

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO

**ESTUDO DE FILMES DE POLICAPROLACTONA CARREADOS COM
ATORVASTATINA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO EM
REGENERAÇÃO TECIDUAL**

DEBORA BAPTISTA PEREIRA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO DE FILMES DE POLICAPROLACTONA CARREADOS COM
ATORVASTATINA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO EM
REGENERAÇÃO TECIDUAL

DEBORA BAPTISTA PEREIRA

Sob a Orientação da Professora Dr^a.

Roberta Helena Mendonça

e Coorientação da Dr^a.

Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P426e Pereira, Debora Baptista, 1994-
Estudo de filmes de Policaprolactona carreados com Atorvastatina
para potencial aplicação em regeneração tecidual / Debora Baptista Pereira. -
Seropédica, 2020. 94 f.: il.

Orientadora: Roberta Helena Mendonça.
Coorientadora: Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Engenharia Química, 2020.

1. Atorvastatina. 2. Policaprolactona. 3. *Solvente casting*. 4. Liberação
controlada. I. Mendonça, Roberta Helena, 1980-, orient. II. Ferreira de
Carvalho Patrício, Beatriz, 1987-, coorient. III Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Engenharia Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DEBORA BAPTISTA PEREIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 18/02/2020.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Roberta Helena Mendonça. Dra. UFRRJ. (Orientadora/Presidente da banca)

Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio. Dra. LMN/Farmanguinhos (Coorientadora)

Livia Deris Prado. Dra. LDVA/ Farmanguinhos

Daniele Cruz Bastos. Dra. UEZO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E
CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

Emitido em 2020

TERMO Nº 522/2020 - PPGEQ (12.28.01.00.00.00.42)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 15/12/2020 17:24)

ROBERTA HELENA MENDONCA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DEQ (12.28.01.00.00.00.45)

Matrícula: 2626057

(Assinado digitalmente em 14/12/2020 13:59)

LIVIA DERIS PRADO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 118.790.167-96

(Assinado digitalmente em 14/12/2020 13:33)

DANIELE CRUZ BASTOS

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 091.723.287-97

(Assinado digitalmente em 14/12/2020 11:03)

BEATRIZ FERREIRA DE CARVALHO PATRICIO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 124.366.057-00

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:

522, ano: **2020**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **14/12/2020** e o código de verificação: **da5cbaa95a**

Dedico esse trabalho aos meus pais Mario e Rosania, que sempre foram meus maiores incentivadores e minha maior força para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir chegar onde estou hoje.

Aos meus pais Mario e Rosania, por terem me ensinado valores que carregarei para o resto da minha vida, por terem acreditado em mim e se esforçado para me darem todo o suporte necessário.

À professora Roberta Helena Mendonça, pela orientação, amizade e confiança que depositou em mim.

À minha coorientadora Beatriz Patricio, pela paciência, dedicação e suporte no desenvolvimento deste trabalho.

À Hέλvecio Vinício Antunes Rocha, Michelle Alves Sarcinelli e Marcelo Henrique da Cunha Chaves, do Laboratório de Micro e Nanotecnologia de Farmanguinhos, por toda colaboração, gentileza e contribuições essenciais ao presente trabalho.

À técnica Anastácia do Instituto de Química da UFRRJ pelas análises de Espectrometria de infra-vermelho com transformada de Fourier.

À Izadora e ao Prof. Lindoval, do Laboratório de Catálise/UFRRJ-IT-DEQ pela realização análise de difração de raios-X.

Ao Laboratório de Micro e Nanotecnologia de Farmanguinhos (LMN/FIOCRUZ) pelas análises de microscopia eletrônica de varredura, termogravimetria, calorimetria exploratória diferencial e testes *in vitro*, assim como pela doação do fármaco atorvastatina.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Materiais do DEQ-UFRRJ, Talita, Hellen, Yasmin, Vinício e Matheus por dividirem momentos de felicidade, ansiedade, conhecimento e muito trabalho.

Às minhas queridas amigas, Priscila, Bruna, Isabelle, Caroline, Jeane, Thaiz, Amanda, Mayara, Rafaela. Vocês foram meu porto seguro por todos esses anos e se tive forças para chegar onde estou foi graças a vocês.

Aos amigos que a UFRRJ me presenteou, Dominique, Iuri, Sabrina, Lucas Oliveira, Glaucia, Lucas Tricarico, Dayane, Aleixo, Gabriela, Jonathan, Luiz Fernando, Florence, por todo apoio e por sempre estarem torcendo por mim.

À minha querida avó Lucy, que hoje acompanha minhas conquistas de um lugar distante.

Ao meu querido amigo Cassiano Pedro (*in memoriam*), cujo exemplo de determinação segue me inspirando até hoje.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por todo o conhecimento que me proporcionou e por ter sido minha maior conquista acadêmica e ao PPGEQ

Finalmente, agradeço à CAPES, pois, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

RESUMO

PEREIRA, Debora Baptista. **Estudo de filmes de policaprolactona carregados com atorvastatina para aplicação em regeneração tecidual**. 2020. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Danos ao tecido cartilaginoso e ósseo são causados por diversos fatores como traumas, inflamações e envelhecimento e podem acarretar na perda tecidual com comprometimento funcional. Por ser um tecido que apresenta baixa ou até mesmo nenhuma capacidade regenerativa, se torna difícil o tratamento e recuperação. Na tentativa de superar estes problemas, pesquisadores têm desenvolvido e aperfeiçoado diferentes técnicas regenerativas baseadas na utilização de biomateriais poliméricos. Junto a esses, é de interesse utilizar um fármaco com propriedades benéficas para auxiliar o tratamento das áreas cartilaginosas danificadas pelo desgaste causado por inflamações e lesões. A atorvastatina (ATV), estatina redutora de colesterol, tem exibido em diversos estudos ações secundárias interessantes, como anabolismo ósseo devido ao seu uso prolongado. Entretanto, são necessárias altas doses desse insumo para esse efeito e as formas comercializadas desse fármaco são comprimidos de uso oral, tendo pouco direcionamento para o tecido cartilaginoso e ósseo. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi desenvolver e avaliar filmes poliméricos para liberação controlada de atorvastatina. Nesse contexto, foram desenvolvidos, filmes compostos por policaprolactona (PCL), um polímero sintético biodegradável, contendo ATV. Os filmes foram produzidos através da técnica de *solvent casting* utilizando duas metodologias diferentes, sem e com solubilização do fármaco (métodos 1 e 2 respectivamente) e com diferentes proporções fármaco/polímero. Esses foram caracterizados pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), MEV acoplado a espectroscopia de energia dispersiva (EDS), difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). De acordo com os resultados obtidos por essas técnicas, foi possível concluir que os filmes produzidos pelo método 2 foram considerados melhores por apresentarem maior homogeneidade na dispersão do fármaco. A liberação do fármaco presente nos melhores filmes foi avaliada em solução tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C e rotação de 75 rpm em um dissolutor com sensores de fibra ótica, registrando a liberação em tempos pré-definidos por 5 dias. Através desse teste demonstrou-se que o mesmo foi liberado no tempo estudado de forma prolongada, e que tanto a morfologia do material quanto o processo de difusão têm influência no mecanismo de liberação, sugerindo que o material na superfície é liberado primeiro e em seguida, o filme sofre erosão, disponibilizando o fármaco. A degradação dos filmes foi observada através do MEV realizada após a liberação, comprovando o processo de erosão. Portanto, os filmes desenvolvidos têm potencial aplicação para liberação controlada de fármacos, podendo futuramente ser utilizado como biomaterial para regeneração do tecido cartilaginoso.

Palavras-chave: Atorvastatina, policaprolactona, *solvent casting*, liberação controlada.

