

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ALINE ADELAIDE PAZ DA SILVA DUARTE

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE MATRIZES POLIMÉRICAS  
BIODEGRADÁVEIS (PLGA) ASSOCIADAS COM HORMÔNIO DO  
CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE (RHGH): ESTUDO *IN VITRO*.**

Porto Alegre  
2014

ALINE ADELAIDE PAZ DA SILVA DUARTE

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE MATRIZES POLIMÉRICAS  
BIODEGRADÁVEIS (PLGA) ASSOCIADAS COM HORMÔNIO DO  
CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE (RHGH): ESTUDO *IN VITRO*.**

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

Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

Porto Alegre  
2014

### **Fontes de Catalogação (CIP)**

D812a Duarte, Aline Adelaide Paz da Silva  
Avaliação da degradação de matrizes poliméricas biodegradáveis (PLGA) associadas com hormônio do crescimento humano recombinante (RHGH): estudo in vitro / Aline Adelaide Paz da Silva Duarte. – Porto Alegre, 2014. 45 f.

Diss. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli.

1. Odontologia. 2. Hormônio do Crescimento.  
3. Materiais Biocompatíveis. 4. PLGA (Odontologia)  
I. Pagnoncelli, Rogério Miranda. II. Título.

CDD 617.695

### **Bibliotecário Responsável**

Ginamara de Oliveira Lima  
CRB 10/1204

ALINE ADELAIDE PAZ DA SILVA DUARTE

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE MATRIZES POLIMÉRICAS  
BIODEGRADÁVEIS (PLGA) ASSOCIADAS COM HORMÔNIO DO  
CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE (RHGH): ESTUDO *IN VITRO*.**

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

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2014.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli – Orientador

---

Prof. Dr. Marcos Antônio Torriani – FO/UFPel

---

Prof. Dr. Vinicius Nery Viegas – FO/PUCRS

---

Prof. Dr. João Batista B. Weber – FO/PUCRS - Suplente

Porto Alegre  
2014

À minha família,  
por serem meu alicerce e estarem sempre  
presente, apoiando e torcendo por minhas vitórias.

À minha amada mãe, Ester.  
Obrigada pela oportunidade de estudar e  
por me ajudar a concretizar esse sonho.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Deus, que está presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus familiares, obrigada por estarem sempre presente me apoiando nos momentos difíceis e me incentivando a não desistir dos meus objetivos sejam profissionais ou pessoais. Obrigada por tudo: mãe, Beto, tias e primos.

Aos meus amados irmãos: Shayane, Betinho e Giovani por toda a ajuda para conclusão dessa etapa. A colaboração de vocês foi fundamental, muito obrigada! Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli, obrigada por toda ajuda durante esse período e por permitir que eu cresça profissionalmente.

À Prof. Dra. Rosane Angélica Ligabue, obrigada pelo apoio na execução dessa pesquisa e pela disponibilização na utilização do Laboratório de Resinas e Ornametálicos (LOR/PUCRS).

Ao comandante do Posto Médico de Guarnição de Uruguaiana (PMGuU) MAJ Alberto Saraiva Tibúrcio e ao chefe da Odontoclínica do PMGuU 1º TEN Cassiano Zandonai, por me incentivarem a dar continuidade em meus estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do Magnífico Reitor Joaquim Clotet.

À Faculdade de Odontologia da PUCRS, representada pelo Diretor Prof. Dr. Alexandre Bahlis.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO): Prof. Dr. José Antônio Poli Figueiredo e Profa. Dra. Ana Spohr.

À todos os professores do PPGO/PUCRS.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação FO/PUCRS, por toda ajuda e atenção dispensada à mim e aos meus colegas.

À toda equipe do Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR – FAQUI/PUCRS), em especial às alunas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) Emanuelli e Fabiana por toda ajuda e atenção que me dedicaram durante a fase experimental dessa pesquisa.

À equipe do Instituto de Toxicologia (INTOX) da PUCRS.

Ao Prof. Dr. João Feliz Duarte Moraes e equipe da assessoria estatística da Faculdade de Matemática da PUCRS.

Aos professores do Curso de CTBMF/UFPel: Prof. Dr. Marcos Antônio Torriani e Prof. Dr. Otacílio Luiz Chagas Jr. pela amizade e pelos ensinamentos que me transmitiram durante o curso de especialização e que, sem dúvidas, foram muito importante para a conclusão dessa etapa.

Àqueles que me incentivaram a fazer o Mestrado: Profa. Dra. Marília Gehrardt de Oliveira; e as amigas Wâneza Dias Borges Hisch e Caroline Comis Giongo.

Aos colegas do PPGO/PUCRS: Ricardo Fernandes Garcia, Fernanda Boing, Alexandre Gerzson, Henrique de Oliveira, Fernando Antonini.

Aos amigos de Uruguaiana, Pelotas e Porto Alegre.

**Meus sinceros agradecimentos!**

*“Grandes realizações são possíveis quando  
se dá importância aos pequenos começos”  
Lao-Tsé*

## RESUMO

O PLGA é um polímero bioabsorvível derivado dos ácidos láctico e glicólico que tem sido usado como sistema de liberação de drogas. Uma das drogas com potencial de utilização nesse tipo de veículo é o hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH), pois apresenta vantagens como, por exemplo, acelerar o processo de osteointegração, remodelação óssea e maturação ao redor de implantes, além de estimular a osteogênese.

**Objetivo:** Este trabalho tem por objetivo avaliar a degradação de matrizes de PLGA com rhGH.

**Materiais e Métodos:** Foram utilizadas duas proporções de PLGA: 75:25 (Grupo I) e 50:50 (Grupo II). As matrizes foram confeccionadas por meio da técnica de evaporação de solventes da seguinte forma: primeiramente o PLGA foi dissolvido com diclorometano e metanol e, posteriormente, foi misturado à uma solução composta por hormônio do crescimento humano recombinante, acetato de zinco e água deionizada. A mistura dessas substâncias foi vertida em moldes de silicone de formato circular, com aproximadamente 10 mm de diâmetro, os quais foram acondicionados em uma câmara de evaporação de solvente, à temperatura ambiente, onde as matrizes foram secas por meio do arraste forçado pela ação de gás nitrogênio. As amostras controle, entretanto, foram confeccionadas apenas dissolvendo o PLGA e vertendo-o nos moldes de silicone. Após o período de secagem todas as amostras foram pesadas em uma balança de precisão. Na sequência, as matrizes foram imersas em solução tampão e realizou-se o ensaio de degradação hidrolítica, no qual as amostras permaneceram por um período de tempo pré-determinado. Terminado esse processo, a parte sólida da amostra foi seca e, novamente, pesada. O sobrenadante, então, passou pela análise de pH e pela análise de espectrofotometria de absorção UV-visível.

**Resultados:** Através da equação da reta obtida em uma curva de calibração, foi possível calcular a concentração do rhGH liberado no meio. Com isso, observou-se que, do primeiro até o último dia a concentração de rhGH liberado no meio foi maior no Grupo II. O percentual de perda de massa foi crescente ao longo tempo, em ambos os grupos. Porém essa perda de massa foi maior no Grupo I, em relação ao Grupo II. O pH apresentou pouca variação ao longo do tempo. A média ficou entre 7,5 e 7,9.

**Conclusão:** As matrizes preparadas com PLGA na proporção 50:50 apresentaram melhores resultados em relação às matrizes preparadas com PLGA 75:25. Dentre as vantagens, ressaltam-se: maior facilidade de manipulação, poros mais uniformes, menos bolhas de ar e liberação do hormônio do crescimento de forma mais lenta e gradual.

**Palavras-chave<sup>1</sup>:** Hormônio do crescimento, materiais biocompatíveis, PLGA.

---

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

## ABSTRACT

The PLGA is a bioabsorbable polymer derived from lactic and glycolic acids which has been used as drug release system. One of the drugs with the potential to use this type of vehicle is the recombinant human growth hormone (rhGH), because it has advantages such as speed up the bone integration process, bone maturation and remodeling around implants, in addition to stimulating osteogenesis.

**Objective:** This study aims to evaluate the matrix degradation of PLGA and rhGH.

**Materials and Methods:** 75:25 (Group I) and 50:50 (Group II): Two ratios of PLGA were used. The matrices were prepared by solvent evaporation technique as it follows: firstly, the PLGA was dissolved in dichloromethane and methanol and then it was mixed with a composed mixture of recombinant human growth hormone, zinc acetate, solution and deionized water. This mixture was poured into silicone circular shape moulds approximately 10 mm diameter which were placed in a solvent evaporation chamber at room temperature, where they were dried by nitrogen gas force action. The control samples were made just dissolving PLGA and pouring it into the silicone moulds. After the drying period, all the samples were weighed on a precision scale. Then, they were immersed in buffer solution and the hydrolytic degradation experiment was investigated and the samples remained for a predetermined period of time. After this process was finished, the solid sample portion was dried and weighed again. The supernatant went through pH analysis and later, by UV-visible absorption spectrophotometry analysis.

**Results:** It was possible to calculate the concentration of rhGH released in the middle through the straight line obtained in a calibration curve. We observed that, from the first to the last day the released rhGH concentration in the medium was higher in Group II. The loss of mass percentage increased over the time in both groups. But this loss of mass was higher in group I compared to Group II. The pH showed a little variation over the time. The average was between 7.5 and 7.9.

**Conclusion:** The matrices which were prepared with PLGA 50:50 showed the best results in relation to the ones prepared with PLGA 75:75. These are some advantages: easy handling, more uniform pores, less bubbles and the growth hormone was released slowly and gradually.

