



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

GUSTAVO JAVIER SALAZAR LITTUMA

**ANÁLISE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA SINVASTATINA
ASSOCIADA AO PLGA NA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO**

Dissertação de Mestrado

Florianópolis
2017

Gustavo Javier Salazar Littuma

**ANÁLISE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA SINVASTATINA
ASSOCIADA AO PLGA NA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação
em Odontologia do Centro
de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal de
Santa Catarina, como parte
dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em
Odontologia.

Área de Concentração:
Implantodontia

Professor
Orientador: Prof. Dr. Ricardo
de Souza Magini

Florianópolis
2017

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

Salazar Littuma, Gustavo Javier.

Análise de liberação *In vitro* da Sinvastatina associada ao PLGA na superfície de Titânio. Gustavo Javier Salazar Littuma; Orientador, Ricardo de Souza Magini -Florianópolis, SC, 2017. 73 p.

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

Inclui Referências

1. Liberação controlada de droga 2. Sinvastatina 3. PLGA I Magini, Ricardo de Souza II Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III Título

Gustavo Javier Salazar Littuma

**ANÁLISE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA
SINVASTATINA ASSOCIADA AO PLGA NA SUPERFÍCIE DE
TITÂNIO**

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

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2017

Prof^a.Dr^a. Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

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

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

Prof.Dr. Aguedo Aragoes
BioCentro

Prof^a.Dr^a.Carmen Maria Olivera Muller
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esta dissertação,

A minha esposa, amor e companheira de minha vida, obrigado por tua paciência e apoio incondicional, por me dar forças nas dificuldades, escutar-me, aconselhar-me, e acompanhar-me nesta etapa importante.

Aos meus pais, obrigado por seu amor incondicional e ensinamentos diários, por me ajudar a cumprir meus sonhos e mostrar-me o caminho da responsabilidade e honestidade, por ensinar-me a palavra de Deus, onde deposito minha fé, forças e amor por Ele.

A você quem já fez de mim um homem melhor, saiba que serei teu amigo incondicional, um exemplo de luta e perseverança. Pietra meu anjo, minha querida e amada filha estarei aguardando por você.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof.Dr.Ricardo de Souza Magini**, obrigado por seu ensino diário, por introduzir a cada um de nós nesse mundo maravilhoso do ensino e mostrar a importância que é transmitir conhecimento.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Aguedo Aragones**, obrigado por seu apoio, dedicação e disposição para ajudar em cada etapa desde trabalho, por compartilhar suas experiências, o que me permitiu explorar novos horizontes.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso**, obrigado por transmitir seu amplo conhecimento, e ensinar que a vida acadêmica é feita de desafios que temos que aceitar sem dúvida, por fazer-nos entender que cada dia devemos nos questionar sobre o que aprendemos e transmitir com amor o que sabemos.

Ao **Prof. Dr. César Augusto Benfatti**, obrigado por sua disposição para resolver nossas dúvidas e por oferecer soluções em cada momento que precisei durante este trabalho, assim como durante os dois anos de mestrado.

Ao **Prof.Dr.Marco Aurélio Bianchini**, obrigado pelo ensino durante os dois anos de mestrado, por mostrar que a disciplina pessoal e docência vão sempre juntos e que o segredo das coisas esta na praticidade.

A **Prof^a.Dr^a.Carmen Maria Olivera Muller**, obrigado por sua dedicação e paciência na execução deste trabalho.

Aos professores e funcionários da UFSC, que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho e facilitaram o uso dos equipamentos delaboratório em suas respectivas áreas de trabalho. Obrigado, ao Prof.Dr. Marcos Antônio Segatto Silva, Prof. Dra.Helen Karine Stulzer, Prof.Dra. Elena Riet Correa Rivero, Prof.Dra. Andrea de Lima Pimenta, Prof. Dra. Marta Elisa Rosso Dotto.

A minha amiga e mestranda do Departamento de Farmácia Daiane Danzilago,muito obrigado pela participação e apoio incondicional no trabalho, por ter ficado presente quando mais precisei,nos acertos e nos erros, obrigado pela amizade e parceria.

Aos meus amigos e companheiros do mestrado, obrigado a cada um de vocês pelo convívio acadêmico nos dois anos de mestrado, pela amizade e apoio diário. Sem dúvida vocês fizeram que esta experiência fosse inesquecível e tenho a cada um de vocês presente em meu coração.

A Universidade Federal de Santa Catarina, que me proporcionou uma educação de primeiro nível para ser um melhor profissional

estabelecendo raízes de conhecimento e humanidade a serem transmitidas ao mundo.

Tudo posso naquele que me fortalece
Filipenses 4:13.

RESUMO

Novas técnicas e superfícies de implantes têm sido desenvolvidas para acelerar a formação óssea e conseqüentemente diminuir o tempo de osseointegração. Os sistemas de liberação controlada de fármacos por meio de agentes carreadores, como os polímeros biodegradáveis, buscam proporcionar, por um longo período de tempo, efeitos terapêuticos, permitindo que o agente seja liberado diretamente no local de ação. O objetivo deste trabalho foi investigar o perfil de liberação da sinvastatina associada ao PLGA (ácido polilático co-glicólico), os quais formaram uma película de revestimento sobre a superfície de discos de titânio, e identificar as características topográficas, físicas e químicas presentes neste revestimento. O estudo envolveu uma técnica de revestimento por imersão dos discos de titânio de 8mm de diâmetro por 3mm de espessura no copolímero de PLGA e sinvastatina. A liberação da Sinvastatina foi avaliada em quaduplicata nos discos com o copolímero em um meio contendo PBS por até 600 horas. A caracterização físico-química e topográfica do PLGA associado à Sinvastatina foi avaliada por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria diferencial exploratória (DSC), já a caracterização topográfica do PLGA e Sinvastatina sobre o titânio foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM) e a rugosidade média (Ra) por perfilometria. Foi observada uma liberação lenta e prolongada da sinvastatina em PBS, alcançando 21,31% após 25 dias de liberação, e verificou-se que o mecanismo que controla a transferência de massa da sinvastatina é difusional. As análises de FTIR e DSC revelaram que houve incorporação da sinvastatina dentro do polímero. A microscopia pelo MEV e AFM evidenciou uma superfície de revestimento uniforme inicial, que foi mudando ao final de 25 dias de imersão em PBS ao ser analisada pelo MEV devido às características de erosão do PLGA. Os resultados de perfilometria não mostraram diferença estatística na rugosidade média entre o Grupo de PLGA e Sinvastatina+PLGA. A liberação da sinvastatina através do PLGA na superfície de titânio foi lenta e prolongada, o que permite considerar a utilização destes agentes como revestimento terapêutico em implantes dentários.

Palavras-chaves: Liberação controlada de droga; Sinvastatina; PLGA; Implante dentário.

ABSTRACT

New techniques and implant surfaces have been developed to accelerate bone formation and consequently, decrease the time of osseointegration. Controlled drug delivery systems by carrier agents such as biodegradable polymers seek to provide therapeutic effects over a long period of time allowing the agent to be released directly into the site of action. The objective of this study was to investigate the release profile of simvastatin associated with Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), which formed a coating film on the surface of titanium disks, and to identify the topographic, physical, and chemical characteristics present in this coating. The study involved a dip coating technique of titanium discs with 8mm of diameter and 3mm of thickness in the copolymer of PLGA and Simvastatin. The release of simvastatin was evaluated in four replicates on the disks with the copolymer in a medium containing PBS for up to 600 hours. The physico-chemical characterization of PLGA associated with simvastatin was evaluated by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and differential scanning calorimetry. The characterization of PLGA and simvastatin on the titanium surface was evaluated by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM) and the mean roughness (R_a) by profilometry. A slow and prolonged release of simvastatin was observed, reaching 21,31% release rate at 25 days, elucidating that diffusion was the mass transport mechanism of simvastatin. The FTIR and DSC analysis revealed that there was a simvastatin incorporation into the copolymer. The scanning electron microscopy (SEM) and (AFM) showed the presence of a initial uniform coating surface, which was changed at the end of the 25 days of immersion in PBS after a new (SEM) analysis, due to the erosion characteristics of PLGA. Observing the results obtain by profilometry, there was no statistical difference between the Group PLGA and Simvastatin+PLGA. The release of simvastatin through PLGA on the titanium surface was slow and prolonged, which allows the use of this agents as a therapeutic coating in dental implants.

Key-Words: Controlled drug delivery; Simvastatin; PLGA; Dental Implant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de Liberação da SIN em função do tempo a partir do PLGA nos discos de titânio à 37°C em PBS	43
Figura 2. Curva de Liberação da SIN em função do tempo nos discos do Grupo 2 ajustadas ao modelo cinético de Ridger&Peppas.....	44
Figura 3. Espectros obtidos por FTIR do PLGA, SIN e SIN+PLGA.....	45
Figura 4a. Termograma DSC da SIN.....	46
Figura 4b. Termograma DSC do PLGA.....	46
Figura 4c. Termograma DSC da SIN+PLGA.....	47
Figura 5. Imagens pelo MEV da topografia de superfície. (a) e (b) Grupo 0; (c) e (d) Grupo 1; (e) e (f) Grupo 2; (g) e (h) Grupo 2 após 25 dias de imersão em PBS a 37°C. 100x e 300x	48
Figura 6. Imagens pelo AFM da topografia de superfície. (a) e (b) Grupo 1; (c) e (d) Grupo 2. Ampliações de 95um e 50um.....	49
Figura 7. Boxplot das medianas de Ra para cada Grupo.....	50
Figura 8. Médias de Ra dos três discos em triplicata ($i=1, 2, 3$) e Média amostral de Ra para cada Grupo.....	51
Figura 9. Desvio-padrão de Ra dos três discos em triplicata ($i=1, 2, 3$) e Desvio amostral de Ra para cada Grupo.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de liberação da SIN em função do tempo a partir do PLGA nos discos de titânio a 37°C em PBS sob agitação.....	50
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BMPs	Proteínas Ósseas Morfogênicas
°C	Graus Celsius
CHCl ₃	Clorofórmio
C	Carbono
cm	Centímetro(s)
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FTIR	Espectroscopia do infravermelho transformada de Fourier
H	Hidrogênio
L	Litro(s)
LCME	Laboratorio Central de Microscopia Eletrônica
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama(s)
mm	Milímetro(s)
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
ml	Mililitro(s)
O	Oxigênio
%	Porcentagem
PLGA	Poliácido láctico- co-glicólico
pH	Potencial Hidrogeniônico
PBS	Tampão Salina Fosfato
Ra	Rugosidade média
rpm	Rotações por minuto
SIN	Sinvastatina
Ti	Titânio
Tg	Temperatura de transição vítrea
ug	Micrograma(s)
UV-VIS	Espectrometria de absorção na região ultravioleta-visível
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	25
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	25
2. OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
CAPÍTULO II	33
ARTIGO EM PORTUGÊS	33
1.INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1 Preparo dos Discos de Titânio.....	39
2.2 Preparo do copolímero	39
2.3 Tratamento dos Discos de Titânio com PLGA e SIN+PLGA.....	39
2.4 Quantificação de Sinvastatina em Discos de Titânio	40
2.5Análise de Liberação de Sinvastatina.....	40
2.6Aplicação de Modelo Matemático para Liberação de Sinvastatina..	40
2.7Análise das Propriedades Físico-Químicas do PLGA e SIN+PLGA41	
2.7.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho modificada por Fourier (FTIR).....	41
2.7.2Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	41
2.7.3 Microscopio Eletrônico de Varredura(MEV).....	41
2.7.4Microscopia de Força Atômica(AFM)	42
2.7.5 Perfilometria.....	42
2.7.6 Análise Estatística	42
3. RESULTADOS	43
3.1Liberação da Sinvastatina.....	43
3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho modificada por Fourier (FTIR)	44
3.3Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	45
3.4 Microscopio Eletrônico de Varredura(MEV).....	47
3.5 Microscopio de Força Atômica (AFM).....	49
3.6 Rugosidade Média por Perfilometria	50
4.DISSCUSSÃO.....	53
5.CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	59
CAPÍTULO III	67
Apêndice-Figuras e Tabelas não apresentadas no artigo.....	67

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A utilização de implantes endósseos para a reabilitação de pacientes parcial e totalmente edêntulos tem permitido melhorar a função mastigatória e a qualidade de vida de inúmeras pessoas (BUSER et al., 2017). Embora as altas taxas de sucesso envolvendo a reabilitação suportada por implantes osseointegráveis tenham consolidado esta modalidade de tratamento, a procura pela otimização da resposta implante-hospedeiro imediata e a longo prazo é um fator de contínua investigação (GRANJEIRO, 2011).