ABSTRACT

PEREIRA, Debora Baptista. **Study of atorvastatin-loaded polycaprolactone films for application on tissue regeneration.** 2020. 93p. Dissertation (Master in Chemical Engineering, Chemical Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Damage to cartilaginous and bone tissue is caused by several factors such as trauma, inflammation and aging and can lead to tissue loss with functional impairment. Because it is a fabric that has low or even no regenerative capacity, treatment and recovery is difficult. In an attempt to overcome these problems, researchers have developed and perfected different regenerative techniques based on the use of polymeric biomaterials. Along with these, it is of interest to use a drug with beneficial properties to assist the treatment of cartilage areas damaged by the wear and tear caused by inflammation and injury. Atorvastatin (ATV), a cholesterol-lowering statin, has shown interesting secondary actions in several studies, such as bone anabolism due to its prolonged use. However, high doses of this input are necessary for this purpose and the commercialized forms of this drug are tablets for oral use, with little direction for cartilage and bone tissue. Thus, the objective of the work was to develop and evaluate polymeric films for controlled release of atorvastatin. In this context, films composed of polycaprolactone (PCL), a biodegradable synthetic polymer containing ATV, were developed. The films were produced using the solvent casting technique using two different methodologies, without and with drug solubilization (methods 1 and 2 respectively) and with different drug / polymer proportions. These were characterized by scanning electron microscopy (SEM), SEM coupled to dispersive energy spectroscopy (EDS), X-ray diffraction (DRX), Fourier transform infrared spectrometry (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry. (DSC). According to the results obtained by these techniques, it was possible to conclude that the films produced by method 2 were considered better because they present greater homogeneity in the dispersion of the drug. The release of the drug present in the best films was evaluated in a phosphate buffer solution (pH 7.4) at 37 ° C and rotation of 75 rpm in a dissolver with fiber optic sensors, recording the release at predefined times for 5 days. Through this test it was demonstrated that it was released in the studied time in a prolonged way, and that both the material morphology and the diffusion process have an influence on the release mechanism, suggesting that the material on the surface is released first and then, the film is eroded, making the drug available. The degradation of the films was observed through the SEM performed after the release, proving the erosion process. Therefore, the developed films have potential application for controlled release of drugs, and may in the future be used as a biomaterial for the regeneration of cartilage tissue.

Keywords: Atorvastatin, polycaprolactone, solvent casting, controlled release.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Molécula da Atorvastatina Cálcica (ZHANG et al., 2009)..... | 7 |
| Figura 2: Estrutura da poli(ϵ -caprolactona) (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). ... | 13 |
| Figura 3: Representação esquemática da sequência experimental utilizada para a produção do pó e subsequente preparo dos filmes. | 23 |
| Figura 4: Aparelho para teste de dissolução de bancada (Evolution Model 6300, Distek). Autoria própria..... | 29 |
| Figura 5: Filmes produzidos pelo método 1, 2 e pcl puro: (a) PA4-1, (b) PA8-1, (c) PA12-1, (d) PA16-1, (e) PA4-2, (f) PA8-2, (g) PA12-2, (h) PA16-2 e (i) filme de PCL puro | 31 |
| Figura 6: Análise química da ATV – FTIR..... | 32 |
| Figura 7: Espectro do FTIR do PCL..... | 33 |
| Figura 8: Espectros de FTIR dos filmes, do PCL e Atorvastatina utilizando método 1. As linhas pontilhadas indicam algumas das bandas características dos materiais puros, para facilitar o entendimento do resultado obtido nos filmes produzidos | 34 |
| Figura 9: Espectros de FTIR dos filmes, do PCL e Atorvastatina utilizando método 2. As linhas pontilhadas indicam algumas das bandas características dos materiais puros, para facilitar o entendimento do resultado obtido nos filmes produzidos. | 35 |
| Figura 10: Difratoograma de raios X da atorvastatina: I ($2\theta = 9,24^\circ$ e $9,59^\circ$), II ($2\theta = 10,37^\circ$), III ($2\theta = 11,96^\circ$ e $12,30^\circ$), IV ($2\theta = 17,05^\circ$), V ($2\theta = 19,57^\circ$) VI ($2\theta = 21,65^\circ$) e VII ($2\theta = 22,78^\circ$, $23,40^\circ$, $23,81^\circ$) | 37 |
| Figura 11: Difratoograma de raios X do filme de PCL: I ($2\theta = 22,2$) e II ($2\theta = 25,2$)..... | 37 |
| Figura 12: Difratoograma de raios X da ATV, PCL e dos filmes obtidos através do método 1, com solubilização do fármaco: PA4-1 (40mg de ATV), PA8-1 (80mg de ATV), PA12-1 (120mg de ATV) e PA16-1 (160mg de ATV)..... | 38 |
| Figura 13: Difratoograma de raios X da ATV, PCL e dos filmes obtidos através do método 2, com solubilização do fármaco: PA4-2 (40mg de ATV), PA8-2 (80mg de ATV), PA12-2 (120mg de ATV) e PA16-2 (160mg de ATV)..... | 39 |
| Figura 14: Curvas de TGA e DTG da PCL, respectivamente | 41 |
| Figura 15: Curvas de TGA e DTG da ATV, respectivamente | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 16: Termograma de TGA e DTG da ATV, PCL e dos filmes de PCL/ATV utilizando o método 1: PA4-1 (40mg de ATV), PA8-1 (80mg de ATV), PA12-1 (120mg de ATV) e PA16-1 (160mg de ATV). | 43 |
| Figura 17: Termograma de TGA e DTG da ATV, PCL e dos filmes de PCL/ATV utilizando o método 2: PA4-2 (40mg de ATV), PA8-2 (80mg de ATV), PA12-2 (120mg de ATV) e PA16-2 (160mg de ATV). | 44 |
| Figura 18: Curvas de DSC da PCL. | 47 |
| Figura 19: Curvas de DSC da Atorvastatina. | 47 |
| Figura 20: Curvas de DSC da ATV, PCL e filmes de PCL/ATV produzidas pelo método 1: PA4-1 (40mg de ATV), PA8-1 (80mg de ATV), PA12-1 (120mg de ATV) e PA16-1 (160mg de ATV). | 48 |
| Figura 21: Curvas de DSC da ATV, PCL e filmes de PCL/ATV produzidas pelo método 1: PA4-2 (40mg de ATV), PA8-2 (80mg de ATV), PA12-2 (120mg de ATV) e PA16-2 (160mg de ATV). | 49 |
| Figura 22: Imagens de MEV da Atorvastatina em pó. | 50 |
| Figura 23: Imagens de MEV do filme de PCL. | 50 |
| Figura 24: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA4-1 | 51 |
| Figura 25: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA8-1. | 52 |
| Figura 26: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA12-1. | 52 |
| Figura 27: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA16-1. | 53 |
| Figura 28: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA4-2. | 54 |
| Figura 29: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA8-2. | 54 |
| Figura 30: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA12-2. | 55 |
| Figura 31: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA16-2. | 55 |
| Figura 32: Espectro de EDS para a área analisada da ATV. | 56 |
| Figura 33: Espectro de EDS para a área analisada da PCL. | 56 |

| | |
|---|----|
| Figura 34: Espectro de EDS para a área analisada do filme PA4-2 em solução tampão fosfato pH 7,4. | 57 |
| Figura 35: Espectro de EDS para a área analisada do filme de PA8-2 em solução tampão fosfato pH 7,4. | 57 |
| Figura 36: EDS dos elementos presentes no filme PA4-2. | 58 |
| Figura 37: EDS dos elementos presentes no filme PA8-2. | 58 |
| Figura 38: Curva analítica da atorvastatina em solução tampão fosfato pH=7,4. | 60 |
| Figura 39: Perfil de dissolução da ATV contida nos filmes PA4-2 e PA8-2. Filmes produzido pela técnica de solvent casting em solução tampão fosfato pH 7,4. | 60 |
| Figura 40: Avaliação do perfil de liberação do fármaco do filme PA4-2 em solução tampão fosfato pH 7,4 de acordo com diferentes modelos linearizados: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, Hixson-Crowell, Higuchi e Korsmeyer-Peppas..... | 63 |
| Figura 41: Avaliação do perfil de liberação do fármaco do filme PA8-2 em solução tampão fosfato pH 7,4 de acordo com diferentes modelos linearizados: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, Hixson-Crowell, Higuchi e Korsmeyer-Peppas..... | 64 |
| Figura 42: MEV filme PA4-2 (40mg de ATV) após a liberação do fármaco (6000 minutos)..... | 66 |
| Figura 43: MEV filme PA8-2 (80mg de ATV) após a liberação do fármaco (6000 minutos)..... | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------|---|
| AINES | Anti-inflamatórios não esteroidais |
| ATV | Atorvastatina |
| C | Carbono |
| Ca | Cálcio |
| DRX | Difração de raios X |
| DSC | Calorimetria Diferencial de Varredura |
| DTG | Derivada da TGA |
| EDS | Espectroscopia de energia dispersiva |
| FTIR | <i>Infrared Spectroscopy with Fourier Transform</i> , do português, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier |
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz |
| F | Flúor |
| HDL-C | <i>High density lipoprotein cholesterol</i> , do português, colesterol de lipoproteína de alta densidade |
| IQ | Instituto de Química |
| LDL | <i>Low density lipoprotein</i> , do português, lipoproteína de baixa densidade |
| MEC | Matriz extra celular |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| Mw | <i>Molecular weight</i> , do português, peso molecular |
| N | Nitrogênio |
| Na | Sódio |
| PA4-1 | Filme de PCL com 4% de atorvastatina produzido pelo método 1 |
| PA8-1 | Filme de PCL com 8% de atorvastatina produzido pelo método 1 |
| PA12-1 | Filme de PCL com 12% de atorvastatina produzido pelo método 1 |
| PA16-1 | Filme de PCL com 16% de atorvastatina produzido pelo método 1 |
| PA4-2 | Filme de PCL com 4% de atorvastatina produzido pelo método 2 |
| PA8-2 | Filme de PCL com 8% de atorvastatina produzido pelo método 2 |
| PA12-2 | Filme de PCL com 12% de atorvastatina produzido pelo método 2 |
| PA16-2 | Filme de PCL com 16% de atorvastatina produzido pelo método 2 |
| PCL | Policaprolactona |

