

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

RICARDO FERNANDES GARCIA

**INCORPORAÇÃO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO  
HUMANO RECOMBINANTE (rhGH) EM MATRIZ DE  
POLÍMERO BIODEGRADÁVEL**

PORTO ALEGRE – RS

2013

RICARDO FERNANDES GARCIA

**INCORPORAÇÃO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO  
HUMANO RECOMBINANTE (rhGH) EM MATRIZ DE  
POLÍMERO BIODEGRADÁVEL**

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

Orientador:  
Prof Dr Rogério Miranda Pagnoncelli

PORTO ALEGRE - RS

2013

## Catlogação na Publicação

G216i Garcia, Ricardo Fernandes  
Incorporação do hormônio do crescimento humano  
recombinante (rhGH) em matriz de polímero biodegradável /  
Ricardo Fernandes Garcia. – Porto Alegre, 2013.  
51 p.

Diss. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, PUCRS.  
Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

1. Odontologia. 2. Traumatologia Bucomaxilofacial.  
3. Hormônio do Crescimento. 4. Biomateriais.  
5. Degradação Hidrolítica (Odontologia). I. Pagnoncelli,  
Rogério Miranda. II. Título.

CDD 617.695

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori, CRB 10/1363

RICARDO FERNANDES GARCIA

**INCORPORAÇÃO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO  
RECOMBINANTE (rhGH) EM MATRIZ DE POLÍMERO BIODEGRADÁVEL**

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

Aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Otacílio Luiz Chagas. Fac. Odonto. da UFPEL.

---

Profa Dra. Rosane Angélica Ligabue. Fac. Química da PUC-RS.

---

Prof. Dr. Vinicius Nery Viegas - PUCRS

Porto Alegre  
2013



## DEDICATÓRIA

### *À Deus*

*“ Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta. (Xico Xavier)”*

### *Aos meus pais e irmãos*

Aos meus pais e irmãos pela força, apoio e confiança. Obrigado por me proporcionarem mais uma vitória em minha vida profissional e pessoal, pelo incentivo nessa nova conquista. Sem vocês tudo isso não tinha sentido . Muito obrigado!!!!



# Agradecimentos

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Orientador **Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli**, pela orientação no Mestrado, sempre acreditando, confiando em mim, pelo apoio, atenção, confiança, paciência, compreensão e carinho dedicados. *“Um bom mestre tem sempre está preocupação: ensinar o aluno a desenvencilhar-se sozinho”.* (Xico Xavier)

A minha coorientadora **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup> Rosane Ligabue**, pelo companheirismo, disponibilidade, confiança e estímulo durante esta trajetória.

As alunas do doutorado da Faculdade de Química da PUC RS, **Juliana Pelisoli** pela ajuda no projeto piloto, a **Emanuele Cabral** por toda ajuda em todas as etapas do experimento, pela disponibilidade ajuda, meu muito obrigado.

Aos meus familiares, por todo apoio dispensado em minha trajetória em Salvador, Pelotas e agora em Porto Alegre. Obrigado pelo apoio, carinho e confiança.

A Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do magnífico reitor **Prof. Dr. Joaquim Clotet** e à Faculdade de Odontologia representada pelo diretor **Prof. Dr. Marco Túlio Mazzini de Carvalho**.

Ao **Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM)** da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

Ao Prof. Dr. **João Feliz Duarte de Moraes**, pelo apoio e orientação com bioestatística no Mestrado.

Aos **Colaboradores da Secretaria de Pós-graduação da PUCRS, Ana Lúcia Silveira Prestes, Davenir Menger Bruschi, Marcos Caetano Correa e Paulo José da Silva** agradeço pelas orientações dispensadas.

Ao **Prof. Dr. Jose Antônio Poli de Figueiredo**, coordenador do programa de Pós-graduação em Odontologia, pela dedicação ao curso.

Aos meus colegas e amigos de curso **Aline Silva, Fernanda Boing, Alexandre Gerszon e Helen Cristina Vieira** agradeço pelo incentivo e companheirismo neste período em que convivemos na pós graduação.



## RESUMO

**Objetivo:** Incorporar o hormônio de crescimento recombinante humano em um polímero biodegradável o poli ácido láctico glicólico ( PLGA ) para utilização na área de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial.

**Materiais e Métodos:** Foi utilizada mistura de dois solventes, metanol e o diclorometano numa proporção em massa de 1,5 : 5,0 para dissolver o PLGA. Foi feita outra solução com o rhGH (hormônio de crescimento humano recombinante), acetato de zinco e água deionizada. As duas misturas foram então misturadas sob agitação mecânica e vertidas em moldes de silicone circular de 01cm de diâmetro e aproximadamente 02mm de espessura. Essa mistura foi deixada na câmara de evaporação de solvente por 48 horas. As matrizes, então, foram degradadas *in vitro* em PBS (solução tampão fosfato salino) com pH 7.4, em banho termostaticado. As amostras foram retiradas do banho no intervalo de 01, 02, 03, 04, 07, 10, 14 dias. Foi aferida a perda de massa, variação do pH e concentração do hormônio liberado em função do tempo.

**Resultados:** A concentração do hormônio liberado em função do tempo foi aumentando até o terceiro dia. No quarto dia, houve uma queda e, no sétimo, ocorreu um aumento do hormônio liberado, estendendo-se até o décimo dia, no décimo quarto dia houve queda novamente. O pH teve uma queda brusca de 7.4 para 3.2 no primeiro dia e mantendo uma pequena queda até o décimo quarto dia. A perda de massa foi gradual, em relação ao tempo, como já era esperado.

**Conclusão:** O PLGA é um bom biomaterial para esses fins. Revelou-se possível incorporar o rhGH nessa matriz, de modo a, então, desenvolver-se um possível material que sirva como enxerto em tecido ósseo.

**Descritores:** PLGA, rhGH, degradação hidrolítica





## ABSTRACT

**Objective:** To incorporate recombinant human growth hormone in a biodegradable polymer (PLGA)

**Material and Methods:** It was used a blend of two solvents, methanol and dichloromethane in a ratio by weight of 1.5: 5.0 for dissolving the PLGA. Another solution was made with rhGH, zinc acetate and deionized water. The two mixtures were then mixed together under mechanical stirring and poured into silicone molds circular of 01cm in diameter and around 02mm of espessur. This mixture was left in the evaporation chamber of solvent for 48 hours. The matrices were then degraded in vitro in PBS pH 7.4, thermostatted bath. The samples were removed from the bath in the range of 01, 02, 03, 04, 07, 10, 14 days. Was measured weight loss, pH and concentration of hormone released versus time.

**Results:** The concentration of hormone released versus time was increased until the third day. On the fourth day had a fall and on the seventh day there have been increased hormone released by the tenth day, the fourteenth day was falling again. The pH had a sharp drop from 7.4 to 3.2 on the first day and keeping a small drop until the fourteenth day. The mass loss was a gradual loss in relation to time as was to be expected.

**Conclusion:** The PLGA is a good biomaterial for making this type of device. You can incorporate the rhGH this array to get a possible material that may serve as a bone graft.

**Descriptors:** PLGA, rhGH, hydrolytic degradation



# *Lista de Figuras*

## LISTA DE FIGURAS

FIG.01 IMAGEN DE MEV DA MICROSFERAS PREPARADOS COM PLGA .....	19
FIG.02 CONFIGURAÇÃO ELETROFIAÇÃO TÍPICO. Q, A TAXA DE FLUXO, D, DISTÂNCIA ENTRE A PLACA E A AGULHA; V, VOLTAGEM APLICADA. ....	20
FIG.03 IMAGEM DE MEV DAS FIBRAS DE PLGA POR ELECTROSPINING CARREGADAS COM SAL DE METOCLOPRAMIDA PLGA .....	21
FIG.04 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE (SAIZEN®, MERCK SERONO S.A. AUBONNE, SUÍÇA) FRASCO-AMPOLA .....	24
FIG.05 MISTURA DE PLGA COM OS SOLVENTES SOB AGITAÇÃO MECÂNICA .....	24
FIG.06 MOLDES DE SILICONE .....	25
FIG.07 SOLUÇÃO DO PLGA E RHGH NA CÂMARA DE EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE COM A MANGUEIRA DE N2 ACOPLADA. ....	26
FIG.08 MATRIZES APÓS 48H NA CÂMARA DE EVAPORAÇÃO DE SOLVENTES.....	26
FIG.09 TRIPLICATAS DAS AMOSTRAS NOS TUBOS DE ENSAIO. ....	27
FIG.10 TRIPLICATAS NO BANHO TERMOSTATIZADO .....	27
FIG.11 ESPECTROFOTÔMETRO, LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA ( INTOX ) DA PUCRS.....	29
FIG.12 AMOSTRAS, APÓS O BANHO TERMOSTETIZADO, PARA PASSAREM NO APARELHO DE ESPECTROFOTÔMETRO .....	29
FIG.13 MICROGRAFIA DA ESTRUTURA DO RHGH PURO.....	35
FIG.14 MEV SUPERFÍCIE DAS MATRIZES INTEGRAS SEM DEGRADAÇÃO; A) AUMENTO DE 500X B) AUMENTO DE 4000X.....	34
FIG.15 MEV MATRIZ DE PLGA SEM INCORPORAÇÃO DO RHGH NEM SULFATO DE ZN. SUPERFÍCIE MAIS LIMPA; A) AUMENTO DE 500X, B) AUMENTO DE 4000X SETAS INDICAM OS MICROPOROS.....	35
FIG.16 SEQUÊNCIA DAS SUPERFÍCIES DAS MATRIZES DEGRADADAS, COM AUMENTO DE 4000X, NOS 1º) PRIMEIRO DIA, 2º) QUARTO DIA, 3º) SÉTIMO DIA, 4º) DÉCIMO DIA.....	35
GRAFI. 01 CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	31
GRAF.02 VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO X TEMPO ( DIAS ) .....	32
GRAF.03 VARIAÇÃO DA PERCENTAGEM DA PERDA DE MASSA X TEMPO EM DIAS .....	33
GRAF.04 VARIAÇÃO DO PH X TEMPO EM DIAS .....	34



## *Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas*

### LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

PLGA	-	Poli ácido glicólico láctico
PLA	-	Poli ácido láctico
GH	-	Hormônio de crescimento humano
rhGH	-	Hormônio de crescimento humano recombinante
LOR	-	Laboratório de Organometálicos e Resinas
SFM	-	Sistema Fagocitário Mononuclear
IGF-I	-	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina do Tipo 1
Zn	-	zinco
N <sub>2</sub>	-	Gás nitrogênio
PBS	-	Solução tampão fosfato salino
ASTM	-	American Society for Testing and Materials
$\lambda$	-	Comprimento de Onda
CTBMF	-	Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial
mg	-	Miligrama
mm	-	Milímetro
mW	-	MiliWatt
nm	-	Nanômetro
®	-	Registrado
PRP	-	Plasma Rico em Plaquetas
%	-	Porcentagem
PUCRS	-	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
KDa	-	Kilo Dalton
CEMM	-	Centro de Microscopia e Microanálises
FDA	-	Food and Drug Administration
PBS	-	Solução Tampão Fosfato Salino
Tg	-	Temperatura de Transição Vítrea



## Sumário

1- INTRODUÇÃO .....	10
2- JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	12
3-OBJETIVO GERAL .....	14
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
4- REVISTA DA LITERATURA .....	15
4.1- PLGA (ÁCIDO POLI LÁTICO GLICÓLICO ) .....	15
4.2- HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE (RHGH).....	17
4.3- MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE MATRIZES DE PLGA .....	19
5- MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
5.1- PLGA.....	23
5.2-HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE (RHGH) .....	23
5.3- CONFECÇÃO DA MATRIZ DE PLGA E INCORPORAÇÃO DO RHGH .....	24
5.4- DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA .....	26
5.5- ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV- VISÍVEL E LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO .....	28
5.6- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	29
6- RESULTADOS.....	31
6.1- CURVA DE CALIBRAÇÃO .....	31
6.2 - LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO ( RHGH ).....	31
6.3- PERDA DA MASSA .....	32
6.4- VARIAÇÃO DO PH .....	33
6.5- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	34
7- DISCUSSÃO .....	38
8- CONCLUSÕES .....	44
9- REFERÊNCIAS .....	45
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS.....	51



## 1- INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas estão surgindo estudos com biomateriais com o objetivo de levar medicações a algum sítio específico do organismo humano ou objetivando ajudar na regeneração tecidual. Os principais materiais hoje utilizados para esses objetivos são os polímeros biodegradáveis como o PLA (poli ácido láctico) e o PLGA (poli ácido glicólico láctico). Para incorporação de tais drogas, são utilizados alguns métodos, como a formulação de microesferas, sistema de liofilização e o “eletrospinning” ou eletrofiação, todos empregando os polímeros biodegradáveis como estrutura. Diversas drogas são utilizadas para serem liberadas nesses sistemas, como antibióticos, anticoncepcionais, proteínas, incluindo o hormônio do crescimento humano (GH).<sup>1</sup>