O titânio e suas ligas são materiais para a fabricação de implantes endósseos em virtude de propriedades como alta biocompatibilidade, resistência à corrosão, baixa densidade, baixo módulo de elasticidade e alta resistência à tração (JORGE et al., 2013).

O uso clínico exitoso dos implantes dentários é dependente da fixação biológica e ancoragem no osso hospedeiro, capaz de suportar uma carga funcional (CASTELLANI et al., 2011). A integração que acontece na interface osso-implante, é considerada complexa ao levar em consideração fatores como material, forma, topografia e química da superfície do implante, bem como variáveis tais como a técnica cirúrgica e a qualidade e quantidade óssea do paciente (PULEO & NANJI, 1999).

Considerando que a utilização do titânio na área dental depende de uma íntima interação entre a superfície do implante e as células teciduais, várias estratégias têm sido desenvolvidas, criando superfícies favoráveis a nível celular de forma a acelerar o processo de osseointegração (CHEN et al., 2013). Neste âmbito, modificações no tratamento de superfície, como, jateamento de partículas, ataque ácido, jateamento com ataque ácido e oxidação anódica são descritos na literatura com esta finalidade (LE GUÉHENNEC et al., 2007; BAUER et al., 2013).

Atualmente, novas estratégias, como a utilização de moléculas bioativas a partir de métodos bioquímicos, têm sido motivo de investigação (BAUER et al., 2009). A funcionalização dos implantes a partir de métodos bioquímicos tem como objetivo imobilizar proteínas, enzimas e peptídeos nos biomateriais e induzir uma resposta tecidual e celular específica, que possa melhorar o contato osso-implante (PULEO & NANJI, 1999).

Existem várias técnicas para controlar a liberação de moléculas bioativas na superfície dos implantes, incluindo a absorção física,

adesão química covalente e a liberação a partir de revestimentos (PULEO&NANCI, 1999; CHEN et al., 2013).

A absorção física consiste em depositar o implante numa solução com moléculas bioativas ou proteínas. Porém esta técnica tem pouco controle na liberação e retenção das moléculas, por depender da química da superfície do implante, da topografia, da hidrofília e da interação eletrostática entre as moléculas bioativas com sua superfície (PULEO &NANCI,1999; CHEN et al., 1999).

A adesão covalente permite imobilizar biomoléculas específicas na superfície do implante, porém é necessário uma prévia funcionalização da superfície de óxido de titânio com grupos aminos ou carboxilos para ter uma reação (PULEO &NANCI, 1999; CHEN et al., 2013). Por outro lado, a liberação a partir de revestimentos permite incorporar fisicamente biomoléculas em revestimentos biodegradáveis e não biodegradáveis induzindo que a resposta das células e tecidos dependa da duração da exposição e concentração de biomoléculas, permitindo uma cinética de liberação controlada (PULEO &NANCI, 1999; BAUER et al., 2013).

A liberação de fatores de crescimento (IGF-1 e TGF- β 1), proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e outras substâncias, através de revestimentos poliméricos biodegradáveis é documentada em estudos *in vitro* e *in vivo* (SCHMIDMAIER et al., 2001; YANG et al., 2011; YOO et al., 2015).

As BMPs, uma família importante de fatores de crescimento para o reparo ósseo, teve sua primeira indicação na ortopedia para cirurgias de fusão da medula espinhal (TRAJKOVSKI, 2012). As BMPs possuem uma grande variedade de atividades biológicas durante a embriogênese sobre os tecidos cartilagosos e ósseos, tais como quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular e apoptose (WANG et al., 2014). No entanto, sua utilização apresenta limitações, como alto custo, falta de controle da atuação por ter uma cinética de liberação complexa, uso em dosagens não fisiológicas, imunogenicidade e segurança a longo prazo (MONTERO et al., 2014).

Considerando esses aspectos, existe a tentativa de encontrar outros agentes farmacológicos que possam regular favoravelmente os fatores de crescimento intrínsecos, conseguindo estimular a osteogênese e a arquitetura do osso trabecular, essenciais para aumentar a osseointegração de implantes dentários (ZHAO et al., 2014; MONTERO et al., 2014).

As estatinas têm sido utilizadas nas últimas décadas para a redução de níveis de colesterol sanguíneo, através da inibição da 3-

hidroximetil glutaril coenzima A (HMG CoA) redutase, enzima fundamental para a formação de mevalonato, um intermediário importante no metabolismo do colesterol endógeno (LEE et al., 2008; AYUKAWA et al., 2009). Estes agentes classificam-se em (1) naturais: Lovastatina;(2) quimicamente modificados: Sinvastatina e Pravastatina; e (3) derivados sintéticos: Atorvastatina, Fluvastatina e Cerivastatina (GARRET et al., 2002).

As estatinas vêm acompanhadas de efeitos benéficos secundários ou pleiotrópicos, apresentando um efeito imunomodulador na promoção da vasculogênese, e um efeito anti-inflamatório e cardioprotetor, afetando o processo de aterogênese a partir da injúria endotelial até o reparo das lesões de aterosclerose (LACOSTE et al., 1995; OZEÇ et al., 2007).

Adicionalmente, o fato das estatinas serem moléculas estáveis, facilmente sintetizadas e não suscetíveis à degradação proteolítica faz com que seu custo seja menor que a produção da BMP-2 recombinante (MUNDY et al., 1999). Estudos *in vitro*, apontam que as estatinas promovem a diferenciação osteoblástica e mineralização, mediando a expressão de vários fatores de crescimento e aumentando a produção de matriz óssea protéica (NATH et al., 2014). Tem sido reportado que as estatinas aumentam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), citocina angiogênica que induz a proliferação e diferenciação de osteoblastos através do estímulo de células endoteliais, produzindo fatores ósseo-anabólicos (OZEÇ et al., 2007; AYUKAWA et al., 2009; MONTERO et al.,2014). A forma de administração das estatinas para promover o efeito sobre o tecido ósseo deve ser considerada, pois altas doses ou administrações com elevada frequência podem causar efeitos colaterais, como uma resposta inflamatória exacerbada (GARRET et al.,2001).

A atuação da sinvastatina parece ter um papel importante na regeneração óssea, participando diretamente da ativação osteoblástica incrementando a expressão de BMP-2 e inibindo a ação osteoclástica (NYAN et al., 2007; ALAM, et al., 2009; YANG et al; 2011). Após a aplicação local, a sinvastatina incrementa marcadores osteogênicos como colágeno tipo I, sialoproteína, fosfatase alcalina e osteocalcina, efetivando a mineralização óssea (LEE et al., 2008; ENCARNAÇÃO et al., 2015). Quando aplicada em áreas de defeitos ósseos, a sinvastatina pode aumentar a formação óssea sem causar resposta no sistema imunológico e evitar dano tecidual quando associadas com um agente carreador adequado (PADIMITRIOU et al., 2015).

Estudos *in vivo* apontam que a administração sistêmica da

sinvastatina pode estimular a formação óssea ao redor da superfície de implantes de titânio (AYUKAWA et al., 2010). No entanto, ao sofrer metabolização hepática, pode haver uma concentração insuficiente no local para estimular a osteogênese, o que leva à necessidade de doses maiores de administração (YANG et al., 2011). Diferentemente, uma administração local da sinvastatina não sofre o metabolismo de primeira passagem no fígado, o que pode favorecer uma maior atividade osteoblástica e contato osso-implante (MORIYAWA et al., 2008). Entretanto, a aplicação local ao redor da superfície leva a uma rápida liberação, fazendo com que seja necessário e favorável a utilização de um agente carreador (FANG et al., 2015).

Devido às razões apontadas, a sinvastatina e os fatores de crescimento requerem um veículo adequado para controlar sua liberação gradual, aumentando sua eficiência no tecido esquelético. Estudos *in vitro* e *in vivo* que testaram o efeito local de sinvastatina aplicada na superfície de implantes dentários usando oxidação anódica (WALTERS et al., 2014), agentes biomiméticos como o fosfato de cálcio (ZHAO et al., 2014) e hidroxiapatita (TAO et al., 2015) influenciaram positivamente na diferenciação de células osteoblásticas e no contato osso-implante.

Assim, torna-se evidente que pode existir um efeito osteoindutor superior da sinvastatina se esta estiver associada a um veículo que não interfira com o processo de liberação (FERREIRA et al., 2015). A liberação de um fármaco na interface osso-implante objetiva a chegada no local de ação em uma concentração terapêutica sem causar efeitos adversos sistêmicos (XIAO et al., 2014).

Considerando que o avanço no desenvolvimento dos sistemas de liberação dependem da seleção apropriada de um agente capaz de controlar a liberação do fármaco, sustentando sua ação terapêutica ao longo do tempo e ao nível de um determinado órgão ou tecido, a utilização de sistemas matriciais constituídos por polímeros torna-se uma opção promissora para tal função (LOPEZ et al., 2005).

A classificação dos sistemas matriciais leva em consideração diversos critérios como a estrutura da matriz, a cinética de liberação, o mecanismo para controlar a liberação, a natureza química e as propriedades do material utilizado (LOPEZ et al., 2005). Os mecanismos que controlam a liberação controlada de um fármaco são a difusão, o intumescimento e a erosão (SIEPMANN & PEPPAS et al., 2001). Nos sistemas controlados por difusão, o composto ativo pode ser liberado após sua dissolução, nos canais das micropartículas preenchidos por água ou através da estrutura polimérica (SANS DRAP & MOËS, 1997).

Nos sistemas controlados por intumescimento, o polímero quando entra em contato com a água intumescce, ou seja, suas regiões mais externas começam a inchar, permitindo que a substância ativa seja liberada por difusão (LANGER, 1990). Já, nos sistemas controlados por erosão, o composto ativo é liberado após a degradação e erosão da matriz polimérica (SANS DRAP & MOËS, 1997). Na área médica, polímeros biorreabsorvíveis têm sido utilizados na liberação controlada de drogas devido à sua versatilidade e eficácia, proporcionando, por um longo período de tempo, efeitos terapêuticos no local de ação, que só poderiam ser alcançados após múltiplas administrações pelos métodos convencionais (LOPEZ et al., 2005; GRANJEIRO et al., 2011).

O copolímero de PLGA tem sido utilizado clinicamente, no campo da ortopedia, como um dispositivo para a fixação de fraturas, como suporte para crescimento celular e dispositivo para liberação controlada de fármacos (SON et al., 2013; XIAO et al., 2014; YOO et al., 2015). Quando utilizado para a liberação de biomoléculas ou agentes terapêuticos, as taxas de liberação podem ser moduladas até vários meses (SON et al., 2013).

O poliéster de PLGA é um copolímero linear, formado pela polimerização dos monômeros de ácido polilático (PLA), que contém um carbono assimétrico na forma D ou L em termos estereoquímicos, e de ácido poliglicólico (PGA) (MAKADIA et al., 2011). Uma das vantagens do copolímero PLGA sobre outros polímeros bioreabsorvíveis, é o fato da necessidade de um tempo mais curto para sua completa degradação, o que implica em menores reações adversas quando fragmentos cristalinos são liberados de polímeros com tempos de degradação maiores (COELHO et al., 2015). A degradação por hidrólise de suas ligações ésteres, origina produtos na forma de oligômeros e monômeros solúveis não tóxicos, que após sofrerem ação metabólica do organismo, são transformados em CO_2 e H_2O (AMBROSE et al., 2004).

O PLGA tem sido estudado na engenharia de tecidos devido as suas excelentes propriedades físico-químicas e biológicas, biocompatibilidade, fácil absorção, controle de sua macro e microestrutura, incorporação e liberação de proteínas com substantividade (LANSMAN et al., 2006). No que diz respeito a área periodontal e implantológica, o PLGA tem mostrado resultados promissores na confecção de arcabouços, películas, membranas, micropartículas ou nanopartículas (VIRLAN et al., 2015); contudo, uma das falhas deste copolímero é a ausência de bioatividade intrínseca sobre células ósseas. Assim, este biomaterial necessita ser combinado com outros materiais para melhorar suas características de biocompatibilidade

(SADIASA et al.,2013). Diferentes técnicas para o revestimento de biomateriais e liberação de drogas tem sido relatados na literatura (BENOIT et al., 1997; WILDEMANN et al., 2004). Considerando que os materiais metálicos, como o titânio, utilizado para a confecção dos implantes dentários, são bioinertes e não biativos, um procedimento simplificado para a biofuncionalização dos mesmos é o revestimento por imersão, ou *dip coating* (STROBEL et al., 2011). Este processo, que é utilizado em um disco, cilindro ou objeto de forma irregular, envolve a inversão do substrato em uma solução por um tempo determinado, assegurando que o mesmo esteja completamente molhado, para então ser retirado da solução de banho (YIMSIRI et al 2006.; FANG et al., 2008).

