

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM IMPLANTODONTIA

MARIANE BEATRIZ SORDI

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, DEGRADAÇÃO E
CITOTOXICIDADE DE ARCABOUÇOS DE PLGA+HA/ β TCP
COM SINVASTATINA INCORPORADA**

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro

Florianópolis
2017

Mariane Beatriz Sordi

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, DEGRADAÇÃO E
CITOTOXICIDADE DE ARCABOUÇOS DE PLGA+HA/ β TCP
COM SINVASTATINA INCORPORADA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia na área de concentração de Implantodontia.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro

Florianópolis
2017

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

Sordi, Mariane Beatriz

Produção, caracterização, degradação e citotoxicidade de arcabouços de PLGA+HA/bTCP com Sinvastatina incorporada / Mariane Beatriz Sordi ; orientador, Ricardo de Souza Magini ; coorientadora, Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro. - Florianópolis, SC, 2017.
121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Arcabouço. 3. Sinvastatina. 4. Cerâmica bifásica. 5. Polímero. I. Magini, Ricardo de Souza. II. Cordeiro, Mabel Mariela Rodríguez. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Mariane Beatriz Sordi

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, DEGRADAÇÃO E
CITOTOXICIDADE DE ARCABOUÇOS DE PLGA+HA/ β TCP
COM SINVASTATINA INCORPORADA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Odontologia”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 10 de fevereiro de 2017.

Prof.^a. Dr.^a. Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Presidente
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof. Dr. Águedo Aragonés
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à ciência e à
todas as pessoas que podem melhorar
sua vida a partir dela.

AGRADECIMENTOS

Não há como iniciar uma seção de agradecimentos sem primeiramente mencionar a família, a base de qualquer existência, o apoio incondicional e absoluto, o amor. Agradeço aos meus pais, *Laidete e Sérgio*, por todo o incentivo que me deram para que eu continuasse estudando e para que eu desse meus próprios passos rumo aos meus sonhos e anseios. Agradeço às minhas irmãs, *Isaura, Elisana e Roseane*, por serem meus complementos, partes de mim, cada uma com suas características e peculiaridades. Família, vocês são meu apoio e minha alavanca, é por vocês que busco dar o melhor de mim em tudo que faço.

Agradeço também ao meu companheiro, amigo e namorado, *Jorge*. Já se passaram muitos anos juntos, já enfrentamos diversos desafios, já fizemos muitos planos. Alguns já realizados e muitos outros por realizar. Obrigada por sempre estar por perto, incentivando-me a seguir minhas metas e tentando mostrar a mim mesma as minhas qualidades. Obrigada pela sua família, que sempre me acolheu com carinho e atenção. É com você que eu quero estar!

A vivência nestes dois anos de mestrado, apesar de muito esforço e muito estudo, foi doce, leve e divertida. As amizades que construí durante os dois anos de curso, certamente levarei por toda a minha vida. Amigos são aquelas pessoas que chegam à nossa vida e, por afinidade ou mesmo coincidência, acabam por se tornar indispensáveis; estão conosco nos momentos agradáveis e de lazer, nos alegram nos dias tristes, trazem conselhos quando é preciso. Agradeço a todos os amigos que fizeram parte da minha vida, em especial àqueles que estiveram mais próximos de mim durante os anos de mestrado e contribuíram direta ou indiretamente, não só para a execução deste trabalho, mas para a minha formação como mestre em Odontologia. Aos meus amigos *Karin, Adriana, Javier, Madalena, Maria Elisa, Fernanda*, e aos demais colegas de mestrado / doutorado, deixo o meu muito obrigada. Vocês fazem meus dias mais felizes. São essenciais para mim!

Ao meu professor orientador, minha inspiração, meu incentivador, professor *Ricardo Magini*. Agradeço muito por toda confiança e apoio que o senhor dedica a mim desde que iniciei minha carreira na pesquisa científica. O senhor continuamente, não somente abre as portas para o meu futuro, como está ao meu lado para me apoiar e torcer por mim. É no senhor que eu busco inspiração e incentivo. Muito obrigada!

À minha professora co-orientadora, professora *Mabel Cordeiro*. A senhora é exemplo de dedicação e motivo de inspiração. É na senhora que vejo toda a magia que eu tanto admiro no mundo celular e molecular. Assistir a uma aula sua é entrar em um novo mundo, viajar por ele, e retornar maravilhada em imaginar como tudo pode ser explicado e transformado através da pesquisa científica. Obrigada por ajudar a desenvolver este trabalho. Aproveito para agradecer a, hoje doutora, *Isis Encarnação*, colega que iniciou os estudos dos quais hoje eu dou continuidade. Foi a Isis que, juntamente com nossos professores orientadores, encabeçou este trabalho e ajudou no desenvolvimento da metodologia, que resultou em apoio financeiro internacional para o desenvolvimento desta pesquisa e de outras que estão por vir. Ainda, os trabalhos desenvolvidos previamente, ajudaram a melhorar o presente estudo, bem como explicar muitos dos resultados obtidos.

Ao professor *Águedo Aragones*, sempre atencioso e gentil. Este trabalho é fruto das suas ideias e dos seus conhecimentos em biomateriais. O senhor nunca mediu esforços para ensinar o que fosse preciso, esteve comigo no laboratório para a confecção dos arcabouços e sempre se mostrou disposto para ajudar no desenvolvimento do trabalho. Admiro muito o seu esforço e dedicação e agradeço por toda a atenção que o senhor tem me dado.

À professora *Ariadne Cruz*, a qual é, para mim, modelo de professora. Cultivo esta admiração desde as aulas de periodontia, que a senhora sabe conduzir com tanta paciência e tanto amor. Tive a sorte de reencontrá-la no meu caminho e de me aproximar um pouco mais. A senhora muito me ajudou quando eu precisei, e minha admiração só aumentou. Obrigada por tudo, a senhora é exemplo para mim!

Ao professor *Júlio Souza*, que tanto confiou e abriu portas para o meio científico. Professor, o senhor é exemplo de dedicação e trabalho árduo. Estivemos desenvolvendo pesquisas juntos desde o período de iniciação científica da minha graduação, e desde então eu pude contar com o seu apoio e incentivo. Obrigada por confiar em mim!

À professora *Andrea Pimenta*, minha fonte de conhecimento em microbiologia. Foi neste meio que realizei as minhas primeiras pesquisas, e a senhora teve a paciência e a bondade de apontar os meus erros e ensinar o caminho correto. A senhora sempre foi muito atenciosa e disponível, e eu agradeço muito por todo o conhecimento adquirido.

Ao professor *Marco Aurélio Bianchini*, que com o seu jeito peculiar, soube me intrigar e me fazer buscar respostas para pesquisas clínicas. O senhor esteve presente durante todas as etapas do mestrado e atuou como um grande clínico, transmitindo seus conhecimentos e possibilitando que eu me tornasse não apenas pesquisadora, mas também uma boa implantodontista.

Ao professor *César Benfatti*, o qual esteve ajudando-me em todos os sentidos durante o período de mestrado, solucionando tanto dúvidas clínicas quanto científicas. O senhor é exemplo de versatilidade e bom humor. Obrigada por lutar tanto pelo bem do CEPID e de seus alunos, e obrigada pela ajuda concedida sempre que precisei.

Ao professor *Antônio Carlos Cardoso*, por todo o carinho e conhecimento transmitido. Muito obrigada por atuar como um incentivador para a formação de professores completos, e obrigada pela paciência em ensinar. O senhor é um professor-pai.

Às professoras *Cláudia Volpato e Elisa Oderich*, minhas referências em excelência em prótese dentária. Muito obrigada pela atenção incondicional, vocês são exemplos para mim de professoras completas, capazes de atuar na pesquisa científica e na clínica. Embora tivéssemos desenvolvido em parceria apenas casos clínicos, as senhoras também são referência para a professora que desejo ser.

À nossa sempre presente e dedicada, *Silvane Costa*, que trabalha incansavelmente pelo bem do CEPID e de seus alunos, “quebrando-galhos” e “dando puxões de orelha”. Sil, você é também uma amiga e exemplo de dedicação!

Ao InteLab, laboratório onde os experimentos de cultivo celular estão sendo realizados, e a toda sua equipe, em especial ao professor *Luísmar Porto*, por permitir que parte desta pesquisa fosse desenvolvida em seu laboratório, e à aluna *Camila Schoeder*, que atuou ativamente nas culturas celulares. Ao professor *Marcos Segatto*, que foi extremamente gentil, viabilizando os testes de caracterização térmica dos biomateriais produzidos, ao doutor *Leandro Nandú*, que realizou os testes de caracterização química das amostras no Laboratório Central de Análises de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, e aos mestrandos *Roberta de Farias e Guilherme Volpato*, que ajudaram na obtenção das imagens por microscopia eletrônica de varredura com o equipamento disponível na Engenharia Mecânica.

"O desejo sincero e profundo do coração é sempre realizado; em minha própria vida tenho sempre verificado a certeza disto."
(Mahatma Gandhi)

RESUMO

As perdas ósseas decorrentes de perdas dentárias ou doenças degenerativas fizeram com que houvesse interesse na busca por estratégias de regeneração óssea, a fim de repor o osso que foi perdido. Devido às suas características biológicas e mecânicas, o osso exige estratégias complexas para permitir a reconstituição da sua estrutura e função. Os principais quesitos para uma estratégia eficaz de engenharia óssea incluem um número suficiente de células formadoras de osso, um arcabouço capaz de conduzir estas células e oferecer suprimento sanguíneo adequado, e fatores de crescimento capazes de induzir a diferenciação celular. Assim, o objetivo deste estudo foi produzir arcabouços de ácido polilático co-glicólico com hidroxiapatita e β -tricálcio fosfato (PLGA+HA/ β TCP), adicionados de sinvastatina a 5%, bem como caracterizar e avaliar a degradação e a citotoxicidade destes arcabouços, de forma a verificar se os mesmos poderiam ser promissores para aplicação clínica. Os arcabouços foram obtidos pela técnica de evaporação de solvente. Após a dissolução completa do polímero em clorofórmio, foram adicionadas partículas de sacarose e de cerâmica bifásica (hidroxiapatita (70%) e β -TCP (30%)), na proporção 1:1 entre polímero e cerâmica. Após a evaporação do solvente, a sacarose foi removida utilizando-se álcool polivinílico. Para os arcabouços com sinvastatina incorporada, o fármaco a 5% foi diluído em clorofórmio, ao qual foram adicionados sacarose, hidroxiapatita e β -TCP ao polímero já diluído. Os arcabouços foram seccionados em discos de 6 mm por 1 mm e esterilizados por radiação gama. Após a síntese dos arcabouços, os mesmos sofreram testes de caracterização, degradação e citotoxicidade. Para tanto, as amostras foram imersas em PBS a 37 °C, sob agitação constante, durante 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Amostras não degradadas foram tomadas como referência. Foram realizados microscopia eletrônica de varredura, para avaliar a estrutura física; espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier, para analisar a composição química; calorimetria exploratória diferencial, para testar as propriedades térmicas; teste da gota, para verificar a hidrofobia; e citotoxicidade, para avaliar se as amostras afetam o crescimento celular. As imagens obtidas por microscopia revelam a presença de macro, meso e microporos na estrutura do polímero, onde partículas de HA e β TCP encontram-se bem inseridas e dispersas. Para análises químicas, observa-se um padrão bastante semelhante entre os arcabouços sem sinvastatina e com sinvastatina a 5%, com prevalência de bandas de absorção de cerca de 1750 cm^{-1} (C = O), e de bandas entre 350 – 1500 cm^{-1} (ésteres (C – O) e

hidrocarbonetos (CH_2 e CH), assim como traços de hidrocarbonetos (CH , CH_3 e CH_2) por volta de 3000 cm^{-1} . Sobre as análises térmicas, observa-se que as curvas do termograma seguem um padrão semelhante entre os arcabouços sem sinvastatina e com sinvastatina a 5%, com valores numéricos muito próximos, onde os picos endotérmicos ocorrem em cerca de $150 - 160 \text{ }^\circ\text{C}$. Os arcabouços com sinvastatina mostraram-se mais hidrofílicos e mais citotóxicos que os arcabouços sem sinvastatina, chegando a uma redução de até 20% na viabilidade celular ao terceiro dia de experimento em comparação com o controle positivo. Arcabouços de PLGA+HA/ β TCP com sinvastatina a 5% apresentaram boas características físico-estruturais, químicas e térmicas, demonstrando ser um biomaterial promissor para a regeneração de tecido ósseo juntamente com células-tronco. Entretanto, quando testado sobre fibroblastos, os mesmos arcabouços mostraram-se citotóxicos na concentração de testada de sinvastatina.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Bioengenharia. Arcabouços. Polímero. PLGA. Cerâmica bifásica. Hidroxiapatita. β -tricalcío fosfato. Sinvastatina.

ABSTRACT

Bone loss due to tooth extraction or degenerative diseases cause interest in the search for bone regeneration strategies. Due to its biological and mechanical characteristics, bone requires complex strategies to allow the reconstitution of its structure and function. The main requirements for an effective bone engineering strategy include sufficient number of bone-forming cells, scaffolds capable of conducting these cells and providing adequate blood supply, and growth factors able to induce cell differentiation. Thus, the aim of this study was to develop scaffolds of polylactic coglycolic acid, hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate (PLGA+HA/ β -TCP), added with 5% simvastatin, as well as to characterize and evaluate the degradation and cytotoxicity of the scaffolds in order to assess if these biomaterials could be used for further clinical proposes. The samples were obtained by the solvent evaporation technique. After complete dissolution of the polymer in chloroform, sucrose and biphasic ceramic particles (HA (70%) and β -TCP (30%)) were added in a ratio of 1:1 between polymer and ceramic. After evaporation of the solvent, sucrose was removed using polyvinyl alcohol. For the samples with simvastatin, 5% of the medication were diluted in chloroform to which sucrose, HA and β -TCP were added to the diluted polymer. Then, the samples were sectioned on 6 mm x 1 mm discs and sterilized by gamma radiation. After the synthesis of the scaffolds, characterization and degradation tests were conducted. For degradation, the samples were immersed in PBS at 37 °C under constant stirring for 1, 7, 14, 21, and 28 days. Non-degraded samples were taken as reference. Scanning electron microscopy was performed to evaluate the physical structure; Fourier transform infrared spectroscopy to analyze the chemical composition; differential scanning calorimetry to test the thermal properties; drop test to check for hydrophobicity; and cytotoxicity to evaluate whether the samples could affect cell growth. Microscopy images revealed the presence of macro, meso and micropores in the polymer structure, where particles of HA and β TCP were well inserted and dispersed. On chemical analyzes, a very similar pattern is observed between the scaffolds without simvastatin and with 5% simvastatin, and a prevalence of absorption bands of about 1750 cm^{-1} (C = O), and bands between 350 - 1500 cm^{-1} , characteristic of esters (C - O) and hydrocarbons (CH_2 and CH), as well as traces of CH, CH_3 and CH_2 hydrocarbons at about 3000 cm^{-1} . On thermal analyzes, it was observed that the thermogram curves follow a similar pattern between the scaffolds without simvastatin and with 5% simvastatin, with very close numerical

values, where the endothermic peaks occur at about 150 - 160 °C. Scaffolds with 5% simvastatin were more hydrophilic and cytotoxic than scaffolds without simvastatin, reaching a reduction of up to 20% in cell viability on the third day of experiment compared to the positive control. Scaffolds of PLGA+HA/ β TCP with 5% simvastatin presented good structural, chemical and thermal characteristics, revealing to be a promising biomaterial for regeneration of bone tissue along with stem cells. However, when tested on fibroblasts, the scaffolds were cytotoxic at the concentration of 5% simvastatin.

Keywords: Bone regeneration. Bioengineering. Scaffolds. Polymer. PLGA. Biphasic ceramics. Hydroxyapatite. β -tricalcium phosphate. Simvastatin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Demonstração da secção realizada nas amostras do estudo para análises por microscopia eletrônica de varredura, onde A representa a secção horizontal e B a secção vertical ou transversa.....	43
Figura 2. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal.....	48
Figura 3. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal.....	49
Figura 4. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical.....	50
Figura 5. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical.....	51
Figura 6. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	52
Figura 7. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial.....	54
Figura 8. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal, após 1 dia de degradação.....	56
Figura 9. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal, após 1 dia de degradação.....	57
Figura 10. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical, após 1 dia de degradação.....	58
Figura 11. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical, após 1 dia de degradação.....	59
Figura 12. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal, após 7 dias de degradação.....	60
Figura 13. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal, após 7 dias de degradação.....	61

Figura 14. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical, após 7 dias de degradação.....	62
Figura 15. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical, após 7 dias de degradação.....	63
Figura 16. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal, após 14 dias de degradação.....	64
Figura 17. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal, após 14 dias de degradação.....	65
Figura 18. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical, após 14 dias de degradação.....	66
Figura 19. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical, após 14 dias de degradação.....	67
Figura 20. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal, após 21 dias de degradação.....	68
Figura 21. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal, após 21 dias de degradação.....	69
Figura 22. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical, após 21 dias de degradação.....	70
Figura 23. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical, após 21 dias de degradação.....	71
Figura 24. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal, após 28 dias de degradação.....	72
Figura 25. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal, após 28 dias de degradação.....	73
Figura 26. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical, após 28 dias de degradação.....	74

Figura 27. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical, após 28 dias de degradação.....	75
Figura 28. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de amostras degradadas por 1 dia.....	77
Figura 29. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de amostras degradadas por 7 dias.....	78
Figura 30. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de amostras degradadas por 14 dias.....	79
Figura 31. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de amostras degradadas por 21 dias.....	80
Figura 32. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de amostras degradadas por 28 dias.....	81
Figura 33. Comparação dos gráficos obtidos através de FTIR nos diferentes tempos experimentais.....	82
Figura 34. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial de amostras degradadas por 1 dia.....	84
Figura 35. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial de amostras degradadas por 7 dias.....	85
Figura 36. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial de amostras degradadas por 14 dias.....	86
Figura 37. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial de amostras degradadas por 21 dias.....	87
Figura 38. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial de amostras degradadas por 28 dias.....	88
Figura 39. Comparação dos gráficos obtidos através de DSC para amostras sem sinvastatina nos diferentes tempos experimentais.....	89
Figura 40. Imagens obtidas através do teste de molhabilidade das amostras, onde 1a representa amostra sem sinvastatina imediatamente após a deposição da gota e 1b representa amostra sem sinvastatina uma hora após a deposição da gota de meio de cultura celular; 2a representa amostra com sinvastatina imediatamente após a deposição da gota e 2b representa amostra com sinvastatina uma hora após a deposição da gota.....	91
Figura 41. Valores de média \pm desvio padrão da absorbância (490 nm) obtida pelo teste de citotoxicidade de arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 1 dia de crescimento. * Letras iguais representam que não houve diferença estatística entre os grupos.....	93
Figura 42. Valores de média \pm desvio padrão da absorbância (490 nm) obtida pelo teste de citotoxicidade de arcabouços com e sem sinvastatina	

sobre fibroblastos L929 após 3 dias de crescimento. * Letras iguais representam que não houve diferença estatística entre os grupos.....	94
Figura 43. Valores de média \pm desvio padrão da absorbância (490 nm) obtida pelo teste de citotoxicidade de arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 7 dias de crescimento. * Letras iguais representam que não houve diferença estatística entre os grupos.....	95
Figura 44. Valores expressos em porcentagem \pm desvio padrão para a citotoxicidade apresentada pelos arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 1 dia de crescimento.....	96
Figura 45. Valores expressos em porcentagem \pm desvio padrão para a citotoxicidade apresentada pelos arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 3 dias de crescimento.....	97
Figura 46. Valores expressos em porcentagem \pm desvio padrão para a citotoxicidade apresentada pelos arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 7 dias de crescimento.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bandas de absorção e suas correspondências.....	53
Tabela 2. Bandas de absorção e os tipos de ligação.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTM – Células-tronco mesenquimais
MEC – Matriz extracelular
BMPs – Proteínas ósseas morfogenéticas
rhBMPs - Proteínas ósseas morfogenéticas recombinantes
ROG – Regeneração óssea guiada
PLA – Poli(ácido láctico)
PGA – Poli(ácido glicólico)
PLGA – Poli(D,L-láctico-co-glicólico)
PLLA – Poli(L-ácido láctico)
HA – Hidroxiapatita
TCP – Tricálcico fosfato
PLGA+HA – Ácido polilático co-glicólico e hidroxiapatita
PLGA+HA/ β TCP – Ácido polilático co-glicólico e hidroxiapatita com β -tricálcio fosfato
PLGA+HA/ β TCP+SIN5% – Ácido polilático co-glicólico e hidroxiapatita com β -tricálcio fosfato e sinvastatina a 5%
HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
LT 706 S – *Poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate, Resomer[®] Evonik*
LG 824 S – *Poly(L-lactide-co-glycolide) 82:18, Resomer[®] Evonik*
DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's médium*
SFB – Soro fetal bovino
PS – Solução de penicilina/estreptomicina
PBS – Solução tampão de fosfato
MTS – [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
DMSO – Dimetilsulfóxido
pH – Potencial hidrogeniônico
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformação de Fourier
DSC – Calorimetria exploratória diferencial
CO₂ – Dióxido de carbono

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3 JUSTIFICATIVA.....	37
4 OBJETIVOS.....	39
5 METODOLOGIA.....	41
6 RESULTADOS.....	47
7 DISCUSSÃO.....	99
8 CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS.....	111

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo. A matriz óssea é constituída principalmente de hidróxiapatita (65% do seu peso molecular), de colágeno do tipo I, proteoglicanas de baixo peso molecular e proteínas não-colágenas (25%) e de água (10%). As células que constituem o tecido ósseo são principalmente osteoblastos (responsáveis pela produção de matriz óssea), osteoclastos (capazes de promover a reabsorção óssea), osteócitos (células adultas) e células de revestimento do osso. O desenvolvimento embrionário do osso ocorre durante a determinação do eixo dorsoventral do embrião através de vias intramembranas e endocondrais, um processo complexo de múltiplas etapas, que só é completado na idade adulta. As células osteoprogenitoras são de origem mesenquimal, possuem as propriedades de células-tronco, dando origem aos osteoblastos por meio de um mecanismo regulador que envolve fatores de crescimento e de transcrição. As células osteoprogenitoras persistem por toda a vida pós-natal como células ósseas de revestimento e são reativadas no adulto durante o reparo de fraturas ósseas e outras lesões (CARREIRA et al., 2014; KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

As perdas ósseas decorrentes de perdas dentárias ou doenças degenerativas fizeram com que houvesse interesse na busca por estratégias de regeneração óssea, a fim de repor o osso que foi perdido. Devido às suas características biológicas e mecânicas, o osso exige estratégias complexas para permitir a reconstituição da sua estrutura e função. Os principais quesitos para uma estratégia eficaz de engenharia óssea incluem um número suficiente de células formadoras de osso, um arcabouço capaz de conduzir estas células e oferecer suprimento sanguíneo adequado, e fatores de crescimento capazes de induzir a diferenciação celular (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012).

