.5 Fatores que afetam a degradação	26
2.4.6 Toxicidade	29
2.5 O HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (GH).....	29
2.5.1 Limitações da estabilidade do rhGH	33
2.6 ESPECTOFOTOMETRIA UV-VISÍVEL.....	35
2.7 PH E MENSURAÇÃO DE PH – PHMETRIA	38
2.8 TEMPERATURA X CONSERVAÇÃO DE MOLÉCULAS	39
2.8.1 Temperatura x Conservação de moléculas	40
2.8.2 Estabilização térmica	40
3. OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAIS.....	44
4.1.1 PLGA	44
4.1.2 Hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH)	45
4.2 Métodos:	46
4.2.1 Preparação das matrizes	46
4.2.2 Agrupamento das amostras	48

4.2.3 Degradação hidrolítica das matrizes	49
4.2.4 Determinação da quantidade de rhGH incorporado na matriz de PLGA	51
4.6 CURVA DE CALIBRAÇÃO	52
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5. RESULTADOS	54
5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO	54
5.2 LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO	55
5.2.1 Influência do tempo de armazenamento na estabilidade do rhGH incorporado nas matrizes de PLGA	55
5.2.2 Influência da temperatura de armazenamento incorporado na estabilidade do rhGH incorporado nas matrizes de PLGA.....	61
5.2.3 Avaliação de phmetria das soluções utilizadas para degradação das matrizes.....	65
6. DISCUSSÃO.....	72
7. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

Desde a introdução dos polímeros reabsorvíveis no âmbito das cirurgias reconstrutivas, uma quantidade considerável de pesquisas tem sido conduzidas no intuito de avaliar os polímeros reabsorvíveis e a sua capacidade de funcionar como veículos de liberação de agentes farmacológicos. Entre todos os biomateriais, a aplicação do ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) tem mostrado imenso potencial como material osteocondutor e carreador de diferentes drogas para os fins da engenharia tecidual. O PLGA pertence a uma família de biomateriais a base de polímeros reabsorvíveis aprovados pela Food and Drug Association (FDA) e que são fisicamente resistentes e altamente biocompatíveis. Na campo da odontologia, tem sido usado frequentemente em cirurgias de reconstrução alveolar, a fim de proporcionar preservação e/ou aumento ósseo para posterior instalação de implantes¹. Recentemente, autores tem reportado o uso de matrizes de PLGA como carreadores de fatores de crescimento, proteínas e hormônios a fim de otimizar a distribuição e a atividade de cada uma destas substâncias no sítio receptor. Tal técnica já vem sendo utilizada há algum tempo na medicina, onde matrizes de polímeros reabsorvíveis já são utilizadas para carrear proteínas, medicamentos e outras macromoléculas como DNA, RNA e peptídeos^{1,2}.

Dentre os polímeros reabsorvíveis utilizados para estes fins, o PLGA é o mais popular e mais utilizado, pois possui características favoráveis de degradação, possibilita a incorporação de substâncias e a longa experiência clínica com tal material demonstra alto índice de sucesso. A literatura recente tem demonstrado que a degradação do PLGA pode ser empregada como meio de liberação de agentes farmacêuticos em doses desejáveis pela implantação sem procedimentos cirúrgicos extensos. Ademais, é possível controlar as propriedades físicas da matriz polímero-substância incorporada através do controle de parâmetros relevantes como massa molecular do polímero, proporção de ácido lático e glicólico durante a fabricação da matriz de PLGA e concentração do agente farmacológico incorporado, atingindo assim uma dose e intervalo de liberação ideal da substância incorporada no polímero³. Entretanto,

a toxicidade potencial da substância a ser incorporada no polímero, a liberação inconsistente, a interação polímero-substância durante a incorporação na matriz, a proporção ideal da substância que pode ser incorporada à matriz, a estabilidade desta durante a fabricação do biomaterial e o armazenamento são fatores que ditarão o sucesso da técnica e requerem avaliação detalhada⁴.

Diversos agentes farmacológicos estão sendo incorporados a matrizes de PLGA, sendo esta técnica de administração de substâncias vantajosa devido a alguns fatores, tais como: (1) controle da liberação até mesmo para drogas de baixo peso molecular; (2) é aplicável para drogas instáveis, como peptídeos, devido à ausência de calor ou contato com solventes orgânicos durante o processo de preparação da matriz e incorporação das drogas e (3) a taxa de liberação pode ser controlada facilmente pela seleção e formulação do polímero absorvível. Ainda, devido à sua natureza hidrofóbica, é relativamente fácil incorporar drogas hidrofóbicas em partículas de PLGA⁵.

Ademais, segundo Müller et al., 2001, partículas de PLGA possuem uma vantagem em relação a outros sistemas de liberação de drogas, por possuir maior estabilidade durante o armazenamento do composto⁶.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OS BIOMATERIAIS

Com o objetivo de evitar a abordagem de áreas doadoras para obtenção de enxerto ósseo, a engenharia tecidual tem evoluído como uma estratégia alternativa para o desenvolvimento dos biomateriais. A vantagem óbvia do seu uso é a diminuição tanto da morbidade do ato operatório quanto do tempo necessário para a sua execução. Idealmente, um material que venha a ser empregado como substituto ósseo deve ser biocompatível, apresentar propriedades mecânicas satisfatórias e influenciar de forma positiva nos processos de osteocondução e osteoindução. Estes materiais foram definidos em 1986, pela Sociedade Européia, como sendo qualquer substância, droga ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que pode ser usada por um período ou definitivamente para repor algum órgão, tecido ou função do corpo humano⁷. Esses produtos não devem produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica. Dessa forma, deve ser atóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico. Em função do tempo de permanência no corpo humano, podem ser classificados em dois grandes grupos, permanentes ou temporários⁸.

Dentre os biomateriais, os polímeros absorvíveis apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir e manusear, além de apresentarem características mecânicas semelhantes a dos materiais biológicos.

2.2 ARCABOUÇOS OSTEOCONDUTORES

A engenharia tecidual, que visa o reparo de defeitos nos tecidos do organismo, requer um manejo racional e cuidadoso de múltiplos fatores. Isto inclui o uso de arcabouços osteocondutores, células osteogênicas e estímulos osteoindutores e osteopromotores, além de um ambiente biomecânico apropriado. Cada uma dessas variáveis contribui, em combinação com as

outras, para o sucesso ou falha do tratamento com estes biomateriais. Os arcabouços osteocondutores desempenham diversas funções, como por exemplo servir de: (1) mantenedor de espaço que previne a migração de tecidos adjacentes ao defeito ósseo; (2) superfície que facilita a inserção, sobrevivência, migração, proliferação e diferenciação de células progenitoras, promovendo assim o reparo ósseo através do volume enxertado; (3) veículo de transporte de células, medicamentos, fatores de crescimento e outros agentes bioativos para um determinado sítio^{8,9}. Uma gama variada de arcabouços osteocondutores estão disponíveis para uso clínico atualmente, e diversos outros estão sob desenvolvimento. As diferenças entre os arcabouços podem ser categorizada em 6 grupos de propriedades: volume do material, arquitetura tridimensional e porosidade, propriedades químicas da superfície, propriedades mecânicas, propriedades ambientais iniciais do material (osmolaridade, pH) e propriedades ambientais tardias do material (características de degradação). Cada um destes fatores gera implicações importantes para a resposta biológica dos tecidos locais a este material e para a utilidade deste em transportar agentes bioativos para um determinado sítio receptor^{9,10}.

As vantagens potenciais destes arcabouços alternativos em relação aos tecidos naturais são: (1) reprodutibilidade; (2) custo de produção diminuído; (3) potencial para produção customizada e (4) capacidade de ser utilizado como material de substrato para veículo de outras substâncias. Este substrato pode então ser sistematicamente modificado através de alterações em sua arquitetura, propriedades químicas de superfície, propriedades mecânicas e padrão de degradação, objetivando uma melhora no transporte e liberação de drogas ou substâncias bioativas¹⁰.

Polímeros derivados do ácido láctico, ácido glicólico e copolímeros a base da combinação destes ácidos tem sido utilizados para desenvolver arcabouços tridimensionais através de variados métodos de fabricação. Devido a suas propriedades de biocompatibilidade, osteocondutividade e variadas propriedades mecânicas, tais materiais tem recebido atenção especial para o desenvolvimento de biomateriais que visam a regeneração óssea. Ainda, a aprovação pela FDA

(Food and Drug Administration) torna este polímero regulamentado para uso em pesquisas *in vivo*, sendo este fator de extrema importância para o uso clínico deste biomaterial¹⁰.

2.3 OS POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Diversos polímeros e copolímeros podem ser utilizados na preparação de matrizes absorvíveis que funcionam como arcabouços osteocondutores, e a maior parte destes tem sua origem derivada do ácido poli-glicólico (PGA) ou ácido poli-lático (PLA). Historicamente, os polímeros absorvíveis foram associados com reações do sítio receptor, e este fator causou dificuldades na utilização destes tipos de biomateriais. No entanto, é possível combinar diferentes polímeros ou associar diferentes formas do mesmo polímero, obtendo materiais com diferentes propriedades químicas e mecânicas, e que são degradados em diferentes períodos de tempo e causam diferentes reações inflamatórias no sítio receptor¹¹.

Polímeros biodegradáveis são materiais de origem natural ou sintética e são degradados *in vivo* por vias enzimáticas ou não-enzimáticas, resultando em produtos biocompatíveis, toxicologicamente seguros e eliminados por vias metabólicas fisiológicas¹¹. O número destes materiais utilizados como carreadores de substâncias aumentou drasticamente na última década. Estes materiais capazes de funcionar como veículos de liberação de substâncias podem ser amplamente classificados como:

- 1- polímeros sintéticos biodegradáveis: inclui materiais hidrofóbicos como os ácidos α -hidróxido (família do ácido poli-lático-co-glicólico – PLGA, entre outros);
- 2- polímeros naturais como açúcares complexos (hialuran e quitosan) e inorgânicos (hidroxiapatita).

A biocompatibilidade é um fator importante para a utilização destes materiais, porém, é importante salientar que a biocompatibilidade não é uma propriedade intrínseca do biomaterial, mas depende do ambiente biológico e da

tolerância do meio que recebe o material, havendo influência da interação polímero-substância neste quesito^{8,9,11}.

2.4 O ÁCIDO POLI-LÁTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA)

O ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) é um material originado da união do ácido poli-lático (PLA) com o ácido poli-glicólico (PGA). De acordo com a literatura científica, o PLGA é classificado como o melhor biomaterial disponível para liberação de substâncias, por proporcionar propriedades mecânicas e químicas ideais para este fim. O ácido poli-lático contém um α -carbono assimétrico que é tipicamente descrito como forma D- ou L- na nomenclatura esteroquímica clássica. As formas enantioméricas do polímero PLA são o ácido poli-D-lático (PDLA) e o ácido poli-L-lático (PLLA). O PLGA é geralmente um acrônimo para o ácido poli-D,L-lático-co-glicólico, onde as formas D- e L- do ácido lático estão em proporções iguais. No entanto, pode-se combinar diferentes proporções destes materiais, obtendo um material com diferentes propriedades químicas e mecânicas, que são degradados em diferentes períodos de tempo e causam diferentes reações inflamatórias no sítio receptor; e assim tornando o biomaterial ideal para seu uso clínico^{8,9}.

O PLGA tem sido extensivamente utilizado como carreador em sistemas de liberação controlada de agentes farmacêuticos e/ou substâncias bioativas, devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade^{12,13}. Em geral, a degradação do PLGA e a liberação de agentes farmacológicos podem ser sincronizadas, levando em conta fatores como a hidrofiliabilidade do material, cristalinidade, interações químicas e relação volume-área de superfície da matriz desenvolvida. Todos estes fatores, além de outros, devem ser levados em consideração a fim de customizar a degradação e conseqüentemente o mecanismo de liberação de substâncias para a criação de um material ideal para o uso clínico. Assim, para um material que visa liberação de substâncias em um curto período (até um mês), um polímero amorfo hidrofílico é recomendável. Para uma liberação de substância de médio-prazo (um a seis meses), a escolha de um polímero de alto

peso molecular seria apropriada. Já quando se deseja uma liberação de substância em longo-prazo (mais de seis meses), um polímero com alto grau de cristalinidade pode ser considerado, sem negligenciar as outras características que também influenciam degradação e liberação de agentes bioativos. Ainda, diversos estudos demonstram que o PLGA pode ser facilmente desenvolvido como matrizes carreadoras de substâncias farmacológicas em todas as escalas (desde nanoesferas até macro-implantes), podem encapsular diversos tipos de agentes farmacêuticos (drogas, peptídeos, proteínas) e pode oferecer liberação destes agentes em diferentes períodos de tempo e intervalos, e ainda atuar por diversas vias de administração^{11,13}.

2.4.1 Propriedades físico-químicas

Para se desenvolver uma matriz com capacidade de carrear substâncias e liberá-las no organismo, é essencial que se conheça as propriedades físicas, químicas e biológicas do PLGA.

O PLGA pode ser processado em qualquer forma e tamanho, e pode encapsular moléculas de qualquer tamanho. Este é solúvel em uma gama variada de solventes, incluindo os solventes a base de cloro, tetrahidrofurano, acetona ou acetato de etila¹².

A presença de grupos metil no PLA torna este mais hidrofóbico que o PGA; portanto, matrizes de PLGA ricos em ácido poli-lático são menos hidrofílicos, absorvem menos água e conseqüentemente degradam mais vagarosamente. Devido à hidrólise do PLGA, parâmetros que são tipicamente considerados invariáveis em uma formulação sólida podem alterar com o tempo, como a umidade do conteúdo e a massa molecular. O efeito dessas propriedades do polímero na taxa de liberação das substâncias das matrizes de polímeros biodegradáveis tem sido extensivamente estudadas, afim de se obter o material com as propriedades ideais para o uso clínico. A alteração das propriedades do PLGA durante a biodegradação do polímero influencia no intervalo e na dose de liberação das moléculas incorporadas na matriz. As próprias propriedades físicas do PLGA tem se mostrado dependentes de uma

variedade de fatores, incluindo o peso molecular inicial, a proporção entre PGA e PLA, o tamanho da matriz, a exposição à água (forma da superfície) e a temperatura de armazenamento^{12,13}.

A resistência mecânica do PLGA é afetada por propriedades físico-químicas como a massa molecular e o índice de dispersão. Estas propriedades afetam também a possibilidade de se utilizar este polímero como veículo carreador e liberador de substâncias e podem controlar a taxa de degradação e hidrólise da matriz. Estudo recente demonstrou, entretanto, que o tipo de molécula incorporada também influencia a taxa de liberação desta substância¹³.

2.4.2 Farmacocinética a biodistribuição de moléculas

O veículo de distribuição das moléculas incorporadas em matrizes de PLGA devem ser aptos a distribuir as substâncias por tempo apropriado, em dose efetiva e intervalo adequado para produzir os efeitos terapêuticos aos quais a terapia se propõe. A biodistribuição das moléculas e a farmacocinética do PLGA segue um perfil não-linear e dose-dependente¹⁴.

Sabe-se que a degradação das matrizes de PLGA é rápida inicialmente (cerca de 30% do volume inicial da matriz) e diminui o ritmo posteriormente para ser eliminada no pulmão através da respiração⁶. A fim de restringir estas limitações, estudos tem investigado o papel da modificação da superfície, sugerindo que a incorporação de agentes modificadores de superfície podem significativamente aumentar a meia-vida do PLGA no sangue circulante^{16,17}.

2.4.3 Técnicas de fabricação das matrizes de PLGA

Medicamentos e proteínas são a mais exigentes classes de agentes farmacológicos em que a liberação controlada e direcionada é utilizada para aumentar a especificidade, diminuir a toxicidade e o risco associado ao tratamento. No entanto, os desafios da liberação e da estabilidade associados com estes agentes tem diminuído o número de produtos no mercado. Manter uma validade adequada de matrizes incorporadas com peptídeos, proteínas e

medicamentos requer formulações no estado sólido para limitar as reações hidrolíticas de degradação¹⁷. Ainda, a liberação de substâncias como peptídeos e proteínas podem também requerer formulações parenterais para evitar degradação no trato digestivo e metabolismo de primeira passagem, enquanto a meia-vida curta destes tipos de moléculas contribuem para a necessidade destas formulações parenterais para reduzir a frequência de dosagens. Para que se evite o tratamento cirúrgico para inserção de implantes impregnados com estas substâncias, micropartículas de PLGA injetáveis (microesferas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas) podem ser empregadas para uma liberação controlada destas substâncias. Drogas incorporadas a estas matrizes poliméricas são liberadas por difusão através da barreira do polímero ou por erosão do material do polímero. Em adição a sua bicompatibilidade, a compatibilidade da substância a ser associada, cinética de biodegradação favorável e propriedades mecânicas ideais, as matrizes de PLGA podem ser facilmente processadas em diferentes formas e tamanho^{16,17}. Dentre as diversas técnicas utilizadas para preparação de matrizes de PLGA incorporada com substâncias farmacológicas (drogas, proteínas, peptídeos), o método de evaporação do solvente é o mais amplamente empregado e com maior previsibilidade na incorporação do agente farmacológico em questão ao PLGA.

2.4.3.1 Técnicas de preparação de matrizes

2.4.3.1.1 Método de evaporação do solvente

1) Processo de emulsão única (simples): processos de emulsificação óleo-em-água são exemplos de processos de emulsão única. A quantidade apropriada de polímero é inicialmente dissolvida em um solvente orgânico volátil, insolúvel em água (ex: tetrahydrofurano – THF) para produzir uma solução de fase simples. A droga (substância) é adicionada para produzir uma dispersão na solução. Esta solução de polímero dissolvido e droga dispersada é então emulsificada em um grande volume de água na presença de um emulsificante (ex: álcool polivinil – PVA), em temperatura apropriada e sob agitação

constante. O solvente orgânico evapora ou é extraído para que o óleo se solidifique, sob condições adequadas. Se evaporado, a emulsão é mantida sob pressão atmosférica reduzida com controle da agitação enquanto o solvente evapora. Se extraído, a emulsão é transferida para uma grande quantidade de água (com ou sem surfactante) ou outro meio de extinção para dispersar o solvente associado as gotículas de óleo. As microesferas sólidas resultantes são então lavadas e secas sob condições apropriadas para então criar a formulação injetável de microesferas^{18,19}.

2) Processo de emulsão dupla (múltipla): métodos de emulsão água-em-óleo-em-água são mais adequados para encapsular drogas solúveis em água como peptídeos, proteínas e vacinas, diferentemente do processo de emulsão simples, que é mais adequado para incorporação de drogas insolúveis em água, como esteróides. Primeiramente, uma quantidade apropriada da substância a ser incorporada é dissolvida numa fase aquosa, e então esta solução com a substância é adicionada a uma fase orgânica que consiste em PLGA e/ou solução de PLGA em DCM ou clorofórmio, sob vigorosa agitação para permitir a emulsão água-em-óleo. Após esta fase, a emulsão primária água-em-óleo é adicionada a uma solução aquosa de PVA e então emulsificada por cerca de um minuto sob apropriadas condições de mistura de substâncias. O solvente orgânico evapora ou é extraído da mesma forma que no processo de emulsão simples. Neste processo de emulsão dupla, a escolha do solvente e a taxa de agitação durante o preparo das soluções afeta a eficiência do processo de encapsulação e o tamanho final das partículas obtidas^{18,20}.