Frente aos resultados promissores que diversos pesquisadores vêm observando com novas formas de recobrimentos para a biofuncionalização de metais como o titânio. Propõe-se, neste estudo *in vitro*, a utilização da sinvastatina incorporada ao PLGA na superfície de discos de titânio, visando obter uma liberação lenta e gradual do fármaco, gerando assim uma maior eficácia terapêutica no local de ação, bem como conduzir a caracterização topográfica e físico-química do material de revestimento.

2OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de liberação da sinvastatina associada ao PLGA na superfície de titânio e identificar as características topográficas e físico-químicas presentes no revestimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Analisar a cinética de liberação da sinvastatina no copolímero de PLGA;
- 2.2.2 Investigar as características físico-químicas da sinvastatina, PLGA e sinvastatina+PLGA;
- 2.2.3 Avaliar alterações topográficas e de rugosidade na superfície de revestimento de copolímero com sinvastatina.

CAPÍTULO II

ARTIGO EM PORTUGUÊS

ANÁLISE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA SINVASTATINA ASSOCIADA AO PLGA NA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

Gustavo Javier Salazar Littuma *

Daiane Danzilago **

Aguedo Aragones***

Carmen Maria Olivera Müller****

Ariadne Cristiane Cabral da Cruz*****

Ricardo de Souza Magini *****

*Mestrando em Implantodontia na Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC-Florianópolis-SC- Brasil.(xaviersl_24@hotmail.com)

**Mestrando em Implantodontia na Univesidade Federal de Santa Catarina- UFSC- Florianópolis- SC- Brasil.(daiaanzilaggo@gmail.com)

***Diretor e Pesquisador do Biocentro- Florianópolis- SC- Brasil.(aguedo@terra.com.br)

****Professora Doutora do Departamento de Ciências e Tecnologia dos Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC- Florianópolis-SC-Brasil.(carmenmull@gmail.com)

*****Professora Doutora do Departamento de Odontologia na Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC-Florianópolis-SC- Brasil.(ariadnecruz@hotmail.com)

*****Professor Titular do Departamento de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC- Florianópolis- SC- Brasil.(Ricardo.magini@gmail.com)

Endereço para correspondência:

Prof. Ricardo de Souza Magini, DMD, MSc

E-mail: ricardo.magini@gmail.com

Centro de Pesquisa sobre Implantes Dentários (CEPID)

Departamento de Odontologia

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Florianópolis / SC

88040-900, Brasil

Telefone: +55 48 37219077

RESUMO

Objetivo: Avaliar o perfil de liberação da sinvastatina associada ao PLGA (ácido polilático-co-glicólico), os quais formaram um filme de revestimento sobre a superfície de discos de titânio, e identificar as características topográficas, físicas e químicas presentes neste revestimento

Materiais e métodos: Através da técnica de revestimento por imersão, discos de titânio com PLGA e sinvastatina foram imersos em PBS com a finalidade de avaliar a cinética de liberação da sinvastatina. Utilizou-se um modelo de ajuste matemático para conhecer o mecanismo de transferência de massa da sinvastatina. A caracterização físico-química do PLGA associado à sinvastatina foi avaliada por FTIR e DSC, enquanto a caracterização do revestimento sobre o titânio foi caracterizado por (MEV), microscopia de força atômica (AFM) e a rugosidade média da superfície (Ra) por perfilometria. **Resultados:** Foi observada uma liberação lenta e prolongada da sinvastatina em PBS, alcançando um 21,31% em 25 dias. Verificou-se que o mecanismo que controla a transferência de massa da sinvastatina é difusional e também que existiu uma incorporação da sinvastatina dentro do polímero, houve a presença de uma superfície de revestimento uniforme inicial que foi mudando ao final dos 25 dias de imersão por causa das características de erosão do PLGA. Observando os resultados dos valores do teste de Levene quadrático para variância e teste t bilateral, que foram aplicados sobre os resultados de perfilometria, não houve evidências para dizer que os desvios-padrões de Ra e média amostral de Ra entre o Grupo de PLGA e Sinvastatina+PLGA foram diferentes. **Conclusão:** A liberação da sinvastatina através do PLGA na superfície de titânio foi lenta e prolongada, o que permite considerar a utilização destes agentes como revestimento terapêutico em implantes dentários

Palavras-chave: Liberação controlada de droga, difusão, polímero, implante dentário

RELEVÂNCIA CLÍNICA

A implantologia atual está numa constante busca de novos tratamentos de superfície e recobrimentos que possam química, mecânica e biologicamente melhorar seu desempenho funcional na interfase osso-implante e suprir terapêuticamente as necessidades dos pacientes com deficiências na quantidade e qualidade óssea. Considerando que fármacos como a sinvastatina tem impacto na adesão de proteínas e processos celulares que promovem a osteogênese, é relevante realizar um estudo que permita a futura implementação de agentes osteoindutores na superfície do titânio que consigam ser liberados gradualmente através de carreadores biocompatíveis como o PLGA favorecendo assim o processo de osseointegração.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de implantes endósseos para a reabilitação de pacientes parcial e totalmente edêntulos tem permitido melhorar a função mastigatória e a qualidade de vida (BUSER et al., 2017). Embora as altas taxas de sucesso envolvendo a reabilitação suportada por implantes osseointegráveis tenham consolidado esta modalidade de tratamento, a procura pela otimização da resposta implante-hospedeiro imediata e a longo prazo é um fator de contínua investigação (GRANJEIRO, 2011). Considerando que a utilização do titânio na área da implantodontia depende de uma íntima interação entre a superfície do implante e as células teciduais, várias estratégias têm sido desenvolvidas criando superfícies favoráveis a nível celular de forma a acelerar o processo de osseointegração (CHEN et al., 2013).

A funcionalização dos implantes a partir de métodos bioquímicos tem como objetivo principal imobilizar proteínas, enzimas ou peptídeos nos biomateriais, induzindo uma resposta tissular e celular específica, a fim de controlar a interface osso-implante (PULEO&NANCI, 1999; BAUER et al., 2009).

As estatinas têm sido utilizadas na última década para a regulação dos níveis de colesterol endógeno através da inibição da 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG CoA) redutase (LEE et al., 2008; AYUKAWA et al., 2009). Adicionalmente, as estatinas têm efeito pleiotrópico na promoção da vasculogênese, ação imunomoduladora e anti-inflamatória (LACOSTE et al., 1995; OZEC et al., 2007). Estatinas lipofílicas, como a sinvastatina, têm apresentado potencial osteoindutor, promovendo a diferenciação dos osteoblastos causada pela estimulação de proteína morfogenética óssea (BMP-2) (NYAN et al., 2007; YANG et al., 2011).

Após a aplicação local, a sinvastatina aumenta marcadores osteogênicos como colágeno tipo I, sialoproteína, fosfatase alcalina e osteocalcina, efetivando a mineralização óssea (LEE et al., 2008; ENCARNAÇÃO et al., 2015). Quando aplicada em áreas de defeitos ósseos, a sinvastatina pode aumentar a formação óssea sem causar resposta no sistema imunológico e evitar dano tecidual quando associadas a um agente carreador adequado (PADIMITRIOU et al., 2015).

Estudos *in vivo* apontam que a administração sistêmica da sinvastatina pode estimular a formação óssea ao redor da superfície de implantes de titânio (AYUKAWA et al., 2010). No entanto, ao sofrer

metabolização hepática, pode haver uma concentração insuficiente no local para estimular a osteogênese, o que leva à necessidade de doses maiores de administração (YANG et al., 2011). Diferentemente, uma administração local da sinvastatina não sofre o metabolismo de primeira passagem no fígado, o que pode favorecer uma maior atividade osteoblástica e contato osso-implante (MORIYAWA et al., 2008). Entretanto, a aplicação local ao redor da superfície leva a uma rápida liberação, fazendo com que seja necessário e favorável a utilização de um agente carreador (FANG et al., 2015).

Considerando que o avanço no desenvolvimento dos sistemas de liberação dependem da seleção apropriada de um agente com capacidade de controlar a liberação do fármaco, sustentando sua ação terapêutica ao longo do tempo e ao nível de um determinado órgão ou tecido, a utilização de sistemas matriciais constituídos por diversos polímeros torna-se uma opção promissora para tal função (LOPEZ et al., 2005).

Copolímeros como o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) têm sido estudados como arcabouços ou veículos de liberação de fármacos, em função das suas propriedades físico-químicas e biológicas, assim como pela incorporação e liberação de proteínas com substantividade (LANSMAN et al., 2006). Uma das vantagens do PLGA sobre outros polímeros biorreabsorvíveis é que este precisa de um tempo mais curto para sua completa degradação, implicando em menores reações adversas, diferentemente de quando fragmentos cristalinos são liberados por polímeros com tempos de degradação maiores (COELHO et al., 2015). Considerando que os materiais metálicos, como o titânio, utilizado para a confecção dos implantes dentários, são bioinertes e não biativos, um procedimento simplificado para a biofuncionalização dos mesmos é o revestimento por imersão, ou *dip coating* (STROBEL et al., 2011). O método envolve a inversão do substrato em uma solução por um tempo determinado, assegurando que o mesmo esteja completamente molhado, para então ser retirado da solução de banho (YIMSIRI et al., 2006; FANG et al., 2008).

Frente aos resultados promissores que diversos pesquisadores vêm observando com novas formas de recobrimentos para a biofuncionalização de metais como o titânio, propõe-se neste estudo o recobrimento da superfície de discos de titânio em PLGA bem como a análise de liberação *in vitro* da sinvastatina seguida da caracterização topográfica e físico-química dos discos revestidos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo dos discos de titânio

Neste estudo foram utilizados discos de titânio grau 4 (Acnis, São Paulo, Brasil) de 8mm de diâmetro por 3mm de espessura. Os discos foram seccionados utilizando uma máquina de corte de precisão (Isomed1000, Instrumental Brasil, São Paulo, Brasil) e, posteriormente, lixados com lixas de carbeto de silício entre 400 e 1200 *Mesh*. A limpeza da superfície foi realizada sucessivamente durante e após o lixamento sob imersão em álcool isopropílico absoluto (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 minutos, e 10 minutos em água destilada sob ultrassom. Após o preparo dos discos, as amostras foram distribuídas em três grupos, a saber Grupo 0: Titânio; Grupo 1: PLGA e Grupo 2: SIN+PLGA.

2.2 Preparo do copolímero

Pela técnica de evaporação de solvente, em um *Becker*, o copolímero de poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) (Resomer, Evonik Ind., Essen, Alemanha), na proporção 82/18 (m:m) Lático/Glicólico, foi dissolvido em clorofórmio (CHCl_3 – Synth – LabSynth, Diadema, Brasil) (5% m/v) (500mg em 10ml) em temperatura ambiente, sob agitador magnético (Nova Ética, São Paulo, Brasil) para sua total dissolução. A solução permaneceu em agitação por 3 horas. Após a dissolução completa do PLGA, a sinvastina (SIN) (Sinvastatin, PHR 1438-1G, Fluka, Sigma-Aldrich, Brasil) foi diluída nessa solução em uma concentração de 10% em relação a massa do polímero (m:m). A solução ficou em agitação por 5 a 10 minutos sendo utilizada no prazo de 24h após a sua preparação.

2.3 Tratamento dos discos de titânio com PLGA e SIN+PLGA

Para a análise de liberação, topografia de superfície e rugosidade média, foram preparados 10ml de solução de PLGA, separando nos Grupo 1 e Grupo 2 o mesmo volume de solução em cada *becker*. O Grupo 2 recebeu 25mg de SIN correspondente aos 10% (m:m) de polímero. Após a dissolução da sinvastatina na solução, os discos foram submersos por *dip coating* por 2 segundos e retirados até a total eliminação do excesso por gotejamento e pesados para registrar o

peso inicial utilizando uma balança analítica(Radwag,Valbom,Portugal). Posteriormente realizou-se a evaporação do solvente por 24 horas. O Grupo 1 com PLGA seguiu a mesma técnica, sem a adição de sinvastatina, entretanto.

2.4 Quantificação de Sinvastatina em discos de titânio

Para a quantificação da sinvastatina foi utilizado espectrofotômetro UV-vis (Agilent Cary,Melbourne, Australia) a um comprimento de onda de 238nm. Após o revestimento dos discos, no Grupo 2 foi avaliado a quantidade de fármaco presente no disco. O teste foi realizado em quadruplicata e cada disco foi submerso em 20ml de acetonitrila e mantido em ultrassom por 30 minutos e, posteriormente, quantificados por espectrofotômetro UV-vis em 238nm.