| | |
|---------|---|
| PGA | Poli(ácido glicólico) |
| PLA | Poli(ácido láctico) |
| PLGA | Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) |
| PMMA | Polimetilmetacrilato |
| PVA | Poliacetato de vinila |
| O | Oxigênio |
| OA | Osteoartrite |
| S | Enxofre |
| SLContr | Sistema de liberação controlada |
| SLC | Sistema de liberação tradicional |
| T_c | Temperatura de cristalização |
| T_f | Temperatura final em que acontece a perda de massa |
| T_g | Temperatura de transição vítrea |
| TGA | Thermogravimetric analysis, do português, análise termogravimétrica |
| T_i | Temperatura inicial em que acontece a perda de massa |
| T_m | Temperatura fusão |
| UFRRJ | Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro |
| U.a. | Unidade de absorbância |
| UV-Vis | Ultravioleta-visível |
| X_c | Grau de cristalinidade |

Sumário

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introdução..... | 1 |
| 2 | Objetivo Geral..... | 4 |
| 3 | Revisão Bibliográfica..... | 5 |
| 3.1 | Cartilagem | 5 |
| 3.2 | Atorvastatina..... | 7 |
| 3.3 | Engenharia Tecidual..... | 9 |
| 3.4 | Biomateriais | 10 |
| 3.5 | Policaprolactona..... | 12 |
| 3.6 | Sistemas de liberação de fármacos..... | 14 |
| 4 | Materiais e Métodos..... | 23 |
| 4.1 | Produção dos filmes de PCL/ATV por <i>solvent casting</i> | 23 |
| 4.2 | Caracterização da ATV, PCL e filmes de PCL/ATV | 24 |
| 4.2.1 | Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)..... | 24 |
| 4.2.2 | Difração de raios X (DRX)..... | 25 |
| 4.2.3 | Análises Térmicas (TGA e DSC)..... | 26 |
| 4.2.4 | Microscopia eletrônica de varredura convencional (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)..... | 27 |
| 4.2.5 | Análise de liberação do fármaco presente na estrutura dos filmes de PCL/Atorvastatina (SUV) | 28 |
| 4.2.6 | Análise de degradação dos filmes de PCL/ATV após liberação do fármaco. | 30 |
| 5 | Resultados e Discussões | 31 |
| 5.1 | Análise química do fármaco, polímero e filmes – FTIR..... | 32 |
| 5.2 | Análise microestrutural das partículas do fármaco, filme de PCL puro e filmes PCL/ATV - DRX..... | 36 |
| 5.3 | Análise térmica do fármaco, polímero e filmes - TGA, DTG e DSC..... | 40 |
| 5.4 | Análise morfológica do fármaco, polímero e filmes – MEV/EDS..... | 49 |

| | | |
|-----|--|----|
| 5.5 | Estudo da liberação da ATV em filmes de PCL/ATV | 59 |
| 5.6 | Estudo da degradação após testes <i>in vitro</i> | 66 |
| 6 | Conclusões..... | 69 |
| 7 | Sugestão para trabalhos futuros | 70 |
| 8 | Referências | 71 |

1 INTRODUÇÃO

A cartilagem é uma forma de tecido conjuntivo, que desempenha um papel crucial no corpo humano, fornecendo uma estrutura de suporte para órgãos e conectando vários tipos de tecido entre si (Sefat *et al.*, 2019; Ulici, Chen, Cheng, & Tuan, 2017; Vinatier & Guicheux, 2016). Após o tecido da cartilagem ser danificado, devido à sua natureza avascular, há uma dificuldade na proliferação de condrócitos, célula do tecido cartilaginoso (Weeren, Badylak, Benders, & Rene, 2013), o que dificulta a regeneração desse tecido, podendo evoluir para diversas doenças, sendo a osteoartrite (OA) a mais frequente (Rahmati, Mobasheri, & Mozafari, 2016; Sefat *et al.*, 2019). Essa doença se caracteriza pelo desgaste da cartilagem articular e também por alterações ósseas. As causas vão desde defeitos das articulações até alterações do metabolismo (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2019). Novos dados apontam o colesterol e o metabolismo lipídico anormal como vetores catabólicos da doença (Choi *et al.*, n.d.; Zhai, 2019).

O tecido ósseo é um tecido dinâmico em constante remodelamento e tem por função: suportar partes moles, proteger órgãos, armazenar íons, apoiar músculos e produzir células sanguíneas (Portinho, Boin, & Bertolini, 2008). A osteoporose, por sua vez, é uma doença esquelética progressiva, caracterizada pela fragilidade óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com consequente aumento da suscetibilidade à fratura, podendo essas ocorrerem devido a lesões de baixo impacto. (Mora-Raimundo, Manzano, & Vallet-Regí, 2017).

Graças a complexidade de doenças nesses tecidos, na dificuldade do tratamento alcançar os mesmos, na carga mecânica que esses tecidos sofrem e por serem acometidos por doenças degenerativas, os tratamentos existentes na indústria para doenças nesses tecidos ósseos e cartilagosos não podem ser aceitos como curas absolutas (Perera, Gikas, & Bentley, 2012; Rahmati *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de biomateriais para regeneração tecidual é uma alternativa promissora para a recuperação de diversos tecidos, incluindo o tecido ósseo. Para tal, têm sido utilizadas as técnicas de engenharia tecidual, um campo de estudo emergente, que combina os princípios da engenharia com os das ciências biológicas para desenvolver substitutos biológicos que possam restaurar notavelmente as funções dos tecidos

alterados, visando tratar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Bernhard & Vunjak-novakovic, 2016; Lanza, Langer, & Vacanti, 2013).

Os avanços da engenharia tecidual vêm sendo acompanhados pelo desenvolvimento de arcabouços porosos (*scaffolds*), membranas para regeneração tecidual guiada, filmes para liberação controlada de fármacos, dentre outros (Barrère, Mahmood, Groot, & Blitterswijk, 2008).

O polímero sintético policaprolactona (PCL) tem sido utilizado em diferentes técnicas para a produção de biomateriais, tais como eletrofiação, *solvent casting*, moldagem por compressão, entre outras (Salmoria, Cardenuto, Roesler, Zepon, & Kanis, 2016; Woodruff & Hutmacher, 2010). Devido à sua biocompatibilidade e à biodegradabilidade (Hakkarainen & Albertsson, 2002), este é extensivamente estudado para administração controlada de medicamentos e aplicações de engenharia de tecidos em várias formulações. Sua compatibilidade com uma ampla gama de medicamentos permite a distribuição uniforme de medicamentos na matriz de formulação e sua degradação lenta, facilita a liberação em até vários meses (Sinha, Bansal, Kaushik, Kumria, & Trehan, 2004).

Para atuar no tratamento de doenças ligadas a cartilagem e ao tecido ósseo, um biomaterial ideal, além de ser biocompatível, biodegradável e de fornecer suporte à viabilidade e funcionalidade celular, deve servir ao propósito de fornecer substâncias, capazes de ajudar no tratamento da doença causadora do problema. A atorvastatina (ATV), uma estatina sintética, além de reduzir a incidência de doenças cardiovasculares (Gazzerro *et al.*, 2012; Korani *et al.*, 2019), coronárias (Brugts *et al.*, 2009; Vaquero *et al.*, 2007) e cerebrovasculares (Brugts *et al.*, 2009) também modera as concentrações plasmáticas de outros lipídios, incluindo triglicerídeos e colesterol presente na lipoproteína de alta densidade (HDL-C, do inglês *high density level*) (Korani *et al.*, 2019; Wen, Huang, Lu, & Yuan, 2019). Sabe-se ainda que as estatinas têm uma série de efeitos benéficos que independem das suas propriedades modificadoras sobre o metabolismo lipídico, incluindo o anabolismo ósseo, ações vasodilatadoras, antitrombóticas, antioxidantes, anti-inflamatórias e imunossupressoras (Bone *et al.*, 2007; Zeybek *et al.*, 2011). Essas características podem auxiliar na recuperação do tecido ósseo e no combate a inflamações na cartilagem articular.