2.4.4 Liberação de agentes farmacológicos (drogas, proteínas, peptídeos)

2.4.4.1 Liberação bifásica

Copolímeros de PLGA sofrem degradação por hidrólise ou biodegradação pela quebra de ligações ésteres em oligômeros e finalmente em monômeros. Este processo de degradação tem sido demonstrado *in vitro* e *in vivo* para vários

tipos de polímeros, drogas e proteínas, com diferentes proporções entre os polímeros combinados²¹. O processo de degradação para estes polímeros ocorre principalmente pela erosão volumétrica uniforme da matriz de PLGA, havendo então deslocamento de água para o interior da matriz e este deslocamento se torna maior que a taxa de degradação do polímero. Ainda, ocorre um aumento de terminações carboxílicas como resultado da biodegradação, o que ajuda a catalisar o processo. Pode-se então descrever o processo de liberação de agentes bioativos das matrizes de PLGA pela difusão do agente através da massa da matriz, difusão superficial e depois então pela degradação/erosão da massa interna da matriz e degradação/erosão superficial. Como todos estes fatores podem influenciar o processo de degradação, o padrão de liberação de agentes farmacológicos se torna imprevisível. Diversos fatores influenciam o índice de degradação do PLGA, como a molaridade dos ácidos poli-lático e poli-glicólico, a massa molecular de cada polímero e o grau de cristalinidade. Já o entendimento da liberação de substâncias destas matrizes biodegradáveis é um pouco mais complicado²². Uma curva bifásica de liberação de substâncias como resultado da biodegradação do polímero depende da proporção entre os polímeros utilizados, e demonstra o seguinte padrão de curva gráfica:

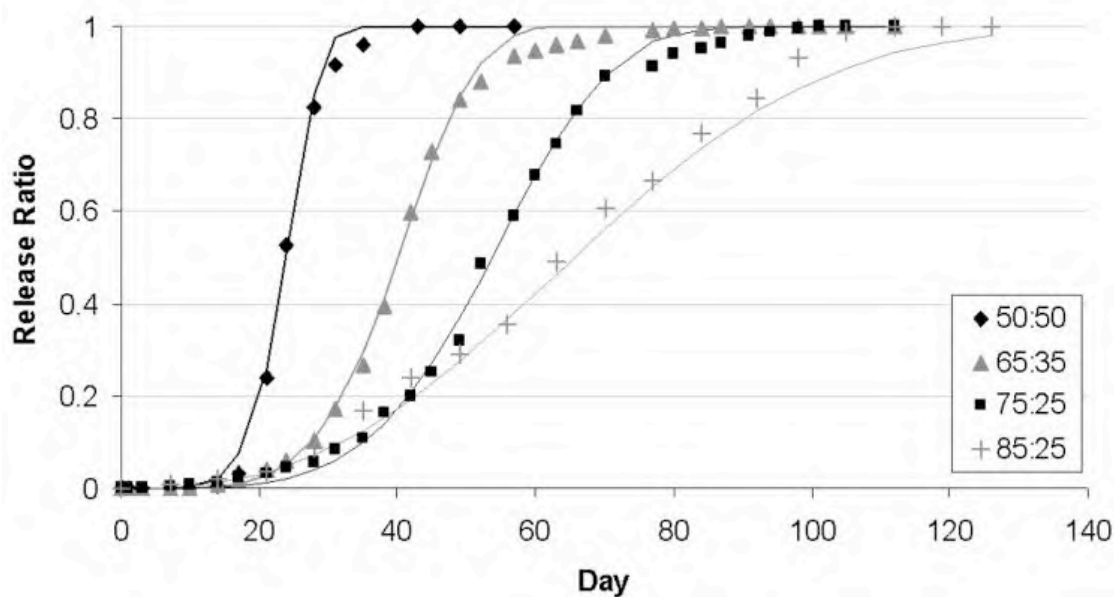


Figura 1: gráfico ilustrativo da taxa de degradação de matrizes de PLGA com diferentes concentrações de polímeros PGA/PLA.

Fonte: Siegel SJ, Kahn JB, Metzger K, Winey KI, Werner K, Dan N. Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. Eur J Pharm Biopharm. 2006;64:287–293.

- (1) O surto inicial de liberação está relacionado ao tipo de agente, a concentração do agente e as características hidrofílicas/hidrofóbicas do polímero. A substância na superfície, em contato com o meio, é liberada devido a solubilidade e a penetração de água no interior da matriz. A droga é então liberada por difusão através da matriz do polímero, bem como através dos espaços porosos da estrutura do polímero. Essa erosão da matriz de PLGA diminui significativamente o peso molecular do PLGA, mas não ocorre perda de peso e nenhum monômero solúvel é formado nesta fase.
- (2) Na segunda fase, as substâncias são liberadas progressivamente após hidrólise do polímero em produtos oligoméricos e monoméricos, partículas suficiente pequenas para serem solúveis; criando uma passagem para a droga ser liberada por difusão e erosão até completa solubilização do polímero. O tipo de substância também exerce importante influência em atrair a fase aquosa para o interior da matriz^{22,23}.

O papel das enzimas na biodegradação do PLGA não está bem claro. A literatura atual indica que a biodegradação do PLGA não envolve a ação enzimática e se dá puramente por hidrólise. No entanto, alguns pesquisadores tem sugerido que as enzimas exercem influência na quebra do PLGA, por haver diferenças nos índices de degradação entre pesquisas *in vivo* e *in vitro*. Idealmente, polímeros de PLGA devem possuir resistência mecânica considerável, pois os sistemas de liberação de drogas utilizando PLGA estão sujeitos a significativo estresse físico, o que também pode influenciar na quebra mecânica dos implantes e alterar a área de superfície e conseqüentemente o padrão de hidrólise de todo o sistema²⁴.

2.4.5 Fatores que afetam a degradação

Para se alcançar as propriedades desejáveis do PLGA, é essencial entender os fatores que afetam a degradação deste tipo de polímero e desenvolver sistemas de liberação de drogas que se acomodam a estes fatores, tornando a liberação das substâncias e a ação das mesmas mais eficaz e eficiente.

2.4.5.1 Composição do polímero

A composição do polímero é o fator mais importante para se determinar as características hidrofílicas e/ou hidrofóbicas e o índice de degradação da matriz do polímero. Lu e cols. publicaram um estudo sobre a composição dos polímeros utilizados para este fim demonstraram a degradação destes em diversos grupos²⁵. Os resultados mostram que o aumento do percentual de ácido glicólico acelera a perda de peso do polímero. Uma matriz de PLGA construída em uma proporção de 50% de PLA e 50% de PGA (PLGA 50:50) demonstra uma degradação mais rápida que uma matriz de PLGA 65:35, devido a hidrofiliabilidade do PGA, o que causa uma degradação mais rápida nos polímeros com maior concentração de PGA. Conseqüentemente, o PLGA 65:35 possui degradação mais rápida que o PLGA 75:25, e este degrada de forma mais acelerada que o PLGA 85:15. Assim, o índice de degradação é acelerado

com o aumento da proporção de PGA na composição do polímero. A quantidade de ácido poli-glicólico é um parâmetro crítico para se customizar as características hidrofílicas da matriz e assim influenciar a velocidade de degradação e o padrão de liberação de agentes farmacológicos^{25,26}.

2.4.5.2 *Peso Molecular médio*

Polímeros com alto peso molecular normalmente exibem baixo índice de degradação²⁷. O peso molecular possui relação direta com o tamanho da cadeia polimérica. Polímeros com maior peso molecular possuem cadeias poliméricas mais longas, o que requer mais tempo para ser degradada. Porém, tal característica é inversa para o PLLA, devido a uma relação inversamente proporcional entre o peso molecular e o grau de cristalinidade²⁸.

2.4.5.3 *Tipo de agente farmacêutico incorporado*

O mecanismo de degradação da matriz polímero-agente farmacológico e os parâmetros de liberação de substâncias destes polímeros variam de acordo com o tipo de agente incorporado²⁹. A presença de substâncias pode alterar o mecanismo de degradação de erosão volumétrica da matriz para um padrão de degradação superficial, afetando também o índice de degradação da matriz¹³. O perfil de liberação da substância, definido como o tempo necessário para liberação de 100% do agente e o índice de estabilidade da substância também variam consideravelmente. Ainda, um estudo recente mostra que não há forte relação entre os parâmetros de liberação das substâncias com suas propriedades químicas (definida pela densidade de grupos OH) ou hidrofílicidade (dada pela solubilidade em água)²⁹. No entanto, fica claro que se deve considerar o efeito das propriedades químicas dos agentes farmacológicos utilizados para explicar os mecanismos de liberação destes agentes a partir de sistemas específicos de polímeros biodegradáveis.

2.4.5.4 Tamanho e forma da matriz

A razão entre a área de superfície para o volume da matriz tem mostrado ser um fator significativo para a degradação de matrizes de maior tamanho. Uma maior área de superfície causa maior degradação da matriz. Também tem sido reportado que a degradação volumétrica da massa interna da matriz é mais acelerada que a degradação superficial pura, o que torna a liberação de substâncias mais rápida em dispositivos com maior volume em relação à área de superfície de toda a matriz³⁰.

2.4.5.5 pH

A degradação/hidrólise *in vitro* do PLGA mostrou que meios alcalinos e altamente ácidos aceleram a degradação. No entanto, a diferença entre meios neutros e levemente ácidos é menos pronunciada, devido a autocatalização do polímero pelos grupos de terminações carboxílicas³¹.

2.4.5.6 Ação enzimática

Há resultados conflitantes na literatura quanto aos efeitos das enzimas no mecanismo de degradação (hidrólise ou reações de clivagem). Esta contradição está baseada em resultados diferentes quando se avalia degradação do PLGA *in vivo* e *in vitro*²⁶. Tem sido proposto que o PLGA degrada exclusivamente por hidrólise, mas outros sugerem que a degradação enzimática também participa do processo. Devido a falta de uniformidade nos experimentos *in vivo*, há dificuldade em se comparar e demonstrar o papel das enzimas neste processo de degradação³².

2.4.5.7 Quantidade do agente farmacêutico

A quantidade do agente farmacêutico incorporado na matriz carreadora também exerce influência significativa na taxa e na duração da liberação da substância. Matrizes de PLGA com maior quantidade de agente farmacêutico encapsulado possuem maior surto inicial de liberação de substâncias do que

aquelas matrizes com menor quantidade, devido a maior proporção agente-polímero. No entanto, o efeito da quantidade do agente na liberação de substâncias é atenuado quando a quantidade de droga chega a um nível crítico, dependendo do tipo de droga^{33,34}.

2.4.6 Toxicidade

Estudos toxicológicos com sistemas de PLGA sugerem que pode haver reações no tecido adjacente ao local da aplicação^{35,36}. No entanto, estas reações são geralmente leves, e o PLGA já demonstrou ser extremamente seguro quando utilizado como implantes ou em micropartículas. Um estudo mostrou que o uso do PLGA em nanopartículas pode criar alterações na biodistribuição e na toxicidade deste material³⁵.

2.5 O HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (GH)

O hormônio do crescimento humano, abreviadamente GHh, também chamado somatotrofina ou somatotropina (ST), é uma proteína monomérica e um hormônio peptídico composto por 191 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 22kDa, sintetizado e secretado pela glândula hipófise anterior^{37,38}. O GHh é armazenado na glândula pituitária na forma de grânulos e a liberação do GHh na circulação ocorre nesta forma de grânulos³⁸. O padrão de liberação normal é através de longos pulsos (cada um com duração de 15 a 30 minutos) de secreção de GHh; porém os picos mais altos e mais previsíveis de liberação de GHh ocorrem normalmente durante o sono, mais especificamente na primeira hora³⁹. Cerca de 50% da secreção do GHh diária ocorre durante o terceiro e quarto estágio do sono REM, e entre os picos de liberação, os níveis de GHh basal são baixos. O nível do GH durante tais picos pode ir de 5-30 ng/mL ou mais. Entre picos, os níveis basais de GH são baixos, geralmente abaixo de 3 ng/mL na maior parte do dia e da noite. A quantidade e o padrão de secreção do GH muda ao longo de toda a vida. Os níveis basais são máximos durante a infância. A amplitude e a frequência de picos são máximos durante o

estirão pubertal. As crianças e os adolescentes saudáveis têm uma média de 8 picos a cada 24 horas. Os adultos, em média 5 picos. Os níveis basais, a frequência e a amplitude dos picos caem ao longo da vida adulta. No entanto, todo este padrão de secreção é influenciado por fatores como idade, gênero, dieta, exercícios, estresse e outros hormônios^{39,40}.

A secreção do GHh é estimulada pelo hormônio liberador do hormônio do crescimento (rhGH), e negativamente regulada pela somatostatina³⁹. Para melhor compreensão, o hormônio do crescimento pode ainda ser diferenciado quanto à sua nomenclatura na área médica, sendo chamado de somatotrofina quando se refere ao hormônio de crescimento produzido naturalmente em animais, enquanto o termo somatofina se refere ao hormônio de crescimento produzido por tecnologia de DNA recombinante e abreviado pela sigla rhGH em humanos.

A terapia com hormônio de crescimento recombinante foi desenvolvida no início dos anos 50 e utilizada com sucesso para tratar distúrbios do crescimento causados pela deficiência do GHh. Mais recentemente, pesquisas indicaram que os distúrbios do crescimento estão associados a anormalidades genéticas, incluindo alterações na produção do hormônio, na secreção deste e defeitos nos receptores do hormônio do crescimento⁴⁰, já que da mesma forma que a proteína de outros hormônios, o GHh age por meio da interação com um receptor específico encontrado na superfície das células; enquanto uma causa comum de insuficiência de GHh em adultos é a remoção da glândula pituitária para o tratamento de algumas lesões malignas⁴¹.

Até que a tecnologia do DNA recombinante (DNAr) fosse desenvolvida, o hormônio do crescimento humano era obtido de forma limitada a partir da glândula pituitária de cadáveres⁴², já que o GHh de origem bovina é inativo em humanos. Em meados dos anos 80, o GHh derivado de cadáveres foi retirado do mercado devido ao risco de transmissão da doença Creutzfeld-Jacob⁴³.

A possibilidade de se obter hormônio de crescimento humano derivado do DNAr permitiu o tratamento de pacientes com insuficiência de GHh e possibilitou a investigação de uma gama de outras doenças relacionadas a este hormônio. Diversas empresas já possuem aprovação da FDA para produzir o rhGH para

uma variedade de indicações⁴³ que incluem, além das desordens do crescimento em crianças e adultos associados a insuficiência de GH, sendo esta a maior indicação da terapia de reposição de GHh, insuficiência renal crônica, Síndrome de Turner e caquexia secundária a AIDS^{44,45}.

Devido a curta meia-vida do rhGH, a terapia de reposição requer injeções frequentes (diárias ou 3 vezes por semana), que afetam negativamente a adesão ao tratamento e o conforto do paciente⁴⁶. Assim, o desenvolvimento de formulações que contêm rhGH e permitem a sua liberação gradual podem trazer melhoras significativas à eficácia do tratamento e à qualidade de vida dos pacientes. Ainda, apesar de a terapia de reposição não mimetizar com fidelidade a secreção natural pulsátil, esta é ainda efetiva e muito segura. Estudos clássicos demonstraram que a infusão contínua de rhGH (através de bombas externas) resultaram em velocidade de crescimento comparável ao tratamento com injeções diárias^{47,48}, confirmando então que a liberação pulsátil de GH não é requisito para a eficácia da terapia. A administração contínua por bombas de infusão, porém, apesar de eficaz, também não é bem tolerada pelos pacientes. Uma formulação que armazena e libera GHh de forma contínua poderia produzir benefícios similares aos sistemas de infusão por bombas e eliminar o desconforto associados as injeções diárias. Tal formulação de armazenamento e liberação deve ainda ser composta de material biocompatível, para que não ocorra reações adversas durante a administração. Diversos materiais biocompatíveis tem sido estudados e desenvolvidos a fim de funcionar como carreadores de substâncias como medicamentos, proteínas, peptídeos⁴⁹. Devido à necessidade de tratamento de longo-prazo com rhGH para as desordens de crescimento, sistemas biodegradáveis impregnados com rhGH cumprem a função de liberação constante após sua instalação no organismo, seja esta através de cirurgias ou de forma injetável. Polímeros biodegradáveis, como o PLGA em forma de micro ou macropartículas (matrizes), injetáveis ou implantadas no organismo, tem sido extensivamente utilizados há mais de 20 anos como sistemas de armazenamento e distribuição de substâncias, inclusive rhGH, para tratamentos locais e/ou sistêmicos. Este polímero já é utilizado

atualmente como sistema de liberação de um agonista do hormônio liberador de hormônio luteinizante para o tratamento de câncer de próstata, puberdade precoce e endometriose⁵⁰. O PLGA é degradado em ácido lático e ácido glicólico e pode ser obtido em uma variedade de formas que diferem no peso molecular e em composição; ambos estes fatores determinam a taxa de degradação do polímero⁵¹. Por apresentar tais características, o PLGA é um excelente material para a confecção de matrizes liberadoras de rhGH.

No entanto, alguns fatores desta interação polímero-rhGH devem ser muito bem avaliados para que se tenha um material que corresponde aos propósitos desta terapia e torne o tratamento eficiente. Entre tais fatores, destaca-se principalmente a estabilidade da proteína ao ser incorporada na matriz de PLGA. O sistema mais conhecido de liberação de rhGH, o Nutropin Depot, que consistia de PLGA impregnado por rhGH, foi aprovado pela FDA nos Estados Unidos em 1999 e retirado do mercado em 2004 devido à várias desvantagens como alto surto de liberação, desnaturação de proteínas após administração e reações adversas, como inflamação⁵². A desnaturação de proteínas é causada pelo ambiente ácido causado pela degradação do PLGA, uma vez que estabilizadores de meio não são adicionados⁵³. Altos surtos de liberação podem levar a perda significativa da ação da substância em um curto período de tempo, reduzindo a eficácia da formulação, e ainda promover concentrações tóxicas da(s) substância(s) utilizada(s). Ademais, a agregação de proteínas pode ocorrer em ambientes desfavoráveis e a liberação desses agregados podem ocasionar respostas imunológicas imprevisíveis. Até junho de 2012, não havia disponível no mercado, nacional ou mundial, sistemas de liberação controlada de rhGH com duração acima de um mês. Ainda é um desafio para pesquisadores desenvolver um sistema adequado de liberação de rhGH com preservação da integridade da substâncias, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, uma vez que o rhGH não é estável quando exposto a solventes orgânicos durante a preparação do sistema, e a matriz do polímero biodegradável afeta a estabilidade do GHrh⁵⁴⁻⁵⁶.

2.5.1 Limitações da estabilidade do rhGH

Para o desenvolvimento de um sistema de PLGA impregnado com rhGH, a estabilidade deste hormônio sob condições fisiológicas deve ser considerada, pois o PLGA se torna hidratado e assim expõe o rhGH incorporado na matriz à água e íons em condições fisiológicas de pH e temperatura. As vias primárias de degradação para o rhGH em solução incluem agregação, desaminação, oxidação e degradação das aminas terminais⁵⁷⁻⁵⁹. Essa taxa de degradação é mais rápida em pH fisiológico do que nas condições de fabricação das formulações⁶⁰. Estes estudos sugerem que a duração da matriz de PLGA incorporada por rhGH pode não exceder um mês, devido a significativa degradação química e física. A desnaturação proteica pode causar a perda a atividade biológica do sistema e ainda aumentar a resposta imunológica ao implante instalado⁶¹.

Além desta instabilidade física e química do rhGH em meio aquoso, tal substância pode ainda sofrer desnaturação física quando exposto a solventes orgânicos⁶². A exposição a solventes orgânicos é necessária para a confecção da matriz de PLGA, já que o PLGA não é solúvel em solventes aquosos. Uma formulação contendo rhGH deve ser desenvolvida a fim de estabilizar a proteína contra a sua desnaturação. Dois métodos diferentes de estabilização do rhGH em sistemas de PLGA/solventes orgânicos já foram descritos. No primeiro método, utiliza-se as variáveis normais para o desenvolvimento da matriz, como excipiente e pH⁶¹, enquanto o segundo método descreve a vantagem de se interagir o rhGH com zinco para formar um complexo insolúvel⁶³. Diversos excipientes foram estudados com o primeiro método para testar suas capacidades de aumentar a solubilidade e estabilidade do rhGH para seu uso em processo de emulsão dupla. Destes excipientes, a trealose demonstrou a capacidade única em prover alta solubilidade e estabilidade durante o encapsulamento do hormônio. O segundo método utilizou ligações específicas entre o rhGH e zinco. Estudos prévios com este método mostram que o zinco aumenta a estabilidade física do rhGH⁶⁴. Este método é similar ao armazenamento da forma natural do GHh nos grânulos secretores da glândula

hipófise⁶⁵. O uso destas formulações mais estáveis na produção de microesferas de PLGA foi recentemente investigado e demonstrou eficácia na estabilidade da proteína⁶¹⁻⁶³.