**Key-Words<sup>1</sup>:** Growth hormone, biocompatible materials, PLGA

---

<sup>1</sup>Medical Subject Headings (MeSH); disponível em <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Embalagem do Hormônio do Crescimento (Saizen®).....	20
Figura 2 – Agitação magnética para dissolução do PLGA.....	22
Figura 3 – Moldes de silicone.....	23
Quadro I – Divisão dos grupos.....	23
Figura 4 – Desenho esquemático da Espectrofotometria U-V visível.....	25
Figura 5 – a) Aparelho para metalização em ouro; b)Microscópio Eletrônico...26	
Gráfico 1 – Curva de Calibração.....	28
Gráfico 2 – Liberação do rhGH no Grupo I.....	29
Gráfico 3 – Liberação do rhGH no Grupo II.....	29
Gráfico 4 – Perda de massa – Grupo I.....	30
Gráfico 5 – Perda de massa – Grupo II.....	31
Gráfico 6 – Comparação da perda de massa entre os grupos.....	31
Gráfico 7 – Análise do pH.....	32
Figura 6 – MEV: Topografia das matrizes.....	33
Figura 7 – MEV: Estrutura do rhGH puro.....	34
Figura 8 – MEV: Estruturas similares ao rhGH, encontradas no interior das matrizes.....	34
Figura 9 – MEV: Matriz após 14 dias de degradação .....	35

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
LOR	Laboratório de Organometálicos e Resinas
PLGA	Poli (ácido lático-co-glicólico)
PLA	Poli (ácido lático)
PGA	Poli (ácido glicólico)
GH	Hormônio do Crescimento
rhGH	Hormônio do Crescimento Humano Recombinante
pH	Potencial hidrogeniônico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
FDA	Food and Drug Administration
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido
r-pGH	Hormônio do crescimento recombinante de porco
mm	Milímetro
U-V	Ultravioleta
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
®	Registrado
mg	Miligrama
%	Percentual
g/mol	Gramas por mol
ml	Mililitro
rpm	Rotações por minuto
h	Hora
PBS	Solução tampão fosfato salino
ASTM F1635	American Society for Testing and Materials
°C	Graus Celsius
A	Absorbância ou absorvância
$\epsilon$	Coefficiente de extinção molar
l	Caminho óptico
c	Concentração da solução
$\lambda$	Comprimento de onda
nm	Nanômetro
INTOX	Instituto de Toxicologia
KeV	Quilo eV = mil elétrons-volt
EUA	Estados Unidos da América

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Biomateriais	13
2.2 PLGA	15
2.3 Hormônio do crescimento	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivos gerais	19
3.2 Objetivos específicos	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Materiais	20
4.1.1 Hormônio do crescimento	20
4.1.2 PLGA	21
4.2 MÉTODOS	21
4.2.1 Preparação das matrizes	21
4.2.2 Degradação hidrolítica	23
4.2.3 Espectrofotometria UV-visível	24
4.2.4 Curva de calibração	25
4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	26
4.2.5 Análise estatística	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Curva de Calibração	28
5.2 Liberação do Hormônio do Crescimento	28
5.3 Perda de Massa	30
5.4 Análise do pH	32
5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	33
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

## 1 INTRODUÇÃO

É cada vez maior a necessidade de encontrarmos um biomaterial previsível que sirva de substituto para enxertos de osso autógeno. Vários tipos de materiais para enxertia estão disponíveis no mercado, porém, nenhum com todas as características desejáveis (osteoadutor, osteocondutor e osteogênico). Em busca de um material ideal, os estudos na área da engenharia tecidual estão cada dia mais avançados.

Dentre os biomateriais, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes as dos materiais biológicos<sup>1</sup>.

O PLGA é um polímero bioabsorvível derivado dos ácidos láctico (PLA) e glicólico (PGA) que sofre degradação por hidrólise e que tem sido considerado bastante promissor<sup>2,3,4</sup>. A sua velocidade de degradação pode ser modificada variando-se a sua composição química. Dessa forma, é possível obter diferentes copolímeros de PLGA com tempos de degradação distintos<sup>5,6</sup>.

O PLGA pode ser utilizado como sistema de liberação de drogas e uma das drogas com potencial de utilização nesse tipo de veículo é o hormônio do crescimento (GH – growth hormone), também chamado de hormônio somatotrópico ou somatotropina<sup>7,8</sup>.

Estudos têm demonstrado que o uso tópico do hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) acelera o processo de osteointegração, estimulando a osteogênese e também acelera o processo de remodelação óssea e maturação ao redor de implantes<sup>9,10</sup>.

Três aspectos gerais são necessários para a construção de um novo tecido: células ou substitutos celulares, arcabouços tridimensionais e compostos que possam estimular o tecido, como os fatores de crescimento. Dessa forma, propõe-se a associação do hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) com matrizes poliméricas, para que futuramente sejam realizados estudos *in vivo*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Biomateriais

Os biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética que têm sido desenvolvidas para serem usadas na restauração ou substituição de órgãos, tecidos ou funções do corpo humano<sup>11,12</sup>. Esses produtos não devem provocar qualquer resposta biológica adversa, seja ela local ou sistêmica. Em virtude disso, deve ser atóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico<sup>13</sup>.

Podem ser classificados em permanentes ou temporários, de acordo com o tempo de permanência no corpo humano. Ou ainda, conforme o seu comportamento fisiológico<sup>13</sup>:

**Biotoleráveis:** materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Exemplo: polímeros sintéticos e a grande maioria dos metais.

**Bioinertes:** materiais em que a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. Exemplo: alumina, zircônio, titânio, ligas de titânio e carbono.

**Bioativos:** materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração). Exemplo: vidros e vitro-cerâmicas à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.

**Absorvíveis:** materiais que, após certo período de tempo, em contato com os tecidos acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Exemplo: biopolímeros, como o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), entre outros.

Os biomateriais utilizados na regeneração óssea necessitam ser biocompatíveis e idealmente osteoindutivos, osteocondutivos, porosos, integrativos e mecanicamente compatíveis com o osso nativo<sup>14</sup>. Para isso, é necessário um arcabouço tridimensional poroso que tenha propriedades bioativas e biodegradáveis, servindo de molde para a formação do novo tecido e guiando a migração, diferenciação e proliferação tecidual<sup>15, 16, 17</sup>.

A engenharia tecidual faz uso dos polímeros para o desenvolvimento de “*scaffolds*” (ou matrizes) tridimensionais, que atuam como um suporte temporário para as células aderirem e proliferarem. O *scaffold* deve imitar a matriz extracelular nativa tanto arquitetonicamente, como funcionalmente<sup>15</sup>. Permitindo, dessa forma, a fixação celular, a troca de nutrientes e a angiogênese. É importante que a matriz seja biodegradável e a sua taxa de degradação deve coincidir, ou pelo menos ser controlável, para mimetizar a taxa da neoformação do tecido<sup>18</sup>.

A promessa da engenharia tecidual consiste em combinar os avanços no campo dos biomateriais e da biologia celular, de modo que os enxertos ósseos possam abranger a maioria ou todas as características ideais. Para isso, tem sido estudada a associação de matrizes poliméricas com fatores de crescimento, células cultivadas e fármacos<sup>19</sup>.

O sistema de liberação de fármacos dos biomateriais atua através de estímulos do meio, como por exemplo: alteração na temperatura, força iônica e pH local. Com isso, acredita-se que as alterações no pH possam gerar alterações conformacionais, fazendo com que o biomaterial saia de um estado estável e passe para um estado ativo, permitindo a liberação de drogas para o meio<sup>20</sup>.

## 2.2 PLGA

O poli(L- ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, é um copolímero derivado dos ácidos láctico (PLA) e glicólico (PGA) que tem sido empregado na encapsulação de peptídeos e proteínas, pela sua biocompatibilidade celular, biodegradabilidade e aprovação regulamentar<sup>4</sup>.

Sua estrutura química é mais suscetível à reação de hidrólise, pois possui o mero proveniente do ácido glicólico, que tem maior propensão ao ataque das moléculas de água quando comparado ao poli (L-ácido láctico), PLLA, cuja cadeia polimérica é formada exclusivamente por meros provenientes do ácido láctico<sup>21</sup>.

Um estudo realizado por Pitt et al. (1981)<sup>22</sup> definiu dois estágios no processo de degradação: 1) Um primeiro estágio, caracterizado por uma redução da massa molecular causado pela hidrólise aleatória de ligações ésteres do polímero. 2) Um segundo estágio, caracterizado por perda de massa e uma variação na taxa de cisão da cadeia polimérica. As cadeias são rompidas pela hidrólise dos grupos ésteres, e os produtos da degradação, ácido láctico e glicólico, inócuos ao organismo, são eliminados por meio do ciclo de Krebs, como CO<sub>2</sub> e também na urina.

Os polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico têm recebido muita atenção nas pesquisas de polímeros biodegradáveis alternativos, sendo que já são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para serem utilizados como sistemas de liberação de drogas, existindo diversos estudos demonstrando sua baixa toxicidade, baixa capacidade alergênica e excelente biocompatibilidade<sup>2,3</sup>.

Além da fabricação de dispositivos para liberação controlada de fármacos, o PLGA também pode ser combinado com matrizes de engenharia tecidual implantável para o uso comercial e em pesquisas biocompatibilidade<sup>4,7</sup>.

### **2.3 Hormônio do Crescimento**

O Hormônio do Crescimento (GH – growth hormone), é um hormônio polipeptídico, produzido na glândula pituitária anterior. Ele é secretado principalmente à noite, durante toda a vida, porém seu pico de secreção ocorre durante a puberdade e há um decréscimo acentuado de sua produção a partir da sexta década de vida<sup>23</sup>.