Esses polímeros são escolhidos pela área farmacêutica e médica por serem materiais absorvíveis, serem hidroliticamente instáveis e possuírem características de biodegradação que os torna capazes de serem totalmente eliminados pelo metabolismo corpóreo até certo tempo após o implante. O PLA e o PLGA são polímeros relativamente hidrofóbicos, instáveis em condições de umidade, biodegradáveis, sofrendo hidrólise para produzir monômeros de ácido láctico e glicólico, que são degradados pelas mitocôndrias das células pelo ciclo de Krebs. O PLGA é o polímero mais comumente usado e aprovado pela “*Food and Drug Administration*” (FDA). É um material biocompatível e pode ser utilizado como um dispositivo de liberação controlada de drogas.<sup>1,2</sup>

São várias as substâncias testadas para serem carregadas por esses polímeros, uma delas é o hormônio do crescimento humano, também chamado de hormônio somatotrópico ou somatotropina. É um polipeptídeo de 191 aminoácidos com peso molecular de 22KDa, secretado pela glândula pituitária, promovendo o crescimento.<sup>27</sup> O GH é um regulador fundamental do crescimento ósseo pós-natal, atuando no remodelamento ósseo, que é regulado pelo balanço entre a reabsorção e a formação óssea. Nesse processo, o GH desempenha um papel fundamental, exercendo efeito sobre os osteoclastos e, mais acentuadamente, sobre os osteoblastos, criando a base teórica para o seu possível efeito de anabolismo no esqueleto<sup>28-30</sup>. Seus efeitos são mediados diretamente via receptores de GH na

membrana celular ou indiretamente via um aumento da síntese do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I). O GH é secretado principalmente à noite, durante toda a vida; porém, seu pico de secreção ocorre durante a puberdade e há um decréscimo acentuado de sua produção a partir da sexta década de vida, sendo esse hormônio também conhecido como o hormônio da velhice.<sup>31</sup>

Estudos demonstram que o uso tópico do hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) tem acelerado o processo de osteointegração, estimulando a osteogênese e também acelera o processo de remodelação óssea e maturação em volta dos implantes.<sup>62</sup> Gomez Moreno et al (2009)<sup>63</sup> demonstraram que a administração local de rhGH mostrou diferenças histomorfométricas extremamente significantes entre os implantes tratados com o hormônio e o controle. Em geral observou-se maior densidade óssea ao redor do implante com rhGH em relação aos não tratados com rhGH após 14 dias.

Nesse contexto, busca-se, através deste , elaborar juntamente com o Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) da Faculdade de Química da PUCRS, um biomaterial que possa ser utilizado como um enxerto na área de cirurgia bucomaxilofacial, que estimulará a formação óssea em um local específico, realizando uma regeneração óssea guiada. Para isso, será utilizado como arcabouço um polímero biodegradável e biocompatível como o PLGA e será feita a incorporação do rhGH que fará o papel de um indutor de cicatrização e formação e óssea.



## *Justificativa do estudo*

---

### **2- JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

Com o avanço da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial faz-se cada vez mais presente a necessidade da busca de materiais que substituam o enxerto de osso autógeno por biomateriais mais previsíveis que possibilitem uma regeneração óssea guiada, principalmente, em pacientes mais críticos como os com fissura palatina, ou em pacientes que necessitam de remoção de patologias ósseas e candidatos a implantes que não possuam uma quantidade óssea necessária para tal procedimento. Existe hoje vários tipos de enxertos, porém nenhum com todas as características desejáveis (osteoadutor, osteocondutor e osteogênico). Materiais como hidroxiapatita são muito usados, mas não possuem uma forma eficaz para sua fixação no leito receptor, não podendo ser utilizados em alguns sítios cirúrgicos. O plasma rico em plaquetas (PRP), misturas de fatores de crescimento derivados de plaquetas, têm sido utilizados com resultados incertos. Em parte, pelo fato de que a composição e a concentração dos fatores de crescimento presentes no PRP ainda são desconhecidos e não-previsíveis.

Na busca de um material mais próximo das qualidades do enxerto do osso autógeno, estudos na área da engenharia de tecido ósseo estão cada dia mais avançados. Nesse sentido, a bioengenharia necessita de três aspectos gerais para construção de um novo tecido: células ou substitutos celulares, arcabouço tridimensionais e compostos que possam estimular o tecido, como os fatores de crescimento. O arcabouço ideal deve ser poroso com uma rede de poros interconectados, biodegradável, biocompatível e estável mecanicamente. Atualmente, os materiais mais estudados para esse fim são os polímeros, copolímeros, hidroxiapatita, quitosana e colágeno.

Nesse contexto, vem-se através desse trabalho elaborar, juntamente com o Laboratório de Organometálicos e Resinas (LO) da Faculdade de Química da PUCRS, um biomaterial que possa ser utilizado como um enxerto, que estimule a formação óssea em um local específico, realizando uma regeneração óssea guiada. Para isso, será utilizado como arcabouço um polímero biodegradável e biocompatível como o PLGA. Esse material pode permitir a confecção de um arcabouço tridimensional com formação de poros interconectados. Nesse arcabouço será incorporado um estimulador de tecido, nesse caso o hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) que será testado. Por meio da tecnologia do DNA

recombinante, a síntese industrial do rhGH possibilitou que seu uso fosse difundido e não mais limitado ao tratamento de pacientes pediátricos. O intuito deste trabalho, primeiramente, foi realizar um teste para incorporar o hormônio de crescimento nesse arcabouço de polímero e testar sua real incorporação, para em um segundo estágio seja verificada a presença ou não da sua bioatividade *in vitro* e em modelos animais.





### **3-OBJETIVO GERAL**

1- Incorporar o hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) que se apresenta na forma de pó liofilizado em uma matriz de polímero biodegradável.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1 – Avaliar a real presença desse hormônio na matriz após a formulação, através de testes (liberação “in vitro”, perda da massa, variação de pH e microscopia eletrônica de varredura ).

2 – Quantificar a percentagem de hormônio liberada da matriz.



## 4- REVISTA DA LITERATURA

### 4.1- PLGA (POLI ÁCIDO LÁCTICO GLICÓLICO )

Nas últimas duas décadas o ácido poli ácido láctico glicólico (PLGA) tem sido um dos mais atraentes candidatos poliméricos usados para fabricar dispositivos para a entrega de drogas e em aplicações na engenharia tecidual. PLGA é biocompatível e biodegradável, possui uma ampla gama de tempos de erosão, tem ajustáveis propriedades mecânicas e o mais importante, é um polímero aprovado pela FDA. Em particular, o PLGA tem sido extensivamente estudado para o desenvolvimento de dispositivos para liberação controlada de medicamentos de pequenas moléculas, proteínas e outras macromoléculas em uso comercial e em pesquisa.<sup>7</sup>

Materiais biodegradáveis podem ser naturais ou de origem sintética e são degradadas *in vivo*, quer enzimaticamente ou não enzimaticamente, ou ambos, para produzir produtos de degradação biocompatíveis e toxicologicamente seguros, que sejam eliminados pelas vias metabólicas normais. O número de tais materiais que são utilizados para liberação controlada de biofármacos aumentou consideravelmente ao longo da última década. A categoria de base de biomateriais utilizados na entrega da droga pode ser amplamente classificada como<sup>1</sup> polímeros sintéticos biodegradáveis, que inclui relativamente materiais hidrofóbicos, tais como os ácidos  $\alpha$  hidroxilados (uma família que inclui o PLGA), polianidridos e outros e que ocorrem naturalmente, tais como açúcares complexos (hialuronano, quitosano) e inorgânicos (hidroxiapatita). O sucesso desses materiais usado na entrega de biofármacos decorre da multiplicidade de doenças, da gama de dosagens e dos requisitos especiais que podem ser aplicados. Biocompatibilidade é claramente importante, embora nota-se que a biocompatibilidade não é uma propriedade intrínseca de um material, mas depende do ambiente biológico e a tolerabilidade que existe com respeito a determinadas interações tecido-droga-polímero. O polímero PLGA é um copolímero de poli ácido láctico (PLA) e de poli ácido glicólico (PGA). É definido como o melhor biomaterial disponível para a entrega de biofármacos no que diz respeito ao seu desenho estrutural e desempenho.<sup>7</sup> O PLGA é um polímero relativamente hidrofóbico, instável em condições de umidade e biodegradável,

sofrendo hidrólise para produzir monômeros de ácido lático e glicólico, que são degradados na mitocôndrias pelo ciclo de Krebs.<sup>1-2</sup>

A mudança das propriedades, tais como peso molecular, porcentagem de PLA e PGA, do PLGA durante sua biodegradação influencia as taxas de liberação e degradação da droga incorporada. O PLGA tem propriedades físicas próprias que dependem de inúmeros fatores, incluindo o peso molecular inicial, a proporção de lático para glicólido, o tamanho do dispositivo, a exposição à água (superfície temperatura de forma) e de armazenamento<sup>7</sup>. A resistência mecânica do PLGA é afetada pelas propriedades físicas, tais como peso molecular e índice de polidispersão. Essas propriedades também afetam a capacidade de ser formulado como um dispositivo de entrega de biofármacos e pode controlar a taxa de degradação do dispositivo e hidrólise. Além disso, estudos recentes revelaram que o tipo de droga também desempenha um papel na determinação da velocidade de liberação.<sup>8</sup> O PGA cristalino, quando co-polimerizado com o PLA, reduz o grau de cristalinidade de PLGA, isso resulta no aumento da taxa de hidratação e hidrólise. Como regra geral, os maiores teores de PGA conduz a uma taxa rápida de degradação. O grau de cristalinidade e ponto de fusão dos polímeros são diretamente relacionados com o peso molecular do polímero.<sup>9</sup>

A biodistribuição e a farmacocinética de PLGA segue um perfil não-linear, dose-dependente<sup>10</sup>. Além disso, estudos prévios indicam que tanto a depuração sanguínea quanto a absorção pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) podem depender da dose e composição dos sistemas transportadores de PLGA<sup>11</sup>. A degradação do PLGA que carrega biofármacos é rápida na fase inicial (cerca de 30%).<sup>12</sup> A degradação do copolímero de PLGA é um processo coletivo de difusão em volume, difusão de superfície, erosão de volume e erosão da superfície. Uma vez que existem muitas variáveis que influenciam o processo de degradação, o padrão de taxa de liberação é muitas vezes imprevisível. A taxa de biodegradação dos copolímeros de PLGA são dependentes da proporção molar entre o ácido lático e ácido glicólico na cadeia do polímero, peso molecular do polímero, o grau de cristalinidade, e a temperatura de transição vítrea (Tg) do polímero. A liberação do fármaco a partir da matriz homogênea degradante é mais complicado.<sup>13</sup> O papel das enzimas em qualquer biodegradação do PLGA não é clara. A maior parte da literatura indica que a biodegradação do PLGA não envolve qualquer atividade enzimática e é puramente por meio da hidrólise. Entretanto, alguns investigadores sugeriram um papel enzimático na degradação do PLGA com base na diferença dessa degradação *in vitro* e em *in vivo*. Idealmente, os sistemas de polímeros de PLGA devem ter uma resistência mecânica considerável, uma vez que utilizando os dispositivos de entrega de drogas formuladas eles são submetidos a stress físico significativo,

o que também pode influenciar a desagregação mecânica dos implantes e alterar a área de superfície, sua hidratação e hidrólise.<sup>14</sup> Polímeros com peso molecular mais elevado têm geralmente taxas inferiores de degradação<sup>15</sup>. Peso molecular tem uma relação direta com o tamanho da cadeia polimérica. Os polímeros com peso molecular mais elevado têm maiores cadeias poliméricas, os quais necessitam de mais tempo para se degradarem do que os com cadeias poliméricas menores.<sup>16</sup> A biodegradação *in vitro*, degradação hidrolítica do PLGA, mostrou que as médias do pH, tanto as alcalinas como as fortemente ácidas, aceleraram a degradação do polímero.<sup>17</sup>

## 4.2 HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE ( rhGH )

O hormônio do crescimento (GH), também chamado de hormônio somatotrópico ou somatotropina. É um polipeptídeo de 191 aminoácidos com peso molecular de 22KDa , secretado pela glândula pituitária, promovendo o crescimento ósseo pós natal.<sup>3</sup> O GH é um regulador fundamental do crescimento ósseo pós-natal, atuando na remodelação óssea, que é regulado pelo balanço entre a reabsorção e a formação óssea. Nesse processo, o GH desempenha um papel fundamental, exercendo efeito sobre os osteoclastos e, mais acentuadamente, sobre os osteoblastos, criando a base teórica para o seu possível efeito de anabolismo no esqueleto<sup>4-5</sup>. Seus efeitos são mediados diretamente via receptores de GH na membrana celular ou indiretamente via um aumento da síntese do fator de crescimento semelhante ao da insulina (IGF-I). O GH é secretado principalmente à noite, durante toda a vida; porém, seu pico de secreção ocorre durante a puberdade e há um decréscimo acentuado de sua produção a partir da sexta década de vida, sendo esse hormônio também conhecido como o hormônio da velhice.<sup>6</sup>