Em um estudo que objetivava a avaliar a estabilidade das moléculas de rhGH encapsuladas em microesferas de PLGA por um processo de emulsão dupla, Cleland e cols. reportaram que o rhGH foi liberado das microesferas de PLGA em sua forma nativa, sendo biologicamente ativo durante todo o período de incubação (30 dias) em condições fisiológicas (pH 7.4 e temperatura 37°C). Assim, ressalta-se que a degradação química do rhGH não foi afetada pelas partículas de PLGA, indicando então que o ambiente interno das microesferas de PLGA é similar a solução tampão. Então, se uma proteína demonstra estabilidade em solução tampão sob condições isotônicas de pH 7.4 e temperatura de 37°C, esta é segura, estável e eficaz para ser liberada de matrizes de PLGA inseridas no organismo⁶⁶.

Em outro estudo sobre a estabilidade do hormônio de crescimento em partículas de PLGA, Johnson e cols. avaliaram a estabilidade da proteína encapsuladas em polímeros de diferentes pesos moleculares, diferentes terminações poliméricas e diferentes quantidades de zinco. Ainda, os parâmetros de liberação de rhGH *in vivo* foram determinados após administração subcutânea das microesferas de PLGA em ratos e macacos *rhesus*. As análises da estabilidade e bioatividade da proteína de 3 diferentes formulações de microesferas de PLGA mostraram características similares à proteína previamente ao encapsulamento. *In vivo*, a administração subcutânea das microesferas aos animais induziu níveis elevados de Ghrh por até um mês. O taxa de proteína (rhGH) liberada diferiu entre as três formulações e foi determinada pelo peso molecular e hidrofobicidade do PLGA. Os níveis plasmáticos de rhGH, após 3 doses sequenciais mensais de uma das formulações, foram reproduzíveis e não demonstraram acumulação da dose. Tais dados provam a estabilidade da proteínas nas matrizes de PLGA⁶⁷.

Afim de desenvolver formulações que pudessem estabilizar as proteínas recombinantes humanas, entre elas o rhGH, em solventes orgânicos utilizados

para encapsulamento destas proteínas, Cleland e Jones realizaram um estudo em que diversos excipientes foram testados para avaliar a máxima solubilidade de cada proteína recombinante estudadas. Os resultados mostram que a estabilidade de certas formulações correlacionaram de forma similar com a estabilidade obtida durante o encapsulamento em microesferas de PLGA. A proteína foi liberada da microesfera em sua forma nativa, demonstrando a estabilidade da formulação⁶⁸.

Ainda, corroborando com os estudos acima, um outro estudo de Cleland e colaboradores comparou as características de degradação do rhGH incorporado a matrizes de PLGA a degradação do rhGH puro em solução. Os autores mostraram que as formulações de PLGA demonstraram uma liberação contínua de rhGH por 30 dias e que as taxas de oxidação e deaminação do rhGH incorporado em partículas de PLGA foram equivalentes àquelas ocorridas no rhGH puro quando colocados em solução tampão (pH 7.4) a 37°C. Assim, os autores concluíram que o rhGH foi incorporado ao PLGA de forma bem sucedida e que a liberação e degradação química do rhGH não foram afetadas pela presença do PLGA, indicando que o ambiente interno das matrizes são fisiológicos para a incorporação de rhGH⁶⁶.

2.6 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL

A espectrofotometria é o método de análises óptico mais usados em investigações biológicas e físico-químicas. O espectrofotômetro é um instrumento que permite comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto e uma quantidade conhecida da mesma substância⁷⁰.

A capacidade que as diversas substâncias químicas têm de absorverem luz em determinados comprimentos de onda pode ser utilizada para a sua determinação quantitativa e qualitativa, uma vez que o espectro de absorção é característico para uma determinada substância e a quantidade de absorção (intensidade) é dependente da concentração do composto. A relação da

absorbância (A) com a concentração da substância é representada pela Lei de Lambert-Beer: “A absorvância (A) de uma substância é proporcional à concentração da substância na solução e à distância percorrida pelo feixe luminoso que atravessa a solução (caminho óptico)”.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c,$$

Onde:

ϵ = coeficiente extinção molar, que é constante para cada substância, A = definido como a absorbância da substância em um determinado comprimento de onda (λ) numa cubeta de caminho óptico (l) = 01 cm (largura da cubeta) e c = à concentração da solução. A absorbância é uma função linear da concentração. Assim, para uma mesma substância, considerando-se o caminho óptico constante, a absorbância é diretamente proporcional à concentração desta substância. Os pontos experimentais são obtidos pela leitura de uma propriedade que varia em função da concentração do analito, ou seja, da molécula a ser mensurada^{71,72}. A propriedade medida é chamada de sinal do instrumento, que no caso deste estudo, será a absorbância. De acordo com a literatura, proteínas apresentam pico de absorbância em ultravioleta de 214 a 280nm. Esse valor é diretamente proporcional ao seu conteúdo proteico. Ainda, de acordo com a literatura, a absorbância do hormônio puro é de 214 a 286nm, sendo similar a absorbância em ultravioleta para detecção de outras moléculas proteicas. Em geral, considera-se que uma leitura de 1,0 A_{280} equivale a uma concentração de 1 mg/mL⁷¹.

Dentre os tipos de espectrofotometria, pode-se citar a espectrofotometria atômica, onde rede de difração são utilizadas para estudar o espectro de energia da radiação eletromagnética dos astros coletada nos telescópios; espectrofotometria de absorção atômica, que é um método de análise usado para determinar qualitativamente e quantitativamente a presença de metais; espectrofotometria no infravermelho e a espectrofotometria no ultravioleta-visível, que envolvem a espectroscopia de fótons e se destinam para a detecção de compostos orgânicos. Dentre a duas ultimas, a espectrofotometria UV-visível

é largamente usada tanto na indústria quanto na pesquisa científica pois ela é uma técnica rápida e confiável para medidas, controle de qualidade e análises dinâmicas biológicas e físico-químicas. O instrumento usado na espectroscopia UV-visível é chamado de espectrofotômetro UV-visível. Para se obter informação sobre a absorção de uma amostra, ela é inserida no caminho óptico do aparelho. Então, luz UV e/ou visível em um certo comprimento de onda (ou uma faixa de comprimento de ondas) é passada pela amostra gerando um espectro UV-visível, que se constituiu essencialmente de um gráfico da absorbância versus o comprimento de onda na faixa do UV e/ou visível. O espectrofotômetro mede o quanto a luz foi absorvida pela amostra. Apesar de as amostras poderem ser sólidas (ou mesmo gasosas), elas usualmente são líquidas. Uma cela transparente (ou seja, que não absorve radiação na faixa de comprimentos de onda usada), comumente chamada de cubeta, é enchida com a amostra líquida e inserida no espectrofotômetro. O caminho óptico pela amostra é então a largura da cubeta. Espectrofotômetros mais simples (econômicos) usam cubetas com a forma cilíndrica (tubos de ensaio), porém, os mais sofisticados usam cubetas retangulares, geralmente com uma largura de 1cm. Para espectroscopia apenas no visível, simples cubetas de vidro podem ser usadas, porém a espectroscopia no ultravioleta requer cubetas especiais feitas de um material que (ao contrário do vidro) não absorva luz UV, como o quartzo⁷³. A figura 2 mostra um desenho esquemático que simula o funcionamento de um espectrofotômetro UV-visível.

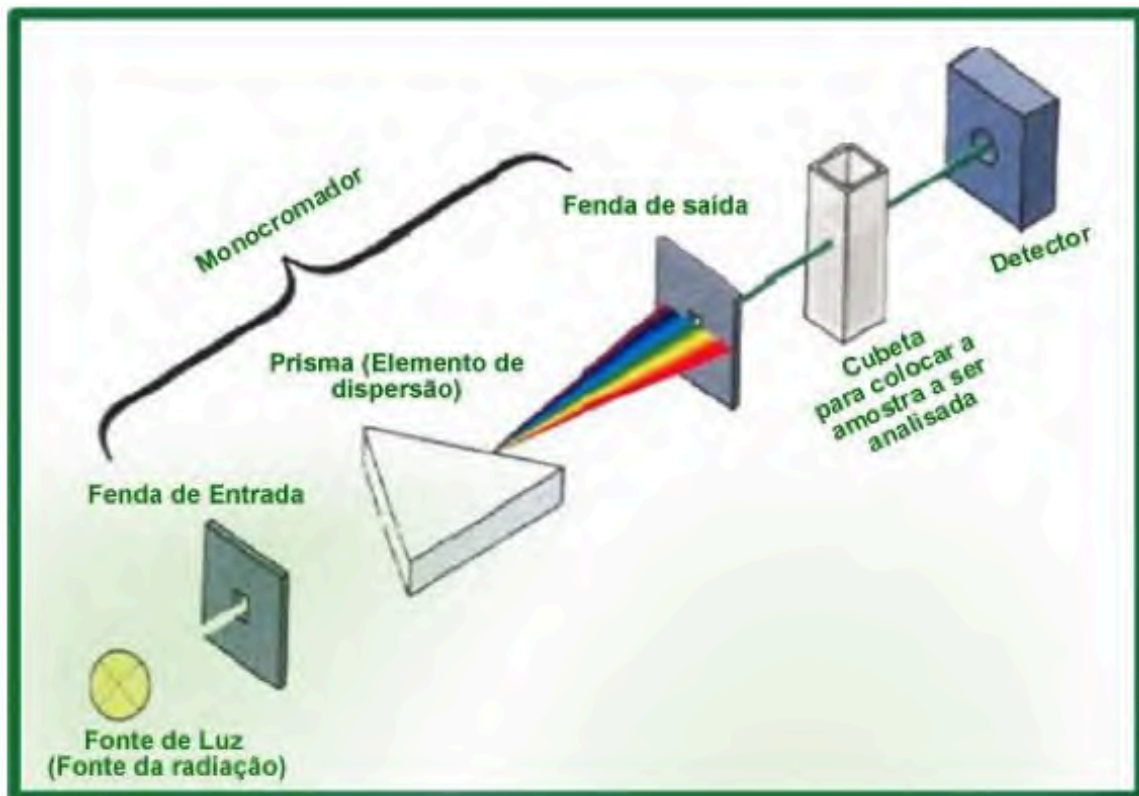


Figura 2: Desenho esquemático – Espectrofotometria UV-Visível.

Disponível em: <http://quimicandovp.wordpress.com/category/espectrofotometria-uvvisivel>

2.7 PH E MENSURAÇÃO DE PH – PHMETRIA

Em química, pH é uma medida da acidez ou basicidade de uma solução aquosa. As soluções com um pH inferior a 7 são ditas ácidos e soluções com um pH superior a 7 são básicas ou alcalinos. A água pura tem um pH muito próximo a 7. A escala do pH é feita com base em um conjunto de soluções padrão cujo pH é estabelecido por acordo internacional⁷⁴. Os valores de pH padrão são determinadas utilizando uma célula de concentração de transferência, através da medição da diferença de potencial entre um eletrodo de hidrogênio e um eletrodo padrão, tal como o eletrodo de cloreto de prata. Matematicamente, o pH é um logaritmo negativo da atividade do íon hidrogênio, mais frequentemente expressos como a medida da concentração do íons hidrogênio O pH irá indicar se a solução é ácida ou básica, mas não é uma medida da acidez ou alcalinidade. Aparelhos medidores de pH trabalham em líquidos, embora sondas

especiais são por vezes utilizadas para medir o pH de substâncias semi-sólidas. Um medidor de pH típico é constituído por uma sonda de medição especial (um eléctrodo de vidro) ligado a um medidor eletrónico que mede e apresenta a leitura de pH. Para que haja uma leitura precisa, o medidor de pH deve ser calibrado antes de cada medição. A calibração deve ser realizada previamente a cada utilização, com pelo menos duas soluções tampão padrão que abrangem a gama de valores de pH a ser medido. Para propósitos gerais tampões a pH 4,01 e pH 10,00 são aceitáveis. Mensurações de pH são importantes na medicina, biologia, química, agricultura, engenharia dos alimentos, ciências ambientais, oceanografia, engenharia civil, engenharia química, nutrição, tratamento e purificação de água, entre muitas outras aplicações^{74,75}.

2.8 TEMPERATURA X CONSERVAÇÃO DE MOLÉCULAS

A estabilidade de um medicamento é a extensão em que ele mantém as mesmas propriedades e características que possuía no momento de sua fabricação, ou seja, é a propriedade de um produto em preservar as mesmas características físicas, químicas e farmacológicas durante seu período de vida útil, representado pelo prazo de validade. Esta estabilidade depende de fatores ambientais como temperatura, luz e umidade e de fatores relacionados ao próprio produto como forma farmacêutica, processo de fabricação, material de embalagem e propriedades físicas e químicas das substâncias ativas e dos excipientes. Operações de transporte, armazenamento e administração realizadas em condições diferentes das recomendadas pelo fabricante aumentam a possibilidade de ocorrerem alterações indesejadas como diminuição da atividade terapêutica e aumento do risco de efeitos tóxicos.

Os principais fatores ambientais controláveis que interferem na estabilidade dos medicamentos são a temperatura, a luminosidade e a umidade, uma vez que as reações químicas e biológicas geralmente são aceleradas com o aumento dos valores destes fatores. Dentre eles, a temperatura é a condição

ambiental responsável pelo maior número de alterações e deteriorações dos medicamentos.

2.8.1 Temperatura x Conservação de moléculas

Temperatura, seja calor ou frio, é ainda uma das mais importantes ferramentas para tratamento de doenças na medicina moderna. Pesquisa recente sobre a termoestabilidade de compostos e moléculas em diversas temperaturas tem focado em destruir ou estabilizar células/tecidos doentes. O uso de temperaturas consideravelmente baixas para lesar tecidos ou células indesejáveis é chamado de criocirurgia/crioablação/crioterapia, enquanto o uso de temperaturas consideravelmente altas para o mesmo propósito é chamado de termocirurgia/termoablação/termoterapia. Para aplicações de estabilidade (biopreservação), diferentes termos como criopreservação, preservação hipotérmica e preservação seca ou liopreservação são utilizados para temperaturas abaixo de -80°C , aproximadamente 4°C e temperatura ambiente, respectivamente. No entanto, há uma diferenciação de conceitos entre preservação hipotérmica e liopreservação, já que o primeiro termo se destina a preservação completa de tecidos ou órgãos hidratados em um curto período de tempo, normalmente dias ou semanas, enquanto o segundo termo (liopreservação) foca em estabilizar moléculas em um período de tempo prolongado (meses ou anos), em um estado desidratado⁷⁶⁻⁷⁸.

2.8.2 Estabilização térmica

O objetivo da estabilização térmica (ou biopreservação) é preservar moléculas importantes, como biomoléculas, células, tecidos e órgãos para uso futuro. Para estabilização em curto prazo, moléculas são normalmente resfriadas a temperaturas próximas de 4°C (preservação hipotérmica), sem congelamento. O intuito é desacelerar o metabolismo e degradação das moléculas a fim de estender seu tempo de armazenamento para dias ou semanas previamente ao seu uso. Estudos reportando o uso da preservação hipotérmica focam em

preservar órgãos, já que sua estabilização a longo-prazo não é aplicável. Para estabilização a longo prazo, entretanto, moléculas (proteínas, células e pequenas porções de tecidos) são normalmente estabilizados em uma fase vítrea, que é um estado termodinamicamente estável com alta viscosidade e baixa atividade molecular. Assim, qualquer processo que requer degradação destas moléculas estabilizadas são suspensas enquanto esta estiver em seu estado vítreo. Diversos métodos são utilizados para transformar tais moléculas de seu estado aquoso em temperaturas ambientes em fase vítrea em temperatura refrigerada (criopreservação) ou mesmo em temperatura ambiente (liopreservação)⁷⁶.

Dentre os métodos de criopreservação, os mais utilizados são o método do congelamento lento convencional, onde há inevitavelmente formação de gelo; e o método da vitrificação, que é livre da formação de gelo⁷⁸. Já entre os métodos de liopreservação, também há 2 métodos que se destacam para transformar moléculas do estado aquoso para o estado seco: congelamento-secagem, também chamado de liofilização; e evaporação, também chamado de dissecação. No primeiro método, uma amostra biológica (ex: proteínas) em solução aquosa são primeiramente suplantadas com lioprotetoras (ex: trealose), para então ser resfriada a uma temperatura entre -3°C e -7°C . A amostra é então resfriada lentamente de forma mais intensa, até atingir temperaturas entre -30°C e -50°C ; e depois passa por dois ciclos de secagem, o primeiro através da exposição da substância a uma câmara de vácuo (secagem primária); e a segunda através do aquecimento lento das amostras até a temperatura ambiente, permitindo a desidratação das amostras por horas ou dias. As amostras são então embaladas e preservadas no estado seco em temperatura ambiente até seu uso futuro. Este método de congelamento-secagem (liofilização) é usado de forma efetiva para liopreservação de diversas macromoléculas biológicas como proteínas e lipídeos, além de muitos compostos farmacêuticos. Já no segundo método (evaporação), a água é removida pela exposição da amostra em ambiente seco (vácuo ou câmara de gás inerte – nitrogênio), sem congelamento (formação de gelo). Tal método

também tem sido utilizado para promover liopreservação de macromoléculas biológicas como proteínas e lipídios, além das substâncias farmacêuticas^{79,80}.

Um estudo de Kang e colaboradores reportou a influência da temperatura durante o processo de fabricação de microesferas de PLGA incorporadas com rhGH. Os autores concluíram que, utilizando baixas temperaturas (0°C) durante a incorporação do rhGH ao PLGA, houve liberação sustentada e constante de rhGH das microsferas, com mínimos picos excessivos de liberação. Ainda, a injeção subcutânea destas microesferas em ratos laboratoriais demonstrou concentrações plasmáticas estáveis por 30 dias, evitando as flutuações na concentração da droga. No entanto, este estudo não se destinou a comparar este método de fabricação das matrizes com um método em que não houve controle da temperatura ou um método em que a fabricação se deu em temperatura ambiente, questionando assim a relevância do estudo⁸¹.

De acordo com a bula do produto Purasorb® – PLGA 50:50, recomenda-se armazenamento em baixa temperatura (ambiente refrigerado) e sob pressão atmosférica normal (inerte) após a abertura da embalagem. Ainda, também de acordo com a bula do produto Saizen®, após a reconstituição deste agente, a solução deve ser conservada sob refrigeração, protegida da luz e em temperatura entre 2°C e 8°C, sem congelar. Nesta formulação comercial, o rhGH é apresentado em forma de pó liofilizado, ou seja, já liopreservado.