As CTM, uma vez que possuem a capacidade de se diferenciar em diferentes linhagens de células, acabam por se tornar peças-chave para a regeneração óssea. Entretanto, a sua atividade é regulada por interações com a matriz extracelular (MEC), exigindo o desenvolvimento de biomateriais que possam reproduzir as funções desempenhadas pela MEC (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). Os arcabouços, além de conduzirem as células devido à sua forma tridimensional e porosa, são capazes de desempenhar o papel da MEC, mas precisam contar com propriedades positivas de topografia de superfície, arquitetura,

interconectividade, rigidez/elasticidade e degradação para que sejam funcionais (WAGONER JOHNSON; HERSCHLER, 2011).

A utilização de fatores de crescimento permite que a diferenciação celular seja controlada em linhagens específicas (SUNDELACRUZ; KAPLAN, 2009). Nesse âmbito, entram as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), as quais são as moléculas mais estudadas e utilizadas na regeneração de tecido ósseo. Entretanto, existem preocupações relacionadas ao uso clínico das BMPs, uma vez que os seus efeitos adversos decorrentes de sua elevada potência limitam a sua utilização (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). Recentemente, a sinvastatina, medicamento utilizado para o tratamento da hipercolesterolemia (JADHAV; JAIN, 2006), tem obtido destaque por ser capaz de promover regeneração óssea, além de atuar como agente anti-inflamatório (MONTERO; MANZANO; ALBALADEJO, 2014).

As propriedades negativas das BMPs, tais como os efeitos colaterais decorrentes do seu uso ainda não bem estabelecido e o seu alto custo de utilização (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012), juntamente com os resultados promissores da sinvastatina, no sentido da regeneração óssea e facilidade de aquisição (MONTERO; MANZANO; ALBALADEJO, 2014), demonstram que novas pesquisas devam ser realizadas de forma a verificar a capacidade da sinvastatina de realizar diferenciação osteoblástica, bem como elucidar qual a melhor concentração e a melhor via de ação desta substância.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Engenharia de tecidos e Regeneração óssea

A regeneração óssea guiada (ROG) é um método empregado com sucesso na prática odontológica para aumentar o volume do osso hospedeiro em locais escolhidos para a colocação do implante. Originalmente, o princípio biológico que conduz ao método de regeneração guiada de tecidos foi descoberto por Karring e Nyman (KARRING; NYMAN; LINDHE, 1980; NYMAN et al., 1980) no início dos anos 1980 como um resultado do desejo de regenerar tecidos periodontais perdidos. Como consequência, novas possibilidades de regenerar tecidos periodontais com novo cimento, raiz, ligamento periodontal e osso alveolar se tornaram disponíveis. Logo, a regeneração de tecidos encontrou aplicações em outras áreas, incluindo a regeneração de tecido ósseo. Como resultado de experiências em animais e aplicações clínicas em seres humanos, a regeneração guiada de tecidos tornou-se um método efetivo para o aumento de osso em situações de volume inadequado para a colocação de implantes dentários (HÄMMERLE; KARRING, 1998).

Devido às suas características biológicas e mecânicas, o osso exige estratégias complexas destinadas a permitir a reconstituição da sua estrutura e função. Apesar da sua estrutura aparentemente definida, o osso é um tecido extremamente dinâmico, como resultado da reabsorção contínua por osteoclastos acompanhada de contínua formação *de novo* osso por osteoblastos (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). Em consequência à boa capacidade de cicatrização do osso, a maioria das fraturas ou defeitos ósseos pode curar espontaneamente. Durante a cura da fratura, células-tronco mesenquimais indiferenciadas circulantes são recrutadas para os locais da lesão através de quimiocinas e fatores de crescimento, e então proliferam e diferenciam-se em condroblastos e osteoblastos para reparar o defeito sob a influência da neo-vascularização e estímulos microambientais adequados (BALDINI et al., 2009; CARREIRA et al., 2014). A reprodução de uma rede tão complexa de células, fatores biológicos, mecânicos e influências faz da regeneração óssea um desafio médico e biológico.

Em princípio, quatro métodos são descritos com a finalidade de aumentar a taxa de formação óssea: (1) osteoindução, através da utilização de fatores de crescimento; (2) osteocondução, onde um material de enxerto serve como arcabouço para o crescimento de novo osso; (3) osteogênese de distração, na qual uma fratura é induzida cirurgicamente

e os dois fragmentos são então lentamente separados; e (4) regeneração guiada de tecidos (ou regeneração óssea guiada – ROG, para o caso do osso), que permite que os espaços mantidos por barreiras de membranas possam ser preenchidos com novo osso (HÄMMERLE; KARRING, 1998).

A fim de melhorar as taxas de sucesso de procedimentos cirúrgicos para melhorar a reconstrução de defeitos do osso, novas estratégias têm sido desenvolvidas para as terapias de regeneração: (1) abordagens acelulares, destinadas a facilitar a atividade de reparação por populações de células nativas, consistindo em uma matriz que contém sinais químicos de recrutamento que provocam a diferenciação de células-tronco locais, resultando na formação de um tipo funcionalmente competente de osso; (2) abordagens celulares, que envolvem células-tronco adultas ou células diferenciadas. Se forem utilizadas células imaturas, estas podem ser diferenciadas *in vivo* ou serem induzidas a diferenciação *in vitro*, antes da implantação; e (3) abordagens combinadas, onde populações de células são inseridas dentro de uma matriz, que é funcionalizada com agentes de sinalização biológica (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012).

Os principais quesitos para uma estratégia eficaz de engenharia óssea incluem: número suficiente de células formadoras de osso; arcabouço condutor de células; sinais bioquímicos, tais como fatores de crescimento, para induzir a diferenciação osteogênica; e suprimento sanguíneo adequado (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012).

2.2 Células-tronco mesenquimais

Os avanços científicos na compreensão da biologia de células-tronco mesenquimais (CTM) *in vivo* possuem implicações significativas para as estratégias de reparo ósseo. Acredita-se que a regeneração óssea seja mediada através de osteoprogenitores e seus ancestrais, as CTM, as quais podem ser encontradas em praticamente todos os tecidos peri e pós-natal (JONES; YANG, 2011). De acordo com a sua natureza mesenquimal, estas células perivasculares/reticulares podem dar origem a adipócitos (BIANCO et al., 1988) ou estarem envolvidas na organização de unidades de remodelação óssea (MÖDDER; KHOSLA, 2008). Além disso, eles suportam a hematopoiese pela liberação de citocinas essenciais para o tráfico e maturação de células-tronco hematopoiéticas (SUGIYAMA et al., 2006). As principais propriedades das CTM são: auto-renovação e diferenciação (multipotentes), capacidade quimiotática e de migração para locais inflamados ou injuriados, secreção de

mediadores parácrinos e fatores tróficos, propriedades imunomoduladoras, propriedades angiogênicas, e atividade em reações inflamatórias (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). A compreensão da biologia de CTM *in vivo*, bem como a sua relação com as células endoteliais locais, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de reparo ósseo. A cuidadosa seleção de fontes de CTM e o preparo de arcabouços com formulações mistas de CTM levarão à formação de tecidos de reposição com qualidade (JONES; YANG, 2011).

CTM adultas foram encontradas numa grande variedade de locais, incluindo periósteo, tecido muscular, pericôndrio, tecido adiposo, tecidos fetais (pulmão, fígado, e baço), e em fontes menos maduras, tais como placenta, líquido amniótico e sangue do cordão umbilical (BERNARDO; LOCATELLI; FIBBE, 2009). Nestes locais, as CTM estão adormecidas em um estado de não proliferação, até que sejam obrigadas a participar na reparação e regeneração local. CTM quiescentes são mobilizados através de regulação de sinais físicos e químicos que controlam a sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência. A maioria dos ensaios clínicos utiliza células-tronco da medula óssea para aplicações terapêuticas (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). Entretanto, a ausência de marcadores de superfície específicos para identificar precursores de tecido conjuntivo no interior da população de células-tronco heterogêneas, bem como ensaios preditivos de desempenho clínico torna difícil identificar uma fonte ideal de CTM (HABIBOVIC et al., 2006). Células-tronco adultas costumam se diferenciar em um leque restrito de progenitores e células terminais para substituir tecidos locais. No entanto, o isolamento e a cultura de células funcionais específicas de tecidos em quantidades suficientes para proporcionar terapias eficazes pode ser um desafio. Por outro lado, células-tronco embrionárias possuem capacidade ilimitada de autorrenovação e plasticidade, mas existem problemas éticos e de segurança com relação ao seu uso (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012).

2.3 Arcabouços

CTM são sem dúvida peças-chave para a regeneração óssea, mas sua atividade é regulada por interações com a MEC. Sob este ponto de vista, é necessário o desenvolvimento de biomateriais que reproduzam as funções desempenhadas pela MEC (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). Para estruturas biológicas que não podem ser reparadas, os meios alternativos de restabelecer as funções nos indivíduos é usar um

biomaterial. Implantes ou transplantes são geralmente utilizados para imitar ou restaurar as funções das estruturas biológicas danificadas, mas poucos podem reproduzir plenamente todas as ações complexas do tecido ou órgão original (BARBANTI et al., 2004).

O conceito de engenharia de tecidos com base em arcabouços foi introduzido no início de 1990 para tratar as limitações de enxerto de tecidos e reparação aloplástica de tecidos a partir da aplicação dos princípios da engenharia e das ciências da vida em direção ao desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido (LANGER; VACANTI, 1993). A baixa eficácia terapêutica do transplante de células foi registrada quando as células foram transferidas para dentro da área enxertada por injeção ou infusão, possivelmente porque as células são pobremente retidas no local. Sendo assim, é necessário dar um microambiente para as células que seja adequado à sua sobrevivência e função, e isso pode ser conseguido através do uso de biomateriais tridimensionais, os arcabouços. Além do mais, estes microambientes podem ser utilizados como transportadores de moléculas biosinalizadoras e nutrientes celulares, que são capazes de influenciar positivamente as células transplantadas e, por conseguinte, resultando em um aumento significativo da eficácia terapêutica (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012).

Arcabouços são usados como substitutos temporários do tecido original quando existe alguma lesão a ser reparada e regenerada. Os arcabouços osseocondutores devem atuar para facilitar, ou até mesmo acelerar, o reparo ósseo, enquanto a reconstrução do defeito ósseo não atinge a sua completa resolução. Portanto, eles não devem atuar como um substituto para o tecido de osso de maneira permanente (FISHER et al., 2015). Arcabouços tridimensionais possuem uma série de exigências a serem cumpridas, devendo ser aceitos pelo organismo, fornecer ligação entre as células, facilitando a migração e a proliferação celular, possibilitar irrigação sanguínea, permitir a sinalização bioquímica, possuir taxa de degradação proporcional à cicatrização óssea e, ainda, possuir rigidez semelhante ao osso. Portanto, propriedades químicas, topografia de superfície, arquitetura, porosidade, interconectividade, rigidez/elasticidade e degradação, são propriedades a serem ajustadas para obter um arcabouço funcional ideal (WAGONER JOHNSON; HERSCHLER, 2011).

Neste campo de arcabouços tridimensionais, é impossível não mencionar os polímeros. Os componentes mais importantes de uma célula viva (proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos) são todos polímeros, os quais são uma classe muito versátil de materiais, com diferentes

aplicações em diferentes campos de atuação (ERBETTA et al., 2012; PILLAI; PANCHAGNULA, 2001). Os poliésteres poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ácido glicólico) (PGA) foram os dois primeiros materiais a serem utilizados com sucesso na medicina para suturas. Eles pertencem a um grupo de polímeros que carregam grupos hidrolizáveis, os quais são suscetíveis à biodegradação. Uma alternativa interessante à utilização destes materiais é o copolímero poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), que contém unidades alternativas de PLA e PGA (ERBETTA et al., 2012; MIDDLETON; TIPTON, 2000; MOTTA; DUEK, 2006).

Copolímeros de PLGA são poliésteres relativamente hidrofóbicos, instáveis em condições húmidas e biodegradáveis em subprodutos como o ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água, que não são tóxicos e são absorvidos pelo organismo (ERBETTA et al., 2012). Assim, o PLGA é um biomaterial altamente biocompatível, além de ser facilmente confeccionado (MANO et al., 2004; MOTTA; DUEK, 2006). Sua vantagem sobre outros polímeros biorreabsorvíveis, como o poli(L-ácido láctico), ou PLLA, por exemplo, é o fato do PLGA requerer um menor tempo para sua completa degradação (BARBANTI et al., 2004), implicando menor probabilidade de reações adversas, as quais decorrem, muitas das vezes, de fragmentos cristalinos liberados por polímeros, cujo tempo de degradação é excessivamente longo (BERGSMA et al., 1995; MOTTA; DUEK, 2006); mas ainda possui tempo de degradação maior que polímeros como o PGA. Enquanto que para o PLLA o tempo de reabsorção do material pelo organismo pode levar mais de 36 meses (RENOUF-GLAUSER et al., 2005), para o PLGA esse tempo pode ser reduzido para aproximadamente 6 meses. Essa capacidade de controlar o tempo de degradação no organismo direciona o uso dos biomateriais para aplicações mais específicas (MOTTA; DUEK, 2006).

Apesar de não apresentar bioatividade intrínseca para osteoindução (GOMEZ et al., 2006; LEBOURG; SUAY ANTÓN; GOMEZ RIBELLES, 2010), o PLGA permite a incorporação e liberação de proteínas com substantividade (GOMEZ et al., 2006; LANSMAN et al., 2006). Seu mecanismo de degradação é extremamente útil para a liberação controlada de moléculas sinalizadoras ou fatores de crescimento (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). Entretanto, este copolímero está relacionado à baixa adesão e proliferação celular devido ao caráter hidrofóbico de sua superfície (LIU et al., 2011; SHEN et al., 2011) e, ainda, à sua baixa resistência mecânica (LIUYUN et al., 2013).

Os fosfatos de cálcio, incluindo hidróxiapatita (HA), tricálcico fosfato (TCP) e cimentos de fosfato de cálcio têm desempenhado papéis

importantes na construção de arcabouços para engenharia de tecido ósseo, pois são biocompatíveis e apresentam diferentes taxas de degradação, além da osteocondutividade (HUANG; MIAO, 2007). Biomateriais produzidos a partir de hidroxiapatita e/ou tricálcio fosfato devem ser cuidadosamente testados quanto à liberação de resíduos, duração e local de excreção. O mecanismo de degradação pode ser extremamente útil para a liberação controlada de moléculas de sinalização ou fatores de crescimento. Transportadores biodegradáveis oferecem controle do tempo da dose administrada, de modo a provocar a liberação de uma ou mais moléculas bioativas e manter uma concentração específica por um tempo prolongado (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012).

A hidroxiapatita e seus análogos são os componentes mais populares para substituição de osso, devido à sua semelhança química com o componente mineral dos ossos e dentes dos mamíferos. As baixas propriedades mecânicas e fragilidade destes compostos, especialmente quando fabricado com alta porosidade, frequentemente leva à sua utilização em conjunto com polímeros sintéticos. Da mesma maneira, devido à sua semelhança química com tecidos calcificados de mamíferos e, por conseguinte, sua biocompatibilidade, o β -TCP também tem sido utilizado na regeneração óssea. A diferença relevante entre as propriedades de HA e β -TCP são suas taxas de degradação, pois enquanto que a HA é relativamente não-solúvel, o β -TCP solubiliza rapidamente. Arcabouços com a combinação de ácido polilático co-glicólico e hidroxiapatita (PLGA+HA) tem obtido bons resultados, levando à diferenciação osteogênica de células que expressam diversos marcadores ósseos (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). Assim, combina-se, no mesmo material, características positivas como a liberação de íons cálcio e fosfato e a possibilidade de se incorporar substâncias bioativas para formar um sistema de liberação controlada para a osteoindução (BOERCKEL et al., 2011; YANG et al., 2006).

2.4 Fatores de crescimento

A manipulação tecidual pode ser conseguida através da entrega de sinais indutores nativos em microambiente *in vivo*. A utilização de fatores de crescimento permite a diferenciação celular controlada em linhagens específicas (SUNDELACRUZ; KAPLAN, 2009). O uso de matriz óssea desmineralizada para curar defeitos ósseos foi relatado pela primeira vez no final do século XIX, mas a proteína osteogênica envolvida neste processo foi descrita apenas na década de 1960, quando Urist presumiu um papel osteoindutivo para as proteínas ósseas

morfogenéticas (BMPs) (URIST, 1965). Atualmente, mais de 20 proteínas morfogenéticas homodiméricas ou heterodiméricas já foram descritas em seres humanos e em outras espécies, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento e na função de muitos tipos de células em vários tecidos. No tecido ósseo, as células osteoprogenitoras, osteoblastos, condrócitos, plaquetas e células endoteliais produzem BMPs. As BMP-2, BMP-4 e BMP-7 exibem potencial osteogênico expresso em epitélio dentário (CARREIRA et al., 2014).

Os efeitos *in vitro* das BMPs são observados em dosagens muito baixas (5 a 20ng/mL). No entanto, as BMPs disponíveis comercialmente são usadas em grandes doses (até 40mg para alguns produtos), provavelmente devido ao seu consumo proteolítico intenso durante as fases iniciais de reparação pós-cirúrgica. Além disso, a purificação de BMPs a partir de extratos de osso desmineralizado demanda alguns quilogramas de material, o qual tem um custo bastante elevado, além de ser um processo demorado (CARREIRA et al., 2014).

A meia-vida curta de diversos fatores de crescimento *in vivo* e os seus efeitos colaterais devido à sua elevada potência, colocam limitações no que diz respeito à sua administração sistêmica (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). Existem várias preocupações relacionadas com a utilização clínica das BMPs. Edema gengival grave foi relatado quando pacientes com defeitos em osso alveolar foram tratados com BMP-2 em um arcabouço de hidrogel à base de ácido hialurônico (NEOVIUS et al., 2013). Quatro casos de ossificação heterotrópica foram relatados em pacientes que foram tratados com rhBMP-2 e rhBMP-7, os quais tiveram que ser removidos cirurgicamente, aumentando a morbidade, já que um segundo sítio cirúrgico teve de ser abordado (AXELRAD et al., 2008). Ainda, BMPs em concentrações mais elevadas (40 mg) utilizadas em estudos clínicos na coluna cervical foram associadas ao maior risco de câncer em comparações com grupos controle, sugerindo que as BMPs são de fato cancerígenas; além do mais, os autores acrescentam que o risco de câncer associado a BMP-2 pode ser dose-dependente e enfatizam a necessidade protocolos mais bem definidos para o uso clínico de BMPs (DEVINE et al., 2012). Nesse âmbito, faz-se necessária a busca por outros fatores de crescimento, que possuam menor custo, segurança de aplicação e eficácia na regeneração óssea.

Em 1999, Mundy et al. relataram que a lovastatina e a sinvastatina eram capazes de estimular a regeneração óssea quando administradas por via subcutânea em calvária de ratos (MUNDY et al., 1999). Estas substâncias fazem parte do grupo das estatinas, as quais são

inibidores específicos da 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, a enzima limitante da velocidade da via de síntese de colesterol. Assim, a sinvastatina é uma das drogas mais prescritas para o tratamento da hipercolesterolemia, uma vez que tem a função de impedir a síntese de colesterol (JADHAV; JAIN, 2006).