No presente trabalho, de forma a avaliar e combinar o uso de fármacos associados a polímeros para a produção de biomateriais, que no caso da ATV é comercializada na forma de comprimidos, não tendo outro sistema de liberação além da forma oral, foram

desenvolvidos filmes de PCL incorporados com ATV para liberação controlada do fármaco. Desse modo, os filmes desenvolvidos têm possível aplicação como biomateriais, para que possam, futuramente, auxiliar no tratamento da degeneração da cartilagem, sendo um material versátil capaz de ser implantado em diferentes locais de acordo com a necessidade do paciente. Vale ressaltar que os filmes produzidos neste trabalho utilizando ATV e PCL não foram estudados por outros autores, sendo um trabalho inédito.

2 OBJETIVO

Objetivo Geral

Esta dissertação teve como objetivo a produção de filmes de Policaprolactona incorporados com atorvastatina para aplicação no tratamento de regeneração tecidual de doenças cartilaginosas e ósseas.

Objetivos Específicos

- i. Produção de filmes poliméricos através de duas metodologias diferentes com proporções de PCL e atorvastatina diferentes.
- ii. Caracterizar os filmes por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmicas.
- iii. Estudar a liberação *in vitro* da atorvastatina dos filmes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cartilagem

A cartilagem é uma forma de tecido conjuntivo que fornece suporte para órgãos e conecta vários tipos de tecido entre si. Além disso, esse tecido cria superfícies entre os ossos o que permite que na articulação não haja fricção e nem dor, atuando como um amortecedor; também é responsável por formar modelos de crescimento para desenvolvimento ósseo (Sefat *et al.*, 2019; Ulici *et al.*, 2017; Vinatier & Guicheux, 2016). A consistência da cartilagem é dada por uma substância gelatinosa conhecida como sulfato de condroitina, na qual fibras protéicas incorporadas, como colágeno e elastina, conferem ao tecido uma natureza rígida porém flexível (Sefat *et al.*, 2019).

A cartilagem articular é um tecido avascular, esparsamente celularizado, cujas características bioquímicas refletem principalmente a composição da matriz extracelular, que é uma rede estrutural complexa não celular, que rodeia e suporta as células do tecido conjuntivo (Portinho *et al.*, 2008). Esta é hiperhidratada (conteúdo de água variando de 66 a 80%), 5-6% são componentes inorgânicos (principalmente hidroxapatita) e do restante orgânico, 48-62% é formado por colágeno tipo II e 22-38% por proteoglicanas (Rezende, Hernandez, Camanho, & AmatuZZi, 2000). A cartilagem pode sofrer alterações na sua constituição devido a causas inflamatórias, trauma ou envelhecimento, o que leva à diminuição da celularidade e posterior degradação da matriz extracelular (Vinatier & Guicheux, 2016).

A ausência de vascularização e proliferação de condrócitos (células presentes no tecido cartilaginoso) fornece a cartilagem uma baixa capacidade de auto-cura que leva a diversas doenças como oostartrite, artrite reumatoide, osteogênese imperfeita, osteocondrodisplasia, policondondia relaxante, osteocronrite, cosocondrite, escleroderma, astrite séptica e condromossarcoma (Rahmati *et al.*, 2016; Sefat *et al.*, 2019).

No conjunto das doenças relacionadas ao desgaste da cartilagem, a OA é a mais frequente. Ela é responsável por 7,5% de todos os afastamentos de trabalho e é o quarto maior fator de impacto determinante da aposentadoria (6,2%) no Brasil (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2019). A incidência dessa doença aumenta com o passar dos

anos, sendo pouco comum antes dos 40 e mais comum após os 60 (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2019). Na idade de 75 anos, 85% das pessoas têm evidência radiológica ou clínica da doença, mas somente 30 a 50% dos indivíduos com alterações observadas nas radiografias queixam-se de dor crônica (Organização mundial da Saúde, 2018, Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2019). Isso acaba levando a demora no tratamento e agravando a doença.

Novos dados apontam o colesterol, seus metabólitos e o receptor ROR α (receptor órfão alfa - participa da regulação transcricional de alguns genes envolvidos no ritmo circadiano) como vetores catabólicos da doença semelhante à OA em camundongos (Zhai, 2019). Estudos sobre anormalidades metabólicas e obesidade, em particular o metabolismo lipídico anormal, foi associado à OA em humanos (Beier, 2019).

Os tratamentos atuais para a degeneração da cartilagem incluem métodos cirúrgicos e não cirúrgicos. Dentre os métodos cirúrgicos destacam-se: artroplastia (reconstrução cirúrgica ou substituição de uma articulação por um implante) (Jackson & Nordentoft, 2010), artroscopia (procedimento endoscópico, minimamente invasivo, através do qual se examina e, por vezes, se realiza o tratamento dos danos do interior de uma articulação) (Jackson & Nordentoft, 2010) e enxerto osteocondral (operação na qual uma pequena amostra de cartilagem saudável com parte do tecido ósseo subjacente é retirada de uma área doadora e implantado no site do destinatário) (Sefat *et al.*, 2019). A desvantagem dos procedimentos citados são mobilidade reduzida, perda de parte de tecido saudável durante o processo e, em alguns casos, dor local (Vinatier & Guicheux, 2016). Além do risco cirúrgico.

Os tratamentos não cirúrgicos incluem exercícios físicos (fisioterapia) e utilização de medicamentos (B. R. Costa *et al.*, 2017). Os exercícios físicos ajudam a aumentar a mobilidade da articulação e na reparação da cartilagem, e, no caso do tratamento farmacológico, são utilizados medicamentos analgésicos e agentes anti-inflamatórios não esteroides e esteroidais. A maioria dos medicamentos à base de esteroides, com o uso prolongado causam danos a longo prazo no fígado e Síndrome de Cushing, quando administrados por via oral e, portanto, não é a primeira escolha do tratamento (Page, Hinman, & Bennell, 2011; Sostres *et al.*, 2010).

O tecido ósseo é um tecido dinâmico em constante remodelamento; tem por função: suportar partes moles, proteger órgãos, armazenar íons, apoiar músculos e produzir células sanguíneas. É um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado (Portinho *et al.*, 2008).

A osteoporose é uma doença esquelética progressiva, caracterizada pela fragilidade óssea e deterioração da arquitetura do tecido ósseo, com consequente aumento da suscetibilidade à fratura, sendo a ocorrência de fraturas por baixo impacto, o principal desafio clínico (Mora-Raimundo *et al.*, 2017). Os tratamentos atuais para essa doença têm algumas restrições, como a adequação e segurança a longo prazo, sendo que ainda não existe solução satisfatória para o enfraquecimento ósseo da osteoporose (Mora-Raimundo *et al.*, 2017). Na maioria das fraturas ósseas, a regeneração ocorre sem a necessidade de intervenções, devido a capacidade do osso de auto reparo. Todavia, algumas lesões maiores necessitam de intervenções cirúrgicas (Mora-Raimundo *et al.*, 2017).

Devido a complexidade da cartilagem e do tecido ósseo em termos de reparo, das causas primárias desconhecidas, de doenças degenerativas e das cargas mecânicas que ocorrem naturalmente, os tratamentos existentes para doenças que acometem esses tecido não podem ser aceitos como curas absolutas (Perera *et al.*, 2012; Rahmati *et al.*, 2016). Apesar de grandes feitos terem sido alcançados, ainda não existem biomateriais clinicamente aprovados e especificamente adaptados para aplicações na regeneração do tecido cartilaginoso e ósseo, sendo necessário o desenvolvimento de biomateriais capazes de restabelecer a regeneração normal da cartilagem.

3.2 Atorvastatina

A ATV é um agente redutor de lipídeos sintéticos de grande importância medicinal, comercializado pela primeira vez pela Pfizer, sendo prescrito para o controle do colesterol (Wan, Lu, Dalai, & Zhang, 2009). Sua molécula pode ser visualizada na Figura 1.

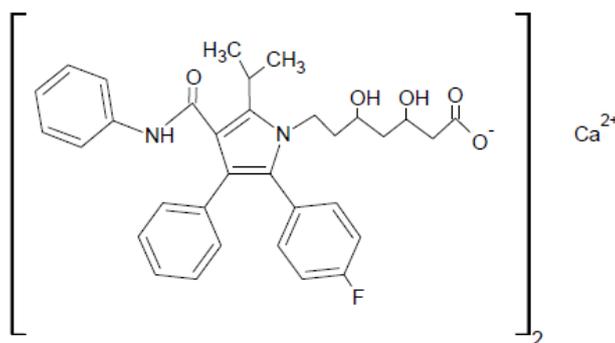


Figura 1: Molécula da Atorvastatina Cálcica (ZHANG *et al.*, 2009).