No entanto, há uma escassez de estudos na literatura científica que se destinam a estudar a estabilidade do PLGA e do rhGH, após reconstituição destes produtos, quando estes padrões de temperatura são mantidos ou alterados⁸². Ainda, há uma escassez de informações fornecidas pelos próprios fabricantes dos produtos e também na literatura científica sobre a estabilidade destas moléculas quando armazenadas por determinados períodos de tempo após a sua reconstituição do rhGH e/ou dissolução das partículas de PLGA.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

3.1.1 Avaliar a estabilidade *in vitro* do hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) encapsulado em matrizes de PLGA durante o armazenamento da matriz previamente ao seu uso clínico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar o tempo de estabilidade do rhGH encapsulado em matrizes de PLGA quando estas são armazenadas por diferentes períodos de tempo;

3.2.2 Comparar a estabilidade do rhGH encapsulado na matriz de PLGA quando esta é armazenada em temperatura ambiente *versus* armazenamento em ambiente refrigerado;

3.2.3 Correlacionar o pH da solução de degradação das formulações testes armazenadas por diferentes períodos de tempo e em temperaturas diferentes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 PLGA

Para confecção das matrizes foi utilizado PLGA comercial (Purasorb®– PURAC, Gorinchem, Holanda) em proporção 50:50 e viscosidade intrínseca de 1.0dl/g (figura 3). Tal material apresenta um peso molecular de 120KDa. A apresentação farmacêutica é na forma de pó e, segundo o fabricante, quando armazenado na embalagem original sob baixas temperaturas (-15°C), tal material mantém suas propriedades originais por até 3 anos; e, quando armazenado em temperatura ambiente, suas propriedades podem ser mantidas por até 1 ano. Ainda de acordo com o fabricante, previamente a abertura da embalagem do material, recomenda-se que se aguarde até o material atingir a temperatura ambiente e, após abertura da embalagem, recomenda-se armazenamento em baixa temperatura (ambiente refrigerado) e sob pressão atmosférica normal (inerte).

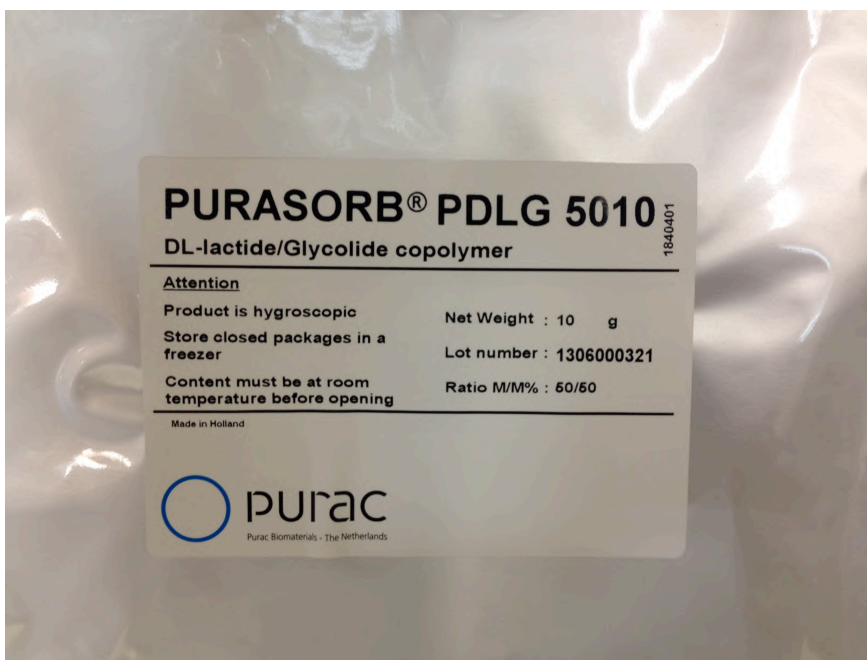


Figura 3: Ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) - Purasorb®– PURAC

4.1.2 Hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH)

Será utilizado, nesse estudo, o hormônio do crescimento humano recombinante (Saizen[®], Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça), sob forma de pó liofilizado (frasco-ampola), em que, conforme informações na bula do fármaco, cada frasco-ampola contém 1,33 mg (4 UI) de rhGH, e excipientes de manitol 20,0 mg, fosfato dissódico dihidratado 2,0-2,4 mg e fosfato monossódico monohidratado 0,30-0,40 mg (figuras 4a e 4b).

Segundo o fabricante, Saizen[®] 1,33mg (4UI) pó liofilizado é válido por 24 meses, quando mantido no frasco-ampola e em temperatura entre 2°C e 8°C. Após a reconstituição deste agente em água para injeção, a solução deve ser conservada sob refrigeração, protegida da luz e em temperatura entre 2°C e 8°C, sem congelar. Ainda, após a reconstituição (em água para injeção), este medicamento deve ser utilizado em até 24 horas.

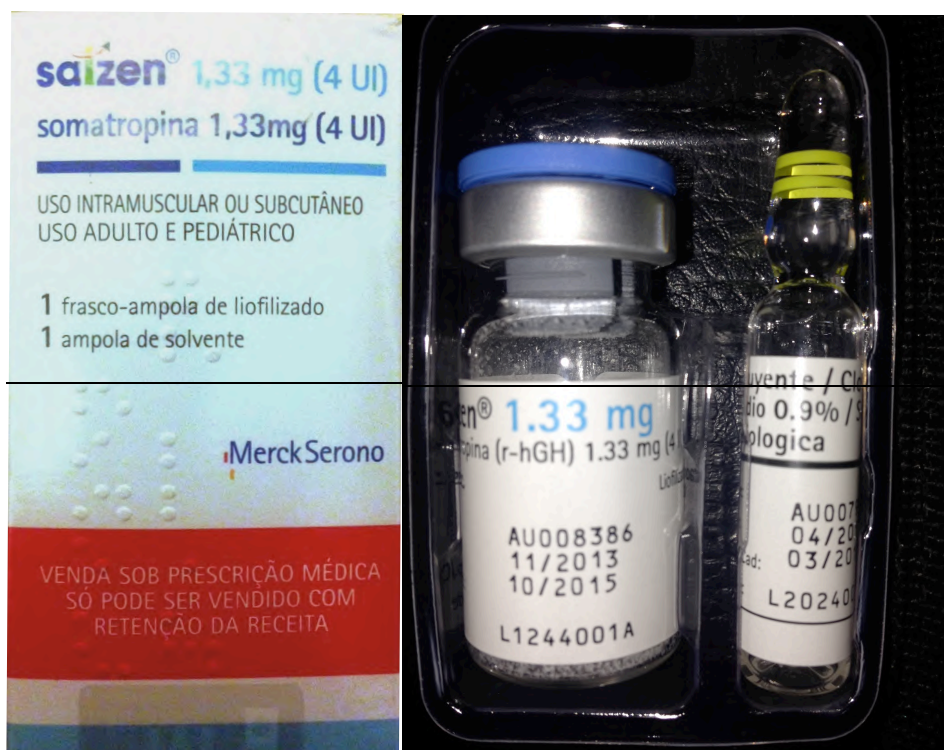


Figura 4: Hormônio de crescimento humano recombinante - Saizen[®]

4.2 MÉTODOS:

4.2.1 Preparação das matrizes

As matrizes de PLGA puro e matrizes de PLGA contendo rhGH liofilizado foram confeccionadas no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR), da Faculdade de Química da PUCRS, sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Rosane Angélica Ligabue.

Para a confecção de matrizes puras de PLGA 50:50, 7.5g de Purasorb®-PURAC 50:50 foram misturados com 30ml de tetrahidrofurano (THF), em uma proporção de aproximadamente 1:4 entre gramas de PLGA e mililitros de THF. Essa mistura permaneceu sob agitação magnética por 90 minutos, até dissolução completa do PLGA em THF e a mistura foi vertida em moldes de silicone de 10mm de diâmetro e 2mm de altura. Um total de 27 matrizes foram confeccionadas seguindo este método.

Previamente à confecção das matrizes de PLGA + rhGH, a quantidade de hormônio a ser utilizada foi misturada com acetato de zinco na proporção 1:6 (rhGh: acetato de zinco), respectivamente, sendo a mistura imersa em aproximadamente 2ml de THF, permanecendo sob agitação mecânica por 5 minutos. Após, 28ml de THF foram misturados a 7,5g de PLGA, em uma proporção de aproximadamente 1:4 entre gramas de PLGA e mililitros de THF. Essa mistura ficou sob agitação magnética por aproximadamente 90 minutos, até total dissolução das partículas de PLGA e rhGH no solvente utilizado – THF. Ainda, a esta mistura, foram adicionados 1 ampola de Saizen[®], contendo 1,33mg de rhGH, já misturado com 0.221mg de acetato de zinco e 1ml de THF, e a mistura foi levada para homogeneização por 15 minutos em um dispersor Ultra Turrax IKA[®], na velocidade de 3.600 rpm (figura 5). A mistura então foi vertida em moldes de silicone de 10mm de diâmetro e 2mm de altura. Da mesma forma que as matrizes puras, um total de 27 matrizes foram confeccionadas seguindo tal método (figuras 6a e 6b).

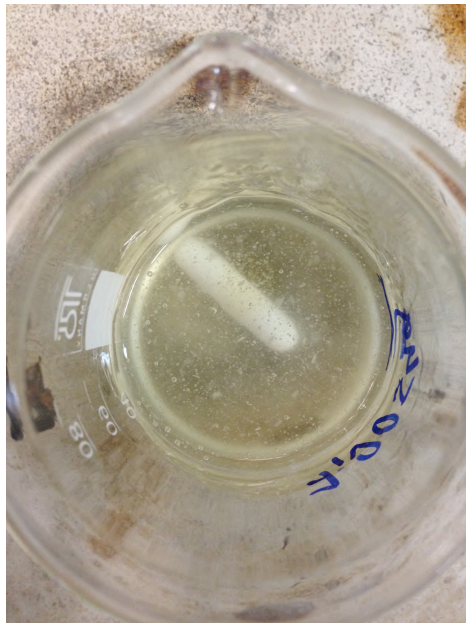


Figura 5: Agitação magnética da mistura rhGH + PLGA em solvente (THF)

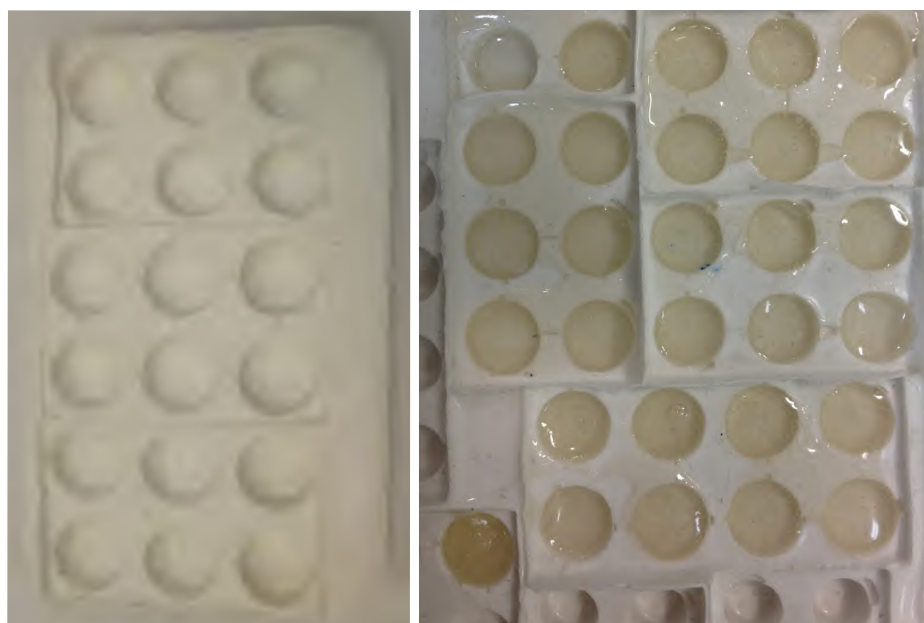


Figura 6: Moldes de silicone onde as matrizes de PLGA e PLGA + rhGh foram vertidas. Dimensão = 10mm de diâmetro x 2mm de profundidade

As matrizes foram preparadas com o auxílio de um extensômetro de 700 μm . Após, foram acondicionados em uma câmara de evaporação de solvente, à temperatura ambiente, onde as matrizes foram secas por meio de arraste

forçado pela ação de gás nitrogênio, permanecendo nesta câmara até que tivessem completamente secas.

4.2.2 Agrupamento das amostras

Foram confeccionadas 27 matrizes de PLGA + rhGH (formulação teste) e 27 matrizes de PLGA puro (formulação controle), conforme técnica supracitada.

Após pesagem das amostras em balança de precisão (Mettler-Toledo Ind. e Com. Ltda, Barueri, SP, Brasil) 24 amostras contendo PLGA + rhGH foram embaladas individualmente em papel grau cirúrgico e então divididas igualmente em 4 grupos, denominados de grupo **I**, **II**, **III** e **IV**, com cada grupo contendo 6 amostras. As amostras do grupo I foram armazenadas por 7 dias previamente a sua degradação. As amostras do grupo II, por 14 dias; do grupo III por 21 dias e do grupo IV, por 28 dias. Ainda, dentro de cada grupo, as amostras foram subdivididas em dois subgrupos contendo 3 amostras cada, denominados de subgrupo **A (ambiente)**, em que foram armazenadas em temperatura ambiente, e subgrupo **F (frio)**, em que foram armazenadas em ambiente refrigerado (entre 2°C e 8°C). As 3 matrizes restantes (alocadas em um grupo separado denominado grupo 0) não foram armazenadas, sendo colocadas em tubos de ensaio específicos para degradação logo após sua confecção. Vinte e quatro das 27 matrizes confeccionadas em PLGA puro foram pesadas, embaladas e agrupadas da mesma maneira que as matrizes contendo rhGH, em grupos **I**, **II**, **III** e **IV** e subgrupos **A** e **F**, sendo que as 3 restantes não foram armazenadas, mas colocadas em tubos de ensaios específicos para degradação logo após sua confecção. A alocação das matrizes em grupos e subgrupos foi realizada de forma aleatória, através de numeração das matrizes e sorteio simples entre os números colocados em uma urna fechada.

O quadro 1 mostra a divisão dos grupos e subgrupos e o número de matrizes contidas em cada grupo/subgrupo.

Grupo/Subgrupo	Subgrupo A	Subgrupo F
Grupo 0 (degradação imediata)	3 matrizes PLGA + rhGH 3 matrizes PLGA	0 matrizes
Grupo I (7 dias de armazenamento)	3 matrizes PLGA + rhGH 3 matrizes PLGA	3 matrizes PLGA + rhGH 3 matrizes PLGA
Grupo II (14 dias de armazenamento)	3 matrizes PLGA + rhGH 3 matrizes PLGA	3 matrizes PLGA + rhGH 3 matrizes PLGA
Grupo III (21 dias de armazenamento)	3 matrizes PLGA + rhGH 3 matrizes PLGA	3 matrizes PLGA + rhGH 3 matrizes PLGA
Grupo IV (28 dias de armazenamento)	3 matrizes PLGA + rhGH 3 matrizes PLGA	3 matrizes PLGA + rhGH 3 matrizes PLGA

Quadro 1: divisão dos grupos e alocação das amostras em cada grupo e subgrupo do estudo.

4.2.3 Degradação hidrolítica das matrizes

As amostras foram submetidas à degradação hidrolítica no intuito de simular *in vitro* as condições *in vivo*. Inicialmente, as matrizes foram imersas em 9ml de solução tampão fosfato salino, PBS, (pH 7,4), dentro de tubos de ensaio (previamente esterilizados com óxido de etileno) (figura 7). Em seguida, os tubos foram expostos a um banho termostatizado, marca Biomatic, a 37°C. Respeitando o tempo e a temperatura de armazenamento de cada grupo e subgrupo, exceto o grupo 0, as amostras foram colocadas em banho termostático permanecendo no banho durante um tempo pré-determinado. Afim de cumprir o objetivo da pesquisa de avaliar a estabilidade do rhGh incorporado a matrizes de PLGA dentro do grupo teste, comparando diferentes tempos e temperatura de armazenamento, as matrizes foram degradadas por um período de 21 dias; sendo que nos dias 1, 2, 3 e 4 a solução tampão foi substituída diariamente por nova solução PBS; e o sobrenadante removido foi analisado em espectrofotômetro UV visível Cary 1E (Varian, Palo Alto, Estados Unidos) com pico de absorvância de 280nm, para calcular inicialmente o pico de absorvância da solução e, a partir desta, a concentração de rhGH liberado naquele dia específico. Logo após, o pH desta solução também foi mensurado em aparelho

específico para este fim (Mettler-Toledo Ind. e Com. Ltda, Barueri, SP, Brasil). Após o quarto dia, as matrizes permaneceram em degradação em banho termostaticado por mais três dias consecutivos sem troca da solução tampão. No 7º dia então, mais uma vez o sobrenadante foi removido e levado para análise de espectrofotômetro de absorção ultra-violeta (UV) visível e mensuração de pH, e as matrizes foram imersas em nova solução tampão. Nos dias 8 e 9 repetiu-se a troca diária da solução tampão e avaliação do sobrenadante. A partir do dia 9, as matrizes permaneceram em degradação até o 14º dia sem substituição da solução tampão. Neste dia, realizou-se nova troca de solução e o sobrenadante removido foi avaliado para os mesmos testes supracitados. Novamente, permitiu-se degradação ininterrupta do 14º ao 21º dia, sem troca da solução tampão. Neste último dia, novamente o sobrenadante foi removido do tubo de ensaio e levado para análise de absorbância em espectrofotômetro UV visível e mensuração de pH. Este protocolo de degradação foi idêntico para o grupo teste (PLGA + rhGH) e grupo controle (PLGA) O teste de degradação hidrolítica foi realizados conforme a norma ASTM F1635 de 2010⁸³.



Figura 7: imersão das matrizes em solução tampão fosfato salino dentro de tubos de ensaio.

Enfatiza-se que, após cada período de tempo relatado em que se realizou substituição da solução tampão, as amostras foram retiradas do banho e a solução tampão PBS sobrenadante removida foi então encaminhada para análise em espectrofotômetro de absorção ultra-violeta (UV) visível com pico de absorbância de 280nm; no intuito de, através dos valores de absorbância calcular a concentração de hormônio de crescimento liberado naquele determinado período de tempo e, após este teste, submetida ao teste de pHmetria. Todas as análises de espectrofotometria e phmetria foram realizadas no Instituto de Toxicologia (INTOX) da PUCRS. As matrizes que permaneceram dentro dos tubos de ensaio foram imersas em nova solução tampão PBS e recolocadas no banho termostatizado a 37°C até a próxima mensuração, onde se repetiu o processo de substituição da solução tampão e análise da solução removida.

4.2.4 Determinação da quantidade de rhGH incorporado na matriz de PLGA

Através da Lei de Lambert-Beer obteve-se a absorbância (A) de cada amostra analisada pelo espectrofotômetro. Para cada análise, três valores de absorbância foram mensurados⁶⁹, sendo a média da triplicata considerada o valor final de absorbância de cada avaliação. Ainda, por se tratar de matrizes com pesos diferentes e portanto com diferentes concentrações de rhGH, uma média aritmética do valor final de ABS para cada uma das três matrizes da mesma formulação também foi realizada, obtendo então um único valor médio de absorbância para cada formulação de três matrizes. Tais médias foram calculadas para os dois grupos gerais de amostras (formulação teste e formulação controle). Por fim, no intuito de se ter um valor final de absorbância, calculou-se a diferença entre as médias obtidas na formulação controle com as médias obtidas na formulação teste. Assim, os valores de absorbância obtidos para as matrizes de PLGA + rhGh foram descontados dos valores obtidos para as matrizes de PLGA puro; e o valor final foi utilizado para o cálculo da

concentração de rhGH liberada das matrizes em determinado período de tempo, através da equação obtida na curva de calibração. O método de identificação da concentração da proteína por espectrometria UV-visível é validado de acordo com as diretrizes da International Conference on Harmonization (ICH).