O GH atua no metabolismo celular e promove o crescimento de todo o corpo ao afetar a síntese protéica, a multiplicação celular e a diferenciação específica de certos tipos celulares, como as células do crescimento ósseo e as células musculares imaturas. E, também, age no metabolismo de gorduras e carboidratos, exerce funções sobre os órgãos e estimula a produção de fatores de crescimento<sup>23</sup>.

A partir dos anos 90, através de técnicas de biologia molecular, a síntese laboratorial do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH - recombinant human growth hormone) tornou-se realidade, e houve um significativo aumento no número e na qualidade das pesquisas envolvendo esse hormônio: Com isso, a reposição hormonal com GH estabeleceu-se, gerando benefícios como o ganho de massa muscular e óssea. E, seu uso tem sido aplicado em crianças com deficiência de crescimento, portadores de síndromes como o nanismo, adultos e idosos<sup>24</sup>.

Os efeitos da administração sistêmica do GH sobre o reparo de defeitos ósseos críticos foi testado por Cacciafesta et al. (2001)<sup>25</sup>. Os autores realizaram um

estudo em calvária de ratos que foi revestido por membranas e- PTFE e os animais receberam injeções subcutâneas diárias de rhGH. Esse experimento demonstrou que a administração de rhGH melhora a resistência mecânica e a deposição óssea.

Chae Cho et al. (2003)<sup>26</sup> testaram o efeito do uso de injeções subcutâneas diárias de rhGH na consolidação óssea inicial de 16 cães submetidos à distração osteogênica. Observaram que tanto a força mecânica quanto a densidade mineral óssea foi maior nos animais que receberam as injeções de rhGH.

Bail et al. (2002)<sup>27</sup>, analisaram e quantificaram os efeitos do GH na regeneração óssea. Mini porcas da raça Yucatan foram submetidas à distração osteogênica e a injeções diárias de hormônio do crescimento recombinante de porco (r-pGH). Os resultados demonstraram que o hormônio do crescimento pode acelerar a maturação óssea sem alterar a microestrutura do calo ósseo.

Chae Cho et al. (2004)<sup>9</sup>, avaliaram o efeito do hormônio do crescimento encapsulado em microesferas de quitosana. Para tal, 48 cães foram submetidos a distração osteogênica e receberam as seguintes infiltrações na área operada: solução salina (Grupo I), ácido hialurônico (Grupo II), microesferas de quitosana (Grupo III), microesferas de quitosana encapsuladas com hormônio do crescimento (Grupo IV). Os resultados demonstraram que houve um pico de liberação do GH até o 5º dia de experimento e, que a liberação sustentada desse hormônio pode continuar após 20º dia. Concluíram que esse material pode ser muito eficaz no início consolidação óssea em casos de distração osteogênica.

O efeito da aplicação tópica do hormônio do crescimento foi avaliado por Gómez-Moreno et al. (2009)<sup>10</sup> em um estudo com implantes dentários em cães Beagle. Foram extraídos pré-molares e molares superiores e inferiores de 12 cães e após dois meses esses animais receberam implantes cilíndricos de 3,25 mm de

diâmetro e 10 mm de comprimento. A seguir, o hormônio do crescimento, na forma de pó liofilizado, foi aplicado na região implantada. Após 2 semanas, oito cortes histológicos por implante foram obtidos para análise histomorfométrica. Os sítios tratados com hormônio do crescimento mostraram aumento do perímetro ósseo e da neoformação óssea. Com isso, concluíram que a aplicação tópica do hormônio do crescimento pode agir como um estimulante ósseo na colocação de implantes dentários.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a degradação de matrizes poliméricas confeccionadas com duas proporções diferentes de PLGA, associadas com hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1 – Avaliar e quantificar a liberação do rhGH ao utilizar diferentes proporções do PLGA a liberação do rhGH, no ensaio de degradação hidrolítica.
- 2 – Quantificar a perda de massa das matrizes submetidas ao ensaio de degradação hidrolítica, nas diferentes proporções do PLGA.
- 3 – Analisar o comportamento, ao longo do tempo, do pH.
- 4 – Avaliar a topografia das matrizes do grupo que apresentar melhor resultado no ensaio de degradação hidrolítica, através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais:

#### 4.1.1 Hormônio do Crescimento Humano Recombinante

Foi utilizado o hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH), de nome comercial Saizen®<sup>1</sup>, sob a forma de pó liofilizado (frasco-ampola). Cada frasco-ampola contém: 1,33 mg de rhGH; manitol 20 mg; fosfato dissódico dihidratado 2,0-2,4 mg e fosfato monossódico monohidratado 0,30-0,40 mg<sup>28</sup>.

O hormônio do crescimento Saizen® é um polipeptídeo de 191 aminoácidos idêntico ao hormônio do crescimento pituitário humano.

Nesse estudo foram utilizadas 15 caixas de Saizen®.



Figura 1: Hormônio do crescimento humano recombinante – Saizen®<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça.

#### 4.1.2 PLGA

O PLGA utilizado nesse estudo foi o Purasorb®, comercializado pela empresa Purac.

Duas proporções de PLGA foram utilizadas nesse estudo:

- PLGA 50:50, igual proporção dos ácidos lático e glicólico. Vendido comercialmente como Purasorb® PDLG 5010. Tem massa molar igual a 153.000 g/mol. Foi incluído no Grupo I, deste estudo.
- PLGA 75:25, ou seja, 75% de ácido lático e 25% de ácido glicólico. Vendido comercialmente como Purasorb® PDLG 7507. Tem massa molecular igual a 95.000 g/mol. Foi incluído no Grupo II.

#### 4.2 Métodos:

##### 4.2.1 Preparação das matrizes

Os procedimentos de confecção das matrizes, ensaio de degradação hidrolítica, pesagem e medição do pH foram realizados no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) da Faculdade de Química da PUCRS.

Para dissolver o PLGA foi preparada uma mistura de dois solventes **indicados pelo fabricante do polímero**: diclorometano e metanol (77:23), ambos da marca Vetec®. Para cada 7,50 gramas do PLGA foi preparado 100 ml dessa mistura de solventes. Os frascos ficaram em agitação magnética por aproximadamente 3 horas, até o polímero estar completamente dissolvido (Figura 2).

O hormônio do crescimento foi preparado misturando o pó liofilizado com acetato de zinco (1:6) e 10 ml de água deionizada. Para cada uma das proporções do polímero foi utilizado 7 caixas de rhGH (9,31 mg).

A mistura do rhGH foi acrescentada ao polímero dissolvido e levada para homogeneização por 15min em um dispersor Ultra Turrax IKA® T25, na velocidade de 3.600 rpm. Após, verteu-se a mistura do polímero com o hormônio em moldes de silicone de formato circular, com aproximadamente 10 mm de diâmetro.

As amostras do grupo controle passaram apenas pelo processo de dissolução do polímero e, após, foi vertido em moldes de silicone previamente confeccionados no LOR (Figura 3).

Os moldes foram acondicionados em uma câmara de evaporação de solvente, à temperatura ambiente, onde as matrizes foram secas por meio do arraste forçado pela ação de gás nitrogênio. Permaneceram nessa câmara por 24h e, após, foram transferidas para tubos de ensaio que foram armazenados em um dessecador a vácuo, onde ficaram até que as matrizes estivessem com a superfície completamente seca.

Após o período de secagem todas as amostras foram pesadas em uma balança de precisão para posterior avaliação da perda de massa.

Foram confeccionadas 5 amostras em cada subgrupo (Quadro I), segundo Sonia Vieira (1991)<sup>29</sup>, esse número é considerado o ideal.



Figura 2: PLGA misturado aos solventes, em agitação magnética.



Figura 3: Moldes de silicone.

#### 4.2.2 Degradação hidrolítica:

As amostras foram submetidas à degradação hidrolítica no intuito de simular *in vitro* as condições *in vivo*. Inicialmente, as matrizes foram imersas em solução tampão fosfato salino, PBS, (pH 7,4), dentro de tubos de ensaio (previamente esterilizados com óxido de etileno). Em seguida, os tubos foram expostos a um banho termostatizado, marca Biomatic, a 37°C. As amostras ficaram no banho durante um tempo pré-determinado (*vide* quadro). O teste de degradação hidrolítica foi realizados conforme a norma ASTM F1635 de 2010<sup>30</sup>.

Quadro I – Divisão dos grupos.

Grupo/Dias	1º dia	2º dia	3º dia	7º dia	14º dia
Grupo I	5 matrizes + 1 controle				
Grupo II	5 matrizes + 1 controle				

Após cada período de tempo, as amostras foram retiradas do banho, seu pH foi medido, e o sobrenadante foi levado para análise de espectrofotometria de absorção UV visível. A parte sólida da amostra (matriz) foi lavada com água destilada e secada em dessecador à vácuo até obtenção de massa constante e levada para análise de microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.2.3 Espectrofotometria UV-Visível

A capacidade que as diversas substâncias químicas têm de absorverem luz em determinados comprimentos de onda pode ser utilizada para a sua determinação quantitativa e qualitativa, uma vez que o espectro de absorção é característico para

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

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

**Onde:**  $\varepsilon$  = coeficiente extinção molar, que é constante para cada substância, **A** = definido como a absorvância da substância em um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ) numa cubeta de caminho óptico (**l**) = 01 cm (largura da cubeta) e **c** = à concentração da solução. A absorvância é uma função linear da concentração. Assim, para uma mesma substância, considerando-se o caminho óptico constante, a absorvância é diretamente proporcional à concentração desta substância.