2.5 Análise de liberação de Sinvastatina

A liberação da sinvastatina foi avaliada utilizando 4 discos do Grupo 2. Os mesmos ficaram submersos em 20ml de Solução Salina Tamponada (PBS), pH7,4 a 37°C sob agitação constante de 30 rpm por 600 horas. Em intervalos de tempo distintos, 3ml de amostra foi coletada, quantificada e devolvida ao *erlenmeyer* ao final de cada leitura. O pH do meio foi controlado para verificação de possíveis alterações.Os resultados foram expressos da seguinte maneira:

$$\% \text{ liberação SIN} = \frac{\text{Concentração de SIN liberada} \times 100}{\text{Total de SIN incorporado ao disco de Titânio}}$$

2.6 Aplicação de modelo matemático para liberação de Sinvastatina

Os dados de liberação da sinvastatina, foram estudados usando um modelo matemático, auxiliando assim na compreensão dos mecanismos de transferência de massa. O modelo utilizado neste estudo foi a lei da potência descrita por Ridger & Peppas. O programa Statistica 10.0(Quest Inc,Oklahoma,USA) foi empregado seguindo um ajuste não linear com 95% de intervalo de confiança.

2.7 Análise das propriedades físico-químicas do PLGA e SIN+PLGA

2.7.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho modificada por Fourier (FTIR)

O espectro de absorção na região no infravermelho das amostras foi feito com um espectrômetro FTIR modelo (Agilent, Cary 660, Melbourne, Australia) com um acessório de refletância total atenuada horizontal (ZnSe). As amostras foram colocadas diretamente sobre o cristal e a média de 20 varreduras dentro de um intervalo de 4000 - 650 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} foram captadas.

2.7.2 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A caracterização térmica do copolímero PLGA, a sinvastatina e a associação SIN+PLGA foi realizada utilizando o método de calorimetria diferencial exploratória (DSC) no equipamento (Jade-PerkinElmer, Massachusetts, USA). Para a caracterização da sinvastatina, utilizou-se 2,2mg, fazendo a corrida de aquecimento numa temperatura de -20°C a 200°C a uma taxa de aquecimento de 20°C/min, utilizando um cadinho de alumínio e vazão de gás de nitrogênio de 20ml/min. Para a caracterização do polímero, utilizou-se 10mg de PLGA, fazendo três corridas, as duas primeiras de aquecimento e esfriamento de -20°C a 200°C, numa taxa de aquecimento de 20°C/min, a fim de apagar a história térmica do material, e uma terceira corrida de -20°C a 200°C. O cadinho utilizado foi de alumínio e vazão de nitrogênio de 20ml/min. Para a SIN+PLGA, utilizou-se mesmo procedimento e taxa de aquecimento do PLGA.

2.7.3 Análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV)

A análise da topografia de superfície dos Grupos 0, 1 e 2 foi avaliada no seu estado seco e no Grupo 2 após 25 dias de imersão em PBS a 37°C, utilizando-se o microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (JEOL JMS-6390 LV Scanning Electron Microscope, Massachusetts, USA). As amostras secas foram levadas ao aparelho metalizador para recobrimento com ouro de 300 Å. Os espécimes foram examinados ao microscópio eletrônico de varredura, operando com 10 kV. Cada amostra foi fotografada em 2 campos distintos com aumentos de 100x e 300x.

2.7.4 Análise de Topografia de Superfície por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A topografia dos discos do Grupo 1 e Grupo 2 foi avaliada usando um equipamento modelo (Nanosurf FlexAFM, Suíça), operando em modo intermitente (Tapping mode), usando uma ponta modelo TAP190AI-G, com raio menor de 10nm, frequência de ressonância de 190 kHz, constante de mola de 48N/m e velocidade de varredura de 1 linha/s. As imagens obtidas foram tratadas usando o programa WSxM.

2.7.5 Perfilometria

A rugosidade de superfície foi determinada por meio de um perfilômetro óptico (Bruker, DektakXT, EUA). Três discos do Grupo 0,1 e 2 foram posicionados individualmente no centro do equipamento e os valores de Ra (média aritmética da rugosidade de superfície) foram mensurados usando um *cutoff* de 524 μ m em um tempo corrido de 12 segundos. Três leituras foram feitas, percorridas por uma agulha de diamante de 2 μ m sobre cada superfície e o Ra foi calculado.

2.7.6 Análise Estatística

Foi realizada uma análise de inferência estatística com testes paramétricos para realizar observações sobre os valores de rugosidade média coletados nos Grupos 1 e 2, e uma análise descritiva das observações referentes às médias de Ra dos discos de todos os grupos estudados. Os resultados foram apresentados em função da média e desvio amostral. Utilizando o teste Levene –quadrático para a variância, com nível de significância $\alpha = 5\%$, e o teste t bilateral para média amostral, para verificar se houve diferença significativa entre os Grupos 1 e 2. A associação entre variáveis foram feitas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. O programa Matlab (MatworksInc, Massachusetts, USA) foi empregado na análise estatística.

3. RESULTADOS

3.1 Liberação da Sinvastatina

A porcentagem de liberação da sinvastatina em PBS foi lenta e contínua nos 4 discos. Houve uma maior liberação de sinvastatina a partir do terceiro dia, atingindo 21,31% após as 600 horas analisadas. Durante o tempo experimental, a curva de liberação apresentou um comportamento crescente proporcional em todas as amostras, não havendo variações de pH no meio PBS até o final do experimento. Ao serem pesados novamente os discos do Grupo 2 após 600 horas, houve uma aumento do peso dos 4 discos, o que é atribuído ao ingresso de água dentro da matriz polimérica.

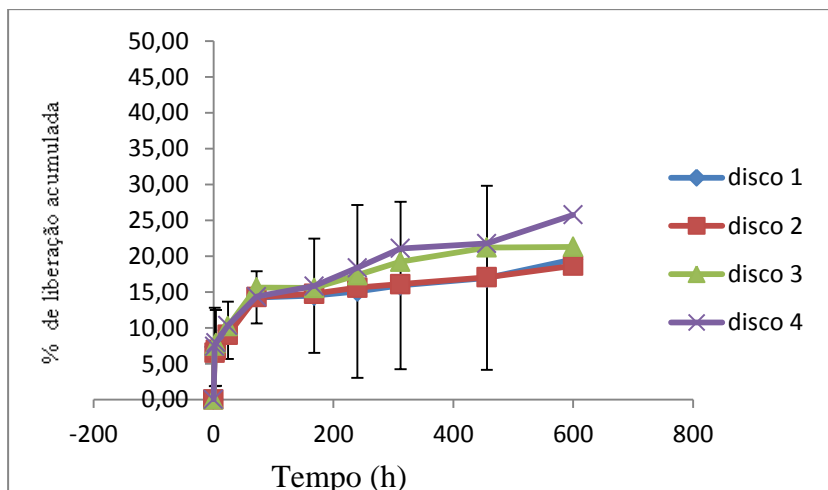


Figura 1. Perfil de liberação acumulada da SIN em função do tempo a partir do PLGA nos discos de Titânio a 37°C em PBS sob agitação.

Neste estudo o modelo de ajuste foi a lei da potência de Ridger & Peppas, representado por:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$$

Este modelo descreve três formas de liberação do fármaco, (1) puramente difusional ou Fickiana ($n=0,5$), (2) transporte Caso II ($n = 1$), o qual é controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas, e (3)

anômalo (n entre 0,5 e 1), quando existe uma combinação dos sistemas 1 e 2 (RITGER & PEPPAS, 1986).

Na equação, M_t representa a quantidade absoluta do fármaco liberado no tempo t e M_∞ a quantidade total do fármaco incorporado ao sistema polimérico, k é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas do sistema, e n corresponde ao expoente de liberação, usado para interpretar e caracterizar o mecanismo de liberação de acordo ao valor numérico que apresenta.

Ao obter um valor de $n < 0,5$ em todos os discos, mostrou que o mecanismo de transporte da sinvastatina é puramente difusional. Comprova-se que este modelo se ajustou satisfatoriamente aos dados experimentais, já que apresentou coeficientes de correlação acima de 0,98 e os resíduos não apresentaram tendências. A curva da liberação M_t/M_∞ da sinvastatina nos discos do Grupo 2 em função do tempo é mostrada na Figura 2, a mesma que apresenta uma regressão linear próxima de 1.

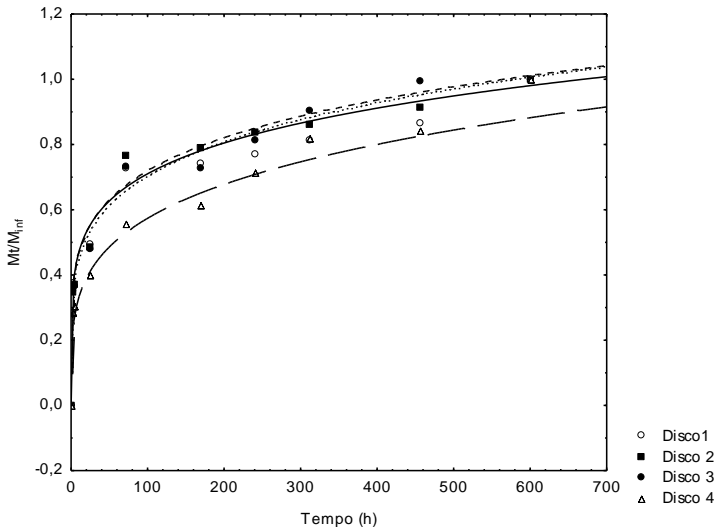


Figura 2. Curva de liberação da SIN em função do tempo nos discos do Grupo 2 ajustadas ao modelo de Ritger & Peppas

3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho modificada por Fourier (FTIR)

Na Figura 5, o espectro FTIR do PLGA, SIN e SIN+PLGA foram identificados. A presença de bandas de absorção características dos grupos funcionais do PLGA mostraram picos correspondentes a grupos $\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}$ (2917cm^{-1}), $\text{C}=\text{O}$ (1737cm^{-1}) e $\text{C}-\text{O}$ (1361cm^{-1}). O espectro FTIR da SIN mostrou picos correspondentes a grupos OH (3542cm^{-1}), $\text{C}-\text{H}$ (2925cm^{-1}), $\text{C}=\text{O}$ (1688cm^{-1}), $\text{C}-\text{H}$ (1368cm^{-1}). No PLGA+SIN os picos foram em 2920cm^{-1} , 1743cm^{-1} , 1364cm^{-1} , respectivamente, correspondentes a grupos $\text{C}-\text{H}$, $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}-\text{O}$, com pouco deslocamento das bandas referentes ao grupos funcionais identificados nos espectros individuais, porém com supressão de algumas bandas do espectro de SIN.

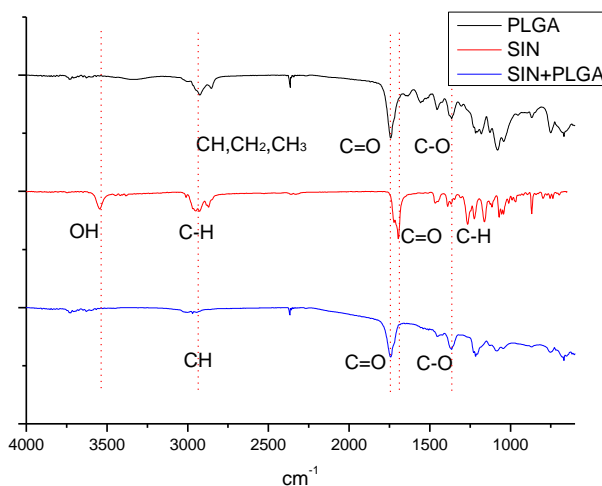


Figura 3. Espectros obtidos por FTIR do PLGA, SIN e SIN+PLGA

3.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

O comportamento térmico da SIN, PLGA e SIN+PLGA está apresentado nas Figuras 4a, 4b e 4c. Conforme pode-se observar no termograma, a SIN apresentou um pico endotérmico associado a fusão ($140,31\text{C}$) (Figura 4a). O PLGA puro apresentou uma temperatura de transição vítrea de $57,94\text{C}$ (Figura 4b). No termograma das amostras de PLGA+SIN, não se observou o pico endotérmico da SIN, apresentando

unicamente diminuição na temperatura de transição vítrea de $49,07^{\circ}\text{C}$ (Figura 4c).