Um exemplo deste cálculo pode ser demonstrado como:

Grupo I, subgrupo A, considerando matrizes 1,2 e 3 do grupo teste (PLGA + rhGH) e as matrizes 4,5 e 6 do grupo controle (PLGA):

	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 4	Matriz 5	matriz 6
Valores de ABS	0.0574	0.0501	0.0510	0.0472	0.0408	0.0425
	0.0573	0.0506	0.0502	0.0473	0.0403	0.0415
	0.057	0.0505	0.0503	0.0474	0.0402	0.0419
Média ABS	0.0572	0.0504	0.0505	0.0473	0.0404	0.0419
Média matrizes 1-2-3	0.0527					
Média matrizes 4-5-6	0.0432					

Média matriz (PLGA + rhGH) - (PLGA)	0.0095
--	---------------

4.6 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Previamente à leitura da mensuração da quantidade de rhGH incorporado a cada matriz e sua degradação, foi realizada uma curva de calibração com uma solução e uma quantidade de hormônio (rhGH) já previamente estipulada, a fim de estabelecer uma equação do gráfico formado e tal equação foi utilizada como parâmetro para quantificar a concentração de hormônio liberada durante os dias de degradação hidrolítica para as diferentes amostras do estudo.

Para a realização desta curva, foi diluído uma ampola de Saizen®, contendo 1,33mg de rhGH em 10ml de solução tampão PBS. A partir da solução mãe, foram realizadas 7 diluições (2x, 4x, 8x, 16x, 32x, 64x e 128x), obtendo assim concentrações conhecidas de rhGH nestas diluições. Essas soluções foram submetidas a espectrofotometria de absorção UV – visível, em um comprimento de onda padrão (pico de absorbância) de 280nm, gerando valores de absorbância condizentes com a concentração de rhGH em cada uma das

soluções diluídas avaliadas. Assim, para cada valor de absorvância constatou-se uma concentração compatível de rhGH, gerando dados para a construção da curva de calibração.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As concentrações de rhGH liberadas das amostras foram calculadas através de uma curva de calibração que foi obtida para a concentração da droga em um pico de absorvância estipulado na análise com o aparelho de espectrofotometria acima mencionado. Para análise estatística foi utilizado o software SPSS®, versão 17.0, (Microsoft Corporation, EUA) e para avaliação das diferenças intra-grupos e inter-grupos foram utilizados os métodos estatísticos teste *t* de *Student*, ANOVA e testes Post Hoc de Bonferroni. Em todos os testes estatísticos utilizados, o nível de significância foi de 5%.

5. RESULTADOS

Todos os resultados deste estudo foram confirmados por testes estatísticos específicos. No intuito de eliminar qualquer margem para ocorrência de viés nos resultados, todos os testes estatísticos foram efetuados considerando os níveis de absorbância obtidos em análise espectrofotométrica. No entanto, a fim de facilitar o entendimento dos resultados, algumas análises descritivas presentes nesta seção de resultados consideram a concentração de hormônio liberada nos períodos avaliados, que por sua vez, depende do nível de absorbância obtido nas avaliações em espectrofotômetro UV-visível. Já para os resultados de pH, os testes estatísticos consideraram os próprios valores de pH obtidos em análises de phmetria.

5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

A absorbância obtida de cada concentração foi analisada e, através do Programa Microsoft Excel, foi gerado um gráfico da curva de calibração (gráfico 1). Derivar uma curva de calibração significa determinar a equação que melhor se ajusta aos pontos experimentais.

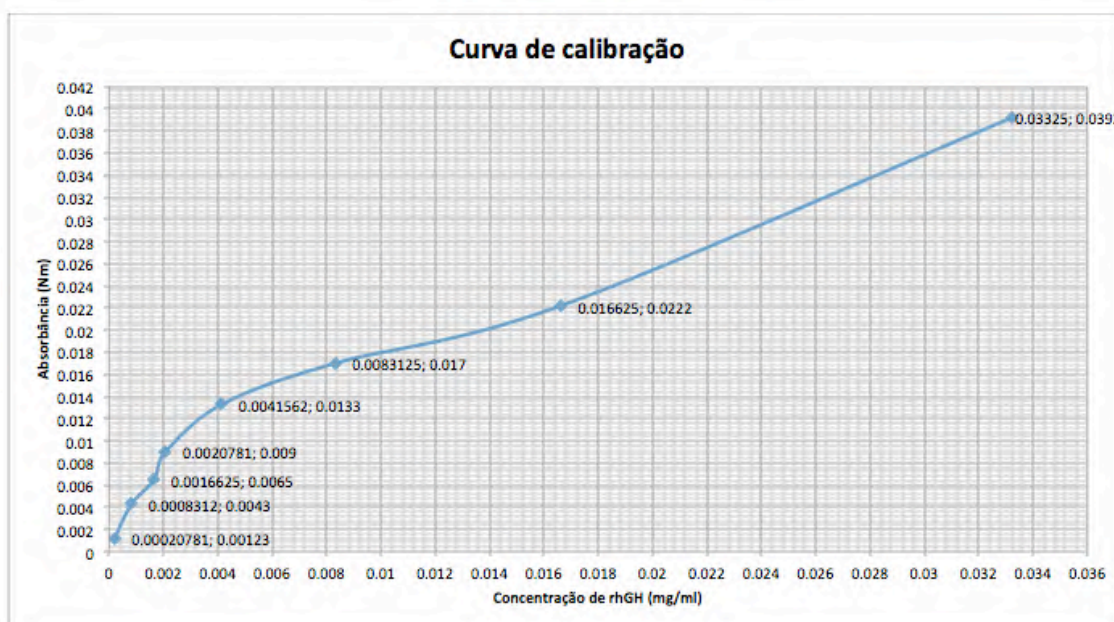


Gráfico 1: Curva de calibração.

5.2 LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO

5.2.1 Influência do tempo de armazenamento na estabilidade do rhGH incorporado nas matrizes de PLGA

Através da Lei de Lambert-Beer obteve-se a absorbância (A) de cada amostra analisada no espectrofotômetro. Para cálculo da absorbância de cada triplicata, primeiramente calculou-se a média entre as três amostras e após calculou-se a diferença entre essa média e a média da absorbância das matrizes controle (sem rhGH). Dessa forma, chegou-se ao valor da média de absorbância de cada grupo (tabela 1).

	Média ABS	Erro padrão
Grupo 0	0.0407	0.00276
Grupo I	0.0457	0.00222
Grupo II	0.0434	0.00172
Grupo III	0.0448	0.00199
Grupo IV	0.0438	0.00155

Tabela 1: valores das médias de absorbância (ABS) e erro padrão para as matrizes correspondentes a cada grupo do estudo.

Por meio da equação obtida na curva de calibração, pode-se obter o valor da concentração de rhGH liberado de cada matriz em determinado período de tempo de degradação. Em geral, sem diferenciar em matrizes armazenadas em temperatura ambiente ou refrigerada, as matrizes armazenadas por diferentes períodos de tempo seguiram o mesmo padrão de liberação de rhGH das matrizes do grupo 0, que foram aquelas que tiveram sua degradação iniciada logo após confecção e portanto podem servir de controle para se avaliar o padrão de degradação e liberação de rhGH das matrizes armazenadas previamente à degradação. Houve liberação de rhGH das matrizes, de forma significativa, até o 14^o dia de degradação, ocorrendo picos de maior e menor liberação. A partir deste dia, não foi observado liberação de rhGH na grande maioria das matrizes do estudo, e apenas o grupo I demonstrou liberação no 21^o

dia; no entanto, foi uma quantidade ínfima e sem valor significativo estatisticamente. Os gráficos 2 e 3 mostram o padrão de liberação das matrizes em cada dia da avaliação da degradação das matrizes, diferenciando os grupos 0, I, II, III e IV.

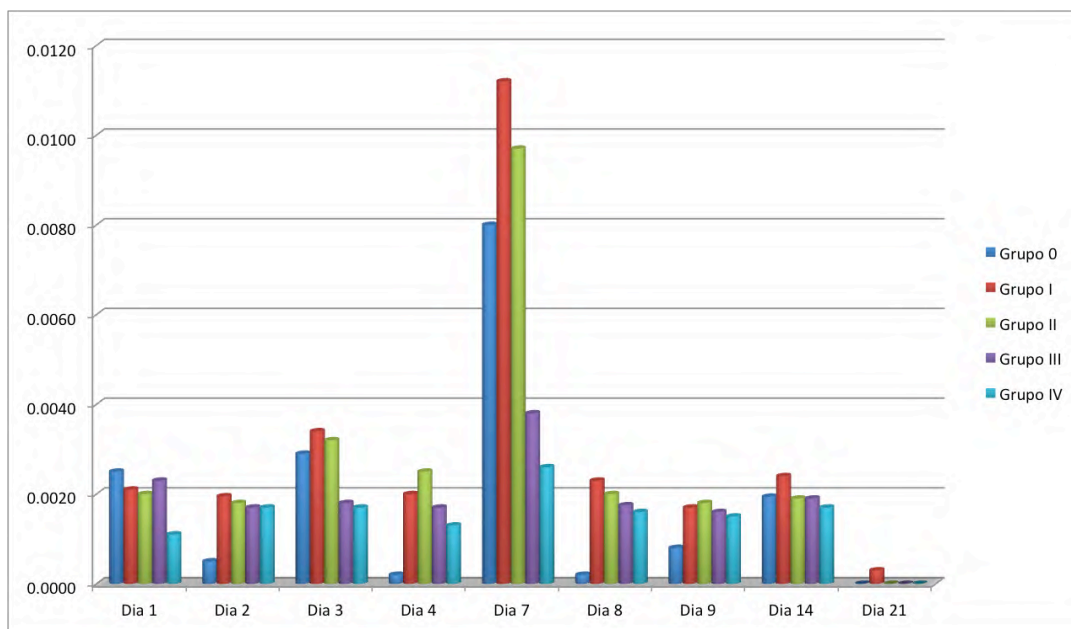


Gráfico 2: demonstração geral do padrão de liberação de rhGH nos diferentes grupos do estudo, considerando os dias de avaliação de degradação das matrizes.

Nota-se ainda que, em geral, todos os grupos seguiram o mesmo padrão de liberação, apresentando um pico significativo de liberação de rhGH no 7º dia de degradação e, nos dias em que houve maior liberação por parte de um grupo, houve a tendência de os outros grupos acompanharem este padrão. Essa relação pode ser observada no 1º, 3º, 7º e 14º dia de avaliação. A mesma tendência ocorreu para os dias de menor liberação, como os dias 2, 4, 9 e 21. Ainda, é notório que, para a grande maioria dos dias de avaliação, o grupo I demonstrou uma maior liberação de rhGH, seguida do grupo II. O grupo 0 apresentou forte oscilação nos valores de concentração de rhGH liberada das matrizes, oscilação esta que não foi acompanhada pelas matrizes armazenadas previamente a sua degradação. Um gráfico linear (gráfico 2) demonstra os achados supracitados.

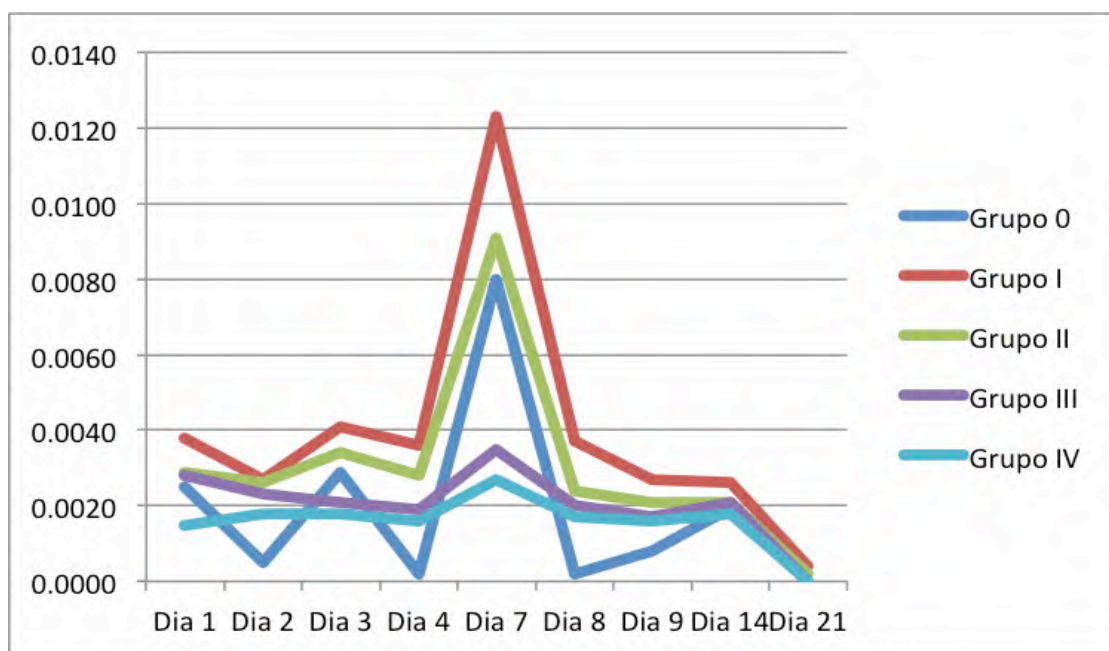


Gráfico 3: demonstração geral do padrão de liberação de rhGH nos diferentes grupos do estudo, considerando os dias de avaliação de degradação das matrizes.

No entanto, considerando as médias dos valores de absorvância mensurados para todas as avaliações espectrofotométricas do estudo, dois testes estatísticos efetuados foram conclusivos, demonstrando não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo, quando $p < 0.05$. A tabela 2 reporta os testes estatísticos realizados entre os grupos do estudo.

Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatística	df	Sig. (p)	Estatística	df	Sig. (p)
ABS 0	,126	27	,200*	,943	27	,146
I	,121	54	,047	,961	54	,078
II	,091	54	,200*	,980	54	,481
III	,132	54	,020	,957	54	,050
IV	,120	54	,052	,950	54	,025

Tabela 2: resultados dos testes estatísticos realizados, considerando todos os valores de absorvância obtidos para as matrizes do estudo

Considerando-se a média dos valores de absorvância para cada grupo do estudo, pode-se afirmar que as matrizes do grupo I apresentaram uma média de

valores de ABS corresponde a 112% do valores apresentados nas matrizes do grupo 0. Já as amostras do grupo II, apresentaram valores médios de ABS correspondentes a 106% dos valores do grupo 0, enquanto os grupos III e IV manifestaram valores correspondentes a 110% e 107%, respectivamente, em relação aos valores do grupo 0. Considerando a mesma relação entre os grupos I, II, III e IV, o grupo II apresentou valores correspondentes a 95% daqueles obtidos para o grupo I, enquanto os valores do grupo III e IV foram correspondentes a 98% e 96%, respectivamente, dos valores de ABS obtidos no grupo I. Ademais, os valores médios de ABS apresentados no grupo III corresponderam a 103% dos números do grupo II, enquanto não houve diferença percentual entre os grupos II e IV. Por último, os valores manifestados no grupo IV corresponderam a 97% dos números apresentados no grupo III para as médias de ABS mensuradas em espectrofotômetro.

No entanto, conforme já mencionado, quando tais valores foram considerados para efetuar testes estatísticos, os mesmos provaram não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos 0, I, II, III e IV. Ainda, quando se considera apenas os valores de ABS dentro de cada subgrupo específico (A e F separadamente), os testes estatísticos reportam nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos I, II, III e IV.

Quando considerado apenas as matrizes que foram armazenadas em temperatura ambiente (subgrupo A), os testes estatísticos demonstram não haver diferença estatisticamente significante entre os grupos do estudo. A tabela 3 exibe os valores médios de ABS para cada grupo do estudo, incluindo o grupo 0. Baseado nestes dados, o teste estatístico ANOVA revelou valor de $p=0,787$. Dentro do intervalo de confiança estabelecido para este estudo ($p<0.05$), este teste revelou não haver diferença estatisticamente significante entre os grupos do estudo. Ademais, quando realizadas comparações múltiplas entre grupos do estudo entre si utilizando teste Post Hoc de Bonferroni, que visa estabelecer uma inter-relação de todos os grupos do estudo entre si, tal teste revelou valores de $p=1,000$ para todas as inter-relações, também confirmando que não há diferença estatística entre os grupos do estudo quando apenas as matrizes do

subgrupo A foram consideradas, conforme mostra a tabela 4.

Grupo Dia	Média	N	Desvio Padrão	Variância
Grupo 0	,0407	27	,01433	,000
Grupo I	,0425	27	,01592	,000
Grupo II	,0415	27	,01309	,000
Grupo III	,0453	27	,01420	,000
Grupo IV	,0433	27	,01304	,000
Total	,0427	135	,01403	,000

Tabela 3: valores das médias de ABS e desvio-padrão para as matrizes do subgrupo A dos grupos 0, I, II, III e IV.

(Grupo Dia	Grupo Dia	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Grupo 0	I	-,00181	,00385	1,000	-,0128	,0092
	II	-,00082	,00385	1,000	-,0118	,0102
	III	-,00463	,00385	1,000	-,0156	,0064
	IV	-,00261	,00385	1,000	-,0136	,0084
Grupo I	0	,00181	,00385	1,000	-,0092	,0128
	II	,00100	,00385	1,000	-,0100	,0120
	III	-,00282	,00385	1,000	-,0138	,0082
	IV	-,00080	,00385	1,000	-,0118	,0102
Grupo II	0	,00082	,00385	1,000	-,0102	,0118
	I	-,00100	,00385	1,000	-,0120	,0100
	III	-,00381	,00385	1,000	-,0148	,0072
	IV	-,00179	,00385	1,000	-,0128	,0092
Grupo III	0	,00463	,00385	1,000	-,0064	,0156
	I	,00282	,00385	1,000	-,0082	,0138
	II	,00381	,00385	1,000	-,0072	,0148
	IV	,00202	,00385	1,000	-,0090	,0130
Grupo IV	0	,00261	,00385	1,000	-,0084	,0136
	I	,00080	,00385	1,000	-,0102	,0118
	II	,00179	,00385	1,000	-,0092	,0128
	III	-,00202	,00385	1,000	-,0130	,0090

Tabela 4: informações de relevância estatística para as matrizes do subgrupo A dos grupos 0, I, II, III e IV. Teste Post Hoc de Bonferroni.

Já para o subgrupo F, a tabela 5 revela os valores médios de ABS para cada grupo. Baseado nestes dados, o teste ANOVA revelou um valor de $p=0,539$, o que confirma não haver diferenças estatisticamente entre os grupos do estudo. Ainda, o teste Post Hoc de Bonferroni confirmou o mesmo resultado de insignificância estatística entre os grupos I, II, III e IV para as matrizes do subgrupo F (tabela 6).

Grupo Dia	Média	N	Desvio Padrão	Variância
Grupo I	,0490	24	,01638	,000
Grupo II	,0453	24	,01215	,000
Grupo III	,0444	24	,01530	,000
Grupo IV	,0442	24	,00972	,000
Total	,0457	96	,01359	,000

Tabela 5: valores das médias de ABS e desvio-padrão para as matrizes do subgrupo F dos grupos I, II, III e IV.

Grupo Dia	Grupo Dia	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Grupo I	II	,00368	,00371	1,000	-,0063	,0137
	III	,00463	,00371	1,000	-,0054	,0146
	IV	,00479	,00371	1,000	-,0052	,0148
Grupo II	I	-,00368	,00371	1,000	-,0137	,0063
	III	,00095	,00371	1,000	-,0090	,0109
	IV	,00111	,00371	1,000	-,0089	,0111
Grupo III	I	-,00463	,00371	1,000	-,0146	,0054
	II	-,00095	,00371	1,000	-,0109	,0090
	IV	,00016	,00371	1,000	-,0098	,0101
Grupo IV	I	-,00479	,00371	1,000	-,0148	,0052
	II	-,00111	,00371	1,000	-,0111	,0089
	III	-,00016	,00371	1,000	-,0101	,0098

Tabela 6: informações de relevância estatística para as matrizes do subgrupo F dos grupos I, II, III e IV. Teste Post Hoc de Bonferroni.