Os pontos experimentais foram obtidos pela leitura de uma propriedade que varia em função da concentração do analito. A propriedade medida é chamada de sinal do instrumento, que no caso deste estudo, será a absorvância. De acordo com a literatura a absorvância do hormônio puro é de 214 a 286nm.

Para nível de comparação, será colocada em outro tubo de ensaio somente a solução tamponada, PBS, sem a amostra.

A análise de espectrofotometria de absorção UV visível foi realizada através do aparelho Cary 1E, marca Varian, no Instituto de Toxicologia (INTOX), da PUCRS.

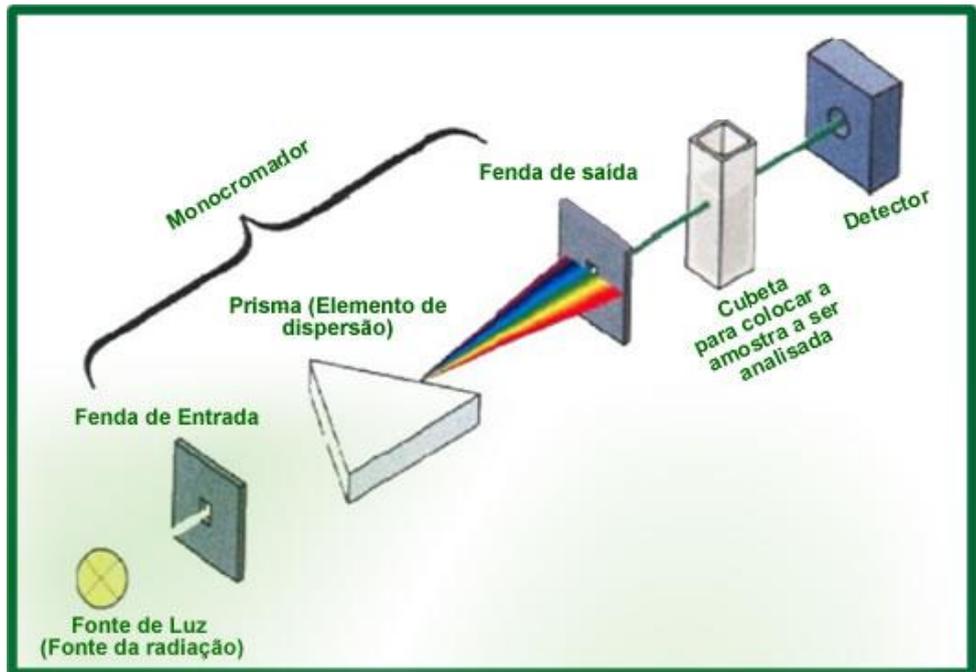


Figura 4 : Desenho esquemático – Espectrofotometria UV-Visível.  
Disponível em: <http://quimicandovp.wordpress.com/category/espectrofotometria-uvvisivel>

#### 4.2.4 Curva de Calibração

Com a finalidade de quantificar a concentração de hormônio liberado durante a degradação hidrolítica, foi realizada uma curva de calibração. Para isso, foi feita uma concentração-mãe com 1,33 mg de rhGH diluída em 50ml de PBS. A partir da solução-mãe foram realizadas 4 diluições (5x, 10x, 25x, 75x), dessa forma obtivemos concentrações conhecidas do hormônio. Essas soluções foram submetidas à espectrofotometria de absorção UV - visível, em um comprimento de onda padrão de 280nm.

#### 4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A parte sólida das amostras foi submetida à análise topográfica, por meio de MEV, no Instituto de Tecnologia FUSE da Unisinos através do equipamento EVO

LS15 (marca Zeiss). As amostras foram colocadas nos stubs para metalização com ouro e as imagens foram adquiridas no modo de espalhamento elétrico usando uma onda elétrica com 20 KeV.

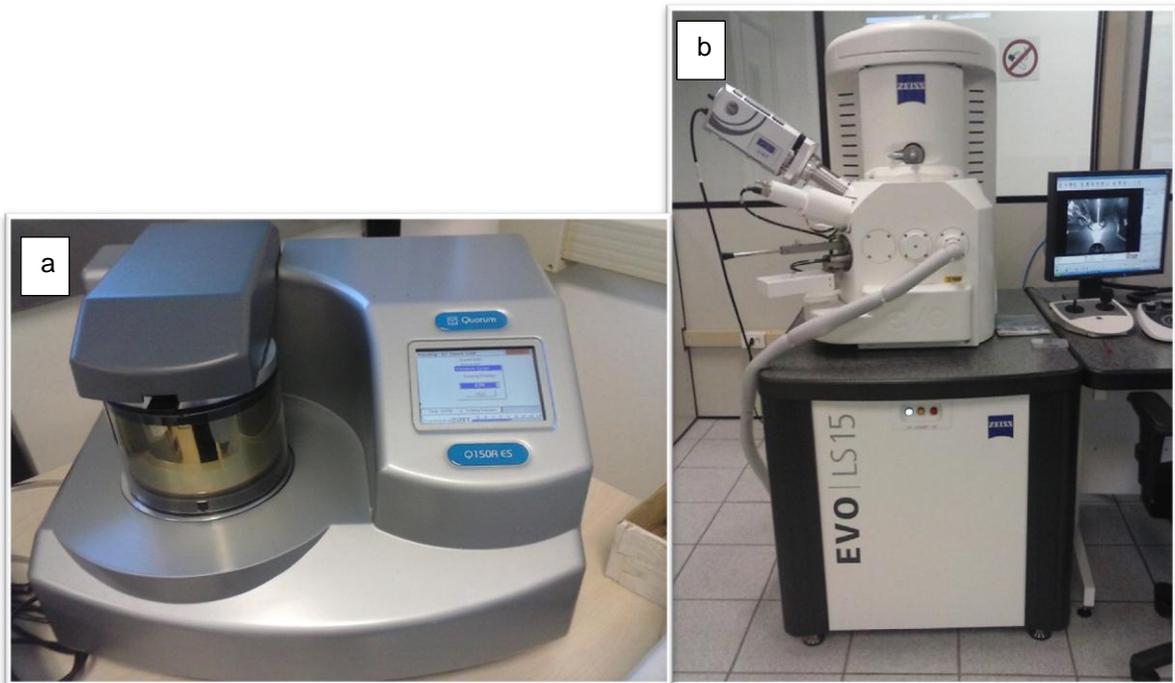


Figura 5: a) aparelho para metalização em ouro; b) Microscópio Eletrônico de Varredura.

#### 4.2.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do serviço de assessoria estatística da Faculdade de Matemática da PUCRS. Para análise estatística foram utilizados os softwares BioEstat®, versão 5.0, e SPSS®, versão 17.0, (Microsoft Corporation®, EUA). E, para avaliação da diferença de médias, foi realizado o teste T de Student.

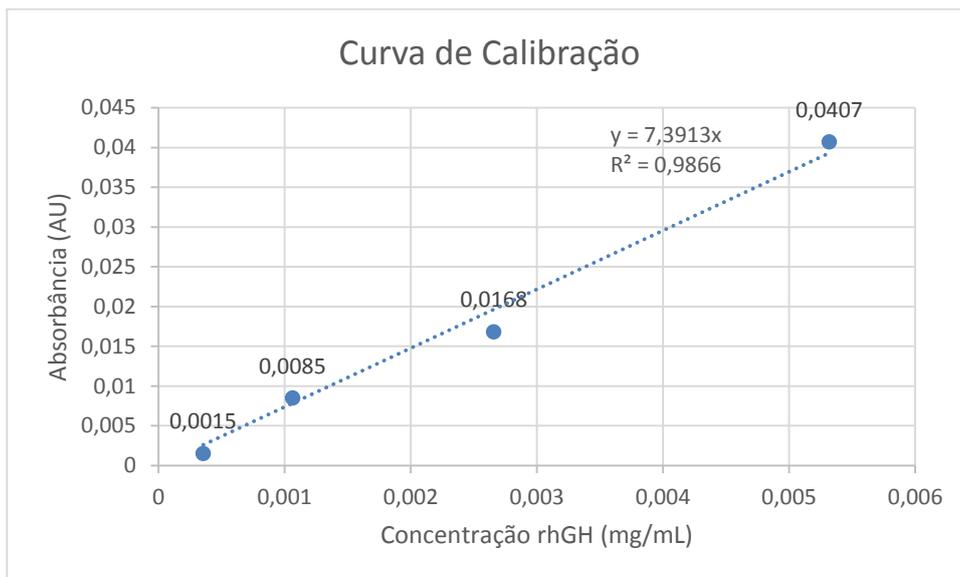
---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Curva de Calibração

A absorvância obtida de cada concentração foi analisada e, através do Programa Microsoft Excel, foi gerado um gráfico da curva de calibração. Derivar uma curva de calibração linear significa determinar a equação de reta que melhor se ajusta aos pontos experimentais. Dessa forma, foi obtida uma reta de tendência, através do método de ajuste de curva. A equação resultante foi  $y = 7,3913x$  e o  $R^2 = 0,9866$ .