Dentre as principais ações metabólicas do GH destacam-se o aumento do anabolismo de proteínas, do catabolismo de ácidos graxos e a redução da utilização de glicose como fonte de energia. Assim, esse hormônio revela-se um poupador de aminoácidos. No tecido ósseo, observa-se que a sua ação promove a deposição aumentada de proteínas pelos condrócitos e osteoblastos, aumento do número de mitoses e a conversão de condrócitos em osteoblastos.<sup>18</sup> Uma vasta discussão versa sobre a ação do GH, na qual se procura esclarecer se ele age diretamente nos tecidos ou se o seu efeito é mediado por um fator de crescimento derivado do fígado. Assim, há duas teorias para explicar sua ação, a mais antiga é a Teoria das Somatomedinas e a mais recente é chamada de Teoria Metabólica do Efeito Dual. A primeira propõe que o GH, produzido na adenohipófise, estimularia principalmente o fígado e o tecido

ósseo a produzirem o fator semelhante a insulina (IGF-I), anteriormente chamado de somatomedina, e esse fator seria então lançado à circulação, atingindo tecidos alvos exercendo ações metabólicas. Na Teoria do Efeito Dual, o hormônio do crescimento induziria a diferenciação de células precursoras a um estado de sensibilidade ao IGF-I, e então essas células imaturas, quando em contato com o IGF-I liberado pela ação do GH no fígado, proliferariam e exerceriam suas funções. Entretanto, é ainda controverso o papel do IGF-I no metabolismo ósseo.<sup>4,18</sup>

A partir dos anos 90, através de técnicas de biologia molecular, a síntese laboratorial do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) tornou-se realidade, e houve um aumento significativo no número e na qualidade das pesquisas envolvendo esse hormônio. No princípio, o rhGH foi utilizado em crianças com retardo de crescimento por deficiência na secreção do GH pela adenohipófise. Atualmente, está bem estabelecido o importante papel do GH em adultos. Assim, há países onde adultos, com deficiência desse hormônio fazem a sua reposição com rhGH. A reposição hormonal com GH em adultos acarreta ganho de massa muscular e óssea, proporcionando melhora na capacidade física e, conseqüentemente, psíquica desses pacientes. Assim, o rhGH tem sido bastante utilizado como reposição hormonal em pacientes idosos, cuja secreção do GH é fisiologicamente reduzida, no tratamento de osteoporose e na caquexia associada à síndrome da imunodeficiência adquirida.<sup>3,18,19</sup>

Estudos demonstram que o uso tópico do rhGH tem acelerado o processo de osteointegração, estimulando a osteogênese e também acelera o processo de remodelação óssea e maturação em volta dos implantes.<sup>62</sup> Gomez Moreno et al (2009)<sup>63</sup> demonstraram que a administração local de rhGH mostrou diferenças histomorfométricas extremamente significantes entre os implantes tratados com o hormônio e o controle. Em geral observou-se maior densidade óssea ao redor do implante com rhGH em relação aos não tratados com rhGH após 14 dias.

A principal via de administração do rhGH se dá por injeções subcutânea e, a principal desvantagem é sua meia-vida curta, bem como toxicidade renal<sup>29</sup>. Entretanto, utilizam-se outras vias de administração, como através de implante de lâminas biodegradáveis e pó liofilizado de rhGH.<sup>20,5</sup>

A somatropina é, em alguns tratamentos, injetada subcutaneamente, diariamente, por vários anos em alguns tratamentos. Os trabalhos estão em busca de fórmulas para diminuir o número de aplicações, que aumentem sua duração de efeito; diminuindo, assim, as complicações para o paciente e melhorando a conveniência do seu uso.

### 4.3- Métodos de Preparação de Matrizes de PLGA

O método para síntese de uma matriz, que tem como objetivo, servir de enxerto, precisa produzir uma matriz com as características que a bioengenharia de tecido preconiza. Duas particularidades têm impacto nas respostas celulares para com o material: a topografia tridimensional e as propriedades físico-químicas da superfície. A topografia tridimensional pode ser relacionada com o tamanho, a forma e a textura da superfície do material, mesmo que vários estudos demonstrem que as células ósseas são sensíveis à topografia grosseiras do material subjacente.<sup>21</sup>

A escolha do método de preparação das matrizes, deve garantir para o biofármaco a ser incorporado na matriz, a estabilidade da molécula e a manutenção da sua atividade biológica.<sup>26-27</sup> Existem alguns fatores que limitam o desenvolvimento dessas formulações de liberação. Uma dessas limitações é a necessidade de estabilização da proteína a ser incorporada por um longo período de tempo em meio aquoso e em condições fisiológicas.<sup>28</sup>

Um dos métodos utilizados com maior frequência na confecção de dispositivos de liberação de biofármacos é a fabricação de nanoesferas ou encapsulação. Como visto na fig. 01 temos uma estrutura do arcabouço formado por inúmeras esferas onde ali estarão nosso biofármaco incorporado. O importante no processo da encapsulação é que as propriedades físicas, químicas e biológicas da proteína a ser incorporada permaneçam intactas. Nesse método as partículas de PLGA podem ser utilizadas para encapsular o biofármaco.<sup>29</sup>

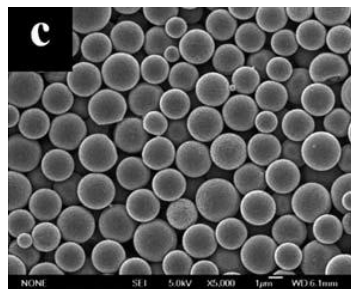


Fig.01 Imagen de MEV da microsferas preparados com PLGA

Disponível em | J. Mater. Chem., 2011, 21, 12691–12699

Estas partículas podem não só servir como um sistema de liberação para o fármaco encapsulado, mas também reduzir os efeitos colaterais nocivos através da entrega de drogas específicas. No entanto, a reatividade química entre estes adjuvantes devem ser avaliados antes da determinação de uma formulação final. A fabricação de tais partículas multifuncionais é normalmente conseguida através de técnicas de emulsão. No entanto, a elevada taxa de depuração da micro / nanopartículas pelo sistema reticuloendotelial do corpo

(RES) e a dificuldade de tais partículas em penetrar em alguns tipos de tecidos, podem limitar a sua utilização para o espaço vascular.<sup>30</sup>

O “electrospining” ou eletrofiação aparece, na atualidade, como outra técnica muito utilizada e promissora. Sua maior vantagem reside na formação de matrizes fibrosas que mimetizam, em estrutura e dimensão, as fibras de colágeno da matriz extracelular, característica almejada na área de bioengenharia. O “scaffold” (ou matriz) deve ser poroso com uma relação superfície-volume alta, para permitir a fixação das células do crescimento, bem como a troca de nutrientes durante a culturas “in vitro” ou “in vivo”.<sup>32</sup> Além disso, a natureza porosa da matriz permitirá angiogênese sobre a implantação no local do defeito (para tecidos vascularizados). Também, porque a matriz atua como um suporte temporário para as células aderirem e proliferarem. As matrizes devem imitar a matriz extracelular nativa tanto arquitetonicamente, como funcionalmente.<sup>33</sup>

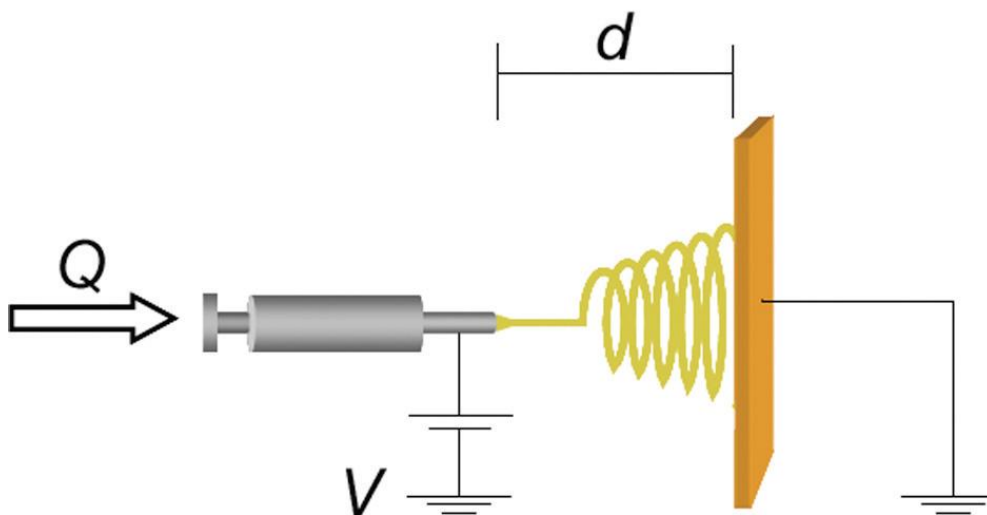


Fig.02 Configuração eletrofiação típico. Q, a taxa de fluxo, d, distância entre a placa e a agulha; V, voltagem aplicada. (Imagens em cores estão disponíveis on-line em [www.liebertonline.com](http://www.liebertonline.com) / 10).

As matrizes de nanofibras podem apresentar um micro-ambiente vantajoso para a formação de tecido ósseo, imitando fibras de colágeno Tipo I, que são um dos principais componentes da formação do tecido ósseo. Os macroporos grandes gerados na síntese das matrizes, como na fig.03, permitem o crescimento de vaso sanguíneo e proporcionam espaços para entrada de nutrientes e saída de metabólitos, bem como aumento de migração celular necessário para, regeneração e sobrevivência do tecido ósseo. As nanofibras produzidas por esse procedimento oferecem elevada área de superfície em relação ao volume produzido, sendo um aspecto favorável a adesão celular.<sup>31,37</sup>

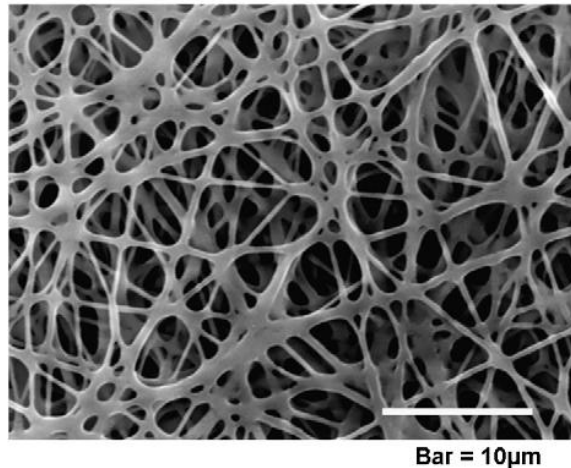


Fig.03 Imagem de MEV das fibras de PLGA por electrospinning carregadas com sal de metoclopramida PLGA  
Disponível em : S.K. Tiwari et al. / *International Journal of Pharmaceutics* 392 (2010) 209–217

A morfologia das nanofibras é resultado da combinação de vários fatores, incluindo neles as propriedades intrínsecas da solução, tais como: o tipo de polímero, concentração, elasticidade, condutividade da solução e tipo de solvente e extrínsecas como: a taxa de fluxo, distância entre a placa e a agulha e voltagem aplicada, como pode ser vista resumidamente na fig.02. Além disso, a morfologia das nanofibras também fica influenciada por condições relacionadas à técnica do “electrospinning”, tais como, corrente elétrica e vazão de distância entre a agulha e a placa receptora.<sup>31</sup>

A evaporação de solvente consiste em outro método. Servindo esse para fabricar matrizes com tamanhos de poros macroscópicos, ou microscópicos, que podem ser implantados ou inseridos para entrega de medicação a longo prazo<sup>29</sup>. Essas matrizes agem como um reservatório de droga que pode ser entregue ao longo de um intervalo de tempo mais longo. Neste método, um polímero e o biofármaco são misturados e dissolvidos em um solvente comum na proporção desejada, o solvente passa a ser, então, completamente evaporado. A sua estrutura resultante é um material composto pelo biofármaco mais o polímero.<sup>34</sup> Esse método cria poros na superfície da matriz formada em quase 98.5% com diâmetros de 50 a 500  $\mu\text{m}$ . Também já foi demonstrado que a concentração do polímero não tem influência sobre o diâmetro dos poros. A grande vantagem dessa técnica consiste na não obrigatoriedade do uso de equipamentos especializados, e existência de pequena variação entre os lotes da substância. A desvantagem é que o método não comporta grande quantidade de polímeros, o que, em tese, inviabilizaria a produção industrial em larga escala.<sup>35</sup>

A parte crítica dessas técnicas, é conseguir a estabilidade do biofármaco dentro da matriz durante sua produção. Além de fazer com que sua liberação seja controlada. Com essa



intenção, algumas substâncias são adicionadas para manter essa estabilidade, a exemplo do acetato de zinco e o óxido de zinco principalmente quando essa substância se trata do rhGH. O zinco foi escolhido por análises histoquímicas da pituitária anterior, as quais mostraram íons zinco presentes em quantidades significativas nos grânulos de GH secretados. Em adição a isso, acredita-se que o GH é armazenado na pituitária com complexos de zinco.<sup>36-38</sup>

## **5- MATERIAIS E MÉTODOS**

O trabalho foi aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Odontologia, com protocolo número 007/11 em 30 novembro de 2011 como carta em anexo A.