5.2.2 Influência da temperatura de armazenamento incorporado na estabilidade do rhGH incorporado nas matrizes de PLGA

Em geral, sem haver diferenciação entre os grupos, os valores de absorvância foram seguidamente mais altos para aquelas matrizes armazenadas em ambiente refrigerado a 2°C a 8°C, como mostra o gráfico 4. Conseqüentemente, uma maior concentração média de rhGH foi liberada das matrizes armazenadas em ambiente refrigerado (subgrupo F) quando comparadas com as matrizes armazenadas em temperatura ambiente (subgrupo A), como mostra o gráfico 5, que considerou a média de concentração de rhGH liberado das matrizes quando os subgrupos A e F foram mensurados, sem distinção entre os grupos I, II, III e IV. Ademais, as matrizes armazenadas em temperaturas diferentes seguiram padrões similares de liberação de rhGH, demonstrando picos inconstantes de maior e menor liberação de rhGH em diferentes dias de avaliação e manifestando maior pico de absorvância e conseqüentemente maior liberação de rhGH ao 7º dia de degradação, além de leituras de espectrofotometria UV-visível compatível com liberação de rhGH até o 14º dia de liberação apenas.

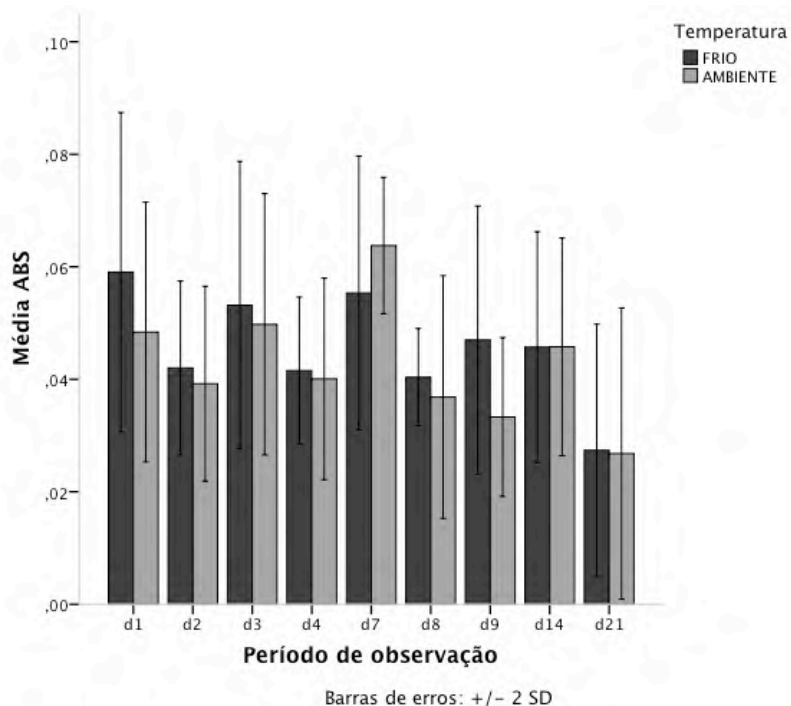


Gráfico 4: comparação entre valores médios de ABS em diferentes dias de avaliação,

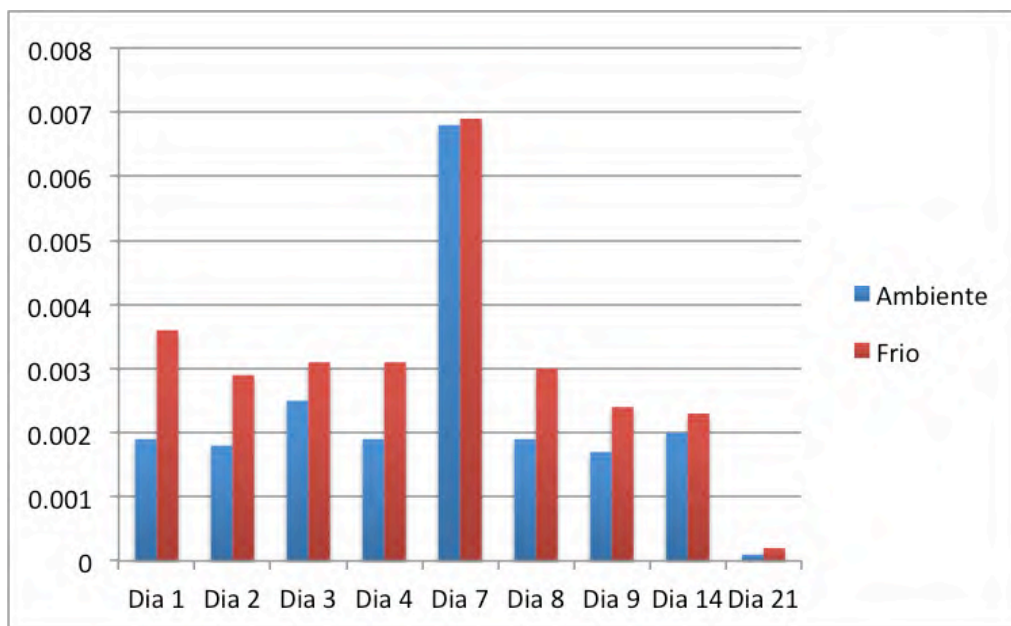


Gráfico 5: comparação entre valores médios de concentração de rhGH liberado das matrizes em diferentes dias de avaliação do estudo para os subgrupos A e subgrupos F.

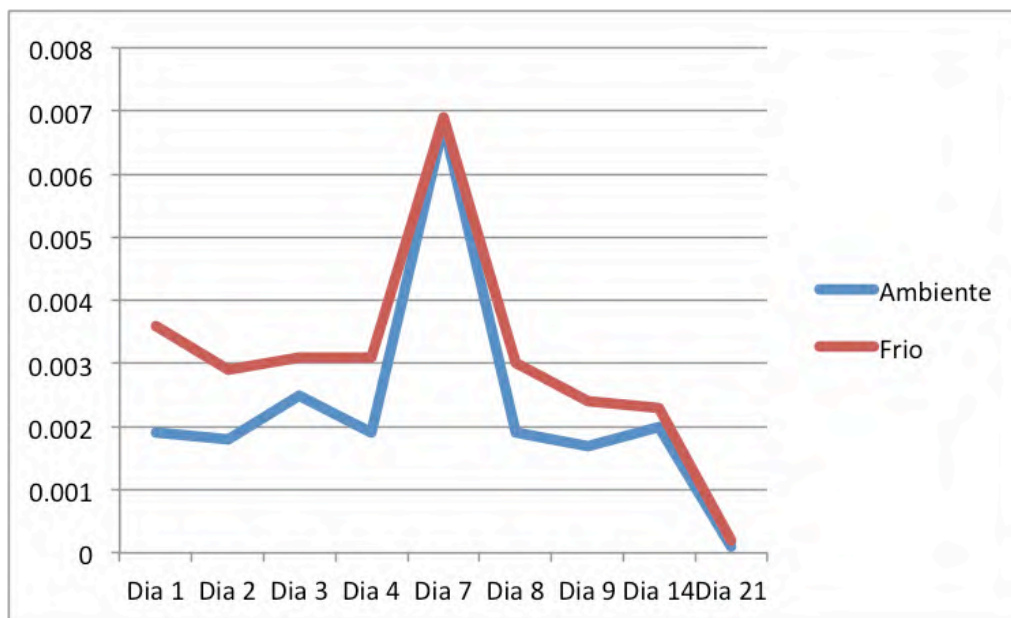


Gráfico 6: comparação entre valores médios de concentração de rhGH liberado das matrizes em diferentes dias de avaliação do estudo para os subgrupos A e subgrupos F.

Nota-se ainda que, apesar de haver absorção de luz para ambos os grupos no 21^o dia de degradação das matrizes, não houve uma liberação

significativa de rhGH. As concentrações de rhGH liberados do 14^o ao 21^o dia de avaliação foram praticamente nulas. Isso se deve ao fato de haver pico de absorvância similar ou até maior nas matrizes que não continham rhGH (formulação controle), gerando valores de absorvância ínfimos ou negativos quando a média dos valores de ABS para matrizes sem rhGH foram subtraídos da média dos valores de ABS para matrizes com rhGH após o 14^o dia de degradação. O gráfico 6 (linear) auxilia na interpretação de todos os dados supracitados.

Ainda, quando se realiza análise comparativa dos subgrupos A e F entre os diferentes grupos do estudo (I, II, III e IV), nota-se que, em todos o grupos experimentais, as concentrações de rhGH liberadas durante a degradação das matrizes foram maiores para aquelas amostras armazenadas em ambiente refrigerado, conforme mostra o gráfico 7.

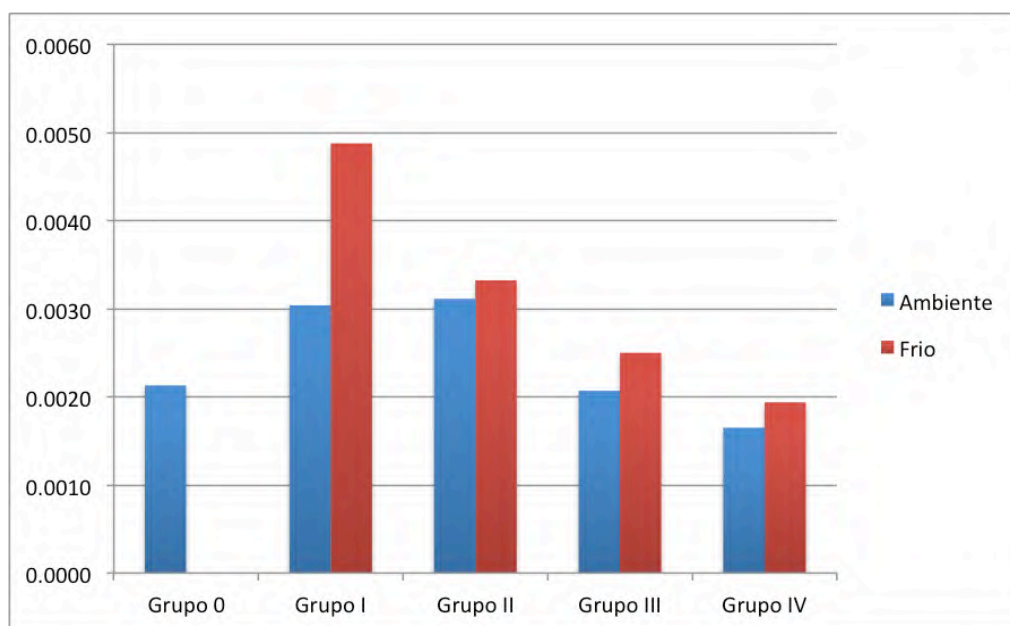


Gráfico 7: níveis médios de concentração de rhGH liberado das matrizes de PLGA em cada grupo do estudo, comparando os subgrupos A e F.

No entanto, no intuito de tornar os resultados do estudo mais fiéis, com menores chances de viés e ainda facilitar a compreensão, os testes estatísticos que objetivavam comparar a temperatura de armazenamento das matrizes e sua possível influência na estabilidade do rhGH incorporado em matrizes

confeccionadas em PLGA foram realizados dentro de cada grupo do estudo, excluindo apenas o grupo 0, pois neste não haviam matrizes pertencentes ao subgrupo F.

Assim, aplicou o teste *t* de Student para igualdade de médias dentro do mesmo grupo e obteve-se os seguintes valores:

	Média ABS subgrupo A	Erro padrão da média	Média ABS subgrupo F	Erro padrão da média	Valor <i>p</i>
Grupo I	0.0425 ± 0.01592	0.00306	0.0490 ± 0.01638	0.00315	0.145
Grupo II	0.0415 ± 0.01309	0.00252	0.0453 ± 0.01215	0.00234	0.271
Grupo III	0.0453 ± 0.01420	0.00273	0.0444 ± 0.01530	0.00294	0.815
Grupo IV	0.0433 ± 0.01304	0.00251	0.0442 ± 0.00972	0.00187	0.770

Tabela 7:: valores médios de absorvância (ABS) para cada subgrupo dos grupos do estudo e valores de *p* para comparações entre os subgrupos

Tais valores de *p*, calculados para cada subgrupo do estudo separadamente, confirmam não haver diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos A e F.

Ainda, baseado nos valores das médias de ABS para cada grupo e subgrupo, pode-se calcular a diferença percentual entre tais valores. No grupo I, as matrizes do subgrupo A demonstraram valores de ABS correspondentes a 86,7% dos valores do subgrupo F. No grupo II, esta proporção subgrupo A:subgrupo F foi de 91,6%. Já no grupo III, os valores médios de ABS do subgrupo A superaram os valores do subgrupo F, o que correspondeu a uma relação A:F de 102%; enquanto no grupo IV as matrizes armazenadas em ambiente refrigerado voltaram a demonstrar picos de ABS maiores em relação as matrizes armazenadas em temperatura ambiente, manifestando uma relação A:F de 97,9%

Ainda, dentro de cada subgrupo do estudo, ou seja, diferenciando as temperaturas de armazenamento das matrizes previamente a sua degradação, pôde-se comparar as médias dos valores de ABS em cada dia de avaliação da degradação das matrizes. Os gráficos 8 e 9 demonstram o padrão de absorção de luz (absorvância – ABS) nos subgrupos A e F para os diferentes dias de avaliação de degradação das matrizes.

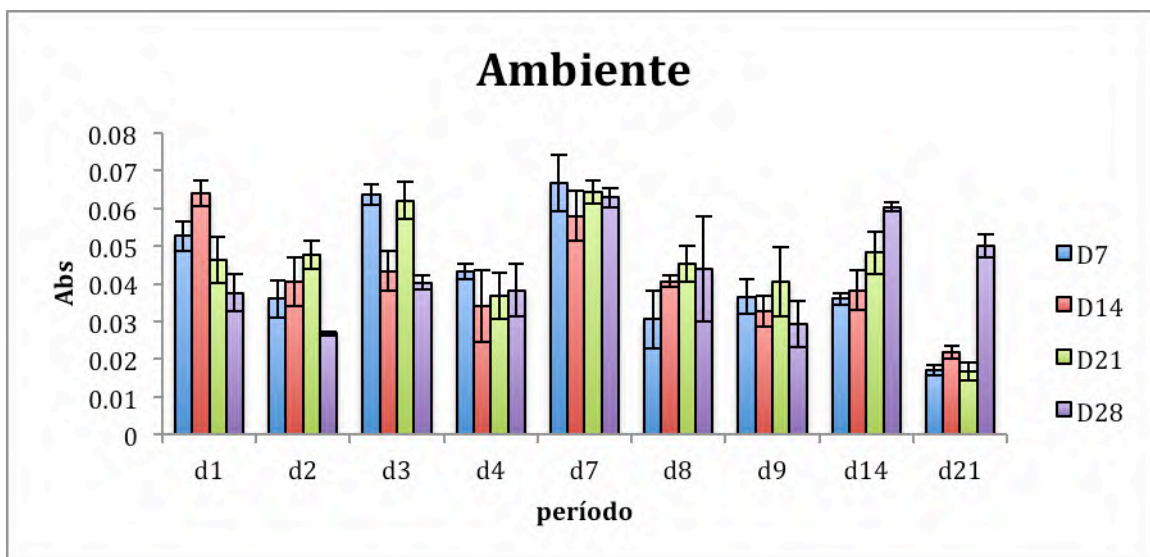


Gráfico 8: padrão de absorção de luz (absorbância) nos diferentes dias de degradação das matrizes armazenadas em temperatura ambiente.

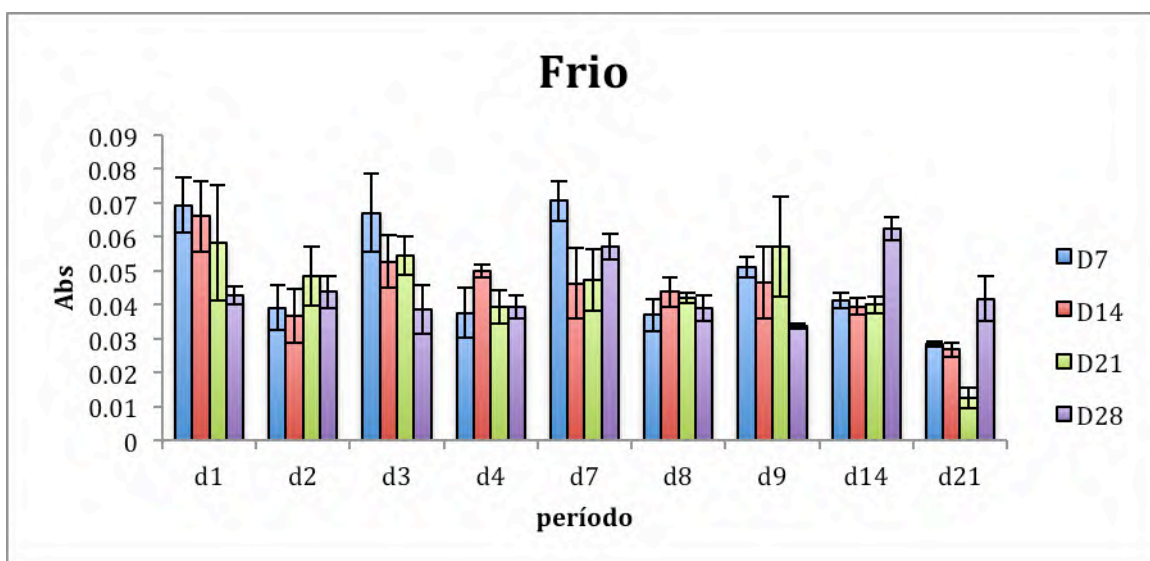


Gráfico 9: padrão de absorção de luz (absorbância) nos diferentes dias de degradação das matrizes armazenadas em temperatura refrigerada.

5.2.3 Avaliação de phmetria das soluções utilizadas para degradação das matrizes

Todos os valores mensurados de pH foram inferiores aos valores da solução tampão (pH 7.4), indicando haver na solução avaliada uma quantidade de PLGA degradado e rhGh liberado, o que faz com que diminua o pH da

solução, ou seja, acidifica o meio.

A avaliação estatística dos valores de pH se deu pelo cálculo da média dos valores de pH de todas as matrizes contidas no subgrupo A e de todas as matrizes contidas no subgrupo B, comparando-se tais valores pelo teste *t* de Student, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). A tabela 8 expressa os valores das médias dos valores de pH para cada subgrupo. Apesar de haver diferença numérica indicando valores de pH maiores para as matrizes do subgrupo A, o teste *t* de Student para amostras independentes revelou um valor de $p = 0,06$, o que indica não haver diferenças estatisticamente significantes entre os valores médios de pH para os subgrupos do estudo. O gráfico 10 evidencia a similaridade de valores indicada na tabela 9.

Temperatura		Média	Desvio Padrão	Erro padrão da média
pH	FRIO	6,2556	,28859	,02777
	AMBIENTE	6,3562	,27031	,02326

Tabela 8: valores da médias de pH para as avaliações do subgrupo A e subgrupo F

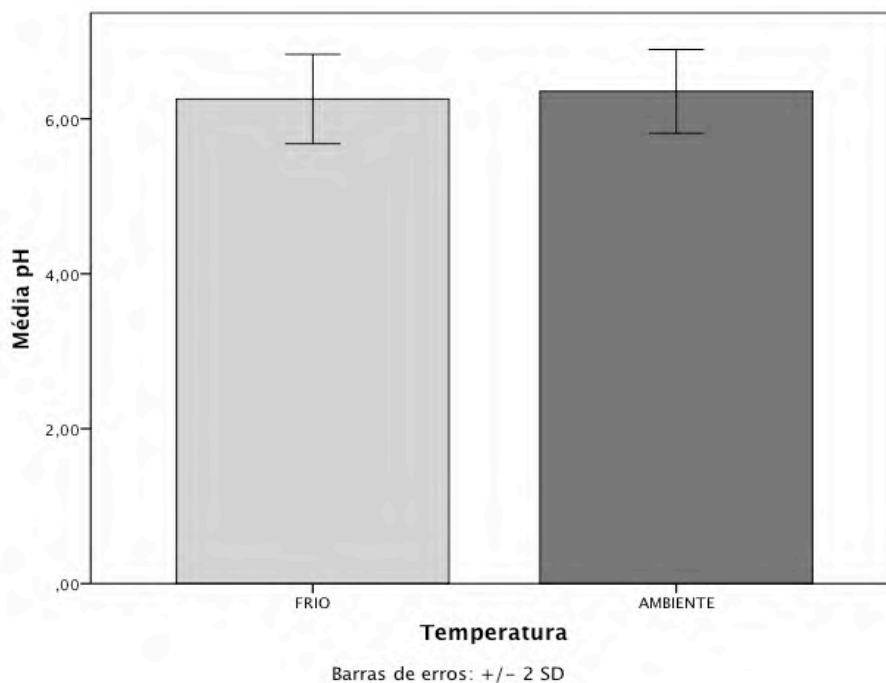


Gráfico 10: comparação entre os valores médios de pH para os subgrupos do estudo.