Atorvastatina faz parte da classe farmacológica das estatinas, que são fármacos frequentemente prescritos para o combate ao colesterol, exercendo seus efeitos através da inibição da HMG-CoA redutase, enzima fundamental na síntese do colesterol. Ao inibi-la, reduz o colesterol tecidual e há um aumento na expressão dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*), diminuindo a circulação dessa lipoproteína no sangue. É indicada para tratamento da hipercolesterolemia (aumento da quantidade de colesterol no sangue) isolada ou associada à hipertrigliceridemia (aumento dos níveis sanguíneos de triglicérides), sendo também utilizada na redução dos níveis sanguíneos de lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *high-density lipoprotein*), inclusive de transmissão genética/familiar (Sonje *et al.*, 2010)

A ATV é rapidamente absorvida após a administração oral, sendo que a fração absorvida e a biodisponibilidade absoluta são apenas cerca de 30% e 12%, respectivamente (Sonje *et al.*, 2010). Tal fato deve-se devido a uma depuração pré-sistêmica na mucosa gastrointestinal e/ou metabolismo de primeira passagem hepática (Shete, Puri, Kumar, & Bansal, 2010; Zhang *et al.*, 2009). Esse fármaco atinge concentrações máximas de plasma entre 1 a 2 horas e possui tempo de meia vida de 14 horas, porém a meia-vida da atividade de inibição da HMG-CoA redutase é 20-30 horas devido a presença de metabolitos ativos derivados desse fármaco que possuem maior duração. Tem sua biotransformação hepática e sua excreção biliar, majoritariamente, mas é excretada também pela via urinária (cerca de 2%) (Suave, Coelho, Amico, & Pezzin, 2009).

Em geral, os efeitos colaterais da ATV são bem tolerados e uma grande quantidade de dados clínicos tem demonstrado a segurança da utilização de altas doses desse medicamento, o que justifica a sua vasta utilização (Schachter, 2005). Além de moderar as concentrações plasmáticas de outros lipídios, incluindo triglicerídeos e HDL-C (Korani *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2019), reduzem a incidência de doenças cardiovasculares (Gazzerro *et al.*, 2012; Korani *et al.*, 2019), coronárias (Brugts *et al.*, 2009; Vaquero *et al.*, 2007) e cerebrovasculares (Brugts *et al.*, 2009).

Sabe-se ainda que as ATV têm uma série de efeitos benéficos que independem das suas propriedades modificadoras sobre o metabolismo lipídico, os chamados efeitos pleiotrópicos, incluindo o anabolismo ósseo, ações vasodilatadoras, antitrombóticas, antioxidantes, anti-inflamatórias e imunossupressoras (Bone *et al.*, 2007; Zeybek *et al.*, 2011). Gupta *et al.* (2008) mostrou que esse fármaco foi capaz de aumentar os níveis de

vitamina D em 33% e causou um estímulo na densidade mineral óssea (DMO) em pacientes com doenças cardiovasculares, sendo medida no colo do fêmur, coluna vertebral e corpo inteiro. Em 2002, Pasco observou em estudo retrospectivo de controle de casos, que o uso de estatinas estava associado a uma redução de 60% no risco de fraturas ósseas, ao avaliarem 1.375 mulheres de idade entre 50 e 95 anos (Pasco, Kotowicz, Henry, Sanders, & Nicholson, 2002).

CHAN (2000) realizaram um estudo caso-controle com informações obtidas em serviços de saúde nos Estados Unidos. Neste estudo verificaram os casos de mulheres idosas com diagnóstico de fratura óssea não patológica (928 casos), que foram combinados com os de pacientes-controle sem fraturas no período de um ano (2.747). Mulheres com histórico de 13 meses ou mais de uso de estatinas mostraram 45 a 52% de redução no risco de fraturas.

O mecanismo para essa diminuição de risco de fraturas ainda não está esclarecido, assim, somente novas pesquisas poderão elucidar a ação dos inibidores da HMG-CoA redutase no tecido ósseo e comprovar sua utilização na regeneração desse tecido, podendo vir a atuar na reparação de defeitos ósseos.

3.3 Engenharia Tecidual

A engenharia de tecidos, campo de pesquisa surgido na década de 1990, foi definida por Langer e Vacanti em 1993 como “um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida ao desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoraram a função do tecido” (Langer & Vacanti, n.d.; Vinatier & Guicheux, 2016).

A engenharia de tecidos é um campo de estudo emergente que combina os princípios de engenharia e ciências biológicas para desenvolver substitutos biológicos que possam restaurar notavelmente as funções dos tecidos alterados (Bernhard & Vunjak-novakovic, 2016; Langer & Vacanti, n.d.). É baseada em uma associação de biomateriais, células e fatores biológicos ou ambientais, também conhecida como “tríade da engenharia de tecidos” (Sci, 2017). A engenharia de tecidos beneficiou-se grandemente dos recentes avanços na engenharia de materiais e na compreensão do papel dos fatores de crescimento e das células-tronco na regeneração de tecidos (Singh, Ramakrishna, & Singh, 2017). São utilizadas como ferramentas essenciais nessa área as células, biomateriais e os fatores de

crescimento (Bernhard & Vunjak-novakovic, 2016). Com o objetivo de auxiliar a regeneração e restauração dos tecidos lesados, gerando substitutos biológicos capazes de reparar, conservar ou aperfeiçoar o desempenho e atividade dos mesmos, aprimorando e desenvolvendo novas terapêuticas e fabricando novos biomateriais (Singh et al., 2017).

Em geral, a engenharia de tecidos combina células e biomateriais para a construção de um novo tecido, replicando o microambiente do mesmo (Lanza et al., 2013). Assim, temos a formação da tríade da engenharia de tecidos, composta pelas células, biomateriais e fatores de crescimento. Nela, as células são responsáveis por sintetizar a matriz do novo tecido. Os *scaffolds* são formados por matrizes porosas, que fornecem um suporte físico e ambiente apropriado para as células proliferarem e adquirirem uma conformação semelhante à que têm nos órgãos e tecidos do organismo (C. Silva & Revisão, 2010). Com o intuito de ajudar a proliferação e diferenciação celular podem ser adicionados nesses materiais fatores de crescimento como uma diversidade de proteínas, condrócitos ou mesmo fármacos (Bernhard & Vunjak-novakovic, 2016; Langer & Vacanti, n.d.; Rezende *et al.*, 2000).

3.4 Biomateriais

Biomateriais são substâncias ou combinações de substâncias sintéticas ou naturais, projetados para substituírem parte ou integralmente a função orgânica de forma segura, econômica e aceitável fisiologicamente, agindo em contato direto com tecidos vivos e com sistemas biológicos. Podem ser de uso temporário ou definitivo, os quais visam tratar ou substituir, parcial ou totalmente, qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Carlos *et al.*, 2010; Oliveira, Oliveira, Machado, & Rosa, 2010).

Os biomateriais devem satisfazer alguns requisitos tais como: biodegradabilidade para a reconstrução de um tecido sem inflamação; biocompatibilidade para que o material execute uma resposta apropriada numa determinada aplicação, sem a obtenção de reações adversas quando este entra em contato com os tecidos vivos; os seus produtos de degradação não devem ser tóxicos nem devem provocar inflamação e devem ser retirados do corpo através das vias metabólicas; ausência de toxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade; facilidade de manipulação, reprodutibilidade e processamento em larga escala (Ghasemi-Mobarakeh, Kolahreez, Ramakrishna, & Williams, 2019).

O comportamento fisiológico do biomaterial pode ser classificado em: bioreabsorvíveis (lentamente decompostos pelo organismo e gradualmente substituídos), biotoleráveis (são aceitos pelo organismo, porém, normalmente, são isolados dos tecidos adjacentes pela formação de tecido fibroso), bioativos (ficam em contato direto com tecidos vivos pela presença de íons no biomaterial, que estabelecem união entre os tecidos e o material implantado, estimulando o crescimento celular) e bioinertes (materiais que apresentam uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, formando uma cápsula fibrosa não aderente ao redor do material) (Ghasemi-Mobarakeh *et al.*, 2019; Hudecki, Kiryczyn, & Łos, 2019).