### **5-1 PLGA**

As nanopartículas foram obtidas a partir do polímero biodegradável PLGA de massa molar de 7000 na proporção 50:50 de ácido glicólico e ácido lático sintetizado através de uma reação de policondensação direta no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) da Faculdade de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), conforme a técnica já descrita na literatura.<sup>39</sup>

### **5.2 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE ( RHGH )**

Foi utilizado, nesse estudo, o hormônio do crescimento humano recombinante (Saizen<sup>®</sup>, Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça), sob forma de pó liofilizado (frasco-ampola) mostrado na fig.04, 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. O hormônio do crescimento Saizen<sup>®</sup> (Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça) é um polipeptídio de 191 aminoácidos idêntico ao hormônio do crescimento pituitário humano. O hormônio do crescimento é sintetizado em uma linhagem celular murina transformada que foi modificada pela adição do hormônio do crescimento humano<sup>40</sup> Foram utilizadas nesse estudo 07 caixas do Saizen<sup>®</sup> de 04UI (1,33mg), totalizando 9,31mg de rhGH.



Fig.04 Hormônio do crescimento humano recombinante (Saizen®, Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça) frasco-ampola

### 5.3- PREPARAÇÃO DA MATRIZ DE PLGA E INCORPORAÇÃO DO RHGH

As matrizes de PLGA com rhGH foram preparadas pelo método de evaporação de solvente.<sup>7,41</sup> O PLGA foi dissolvido em uma mistura de solvente de metanol com diclorometano numa proporção em volume de 1,5 : 5,0 (metanol:diclorometano), ficando em agitação magnética por 24 horas conforme fig. 05.

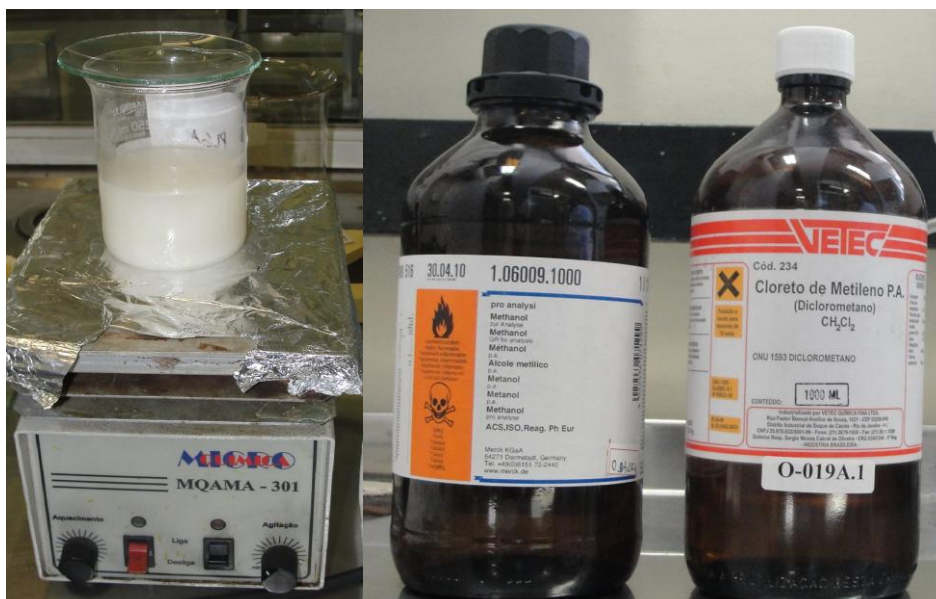


Fig.05 Mistura de PLGA com os solventes sob agitação mecânica

Outra mistura foi preparada com rhGH com acetado de zinco, que tem a finalidade de estabilizar o rhGH para que não seja liberado da matriz em tempo único e para que mantenha suas propriedades físicas, químicas e biológicas, numa proporção molar de 6:1 ( acetato de Zn : rhGH ). Essa mistura foi solubilizada em aproximadamente 10 ml de água deionizada, e permaneceu sob agitação mecânica por 5 minutos. Em seguida essas duas misturas a de PLGA e solvente com a de rhGH e acetado foram misturadas ficando sob agitação magnética por 15 minutos. Após agitação o composto foi vertido em moldes circulares de silicone ( 2mm de espessura por 1cm de diâmetro ) conforme fig.06.



Fig.06 Moldes de silicone

Os moldes foram então colocados na câmara de evaporação de solvente. Junto com os moldes foi colocado dentro da câmara um Becker com a mesma concentração de solvente para saturar o ambiente . Acoplado no orifício de entrada da câmara uma mangueira de saída de nitrogênio (  $N_2$  ) conforme figura 07. O nitrogênio tem a função de fazer o arraste do solvente em evaporação para fora da câmara. Os moldes foram deixados na câmara para secagem por 48 horas as primeiras 24 horas com  $N_2$  e as ultimas 24 horas sem o  $N_2$ . Quanto mais lento ocorrer a evaporação, melhor fica a estrutura dos poros da matriz. Ao final as matrizes foram removidas da câmara conseguindo um formato de comprimidos com as dimensões aproximadas de 01cm de diâmetro por 02mm de espessura conforme visto na figura 08.



Fig.07 Solução do PLGA e rhGH na câmara de evaporação de solvente com a mangueira de N<sub>2</sub> acoplada.



Fig.08 Matrizes após 48h na câmara de evaporação de solventes

#### 5.4 DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA

Foi realizada a pesagem de cada matriz para então iniciar o processo de degradação hidrolítica em banho termostático a uma temperatura de 37<sup>0</sup> C. Foram feitas triplicatas para os dias 1<sup>0</sup>, 2<sup>0</sup>, 3<sup>0</sup>, 4<sup>0</sup>, 7<sup>0</sup>, 10<sup>0</sup>, 14<sup>0</sup> conforme figura 09. Totalizando 21 matrizes com rhGH incorporado mais 07 matrizes sem incorporação do rhGH, apenas a matriz com PLGA que se tornou nosso controle. Os tempos foram estipulados com objetivo de observar a liberação do rhGH baseado nos objetivos biológicos de reparação tecidual inicial que ocorre logo nas primeiras 24, 48, e 72 horas após algum trauma. Período crítico para cicatrização onde

queremos observar se haverá liberação do rhGH nessa fase, e também baseado nas normas do teste de degradação ASTM F1635 (2010).



Fig.09 Triplicatas das amostras nos tubos de ensaio.



Fig.10 Triplicatas no banho termostático

Ao final de cada dia, a matriz remanescente foi removida para secagem em dessecador a vácuo por no mínimo 04 horas até obter massa constante.

Os testes de degradação hidrolítica destes materiais foram realizados baseados na norma ASTM F1635 (2010), no qual, dentro de tubos de ensaio, as matrizes de PLGA e rhGH, foram imersos em solução tampão fosfato salino, PBS, (pH 7,4). Após, os tubos foram expostos a um banho termostático à 37°C durante um tempo pré determinado (1 a 14 dias) conforme figura 10. Após cada período de tempo (1, 2, 3, 4, 7, 10 e 14 dias), os remanescente das matrizes foram retiradas do banho e secadas à vácuo em dessecador até obterem massa constante, e a parte líquida com PBS mais rhGH liberado foi levado para o aparelho de espectrofotômetro UV visível conforme figuras 12 e 11 respectivamente.

## 5.5 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV- VISÍVEL E LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO

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 pode ser compreendida pelas Leis de Lambert-Beer, onde “a absorbância (A) de uma solução é proporcional à concentração da substância na solução e à distância percorrida pelo feixe luminoso que atravessa a solução (caminho óptico)”, como mostra a equação abaixo:

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

$\epsilon$  = coeficiente extinção molar, que é constante para cada substância, (A) quantidade de absorbância em um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ) numa cubeta de caminho óptico (l) = 01 cm (espessura da cubeta) e c = à concentração do analito pesquisado. 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.

Uma solução de rhGH de concentração conhecida foi primeiramente submetida à espectrofotometria para montar uma curva de calibração. Derivar uma curva de calibração linear significa determinar a equação de reta que melhor se ajusta aos pontos experimentais. Esses pontos experimentais são obtidos pela leitura de uma propriedade que varia em função da concentração do analito no caso do trabalho será o rhGH. A propriedade medida chamamos de sinal do instrumento, que no nosso caso será a absorbância. Sabe-se que, de acordo com a literatura, a absorção máxima do hormônio puro é entre 214 a 286nm<sup>36</sup>. Foi realizada uma concentração mãe e em seguida foi realizada varias diluições obtendo varais concentrações diferentes. Essas soluções com concentrações diferentes foram então passadas no espectrofotômetro UV (figura 11), no comprimento de onda de 280nm. Foi então conhecida a absorbância das soluções nas diversas concentrações e montada então a curva de calibração.

## 5.6 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Inicialmente foi realizada uma curva de calibração. Foi feita uma solução com uma concentração conhecida de rhGH. Depois foi diluindo essa solução para formarmos várias concentrações diferentes. As concentrações foram então submetidas a espectrofotometria de absorção UV- visível, num comprimento de onda padrão de 280nm. Assim obtivemos uma curva de calibração com a equação da reta o que nos ajuda a quantificar a concentração de hormônio liberado durante a degradação hidrolítica.

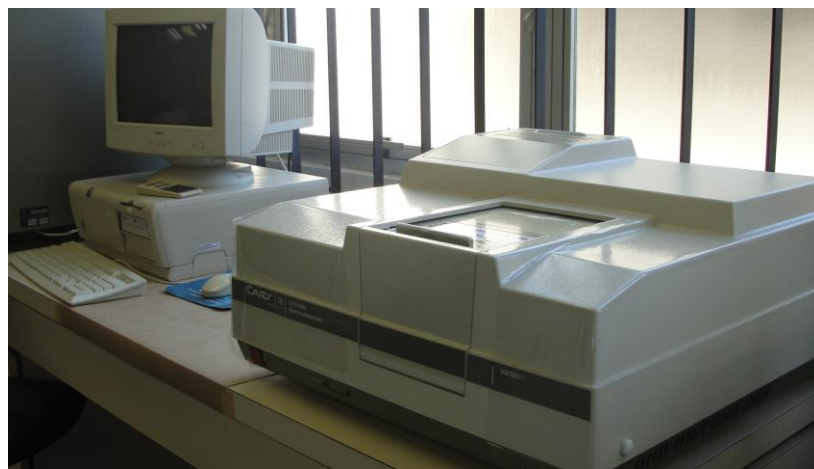


Fig.11 Espectrofotômetro, laboratório de toxicologia ( INTOX ) da PUCRS



Fig.12 Amostras, após o banho termostetizado, para passarem no aparelho de espectrofotômetro.

## 5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após, espectrofotometria, as amostras sólidas, secas até massa constante, foram submetida ao MEV no Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM) da PUCRS através do equipamento Phillips XL 30 para análise qualitativa do material de PLGA e hormônio. As

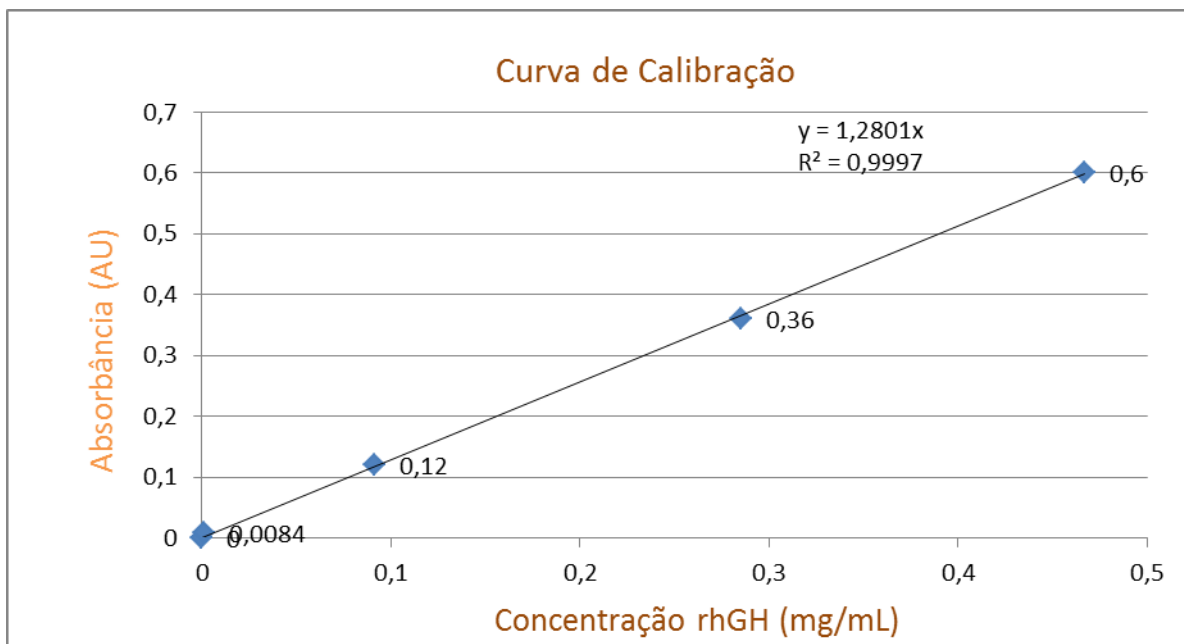


imagens foram adquiridas no modo de espalhamento elétrico usando uma onda elétrica com 20 KeV. As amostras foram colocadas nos “stubs” para metalização com ouro. No MEV com os aumentos de 500x, 2000x e 4000x observamos as características topográficas da matriz nos respectivos dias de degradação hidrolítica.