Gráfico 1: Curva de calibração

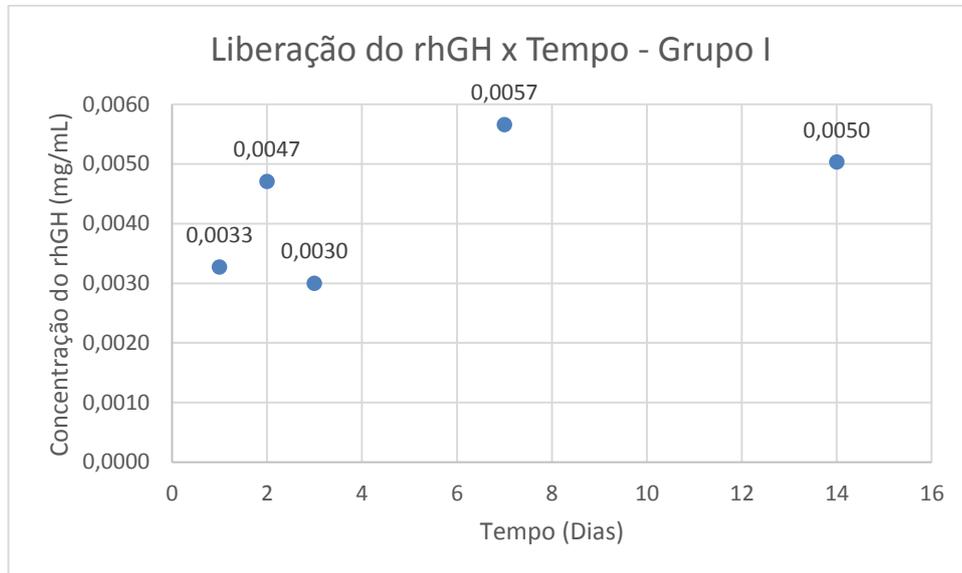


### 5.2 Liberação do Hormônio do Crescimento

Através da Lei de Lambert-Beer obteve-se a absorvância (A) de cada amostra analisada no espectrofotômetro. Para cálculo da absorvância de cada quintuplicata, primeiramente calculou-se a média entre as cinco amostras e após calculou-se a diferença entre essa média e a absorvância do controle. Dessa forma, chegou-se ao valor da absorvância de cada subgrupo.

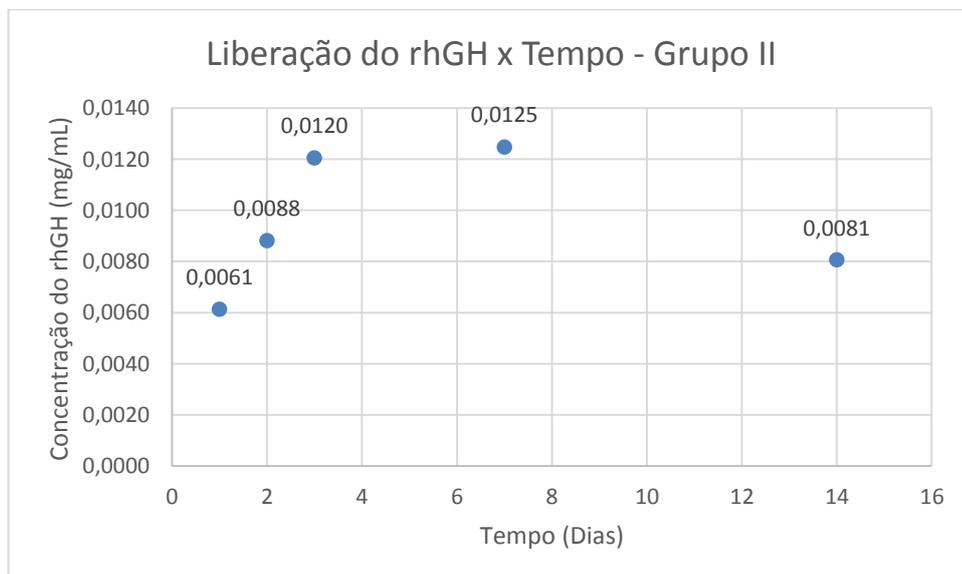
Por meio da equação da reta obtida na curva de calibração, pode-se obter o valor da concentração de rhGH liberado em cada grupo.

Gráfico 2: Liberação do rhGH no Grupo I.



No Grupo I, observamos a liberação do rhGH com pouca variação ao longo do tempo e concentrações baixas do hormônio no meio, o que indica que ainda restou quantidades significativas de rhGH nas matrizes.

Gráfico 3: Liberação do rhGH no Grupo II.

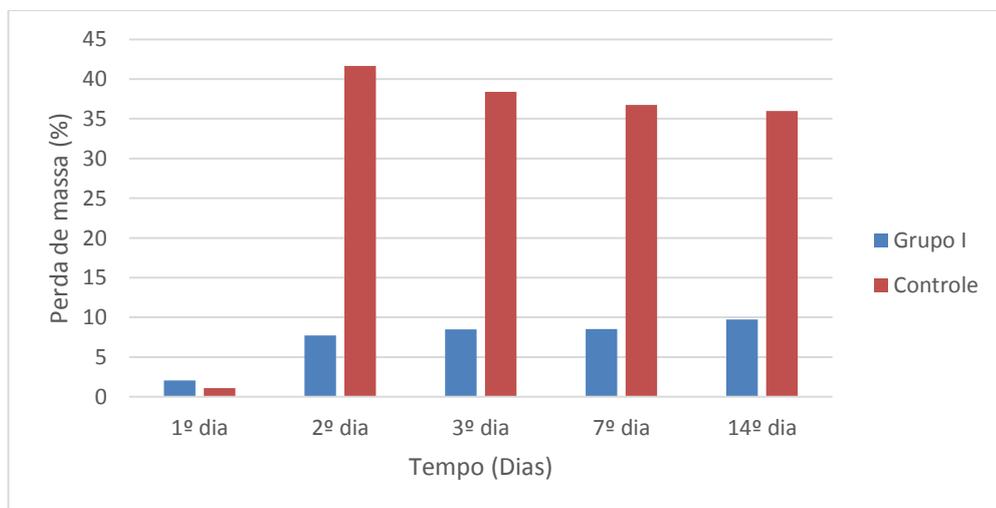


No Grupo II observa-se uma liberação de rhGH crescente até o 7º dia e uma queda no 14º dia. Do primeiro até o último dia observou-se uma concentração de rhGH liberado pelo Grupo II maior em relação ao Grupo I e, essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,0044$ ), nível de significância 1%.

### 5.3 Perda de Massa

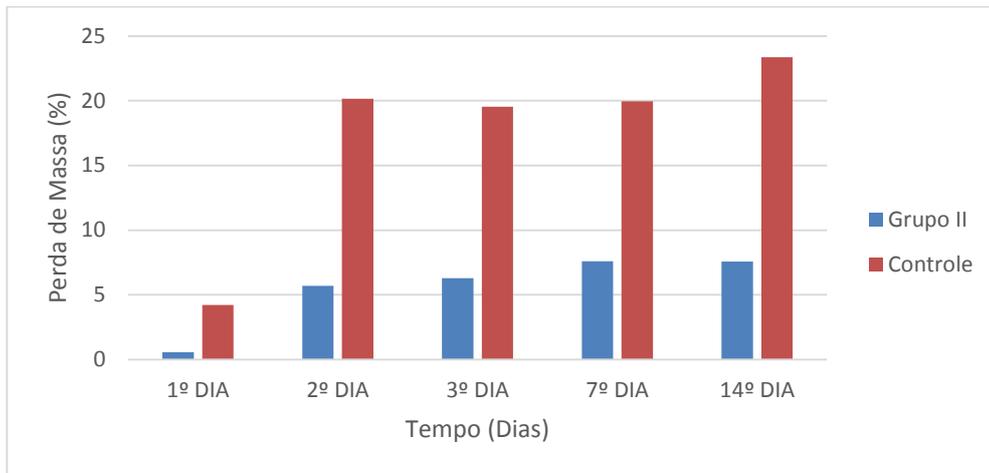
Foi realizada uma média das massas inicial e final de cada quintuplicata. Através dessas médias calculou-se o percentual de perda de massa. Os dois grupos foram analisados individualmente e, após, foi feita uma comparação entre os grupos.

Gráfico 4: Perda de massa do Grupo I comparado com o controle.



Comparando-se o percentual de perda de massa das matrizes do Grupo I com o controle, obteve-se diferença estatisticamente significativa ( $p= 0.0367$ ), com nível de significância de 5%.