A sinvastatina parece ser capaz de promover a atividade osteoblástica e inibir a atividade osteoclástica; além do mais, é sugerido que a sinvastatina colabore com a atividade das BMPs envolvidas no processo de regeneração óssea e conduza a diferenciação dos osteoblastos induzida pela antagonização do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (YAMASHITA et al., 2008). Entretanto, em estudo *in vivo*, sinvastatina e arcabouços de PLGA+HA/ β -TCP, associados ou não, e aplicados a defeitos de 5 mm de diâmetro em calvária de ratos, aumentaram a expressão de citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral α e interleucina 1- β) nos tecidos adjacentes, mas promoveram formação óssea similar aos dos grupos controle após 60 dias (ENCARNACAO et al., 2016). Não obstante, a sinvastatina ainda parece aumentar a atividade de fosfatase alcalina e a mineralização, assim como aumenta a expressão da sialoproteína óssea, da osteocalcina e do colágeno do tipo I, mostrando ter um efeito anti-inflamatório através da diminuição da produção de interleucina-6 e interleucina-8 (SAKODA et al., 2006). Por fim, a sinvastatina também parece ser capaz de estimular a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) de um modo dose-dependente (TAKENAKA et al., 2003), o qual, juntamente com as BMPs, atuará no sentido de ativar os osteoblastos a formarem novo osso.

Os resultados conflitantes acerca do efeito da sinvastatina podem ser decorrentes do fato de que os efeitos da sinvastatina podem ser influenciados por uma série de fatores, incluindo o modo de administração, duração da exposição, o modelo animal experimental e biodisponibilidade (PARK, 2009). Esforços devem ser direcionados para melhor entender os mecanismos biológicos envolvidos na aplicação tópica de sinvastatina, a qual é capaz de agir como um agente anti-inflamatório e regenerativo (MONTERO; MANZANO; ALBALADEJO, 2014).

Tendo em vista que os resultados obtidos com o uso da sinvastatina ainda são muito variáveis, assim como os métodos empregados para a utilização da mesma (*in vitro*, *in vivo*, diferentes concentrações, associadas ou não a arcabouços, arcabouços de composições distintas, entre outros) é importante que se realizem testes completos e variados em estudos iniciais *in vitro* para definitivamente

estabelecer se o uso da sinvastatina pode favorecer a diferenciação osteoblástica de células-tronco.

3 JUSTIFICATIVA

A regeneração óssea é tema de grande interesse dentro da Implantodontia, já que grande parte dos indivíduos que buscam por tratamentos reabilitadores por meio de próteses dentárias sobre implantes tem espessura e altura óssea reduzida decorrente da perda dental prévia. Tendo em vista que ainda não existem tratamentos bem estabelecidos acerca da regeneração óssea utilizando biomateriais, é preciso que novos estudos sejam realizados para preencher esta lacuna. Uma vez que o uso da sinvastatina (as vias de aplicação e concentrações apropriadas) ainda não está bem estabelecido na literatura, fazem-se necessários estudos que visem determinar se o uso da sinvastatina associada a arcações de PLGA+HA/ β TCP pode ser uma estratégia promissora para aplicações clínicas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Uma vez que estudos anteriores do presente grupo de pesquisa demonstraram boas propriedades mecânicas de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP, com e sem sinvastatina incorporada, bem como taxas favoráveis de liberação da sinvastatina em diferentes concentrações, o objetivo deste estudo foi produzir, caracterizar e avaliar a degradação e a citotoxicidade de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP sem sinvastatina e com sinvastatina a 5%.

4.2 Objetivos Específicos:

- Realizar testes para caracterização, bem como avaliar a degradação dos arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN5%;
- Avaliar e comparar a hidrofobia dos arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN5%;
- Avaliar a citotoxicidade dos arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN5%, seguindo as normas determinadas pela ISO10993-5.

5 METODOLOGIA

5.1 Reagentes

Os arcabouços foram confeccionados a partir dos polímeros LT 706 S (Poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate, Resomer[®] Evonik, Essen, Alemanha) e LG 824 S (Poly(L-lactide-co-glycolide) 82:18, Resomer[®] Evonik, Essen, Alemanha). Já a cerâmica bifásica adicionada aos arcabouços foi HA/ β TCP (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Para o grupo de arcabouço experimental, foram adicionados os mesmos polímeros e cerâmica bifásica, acrescidos de Sinvastatina (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, Estados Unidos). O método utilizado para a confecção dos arcabouços foi pela evaporação do solvente clorofórmio (Synth[®], Diadema, SP, Brasil), e a porosidade foi proporcionada através da adição de sacarose (Merck[®], Darmstadt, Alemanha), a qual foi removida com banhos de álcool polivinílico (Synth[®], Diadema, SP, Brasil).

O meio de cultura celular utilizados foi DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Gibco[™], Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), adicionado de soro fetal bovino (SFB, Gibco[™], Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e solução de penicilina/estreptomicina (PS, Gibco[™], Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). A degradação dos arcabouços foi realizada através da imersão das amostras em PBS (*phosphate buffered saline*, Medicago[®], Suécia). Para os testes de citotoxicidade, foi utilizado o ensaio colorimétrico MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; CellTiter 96[®], Promega, São Paulo, SP, Brasil), onde também foi necessário o uso de DMSO (Dimetilsulfóxido, Synth[®], Diadema, SP, Brasil).

5.2 Obtenção dos arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β -TCP+SIN5%

Os arcabouços foram produzidos com copolímero de ácido polilático coglicólico, hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato (PLGA+HA/ β TCP) obtidos pela técnica de evaporação de solvente. O copolímero PLGA, na proporção 3:1 (polímero baseado em lactídeo:poli(L-ácido láctico-co-trimetileno carbonato), foi dissolvido em clorofórmio (10% m/m), em temperatura ambiente. Após a dissolução completa do polímero, foram adicionadas partículas de sacarose (75%

m/m) com granulação inferior a 500 μm , bem como partículas de cerâmica bifásica (50 μm de hidroxiapatita (70%) e β -TCP (30%)), na proporção 1:1 entre polímero e cerâmica. Essa solução foi vertida em moldes cilíndricos de 6 mm de diâmetro até a evaporação total do solvente. Os cilindros obtidos foram então seccionados com lâmina de bisturi para obtenção de amostras com espessura de 1 mm e diâmetro de 6 mm. A sacarose foi removida das amostras obtidas usando-se solução de álcool polivinílico (($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$)_n) em banhos de 24 h, seguido por banhos de 24 h com água destilada, sob agitação constante. Para os arcabouços com sinvastatina incorporada (SIM \geq 97%, grau de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC, sólida M=418,57), o fármaco a uma concentração de 5% foi diluído em clorofórmio, ao qual foram adicionados sacarose (75%), HA e β -TCP ao polímero já diluído em clorofórmio (1:1). Os demais passos para a obtenção do arcabouço com sinvastatina foram os mesmos já descritos acima. Após a secagem dos discos obtidos, os arcabouços foram esterilizados por radiação gama (ENCARNACAO et al., 2016). Os arcabouços confeccionados possuíam em média 6 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, e um peso médio de 18 mg para os arcabouços sem sinvastatina e de 25 mg para arcabouços com sinvastatina.

5.3 Caracterização e degradação dos arcabouços

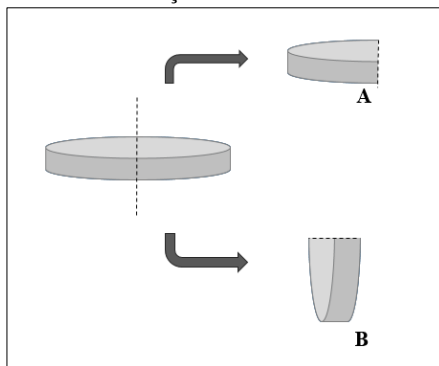
Os arcabouços com e sem sinvastatina foram analisados quanto à velocidade e qualidade de degradação. Para tanto, os discos foram imersos em *erlenmeyers* fechados contendo PBS estéril, a uma temperatura de 37 °C, sob agitação de 33 a 37 rpm, em uma incubadora com agitação TE-424 (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e a um pH regulado em $7,4 \pm 0,5$. Os arcabouços foram removidos nos tempos experimentais de 1, 7, 14, 21 e 28 dias, lavados três vezes com água destilada e secos em cabine de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil) por 20 h. Para cada tempo experimental, foram realizados os seguintes testes:

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os discos de PLGA+HA/ β TCP foram seccionados transversalmente, dividindo-os em duas metades, as quais foram analisadas horizontal e verticalmente (secção transversa), dispostas conforme a Figura 1. As amostras foram então dispostas sobre a superfície dos *stubs* e coladas com fita de carbono dupla

face nos recipientes de suporte, para então serem metalizadas com uma camada de Ouro-Paládio. Para as análises, foi empregado microscópio eletrônico (TM3030, Hitachi, Tóquio, Japão) com fonte de elétrons de Tungstênio, detector de elétrons secundários e nas tensões entre 10 e 15 kV, localizado no Laboratório de Microscopia da Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Foram analisados dois discos de PLGA+HA/ β TCP e dois discos de PLGA+HA/ β TCP+SIN5%. Para cada amostra, foram obtidos quatro registros com diferentes ampliações (X50, X100, X500, X1000, X2000).

Figura 1. Demonstração da secção realizada nas amostras do estudo para análises por microscopia eletrônica de varredura, onde A representa a secção horizontal e B a secção vertical ou transversa.



5.3.2 Espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier (FTIR)

Análises por FTIR foram realizadas nos arcabouços para determinar a qualidade e consistência das amostras, bem como determinar a quantidade de cada componente adicionado à mistura que deu origem aos arcabouços. As análises por FTIR foram

realizadas em um Cary 600 Series FTIR Spectrometer (Agilent Technologies Inc., Estados Unidos).

5.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os termogramas de DSC foram obtidos utilizando célula de DSC Shimadzu DSC-60 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Amostras de aproximadamente 1,5 mg foram seladas em cadinho de alumínio e submetidas a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio de fluxo de 100 mL min⁻¹. A faixa de temperatura analisada foi de 25 a 350 °C, em uma única corrida. A célula de DSC foi previamente calibrada com índio e zinco. Os dados obtidos foram processados em *software* TA-60 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

5.4 Teste de molhabilidade

A molhabilidade dos arcabouços de PLGA+HA/βTCP e PLGA+HA/βTCP+SIN5% foi avaliada através do teste da gota para avaliar a hidrofobia das amostras. Para tanto, 30 μl de DMEM foi colocado sobre os arcabouços com o auxílio de uma pipeta e o comportamento da mesma foi avaliado através de fotografias padronizadas tiradas no momento da deposição da gota de meio de cultura e novamente depois de uma hora.

5.5 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade dos arcabouços de PLGA+HA/βTCP e PLGA+HA/βTCP+SIN5% foi avaliada através do teste de MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]. Os testes foram realizados utilizando placas de 48 cavidades. Foi utilizada uma linhagem de fibroblastos L929 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, 2593™), os quais foram cultivados a 37 °C e 5% de CO₂, em meio DMEM com alta concentração de glicose e L-glutamina, suplementado com 10% de SFB e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PS).

Os fibroblastos L929 foram cultivados a uma densidade de 7x10³ células por cavidade. Os testes foram realizados em quadruplicata e os tempos experimentais foram de 1, 3 e 7 dias. Os testes de citotoxicidade

seguiram o proposto pela ISO 10993-5:2009(E), e conforme métodos indexados no sistema de garantia da qualidade do IntelLab.

Para a cultura celular, o método utilizado foi por contato indireto. Assim, os fibroblastos foram semeados nas placas de 48 cavidades e incubados por 24 h. Após as 24 h de crescimento, foi realizada a troca do meio (500 μ l) e as cavidades da placa foram preenchidas com os discos de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN5%. O controle positivo foi composto por meio de cultivo (DMEM com SFB a 10% e PS a 1%) e fibroblastos, e o controle negativo foi composto apenas pelo meio de cultivo celular. Para o teste colorimétrico, após os períodos experimentais, os discos foram removidos das placas e os fibroblastos foram observados através de microscópio para avaliar quantidade e formato celular. O meio foi gentilmente removido e as cavidades foram lavadas três vezes com PBS. Após, 300 μ l de meio acrescidos de 60 μ l de solução de MTS foram dispensados sobre as cavidades e incubados novamente por 2 horas e 30 minutos. As absorbâncias foram medidas por espectrofotômetro (Infinite M200, TECAN, Áustria GmbH, Grödig, Áustria) a um comprimento de onda de 490 nm, e as porcentagens de células viáveis foram calculadas em relação aos controles.

5.6 Análise dos resultados

Foi realizada análise qualitativa e descritiva das amostras processadas em MEV, FTIR, DSC e molhabilidade, e análise descritiva e estatística para os resultados obtidos através de MTS. Estes resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão e porcentagem \pm desvio padrão. A comparação entre os grupos e a análise estatística de possíveis dados obtidos das observações foram realizadas por meio da análise de variância univariada (ANOVA1), seguida pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações (IBM® SPSS® Statistics, Version 21). O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização dos arcabouços

Após a confecção dos arcabouços, os mesmos foram analisados de forma a avaliar a qualidade de produção, previamente à realização dos testes com culturas celulares. Foram realizados testes para avaliação da estrutura física (microscopia eletrônica de varredura), composição química (espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier) e propriedades térmicas (calorimetria exploratória diferencial). Os resultados são expostos abaixo.

6.1.1 Estrutura física

As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (TM3030, Hitachi, Tóquio, Japão) e as imagens obtidas estão dispostas abaixo (Figuras 2 a 5). Analisando as imagens, é possível observar a presença de macro, meso e microporos na estrutura do polímero, onde partículas de hidroxiapatita e β -tricálcio fosfato encontram-se bem inseridas e dispersas. Não há presença de microfissuras nas estruturas poliméricas ou cerâmicas, entretanto na Figura 4 é possível observar micropartículas de HA/ β TCP aglutinadas ao redor de uma macropartícula de mesma composição. Existe uma quantidade mais elevada de microporos na superfície do polímero de arcabouços com sinvastatina a 5% em comparação aos arcabouços sem sinvastatina incorporada.

Figura 2. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal.

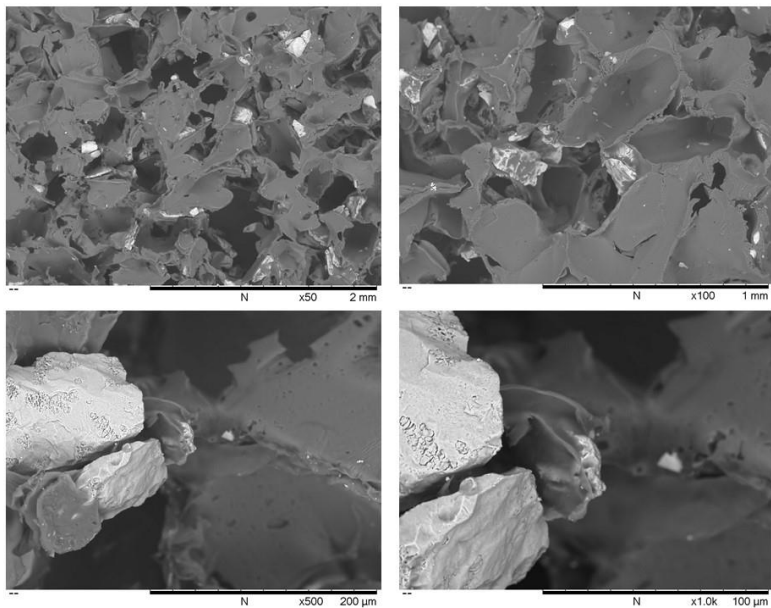


Figura 3. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal.

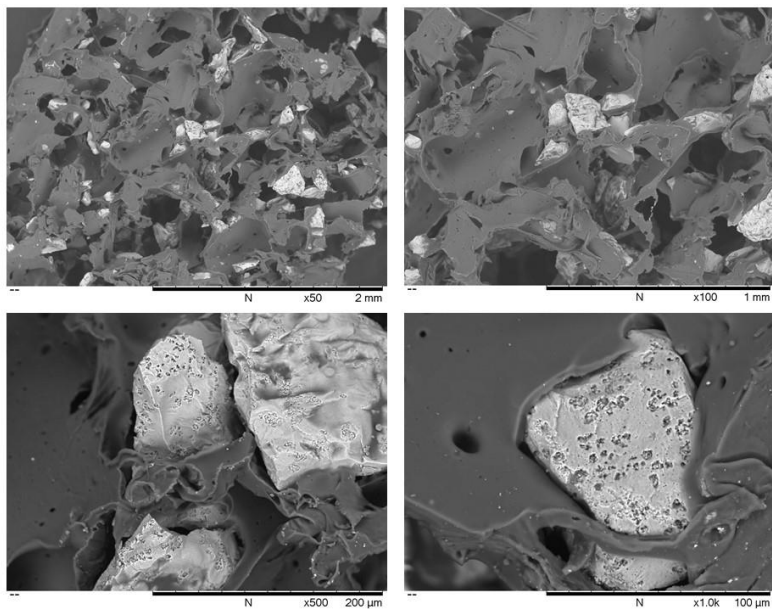


Figura 4. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical.

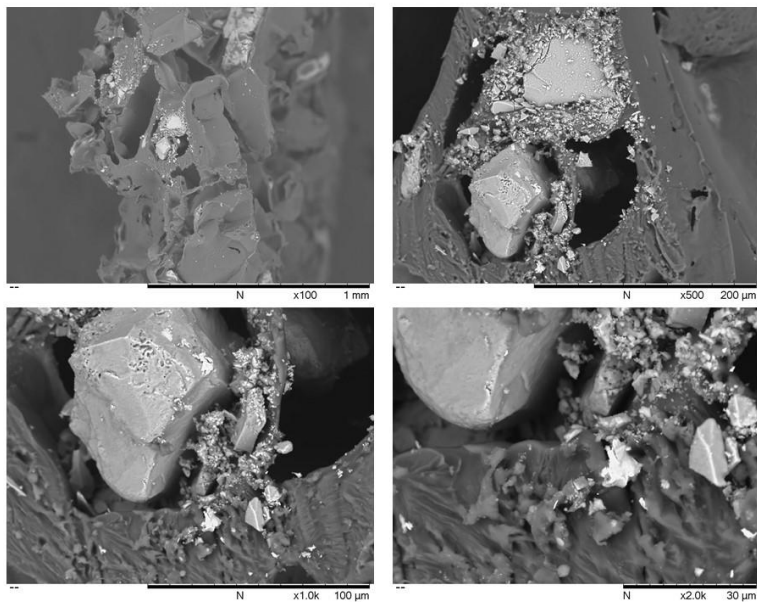
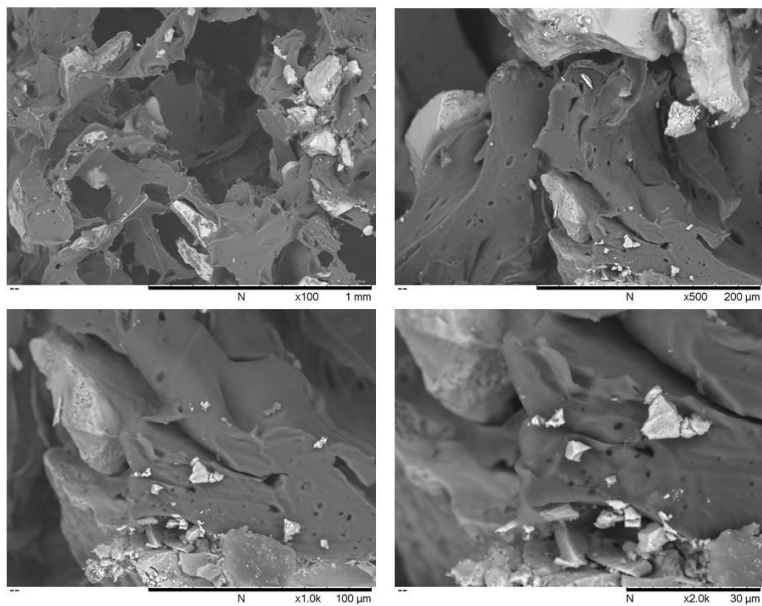


Figura 5. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical.



6.1.2 Composição química

Os estudos por espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier foram realizadas em Cary 600 Series FTIR Spectrometer, o qual realiza vinte espectros por análise. Dois discos de cada grupo (com e sem sinvastatina) foram analisados e o gráfico gerado está disposto abaixo (Figura 6), onde observa-se um padrão bastante semelhante entre os arcabouços sem sinvastatina (linha preta) e com sinvastatina a 5% (linha vermelha). No gráfico, há uma prevalência de bandas de absorção de cerca de 1750 cm^{-1} , o que representa ligações duplas entre carbono e oxigênio ($\text{C}=\text{O}$), e de bandas entre $350 - 1500\text{ cm}^{-1}$, o que é característico de ésteres ($\text{C}-\text{O}$) e hidrocarbonetos (CH_2 e CH), assim como traços de hidrocarbonetos CH , CH_3 e CH_2 por volta de 3000 cm^{-1} . As Tabelas 1 e 2 exibem bandas de absorção e suas correspondências, ajudando na interpretação dos gráficos obtidos por FTIR.

Figura 6. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.