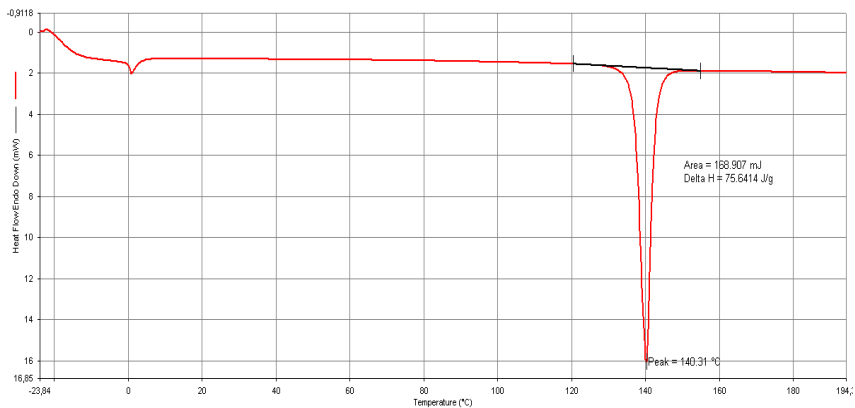


Figura 4a. Termograma DSC da SIN

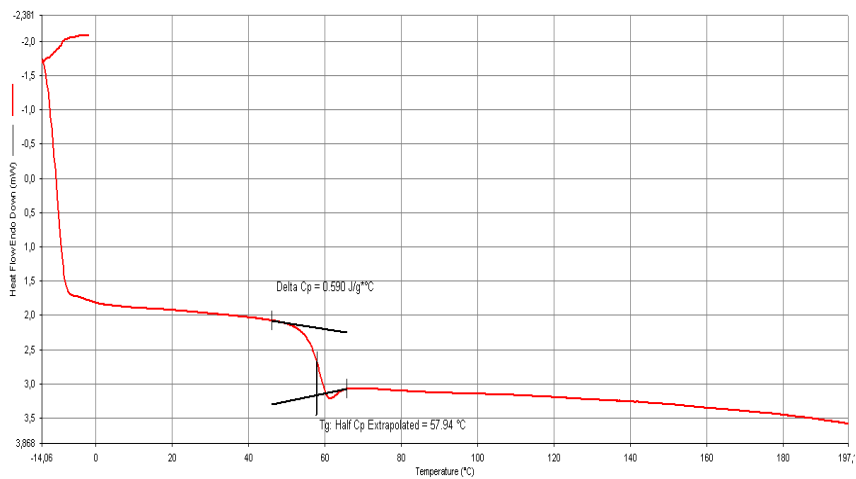


Figura 4b. Termograma DSC do PLGA

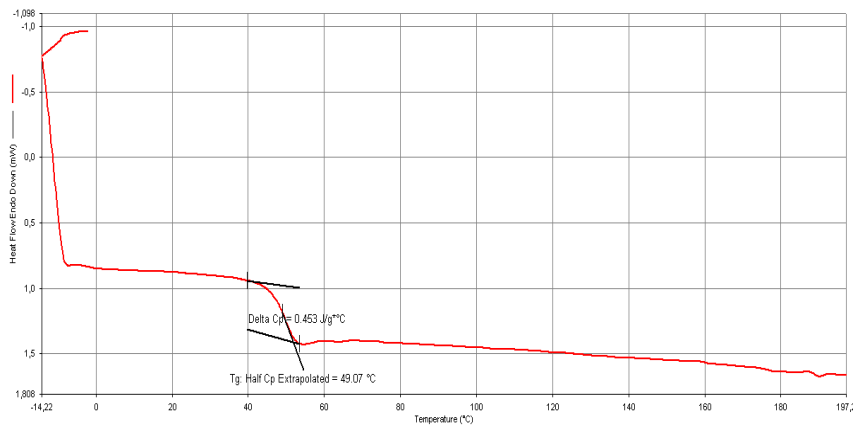


Figura 4c. Termograma DSC da SIN+PLGA

3.4 Análise de topografia de superfície pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Conforme a Figura 5, observou-se que o Grupo 0 teve uma superfície lisa (Figura 5a-b). O revestimento do Grupo 1 (Figura 5c-d) e do Grupo 2 (Figura 5e-f) apresentaram uma superfície densa com leves irregularidades, porém contínua e uniforme; já o revestimento do Grupo 2 (Figura 5g-h), após os 25 dias de imersão em PBS, apresentou uma superfície fragmentada.

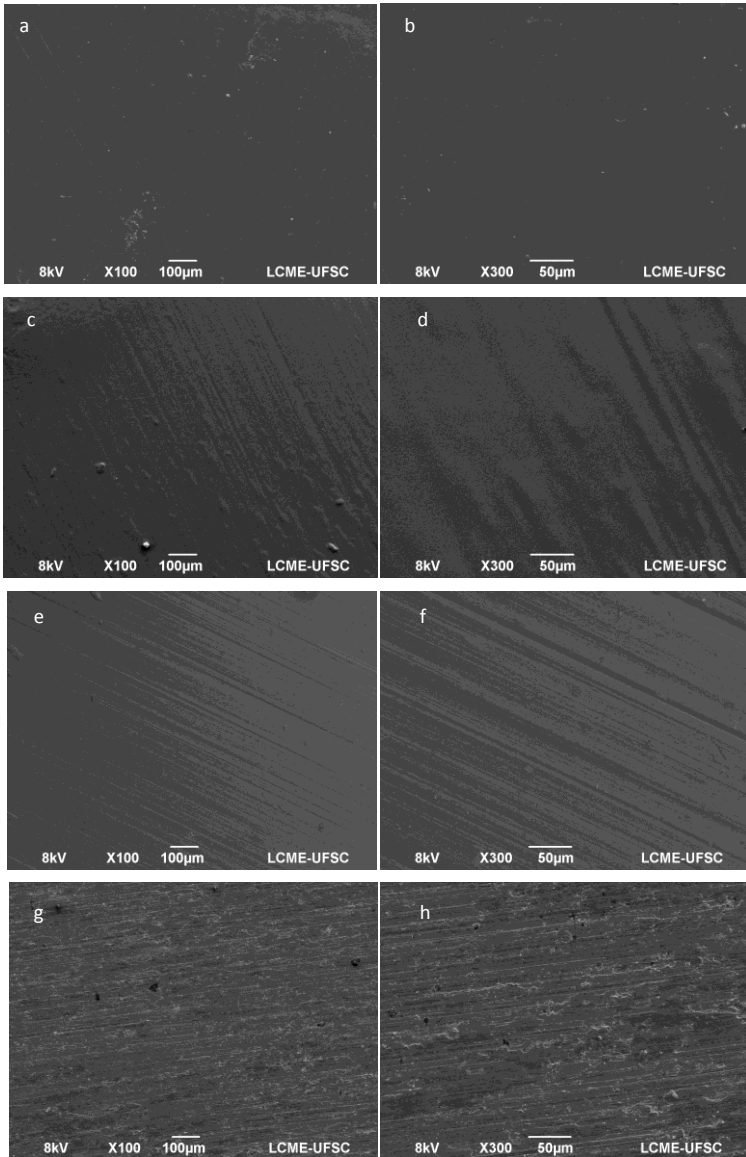


Figura 5. Imagens pelo MEV da topografia de superfície. (a) e (b) Grupo 0; (c) e (d) Grupo 1; (e) e (f) Grupo 2; (g) e (h) Grupo 2 após 25 dias de imersão em PBS a 37°C. Ampliações de 100x e 300x

3.5 Análise de topografia de superfície por microscopia de força atômica (AFM)

Conforme a figura 6, observou-se uma topografia de superfície irregular no Grupo 1 e Grupo 2, a 95 μm e 50 μm , porém o revestimento polimérico foi uniforme e homogêneo em ambos grupos.

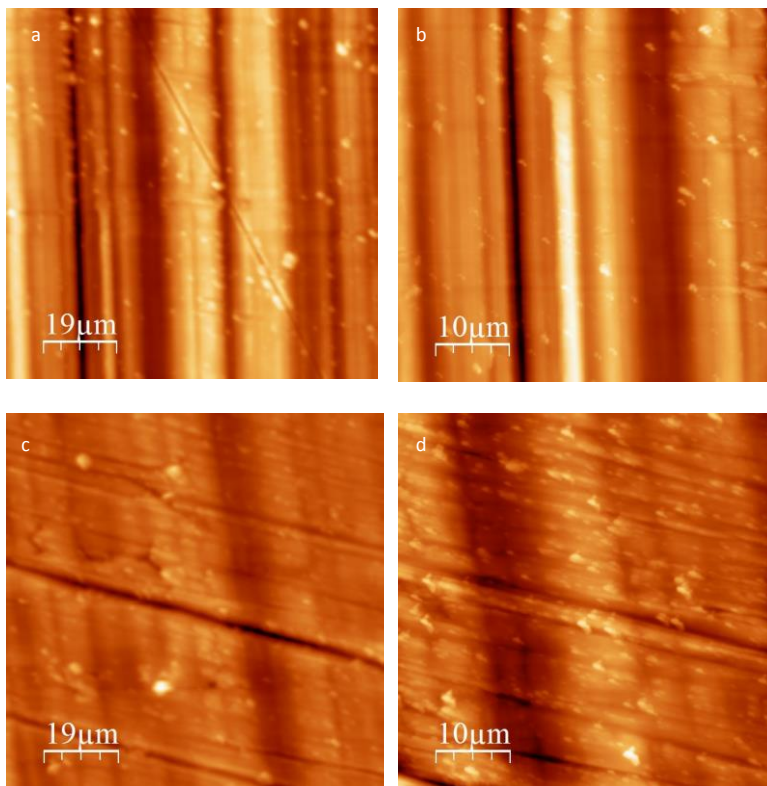


Figura 6. Imagens pelo AFM da topografia de superfície. (a) e (b) Grupo 1; (c) e (d) Grupo 2. Ampliações de 95 μm (a e c) e 50 μm (b e d).

3.6 Análise de rugosidade média por perfilometria

Ao analisar o boxplot da figura 7, observa-se que o Grupo 0, Grupo 1 e Grupo 2 apresentam medianas de R_a diferentes entre si, porém a variância da mediana do Grupo 0 e menor que a do Grupo 1 e Grupo 2.

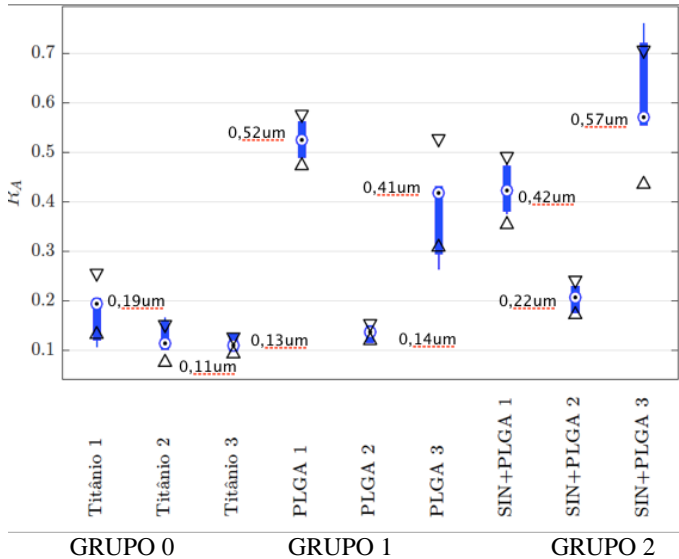


Figura 7- Boxplot das medianas de R_a para cada Grupo.

A Tabela 1 mostra os valores das médias de R_a , assim como a média amostral e desvio-padrão para cada Grupo.

	Grupo 0		Grupo 1		Grupo 2	
	$R_a^{(0,i)}$	$\sigma^{(0,i)}$	$R_a^{(1,i)}$	$\sigma^{(1,i)}$	$R_a^{(2,i)}$	$\sigma^{(2,i)}$
Disco $i=1$	0,166333	0,051423	0,52566	0,038	0,426	0,05056
Disco $i=2$	0,12933	0,030989	0,13333	0,01289	0,20333	0,02569
Disco $i=3$	0,11566	0,013428	0,369	0,091	0,63066	0,11211
	$[\bar{x}_{(0)}; \sigma_{(0)}]$		$[\bar{x}_{(1)}; \sigma_{(1)}]$		$[\bar{x}_{(2)}; \sigma_{(2)}]$	
	(0,13711;0,0262)		(0,34266;0,1975)		(0,42;0,2137)	

Tabela 1. Médias de R_a dos três discos em triplicata ($i=1, 2, 3$) para cada Grupo, média amostral e desvio-padrão amostral para cada Grupo.

Na figura 8 e figura 9, observa-se que a média amostral de R_a e o desvio-padrão dos discos do Grupo 0, Grupos 1 e 2 são diferentes.