## 6- RESULTADOS

### 6.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Após ter feita as diluições, as soluções foram passadas no aparelho de espectrofotômetro de UV visível. Obtida as absorbância de cada solução com as concentrações do rhGH conhecida foi montada a curva de calibração no programa Microsoft Excel conforme gráfico 01. Foi obtido um gráfico e tirada a equação da reta que será utilizada para calculo da concentração do rhGH após os tempos de degradação hidrolítica.



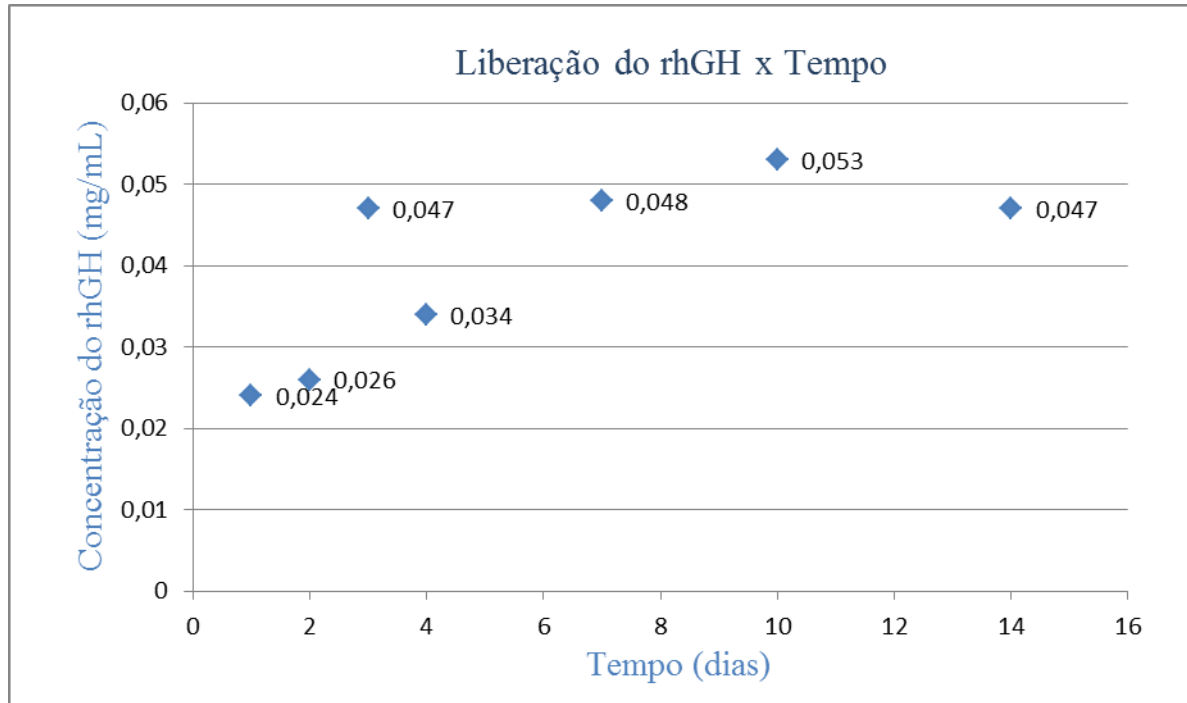
Graf.01 Curva de Calibração

### 6.2 – LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO ( rhGH )

As concentrações do hormônio liberado na degradação hidrolítica foi calculado segundo a relação da absorbância (A) com a concentração da substância compreendida pelas Leis de Lambert-Beer.

Para cálculo da concentração foi utilizado a media de absorbância das triplicatas de cada dia diminuído da media da absorbância do controle (matriz de PLGA sem rhGH). Após

acharmos as absorbâncias das triplicatas de cada dia foi calculado a concentração das soluções, através da equação da reta obtida na curva de calibração, e realizada a média de cada dia obtendo uma relação, concentração versus o tempo.



Graf.02: Variação da concentração da liberação do hormônio x tempo ( dias )

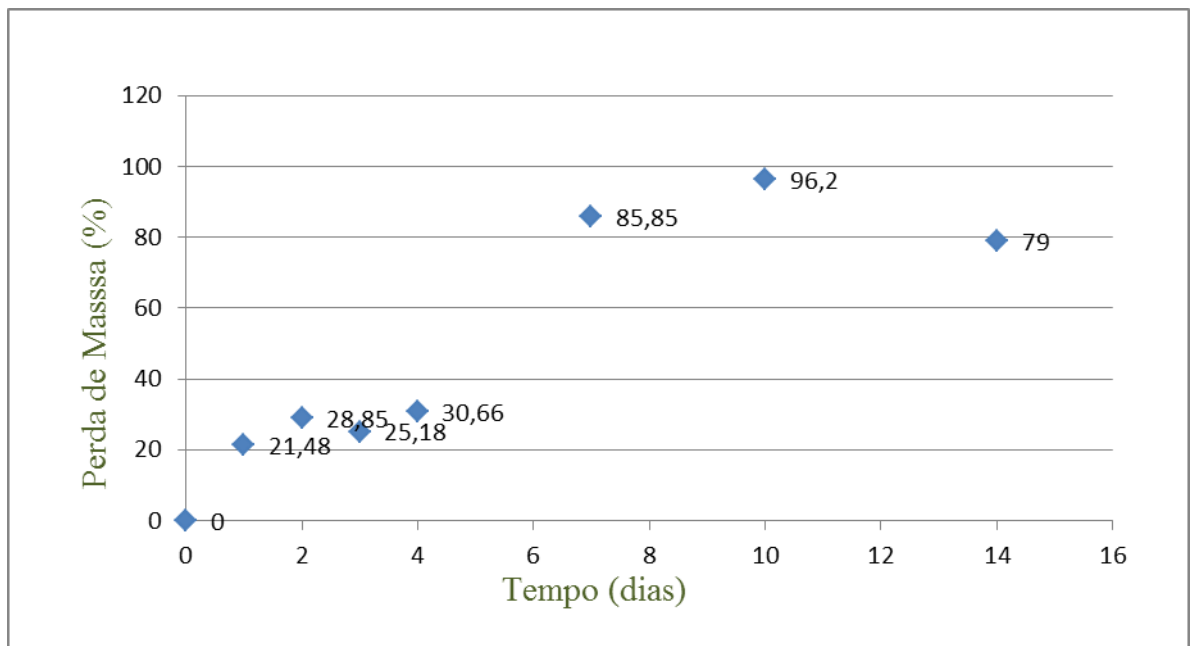
O que observamos no gráfico 02 , gráfico de dispersão de dados, foi que durante essa degradação houve a liberação do hormônio crescente até o sétimo dia. A partir do sétimo dia já observamos uma tendência de estabilização em relação a concentração de rhGH liberado da matriz. Provável explicação é que o rhGH nesse período já foi quase que completamente liberado e principalmente , que o rhGH provavelmente esta em sua maior parte incorporado na superfície da matriz não em seu interior, por isso essa liberação maior nos primeiros dias, pela ocorrência da degradação da superfície da matriz inicialmente .

### 6.3- PERDA DA MASSA

Para cálculo da perda de massa da matriz no decorrer da degradação, foram realizadas as pesagens das matrizes antes da degradação e logo após a sua remoção do banho e secagem num dessecador a vácuo até massa constante. Foi realizada a média das massas iniciais e finais de cada triplicata. Foi realizada curva de tendência no software SPSS®<sup>1</sup> para verificar se existe significância de perda da massa com o decorrer do tempo, com nível de significância

<sup>1</sup>SPSS for Windows, versão 17, Microsoft Corporation®, EUA.

menor que 5% observamos uma queda de aproximadamente 10% de perda de massa no decorrer dos dias.

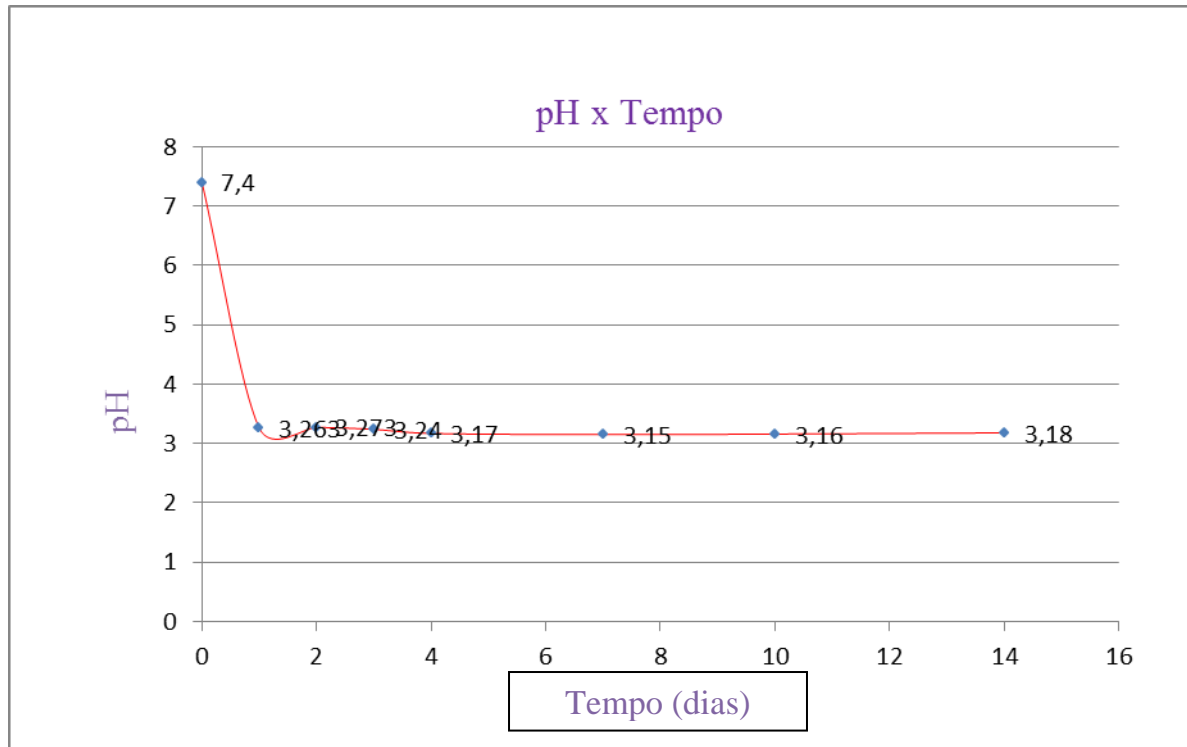


Graf.03 Variação da percentagem da perda de massa x tempo em dias

Observamos nos primeiros dias uma perda de massa. Essa perda vai crescendo ao longo do tempo conforme gráfico 03. Essa perda da massa está implicada com a queda do pH, concentração de láctico e glicólico da matriz de PLGA usado, com o peso molecular do PLGA. Quanto mais baixo pH mais rápida é a degradação ou seja a perda de massa aumenta.

#### 6.4 VARIAÇÃO DO PH

O pH foi medido também após cada retirada do banho termostaticado. A maior queda ocorre logo no primeiro dia, de 7,4 para 3,26. Observa-se um pH baixo porém sem muitas variações ao longo do tempo. Foi realizado no SPSS uma curva de regressão linear onde pode observar uma tendência de queda do pH de aproximadamente 2,2% ao dia com nível de significância menor que 5%. Observamos a queda não acentuada do pH depois do primeiro dia.



Graf.04 Variação do pH x tempo em dia

## 6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Através do MEV podemos observar as características topográficas das matrizes nos vários períodos de degradação.

Na figura 14 observamos a superfície da matriz incorporada com rhGH íntegra sem sofrer degradação em um aumento de 500x (a) e 4000x (b). As setas mostram estruturas que não fazem parte da matriz de PLGA, provavelmente são estruturas do rhGH e ou do sulfato de Zn. Pela micrografia com aumento de 2000x do rhGH (figura 13) puro, as estruturas da figura 14(b) apontadas com a seta, são similar as estruturas do rhGH.

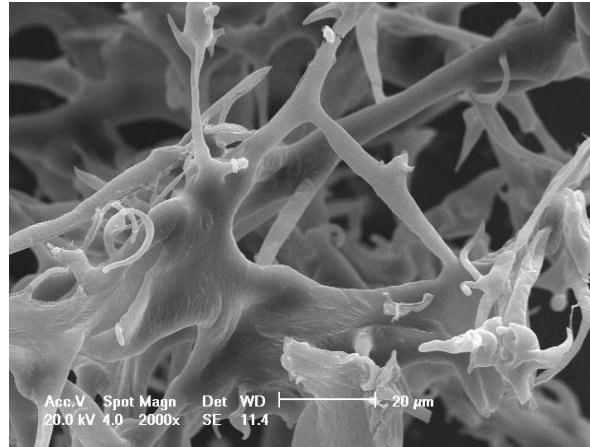


Fig.13 Micrografia da estrutura do rhGH puro.