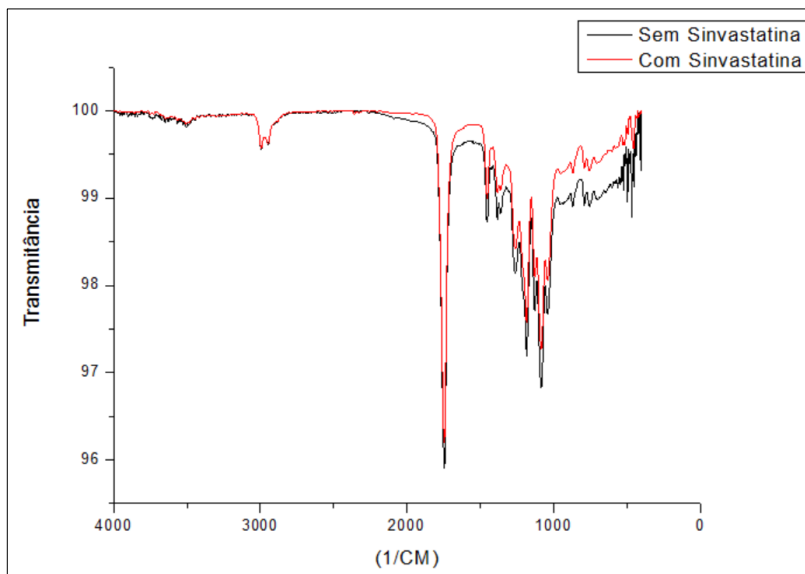


Tabela 1. Bandas de absorção e suas correspondências.

Bandas de absorção (cm⁻¹)	Estrutura Química / Atribuições
3000 - 2700	CH, CH ₃ e CH ₂ (alongamento assimétrico)
1760 - 1750	C = O (alongado)
1500 - 1250	CH ₃ e CH ₂ (deformação angular simétrica)
1350 - 1150	CH ₂ e CH (deformação angular assimétrica)
1300 - 1150	C – O (éster) (alongado)

* Adaptado de COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1975.

Tabela 2. Bandas de absorção e os tipos de ligação.

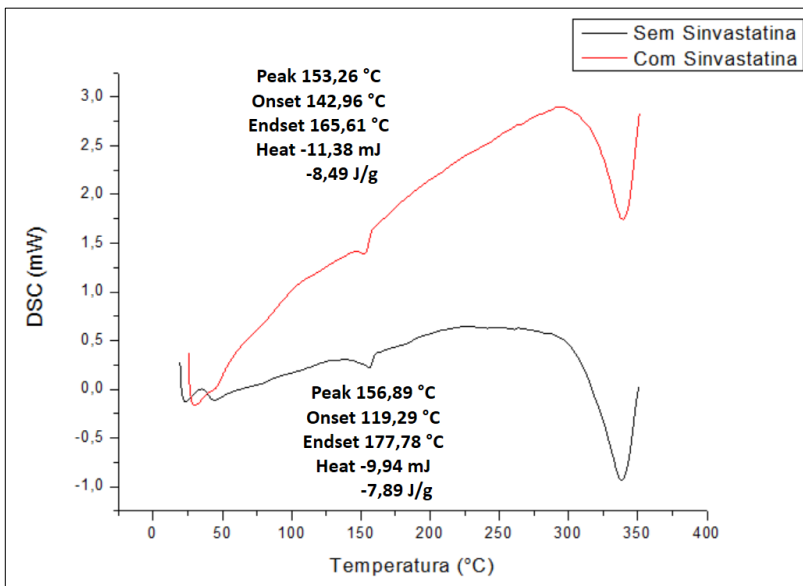
Região de absorção (cm⁻¹)	Tipo de ligação
1300-800	C – O
1300-800	C – C
1250-1000	C – N
1900-1500	C = C
1850-1600	C = O
2150-2100	C ≡ C
2250-2080	C – D
3000-2850	C – H
3800-2700	O – H

* Adaptado de SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006.

6.1.3 Propriedades Térmicas

Os estudos por calorimetria exploratória diferencial foram realizadas em Shimadzu DSC-60. Um disco de cada grupo (com e sem sinvastatina) foi analisado e o gráfico gerado está disposto abaixo (Figura 7), onde observa-se um que as curvas do termograma seguem um padrão semelhante entre os arcaouços sem sinvastatina (linha preta) e com sinvastatina a 5% (linha vermelha), com valores numéricos muito próximos. O equipamento não foi capaz de detectar a temperatura de transição vítrea das amostras. No gráfico, os picos endotérmicos acontecem em cerca de 150 °C, voltando a aparecer de forma mais intensa após 325 °C.

Figura 7. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial.



6.2 Degradação dos arcabouços

Após a confecção e caracterização dos arcabouços, os mesmos sofreram análises de degradação. Da mesma maneira dos testes de caracterização dos arcabouços, foram realizados experimentos para avaliação da estrutura física (microscopia eletrônica de varredura), composição química (espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier) e propriedades térmicas (calorimetria exploratória diferencial) em cinco tempos experimentais (1, 7, 14, 21 e 28 dias).

6.2.1 Estrutura física

As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura a 15 kV nas ampliações X50, X100, X500, X1000 e X2000 (TM3030, Hitachi, Tóquio, Japão) para cada tempo experimental e as imagens obtidas estão dispostas abaixo (Figuras 8 a 27). Após 1 e 7 dias de degradação dos arcabouços, não houve diferença estrutural em comparação às amostras que foram caracterizadas previamente. Já após 14, 21 e 28 dias de degradação, aparentemente há algum nível de degradação crescente da cerâmica, mas não são observados “cracks” ou microfissuras na estrutura do polímero após 14 e 21 dias. No entanto, após 28 dias de degradação, amostras com sinvastatina apresentaram uma aparente desorganização na estrutura do polímero. A degradação da cerâmica bifásica parece ser mais evidente nos arcabouços sem sinvastatina incorporada. Após 28 dias de degradação em PBS, foi observado que a estrutura física dos arcabouços se manteve praticamente inalterada, com baixos níveis de degradação.

Figura 8. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal, após 1 dia de degradação.

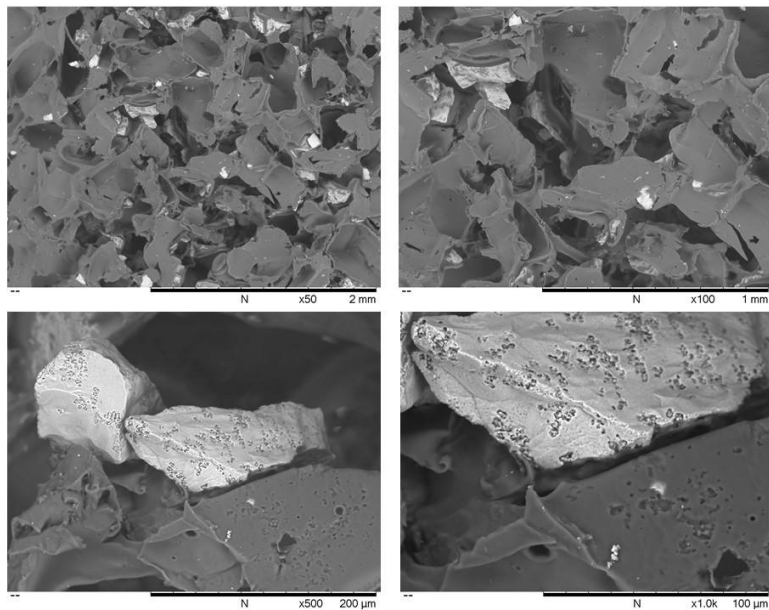


Figura 9. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal, após 1 dia de degradação.

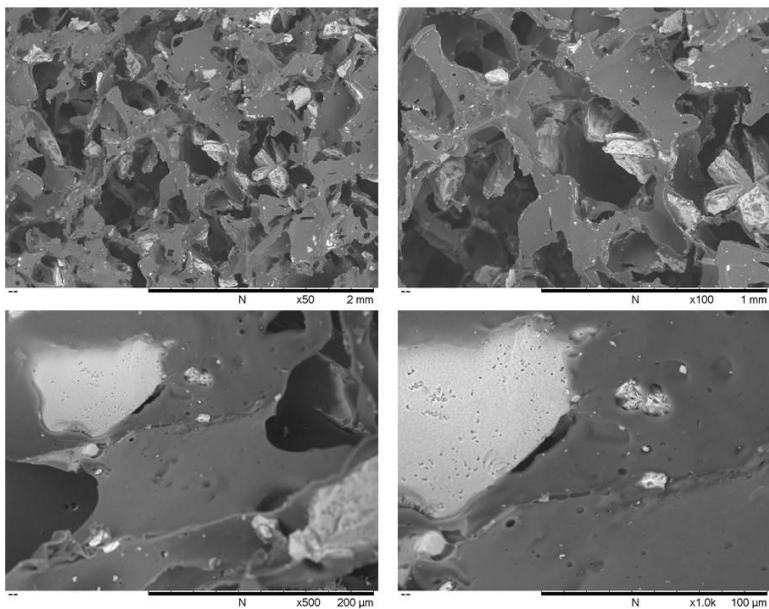


Figura 10. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical, após 1 dia de degradação.

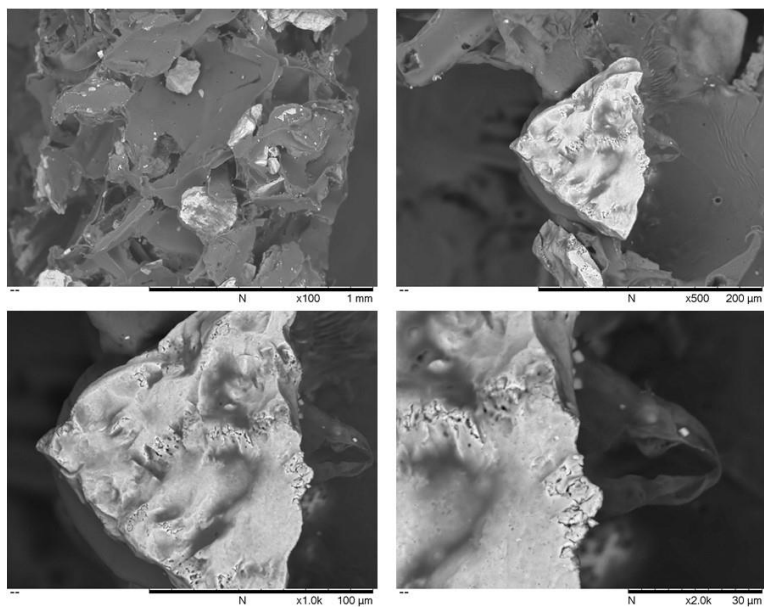


Figura 11. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical, após 1 dia de degradação.

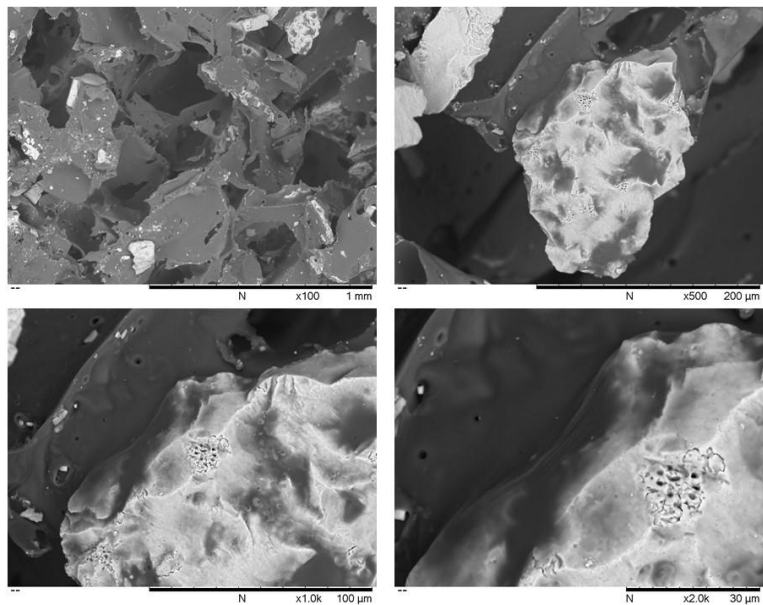


Figura 12. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal, após 7 dias de degradação.

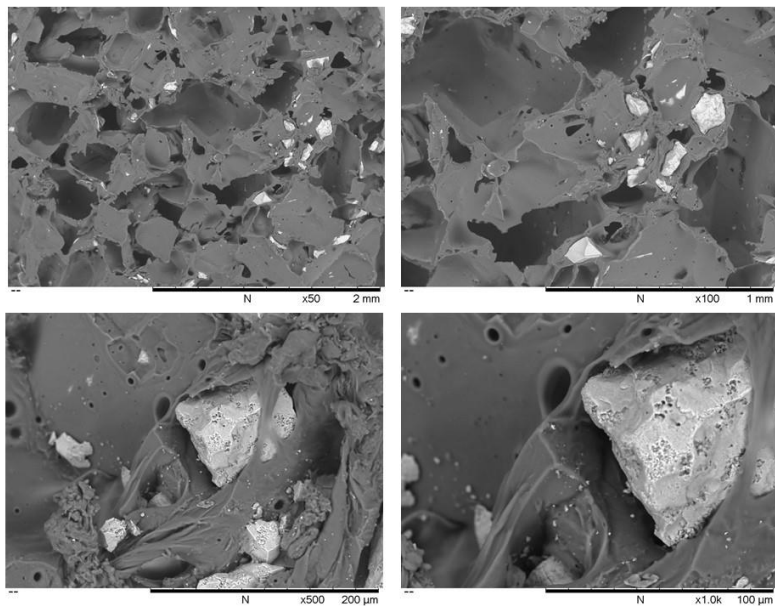


Figura 13. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal, após 7 dias de degradação.

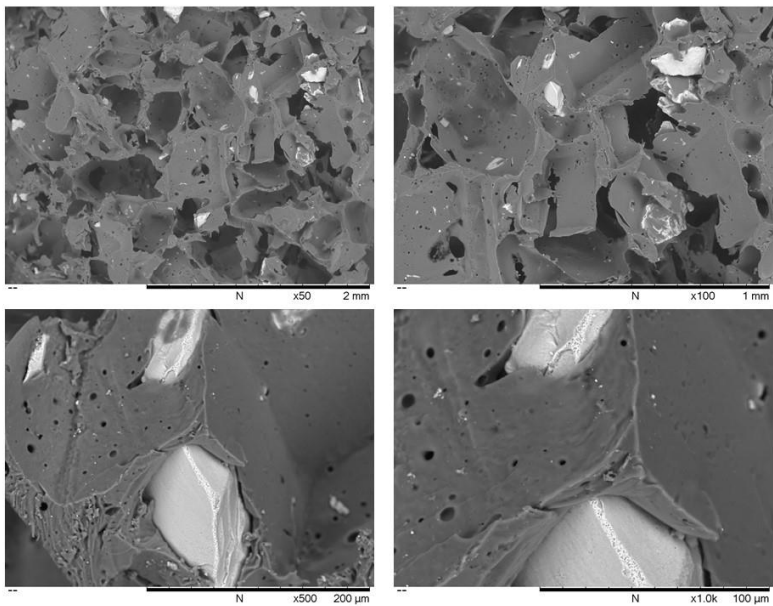


Figura 14. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical, após 7 dias de degradação.

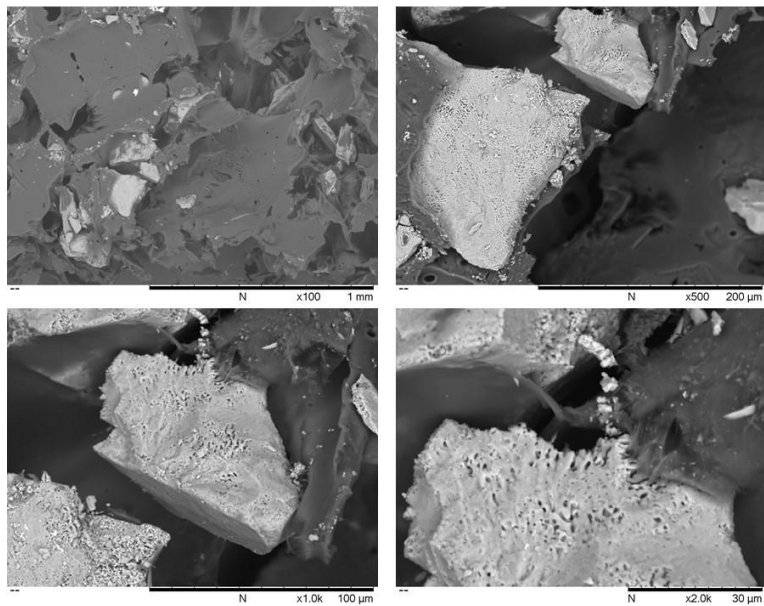


Figura 15. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical, após 7 dias de degradação.

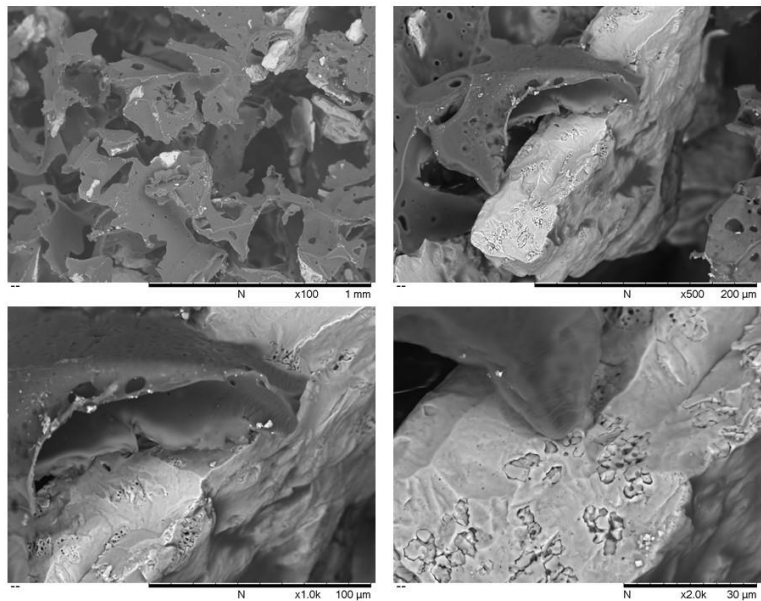


Figura 16. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal, após 14 dias de degradação.

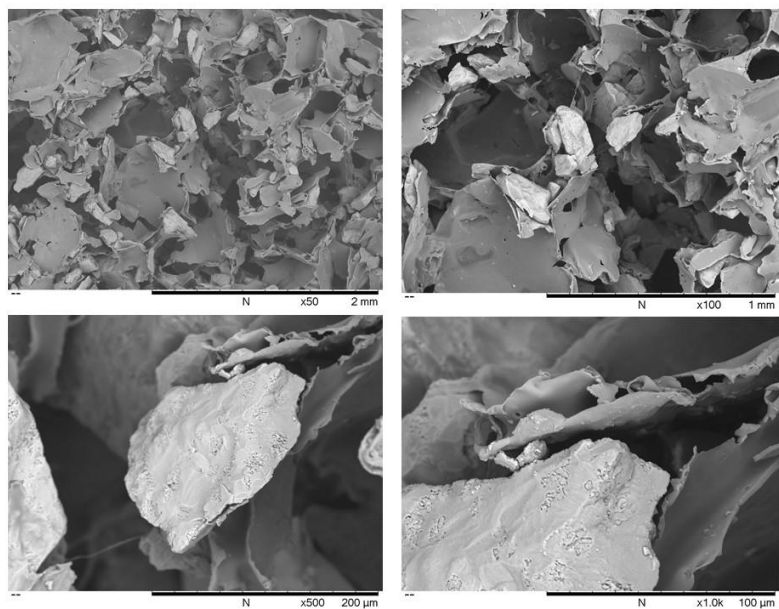


Figura 17. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal, após 14 dias de degradação.

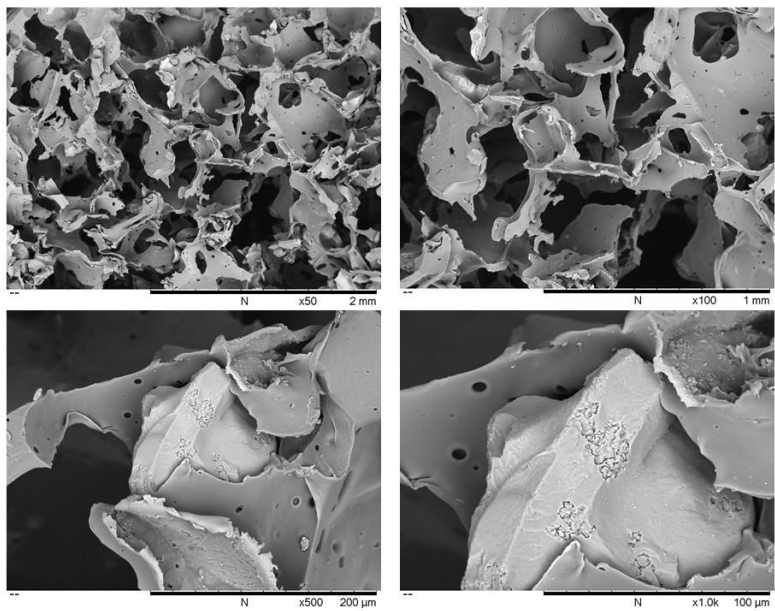


Figura 18. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical, após 14 dias de degradação.