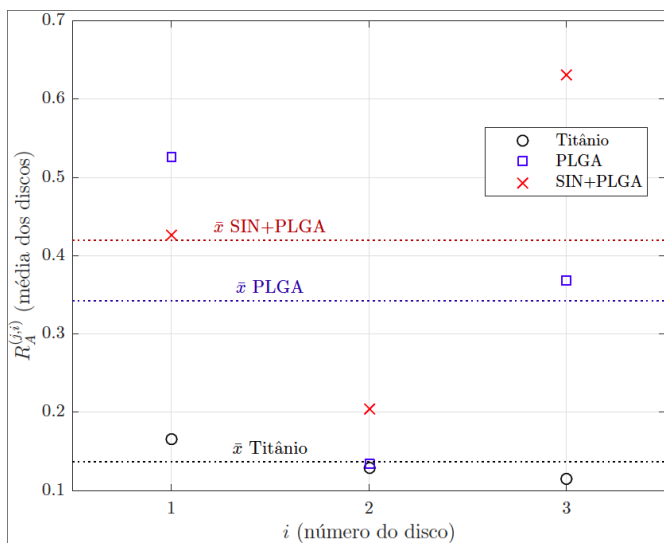


Figura 8. Médias de R_a dos três discos em triplicata ($i=1, 2, 3$) e Média amostral de R_a do Grupo 1 (0,34um) e Grupo 2 (0,42um).

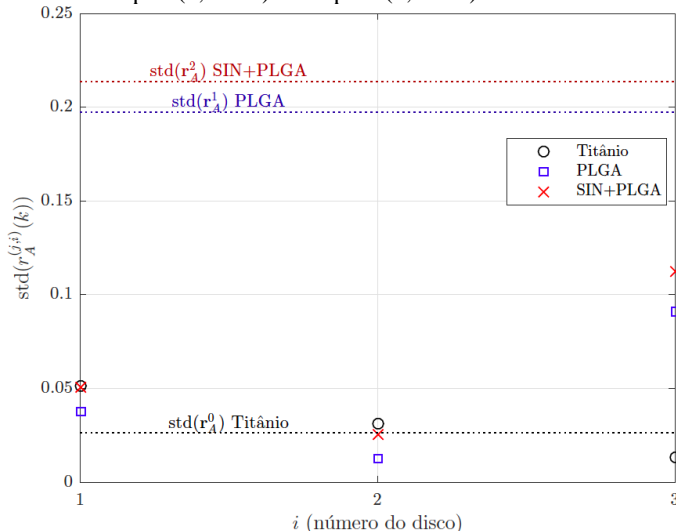


Figura 9. Desvio-padrão de R_a dos três discos em triplicata ($i=1, 2, 3$) e desvio amostral de R_a do Grupo 1 (0,1974) e Grupo 2 (0,2137)

Observando os resultados do teste de Levene para a variância do Grupo 1, denotada como σ^2_1 de 0,2137 e do Grupo 2 como σ^2_2 de 0,1974, bem como o valor de $p = 0,8349$ sendo $> \alpha (0,05)$, afirma-se que não há evidências para rejeitar a hipótese nula ($H_0 \sigma^2_1 = \sigma^2_2$), assumindo que o Grupo 1 e 2 possuem o mesmo desvio-padrão de *Ra*.

Ao realizar o teste t bilateral para comparar se há diferença estatística entre as médias de *Ra* do Grupo 1 (0,34 um) e Grupo 2 (0,42um) sendo $p = 0,6692$ e $> \alpha (0,05)$, infere-se que as rugosidades médias entre os Grupo 1 e 2 são iguais, aceitando-se a hipótese nula. Sendo o coeficiente de correlação amostral $\rho = 0,616$, verifica-se que existe uma correlação moderada entre os Grupos 1 e 2.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, observou-se que a porcentagem de liberação da sinvastatina em PBS, foi lenta em todos os discos, atingindo 21,31% após as 600 horas de análise. Considerando que o meio de PBS tem sido previamente utilizado em outros estudos para medir a dissolução e percentual de liberação da sinvastatina (ZHANG et al., 2011; WALTER et al., 2014). A liberação lenta da sinvastatina pode ser atribuída a sua baixa solubilidade em meio aquoso (JUN et al., 2007). Em trabalhos prévios como o realizado por Encarnação et al. em 2016, observou-se que ao avaliar *in vitro* a liberação da sinvastatina com 2%, 5%, e 8% em um arcabouço de PLGA e hidroxiapatita com 30 e 70% de porosidade, houve como resultado uma liberação lenta e prolongada da sinvastatina, atingindo de 2 a 4% após 40 dias de imersão em PBS. Masaeli et al. em 2016, refere que este evento de liberação lenta pode ser atribuído ao fato de que tanto a sinvastatina como o PLGA apresentam características hidrofóbicas. Segundo Costa et al. (2004), ao utilizar polímeros hidrófobos, a transferência de líquido pela matriz torna-se lenta o que leva a um tempo de latência. Neste estudo esse tempo de latência pode ter acontecido durante as primeiras horas do experimento considerando que a liberação da sinvastatina aumentou somente a partir do terceiro dia. De acordo com Shah et al. em 1991, a cinética de liberação de drogas a partir do PLGA tem um caráter bifásico, apresentando uma liberação rápida ou efeito *burst*, que pode ser atribuída a uma incompleta incorporação da droga na superfície e uma segunda fase de liberação mais lenta até o esgotamento do composto ativo. Este estudo não teve uma liberação rápida da sinvastatina durante os primeiros dias de análise, apresentando uma liberação lenta, gradual e prolongada até os 25 dias.

Durante o tempo experimental de liberação neste estudo, observou-se que não houve alterações do pH, revelando que houve estabilidade das cadeias poliméricas. Alterações dos valores de pH podem estar relacionados com a degradação do polímero ou com a difusão do fármaco para o meio aquoso (GUTIERRES et al., 1995). Uma liberação lenta e contínua de sinvastatina é uma característica fundamental para que o fármaco atue de forma regular, causando possível regeneração óssea, sem causar danos inflamatórios aos tecidos adjacentes.

Ao aplicar a lei da potência neste estudo (RIDGER & PEPPAS, 1987), uma vez que este modelo apresentou um coeficiente de correlação acima de 0,98, e os resíduos não apresentaram tendências

conservando uma distribuição aleatória, foi confirmado que o modelo utilizado se ajustou satisfatoriamente. O valor de $n < 0,5$ em todos os discos comprovou que o mecanismo de transporte da sinvastatina é puramente difusional ou seja a migração da droga acontece de uma posição inicial dentro do sistema polimérico para a superfície externa, além de um controle maior de liberação ao estar coberta pelo filme polimérico.

Na análise de FTIR, os picos característicos dos grupos funcionais do PLGA, foram observados em (2917cm^{-1}), referente a um estiramento assimétrico de grupos CH_2 , $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, picos em (1737cm^{-1}), associado a estiramento vibracional de grupos funcionais carbonila $\text{C}=\text{O}$, e picos em (1361cm^{-1}), referente a estiramento vibracional de grupos funcionais éster $\text{C}-\text{O}$. Esses resultados concordam com os descritos na literatura (NATH et al., 2014; SILVA et al., 2015).

No espectro FTIR da SIN, foram observados picos em (3542cm^{-1}), associado a grupos hidroxila, em (2925cm^{-1}) referente a um estiramento vibracional simétrico e assimétrico de $\text{C}-\text{H}$ de metila e metileno, picos em (1688cm^{-1}), associado a estiramento vibracional de grupo carbonila lactona e éster $\text{C}=\text{O}$, e picos em (1368cm^{-1}) referente a um balanço vibracional de grupos metila e metileno. Esses resultados foram similares aos descritos por (PATEL&PATEL., 2008; NATH et al., 2014; REZA et al., 2016; VARGAS, 2014).

Ao comparar as bandas da SIN+PLGA com os espectros individuais, identificou-se que houve pouco deslocamento das bandas do PLGA, evento que sugere a incorporação da SIN ao copolímero (NATH et al., 2014; PATEL&PATEL, 2008). Adicionalmente, verificou-se no espectro de SIN+PLGA uma diminuição e supressão de alguns picos. Segundo Vargas (2014), uma diminuição ou supressão das bandas em FTIR é indicativo da possível formação de um complexo entre o polímero e a sinvastatina, no qual a porção não complexada é responsável pela presença de bandas inalteradas no espectro FTIR. Isso deve ser levado em consideração já que uma parte da sinvastatina poderia estar complexada ao polímero e outra parte não porém ambas ficariam presentes dentro da matriz o que segundo Andretta et al.(2003), levaria a que o processo de erosão do polímero seja necessário para que a parte não complexada seja liberada.

A análise de DSC, mostrou que a sinvastatina apresentou um pico endotérmico associado ao ponto de fusão a $140,31^\circ\text{C}$, característico de seu estado cristalino (JUN et al., 2007), e o PLGA puro exibiu uma temperatura de transição vítrea (T_g) de $57,94^\circ\text{C}$, que caracteriza seu estado amorfo (MOTTA&DUEK, 2006). Nas amostras de SIN+PLGA,

entretanto, o pico endotérmico da sinvastatina não foi observado, sugerindo a formação de um complexo amorfo entre eles (PATEL&PATEL, 1998;VARGAS, 2014). Como resultado de esse evento sugere-se que a droga pode ter sido completamente envolvida pelo copolímero o que é reforçado também pela diminuição e supressão de bandas no espectro FTIR de amostras de SIN+PLGA.

Nas amostras de SIN +PLGA, onde houve queda na Tg, com 49,07°C, pode atribuir-se as características vítrias do polímero ao fato das cadeias terem pouca mobilidade molecular para se organizar, diferentemente do estado borrachoso, onde existe uma alta mobilidade das mesmas (FAISANT et al., 2006). No estado borrachoso, o polímero é mais permeável a água, resultando numa maior hidratação, maior liberação de droga e degradação do polímero, o que seria ao contrario com o polímero no estado vítrio acima da temperatura fisiológica corporal (WANG et al., 2000).

Por outro lado, Vey et al em 2012, descreve que uma queda na temperatura de transição vítream relação com uma alteração do comportamento conformacional dos segmentos poliméricos ricos em ácido polilático. Levando em consideração que o percentual de ácido polilático utilizado neste estudo é de 82%, predominando as características hidrofóbicas do monômero PLA em relação as do PGA, acrescentando o estado vítrio do polímero que pode levar a menor hidratação das cadeias, trazendo como resultado um maior tempo de latência para a liberação de droga e degradação polimérica (WANG et al., 2000), podemos confirmar que essa liberação lenta da sinvastatina está relacionada também as propriedades do copolímero, porém não podemos confirmar que houve uma mudança do estado vítreo para borrachoso no PLGA durante e após o tempo experimental de liberação, assimcomo perda de seu peso molecular.

As observações pelo MEV, que avaliaram a topografia da superfície do Grupo 0,1 e 2 mostraram que a superfície do Grupo 0 apresentava-se lisa eo revestimento dos Grupos 1 e 2, apresentavam leves irregularidades, porém com uma disposição uniforme e contínua. Esse resultado foi semelhante ao adquirido pelo AFM, mostrando uma superfície irregular no Grupo 1 e 2 porém apresentando uma topografia uniforme e homogênea em ambos Grupos. Quando foram observados os discos pelo MEV após 25 dias de imersão em PBS, o revestimento do Grupo 2 mostrou uma superfície fragmentada. Este resultado pode ser atribuído a um processo de erosão do PLGA, apresentando inicialmente um período sem alterações, e logo uma entrada de água na matriz, fazendo com que este processo aconteça de forma homogênea ao longo

de toda a superfície (ALEXIS et al., 2005).Esses resultado de entrada de água na matriz, podem ser confirmados pelo ganho de peso observado nos 4 discos após as 600 horas de análise em PBS, o que comprova que houve uma hidratação das cadeias poliméricas.

O teste Levene quadrático para variância e teste t bilateral, aplicados nos dados de perfilometria, mostrou que o desvio padrão e media amostral de Ra é a mesma para os Grupo 1 e 2. Ao se correlacionar esse dado com os aspectos clínicos, pode-se sugerir que a aplicação da sinvastatina +PLGA sobre a superfície de um implante de titânio, pela técnica proposita neste trabalho, pode obter um revestimento sobre o implante que seja biodegradável e com uma topografia superficial uniforme e continua, sem áreas de rugosidade. Estes aspectos podem favorecer um maior contato osso-implante, maior estabilidade implantar e maior atividade celular.

O coeficiente de correlação amostral da rugosidade mostrou uma correlação moderada entre o Grupo 1 e 2, confirmando a reprodutibilidade da técnica proposta neste trabalho, seguindo-se o mesmo tempo de deposição e a mesma velocidade de retirada do disco na solução .

Neste estudo, a utilização de uma droga pouco solúvel, como a sinvastatina em meio aquoso, fez com que sua velocidade de liberação e difusão dependesse de suas propriedades físicas, do gradiente de concentração, da geometria, e da superfície do sistema matricial (ANDREETTA et al.,2003). Porém, propriedades como a disposição, comprimento, flexibilidade e capacidade de absorção de água das cadeias poliméricas podem afeitar a taxa de difusão através da matriz e posterior liberação do fármaco (WISHKE,2008).