Ainda, um gráfico comparativo (gráfico 11) entre os valores médios de pH para os dois subgrupos do estudo para cada dia de avaliação da degradação das matrizes também evidencia uma similaridade entre os valores, não indicando diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos A e F.

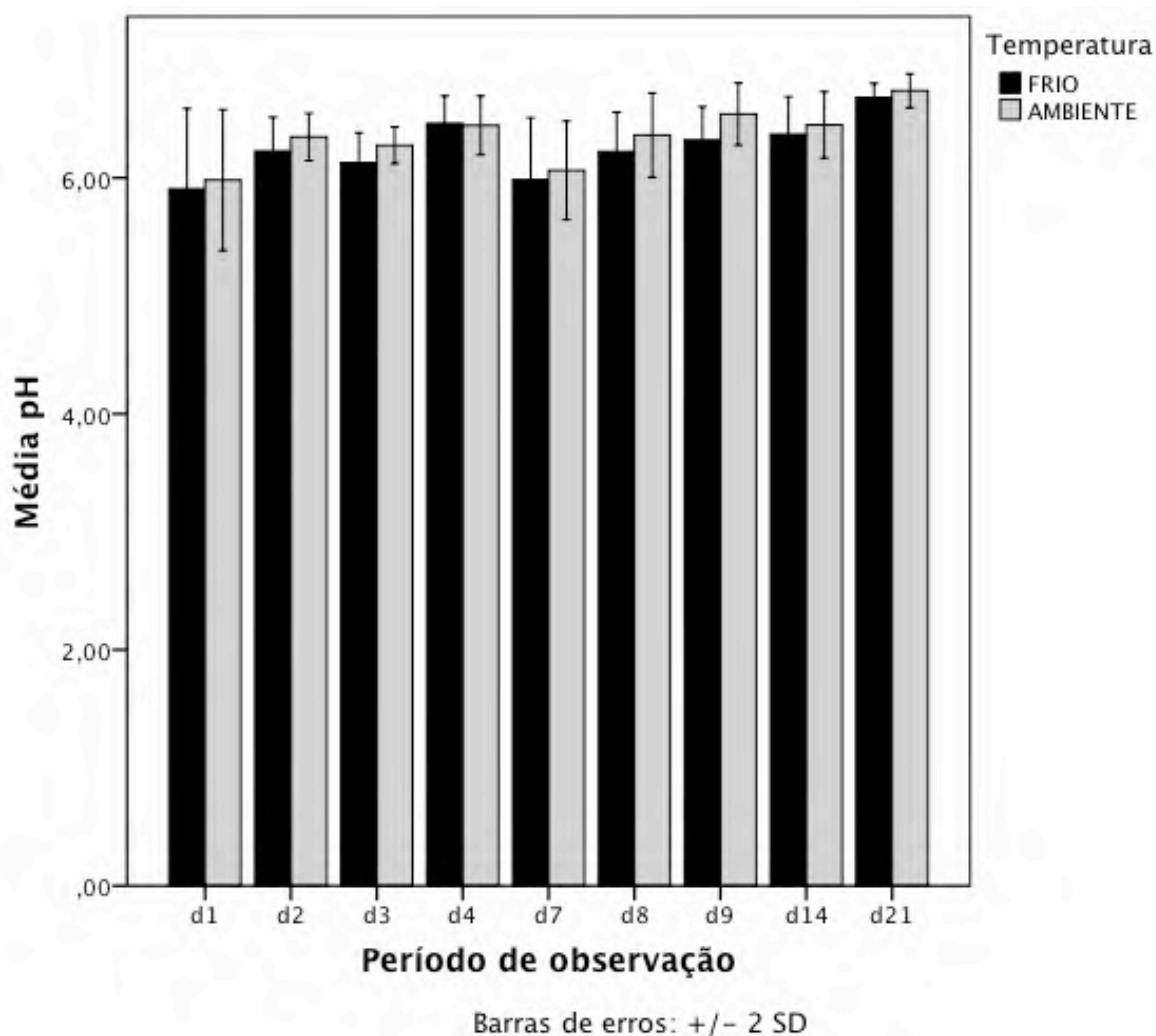


Gráfico 11: comparação entre os valores de pH dos subgrupos do estudo para cada dia de avaliação da degradação das matrizes

Já quando se compara os grupos do estudo, os resultados são diversos. Para as matrizes armazenadas em temperatura ambiente, apesar de haver diferenças numéricas brandas para os valores de pH das matrizes dos grupos 0

em comparação com as matrizes dos grupos I, II, III e IV, algumas diferenças entre grupos foram estatisticamente significativas. A tabela 9 revela os valores médios de pH para os grupos avaliados. Evidencia-se uma diminuição inicial dos valores pH para os grupos I e II em relação ao grupo 0 e posteriormente um leve aumento dos valores de pH, coincidentes com o aumento do tempo de armazenamento das matrizes. No entanto, apesar desta variância, os valores se mantiveram inferiores ao pH fisiológico durante toda as mensurações. Na comparação inter-grupos, algumas diferenças estatisticamente significantes foram encontradas, como mostra a tabela 10, com as diferenças estatisticamente significativas grifadas em vermelho. Nas comparações com o grupo 0, apenas o grupo IV acusou diferença estatisticamente significativa. Os valores médios de pH das matrizes do grupo I foram diferentes, com significância estatística, dos valores dos grupos III e IV, enquanto o grupo II foi diferente apenas do grupo IV. Conseqüentemente, os valores dos grupos III foram estatisticamente diferentes apenas dos valores do grupo I, enquanto o grupo IV foi diferente com relevância estatística dos grupos 0, I e II.

Grupo Dia	Média	Desvio Padrão
Grupo 0	6,3515	,25205
Grupo I	6,1941	,27528
Grupo II	6,2652	,28241
Grupo III	6,3904	,20620
Grupo IV	6,5800	,16079
Total	6,3562	,27031

Tabela 9: valores médios de pH para os grupos do estudo (subgrupos A)

Grupo	Grupo	Diferença média	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Grupo 0	I	,15741	,06526	,173	-,0289	,3438
	II	,08630	,06526	1,000	-,1001	,2726
	III	-,03889	,06526	1,000	-,2252	,1475
	IV	-,22852*	,06526	,006	-,4149	-,0422
Grupo I	0	-,15741	,06526	,173	-,3438	,0289
	II	-,07111	,06526	1,000	-,2575	,1152
	III	-,19630*	,06526	,032	-,3826	-,0099
	IV	-,38593*	,06526	,000	-,5723	-,1996
Grupo II	0	-,08630	,06526	1,000	-,2726	,1001
	I	,07111	,06526	1,000	-,1152	,2575
	III	-,12519	,06526	,573	-,3115	,0612
	IV	-,31481*	,06526	,000	-,5012	-,1285
Grupo III	0	,03889	,06526	1,000	-,1475	,2252
	I	,19630*	,06526	,032	,0099	,3826
	II	,12519	,06526	,573	-,0612	,3115
	IV	-,18963*	,06526	,063	-,3760	-,0033
Grupo IV	0	,22852*	,06526	,006	,0422	,4149
	I	,38593*	,06526	,000	,1996	,5723
	II	,31481*	,06526	,000	,1285	,5012
	III	,18963*	,06526	,063	,0033	,3760

Tabela 10: comparação inter-grupos dos valores de pH para as matrizes dos subgrupos A

Para as matrizes armazenadas em ambiente refrigerado, os resultados se assemelham. Há uma leve acidificação da solução para os grupos I, II e III em relação ao grupo em que as matrizes não foram armazenadas previamente à sua degradação. Ademais, a característica de aumento gradual do pH de acordo com o aumento do tempo de armazenamento também se repete neste subgrupo (tabela 11). Ainda, as diferenças estatisticamente significantes nas comparações inter-grupos são bem semelhantes. O grupo I difere de forma estatisticamente significativa dos grupos III e IV. Já o grupo II, difere apenas do grupo IV.

Conseqüentemente, considerando $p < 0,05$ para revelar diferenças estatísticas, o grupo III difere apenas do grupo I, enquanto o grupo IV difere de forma estatisticamente significativa dos grupos I e II. Tais resultados são evidências na tabela 12.

Grupo Dia	Média	Desvio Padrão
Grupo I	6,0663	,31483
Grupo II	6,1811	,29860
Grupo III	6,3015	,19882
Grupo IV	6,4733	,14334
Total	6,2556	,28859

Tabela 11: valores médios de pH para os grupos do estudo (subgrupos F)

Grupo	Grupo	Diferença média	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Grupo I	II	-,11481	,06782	,561	-,2972	,0676
	III	-,23519*	,06782	,005	-,4176	-,0528
	IV	-,40704*	,06782	,000	-,5894	-,2246
Grupo II	I	,11481	,06782	,561	-,0676	,2972
	III	-,12037	,06782	,473	-,3028	,0620
	IV	-,29222*	,06782	,000	-,4746	-,1098
Grupo III	I	,23519*	,06782	,005	,0528	,4176
	II	,12037	,06782	,473	-,0620	,3028
	IV	-,17185	,06782	,077	-,3543	,0106
Grupo IV	I	,40704*	,06782	,000	,2246	,5894
	II	,29222*	,06782	,000	,1098	,4746
	III	,17185	,06782	,077	-,0106	,3543

Tabela 12: comparação inter-grupos dos valores de pH para as matrizes dos subgrupos F

Por fim, quando os resultados são comparados entre os grupos I, II III e IV dos subgrupos A e F, nota-se de forma constante um valor de pH inferior para o subgrupo F.

6. DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento de um novo biomaterial, além de sua viabilidade, previsibilidade e biocompatibilidade de utilização *in vivo*, características relacionadas à comercialização deste produto devem também ser avaliadas. O armazenamento de um produto, desde a sua fabricação até a sua efetiva utilização, deve ser um parâmetro muito bem estudado para que as características do produto não se alterem durante tal período. Este trabalho objetivou avaliar se ocorrem alterações na estabilidade da incorporação de rhGH nas matrizes de PLGA após determinados períodos de tempo e condições diferentes de temperatura de armazenamento. Assim, esse estudo é de extrema importância para se determinar fatores que influenciarão na comercialização deste produto previamente à sua utilização clínica.

A escolha de um polímero absorvível com características de degradação ideais e possibilidade de funcionar como meio carreador de substâncias farmacológicas é imperativo para a funcionalidade do biomaterial em questão. Assim, a escolha do PLGA comercial (Purasorb®– PURAC) em proporção PLA/PGA de 50:50 foi baseada nestas características citadas, por se tratar de um material capaz de encapsular e liberar agentes farmacêuticos como proteínas (caso do rhGH) e se caracterizar como um polímero hidrofílico de baixo peso molecular, que suporta uma liberação de substâncias farmacêuticas por até um mês^{24,26,70}.

Ainda, em se tratando de escolha do carreador e taxa de liberação de substância, a proporção PLA/PGA 50:50 é a proporção em que a liberação de substâncias ocorre de forma mais acelerada, quando comparado com PLGA com menores proporções de PGA. Sabe-se que quanto maior for a quantidade do mero proveniente do ácido glicólico (PGA), maior será a suscetibilidade à reação de hidrólise, uma vez que estes meros possuem um impedimento menor ao ataque das moléculas de água²⁵. A figura 1 demonstra tais dados. Para que haja repercussão clínica de aceleração da formação óssea com o uso do biomaterial a ser desenvolvido ao final de toda a pesquisa em que este estudo faz parte, a ação do rhGH incorporado nas matrizes de PLGA deve ser precoce,

agindo desde o início da formação do coágulo até o estágio de formação de tecido osteóide, que posteriormente se transformará em osso lamelar bem organizado e maturado. Assim, dentre outras características do polímero, a escolha de uma proporção PLA/PGA que permite esta liberação precoce da substância incorporada é mandatória. Neste estudo, a liberação da substância incorporada (rhGH) se deu de imediato, alcançando bons níveis de liberação de rhGH logo ao primeiro dia de degradação, o que favorece a ação precoce do rhGH nos estágios iniciais de formação óssea. No entanto, houve liberação significativa de hormônio até o 14^o dia de degradação. Esta interrupção precoce na liberação de rhGH não é ideal quando se deseja uma ação mais prolongada do rhGH nos estágios da formação de osso; no entanto deve-se considerar que a concentração de substância liberada das matrizes de PLGA depende, além de outros fatores, do volume de substância incorporado as partículas de PLGA²⁹. No entanto, como já citado, o efeito da quantidade do agente na liberação de substâncias é atenuado quando a quantidade de droga chega a um nível crítico³⁴. Assim, para cada tipo de substância incorporada, estudos devem ser realizados a fim de determinar um quantidade ideal de substância incorporada, para que haja liberação durante um período de tempo desejável ao que se propõe. No presente estudo, a quantidade de rhGH incorporada em cada matriz foi em média 0.044mg. Tal escolha se baseou no nível circulante de rhGH nos adultos (homens < 5ng/mL; mulheres < 10ng/mL), a fim de não aumentar de forma excessiva o nível de rhGH já presente no corpo humano e não promover concentrações tóxicas de rhGH.

Além de todos estes fatores que afetam a degradação e, a ação enzimática sobre o mecanismo de degradação também deve ser considerado. Enquanto alguns autores relatam que o PLGA degrada exclusivamente por hidrólise, outros sugerem que a degradação enzimática também participa do processo^{32,33}. Por se tratar de um trabalho *in vitro*, a possível degradação enzimática não foi considerada.

De acordo com os resultados do estudo, em nenhum grupo e/ou subgrupo houve altos surtos de liberação de rhGH. Tais surtos de liberação podem levar a

perda precoce da ação da substância (por liberação de grande concentração da substância em um curto período de tempo), além de promover concentrações tóxicas da substância.

Clealand e cols. reportaram que o rhGH é liberado de matrizes (microesferas) de PLGA em sua forma nativa, sendo biologicamente ativo durante todo o período de incubação (30 dias) em condições fisiológicas (pH 7.4 e temperatura 37°C)⁶⁶. Corroborando com tais achados, Clealand e Jones⁶⁸ compararam a estabilidade do rhGH puro em solução com a estabilidade desta proteína encapsulada em matrizes de PLGA e revelaram que as taxas de oxidação e desaminação do rhGH incorporado em partículas de PLGA foram equivalentes às aquelas ocorridas no rhGH puro quando colocados em solução tampão (pH 7.4) a 37°C. Assim, os autores concluíram que o rhGH é incorporado ao PLGA de forma bem sucedida e que a liberação e degradação química do rhGH não foram afetadas pela presença do PLGA, indicando que o ambiente interno das matrizes é fisiológico (similar à solução tampão) para a incorporação do rhGH e que a formulação PLGA + rhGH é estável. Em outro estudo, Johnson e cols.⁶⁷ demonstraram *in vivo* que o rhGH encapsulado em microesferas de PLGA mostraram características de estabilidade e bioatividade similares à proteínas (rhGH) previamente ao encapsulamento, e que a administração subcutânea destas microesferas induziram níveis aumentados de rhGH por até 30 dias, mas que administrações mensais sequenciais não demonstraram acúmulo da dose. Em contrapartida, o estudo de Santoveña e cols.⁸⁴, reportou uma redução significativa da concentração de rhGH após 48 horas de degradação em solução tampão PBS. Por este motivo, o estudo destes autores preconiza a troca do meio (solução tampão) a cada 24 horas, a fim de determinar com maior precisão a quantidade de rhGH liberada das matrizes de PLGA durante o período de avaliação. Este estudo seguiu esta mesma metodologia, e o meio de degradação (solução tampão PBS) foi periodicamente removida e substituída por igual volume de solução nova a cada avaliação. Apesar de os estudos supracitados demonstrarem estabilidade da formulação e reportarem liberação de rhGH por um período de 30 dias, o presente trabalho

demonstrou uma liberação de rhGH por menor período. No entanto, como já citado, o volume de rhGH incorporado exerce enorme influência no período de liberação e estabilidade do rhGH, assim como a taxa de degradação das matrizes. No próprio estudo de Santoveña, o autor reporta que a formulação utilizada para incorporação de rhGH em partículas de PLGA que foi similar a formulação deste trabalho expressou uma liberação de rhGH da superfície da matriz por 7 dias devido a uma combinação de erosão da matriz e difusão do rhGH, diminuindo a taxa de liberação após este período. Tais achados são manifestados no presente trabalho, com uma concentração de rhGH liberado mais expressiva durante os 7 dias iniciais, apesar da oscilação dos valores em dias consecutivos. Ademais, a estabilidade limitada do rhGH a 48 horas no meio fisiológico, como reportado no trabalho de Santoveña e cols., pode explicar o pico de liberação de rhGH mensurado ao 7º dia de degradação, já que houve degradação acumulada do 4º ao 7º dia de degradação. Mesmo que a estabilidade seja de 48 horas, há um acúmulo de 2 dias neste período, explicando os valores aumentados. Já ao 14º dia, mesmo considerando possível acúmulo de 48 horas na liberação de rhGH do 9º ao 14º dia de degradação, não houve um pico acentuado de liberação. Tal achado é explicado pelo volume limitado disponível de rhGH ainda incorporado à matriz, já que a maior parte do rhGH incorporado foi liberado até o 7º dia de degradação.

Apesar de haver pequenas diferenças entre valores de absorvância e consequentemente valores de concentração de rhGH liberado das matrizes, sendo maiores para os grupos I e II, não houve diferenças estatísticas entre as matrizes degradadas imediatamente após sua confecção (grupo 0) e as matrizes armazenadas por 7, 14, 21 e 28 dias previamente à sua degradação. Como já citado, não há interferência do PLGA nas partículas de rhGH, e autores reportam que o ambiente interno das matrizes são fisiológicos e as formulações são estáveis. Os resultados deste estudo corroboram com tais achados, já que, pelo menos até o 28º dia de armazenamento, as formulações se mostraram estáveis e revelaram liberação de rhGH de forma similar as matrizes degradadas imediatamente ou armazenadas por um menor período. Ainda, a estabilidade do

rhGH fornecida pela incorporação de acetato de zinco à mistura exerce influência expressiva nestes resultados. O acetato de zinco e a albumina são substâncias que têm sido utilizadas com a finalidade de manter a bioatividade das proteínas⁸⁵. Nos estudos de Johnson e cols.⁶⁷ os autores justificaram o uso do acetato de zinco através de análises histoquímicas da glândula pituitária, na qual foi demonstrada a presença íons zinco nos grânulos de GH, levando a crer, então, que o GH é armazenado na glândula pituitária com complexos de zinco. No presente estudo, optou-se por utilizar o acetato de zinco. A adição deste composto, então, estabiliza todo o rhGH incorporado, fazendo com que o padrão de degradação das matrizes e conseqüente liberação de rhGH seja similar para todos os grupos do estudo. Mesmo quando se compara o tempo de armazenamento considerando apenas as matrizes armazenadas sob a mesma temperatura, não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos do estudo, validando então a conclusão de que as formulações de PLGA com rhGH incorporado são estáveis e que podem ser armazenadas previamente a sua degradação. Tais achados são de grande valia, já que um intervalo de tempo entre a confecção do material e o seu uso clínico é essencial para a viabilidade comercial do produto em questão.