A biocompatibilidade é um dos requisitos mais importantes na engenharia de tecidos, pois relacionam a interação das células e/ou sua adesão a superfície do material (C. Silva & Revisão, 2010). Existem três características da superfície dos materiais que são relevantes nos estudos de biocompatibilidade, estas são: a topografia, a composição química e a energia de superfície (C. Silva & Revisão, 2010). Essas características correspondem à primeira fase na interação da célula com o biomaterial porque conseguem determinar a capacidade das células de se diferenciarem ou não em contato com o implante. Caso as células se diferenciem, provocam a reconstituição do tecido original (C. Silva & Revisão, 2010).

As características hidrofílicas e hidrofóbicas dos materiais condicionam as interações entre as células e os materiais. Uma das explicações plausíveis para que isto aconteça é que algumas regiões da membrana celular lipídica são muito hidratadas e tendem a desenvolver contatos com superfícies igualmente hidratadas (C. Silva & Revisão, 2010).

Na engenharia de tecidos os biomateriais incluem os seguintes tipos: polímeros, cerâmicos, compósitos e metais. Sendo que os polímeros são os mais utilizados nessa área, especialmente para tratar doenças que acometem a cartilagem, devido às suas semelhanças, uma vez que apresentam as características estruturais do tecido e também oferecem uma elevada versatilidade nas propriedades mecânicas (Chen, Liang, & Thouas, 2013).

Os polímeros são classificados de acordo com sua origem em: naturais, cuja vantagem é de serem reconhecidos biologicamente pelo organismo, e sintéticos, tem a vantagem de serem produzidos de forma reprodutível em larga escala (Oliveira *et al.*, 2010). Podem ser utilizados para substituição de tecidos moles ou rígidos pois apresentam

variações na organização da sua estrutura molecular, propiciando a obtenção de diversas propriedades para aplicações específicas (Oliveira et al., 2010).

Ao considerar os benefícios dos biomateriais naturais, segundo a literatura, o foco das pesquisas se direcionou no uso de polímeros como colágeno (Li, Xing, Jiang, Ding, & Li, 2009; Suave et al., 2009), fibroína de seda (Saghazadeh *et al.*, 2018; Villanova, Oréface, & Cunha, 2010), quitosana (Kamaly, Yameen, Wu, & Farokhzad, 2016; Ram *et al.*, 2017), gelatina (Pachau, 2015), ácido hialurônico (Sinha *et al.*, 2004) e alginato (Narasimhan, 2001). Ainda assim, cabe ressaltar que, apesar das características interessantes dos polímeros de origem natural, tais como biodegradabilidade e o uso de recursos renováveis, muitos ainda não apresentam propriedades físicas idênticas aos polímeros petroquímicos (por exemplo, maior fragilidade e decomposição muito rápida) e, em especial, têm custos de produção elevados (Bastos, 2007)

Como polímeros sintéticos estão descritos na literatura desses materiais: polietileno, poliuretano, polimetilmetacrilato de metila, politetrafluoretileno, poliamida 66, poli(tereftalato de etileno), silicone e poli(ácido láctico), policaprolactona (PCL). Esses polímeros já foram aplicados em diferentes superfícies como articulares, vasos, cartilagens, sutura, substituição de tecidos moles e placas de reparação óssea (Chen *et al.*, 2013; Willerth & Sakiyama-elbert, 2018). Algumas das vantagens do uso desses polímeros são menor custo de produção, lenta degradação e facilidade de reprodutibilidade (Franchetti & Marconato, 2006).

Embora haja uma variedade de biomateriais sendo explorada, neste momento, nenhum deles englobam todas as propriedades ideais para utilização em cartilagem e tecido ósseo (Carlos *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010).

3.5 Policaprolactona

A poli (ϵ - caprolactona), ou policaprolactona é um polímero sintético, cuja estrutura química é apresentada na Figura 2. Pode ser preparado por polimerização via abertura de anel do monômero de ϵ -caprolactona através do uso de catalisadores aniônicos, catiônicos e de coordenação ou também por polimerização via abertura do mesmo anel por radicais livres (Sasmazel, 2016).

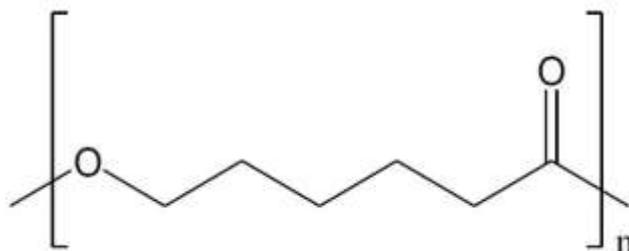


Figura 2: Estrutura da poli(ϵ -caprolactona) (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

O polímero que apresenta regiões com alta cristalinidade, o que garante um pico de fusão bem definido e intenso. Apresenta como características especiais um caráter hidrofóbico permitindo que sua estrutura final permaneça inalterável na presença de água, uma baixa ordem de toxicidade, baixo ponto de fusão (50-60 °C), temperatura de transição vítrea abaixo da temperatura ambiente (-60°C), grande miscibilidade ou compatibilidade mecânica com outros tipos de polímeros, baixa viscosidade e densidade no valor de 1,13 g/cm₃ (Amass, Amass, & Tighe, 1998).

As propriedades de baixa viscosidade e grande miscibilidade tornam esse polímero um bom auxiliar de processamento de polímeros, reduzindo assim a temperatura de transição vítrea e o módulo de elasticidade de blendas poliméricas (mistura de dois ou mais polímeros) (Morais, Guimarães, & Elias, 2007).

O PCL é um polímero solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2- nitropropano em temperatura ambiente. Além disso, possui uma lenta solubilidade em acetona, 2- butanona, acetato de etila, dimetilformamida, acetonitrila e é insolúvel em álcool e em éter dietílico (Morais *et al.*, 2007).

As aplicações desse polímero são diversas, como: em sistemas para liberação controlada de fármacos; recobrimento de cânulas uretrais; e na engenharia tecidual, em tecido epidérmico, muscular, ósseo e cartilaginoso (Oladapo, Zahedi, & Adeoye, 2019; Salmoria *et al.*, 2016; Sasmazel, 2016; Williams *et al.*, 2005).

Devido à biocompatibilidade (Dash & Konkimalla, 2012) e à biodegradabilidade (Woodruff & Hutmacher, 2010) do PCL, esse é extensivamente estudado para administração controlada de medicamentos e aplicações de engenharia de tecidos em várias formulações. Sua compatibilidade com uma ampla gama de medicamentos permite a distribuição uniforme de medicamentos na matriz de formulação (Woodruff & Hutmacher, 2010). Além disso, sua degradação a longo prazo facilita a liberação em até

vários meses (Woodruff & Hutmacher, 2010). Não é tóxico por natureza e é compatível com vários tecidos do corpo, que o fazem um material ideal para engenharia de tecidos (Dash & Konkimalla, 2012; Hakkarainen & Albertsson, 2002; Sinha *et al.*, 2004). Em uma estudo, Sinha *et al.* utilizou microesferas e nano formulações de PCL destinadas a entrega de fármacos (Sinha *et al.*, 2004). Salmoria e colaboradores (2016) trabalharam com a fabricação de malhas reabsorvíveis de policaprolactona / ibuprofeno por moldagem por injeção para aplicação em reparo orbital ocular.

O PCL também tem propriedades mecânicas flexíveis (módulo de Young, elasticidade, resistência à tração e alongamento no valor de quebra) que são adequadas para aplicação paramédica, curativos, contraceptivos e odontologia (Woodruff & Hutmacher, 2010). Isto mostra a versatilidade desse polímero na concepção e desenvolvimento de produtos médicos.

3.6 Sistemas de liberação de fármacos

Sistemas de liberação modificada são formas farmacêuticas capazes de alterar a taxa e o local de liberação dos ativos no organismo, mantendo sua concentração plasmática em nível adequado e controlando a localização das moléculas ativas de forma a obter uma maior quantidade no local desejado. Eles vêm sendo cada vez mais estudados devido às suas vantagens, tais como a promoção do aumento da liberação do fármaco no local de ação e no tempo desejado e diminuição de efeitos colaterais causados pela administração convencional do fármaco (Malam, Loizidou, & Seifalian, 2009; Saghazadeh *et al.*, 2018).

Em um sistema de liberação convencional (SLC), os níveis plasmáticos podem atingir níveis tóxicos com a administração de doses múltiplas, e diminuir para níveis abaixo do terapêutico, quando o fármaco é rapidamente metabolizado (Villanova *et al.*, 2010). Em um sistema de liberação controlada (SLCon), a concentração do fármaco no sangue é mantida em níveis terapêuticos por um período prolongado, com mínima oscilação na concentração plasmática (Villanova *et al.*, 2010). Além disso, o uso de SLCon pode fazer com que o fármaco seja direcionado para a célula alvo evitando os locais indesejáveis onde exerce toxicidade, modulando assim sua distribuição pelos tecidos (Villanova *et al.*, 2010).