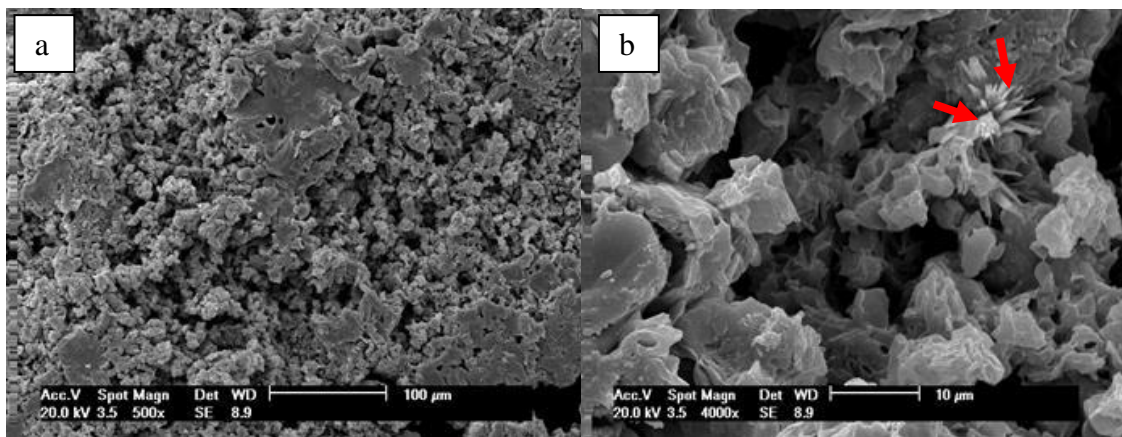


Fig.14 Micrografia da superfície das matrizes integras sem degradação; a) aumento de 500x b) aumento de 4000x

A figura 15 observamos a topografia da matriz controle (apenas PLGA) em dois aumentos, 500x (a) e 4000x (b). Notamos na figura 14(b) a presença de uma maior quantidade de estruturas diferentes em relação à superfície da matriz controle (fig.15b). Nota-se na superfície maior grau de rugosidades. Na figura 15(b) temos uma superfície mais regular. Observamos nas duas superfícies a presença de interconectividades representada pelas setas na figura 15 (b) uma característica importante para matriz que servira como enxerto ósseo.

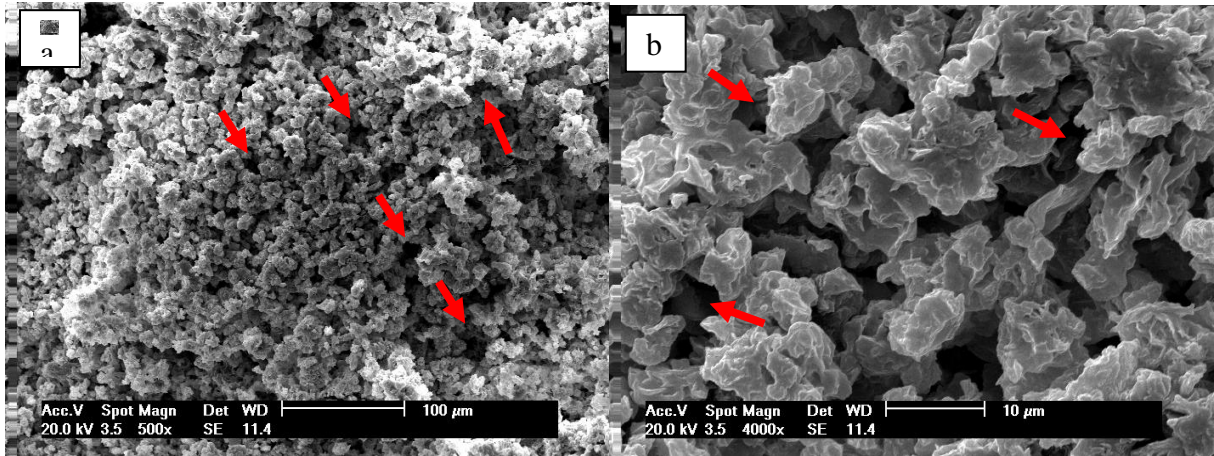
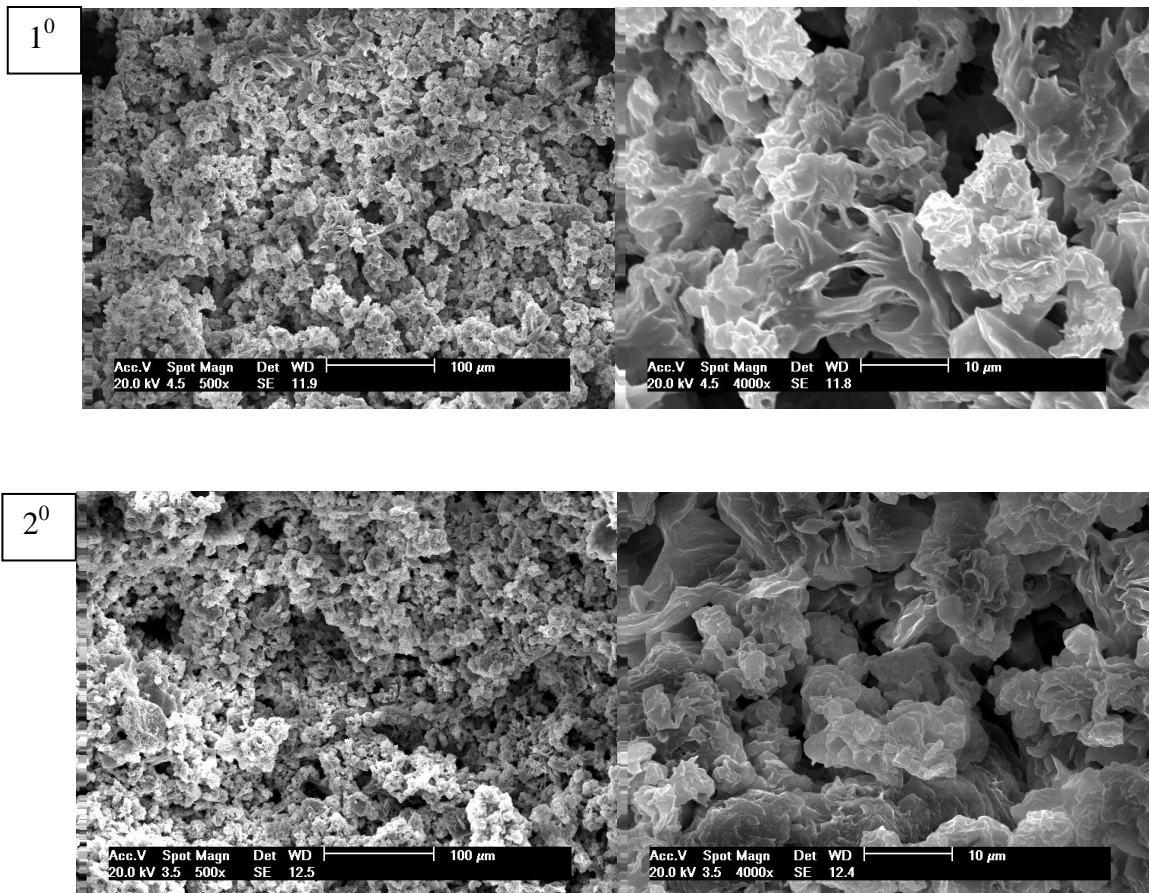


Fig.15 Micrografia da matriz de PLGA sem incorporação do rhGH nem sulfato de zinco. Superfície mais limpa; a) aumento de 500x, b) aumento de 4000x setas indicam os microporos.



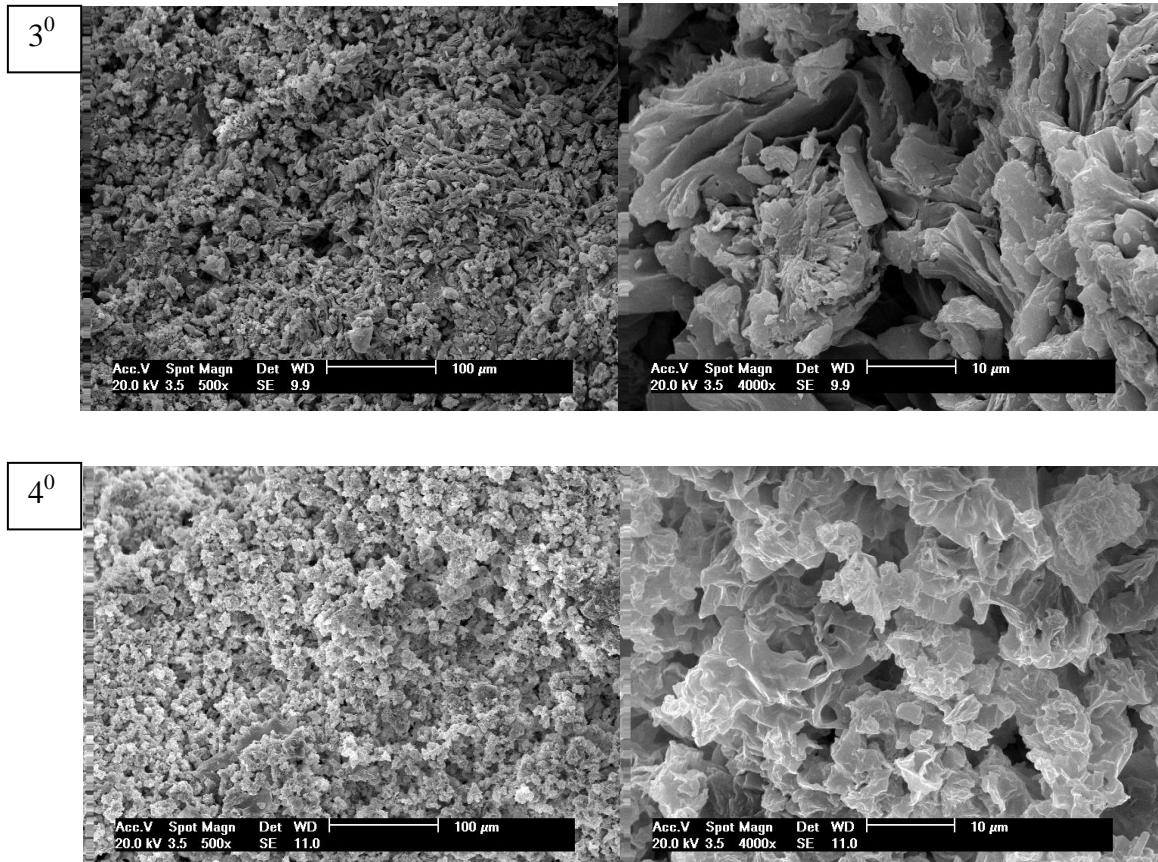


Fig16 Micrografias da sequência das superfícies das matrizes com rhGH degradadas, com aumento de 4000x, nos 1º) primeiro dia, 2º) quarto dia, c) sétimo dia, 4º) décimo dia

Podemos observar na sequencias da fig. 16, as superfícies das matrizes degradadas em quatro períodos diferentes nos aumentos 500x e 4000x. Na fig. 16(1º) observamos as superfícies o primeiro dia, uma superfície mais íntegra com presença de poros e aberturas na estrutura. Na figura 16 (2º) observamos a superfície no quarto dia, já observamos o menor número de interconectividades, uma estrutura com uma característica mais inchadas. Na figura16 (3º) e (4º), sétimo e décimo dia respectivamente, observamos superfície mais degradada, estrutura com diminuição do aspecto de inchaço e a maior presença de interconectividades em relação ao quarto dia. Notamos no sétimo dia a superfície da estrutura de PLGA com uma grande quantidade de rugosidade, enquanto que no décimo dia já temos uma superfície mais lisa.





## 7-DISCUSSÃO

A técnica de produção dessas matrizes está intimamente relacionada aos aspectos de eficiência de carregamento dos biofármacos e do destino de utilização. No estudo de Reves et al 2009<sup>43</sup>, foram produzidas matrizes a base de compósitos de quitosana e fosfato, estruturada em microesferas utilizando uma abordagem de co-precipitação. Essa técnica utiliza a liofilização, fazendo com que o material, aumente sua área de superfície em 200 vezes em comparação com os materiais que são secos pela técnica de evaporação de solventes. Esta área de superfície aumentada relaciona-se com o aumento da eficiência de carregamento de biofármacos. Compósitos com microesferas formadas pela co-precipitação tiveram 200% do fator de crescimento carregado na matriz em comparação com as matrizes formadas por secagem, que tiveram 40% de carregamento. Em nosso trabalho optamos por utilizar a técnica de evaporação de solventes para adquirirmos uma matriz com estrutura porosa. Os resultados mostraram uma matriz com superfície com interconectividades, rugosa, características que ajudam na migração e adesão celular e trocas metabólicas. O que já seria difícil numa estrutura com nano ou microesferas como as utilizadas no trabalho Reves 2009<sup>43</sup>. Um fator limitante nessa estrutura de nano e/ou microesferas está no fato das deficiências associadas ao perfil de liberação das proteínas incorporadas que está na dependência da degradação em massa, o que não pode ser apropriado para aplicações onde se quer regeneração tecidual, onde necessitamos de estruturas de degradação mais lenta para proporcionar um longo suporte mecânico<sup>44</sup>. Outro problema dessas estruturas reside na elevada taxa de depuração da micro/nanoesferas pelo sistema reticuloendotelial (RES) e a dificuldade de tais partículas para penetrar em algum tipo de tecido, podendo, assim, limitar a sua utilização para o espaço vascular.<sup>30</sup>

Outro ponto importante da técnica de evaporação de solvente, que foi levantado no trabalho de Ma and Zhang 1999, reside na não necessidade de materiais especializados como na técnica de nano e/ou microencapsulação e eletrospinning. Técnicas mais sofisticadas. Já a

técnica de evaporação de solvente proporcionou confecção de uma matriz com todas as características desejadas para um objetivo de regeneração óssea e possibilitou a incorporação e liberação controlada do rhGH.