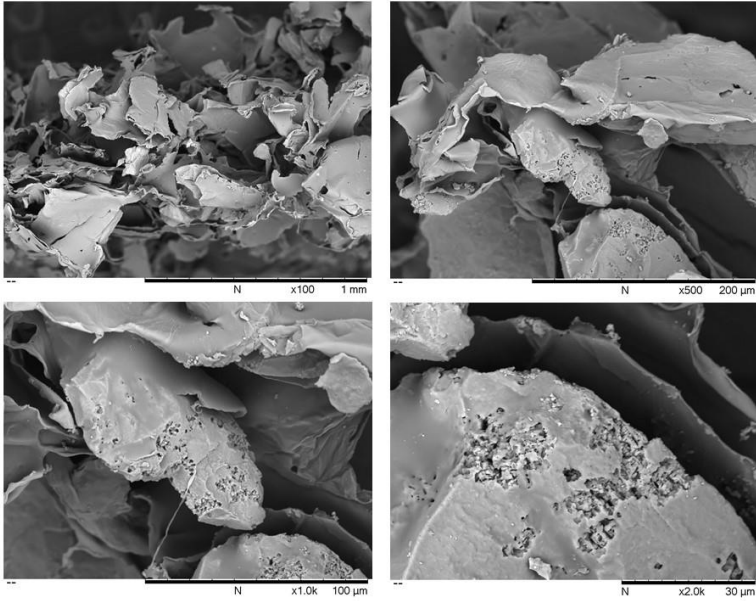


Figura 19. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical, após 14 dias de degradação.

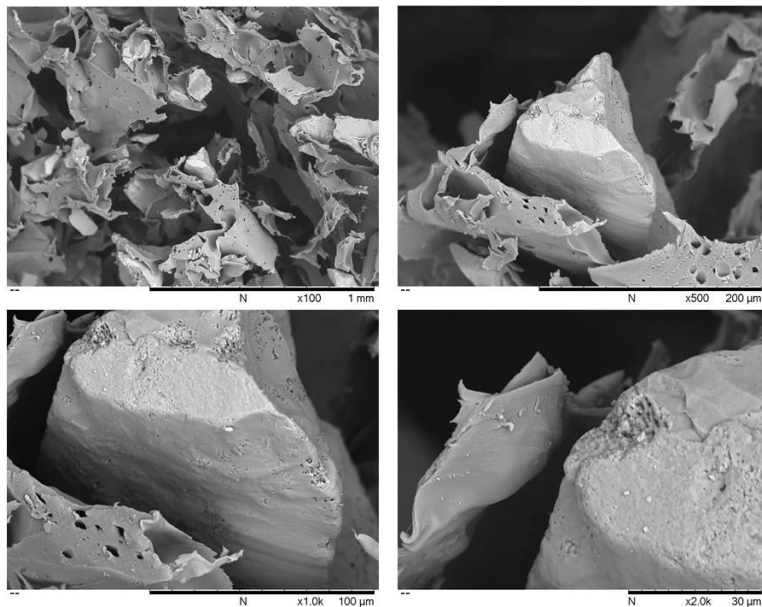


Figura 20. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal, após 21 dias de degradação.

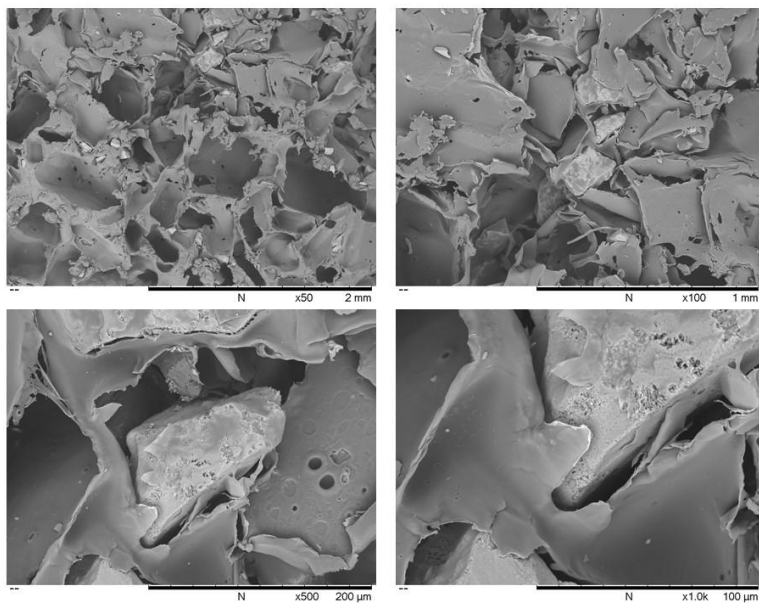


Figura 21. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal, após 21 dias de degradação.

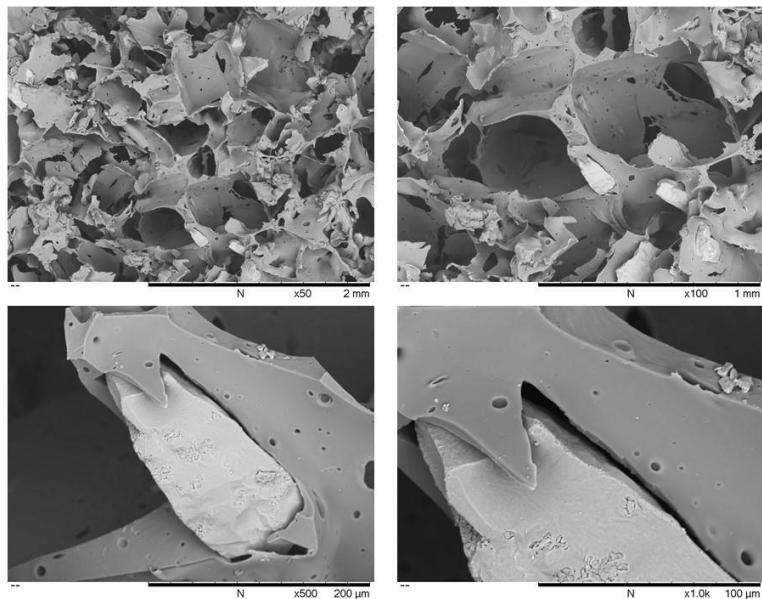


Figura 22. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical, após 21 dias de degradação.

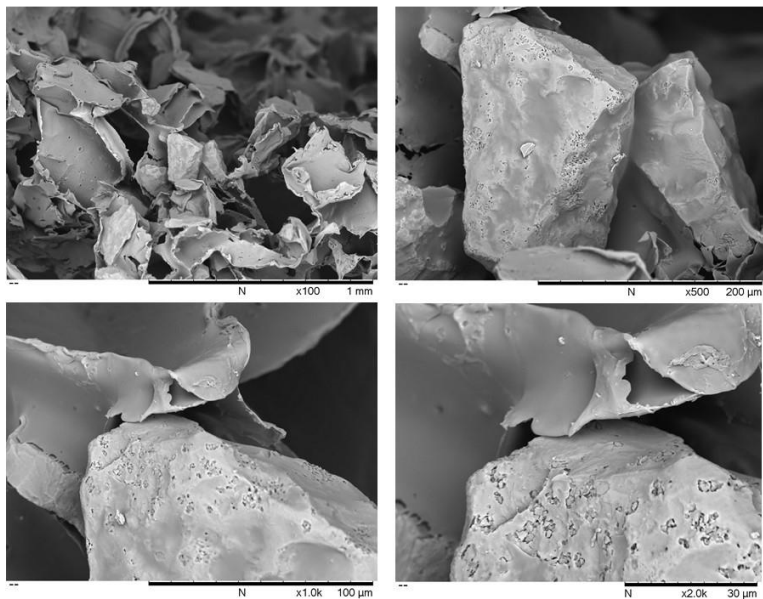


Figura 23. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical, após 21 dias de degradação.

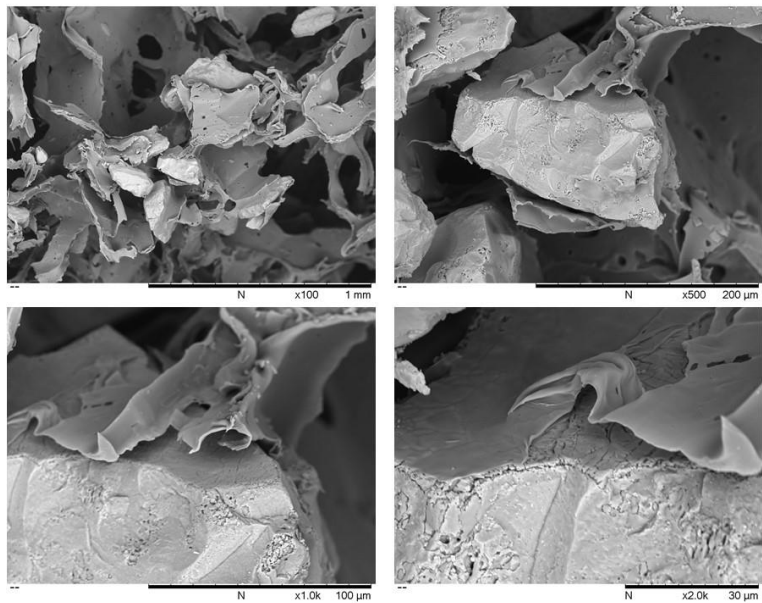


Figura 24. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção horizontal, após 28 dias de degradação.

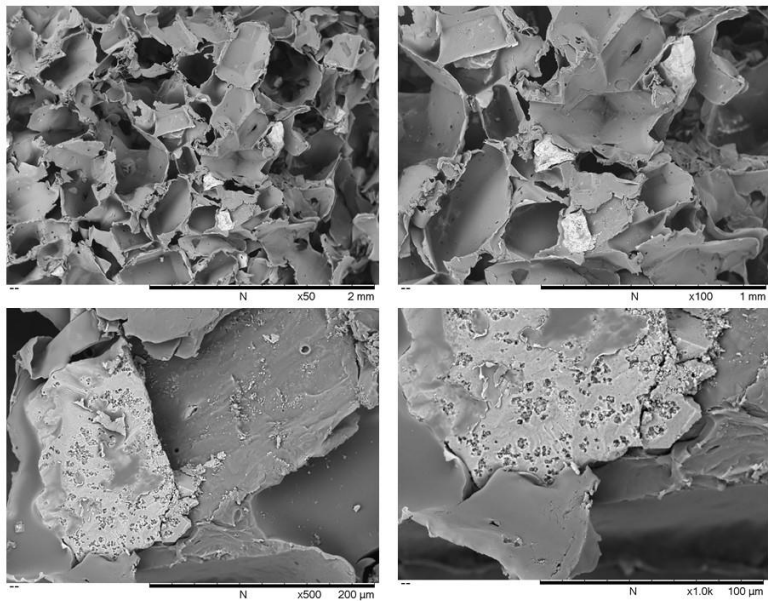


Figura 25. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X50, X100, X500 e X1000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção horizontal, após 28 dias de degradação.

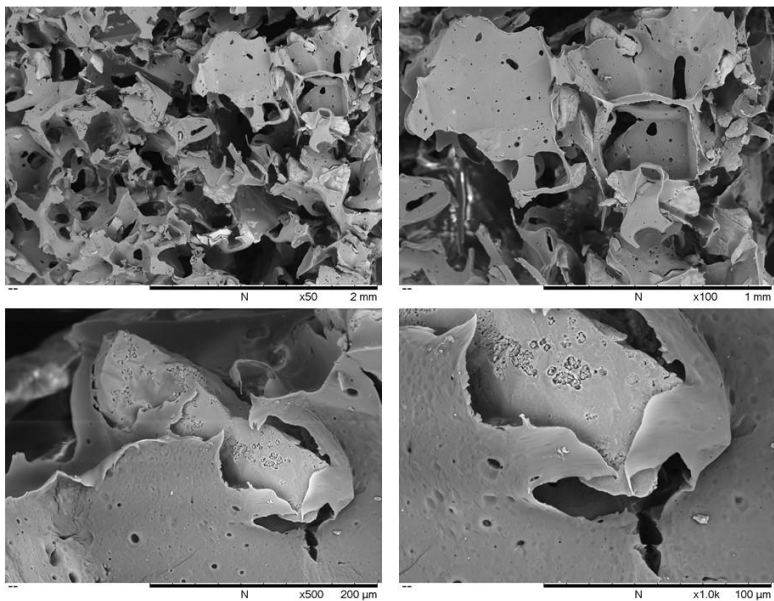


Figura 26. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras sem sinvastatina, em secção vertical, após 28 dias de degradação.

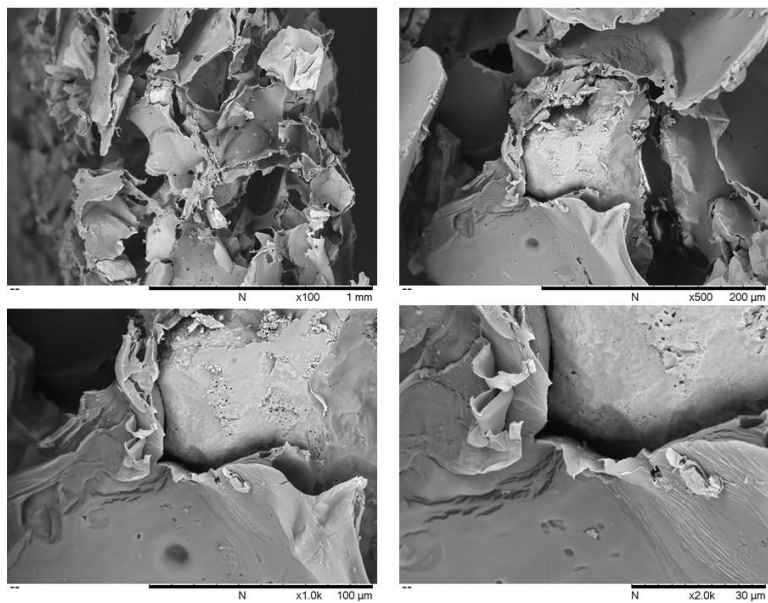
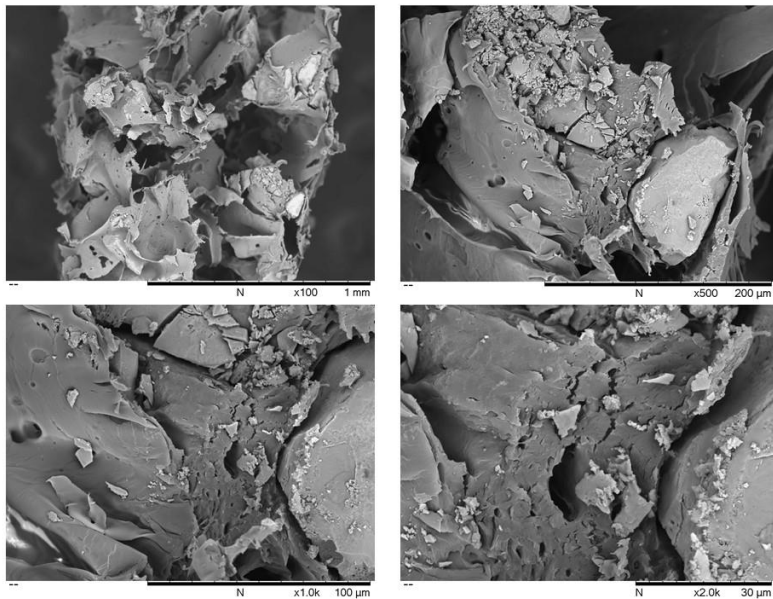


Figura 27. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com X100, X500, X1000 e X2000 de ampliação de amostras com sinvastatina a 5%, em secção vertical, após 28 dias de degradação.



6.2.2 Composição química

Os estudos por espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier foram realizadas em Cary 600 Series FTIR Spectrometer, o qual realiza vinte espectros por análise. Dois discos de cada grupo (com e sem sinvastatina) de cada tempo experimental foram analisados e os gráficos gerados são dispostos abaixo (Figuras 28 a 32). Após 28 dias de degradação em PBS, os gráficos dos cinco tempos experimentais seguiram um padrão semelhante ao gráfico gerado durante a caracterização das amostras (tempo 0), com prevalência de bandas de absorção de cerca de 1750 cm^{-1} , o que representa ligações duplas entre carbono e oxigênio ($\text{C} = \text{O}$), e de bandas entre $350 - 1500\text{ cm}^{-1}$, característico de ésteres ($\text{C} - \text{O}$) e hidrocarbonetos (CH_2 e CH), assim como traços de hidrocarbonetos CH , CH_3 e CH_2 por volta de 3000 cm^{-1} . Apesar da semelhança entre os gráficos, as seguintes alterações podem ser notadas conforme as amostras foram degradando: aumento da vibração da transmitância no intervalo entre $3500 - 4000\text{ cm}^{-1}$, leve redução da transmitância na faixa de 3000 cm^{-1} , principalmente observado após 21 e 28 dias de degradação; a transmitância da banda de absorção de 1750 cm^{-1} manteve-se relativamente constante após 1 e 7 dias de degradação, aumentou levemente no tempo experimental de 14 dias, e reduziu após 21 e 28 dias de degradação em cerca de 1 a 6 pontos, sendo mais evidente nos arcabouços sem sinvastatina incorporada. A banda de absorção entre $500 - 1500\text{ cm}^{-1}$ sofreu pequenas alterações, onde também se destaca o leve aumento de transmitância após de 14 dias de degradação e a redução após 21 e 28 dias de degradação em até 4 pontos, sendo mais evidente nos arcabouços sem sinvastatina incorporada. A Figura 33 representa uma comparação entre os gráficos obtidos desde a caracterização até a degradação final.

Figura 28. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de amostras degradadas por 1 dia.

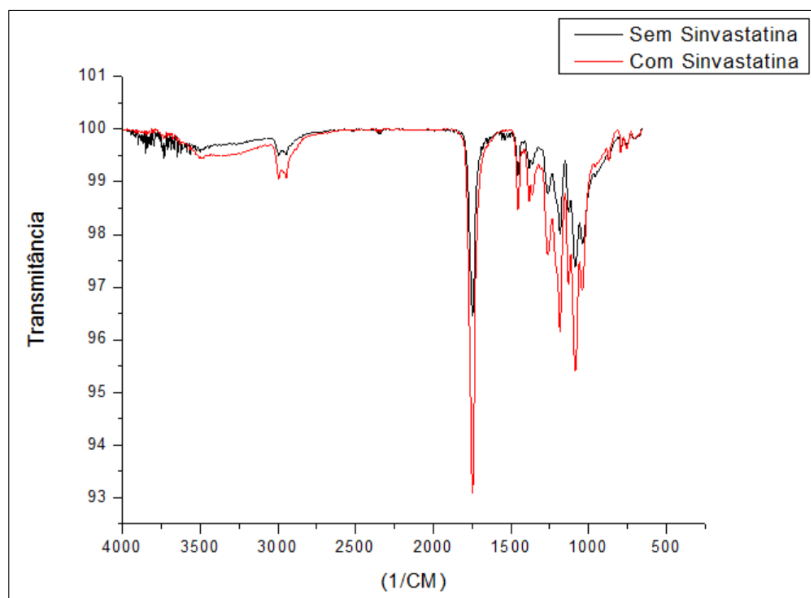


Figura 29. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de amostras degradadas por 7 dias.

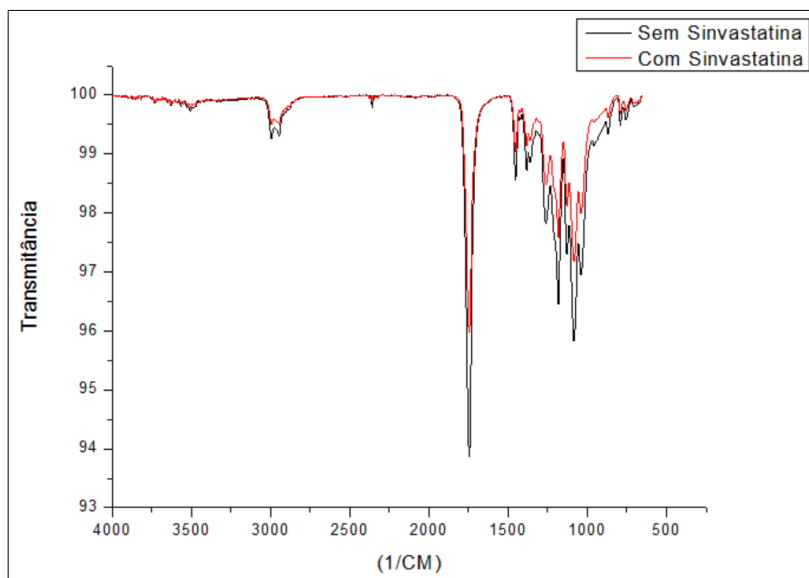


Figura 30. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de amostras degradadas por 14 dias.