Os avanços tecnológicos em métodos de detecção, separação, e síntese têm permitido a descoberta de novos agentes terapêuticos (Pignatello *et al.*, 2009). No entanto, muitos desses agentes apresentam características que impedem ou dificultam sua eficácia em sistemas biológicos (Li *et al.*, 2009), tais como a rápida degradação do princípio ativo, baixa solubilidade em meio biológico, efeitos adversos decorrentes da ação do fármaco em sítios inespecíficos e necessidade da sua utilização em altas dosagens. Neste sentido, os dispositivos de liberação modificada permitem melhorar o desempenho de formulações de medicamentos já existentes, além de possibilitar o uso de novos fármacos que apresentam incompatibilidades quanto a sua utilização em meio biológico, fazendo com que a eficácia terapêutica seja atingida (Suave *et al.*, 2009).

Os polímeros têm tido um papel importante no avanço das tecnologias de liberação de fármacos, proporcionando a liberação controlada de agentes terapêuticos em doses constantes por longos períodos (Liechty, Kryscio, Slaughter, & Peppas, 2010). Sistemas de liberação de fármaco à base do polímero PCL têm sido relatados na literatura para diferentes aplicações, como a utilização de implantes desse polímero carregados com ibuprofeno para reparo orbital (Salmoria *et al.*, 2016), utilização de nanopartículas de PCL contendo alendronato no tratamento de osteoporose (Miladi, Sfar, Fessi, & Elaissari, 2015) e produção de *stents* para tratamento de câncer utilizando PCL, 5-Fluorouracil e paclitaxel (Rong, Chen, Guo, Lei, & Shen, 2012).

Em sistemas poliméricos, a liberação é afetada por parâmetros como: peso molecular (Mw, do inglês *molecular weight*), temperatura de transição vítrea (Tg, do inglês *glass transition temperature*), cristalinidade, solubilidade e taxa de degradação do polímero (Saghazadeh *et al.*, 2018). A Tg define a temperatura na qual as regiões amorfas passam do estado vítreo para o estado borrachoso. Em temperaturas mais baixas que a Tg, as regiões amorfas são vítreas e possuem uma difusividade limitada. Acima da Tg, as regiões amorfas têm uma maior mobilidade e uma difusividade significativamente maior, levando a uma maior taxa de liberação (Saghazadeh *et al.*, 2018). O peso molecular do polímero tem um efeito direto na Tg, na viscosidade, na cristalinidade, nas propriedades mecânicas e na taxa de degradação (Saghazadeh *et al.*, 2018). A proporção hidrofílica/hidrofóbica do polímero também tem um impacto na liberação. As partículas poliméricas hidrofóbicas passam pela erosão da superfície, enquanto as partículas poliméricas hidrofílicas incham e a degradação ocorre dentro da massa do polímero, liberando assim o fármaco (Kaushal, Gupta, & Bansal, 2004).

A liberação de fármacos de matrizes poliméricas envolve processos de transferência de massa e diferentes mecanismos podem ser observados. Exemplos a serem citados são a difusão de água no sistema, a difusão da fármaco para fora do sistema, a dissolução do fármaco, o inchamento do polímero, o relaxamento da cadeia polimérica, a erosão da matriz polimérica inicial, entre outros fenômenos (Siepmann & Siepmann, 2012). É possível que alguns desses processos ocorram em sequência, com um deles sendo mais lento que os outros, sendo, portanto, a etapa limitante da sequência de liberação do fármaco. Dessa forma, a descrição matemática do processo de liberação pode ser simplificada através da consideração do transporte de massa apenas na etapa lenta (Siepmann & Siepmann, 2012).

Para descrever diversos casos de difusão de matéria ou energia em um meio no qual inicialmente não existe equilíbrio químico ou térmico é utilizada a lei de Fick (Equação 1), podendo ser usada para a quantificação e avaliação do transporte de massa por difusão (Siepmann & Siepmann, 2012).

$$F = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo F a taxa de transferência de massa (fluxo), $\partial c / \partial x$ o gradiente de concentração das espécies envolvidas e D o coeficiente de difusão.

A segunda lei de Fick, derivada da Equação 1, leva em consideração o balanço de massas, e está apresentada na equação 2 (Siepmann & Siepmann, 2012).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo c a concentração das espécies envolvidas, t o tempo, D o coeficiente de difusão e x , y e z as coordenadas espaciais.

Em sistemas de liberação de fármacos, algumas considerações precisam ser feitas antes da utilização de qualquer equação. Para os casos mais simples as teorias são baseadas nas seguintes suposições (Siepmann & Siepmann, 2012):

- A etapa limitante é o transporte de massa pela difusão (geralmente do fármaco);

- A condição *sink* (volume do meio pelo menos três vezes maior do que o necessário para se obter uma solução saturada do fármaco) precisa ser atingida durante todo o tempo de liberação;
- O dispositivo não pode sofrer erosão durante a liberação do fármaco;
- O coeficiente de difusão das espécies é constante;
- O inchamento do dispositivo é insignificante ou acontece rapidamente atingindo o equilíbrio;
- A resistência à transferência de massa devido a não agitação do líquido nas fronteiras é insignificante.

A importância do uso de modelos matemáticos para descrever a liberação de fármacos dos protótipos de sistemas de liberação permite conhecer parâmetros físicos importantes, como o coeficiente de difusão de fármacos, e, com isso, ajustar o sistema antes da obtenção do dispositivo final (DASH, MURTHY, NATH, & CHOWDHURY, 2010; G. F. Silva *et al.*, 2019).

Com base na lei de Fick, Noyes e Whitney (1987) foi possível estabelecer uma relação fundamental para o entendimento da cinética de liberação e a mesma pode ser visualizada na Equação 3 (DASH *et al.*, 2010).

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C_t) \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo $\frac{dC}{dt}$ a velocidade de dissolução, K o coeficiente de transferência de massa, C_s a solubilidade máxima no meio de dissolução e C_t a concentração no tempo t .

Nernst e Brunner, em 1904, desenvolveram outra relação, baseada na Equação 3, incluindo parâmetros de difusão, área de superfície e espessura da camada de difusão que interferem no processo de liberação do fármaco (Equação 4) (Manadas, Eugénia, & Veiga, 2002).

$$\frac{dC}{dt} = K \frac{DS}{Vh} (C_s - C_t) \quad (4)$$

Sendo D o coeficiente de difusão, S a área de superfície, h a espessura da camada de difusão e V o volume do meio de dissolução.

A partir da equação de Nernst e Brunner é possível verificar se o volume do meio de dissolução é suficientemente grande, sendo $t \ll C_s$. Caso essa condição seja respeitada, a concentração do soluto no solvente não afetará a velocidade da dissolução. Caso não seja respeitada, afetará a velocidade de dissolução (Manadas *et al.*, 2002).

A partir dessas equações, criaram-se modelos que investigam a cinética de liberação de fármacos, que podem ser classificados em três categorias: métodos estatísticos, dependentes e independentes de modelo (P. J. C. da Costa, 2002).

Os métodos estatísticos baseiam-se em testes não-paramétricos, como o teste de Mann-Whitney e o teste do Qui quadrado. Entretanto, também podem ser baseados em testes paramétricos, como a análise de variância ou o teste de *t-Student*. Dessa forma, podem ser utilizados um ou múltiplos tempos de dissolução (DASH *et al.*, 2010). Os métodos estatísticos consistem na procura de diferenças significativas para a liberação do fármaco em cada amostra efetuada (ANOVA ou teste de *t-student*) ou na procura de diferenças significativas em séries de amostras (MANOVA) (P. J. C. da Costa, 2002). A utilização de testes estatísticos separados para cada tempo de dissolução provoca um erro elevado, que pode tomar valores que ultrapassam o aceitável. (P. J. C. da Costa, 2002).

Os métodos independentes de modelos incluem testes relacionais (baseados em razões entre grandezas obtidas no ensaio de liberação do produto de referência e o ensaio de liberação do mesmo, usando a comparação no mesmo tempo) e procedimentos emparelhados, empregados na pesquisa experimental de processos comportamentais complexos (índices de Rescigno, o fator de diferenciação e o fator de semelhança) (P. J. C. da Costa, 2002). O índice de Rescigno é um método para comparar perfis de concentrações plasmáticas de fármaco ao longo do tempo. O fator de diferenciação calcula a diferença entre duas curvas a cada tempo de leitura, ou seja, é uma medida do erro relativo entre as mesmas. Já o fator de semelhança, é definido como o logaritmo do recíproco da raiz quadrada da soma do quadrado do erro e é uma medida do percentual de dissolução entre as duas curvas (P. J. C. da Costa, 2002; DASH *et al.*, 2010). Os métodos independentes de modelos são descritos facilmente, entretanto, não possuem justificativa científica (P. Costa & Lobo, 2001).