Nas matrizes, onde se quer como objetivo a liberação controlada de biofármacos, um ponto importante será sua bioatividade e sua degradação mais lenta alcançando assim uma liberação controlada do biofármaco. Existem algumas substâncias que são misturadas no período da produção das matrizes para que não haja, no momento da degradação, uma liberação em tempo único. As principais substâncias utilizadas para esse fim é o acetato de zinco e a albumina. No trabalho de Serro et al 2004, para manter a bioatividade das proteínas, antes da implantação, os fatores de crescimento foram revestidos com proteínas transportadoras que podem alterar a adsorção das proteínas. Das diferentes proteínas que adsorvem à superfície dos biomateriais, a albumina tem sido estudada por ter uma maior concentração no sangue, pelas suas propriedades como agente de transporte de fatores de crescimento e em solução e pelas suas interações com os biomateriais.<sup>42</sup> O acetado de zinco é outra substância muito utilizada para manter a bioatividade e controlar a liberação de proteínas, especificamente ao do rhGH. Assim como utilizado em nosso trabalho, estudos de e Yuan et al 2012<sup>38</sup> e OluFunmi L. Johnson et al 1997<sup>36</sup> também utilizaram o acetado de zinco justificando seu uso pelos estudos de análises histoquímicas da pituitária anterior, que mostrou os íons zinco presentes em quantidades significantes nos grânulos de GH secretados. E acredita-se que o GH é armazenado na pituitária com complexos de zinco.<sup>36-38</sup>

A degradação e a liberação desses biofármacos estão baseada em muitas variáveis, por isso a melhor forma estatística a ser utilizada ainda é uma questão de discordância na literatura. Uma variedade de modelos matemáticos tem sido utilizada para descrever a liberação do fármaco a partir de PLGA com função de degradação e liberação de biofármacos controlados. Modelos matemáticos podem ser divididos em duas categorias: modelos semi-empíricos / empíricos mecanicistas e modelos matemáticos.<sup>45</sup>

Modelos empíricos / semi-empíricos são puramente descrições matemáticas, e não são baseadas em nenhum real fenômeno químico, físico e ou biológico. Estes não fornecem qualquer compreensão a respeito dos fatores que controlam a liberação de drogas, e sua previsão é baixa. No entanto, podem ainda ser útil, por exemplo, descrevendo diferentes fases de liberação do fármaco, que podem ser útil no desenvolvimento de produtos. Modelos matemáticos mecânicos, por outro lado, são baseados em fenômenos reais, como a degradação, difusão e erosão. São ferramentas úteis na compreensão mecanicista do processo

de liberação. Os valores de alguns parâmetros podem ser determinados em experimentos complementares, ou equipados com dados experimentais. Vários parâmetros podem ser investigados simultaneamente. A validade de um modelo, aumenta as suas previsões e estão, em boa concordância, independentemente dos dados experimentais. No entanto, a previsibilidade tem sido demonstrada para alguns modelos<sup>46</sup>.

Várias técnicas podem ser usadas para a modelagem matemática. Um exemplo clássico são os modelos exponenciais, <sup>47</sup>. Um modelo linear para saber as principais tendências no decorrer do tempo foi utilizado em nosso estudo para análise dos resultados.

Um modelo é uma simplificação do sistema real, e a sua aplicabilidade e adequação são restritas<sup>45</sup>. Como as reações químicas, a transferência de massa e outros tipos de processos influenciam a liberação do fármaco e depende fortemente das características do material, é crucial, para escolher um modelo apropriado para cada modelo de liberação controlada<sup>48</sup>.

Um adequado modelo com poder preditivo comprovado equivale a uma ferramenta importante no desenvolvimento farmacêutico. Padrões matemáticos podem ser úteis para a compreensão mecanicista da liberação do fármaco, mas as suposições feitas na modelagem são de grande relevância, e em geral aplicação de modelos matemáticos devem ser feitas com cautela e, de preferência ser comprovadas por testes de previsibilidade. Sabe-se, que a variação de um único parâmetro de um material, como a concentração de polímero, pode afetar tanto adsorção da proteína como sua difusão dentro da estrutura polimérica. Por isso, tem sido um desafio para delinear todos os fatores que controlam a liberação do fator de crescimento a partir dessas matrizes<sup>46</sup>.

A degradação do PLGA que carrega biofarmacos é rápida na fase inicial cerca de 30%.<sup>12</sup> O processo de degradação destes polímeros acontece principalmente através da degradação em massa uniforme da matriz na qual a penetração de água no interior da matriz é superior à taxa de degradação do polímero. A cinética de liberação do fator de crescimento, a partir de matrizes *in vitro*, tem sido controlado pelos tipos de interações não covalentes entre o material e o fator de crescimento, o ambiente da matriz e degradação da matriz. Mesmo em um único material polimérico, uma combinação de interações não covalentes tem controlado a liberação dos fatores de crescimento porque muitos materiais interagem com os fatores através de atração eletrostática, interações hidrofóbicas, e outras interações não covalentes<sup>49</sup>.

Outro ponto importante é a estrutura da matriz. GAULTHER et al. demonstrou que um tamanho de poro de 500µm suporta uma melhor formação óssea em comparação com poros de 300µm<sup>22</sup>. As conclusões de TSURUGA et al.<sup>23</sup> e KUBOKI et al.<sup>24</sup> indicam que uma

matriz não geométrica, pode restringir a invasão vascular, produzindo preferencialmente cartilagem em vez de osso, ao passo que as geométricas simulam mais favoravelmente um sistema de Havers para formação óssea. Ripamonti et al. demonstraram que os tamanhos dos poros de 150µm não apoiam neovascularização.<sup>25</sup> Estes estudos sublinham o fundamental efeito da dimensão dos poros nas matrizes para regeneração óssea e crescimento vascular interno. A matriz deste estudo tem uma estrutura porosa na tentativa de um controle de liberação e degradação do rhGH. O transporte de proteínas em matrizes sólidas tem sido controlado pela permeabilidade diretamente relacionada ao tamanho dos poros e porosidade da matriz<sup>50</sup>. O conhecimento dos mecanismos e os processos físico-químicos que influenciam a velocidade de liberação é vital para o desenvolvimento dos materiais com essa finalidade. Os dois mecanismos de liberação de fármaco a partir de PLGA são difusão e degradação / erosão. A taxa de liberação, é muitas vezes, referida como a difusão controlada inicialmente e degradação / erosão controlada durante a fase final do período de liberação.<sup>52</sup> No entanto, vários processos ou eventos influenciam na taxa de difusão do fármaco e na cinética de degradação, por exemplo, interações polímero fármaco<sup>53</sup>, fármaco-fármaco,<sup>54</sup> absorção de água<sup>55</sup> e tamanho dos poros.<sup>56</sup>

A erosão, ou seja, a perda de massa do polímero, tem início quando os produtos de degradação do polímero dissolvidos são capazes de difundir-se no meio. O PLGA normalmente sofre erosão em massa, em contraste com a erosão de superfície.<sup>57</sup> Pequenos poros, formados por absorção de água ou erosão do polímero, aumentam o contato com a água conduzindo à hidrólise, e os ácidos produzidos localmente catalisam a degradação e provocam a dissolução do polímero no interior dos poros, levando a erosão subsequente.<sup>46</sup>

Os produtos de degradação do polímero dissolvidos afetam o sistema de liberação de várias maneiras:

- 1- Eles são ácidos e, assim, catalisam a hidrólise.
- 2- Eles plastificam o polímero, o que aumenta a taxa de água absorvida e diminui a resistência ao transporte do polímero
- 3- Elas aumentam a osmolaridade dentro da matriz do polímero e, assim, a força de absorção de água.
- 4- Eles são conhecidos por serem capazes de cristalizar, especialmente se houver muitas unidades de repetição do monômero iguais numa fila<sup>46</sup>

A erosão, como um mecanismo de controle de taxa de liberação, conduz a formação de poros, o que aumenta a velocidade de difusão. Produtos de degradação dissolvidos presos no interior desse dispositivo podem afetar os processos que influenciam a liberação da droga, em muitos aspectos, por exemplo, por catálise da hidrólise, através do aumento da taxa de absorção de água devido a um aumento da pressão osmótica, e através de plastificação do polímero. Estes produtos de degradação durante a erosão podem, teoricamente, inibir a liberação do fármaco. No entanto, o efeito dominante da erosão é a maior liberação do biofármaco. Em um estudo sobre a liberação do rhGH encapsulado em PLGA, análises matemáticas encontraram relação entre a massa molar ( $M_w$ ) do polímero e a liberação do rhGH. Essa relação, no entanto, pode ser estabelecida por um certo período de tempo de liberação da droga, e estes períodos de forma diferentes em diferentes formulações. Durante a difusão através dos poros cheios de água. A hidrólise afeta provavelmente um outro processo, que, por sua vez, afeta a taxa de difusão. Ambos os processos são formadores de poros, e dependem do peso molecular do o polímero. A difusão através do polímero, depende da mobilidade da cadeia e densidade, que são afetados pela massa molar. A hidrólise é um processo que influencia fortemente outros processos, que podem aumentar ou inibir a liberação do fármaco<sup>58</sup>.

Outro ponto importante na interferência da liberação dos biofármacos é o pH. Vez que, em nosso estudo, observamos uma queda brusca do pH de 7.4 para um pH com uma média de 3.0. Isso se deve ao baixo peso molecular do nosso PLGA. O que determina maior velocidade de degradação, além de maior liberação dos ácidos glicólicos e lácticos, acidificando o meio. Isso pode ser corrigido utilizando um PLGA com uma massa molar mais alta. A influência do pH na degradação ocorre de várias formas. O pH pode ser importante uma vez que pode ser baixo no interior de matriz de PLGA tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>59</sup>.

Quando as amostras de PLGA são incubadas em água destilada, moléculas do polímero degradam como de costume, entretanto o pH médio diminui constantemente. O pH tem uma queda, podendo atingir um valor de 2.0, isso ocorre em três fases. Primeira fase o pH diminui lentamente e a massa do polímero não possui nenhum grupo hidrônio ( $H_3O^+$ ). O número dos grupos finais carboxílicos é baixo, além disso, o polímero não começa a perder a sua integridade de modo que os hidrônios gerados, não conseguem se difundir com facilidade para fora da matriz de polímero, para diminuir o pH do meio de incubação. Na segunda fase o pH diminui rapidamente, o que pode ser atribuído a perda da integridade da matriz polimérica, subitamente ou em um curto período de tempo, todos os hidrônios aprisionadas são libertados. Na terceira fase a taxa do pH declina a um nível muito baixo atingindo um

platô. Este nivelamento é provavelmente devido à desaceleração da degradação do polímero. Essa observação se correlaciona com os resultados do nosso estudo e com as investigações relatadas por outros cientistas<sup>60</sup>. Temos a queda do pH e aumento da velocidade da degradação ( da perda da massa ) como podemos verificar nos nossos resultados.

No estudo de, Fredenberg et al., 2011<sup>46</sup>, foram observados poros fechados na superfície das películas porosas de PLGA, degradados sob condições diferentes. Os poros eram rapidamente fechados em pH baixo (3.0 ). O fechamento dos poros também ocorreu no pH 7,4, embora fosse mais lenta. Em pH 7,4, o polímero foi mais hidrofílico e inchou consideravelmente. Dando evidências de que o fechamento dos poros foi provocado pela difusão das cadeias poliméricas, formando homogêneas massas de polímero e água, em vez de distintas regiões de polímeros e poros. Esses resultados estão em concordância com nossos resultados, onde foi observado nas micrografias dos dias de degradação, as interconectividades da matriz fechadas logo nas primeiras 72 horas onde o pH já estava em média de 3.0. Assim como em nosso estudo que utilizamos um PLGA de massa molar baixa de aproximadamente 7000Mw, Fredenberg 2011 utilizou um PLGA também com massa molar baixa, causando uma taxa de fechamento dos poros, relacionado com o peso molecular e o grau de hidrofobicidade do polímero. O fechamento dos poros e a formação de poros são dois processos simultâneos em curso, e nesse estudo, verificou-se que o fechamento dos poros ocorreu rapidamente em pH 3,0 e pH 7,4, ao passo que a formação de poros foi prevalente em um pH de 5.0 a 6.0<sup>36</sup>. Também observados nas micrografias onde a interconectividades das matrizes do nosso estudo eram diminuídas a medida que o pH diminuía.