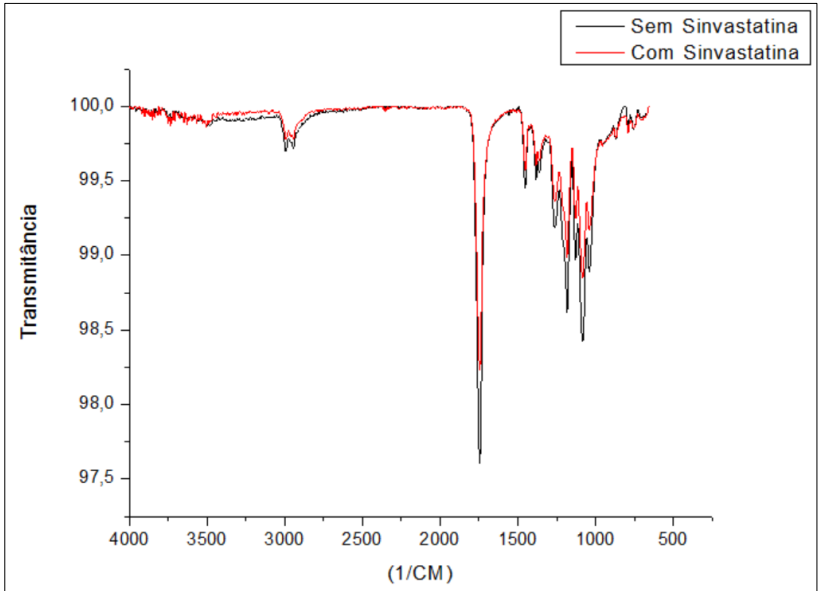


Figura 31. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de amostras degradadas por 21 dias.

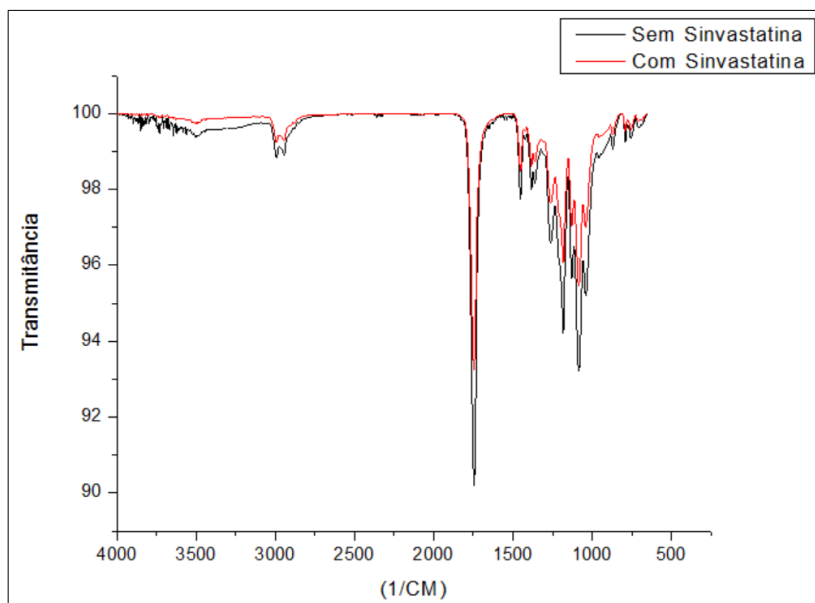


Figura 32. Gráfico obtido através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de amostras degradadas por 28 dias.

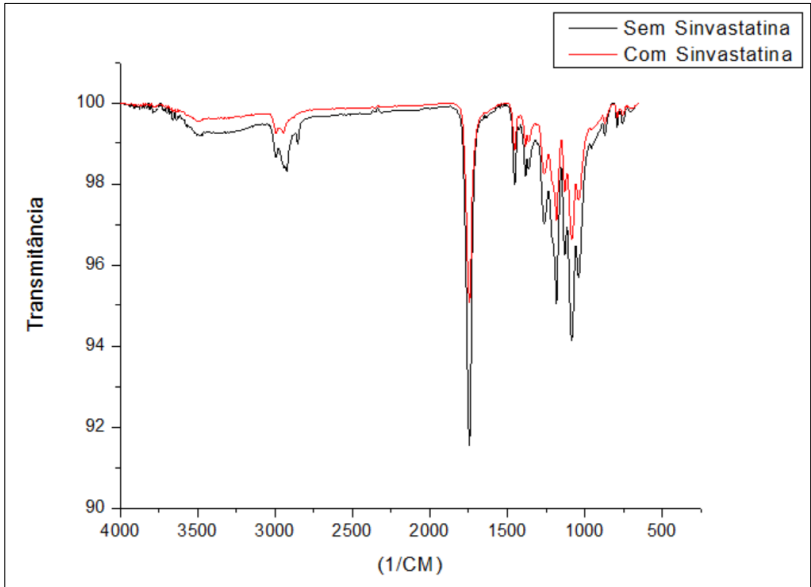
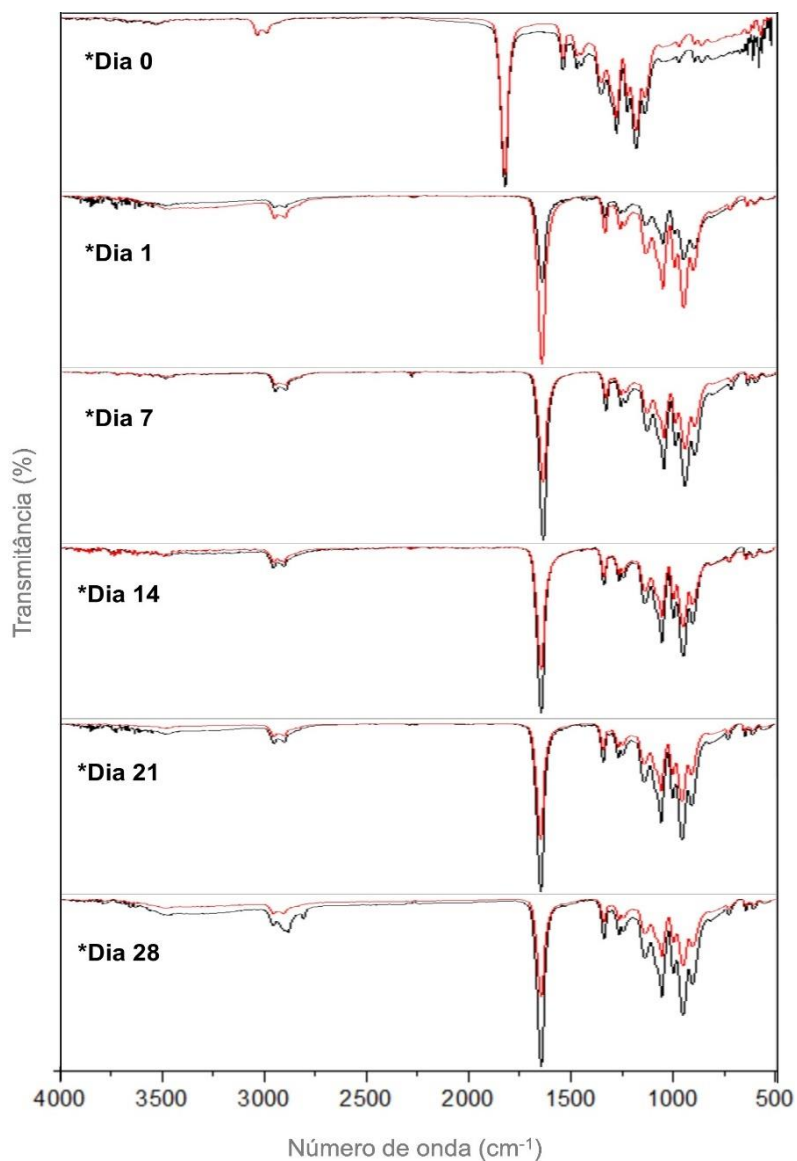


Figura 33. Comparação dos gráficos obtidos através de FTIR nos diferentes tempos experimentais.



6.2.3 Propriedades Térmicas

Os estudos por calorimetria exploratória diferencial foram realizadas em Shimadzu DSC-60. Um disco de cada grupo (com e sem sinvastatina) foi analisado e os gráficos gerados estão dispostos abaixo (Figuras 34 a 38), onde observa-se um que as curvas do termograma seguem um padrão semelhante entre os arcabouços sem sinvastatina e com sinvastatina a 5%, ainda mais semelhantes quando comparados ao tempo 0. Nos gráficos, as curvas ocorrem em cerca de 150 - 160 °C, voltando a aparecer de forma mais intensa após 325 °C, mas como muitas das curvas não finalizaram seu curso até os 350 °C analisados, não foi possível calcular os valores das mesmas. Foi possível observar que os picos endotérmicos (“peak”) foram mais elevados para arcabouços sem sinvastatina incorporada ($156,96\text{ °C} \pm 1,11$) do que com sinvastatina a 5% ($153,99\text{ °C} \pm 0,65$). No tempo experimental de 1 dia esta diferença de temperatura foi mais acentuada que nos demais tempos. A Figura 39 representa uma comparação entre os gráficos obtidos desde a caracterização até a degradação final.

Figura 34. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial de amostras degradadas por 1 dia.

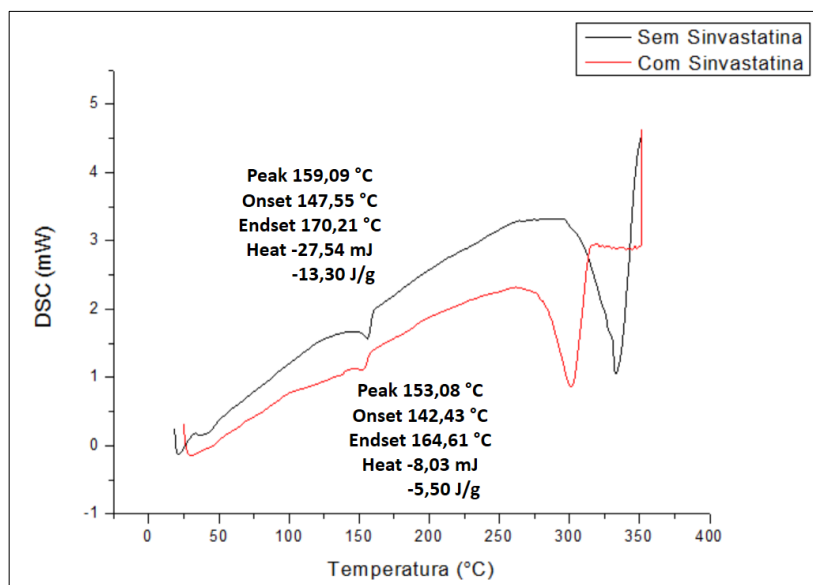


Figura 35. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial de amostras degradadas por 7 dias.

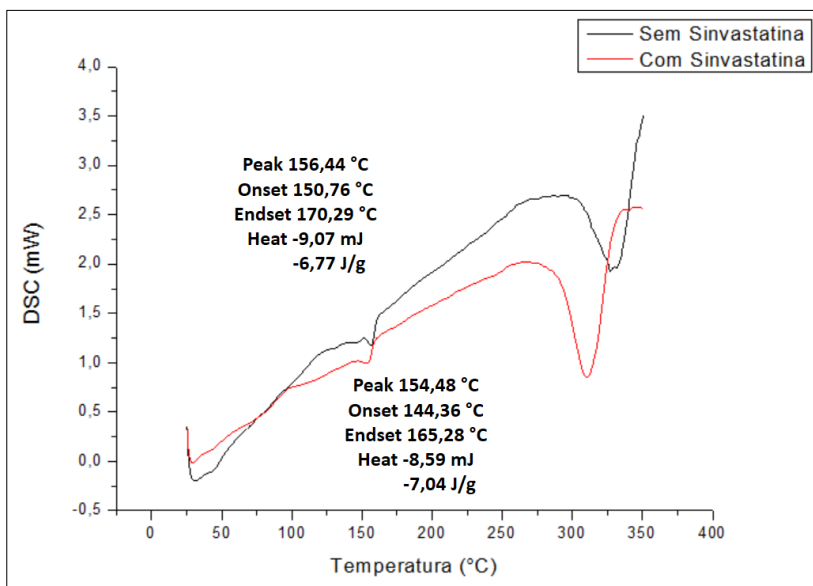


Figura 36. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial de amostras degradadas por 14 dias.

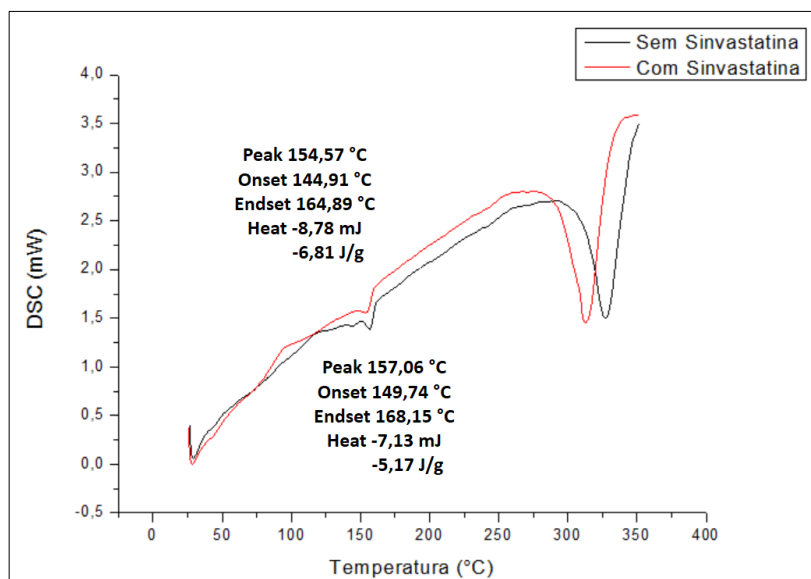


Figura 37. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial de amostras degradadas por 21 dias.

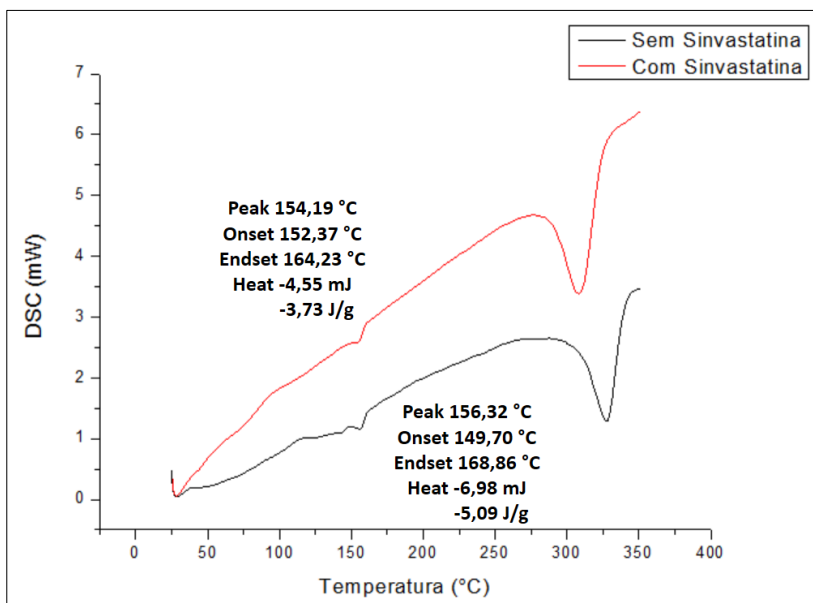


Figura 38. Gráficos obtidos através de calorimetria exploratória diferencial de amostras degradadas por 28 dias.

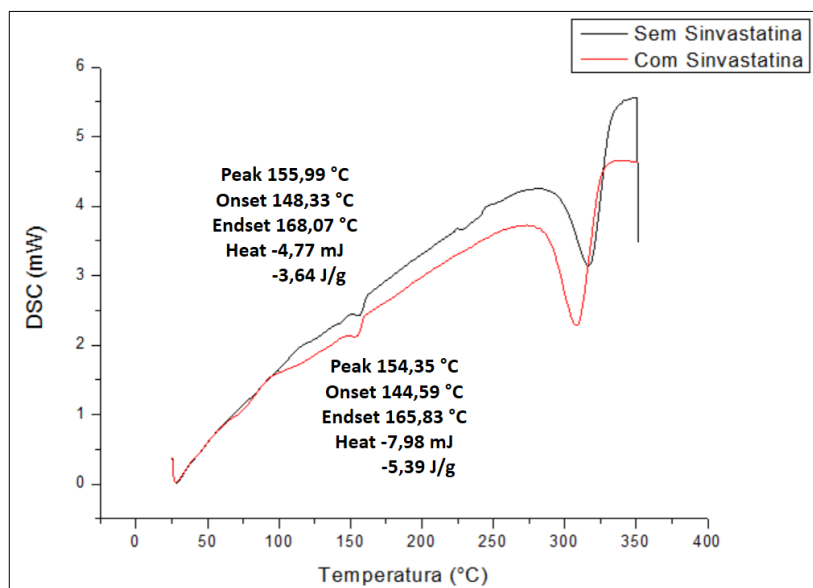
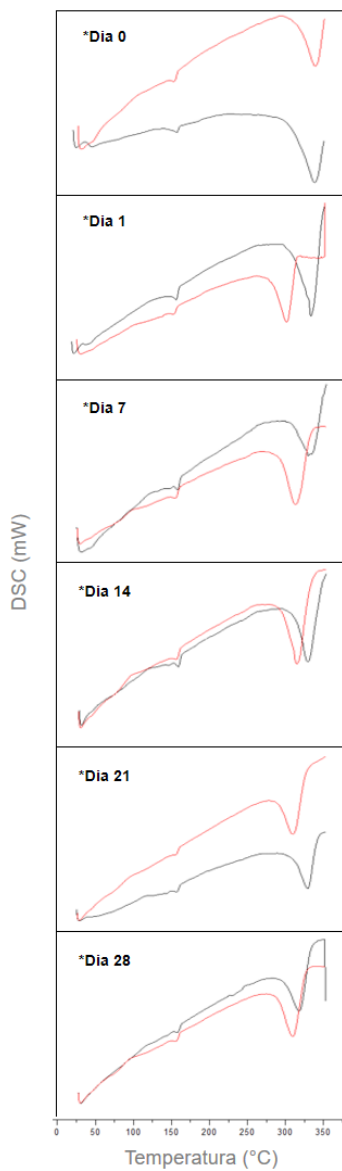


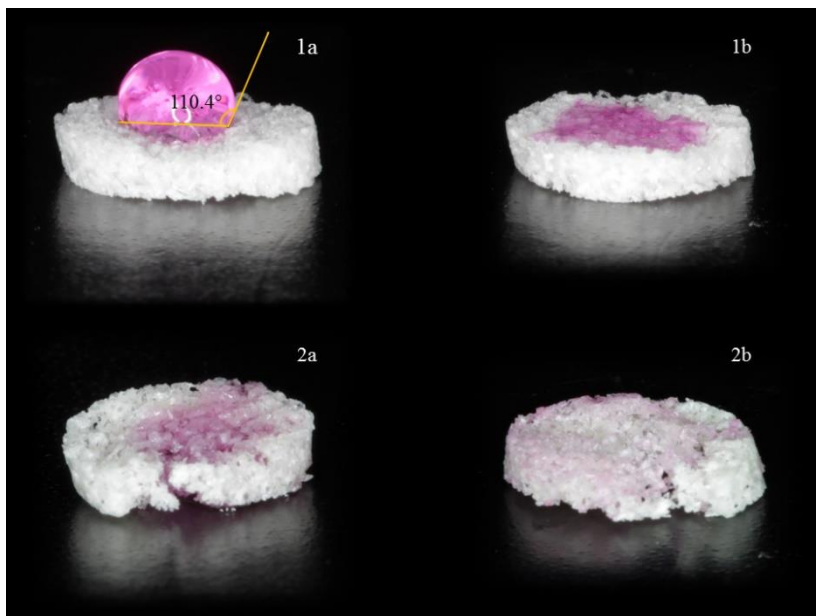
Figura 39. Comparação dos gráficos obtidos através de DSC para amostras sem sinvastatina nos diferentes tempos experimentais.



6.3 Teste de molhabilidade

O teste da gota foi realizado de forma a testar a hidrofobia dos arcabouços produzidos. A Figura 40 mostra os resultados obtidos, onde pode-se observar uma hidrofobia mais evidente para os arcabouços sem sinvastatina incorporada. As imagens foram obtidas imediatamente após a deposição da gota de 30 μ l de DMEM, onde o arcabouço com sinvastatina foi capaz de absorver imediatamente o líquido, enquanto que o arcabouço sem sinvastatina manteve a gota com um ângulo bastante obtuso. Após uma hora da deposição do meio sobre as amostras, novas imagens foram obtidas, onde observou-se uma difusão ainda maior do DMEM pelo arcabouço com sinvastatina, e a absorção completa da gota de DMEM pelo arcabouço sem sinvastatina, embora o líquido ainda não estivesse difundido completamente.

Figura 40. Imagens obtidas através do teste de molhabilidade das amostras, onde **1a** representa a amostra sem sinvastatina imediatamente após a deposição da gota e **1b** demonstra a amostra sem sinvastatina uma hora após a deposição da gota de meio de cultura celular; **2a** representa a amostra com sinvastatina imediatamente após a deposição da gota e **2b** evidencia a amostra com sinvastatina uma hora após a deposição da gota.