Ao final deste trabalho, propõe-se estudos futuros para avaliar a liberação da Sinvastatina da matriz de PLGA aplicada sobre a superfície de titânio em intervalos de tempo maiores,com a finalidade de conhecer a porcentagem máxima de liberação da sinvastatina, verificar se existem alterações fisico-químicas da droga ou do copolímero, assim como mudançasde pH, que poderiam afetar a taxa de liberação do fármaco.

5 CONCLUSÃO

Podemos concluir que neste estudo houve uma liberação lenta e controlada da sinvastatina através do PLGA na superfície de titânio, atribuída a um mecanismo de transferência de massa difusional. A presença de uma incorporação da sinvastatina ao polímero, além de uma topografia de revestimento uniforme e contínua, permite considerar a utilização destes agentes como revestimento terapêutico em implantes dentários, auxiliando na osseointegração.

REFERÊNCIAS

Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, Koyano K. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:336-42.

Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Atsuta I, Jinno Y, Kihara M, Tsukiyama Y, Koyano K. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rattibiae. *J Oral Rehabil.* 2010 ;37:123-30.

Alam S, Ueki K, Nakagawa K, Marukawa K, Hashiba Y, Yamamoto E, Seki S. Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: an immunohistochemical study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics.* 2009; 107: 22–29.

Ambrose CG, Clanton, T. O. Bioabsorbable implants: Review of clinical experience in orthopedic surgery. *Annals of Biomedical Engineering.* 2004 32: 171–177.

Andreetta H. Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de Distintos Modelos. *Lat Am. J. Pharm.* 2003;22:355-364.

Alexis F. Factors affecting the degradation and drug release mechanism of poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]. *Polym Int.* 2005;54:36-46.

Buser D, Chappuis V, Belser UC, Chen S. Implant placement post extraction in esthetic single tooth sites: when immediate, when early, when late? *Periodontol 2000.* 2017 ;73:84-102.

Bauer S, Schmuki P, Klaus VM. Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. *Progress in Material Science.* 2013;58:261-326

Benoit MA, Mousset B, Delloye C, Bouillet R, Gillard J. Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-

glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections. *Int Orthop*.1997;21(6):403-8.

Castellani C,Lindtner RA,Hausbrandt P. Bone–implant interface strength and osseointegration: Biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control.*Acta Biomaterialia*.2011;7:432-440.

Chen C, Zhang SM, Lee IS. Immobilizing bioactive molecules onto titanium implant to improve osseointegration.*Surface&Coating technology*. 2013;228: s312-s317.

Costa E, Arancibia A, Aiache J. Sistemas Matriciales.*Acta Farm. Bonaerense*. 2004;23:259-265.

Encarnação IC, Xavier CC, Bobinski F, dos Santos AR, Corrêa M, de Freitas SF, Aragonez A, Goldfeder EM, Cordeiro MM. Analysis of Bone Repair and Inflammatory Process Caused by Simvastatin Combined With PLGA+HA+ β TCP Scaffold. *Implant Dent*. 2016 ;25:140-8.

Encarnação IC. Análise das propriedades físico-químicas e mecânicas de arcabouço poroso composto de PLGA, cerâmica bifásica e simvastatina de liberação lenta para engenharia de tecido ósseo [Tese de doutorado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Odontologia. Área de concentração Implantodontia, 2016.

Fang W, Zhao S, He F, Liu L, Yang G. Influence of simvastatin-loaded implants on osseointegration in an ovariectomized animal model. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 831504.

Fang H W, Li Y, Su T, Yang T, Chang J, Lin P, Chang W. Dip coating assisted poly(lactic acid) deposition on steel surface. Film thickness affected by drag force gravity. 2008;62:3739-3741.

Faisant N, Akiki J, Siepmann F, Benoit JP, Siepmann J. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: experiment and theory. *Int J Pharm*. 2006;314:189-197.

Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques ND, Arana-Chavez VE. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *J Biomater Appl.* 2015 ;29:965-76.

Granjeiro MJ. *Biomateriais em odontologia: princípios, métodos investigativos e aplicações.* Ed cultural. São Paulo. 2011:41-55.

Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR. Statins and bone formation. *Curr Pharm Des.* 2001;7:715-36.

Garrett IR, Mundy GR. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis Research.* 2002;4: 237–240.

Guterres SS, Fessi H, Barratt G, Devissaguet JP, Puisieux F. Poly. (D,L lactide) Nanocapsules containing diclofenac: I Formulation and stability study. *International journal of pharmaceutics.* 1995; 113:57-63.

Jorge JR, Barão VA, Delben JA, Faverani LP, Queiroz TP, Assunção WG. Titanium in dentistry: historical development, state of the art and future perspectives. *J Indian Prosthodont Soc.* 2013;13:71-7.

Jun SW, Kim MS, Kim JS, Park HJ, Lee S, Woo JS, Hwang SJ. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007 ;66:413-21.

Langer R. New methods of drug delivery. *Science.* 1990 Sep 28; 249: 1527-33

Lansman, S, Paakko, P, Ryhanen, J, Kellomaki M, Waris E, Tormala, P, Waris T, Ashmmakhi N. Poly-L/D-lactide (PLDLA) fibrous implants: histological evaluation in the subcutis of experimental design. *Journal of Craniofacial Surgery.* 2006;17: 1121-28.

Lacoste L, Lam JY, Hung J, Letchacovski G, Solymoss CB, Waters D. Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation.* 1995 ;92:3172-7.

Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle, Amouriq Y. Surface treatment of titanium dental implants for rapid oseointegration. *Dental materials*. 2007;23:844-854

Lee Y, Schmid MJ, Marx DB, Beatty MW, Cullen DM, Collins ME, Reinhardt RA. The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. *Biomaterials*. 2008;29:1940-9.

Lopez CM, Lobo JM, Costa P. Formas Farmacêuticas de liberação modificada : polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005; 41: 143-154.

Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*. 2011;3:1377-97.

Montero J, Manzano G, Albaladejo A. The role of topical simvastatin on bone regeneration: A systematic review. *J Clin Exp Dent*. 2014 ;6:e286-90.

Moriyama Y, Ayukawa Y, Ogino Y, Atsuta I, Koyano K. Topical application of statin affects bone healing around implants. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:600-605.

Motta A, Duek E. Síntese, Caracterização e Degradação “in vitro” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Revista Matéria*. 2006;11:340-350.

Mundy, G, Garrett, R. Harris, S Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286: 1946-1949.

Nath SD, Linh NT, Sadiasa A, Lee BT. Encapsulation of simvastatin in PLGA microspheres loaded into hydrogel loaded BCP porous spongy scaffold as a controlled drug delivery system for bone tissue regeneration. *J Biomater Appl*. 2014;28:1151-63.

Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, Kasugai S. Bone formation with the combination of simvastatin and

calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *Journal of Pharmacological Sciences*.2007;104: 384–386.

Ozeç I, Kiliç E, Gümüş C, Göze F. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 2007; 18: 546–550.

Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*.1999;20:2311-2321.

Papadimitriou, K., Karkavelas, G., Vouros, I., Kessopoulou, E., & Konstantinidis, A. Effects of local application of simvastatin on bone regeneration in femoral bone defects in rabbit. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*.2014; 43:6–11.

Patel R, Patel M. Preparation, Characterization and Dissolution Behavior of a solid dispersion of Simvastatin with Polyethylene Glycol 4000 and Polyvinylpyrrolidone K30. *Journal of Dispersion Science and Technology*.2008;29:193-204.

Ritger P, Peppas N. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or disks. *Journal of Controlled Release*.1987;23-26.

Reza M, Tahereh S, Jafarzadeh K, Rassoul D, Mohammadreza T, Vahid R, Mehdi E. Preparation, Characterization and Evaluation of Drug Release Properties of Simvastatin-loaded PLGA Microspheres. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*.2016, 15 : 205-211.

Sansdrap P, Moës AJ. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release* 1997;43:47–58.

Shah S, Cha Y, Pitt C. Poly(glycolic acid-co-DL-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery? *Journal of Controlled Release*.1992;18:261-270.

Sadiasa A, Kim MS, Lee BT. Poly(lactide-co-glycolide acid)/biphasic calcium phosphate composite coating on a porous scaffold to deliver simvastatin for bone tissue engineering. *J Drug Target*. 2013;21:719-29

Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas N, Raschke M. Biodegradable Poly(D,L Lactide) Coating of implants for continuous Release of Growth Factors. *J Biomed Mater Res*. 2001;58:449-455.

Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; 11;48:139-57.

Silva AT, Cardoso BC, Silva ME, Freitas RF, Souza RG. Synthesis, characterization, and study of PLGA Copolymer in Vitro Degradation. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2015;6:8-19.

Son JS, Choi YA, Park EK, Kwon TY, Kim KH, Lee KB. Drug delivery from hydroxyapatite-coated titanium surfaces using biodegradable particle carriers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013 ;101:247-57.

Strobel C, Romacker A, Witascheck T, Schmidmaier G, Wildemann B. Evaluation of process parameter of an automated dip-coating. *Materials Letters*. 2011.65:3621-3624.

Trajkovski B, Petersen A, Strube P, Mehta M, Duda GN . Intra-operatively customized implant coating strategies for local and controlled drug delivery to bone. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012 ;64:1142-51.

Tao ZS, Zhou WS, Tu KK, Huang ZL, Zhou Q, Sun T, Lv YX, Cui W, Yang L. The effects of combined human parathyroid hormone (1-34) and simvastatin treatment on osseous integration of hydroxyapatite-coated titanium implants in the femur of ovariectomized rats. *Injury*. 2015;46:2164-9

Vargas MR. Dispersões sólidas de simvastatina: Preparação, Caracterização, no estado sólido utilizando técnicas emergentes e estudo de estabilidade. [Tese de

doutorado].Natal:Universidade Federal do Rio Grande do Norte,Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos.2014.

Vey E, Rodger C, Meehanb L, Booth J, Claybourn M, Miller A, Saiani A.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.2012;97:358-365.

Virlan MJ,Miricescu D,Totan A,Greabu M,Tanase C,Sabliov C,Caruntu C,Calenic. Current uses of Poly(lactic-co-glycolic acid) in the Dental Field:A Comprehensive Review. Journal of chemistry.2015; 1-12.

Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z,Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. Genes Dis. 2014 ;1:87-105.

Wang N,Wu X,Li C,Feng M. Syhthesis, characterization, biodegradation and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymer:I.Synthesis and characterization. J Biomater.Sci.Polymer Edn. 2000;11:301-318.

Walter MS, Frank MJ, Rubert M, Monjo M, Lyngstadaas SP, Haugen HJ.Simvastatin-activated implant surface promotes osteoblast differentiation invitro. J Biomater Appl. 2014 ;28:897-908.

Wildemann B, Kandziora F, Krummrey G, Palasdiess N, Haas NP, Raschke M,Schmidmaier G. Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titaniumimplants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle. J Control Release. 2004 ;95:249-56.

Wischke C,Schwendeman S.Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. International Journal of Pharmaceutics.2008; 364: 298-327.

Xiao D,Liu Q,Wang D,Xie T,Guo T,Duan K,Weng J.Room-temperature attachment of PLGA microspheres to titanium surfaces for implant-based drug release. *Appl Surface Science*.2014;309:112-118.

Yang F, Zhao SF, Zhang F,He FM, Yang GL. Simvastatin-loaded porous implant surfaces stimulate preosteoblasts differentiation: an in vitro study. *Oral SurgOral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111:551-6.

Yoo SY, Kim SK, Heo SJ,Koak JY, Lee JH, Heo JM . Biochemical Responses of Anodized Titanium Implants with a Poly(lactide-co-glycolide)/Bone Morphogenetic Protein-2 Submicron Particle Coating. Part 2: An In Vivo Study. *Int J OralMaxillofac Implants*. 2015; 30:754-60.

Yimsiri P, Mackley M.R. Spin and dip coating of light-emitting polymer solution matching experiment with modeling.*Chemical Engineering Science*.2006;61:3496-3505.

Zhao S, Wen F, He F, Liu L, Yang G. In vitro and in vivo evaluation of the osteogenic ability of implant surfaces with a local delivery of simvastatin. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29:211-20.

Zhang Y, Zhang J, Jiang T, Wang S. Inclusion of the poorly water soluble drug simvastatin in mesocellular foam nanoparticles: drug loading and release properties. *Int J Pharm* 2011;410:118–24.