Em pH baixo o polímero é contraído e separado da água, sugerindo que o fechamento dos poros foi causado por um efeito hidrofóbico do PLGA, causando, assim, um baixo grau de dissociação do ácido carboxílico do polímero a pH baixo. A natureza mais hidrofóbica do polímero foi confirmada por medições de absorção de água e molhabilidade (ângulo de contato). A absorção de água foi mais lenta, o fechamento dos poros era mais rápido, e a liberação brusca foi diminuída após a co-encapsulação de uma pequena quantidade de glucose nas microesferas porosas nos estudo de Wang, J et al 2004<sup>61</sup>.

O pH alto ou médio proporciona uma degradação mais demorada da matriz de PLGA<sup>60</sup>.

Outra influência na degradação das matrizes de PLGA é a sua proporção de PGA e PLA. Em nosso estudo utilizamos uma proporção de PLGA de 50:50. Como regra geral, os maiores teores de PGA levam a taxas mais rápidas de degradação<sup>7</sup>.



## 8- CONCLUSÕES

Geral:

- Houve incorporação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) na forma de pó liofilizado na matriz de PLGA.

Específicos:

- A incorporação foi confirmada através dos testes de degradação hidrolítica
- O método da fabricação da matriz de PLGA e a incorporação pelo método de evaporação de solvente mostrou-se capaz de incorporar e liberar o rhGH durante o teste de degradação.

Observou-se, nesse estudo, que é possível incorporar o hormônio de crescimento humano recombinante em uma matriz de PLGA. Através deste dispositivo conseguimos quantificar a liberação desse hormônio. Podemos observar que a melhor técnica de confecção de uma matriz com a finalidade de regeneração tecidual, é uma que crie estrutura o mais próximo possível do tecido que ela irá ajudar regenerar. Objetivos importantes para serem aplicados na área de cirurgia bucomaxilofacial e implantodontia.



## 9- REFERÊNCIAS

- 1) SOARES Amanda Queiroz; Oliveira, Leonardo, François; et al. **Polímeros Biodegradáveis: Novas perspectivas para ciências farmacêuticas**. Rev. Eletrônica de Farmacia. 2005 2 (2).
- 2); E.M. TOPP. **Chemical Degradation of Peptides and Proteins in PLGA: A Review of Reactions and Mechanisms**. Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)), DOI 10.1002/jps.21176
- 3)ERIKSEN, E. F.; KASSEM, M.; LANGDAHL, B. **Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodeling**. Eur J Clin Investig. 1996; 26: 252-64
- 4) RASCHKE, M. *et al.* Homologous growth hormone accelerates healing on segmental bone defects. Bone 2001; 29 (4): 368-73.
- 5) OHLSSON, C. *et al.* **Growth hormone and bone**. Endocrinol Rev. 1998 (19) 1: 55 79.
- 6) GUYTON, A. C. **Textbook of medical physiology**. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.
- 7) Hirenkumar K. Makadia and Steven J. Siegel. **Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier**. Polymers 2011, 3, 1377-1397; doi:10.3390/polym3031377
- 8) Houchin, M.L.; Topp, E.M. **Physical properties of PLGA films during polymer degradation**. J. Appl. Polym. Sci. 2009, 114, 2848–2854.
- 9) Siegel, S.J.; Kahn, J.B.; Metzger, K.; Winey, K.I.; Werner, K.; Dan, N. **Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices**. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2006, 64, 287–293.
- 10) Passerini, N.; Craig, D.Q.M. **An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC**. J. Control. Release 2001, 73, 111–115.
- 11) Yang, Y.Y.; Chung, T.S.; Ng, N.P. **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.



- 12) Panagi, Z.; Beletsi, A.; Evangelatos, G.; Livaniou, E.; Ithakissios, D.S.; Avgoustakis, K. **Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles.** *Int. J. Pharm.* 2001, 221, 143–152.
- 13) Bazile, D.V.; 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.
- 14) Faisant, N.; Siepmann, J.; Benoit, J.P. **PLGA-based microparticles: Elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release.** *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002, 15, 355–366.
- 15) 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.
- 16) Park, T.G. **Degradation of poly (D,L-lactic acid) microspheres: Effect of molecular weight.** *J. Control. Release* 1994, 30, 161–173
- 17) Zolnik, B.S.; Burgess, D.J. **Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release.** *J. Control. Release* 2007, 122, 338–344.
- 18) KOLBECK, S. *et al.* **Homologous growth hormone accelerates bone healing a biomechanical and histological study.** *Bone* 2003; 33: 628-37
- 19) STENPORT, V. F. *et al.* **Systemically administered human growth hormone improves initial implant stability: an experimental study in the rabbit.** *Clin Implant Dent Relat Res.* 2001; 3 (3): 135-41.
- 20) Garcia JT, Dorta JM, Munguía O, Llabrés M, Farinã JB. **Biodegradable laminar implants for sustained release of recombinant human growth hormone.** *Biomaterials.* 2002, 23; 23: 4759-64.
- 21) Dalby MJ, Di Silvio L, Davies GW, Bonfield W. **Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro.** *J Mat Sci Mater Med* 2000; 11: 805–810.
- 22) Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. **Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth.** *Biomaterials* 1998; 19: 133–139.
- 23) Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. **Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis.** *J Biochem* 1997; 121: 317–324

- 24) Kuboki Y, Saito T, Murata M, Takita H, Mizuno M, Inoue M, Nagai N, Poole AR. **Two distinctive BMP-carriers induce zonal chondrogenesis and membraneous ossification respectively geometrical factors of matrices for cell differentiation.** *Connect Tissue Res* 1995; 32: 219–226.
- 25) Ripamonti U, Ma S, Reddi AH. **The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin, a bone morphogenetic protein.** *Matrix* 1992; 12: 202–212
- 26) BURKE, P. A. **Controlled release protein therapeutics: Effects of process and formulation on stability.** In: WISE, D. L., ed. *Handbook of Pharmaceutical controlled release technology.* New York: Marcel-Dekker, 2000; 661-692.
- 27) JUNG, T.; KAMM, W.; BREITENBACH, A.; KAISERLING, E.; XIAO, J. X.; KISSEL, T. **Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?.** *Eur. J. Pharm. BioPharm.* 2000; 50: 147-160.
- 28) Li X, Zhang Y, Yan R, et al. **Influence of process parameters on the protein stability encapsulated in poly-DL-lactide-poly ethylene glycol microspheres.** *J Control Release.* 2000;68:41-52.
- 29) Xu, J.S.; Huang, J.; Qin, R.; Hinkle, G.H.; Povoski, S.P.; Martin, E.W.; Xu, R.X. **Synthesizing and binding dual-mode poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanobubbles for cancer targeting and imaging.** *Biomaterials* 2010, 31, 1716–1722.
- 30) KNOW, K.I.; KIDOAKI, S.; MASTSUDA. **Biomaterials.** *ADV. DRUG. Delivery Rev* 2005; 26: 3929
- 31) ZHAO, L; HE, C; GAO, Y; J. **Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater** 2008.
- 32) SHARMA, B., and ELISSEEFFI, J.H. **Engineering structurally organized cartilage and bone tissues.** *Ann. Biomed. Eng.* 2004; **32**: 148.
- 33) LIU, X., and M.A, P.X. **Polymeric scaffolds for bone tissue engineering.** *Ann. Biomed. Eng.* 2004; **32**: 477.
- 34) Rabin, C.; Liang, Y.; Ehrlichman, R.S.; Budhian, A.; Metzger, K.L.; Majewski-Tiedeken, C.; Winey, K.I.; Siegel, S.J. **In vitro and in vivo demonstration of risperidone implants in mice.** *Schizophr. Res.* 2008, 98, 66–78.
- 35) MA AND ZHANG. **Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix.** *NANO-FIBER MATRIX.* 1999

- 36) OluFunmi L. Johnson, Warren Jaworowicz, Jeffrey L. Cleland Pharmaceutical Research **The Stabilization and Encapsulation of Human Growth Hormone into Biodegradable Microsphere** June 1997, Volume 14, Issue 6, pp 730-735
- 37) Gupte & Ma. **Nanofibrous Scaffolds for Dental and Craniofacial Applications** *J Dent. J Dent Res* 91(3) 2012
- 38) W. Yuan et al. **Preparation and Characterization of recombinant human growth hormone- Zn<sup>+2</sup> –dextran nanoparticles using aqueous phase –aqueous phase emulsion.** *Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8 2012
- 39) V.D. JAHNO; G. B. M. RIBEIRO; L. A. SANTOS; R. A. LIGABUE; S. EINOLOFT; M. R. W. Ferreira; K. F. **Bombonato - Prado.** *Journal of Biomedical Materials Research* 2007, v. 82, p. 1-6.
- 40) Somatropina Humana Recombinante 4 UI. **Saizen (pó liófilo injetável):** Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça; Dezembro 2009. Bula. N1281212B.
- 41) J. Zhao et al. **Preparation, structure and crystallinity of chitosan nano-fibers by a solid–liquid phase separation technique.** *Carbohydrate Polymers* 83 (2011) 1541–1546
- 42) A.P. Serro, M. Bastos, J.C. Pessoa, B. Saramago, **Bovine serum albumin conformational changes upon adsorption on titania and on hydroxyapatite and their relation with biomineralization,** *J. Biomed. Mater. Res. A* 70A (3) (2004) 420–427.
- 43) B.T. Reves, J.D. Bumgardner, J.A. Cole, Y.Z. Yang, W.O. Haggard, Recipient of 2009 Society for Biomaterials Student Award for Outstanding Research. **Master's Degree Candidate Category Lyophilization to Improve Drug Delivery for Chitosan–Calcium Phosphate Bone Scaffold Construct: A Preliminary Investigation,** *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 90B (1) (2009) 1–10
- 44) Hu and Ma. **Nano-Fibrous Scaffolds Capable of Growth Factor Delivery.** *Pharm Res* (2011) 28:1273–1281
- 45) Siepmann, J., Siepmann, F., 2008. **Mathematical modeling of drug delivery.** *Int. J. Pharm.* 364, 328–343
- 46) S. Fredenberg et al. **The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems: A review.** *International Journal of Pharmaceutics* 415 (2011) 34– 52
- 47) Mollo, A.R., Corrigan, O.I., 2003. **Effect of poly-hydroxy aliphatic ester polymer type on amoxicillin release from cylindrical compacts.** *Int. J. Pharm.* 268, 71–79

- 48) Arifin, Y., Lee, L.Y., Wang, C., 2006. **Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: implications to drug delivery systems.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1274–1325.
- 49) K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios, *An Introduction to Tissue–Biomaterial Interactions*, , 2002.
- 50) A.G. Mitsak, J.M. Kempainen, M.T. Harris, S.J. Hollister, **Effect of polycaprolactone scaffold permeability on bone regeneration in vivo**, *Tissue Eng. Part (13–14)* (2011) 1831–1839.
- 52) Mollo, A.R., Corrigan, O.I., 2003. **Effect of poly-hydroxy aliphatic ester polymer type on amoxicillin release from cylindrical compacts.** *Int. J. Pharm.* 268, 71–79
- 53) Blanco, M.D., Alonso, M.J., 1997. **Development and characterization of proteinloaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres.** *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43,287–294.
- 54) Kang, J., Lambert, O., Ausborn, M., Schwendeman, S.P., 2008. **Stability of proteins encapsulated in injectable and biodegradable poly(lactide-co-glycolide)-glucose millicylinders.** *Int. J. Pharm.* 357, 235–243.
- 55) Desai, K.G.H., Olsen, K.F., Mallery, S.R., Stoner, G.D., Schwendeman, S.P., 2010. **Formulation and in vitro–in vivo evaluation of black raspberry extract-loaded PLGA/PLA injectable millicylindrical implants for sustained delivery of chemopreventive anthocyanins.** *Pharm. Res.* 27, 628–642
- 56) Kang, J., Schwendeman, S.P., 2007. **Pore closing and opening in biodegradable polymers and their effect on the controlled release of proteins.** *Mol. Pharm.* 4, 104–118
- 57) Chen, X., Ooi, C.P., 2006. **Effect of ganciclovir on the hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) microspheres.** *J. Biomater. Appl.* 20, 287–302.
- 58) Santoveña, A., García, J.T., Oliva, A., Llabrés, M., Fariña, J.B., 2006. **A mathematical model for interpreting in vitro rhGH release form laminar implants.** *Int. J. Pharm.* 309, 38–43
- 59) Ding, A.G., Schwendeman, S.P.,. **Acidic microclimate pH distribution in PLGA microspheres monitored by confocal laser scanning microscopy.** *Pharm. Res.* 2008 25,2041–2052.
- 60) Wu Shen Xue and Wang Nuo. **Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation** *J. Biomater. Sci. Polymer End*, Vol. 12, No. 1, pp. 21-34 (2001 )
- 61) Wang, J., Wang, B.M., Schwendeman, S.P.,. **Mechanistic evaluation of the glucose-induced reduction in initial burst release of octreotide acetate from poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres.** *Biomaterial* 25, 1919–1927 2004

62) Calvo-Guirado JL, Mate-Sanchez J, Delgado-Ruiz R. **Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study.** Clinical Oral Implants Research. 1-7, 2010

63) Gómez-Moreno G, Cutando A, Arana C, Worf CV, et al. **The effects of growth hormone on the initial** bone formation around implants. The International Journal of Oral e Maxilofacial Implants. V.24, n.6, 1068- 1073. 2009



*Anexos*

---

**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA  
DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS**