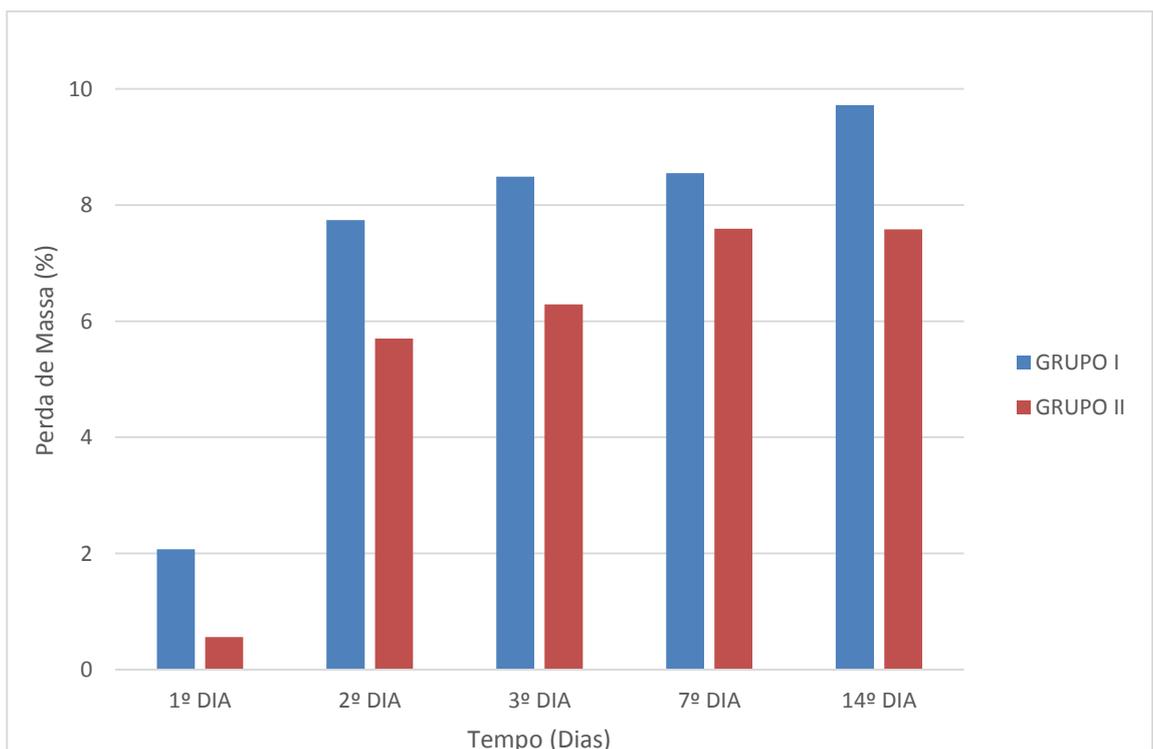
Gráfico 5: Perda de massa do Grupo II comparado com o controle.



O percentual de perda de massa nas matrizes com rhGH ocorreu de forma gradual e foi menor em comparação com as amostras controle, em ambos os grupos.

A perda de massa do Grupo II comparada com o controle, apresentou diferença estatística significativa ( $p = 0.0110$ ), nível de significância 5%.

Gráfico 6: Comparação da perda de massa entre os grupos

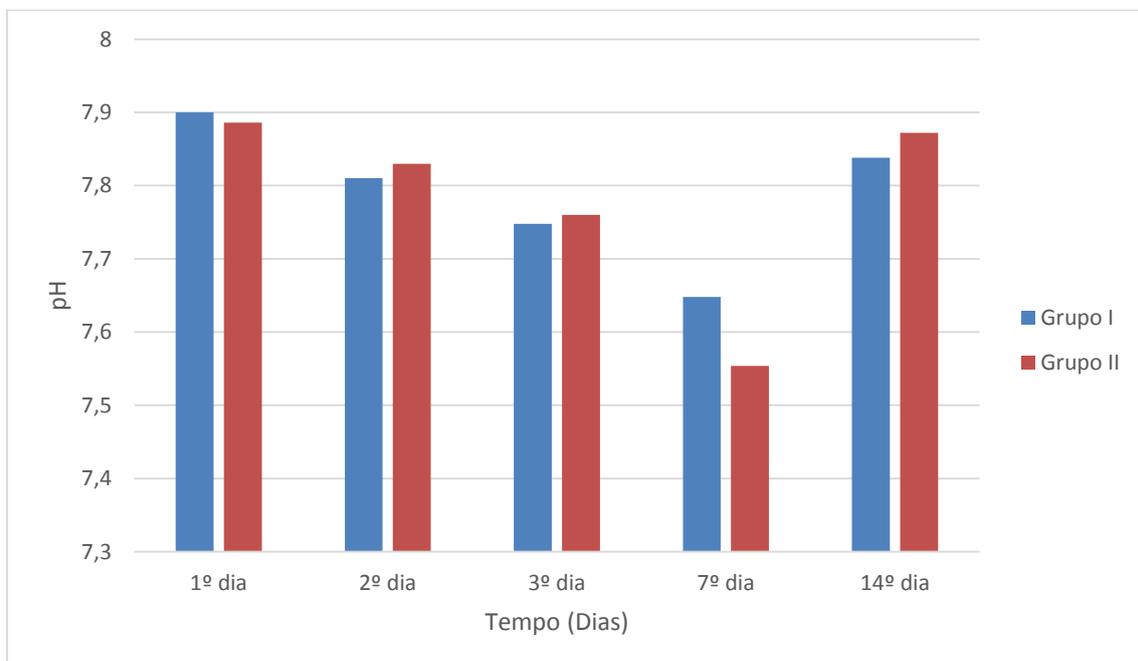


Comparando-se a perda de massa entre os Grupos I e II não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0.3722$ ).

#### 5.4 Análise do pH

O pH apresentou pouca variação ao longo do tempo, com média entre 7,5 e 7,9. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0.4564$ ). O PBS foi usado como controle e teve como média 7,4.

Gráfico 7: Análise do pH.



## 5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Por meio da microscopia eletrônica foi analisada a estrutura superficial das matrizes do Grupo I.

Na figura 6 é possível comparar as diferenças topográficas apresentadas pelas amostras. Na amostra controle (a) nota-se poucos poros e o aspecto deles é distinto dos poros observados nas matrizes seguintes. A segunda imagem (b) apresenta a topografia de uma matriz submetida a 1 dia de degradação, pode-se perceber a presença de poros maiores e mais profundos quando comparados ao controle (a). A terceira matriz (c) passou por 14 dias de degradação hidrolítica e é possível observar um número muito maior de poros, devido ao maior tempo de degradação e maior liberação do hormônio.

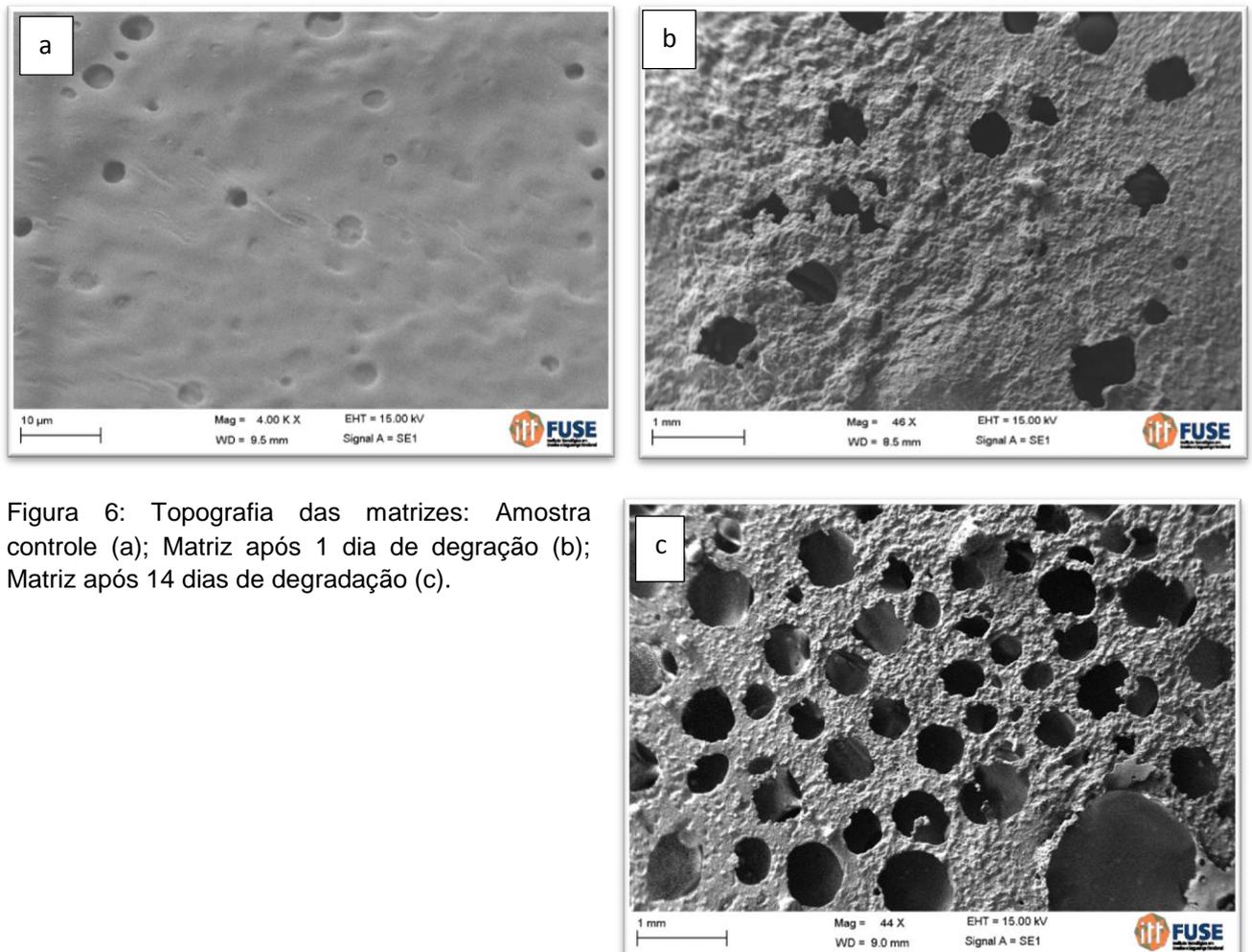


Figura 6: Topografia das matrizes: Amostra controle (a); Matriz após 1 dia de degradação (b); Matriz após 14 dias de degradação (c).

A figura 7 mostra a estrutura do hormônio do crescimento humano recombinante pura. Nas figuras 8 e 9 observa-se a presença de estruturas semelhantes à do hormônio puro encontradas no interior das matrizes.