CAPÍTULO III

APÊNDICE

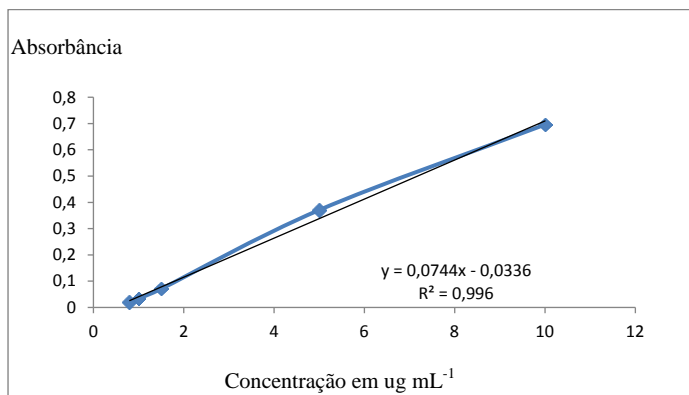


Figura 1. Curva de calibração da absorvância em função da concentração de Sinvastatina em Acetonitrila

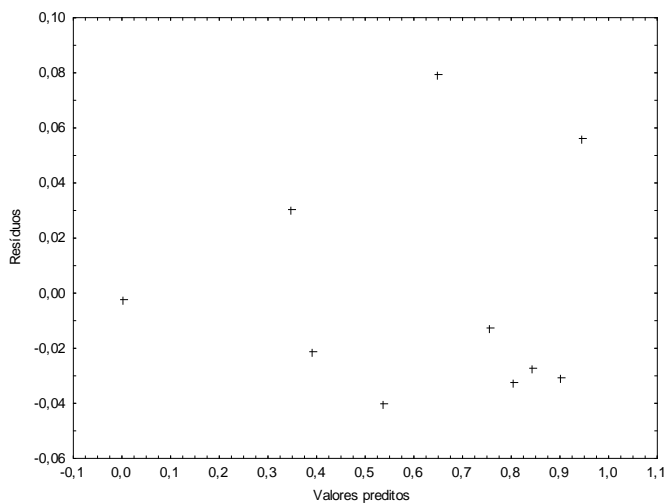


Figura 2a. Resíduos no disco # 1 do grupo 2 ajustado ao modelo de Ridger & Peppas

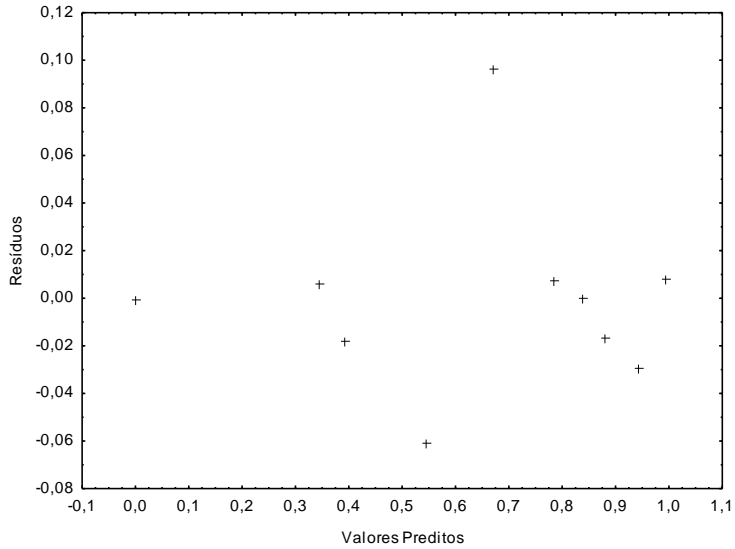


Figura 2b. Resíduos no disco #2 do grupo 2 ajustado ao modelo de Ritger & Peppas

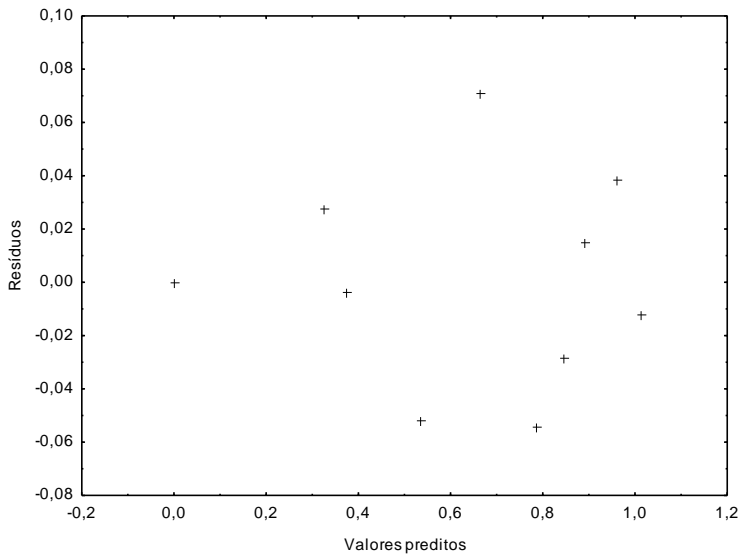


Figura 2c. Resíduos no disco# 3do Grupo 2 ajustado ao modelo de Ritger & Peppas

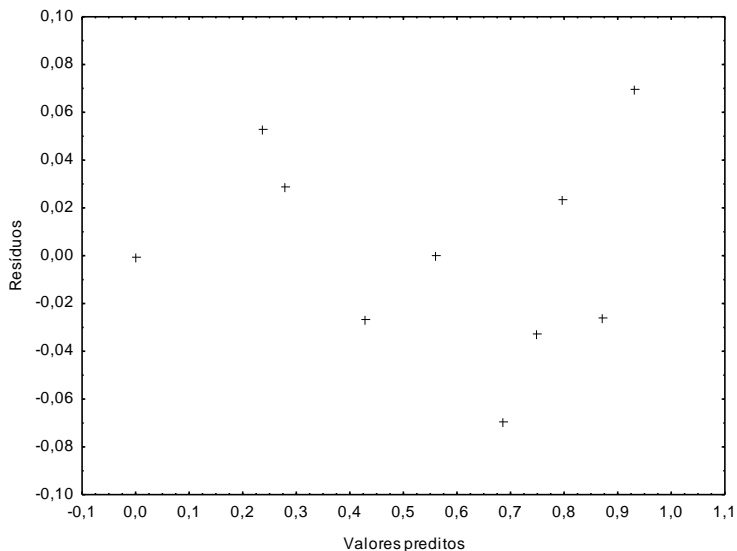


Figura 2d. Resíduos no disco#4 do Grupo 2 ajustado ao modelo de Ritger & Peppas.

Tempo (horas)	% de Liberação					
	disco 1	disco 2	disco 3	disco 4	Média	DP
0	0	0	0	0	0	0
2	7,35	6,52	7,5	7,4	7,19	0,39
4	7,21	6,95	7,86	7,9	7,48	0,41
24	9,66	9,04	10,23	10,33	9,82	0,52
72	14,24	14,28	15,63	14,36	14,63	0,58
168	14,5	14,75	15,56	15,83	15,16	0,55
240	15,07	15,62	17,34	18,37	16,6	1,32
312	15,91	16,09	19,23	21,08	18,08	2,18
456	16,97	17,05	21,21	21,76	19,25	2,25
600	19,54	18,66	21,29	25,75	21,31	2,73

Tabela 1. Porcentagem de liberação da SIN em função do tempo a partir do PLGA nos discos de titânio a 37°C em PBS sob agitação.

Peso Inicial Grupo 2 (gr)	Peso Final Grupo 2(gr)
0,6410	0,6416
0,6354	0,6360
0,6365	0,6370
0,6467	0,6471
Total 2,559gr	Total 2,5616gr

Tabela 2. Peso inicial dos discos do grupo Grupo 2 e após 25 dias de liberação de Sinvastatina em PB

Disco 1

Tempo (min)	SIN (mg)	abs	Meio (mL)	Alíq. (mL)	FD	[] $\mu\text{g/mL}$	Q (%)	pH
0	0,1376	-	-	-	-	-	0,00	-
2		0,0044	20	3	1	0,51	7,35	7,4
4		0,0037	20	3	1	0,50	7,21	7,4
24		0,0162	20	3	1	0,66	9,66	7,4
72		0,0395	20	3	1	0,98	14,24	7,4
168		0,0408	20	3	1	1,00	14,50	7,4
240		0,0437	20	3	1	1,04	15,07	7,4
312		0,048	20	3	1	1,09	15,91	7,4
456		0,0534	20	3	1	1,17	16,97	7,4
600		0,0665	20	3	1	1,34	19,54	7,4

Tabela 3 . Dados da liberação de SIN em ($\mu\text{g/ml}$ e % de liberação no disco 1 submerso em 20ml de PBS - pH7,4 a 37 °C sob agitação constante de 30 rpm por 600 horas.

Disco 2

Tempo (min)	SIN (mg)	abs	Meio (mL)	Alíq. (mL)	FD	[] $\mu\text{g/mL}$	Q (%)	pH
0	0,1376	-	-	-	-	-	0,00	-
2		0,0002	20	3	1	0,45	6,52	7,4
4		0,0024	20	3	1	0,48	6,95	7,4
24		0,013	20	3	1	0,62	9,04	7,4
72		0,0397	20	3	1	0,98	14,28	7,4
168		0,0421	20	3	1	1,01	14,75	7,4
240		0,0465	20	3	1	1,07	15,62	7,4
312		0,0489	20	3	1	1,11	16,09	7,4
456		0,0538	20	3	1	1,17	17,05	7,4
600		0,062	20	3	1	1,28	18,66	7,4

Tabela 4 . Dados da liberação de SIN em ($\mu\text{g/ml}$) e % de liberação no disco 2 submerso em 20ml de PBS - pH7,4 a 37 °C sob agitação constante de 30 rpm por 600 horas.

Disco 3

Tempo (min)	SIN (mg)	abs	Meio (mL)	Alíq. (mL)	FD	[] $\mu\text{g/mL}$	Q (%)	pH
0	0,1376	-	-	-	-	-	0,00	-
2		0,0052	20	3	1	0,52	7,50	7,4
4		0,007	20	3	1	0,54	7,86	7,4
24		0,0191	20	3	1	0,70	10,23	7,4
72		0,0466	20	3	1	1,08	15,63	7,4
168		0,0462	20	3	1	1,07	15,56	7,4
240		0,0553	20	3	1	1,19	17,34	7,4
312		0,0649	20	3	1	1,32	19,23	7,4
456		0,075	20	3	1	1,46	21,21	7,4
600		0,0754	20	3	1	1,46	21,29	7,4

Tabela 5 . Dados da liberação de SIN em ($\mu\text{g/ml}$) e % de liberação no disco 3 submerso em 20ml de PBS - pH7,4 a 37 °C sob agitação constante de 30 rpm por 600 horas.

Disco 4

Tempo (min)	SIN (mg)	abs	Meio (mL)	Alíq. (mL)	FD	[] $\mu\text{g/mL}$	Q (%)	pH
0	0,1376	-	-	-	-	-	0,00	-
2		0,0047	20	3	1	0,51	7,40	7,4
4		0,0072	20	3	1	0,54	7,90	7,4
24		0,0196	20	3	1	0,71	10,33	7,4
72		0,0401	20	3	1	0,99	14,36	7,4
168		0,0476	20	3	1	1,09	15,83	7,4
240		0,0605	20	3	1	1,26	18,37	7,4
312		0,0743	20	3	1	1,45	21,08	7,4
456		0,0778	20	3	1	1,50	21,76	7,4
600		0,0981	20	3	1	1,77	25,75	7,4

Tabela 6. Dados da liberação de SIN em ($\mu\text{g/ml}$) e % de liberação no disco 4 submerso em 20ml de PBS - pH7,4 a 37 °C sob agitação constante de 30 rpm por 600 horas.

	K	n	R^2
Disco 1	0,31	0,18	0,9905
Disco 2	0,3	0,19	0,992
Disco 3	0,28	0,2	0,9926
Disco 4	0,19	0,24	0,9903

Tabela 7. Resultados do ajuste da equação de Ridger & Peppas para liberação da Sinvastatina a partir do PLGA nos discos de titânio.

	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2
	$Ra^{(0,i)}$	$Ra^{(1,i)}$	$Ra^{(2,i)}$
Disco $i=1$	0,1070	0,5250	0,4230
	0,1940	0,5600	0,3770
	0,1980	0,4880	0,4780
Disco $i=2$	0,1090	0,1370	0,2070
	0,1140	0,1440	0,2270
	0,1650	0,1190	0,1760
Disco $i=3$	0,1060	0,4250	0,5610
	0,1310	0,4180	0,5710
	0,1100	0,2640	0,7600

Tabela 8. Medidas de Ra dos três discos em triplicata ($i=1, 2, 3$) para cada Grupo.

Grupos	N	Média amostral	Desvio Amostral
1(PLGA)	3	0,34267	0,19749
2(SIN+PLGA)	3	0,42	0,21373
Combinada	6	0,38133	0,20577
Estatística de Levene(quadrática)	0,0494 6		
Graus de Liberdade	1,4		
p-valor	0,8349		

Tabela 9. Teste para a variância $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$ com método Levene-quadrático