6.4 Citotoxicidade

A citotoxicidade dos arcabouços sem sinvastatina e com sinvastatina a 5% foi avaliada através do teste colorimétrico MTS e as porcentagens das células viáveis foram calculadas em relação aos controles. Os resultados estão expostos em gráficos de média \pm desvio padrão (Figuras 41 a 43) e porcentagem \pm desvio padrão (Figuras 44 a 46). Analisando as médias obtidas através da leitura das absorbâncias, é possível verificar que o controle negativo (apenas meio de cultura) se mantém constante durante os tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias, enquanto que o controle positivo (meio de cultura e fibroblastos) aumenta bruscamente no terceiro dia e retorna aos mesmos níveis do primeiro dia após sete dias de cultura celular. As leituras referentes aos testes realizados com arcabouços sem sinvastatina incorporada seguiram médias bastante semelhantes ao controle positivo durante os tempos experimentais de 1 e 3 dias, decaindo quase que pela metade após 7 dias de crescimento celular. A análise estatística dos resultados comprova este achado, já que nos tempos 1 e 3 dias não houve diferença significativa entre os grupos controle positivo e arcabouços sem sinvastatina, mas no tempo de 7 dias esta diferença foi estatisticamente significativa, e o grupo arcabouços sem sinvastatina igualou-se estatisticamente com os grupos controle negativo e arcabouços com sinvastatina. As leituras dos testes com arcabouços com sinvastatina a 5% mostraram-se mais baixas desde o primeiro dia de experimento quando comparadas ao controle positivo e os testes de arcabouços sem sinvastatina, sendo que esta diferença tornou-se mais evidente no terceiro dia de experimento. Isso foi comprovado pela análise estatística, que revelou que o grupo arcabouços com sinvastatina foi tão baixo quanto o grupo controle negativo nos tempos de 3 e 7 dias.

Características semelhantes são observadas nos gráficos de porcentagens (Figuras 44 a 46), onde as médias percentuais foram calculadas considerando o controle positivo como crescimento celular máximo (100%). No tempo experimental de 3 dias, é possível observar a maior diferença entre os arcabouços, onde as amostras sem sinvastatina incorporada alcançam porcentagens de crescimento celular tão altas quanto o controle positivo, enquanto que as amostras com sinvastatina a 5% atingem porcentagens de cerca de 20% de crescimento de fibroblastos. Após 7 dias de experimento, ambas as amostras levam a um declínio na porcentagem de crescimento celular.

Figura 41. Valores de média \pm desvio padrão da absorbância (490 nm) obtida pelo teste de citotoxicidade de arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 1 dia de crescimento. * Letras iguais representam que não houve diferença estatística entre os grupos.

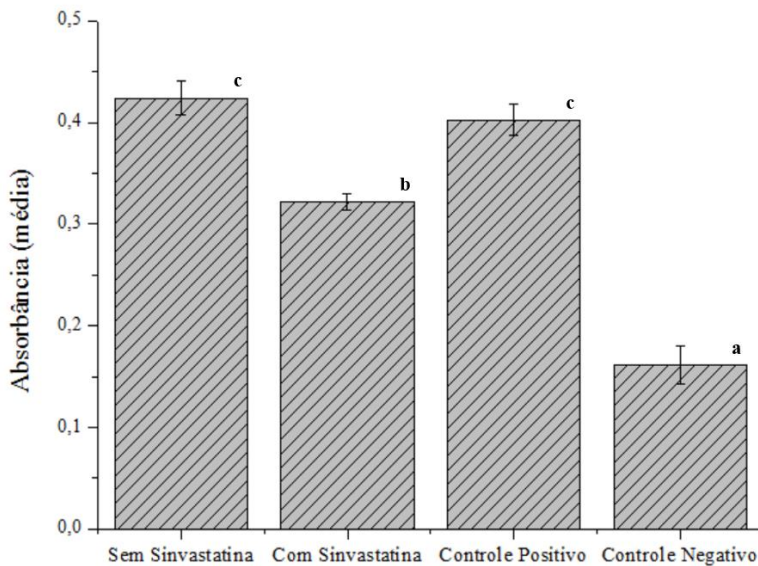


Figura 42. Valores de média \pm desvio padrão da absorbância (490 nm) obtida pelo teste de citotoxicidade de arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 3 dias de crescimento. * Letras iguais representam que não houve diferença estatística entre os grupos.

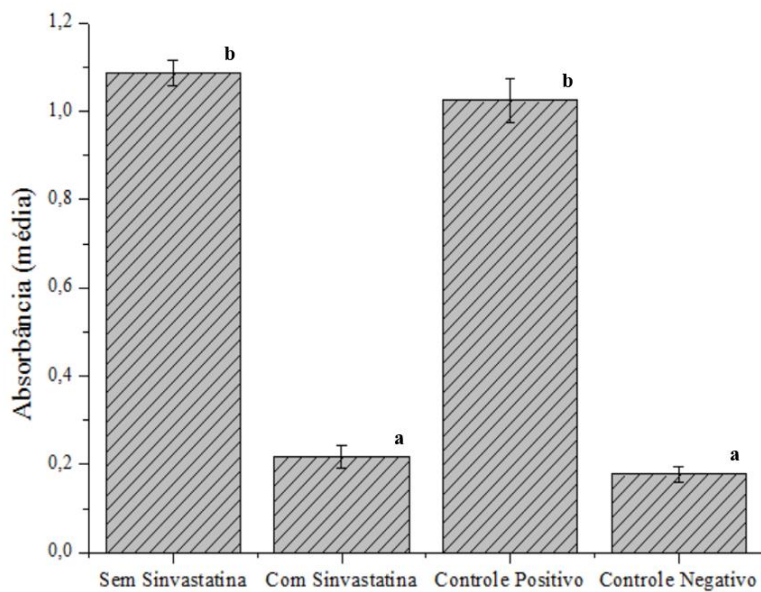


Figura 43. Valores de média \pm desvio padrão da absorbância (490 nm) obtida pelo teste de citotoxicidade de arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 7 dias de crescimento. * Letras iguais representam que não houve diferença estatística entre os grupos.

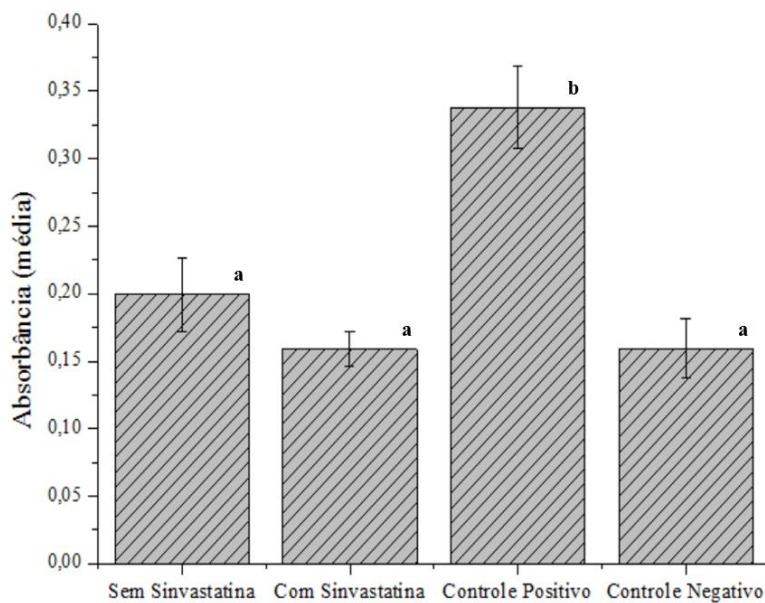


Figura 44. Valores expressos em porcentagem \pm desvio padrão para a citotoxicidade apresentada pelos arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 1 dia de crescimento.

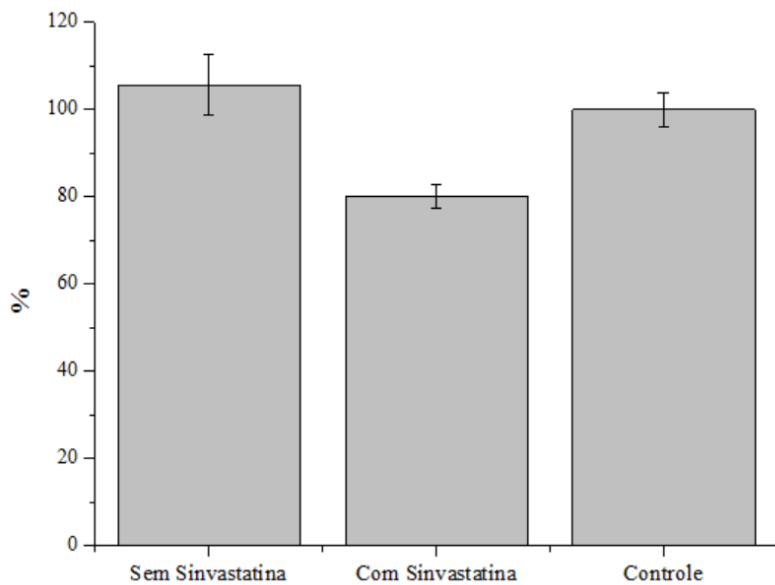


Figura 45. Valores expressos em porcentagem \pm desvio padrão para a citotoxicidade apresentada pelos arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 3 dias de crescimento.

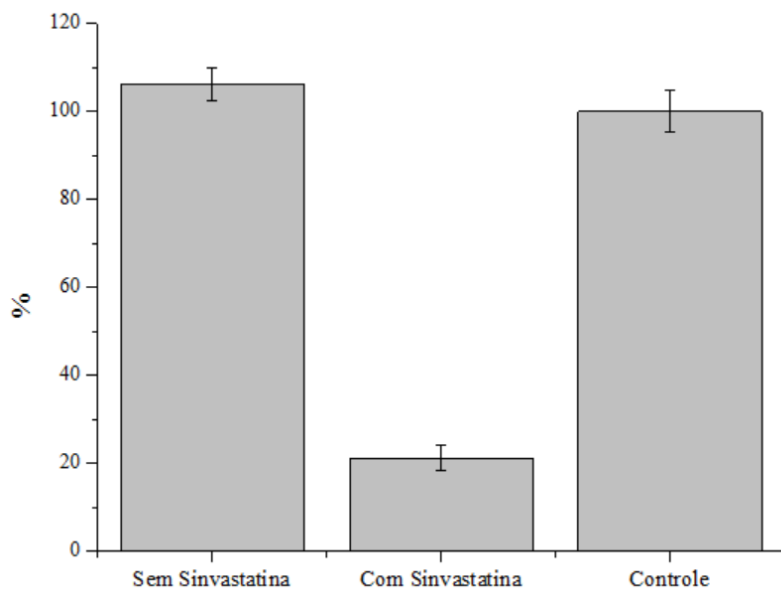
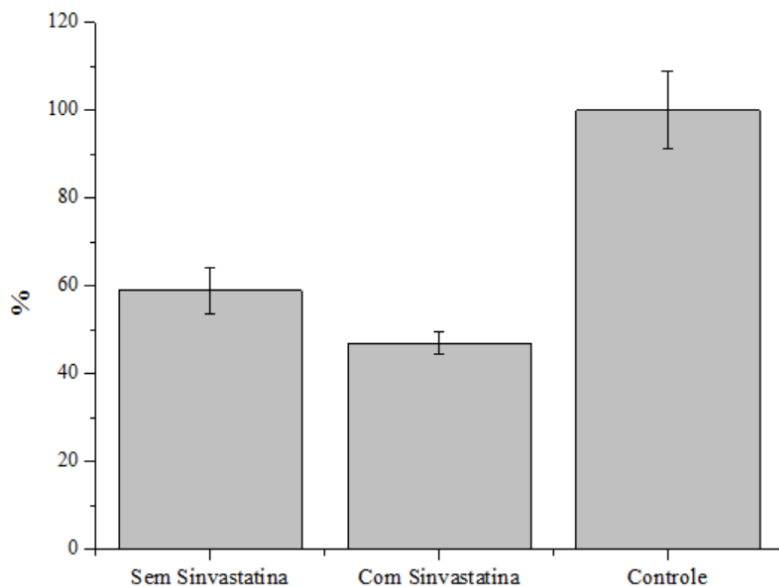


Figura 46. Valores expressos em porcentagem \pm desvio padrão para a citotoxicidade apresentada pelos arcabouços com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após 7 dias de crescimento.



7 DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que arcabouços de PLGA+HA/ β TCP, tanto sem como com sinvastatina a 5% incorporada, mantiveram sua integridade estrutural, química e térmica durante um período de 28 dias de degradação; entretanto, os arcabouços com sinvastatina em sua composição mostraram-se citotóxicos quando testados sobre fibroblastos L929.

Trabalhos anteriores que seguiram a mesma linha de raciocínio obtiveram resultados promissores quanto às propriedades físico-químicas e mecânicas de arcabouços idênticos, revelando uma liberação lenta, gradual e prolongada da sinvastatina, a qual foi influenciada pela lenta degradação do arcabouço devido à forte interação química entre a sinvastatina e o polímero (ENCARNACAO, 2016). A liberação de sinvastatina e a degradação e permeabilidade do arcabouço foram maiores nas amostras em que o arcabouço possuía 70% de porosidade do que com porosidade de 30% (ENCARNACAO, 2016), e foi por este motivo que o presente estudo optou por confeccionar amostras com porosidade de 75%, já que incorporação de sinvastatina ao arcabouço e o aumento de sua porosidade não influenciaram significativamente as propriedades mecânicas estudadas, levando a crer que os arcabouços estudados poderiam ser promissores para a regeneração óssea.

Em um estudo *in vivo*, arcabouços de PLGA+HA/ β TCP, associados ou não com sinvastatina, foram aplicados em defeitos de 5 mm na calvária de ratos, e, apesar de aumentar a expressão de citocinas inflamatórias em tecidos adjacentes, promoveram formação óssea semelhante aos grupos controle após 60 dias, ou seja, a incorporação de sinvastatina não acelerou o processo de regeneração óssea (ENCARNACAO et al., 2016).

Outro estudo que analisou biomateriais semelhantes, mas agora em alvéolos pós-extração de terceiros molares superiores, revelou que a utilização de enxertos de PLGA+HA/ β TCP sem e com sinvastatina a 2% incorporada não possibilitou a formação óssea que era inicialmente esperada e levou a complicações pós-operatórias 3 meses após a extração dentária, quando comparados com os grupos em que se utilizou osso bovino mineral desproteínizado com 10% de colágeno suíno e o controle (sem tratamento) (OLIVEIRA, 2016). Entretanto, o material possuía baixa porosidade (30%) e alta rigidez, o que pode explicar as complicações relatadas no estudo. Além disso, a concentração de sinvastatina utilizada (2%) não apresentou, tanto do ponto de vista

sistêmico quanto local, qualquer consequência maior para os pacientes (OLIVEIRA, 2016).

Tendo em vista os achados dos estudos prévios realizados com este tipo de arcabouço adicionado de sinvastatina, algumas melhoras foram propostas, tais como a padronização da quantidade de sinvastatina incorporada e o aumento na porosidade dos arcabouços. Condições de investigação de degradação *in vitro* costumam tentar simular o pH fisiológico e a osmolaridade. Arcabouços poliméricos utilizados para cultivar células são frequentemente mantidos em meio de cultura durante várias semanas. Durante este tempo, o material pode degradar parcialmente, com alterações nas suas propriedades morfológicas, térmicas e mecânicas (BARBANTI et al., 2004). Assim, a partir da síntese e caracterização dos arcabouços, testes de degradação e citotoxicidade foram realizados. A caracterização e avaliação da degradação dos arcabouços se deu através de análises da estrutura física do material, por microscopia eletrônica de varredura; composição química, por espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier; e propriedades térmicas, por calorimetria exploratória diferencial.

7.1 Estrutura física

A análise da estrutura física das amostras revelou a presença de macro, meso e microporos na estrutura do polímero, onde partículas de hidroxiapatita e β -tricálcio fosfato encontram-se bem inseridas e dispersas. Além disso, ressalta-se a homogeneidade dos micro, meso e macroporos, passível de ser observada no aumento 50X. A uniformidade e interconectividade dos poros é fundamental na produção de arcabouços para engenharia de tecidos, já que estas propriedades facilitam a penetração de fluidos através do material e promovem a formação de tecido numa rede organizada (BARBANTI et al., 2004).

Os copolímeros de PLGA têm propriedades desejáveis, tais como taxa de biodegradação constante, resistência mecânica e geometria de cadeia individual regular (JAIN, 2000). Entretanto, é possível notar uma quantidade mais elevada de microporos na superfície do polímero de arcabouços com sinvastatina a 5% em comparação aos arcabouços sem sinvastatina. As partículas de sacarose, utilizadas como agentes porogênicos, apresentaram formato de cristais sólidos com tamanho médio no seu longo eixo de 578,33 μm ($\pm 187,50$), com irregularidades arredondadas na superfície com diâmetro médio de 7,03 μm ($\pm 11,52$) (ENCARNACAO, 2016). Na superfície do arcabouço, podem-se observar poros no mesmo formato que os cristais de sacarose e poros com

formato esférico, que provavelmente originaram-se da incorporação não controlada de bolhas de ar ao polímero. Assim, a maior quantidade de microporos no polímero de arcabouços com sinvastatina pode ser em decorrência do processo de produção, e não necessariamente ao processo de degradação.

Tanto na caracterização como na análise de degradação das amostras, não são observadas fissuras ou “cracks” na superfície do polímero. Após 14 e 21 dias de degradação, aparentemente há algum nível de degradação da cerâmica, conforme pode ser notado nas Figuras 18 e 24. Além do mais, a degradação da cerâmica bifásica parece ser mais evidente nos arcabouços sem sinvastatina incorporada. Em estudo anterior, as partículas de cerâmica bifásica apresentaram formato sólido pontiagudo, com tamanho médio no seu longo eixo de 283,83 μm ($\pm 95,5$), com alto número de irregularidades arredondadas na superfície, de diâmetro médio de 0,821 μm ($\pm 0,59$) (ENCARNACAO, 2016). Assim, é possível que as irregularidades da cerâmica percebidas através de microscopia eletrônica de varredura sejam características do próprio material, e não em decorrência de sua degradação. Entretanto, é importante ressaltar que, enquanto que a hidroxiapatita possui taxas de degradação muito lentas, o β -tricálcio fosfato degrada-se mais rapidamente (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012).

As micropartículas de HA/ β TCP aglutinadas ao redor de uma macropartícula de mesma composição, observada na Figura 4, podem ser observadas em decorrência da quebra da partícula cerâmica durante o processo de secção transversal da amostra para análise em microscópio.

Após 28 dias de degradação, foi observado que a estrutura física dos arcabouços se manteve praticamente inalterada, o que já era esperado, uma vez que as alterações no polímero não acontecem no período inicial. Após certo tempo sem alterações físico-químicas e mecânicas, o polímero inicia a degradação por hidrólise, perdendo inicialmente propriedades mecânicas e, posteriormente, massa (MOTTA; DUEK, 2006). O tempo analisado não permitiu a constatação dessas alterações. O ácido láctico é mais hidrofóbico do que o ácido glicólico, assim os copolímeros de PLGA ricos em ácido láctico, como é o caso do presente estudo (82:18), são menos hidrofílicos e absorvem menos água, levando a uma degradação mais lenta das cadeias poliméricas (JAIN, 2000). Em estudo prévio, onde foram avaliadas amostras de copolímero PLGA, que foram também degradadas em PBS a 37 °C, revelou que após 60 dias de imersão, a membrana que era inicialmente lisa e homogênea tornou-se totalmente rugosa, denotando certo grau de degradação (MOTTA; DUEK, 2006); entretanto, o processo de degradação aqui realizado levou apenas 28 dias.

Em um estudo prévio de caracterização e degradação de amostras de PLGA, a morfologia de superfície do PLGA foi acompanhada por microscopia eletrônica de varredura durante o processo de degradação em PBS de 6, 12 e 19 dias. As amostras iniciais (não degradadas) e as amostras que sofreram degradação por 6 dias revelaram superfícies íntegras e não-porosas; após 12 dias de imersão em PBS, as amostras apresentavam microfissuras em sua estrutura, revelando um estágio inicial de degradação, que foi exacerbado aos 19 dias de processo de degradação. Nas amostras subsequentes, as análises em MEV das superfícies das amostras tornaram-se inviáveis, devido ao estágio avançado de degradação das amostras, as quais, ao serem inseridas no microscópio, tiveram seus processos de degradação acelerados devido à presença do feixe de elétrons, tornando impossível obter as micrografias dessas amostras (SILVA et al., 2015). No entanto, o estudo mencionado referiu-se à membranas de PLGA sem a incorporação de cerâmicas.