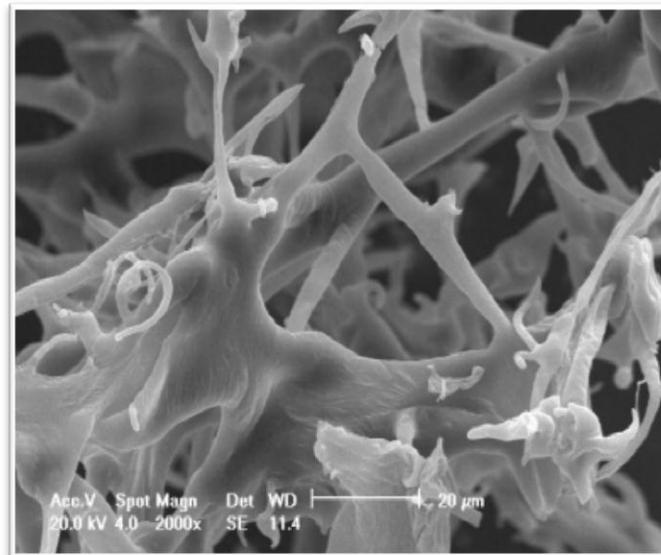


Figura 7: Estrutura do rhGH puro. Fonte: Garcia (2013)<sup>31</sup>.

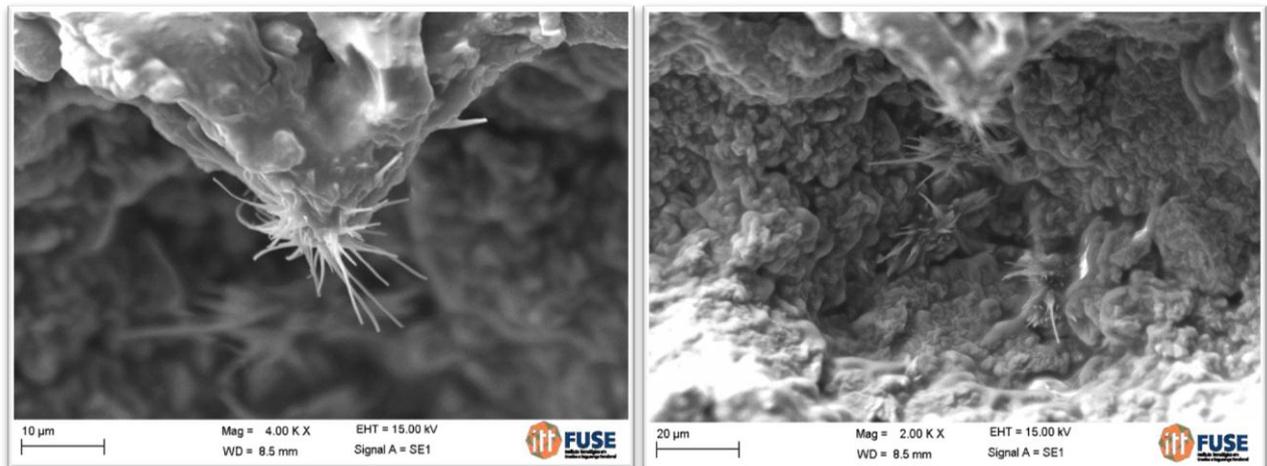


Figura 8: Estruturas, similares à imagem do hormônio puro, encontradas no interior da matrizes

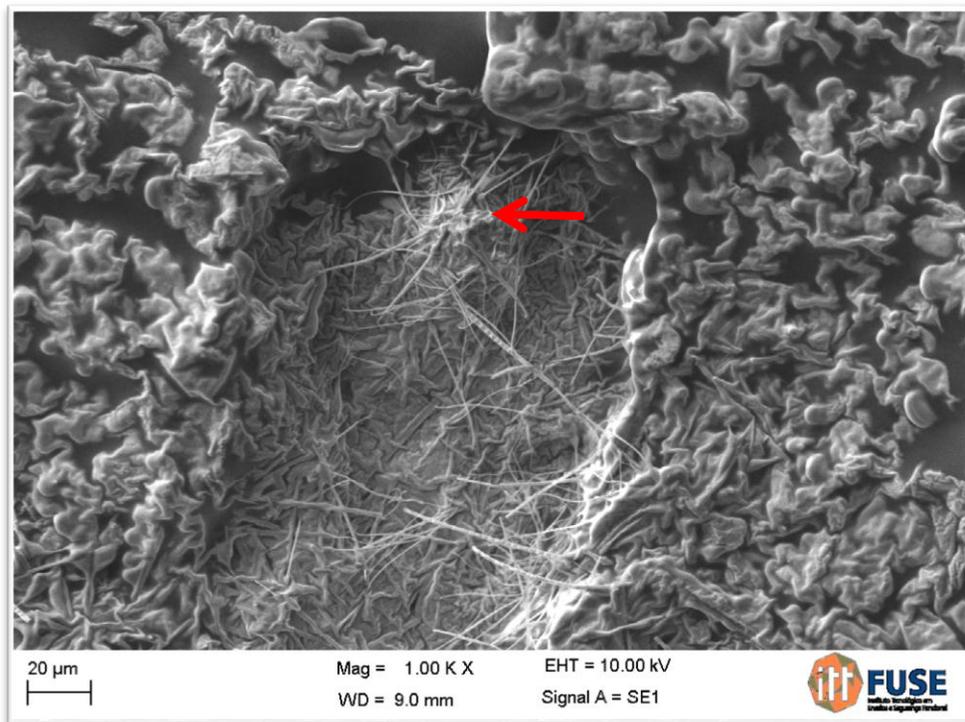


Figura 9: Matriz após 14 dias de degradação. Imagem semelhante à estrutura do rhGH puro.

## 6 DISCUSSÃO

Diferentes técnicas podem ser empregadas para confecção de matrizes poliméricas. Dentre as principais, destacam-se a técnica de co-precipitação e a de evaporação de solventes. No presente estudo, as matrizes de PLGA foram confeccionadas por meio da técnica de evaporação de solventes, que tem sido utilizada na indústria farmacêutica para a encapsulação de fármacos, como, por exemplo, a carbamazepina<sup>32</sup>. Esse método é simples de ser executado e não necessita de equipamentos sofisticados. O material, geralmente, empregado para essa técnica é um polímero e o PLGA está entre os mais utilizados<sup>33</sup>.

Outro fator relevante na escolha do método de fabricação das matrizes foi a possibilidade de criá-las com características favoráveis à regeneração óssea. Assim sendo, apesar de a técnica de co-precipitação apresentar a vantagem de aumentar a área de superfície das matrizes (até 200%, justificado pela formação de estruturas de nano ou microesferas<sup>34</sup>, ao passo que a evaporação de solventes pode crescer apenas 40%), ela é menos eficaz no desenvolvimento de rugosidade superficial e interconectividades, presentes nas matrizes confeccionadas por Garcia (2013)<sup>31</sup>. Sabe-se que essas propriedades são imprescindíveis para auxiliar a migração e adesão celular, as trocas metabólicas, além de proporcionar um suporte mecânico<sup>35</sup>.

O acetato de zinco e a albumina são substâncias que têm sido utilizadas com a finalidade de manter a bioatividade e controlar a liberação de proteínas<sup>36,37,38</sup>. No trabalho de Serro et al 2004<sup>36</sup>, a albumina apresentou maior concentração sanguínea, propriedades como agente de transporte de fatores de crescimento e interações com os biomateriais. Nos estudos de Yuan et al (2012)<sup>37</sup> e de Johnson et al (1997)<sup>38</sup>, os autores justificaram o uso do acetato de zinco através de análises

histoquímicas da pituitária anterior, nas quais foi demonstrada a presença íons zinco nos grânulos de GH, levando a crer, então, que o GH seja armazenado na pituitária com complexos de zinco. No presente estudo, optou-se por utilizar o acetato de zinco e, a partir dos resultados da liberação do rhGH, observa-se que a liberação do hormônio ocorreu de forma controlada. Além disso, observou-se que essa escolha pode ter interferido na degradação das matrizes, tendo em vista que ela foi inferior à degradação das amostras controle, que não tiveram esse material em sua composição.

Ainda que, Panagi et al (2001)<sup>39</sup> tenha demonstrado, em seu estudo, que a taxa de degradação inicial do PLGA que carrega biofármacos atinge cerca de 30%. Isso se opõe aos resultados deste estudo, pois as matrizes com rhGH apresentaram uma taxa de perda de massa bem inferior (não atingindo 10%) enquanto que as amostras controle (sem rhGH) ficaram com média em torno de 30%.

A degradação de um polímero biodegradável depende de vários fatores, entre eles a sua composição química. No caso do PLGA, a variação na proporção de PGA e PLA é capaz de alterar a sua taxa de degradação. Sabe-se que quanto maior for a quantidade do mero proveniente do ácido glicólico (PGA), maior será a suscetibilidade à reação de hidrólise, uma vez que estes meros possuem um impedimento menor ao ataque das moléculas de água<sup>21</sup>. No presente estudo, avaliou-se duas proporções de PLGA comercializadas: PLGA 50:50 e PLGA 75:25. Os resultados referentes à perda de massa ficaram dentro do esperado, isto é, houve uma perda de massa mais lenta no grupo com maior concentração de PLA, o que vai ao encontro dos resultados do estudo realizado por Makadia e Siegel (2011)<sup>40</sup>.

A massa molar também constitui fator relevante na modulação da velocidade de degradação de polímeros, pois quanto maior for a massa molar mais rápida será a sua degradação e, conseqüentemente, maior será a liberação dos ácidos láctico e glicólico no meio, originando um meio com pH ácido<sup>1</sup>. Os resultados referidos nesse estudo mostram que a perda de massa foi maior no grupo com maior massa molar (Grupo I).