Quanto a temperatura de armazenamento das matrizes, a concentração de rhGH, mensurada pelo pico de absorvância do espectro de luz que atravessa a solução retirada do tubo de ensaio onde a matriz degrada, foi similar para ambos os subgrupos do estudo. Apesar de, em geral, haver resultados desiguais com concentrações mais altas para as matrizes armazenadas em ambiente refrigerado, tais diferenças não foram estatisticamente significantes. Tais achados se repetem quando os subgrupos A e F são comparados de forma individual em cada grupo do estudo. Em todas as comparações intra-grupo, valores mais altos de absorvância foram mensurados nas matrizes do subgrupo F; no entanto, todas estas diferenças também não foram estatisticamente significantes. O fato de o hormônio de crescimento recombinante humano (rhGH) ser produzido de forma liofilizada, em que tal proteína sofre mudanças de temperatura para resfriamento e aquecimento, pode explicar essa estabilidade

similar em temperaturas resfriadas (2°C a 8°C) e ambiente (aproximadamente 25°C). Assim, estabelece-se uma relação de alta estabilidade da formulações de rhGH encapsulados em partículas de PLGA, em que a liberação do agente farmacológico encapsulado independe da temperatura de armazenamento. Se por um lado temperaturas elevadas são contraindicadas nos locais de armazenamento de biomateriais e medicamentos, por outro, temperaturas reduzidas também podem trazer danos em algumas situações. A refrigeração pode, por exemplo, aumentar excessivamente a viscosidade de preparações líquidas e causar supersaturação. Já o congelamento pode prejudicar a estabilidade de emulsões e, em alguns casos, levar à formação de polimorfos menos solúveis de alguns fármacos^{76.78}.

Quanto aos resultados de pH, outros estudos mostram que degradação/hidrólise *in vitro* do PLGA mostrou que meio alcalinos e altamente ácidos aceleram a degradação. No entanto, a diferença entre meios neutros e levemente ácidos é menos pronunciada, devido a autocatalização do polímero pelos grupos de terminações carboxílicas^{31,54}. O presente estudo mostrou que a degradação das matrizes com consequente liberação de rhGH não gerou ambientes altamente ácidos ou básicos. Tal resultado é favorável aos propósitos da ação do rhGH na regeneração óssea, já que ambientes ácidos causam desnaturação de proteínas e perda significativa do efeito desejado. No entanto, ambientes mais neutros desaceleram a degradação das matrizes de PLGA, o que pode causar uma liberação mais lenta do rhGH e consequentemente atrasar sua ação nos estágios iniciais do reparo ósseo. Nas outras comparações, o fato de ter havido uma leve acidificação do meio durante a avaliação das matrizes que foram armazenadas por 1 e 2 semanas (grupos I e II), e valores menos ácidos para o grupos III e IV explica a diferença estatisticamente significativa entre grupos com intervalo de 14 dias de armazenamento. No entanto, a baixa variância nos valores de pH ocorridas neste estudo não parece afetar o padrão de degradação das matrizes e consequentemente a liberação de rhGH de tais matrizes, já que os resultados para estas análises de liberação de rhGH foram similares e não estatisticamente diferentes para todos os grupos e subgrupos do

estudo.

7. CONCLUSÃO

Baseados nos resultados do estudo, a avaliação da degradação de matrizes de PLGA incorporadas com partículas de rhGH armazenadas por variados períodos de tempo e em temperaturas diferentes, permite constatar que:

1. as formulações são estáveis, não havendo diferença estatisticamente significantes para a liberação de rhGH das matrizes entre matrizes degradadas imediatamente após sua confecção e matrizes armazenadas por 7, 14, 21 e 28 dias;
2. a temperatura de armazenamento (ambiente refrigerado *versus* temperatura ambiente) não influencia na estabilidade da formulação, havendo liberação de rhGH das matrizes de forma similar nos dois subgrupos do estudo;
3. o pH da solução tampão sobrenadante, utilizada para degradação das matrizes, apresentou pouca variação, mantendo-se em valores próximos ao neutro e sem diferença estatísticas matrizes armazenadas em temperaturas diferentes;
4. Apesar da pouca variação numérica, houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos do estudo cujo o intervalo de armazenamento entre tais grupos foi de 14 dias ou mais, tanto para as matrizes armazenadas em temperatura ambiente quanto para aquelas armazenadas em ambiente refrigerado, quando comparados de forma isolada para cada meio de armazenamento.

Tais informações devem ser combinadas com resultados obtidos de outros estudos que visam avaliar outros fatores importantes para a viabilidade clínica de tal formulação e outros fatores também relacionados a sua comercialização, para que então este material possa ser fabricado, armazenado, transportado e finalmente utilizado de forma segura e eficaz.

REFERÊNCIAS

1. Davies JE, Matta R, Mendes VC, Perri de Carvalho, PS. Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. *Organogenesis* 2000;6:3, 1-6.
2. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000;21:2475–2490.
3. Allison SD. Effect of structural relaxation on the preparation and drug release behavior of poly(lactic-co-glycolic)acid microparticle drug delivery systems. *J Pharm Sci.* 2008;97:2022–2035.
4. Mundargi R, Babu V, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi T. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release.* 2008;125:193–209.
5. Sansdrap P, Moës AJ. Influence of additives on the release profile of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Microencapsul.* 1998;15(5):545-53.
6. Müller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47(1):3–19.

7. Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, Souyris F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1994;23(6):395-8.
8. Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998 Aug;19(16):1419-23.
9. Griffith, L.G., and Naughton, G.K. Tissue engineering— current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002;295:1009-1018.
10. Rawat S, Kohli N, Suri CR, Sahoo DK. Molecular mechanism of improved structural integrity of protein in polymer based microsphere delivery system. *Mol Pharm.* 2012;9(9):2403-14
11. Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev.* 1999;99:3181–3198.
12. Wu XS, Wang N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12:21–34.
13. Siegel SJ, Kahn JB, Metzger K, Winey KI, Werner K, Dan N. Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;64:287–293.
14. Yang YY, Chung TS, Ng NP. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method.

Biomaterials. 2001;22:231–241.

15. Bazile DV, Ropert C, Huve P, Verrecchia T, Marlard M, Frydman A, Veillard M, Spenlehauer G. Body distribution of fully biodegradable [¹⁴C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials*. 1992;13:1093–1102.
16. Esmaeili F, Ghahremani MH, Esmaeili B, Khoshayand MR, Atyabi F, Dinarvand R. PLGA nanoparticles of different surface properties: Preparation and evaluation of their body distribution. *Int J Pharm*. 2008;349:249–255.
17. Houchin ML, Topp EM. Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: A review of reactions and mechanisms. *J Pharm Sci*. 2008;97:2395–2404.
18. King TW, Patrick CW., Jr Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly (D, L-lactic-co-glycolic acid)/poly (ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique. *J Biomed Mater Res Part A*. 2000;51:383–390.
19. Rosca ID, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Control Release*. 2004;99:271–280.
20. Chaisri W, Hennink WE, Okonogi S. Preparation and characterization of cephalexin loaded PLGA microspheres. *Curr Drug Deliv*. 2009;6:69–75.

21. Ramchandani M, Robinson D. In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. *J Control Release*. 1998;54:167–175.
22. Amann LC, Gandal MJ, Lin R, Liang Y, Siegel SJ. In vitro-in vivo correlations of scalable PLGA-risperidone implants for the treatment of schizophrenia. *Pharm Res*. 2010;27:1730–1737.
23. Faisant N, Siepmann J, Benoit JP. PLGA-based microparticles: Elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *Eur J Pharm Sci*. 2002;15:355–366.
24. Kranz H, Ubrich N, Maincent P, Bodmeier R. Physicomechanical properties of biodegradable poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) films in the dry and wet states. *J Pharm Sci*. 2000;89:1558–1566.
25. Lu L, Peter SJ, Lyman MD, Lai H, Leite SM, Tamada JA, Uyama S, Vacanti JP, Langer R, Mikos AG. In vitro and in vivo degradation of porous poly(lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*. 2000;21:1837–1845.
26. Alexis F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly (lactic acid) and poly [(lactic acid)-co-(glycolic acid)] *Polym Int*. 2005;54:36–46.
27. Park TG. Degradation of poly (D,L-lactic acid) microspheres: Effect of molecular weight. *J Control Release*. 1994;30:161–173.

28. Liggins R. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: Properties of microspheres made with low molecular weight polymers. *Int J Pharm.* 2001;222:19–33.
29. Frank A, Rath SK, Venkatraman SS. Controlled release from bioerodible polymers: Effect of drug type and polymer composition. *J Control Release.* 2005;102:333–344.
30. Witt C. Morphological characterization of microspheres, films and implants prepared from poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: Is the erosion controlled by degradation, swelling or diffusion? *Eur J Pharm Biopharm.* 2001;51:171–181.
31. Zolnik BS, Burgess DJ. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *J Control Release.* 2007;122:338–344.
32. Cai Q, Shi G, Bei J, Wang S. Enzymatic degradation behavior and mechanism of poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin. *Biomaterials.* 2003;24:629–638.
33. Li S, Girard A, Garreau H, Vert M. Enzymatic degradation of polylactide stereocopolymers with predominant-lactyl contents. *Polym Degrad Stab.* 2000;71:61–67.
34. Eniola AO, Hammer DA. Characterization of biodegradable drug delivery vehicles with the adhesive properties of leukocytes II: Effect of degradation on targeting activity. *Biomaterials.* 2005;26:661–670. [PubMed]

35. Sundback CA, Shyu JY, Wang Y, Faquin WC, Langer RS, Vacanti JP, Hadlock TA. Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials*. 2005;26:5454–5464.
36. Olivier JC, Fenart L, Chauvet R, Pariat C, Cecchelli R, Couet W. Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. *Pharm Res*. 1999;16:1836–1842.
37. Perry JK, Liu DX, Wu ZS, Zhu T, Lobie PE. Growth hormone and cancer: an update on progress. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2013 Aug;20(4):307-13
38. Daughaday WF. The anterior pituitary. in: Wilson D.W. Williams' Textbook of Endocrinology, 7th ed., Saunders, Philadelphia, 1985, pp. 568–613.
39. Veldhuis JD, Blizzard RM, Rogol AD, Martha Jr. PM, Kirkland JL, Sherman BM. Properties of spontaneous growth hormone secretory bursts and half-life of endogenous growth hormone in boys with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:766–773.
40. Adams EF, Buchfelder M, Lei T, Petersen B, Fahlbusch R. Molecular biology of growth-hormone-secreting human pituitary tumours: Biochemical consequences and potential clinical significance. *Acta Neurochir* 1996;65:7–10.

41. Ho KK, Hoffman DM. Defining growth hormone deficiency in adults. *Metab Clin Exp* 1995;44:91–96.
42. Li CH, Papkoff H. Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands *Science* 1956;124:1038-45.
43. Jorgensen JO. Human growth hormone replacement therapy: Pharmacological and clinical aspects. *Endocr Rev* 1991;12:189–207.
44. Juul A, Jorgensen JO, Christiansen JS, Muller J, Skakkeboek NE. Metabolic effects of GH: a rationale for continued GH treatment of GH-deficient adults after cessation of linear growth. *Horm Res* 1995;44:64–72.
45. Alvarez-Nava F, Lanes R, Quintero JM, Miras M, Fideleff H, Mericq V, Marcano H, Zabala W, Soto M, Pardo T, Borjas L, Villalobos J, Gunczler P, Unanue N, Tkalenko N, Boyanofsky A, Silvano L, Franchioni L, Llano M, Fideleff G, Azaretzky M, Suarez M. Effect of the parental origin of the X-chromosome on the clinical features, associated complications, the two-year-response to growth hormone (rhGH) and the biochemical profile in patients with turner syndrome. *Int J Pediatr Endocrinol* 2013;4(1):10-17.
46. Bond WS, Hussar DA. Detection methods and strategies for improving medication compliance. *Am J Hosp Pharm* 1991;48 (9):1978–1988.
47. Laursen T, Jorgensen JO, Christiansen JS. Metabolic response to growth hormone (GH) administered in a pulsatile, continuous or combined pattern. *Endocrinol. Metab.* 1994;1:33–40.

48. Tauber H, DeBouet du Portal H, Sallerin-Caute B, Rochiccioli P, Bastide R. Differential regulation of serum growth hormone (GH) — binding protein during continuous infusion versus daily injection of recombinant human GH in GH-deficient children, *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1135–1139.
49. Cleland L, Langer R. Formulation and delivery of proteins and peptides: Design and development strategies, in: J.L. Cleland, R. Langer (Eds.), *Protein Formulations and Drug Delivery*. ACS Symposium Series, vol. 567, American Chemical Society, Washington, D.C., 1994, Chapter 1, pp. 1–21.
50. Plosker GL, Brogden RN. Leuprorelin. A review of its pharmacology and therapeutical use in prostatic cancer, endometriosis and other sex hormone-related disorders. *Drugs* 1994;48:930–967.
51. Cleland JL, Lim A, Barron L, Duenas ET, Powell MF. Development of a single-shot subunit vaccine for HIV-1: Part 4. Optimizing microencapsulation and pulsatile release of MN rgp120 from biodegradable microspheres. *J Control Rel* 1997;47:135–150.
52. Wu F, Jin T. Polymer-based sustained-release dosage forms for protein drugs, challenges, and recent advances. *AAPS PharmSciTech* 2008;9(4):1218–1229.
53. van de Weert M, Hennink W, Jiskoot W. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm Res* 2000;17(10): 1159–1167.
54. Crow BB, Borneman AF, Hawkins DL, Smith GM, Nelson KD. Evaluation of

- in vitro* drug release, pH change, and molecular weight degradation of Poly(L-lactic) acid and Poly (D,L-lactide-co-glycolide). *Tissue Engineering* 2005;11(7/8):1077–1084.
55. Kim HK, Park TG. Microencapsulation of dissociable human growth hormone aggregates within poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microparticles for sustained release. *Int J Pharm* 2001;229(1):107–116.
 56. Yamagata Y, Misaki M, Kurokawa T, Taira K, Takada S. Preparation of a copoly (dl-lactic/glycolic acid)-zinc oxide complex and its utilization to microcapsules containing recombinant human growth hormone. *Int J Pharm* 2003;251(1):133–141.
 57. Teshima G, Stults JT, Ling V, Canova-Davis E. Isolation and characterization of a succinimide variant of methionyl human growth hormone. *J Biol Chem* 1991;266:13544– 13547.
 58. Teshima G, Canova-Davis E. Separation of oxidized human growth hormone variants by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr* 1992;625:207 – 215.
 59. Battersby JE, Hancock WS, Canova-Davis E, Oeswein JQ, O'Connor B. Diketopiperazine formation and N-terminal degradation in recombinant human growth hormone. *Int J Pept Protein Res* 1994;44:215–222.
 60. Pearlman R, Bewley TA. Stability and characterization of human growth hormone, in: Y.J. Wang, R. Pearlman (Eds.), *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs: Case Histories*, Plenum Press, New York,

1993, pp. 1–58.

61. Cleland JL, Powell MF, Shire SJ. Development of stable protein formulations: A close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1993;10:307 – 377.
62. Wicar S, Mulkerrin MG, Bathory G, Khundkar LH, Karger BL. Conformational changes in the reversed phase liquid chromatography of recombinant human growth hormone as a function of organic solvent: the molten globule state. *Anal Chem* 1994;66:3908–3915.
63. Johnson OL, Cleland JL, Lee HJ, Charnis M, Duenas E, Jaworowicz W, Shepard D, Shahzamani A, Jones AJS, Putney SD. A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone. *Nature Med* 1996;2:795–799.
64. Cunningham BC, Mulkerrin MG, Wells JA. Dimerization of human growth hormone by zinc. *Science* 1991;253:545 – 549.
65. Thorlacius-Ussing O. Zinc in the anterior pituitary of the rat: a histochemical and analytical work. *Neuroendocrinology* 1987;45:233–242.
66. Cleland JL, Mac A, Boyd B, Yang J, Duenas ET, Yeung D, Brooks D, Hsu C, Chu H, Mukku V, Jones AJ. The stability of recombinant human growth hormone in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res* 1997;14(4):420-5.

67. Johnson OL, Jaworowicz W, Cleland JL, Bailey L, Charnis M, Duenas E, Wu C, Shepard D, Magil S, Last T, Jones AJ, Putney SD. The stabilization and encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres. *Pharm Res* 1997;14(6):730-5.
68. Cleland JL, Jones AJ. Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon-gamma for microencapsulation in biodegradable microspheres. *Pharm Res* 1996;13(10):1464-75.
69. Vieira S. *Introdução à bioestatística – 1ª Ed.* - Rio de Janeiro: Campus, 1991.
70. Chen B, Wu H, Li SF. Development of variable pathlength UV-vis spectroscopy combined with partial-least-squares regression for wastewater chemical oxygen demand (COD) monitoring. *Talanta*, 2014;120:325-30.
71. Kuelzo LA, Ersoy B, Ralston JP, Middaugh CR. Derivative absorbance spectroscopy and protein phase diagrams as tools for comprehensive protein characterization: a bGCSF case study. *J Pharm Sci.* 2003;92(9):1805-20.
72. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, *Analytical Chemistry: An Introduction* , Saunders College Pub., 1994.
73. Olsztyńska-Janus S1, Szyborska-Małek K, Gąsior-Głogowska M, Walski T, Komorowska M, Witkiewicz W, Pezowicz C, Kobielarz M, Szotek S. Spectroscopic techniques in the study of human tissues and their components. Part I: IR spectroscopy. *Acta Bioeng Biomech.*

2012;14(3):101-15.

74. Felix VN1, Viebig RG. Simultaneous bilimetry and pHmetry in GERD and Barrett's patients. *Hepatogastroenterology*. 2005;52(65):1452-5.
75. Li Z1, Wu S, Han J, Yang L, Han S. Resolution of lysosomes in living cells with a ratiometric molecular pH-meter. *Talanta* 2013;114:254-60.
76. Belzer FO, Southard JH. Organ preservation and transplantation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1986;224:291–303.
77. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation*. 2007;83:1289–98.
78. He X. in *Embryonic Stem Cells*. Vienna, Austria: Intech; 2010. Preservation of Embryonic Stem Cells.
79. Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*. 2001;43:89–105.
80. Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, Fowler A, Cheley S, Bayley H, Toner M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2000;18:163–67.
81. Kang J, Wu F, Cai Y, Xu M, He M, Yuan W. Development of Recombinant Human Growth Hormone (rhGH) sustained-release microspheres by a low temperature aqueous phase/aqueous phase emulsion method. *Eur J*

Pharm Sci. 2014 Oct 1;62:141-7.

82. Silca ATCR, Andrade KS, Freitas RFS, Souza RG Avaliação do método de armazenamento do copolímero PLGA via caracterização térmica por TG e DSC. SLAP 2012; 1: 23-26.
83. American Society For Testing And Materials. Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants, ASTM F1635. 2010
84. Santovenã A, García JT, Oliva A, Llabrés M, Fariña JB. A mathematical model for interpreting in vitro rhGH release from laminar implants. Int J Phamac 2006; 309:38-43.
85. Serro AP, Bastos M, Pessoa JC, Saramago B. Bovine serum albumin conformational changes upon adsorption on titania and on hydroxyapatite and their relation with biomineralization, J Biomed Mater Res. 2004;70(3):420–427.
86. JL Cleland, Duenas ET, Daugherty AL, Marian M, Yang J, Wilson M, Celniker AC, Shahzamani A, Quarmby V, Chu H, Mukku V, Mac A, Roussakis M, Gillette N, Boyd B, Yeung D, Brooks D, Maa YF, Hsu C, Jones AJS. Recombinant human growth hormone poly- (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres provide a long lasting effect. J Control Rel 1997;49:193-205.