7.2 Composição química

A análise de estrutura química foi dada pela espectroscopia no infravermelho. A radiação infravermelha (IR) refere-se à parte do espectro eletromagnético entre as regiões visível e de microondas. Embora o espectro infravermelho seja característico da molécula que se quer analisar, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É a presença destas bandas características de grupos que permite a obtenção, através da análise do espectro e consulta a tabelas, de informações estruturais úteis (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Para as amostras analisadas, observou-se um padrão bastante semelhante entre os arcabouços sem e com sinvastatina a 5%. Para as amostras iniciais, há uma prevalência de bandas de absorção de cerca de 1750 cm^{-1} , o que representa ligações duplas entre carbono e oxigênio ($C = O$), e de bandas entre $350 - 1500\text{ cm}^{-1}$, o que é característico de ésteres ($C - O$) e hidrocarbonetos (CH_2 e CH), assim como traços de hidrocarbonetos CH , CH_3 e CH_2 por volta de 3000 cm^{-1} . As características aqui observadas são semelhantes aos apresentados na literatura, como um estudo de caracterização do copolímero PLGA, onde é possível observar uma banda espessa na gama entre 1760 cm e 1750 cm^{-1} , característica de carbonila ($C = O$), presente nos dois monômeros (PLA e PGA); uma banda de agrupamento ($C - O$), entre 1300 e 1150 cm^{-1} , característica dos grupos éster (SILVA et al., 2015). Em outro estudo prévio, também

semelhante ao presente trabalho, o qual avaliou a caracterização e degradação de arcabouços de PLGA, sem cerâmica, revelou que os copolímeros sintetizados apresentaram bandas de absorção de $2997 - 2965 \text{ cm}^{-1}$ (CH_2 , CH_3), 1759 cm^{-1} ($\text{C} = \text{O}$), $1360 - 1450 \text{ cm}^{-1}$ (CH_3) e 750 cm^{-1} (CH), os quais caracterizam o material (MOTTA; DUEK, 2006). Assim, foi possível determinar todos os grupos funcionais de referência ($\text{C} = \text{O}$, $\text{C} - \text{O}$, CH_3 , CH_2 e CH) nos espectros dos copolímeros sintetizados. A ausência de bandas de absorção entre 3600 e 3400 cm^{-1} , característica do grupo hidroxila, indica que os copolímeros de PLGA são anidros (ERBETTA et al., 2012). As Tabelas 1 e 2 exibem bandas de absorção e suas correspondências, ajudando na interpretação dos resultados obtidos por FTIR.

Após 28 dias de degradação, as amostras mantiveram o padrão semelhante ao gráfico gerado durante a caracterização (Figura 33). No estudo que realizou a caracterização e estudo da degradação de amostras de PLGA, os espectros das amostras degradadas são bastante semelhantes, o que indica que não houve modificação significativa nos grupos químicos do PLGA, devido à degradação, durante o período investigado (6, 12, 19, 28, 40 e 55 dias) (SILVA et al., 2015). O ácido láctico é mais hidrofóbico do que o ácido glicólico, assim os copolímeros de PLGA ricos em ácido láctico, como é o caso do presente estudo (82:18), são menos hidrofílicos e absorvem menos água, levando a uma degradação mais lenta das cadeias poliméricas (JAIN, 2000).

Em estudo anterior, que analisou por EDS a superfície de arcabouços idênticos aos aqui testados, identificou-se a composição química da cerâmica bifásica, rica em Ca e P, diferentemente do polímero. A análise também demonstrou que o arcabouço é formado essencialmente por C, O, Ca e P, e, após o processo de liberação de sinvastatina e liofilização para a microscopia, também foram identificados Na, Cl e K, que estavam presentes no arcabouço, provenientes do meio de liberação em PBS e PBS com 30% etanol (ENCARNACAO, 2016).

7.3 Propriedades térmicas

No gráfico, os picos endotérmicos ocorrem em média entre $150 - 160 \text{ }^\circ\text{C}$, o que vai ao encontro de estudos que realizados previamente (ENCARNACAO, 2016). Entretanto, no presente trabalho, não foi possível identificar a temperatura de transição vítrea, característica de materiais de estrutura cristalina. Encarnação, em 2016, analisou a sinvastatina separadamente, a qual apresentou um único pico endotérmico associado à fusão ($146 \text{ }^\circ\text{C}$) e não apresentou transição vítrea. Já o PLGA

puro revelou características de materiais semicristalinos, caracterizado por uma transição vítrea (49,1 °C) proveniente das regiões amorfas, e um pico endotérmico (156,7 °C) associado a fusão das regiões cristalinas. Outras análises em DSC para copolímeros como o PLGA revelaram temperaturas de transição vítrea de 35 °C a 57 °C, dependendo das proporções de polímeros adicionados (ERBETTA et al., 2012; MOTTA; DUEK, 2006; SILVA et al., 2015), e revelaram que a temperatura de transição vítrea diminui conforme o arcabouço vai se degradando, chegando a 20 °C após 55 dias de degradação em PBS (SILVA et al., 2015).

O presente estudo revelou uma média de picos endotérmicos de 156,96 °C para amostras sem sinvastatina e de 153,99 °C para amostras com sinvastatina a 5%. Assim, observa-se que os picos endotérmicos foram mais elevados para arcabouços sem sinvastatina incorporada. Em estudo anterior, arcabouços sem sinvastatina apresentaram temperatura de transição vítrea e de fusão de 74,7 °C e 158,2 °C, respectivamente. Já para as amostras com sinvastatina, a temperatura de transição vítrea foi de 37,9 °C e o pico endotérmico foi de 154,9 °C; além disto, foi detectado um pico de cristalização de 95,1 °C (ENCARNACAO, 2016). A transição vítrea e a fusão estiveram associadas ao polímero e suas interações com a cerâmica bifásica, e o aparecimento do pico de cristalização esteve associado à presença de sinvastatina, que interagiu com os componentes do arcabouço que induziram o processo de cristalização. Comparando estes valores com o PLGA puro, observou-se um deslocamento dos valores para temperaturas mais elevadas, o que indica uma interação entre os materiais (ENCARNACAO, 2016). Uma queda na temperatura de transição vítrea pode estar relacionada a uma alteração no comportamento conformacional dos segmentos poliméricos ricos em ácido polilático (VEY et al., 2012), sugerindo que houve uma forte interação da sinvastatina com o polímero.

Nos gráficos aqui apresentados, houve um segundo pico endotérmico em temperaturas acima de 300 °C, mas como muitas das curvas não finalizaram seu curso até os 350 °C analisados, não foi possível calcular os valores das mesmas. Estes picos podem estar associados à cerâmica bifásica, a qual apresenta transições térmicas em temperaturas superiores.

Vey et al., em 2012, observaram que quanto maior a temperatura de transição vítrea da amostra, mais lenta será a difusão de água. Apesar de que o presente estudo não tenha demonstrado as temperaturas de transição vítrea, este fato pode explicar o período de latência observado nos arcabouços sem sinvastatina.

7.4 Molhabilidade

O teste da gota revelou que arcabouços sem sinvastatina são mais hidrofóbicos que arcabouços com sinvastatina incorporada. As imagens foram obtidas imediatamente após a deposição da gota, onde o arcabouço com sinvastatina foi capaz de absorver imediatamente o líquido, enquanto que o arcabouço sem sinvastatina manteve a gota com um ângulo bastante obtuso de $110,4^\circ$. Após uma hora da deposição do meio sobre as amostras, observou-se uma difusão ainda maior do líquido pelo arcabouço com sinvastatina, e a absorção completa da gota de meio pelo arcabouço sem sinvastatina, embora o líquido ainda não estivesse difundido completamente. Isso pode ser em decorrência da porosidade mais elevada dos arcabouços com sinvastatina incorporada, ou por alguma interação química entre as amostras com sinvastatina e o meio de cultura celular (ENCARNACAO, 2016). Além do mais, é importante lembrar que o PLGA possui caráter hidrofóbico de superfície (LIU et al., 2011; SHEN et al., 2011).

7.5 Citotoxicidade

As amostras confeccionadas não apresentaram resultados favoráveis no que se refere à citotoxicidade sobre fibroblastos da linhagem L929. Os arcabouços com sinvastatina incorporada revelaram-se citotóxicos desde o tempo experimental de 1 dia, chegando a 20% de viabilidade aos 3 dias de ensaio; já os arcabouços sem sinvastatina apresentaram resultados muito bons para os tempos experimentais de 1 e 3 dias, mas igualaram-se aos arcabouços com sinvastatina no tempo de 7 dias. Resultados obtidos em um estudo anterior que avaliou a citotoxicidade por contato direto através de análises de MTT mostraram que ambas as amostras de PLGA e PLGA+HA não eram tóxicas para células osteoblásticas, e o enriquecimento das amostras com hidroxiapatita não influenciou na viabilidade celular. Os resultados deste estudo demonstraram que ambos os arcabouços possibilitaram processos de adesão e proliferação celular, e síntese de colágeno pelos osteoblastos. Arcabouços de PLGA+HA apresentaram melhores respostas celulares, tais como adesão celular e síntese de colágeno que arcabouços de PLGA (MESSIAS; ARAGONES; DUEK, 2009). No entanto, a linhagem celular utilizada nos estudos é diferente, onde o presente estudo utilizou fibroblastos e o estudo de Messias, Aragones e Duek, 2009, utilizou osteoblastos. Além do mais, neste trabalho, o ensaio de citotoxicidade foi

realizado por contato indireto, uma vez que a hidrofobia das amostras faz com que estas flutuem no meio, inviabilizando as análises por contato direto. A difusão de água no polímero provoca a hidrólise das ligações de éster nas cadeias poliméricas, levando à geração de oligômeros solúveis em água. Assim, o arcabouço puro não é tóxico às células (MOTTA; DUEK, 2006). Uma vez que os arcabouços sem sinvastatina são mais hidrofóbicos que os arcabouços com sinvastatina, é possível que as amostras com sinvastatina incorporada tenham interagido mais rapidamente com o meio de cultura, liberando seus produtos e afetando o crescimento celular. Entretanto, é importante observar que o pH do PBS não variou significativamente durante o período de análise da degradação.

A sinvastatina necessita de um carreador para promover a sua libertação lenta e gradual, permitindo a indução local do estímulo osteogênico durante períodos prolongados de tempo e modulando favoravelmente o processo inflamatório (ENCARNACAO et al., 2016). No presente estudo, é possível que tenha ocorrido uma alta difusão inicial de sinvastatina, o que pode ter prejudicado a proliferação celular. O mesmo evento foi notado por Encarnação et al., 2016, onde houve uma resposta inflamatória exacerbada após o enxerto de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP com sinvastatina incorporada. Altas concentrações de sinvastatina provocam morte celular e respostas inflamatórias exacerbadas (KUPCSIK et al., 2009). Dessa forma, uma opção interessante seria reduzir a porcentagem de sinvastatina incorporada para de 5% para 2%.

No estudo prévio que avaliou este tipo de arcabouço, para as amostras com 70% de porosidade, os grupos com 2% e 5% de sinvastatina iniciaram a liberação do fármaco com 1 e 2 dias, respectivamente, e o grupo com 8% de sinvastatina iniciou com 5 horas (ENCARNACAO, 2016). Isso poderia explicar o fato de que, aos 3 dias de ensaio, as amostras com sinvastatina tenham alcançado níveis de citotoxicidade tão baixos quanto 20%. Entretanto, o mesmo estudo demonstrou que a liberação de sinvastatina das amostras incubadas em PBS apresentou uma liberação lenta durante os 40 dias de experimento, atingindo valores de 2,5 a 4,5% nas amostras com 70% de porosidade e, mesmo após os 40 dias, a curva de liberação ainda apresentava um comportamento crescente, sem atingir um equilíbrio (ENCARNACAO, 2016). No entanto, é importante ressaltar as diferenças entre o PBS e o meio utilizado, DMEM, o qual é mais lipofílico.

O período de latência da liberação de sinvastatina nas amostras incubadas em PBS pode estar relacionado a fatores como a hidratação do arcabouço no meio, ou hidrofobia do material, como mencionado

anteriormente. Este fato também foi relatado por Gentile et al. em 2016, que observaram 3 dias de latência das micropartículas de PLGA devido à natureza hidrofóbica do polímero, fazendo com que a solução demore para entrar em contato com a superfície interna do arcabouço (GENTILE et al., 2016).

Outros fatores que contribuem para o período de latência são o gradiente de concentração de sinvastatina na amostra e a porosidade e interconectividade dos poros no arcabouço. Foi observada uma redução do período de latência com o aumento da concentração da sinvastatina e com o aumento da porosidade e interconectividade dos poros que afetam a permeabilidade dos fluidos e o seu contato com o arcabouço para a transferência de massa. Esse período de latência implica que essas amostras devem ser hidratadas previamente em qualquer ensaio biológico para garantir que os fluidos possam invadir imediatamente o arcabouço para a nutrição celular (ENCARNACAO, 2016).

7.6 Considerações Finais

Não existem estudos que realizaram caracterização e análise da degradação em arcabouços de PLGA+HA/ β TCP. O desenvolvimento de arcabouços visa obter estruturas com propriedades mecânicas semelhantes às do osso hospedeiro, de acordo com as qualidades ósseas da área receptora. A associação de biomateriais possibilita a soma de características favoráveis para a elaboração de arcabouços biomiméticos, ou seja, com características mais próximas ao tecido ósseo (ENCARNACAO, 2016).

A perda de massa dos polímeros em geral é avaliada através de cromatografia de permeação em gel (GPC), entretanto a adição de cerâmica inviabilizou a utilização desta técnica, uma vez que a cerâmica pode danificar o equipamento. Assim, análises por ionização por desorção de laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF) foram consideradas para o experimento, no entanto, para as análises, é necessário um índice de polidispersão inferior a 1,2; porém, estudos anteriores revelaram índices de 1,7 a 2,0 (MOTTA; DUEK, 2006), o que inviabilizou também esta análise.

Apesar da solução-tampão ser mais consagrada na literatura para realização de degradação de polímeros, utilizar o próprio meio de cultura celular para degradar as amostras pode ser interessante, já que reduz os vieses, facilitando a elaboração de hipóteses para o comportamento do arcabouço no decorrer do tempo. Além do mais, o método colorimétrico de MTS por contato indireto também pode ter causado alguns vieses, uma

vez que as células não entram em contato direto com o arcabouço, inviabilizando as análises por microscopia eletrônica de varredura.

8 CONCLUSÕES

Os arcabouços de PLGA+HA/ β TCP com sinvastatina a 5% apresentaram boas características físico-estruturais, químicas e térmicas, sugerindo ser um biomaterial promissor para a regeneração de tecido ósseo juntamente com células-tronco. Entretanto, quando testado *in vitro* sobre fibroblastos, os mesmos arcabouços mostraram-se citotóxicos a uma concentração de 5% de sinvastatina.

REFERÊNCIAS

AXELRAD, T. W. et al. Heterotopic ossification after the use of commercially available recombinant human bone morphogenetic proteins in four patients. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 90, n. 12, p. 1617–22, dez. 2008.

BALDINI, N. et al. **Bone Repair Biomaterials**. [s.l.] Elsevier, 2009.

BARBANTI, S. H. et al. Porous and dense poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: In vitro degradation in culture medium and osteoblasts culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 12, p. 1315–1321, 2004.

BERGSMA, J. E. et al. Late degradation tissue response to poly(l-lactide) bone plates and screws. In: **The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium**. [s.l.: s.n.]. p. 101–107.

BERNARDO, M. E.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stromal cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1176, p. 101–17, set. 2009.

BIANCO, P. et al. Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. **British journal of haematology**, v. 68, n. 4, p. 401–3, abr. 1988.

BOERCKEL, J. D. et al. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. **Biomaterials**, v. 32, n. 22, p. 5241–5251, ago. 2011.

CARREIRA, A. C. et al. Bone Morphogenetic Proteins: Facts, Challenges, and Future Perspectives. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 4, p. 335–345, 2014.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; BALDINI, N. The Combined Use of Mesenchymal Stromal Cells and Scaffolds for Bone Repair. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 13, p. 1796–1820, 2012.

DEVINE, J. G. et al. The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk? **Evidence-based spine-care journal**, v. 3, n. 2, p. 35–41, maio 2012.

ENCARNACAO, I. C. et al. Analysis of Bone Repair and Inflammatory Process Caused by Simvastatin Combined With PLGA+HA+betaTCP Scaffold. **Implant dentistry**, v. 25, n. 1, p. 140–148, 2016.

ENCARNACAO, I. C. **Análise das propriedades físico-químicas e**

mecânicas de arcaço poroso composto de PLGA, cerâmica bifásica e simvastatina de liberação lenta para engenharia de tecido ósseo. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

ERBETTA, C. D. C. et al. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, p. 208–225, 2012.

FISHER, P. D. et al. Hydroxyapatite-reinforced *in situ* forming PLGA systems for intraosseous injection. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 7, p. 2365–2373, jul. 2015.

GENTILE, P. et al. Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan-gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 249–257, 2016.

GOMEZ, G. et al. Effect of FGF and Polylactide Scaffolds on Calvarial Bone Healing With Growth Factor on Biodegradable Polymer Scaffolds. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 5, p. 935–942, set. 2006.

HABIBOVIC, P. et al. Predictive value of *in vitro* and *in vivo* assays in bone and cartilage repair--what do they really tell us about the clinical performance? **Advances in experimental medicine and biology**, v. 585, p. 327–60, jan. 2006.

HÄMMERLE, C. H.; KARRING, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodontology 2000**, v. 17, p. 151–175, 1998.

HUANG, X.; MIAO, X. Novel porous hydroxyapatite prepared by combining H₂O₂ foaming with PU sponge and modified with PLGA and bioactive glass. **Journal of biomaterials applications**, v. 21, n. 4, p. 351–74, abr. 2007.

JADHAV, S. B.; JAIN, G. K. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 3–18, jan. 2006.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475–2490, 2000.

JONES, E.; YANG, X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 562–568, 2011.

KARRING, T.; NYMAN, S.; LINDHE, J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. **Journal of**

clinical periodontology, v. 7, n. 2, p. 96–105, abr. 1980.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular : uma Introdução à Patologia**. 2012.

KUPCSIK, L. et al. Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 11–12, p. 4465–73, nov. 2009.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5110, p. 920–6, 14 maio 1993.

LANSMAN, S. et al. Poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 Fibrous Implants. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 6, p. 1121–1128, nov. 2006.

LEBOURG, M.; SUAY ANTÓN, J.; GOMEZ RIBELLES, J. L. Characterization of calcium phosphate layers grown on polycaprolactone for tissue engineering purposes. **Composites Science and Technology**, v. 70, n. 13, p. 1796–1804, 2010.

LIU, X. et al. Hydroxyapatite/biodegradable poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) composite microparticles as injectable scaffolds by a Pickering emulsion route. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 2, p. 821–8, fev. 2011.

LIUYUN, J. et al. Degradation behavior of hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic) acid nanocomposite in simulated body fluid. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 10, p. 4186–4190, 2013.

MANO, J. F. et al. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. **Composites Science and Technology**, v. 64, n. 6, p. 789–817, 2004.

MESSIAS, A. D.; ARAGONES, A.; DUEK, E. A. DE R. PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells. **Key Engineering Materials (Online)**, v. 369–389, p. 461–464, 2009.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335–2346, 2000.

MÖDDER, U. I.; KHOSLA, S. Skeletal stem/osteoprogenitor cells: current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. **Journal of cellular biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 393–400, 1 fev. 2008.

MONTERO, J.; MANZANO, G.; ALBALADEJO, A. The role of topical simvastatin on bone regeneration: A systematic review. **Journal of**

Clinical and Experimental Dentistry, v. 6, n. 3, p. e286-90, 2014.

MOTTA, A.; DUEK, E. Síntese , Caracterização e Degradação “ in vitro ” do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) poly (L-lactic acid-co-glycolic acid), PLGA. **Revista Matéria**, v. 11, n. 3, p. 340–350, 2006.

MUNDY, G. et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science (New York, N.Y.)**, v. 286, n. 5446, p. 1946–1949, 1999.

NEOVIUS, E. et al. Alveolar bone healing accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone morphogenetic protein-2 delivered by hydrogel. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS**, v. 66, n. 1, p. 37–42, jan. 2013.

NYMAN, S. et al. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. **Journal of clinical periodontology**, v. 7, n. 5, p. 394–401, out. 1980.

OLIVEIRA, M. A. P. P. N. DE. **Preservação de cristas ósseas pós-extração de terceiros molares superiores com arcabouços de PLGA/ β -TCP, com e sem simvastatina: um estudo clínico e radiográfico em humanos**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

PARK, J. B. The use of simvastatin in bone regeneration. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 14, n. 9, p. 485–488, 2009.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 447–451, 2001.

RENOUF-GLAUSER, A. C. et al. A degradation study of PLLA containing lauric acid. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2415–2422, 2005.

SAKODA, K. et al. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. **Journal of dental research**, v. 85, n. 6, p. 520–3, jun. 2006.

SHEN, H. et al. Cell affinity for bFGF immobilized heparin-containing poly(lactide-co-glycolide) scaffolds. **Biomaterials**, v. 32, n. 13, p. 3404–3412, maio 2011.

SILVA, A. T. C. R. et al. Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer in vitro Degradation. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 6, p. 8–19, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Grupo

Gen - LTC, 2006.

SUGIYAMA, T. et al. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. **Immunity**, v. 25, n. 6, p. 977–88, dez. 2006.

SUNDELACRUZ, S.; KAPLAN, D. L. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 20, n. 6, p. 646–55, ago. 2009.

TAKENAKA, M. et al. Simvastatin stimulates VEGF release via p44/p42 MAP kinase in vascular smooth muscle cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 301, n. 1, p. 198–203, 31 jan. 2003.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science (New York, N.Y.)**, v. 150, n. 3698, p. 893–9, 12 nov. 1965.

VEY, E. et al. The impact of chemical composition on the degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid copolymers cast films in phosphate buffer solution. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, p. 358–365, 2012.

WAGONER JOHNSON, A. J.; HERSCHLER, B. A. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 1, p. 16–30, jan. 2011.

YAMASHITA, M. et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- α inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. **The Journal of endocrinology**, v. 196, n. 3, p. 601–13, mar. 2008.

YANG, F. et al. Poly(l,l-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 12, p. 3065–3073, 2006.