O pH do meio, neste estudo, não apresentou diferença estatisticamente significativa, mantendo-se no intervalo de 7,5 a 7,9. Já no estudo de Garcia (2013)<sup>31</sup> o pH, após ensaio de degradação hidrolítica, apresentou uma queda brusca nas primeiras 24h e, após, manteve-se na média de 3,18, inviabilizando o uso *in vivo*. Segundo os autores Xue e Nuo (2001)<sup>41</sup> o pH alto ou médio proporciona uma degradação mais lenta, ao passo que o pH ácido ocasiona uma degradação mais rápida do polímero. Tendo em vista a melhor metabolização do hormônio, verifica-se que manter o pH o mais próximo possível do neutro revela-se o ideal para que a acidez demasiada não apresse a degradação do polímero e a conseqüente liberação do rhGH associado a ele.

Quanto a concentração de hormônio liberada no meio, observou-se que as matrizes do Grupo II, apesar de terem degradado mais lentamente, liberaram uma quantidade maior de rhGH no meio. Esse fato pode estar associado ao aspecto macroscópico dessas matrizes, que apresentaram bastante porosidades e formação de bolhas originadas no processo de evaporação de solventes.

Apesar de diversos benefícios do uso do rhGh descritos na literatura, sabe-se que o seu uso descontrolado e excessivo pode proporcionar diversos efeitos colaterais, como por exemplo: acromegalia em adultos e gigantismo nas crianças<sup>42</sup>. Com isso, fica evidente que o uso tópico é uma alternativa mais segura em relação à

via sistêmica. Além de garantir maior biodisponibilidade no local da aplicação, diminuindo, assim, a dose necessária para que o tecido-alvo seja atingido<sup>43</sup>.

Com esse trabalho foi possível determinar a taxa de perda de massa das matrizes com rhGH, a concentração de hormônio liberada, em um meio que simula o ambiente *in vivo*, e também a estabilização do pH. Esses resultados possibilitam a realização de trabalhos futuros a fim de analisarem outros aspectos, como a regeneração óssea em modelos animais.

## 7 CONCLUSÃO

A avaliação da degradação de matrizes confeccionadas com duas proporções diferentes de PLGA, associadas com rhGH, permite constatar que:

1. A liberação do rhGH ocorreu de forma mais lenta e gradual no Grupo I;
2. A perda de massa foi mais acentuada no Grupo I;
3. O pH apresentou pouca variação ao longo do tempo. Mantendo-se entre 7,5 e 7,9;
4. O Grupo I apresentou porosidade mais uniforme e menos bolhas.

## REFERÊNCIAS

1. Barbanti S, Zavaglia C, Duek E. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* Jan 2005; 15(1):13-21.
2. Soares AQ, Oliveira LF, Rabelo D, Souza AR, Polímeros Biodegradáveis: Novas perspectivas para as ciências farmacêuticas, *Revista Eletrônica de Farmácia* 2005; 2(2):202-205.
3. Holland, S. J.; Tighe, B. J.; Gould, P. L. Polymers for biodegradable medical devices, I. Potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J. Control. Rel* 1986; 4:155-180.
4. Santos, R. M. M.; Fialho, S. L. Nanopartículas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* Jan/Fev 2007; Ano 10, n. 37.
5. Kissel, T.; Koneberg, R. Injectable biodegradable microspheres for vaccine delivery, In: Cohen, C., Bernstein (eds), *Microparticulate Systems For the Delivery of proteins and Vaccines*. Marcel Dekker 1996; 51-88.
6. Lima, K. M.; Silva C. L., Rodrigues Júnior J. M. Microesferas Biodegradáveis. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* Jan/Fev 2000; 2(12).
7. Gombotz, W.R.; Pettit, D.K. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconjug. Chem* 1995; 6:332.
8. Raschke, M. et al. Homologous growth hormone accelerates healing on segmental bone defects. *Bone* 2001; 29(4):368-73.
9. Chae Cho, B. et al. The bone regenerative effect of chitosan microsphere-encapsulated growth hormone on bony consolidation in mandibular distraction osteogenesis in a dog model. *The Journal of Craniofacial Surgery*. March 2004; 15(2): 299-311.
10. Gómez-Moreno, G. et al. The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2009; 24(6): 1068-1073.
11. Cohen I. *Biomaterials in Cardiology*. (InspiredMD Corporation, Dereh Hashalom 4, Tel-Aviv). Disponível em: <[http://chemistry.org.il/booklet/22/pdf/ilana\\_cohen.pdf](http://chemistry.org.il/booklet/22/pdf/ilana_cohen.pdf)>. Acesso em: 10 agosto 2012.
12. Helmus M, Gibbons D, Cebon D. Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. *Toxicologic pathology* Jan 2008; 36:70-80.

13. Hench L, Wilson J. In: Introduction. An Introduction to Bioceramics. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 1993; 1:1-15.
14. El-Ghannam, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*. Jan 2005; 2(1): 87-101.
15. Liu, X.; Ma, P.X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.* 2004; 32:477.
16. Vunjak-Novakovic, G. Tissue engineering strategies for skeletal repair. *HSSJ*. Feb 2012; 8 (1): 57-8.
17. Taylor ED, Khan Y, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: a primer for the practicing hand surgeon. *J Hand Surg Am*. Jan 2009; 34(1):164-6.
18. Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21:2529.
19. Oliveira LSAF, et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea: método de análise e perspectivas futuras. *R. Ci. méd. biol.* 2010; 9(1):37-44.
20. Stayton, PS. et al. "Smart" delivery systems for biomolecular therapeutics. *Orthod. Craniofacial Res.* 2005; 8:219-225.
21. Motta, A. C.; Duek, E. A. R., Síntese, Caracterização e Degradação "in vitro" do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico), *Revista Matéria* 2006;11(3):340-350.
22. Pitt, C. G.; Gratzl, M. M.; Kimmel, G. L.; Surles, J.; Schindler, A. Aliphatic Polyesters. The degradation of poly (D, L-lactide, poly( $\alpha$ -caprolactone) and their copolymers in vivo. *Biomaterials* 1981; 2:215-220.
23. Guyton, A. C; Hall, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. 831p
24. Eriksen, E. F.; Kassem, M.; Langdahl, B. Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodeling. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:252-64.
25. Cacciafesta V, Dalstra M, Bosch C, Melsen B, Andreassen TT. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. *European Journal of Orthodontics*. 2001; 23: 733–740.
26. Chae Cho B, et al. The bone regenerative effect of growth hormone on consolidation in mandibular distraction osteogenesis of a dog model. *The Journal of Craniofacial Surgery*. May 2003;14(3) 417-425.
27. Bail HJ, et al. Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone*. Jan 2002; 30(1):117–124.

28. Somatropina Humana Recombinante 4 UI. Saizen (pó liófilo injetável): Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça; Dezembro 2009. Bula. N1281212B.
29. Vieira, S. Introdução à Bioestatística. Rio de Janeiro: Campus; 1991. 203 p.
30. American Society For Testing And Materials. Standard Test Method for *in vitro* Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants, ASTM F1635. 2010.
31. Garcia, RF. Incorporação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhgh) em matriz de polímero biodegradável. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
32. Zanetti BG, Soldi V, Lemos-Senna E. Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2002;38(2), 229-236.
33. Trino, ASM. Estudo sistemático da formação de estrutura em processos de microencapsulação por evaporação de solvente. 2012. 84f. Dissertação (Mestrado em Química Farmacêutica Industrial) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.
34. Reves BT, Bumgardner JD, Cole JA, Yang YZ, Haggard WO. Recipient of 2009 Society for Biomaterials Student Award for Outstanding Research. Master's Degree Candidate Category Lyophilization to Improve Drug Delivery for Chitosan–Calcium Phosphate Bone Scaffold Construct: A Preliminary Investigation, J. Biomed. Mater. Res. Part B 90B (1) (2009) 1–10
35. Hu and Ma. Nano-Fibrous Scaffolds Capable of Growth Factor Delivery. Pharm Res (2011) 28:1273–1281.
36. Serro AP, M. Bastos, J.C. Pessoa, B. Saramago, Bovine serum albumin conformational changes upon adsorption on titania and on hydroxyapatite and their relation with biomineralization, J. Biomed. Mater. Res. A 70A (3) (2004) 420–427.
37. W. Yuan et al. Preparation and Characterization of recombinant human growth hormone- Zn<sup>2+</sup>–dextran nanoparticles using aqueous phase – aqueous phase emulsion. Nanotechnology, Biology, and Medicine 8 2012.
38. OluFunmi L. Johnson, Warren Jaworowicz, Jeffrey L. Cleland Pharmaceutical Research The Stabilization and Encapsulation of Human Growth Hormone into Biodegradable Microsphere June 1997, Volume 14, Issue 6, pp 730-735.

39. Panagi, Z.; Beletsi, A.; Evangelatos, G.; Livaniou, E.; Ithakissios, D.S.; Avgoustakis, K. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2001, 221, 143–152.
40. Hirenkumar K. Makadia and Steven J. Siegel. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011, 3, 1377-1397; doi:10.3390/polym3031377
41. Wu Shen Xue and Wang Nuo. Synthesis, characterization, Biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation *J. Biomater. Sci. Polymer End*, Vol. 12, No. 1, pp. 21-34 (2001)
42. Goldman, L. Ausiello D. *Cecil Medicine*. 23 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008.
43. Abreu, MER. Hormônio do crescimento no processo de osseointegração de implantes de titânio - estudo experimental e revisão de literatura. 2011. 117f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.