Os modelos dependentes consistem no uso de funções matemáticas para descrever o perfil de dissolução do fármaco. Esses perfis são avaliados de acordo com a função escolhida (DASH *et al.*, 2010). Para a escolha da função é comum avaliar o coeficiente de correlação, R^2 . Quanto maior o valor desse melhor o ajuste da função escolhida. Porém, nem sempre é possível utilizar uma equação genérica que traduza matematicamente a

curva de liberação em função dos parâmetros relacionados à forma farmacêutica. Em determinadas situações a equação pode ser deduzida a partir de uma análise teórica do problema, porém, na maioria das vezes, equações empíricas são mais adequadas para descrever o processo de liberação (P. J. C. da Costa, 2002).

Os perfis de liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos estão relacionados com as propriedades físico-químicas tanto do próprio fármaco quanto do polímero constituinte desse sistema. Compreender como será a liberação da atorvastatina dos filmes de PCL é de suma importância para definir sua aplicação, regulação da taxa de fornecimento no organismo e localização espacial de liberação do agente. Também nesse sentido, a caracterização dos materiais de partida e os filmes produzidos permite conhecer e controlar propriedades para que se possa planejar formulações com perfis de liberação específicos. Sendo assim, estudar a cinética de liberação do fármaco nos filmes poliméricos assim como a caracterização dos materiais que os compõe serão imprescindíveis na obtenção de um melhor sistema de liberação.

Alguns dos principais modelos dependentes de modelos utilizados para explicar a liberação prolongada são apresentados a seguir.

3.6.1 Cinética de ordem zero

Este modelo é linear e avalia a dissolução de formas farmacêuticas que não se desintegram e liberam o fármaco lentamente. Esta relação, apresentada na Equação 5, pode ser utilizada para descrever a liberação de fármacos em diferentes formas, como sistemas transdérmicos, osmóticos e comprimidos revestidos (P. J. C. da Costa, 2002; DASH *et al.*, 2010).

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo Q_t a quantidade de fármaco dissolvido no tempo t , Q_0 a quantidade de fármaco inicial na solução e K_0 a constante de velocidade aparente de dissolução ou constante de liberação de ordem zero.

3.6.2 Cinética de primeira ordem

Este modelo, além de poder ser usado para descrever adsorção e/ou eliminação de alguns fármacos, pode também ser empregado em estudos de dissolução. Os dispositivos de liberação que utilizam esse perfil, liberam uma quantidade de fármaco proporcional à

quantidade presente em seu interior, por unidade de tempo e, dessa forma, no decorrer da liberação a quantidade de fármaco liberada diminui (P. J. C. da Costa, 2002). Esta relação (Equação 6) pode ser utilizada para descrever sistemas que possuem fármacos solúveis em água ou que estão condicionados em matrizes porosas (DASH *et al.*, 2010).

$$Q_t = Q_0 e^{-K_1 t} \quad (\text{Equação 6})$$

De forma similar à Equação 5, Q_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t , Q_0 a quantidade inicial de fármaco na solução e K_1 a constante de liberação de ordem um.

3.6.3 Modelo de Higuchi

O modelo de Higuchi foi desenvolvido por Takeru Higuchi e baseia-se na primeira lei de Fick. Este modelo tem sido utilizado para descrever a dissolução de fármacos em diferentes casos, tais como sistemas transdérmicos e matrizes com fármacos solúveis em água. A expressão geral desse modelo está descrita na Equação 7, sendo K_H a constante de dissolução de Higuchi (DASH *et al.*, 2010; Higuchi, 1961).

$$Q_t = K_H t^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Equação 7})$$

No trabalho de da Silva (2014) matrizes de Polihidroxibutirato contendo metronidazol foram estudadas pensando na utilização para regeneração de tecido guiada. A cinética de liberação do antibiótico foi estudada e o modelo utilizado foi o de Higuchi. Entretanto, o sistema desviou da equação de Higuchi, logo foi sugerido que a relação de Korsmeyer-Peppas poderia mostrar melhor adequação para explicar o comportamento cinético pois é frequentemente utilizada para investigar a existência de comportamentos anômalos, ou seja, que diferem da difusão fickiana (da Silva. M. A. C., 2014).

3.6.4 Modelo de Korsmeyer-Peppas

Korsmeyer e Peppas desenvolveram um modelo próprio, que é geralmente utilizado para a análise de liberação de matrizes hidrofílicas e sistemas poliméricos relacionados, sendo descrito na Equação 9 (P. J. C. da Costa, 2002; Korsmeyer, Gummy, Doelker, Buri, & Peppas, 1983).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n \quad (9)$$

Sendo a relação M_t/M_∞ a fração do fármaco liberada ao longo do tempo t , a representa uma constante cinética fixa que engloba as características geométricas e estruturais da forma de liberação e n é o expoente de liberação, que caracteriza diferentes liberações para matrizes em formato cilíndrico.

Peppas (1985) definiu o valor de n de acordo com os diferentes mecanismos de liberação. Sendo assim, para a difusão em sistemas planos (modelo de Fick), $n < 0,5$, já para os sistemas que não seguem a lei de Fick, os valores de n são mais elevados, entre 0,5 e 1,0 (P. J. C. da Costa, 2002).

No trabalho de Yassue-Cordeiro e colaboradores (2015), zeólitas foram submetidas à troca iônica ou impregnação com prata e posteriormente adicionadas em filmes de quitosana para a confecção de curativos para queimaduras. Além das caracterizações do material produzido, também foi estudado o perfil de liberação das zeólitas presentes nos filmes e os modelos de Korsmeyer / Peppas e Peppas / Sahlin foram os que melhor explicaram o comportamento. O expoente utilizado foi o de cinética de liberação (n) abaixo de 0,5, assim com os resultados obtidos pelo modelo de Korsmeyer-Peppas, indicando que a liberação da prata a partir da zeólita e do filme de quitosana não é primordialmente governada pelo mecanismo de difusão, indicando que a liberação da prata pode ter sido dificultada por esta estar presente no filme polimérico provavelmente na forma de nanopartículas e estas ficarem presas no filme, justificando a dificuldade da dissolução e difusão desse metal para a solução simulada (Yassue-Cordeiro *et al.*, 2015).

Oshiro Junior *et al* (2014) estudou o desenvolvimento de formadores de filmes poliméricos orgânico-inorgânico para liberação controlada de fármacos e tratamento de feridas, utilizando materiais poliméricos híbridos de ureasil-poliéter, sintetizados pelo processo sol-gel como sistema formador de filmes, contendo o fármaco modelo sulfadiazina de prata. Neste trabalho o perfil de liberação do ativo foi dependente das características das matrizes, matrizes mais hidrofóbicas como ureasil-POP (polieter funcionalizado a base polióxido de propileno) levam a uma liberação lenta, devido principalmente ao baixo intumescimento da matriz. Já a matriz mais hidrofílica ureasil-POE (polieter funcionalizado a base de polióxido de etileno), que possui grande capacidade de intumescer favoreceu uma liberação mais rápida do fármaco. O modelo matemático que melhor se ajustou às curvas experimentais de liberação da sulfadiazina

de prata a partir dos filmes poliméricos foi o descrito por Korsmeyer e Peppas pois houve um comportamento anômalo, que não respeitou a lei de fick (Oshiro Junior *et al.*, 2014).

3.6.5 Modelo de Hixson-Crowell

Este modelo foi criado por Hixson e Crowell a partir da consideração que a área de uma partícula regular é proporcional à raiz cúbica do seu volume. Ele descreve a liberação em sistemas em que há diferença na área da superfície e no diâmetro das partículas ou comprimidos. Dessa forma, o modelo surgiu a partir da derivação da Equação 8 (P. J. C. da Costa, 2002; Hixson & Crowell, 1931).

$$W_0^{\frac{1}{3}} - W_t^{\frac{1}{3}} = K_S t \quad (\text{Equação 8})$$

Sendo W_0 a quantidade inicial de fármaco no sistema de liberação, W_t a quantidade de fármaco restante no sistema de liberação ao fim do tempo t e K_S uma constante que incorpora a relação superfície-volume.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência experimental conduzida no desenvolvimento dos filmes de PCL/Atorvastatina é esquematicamente representada na Figura 3.

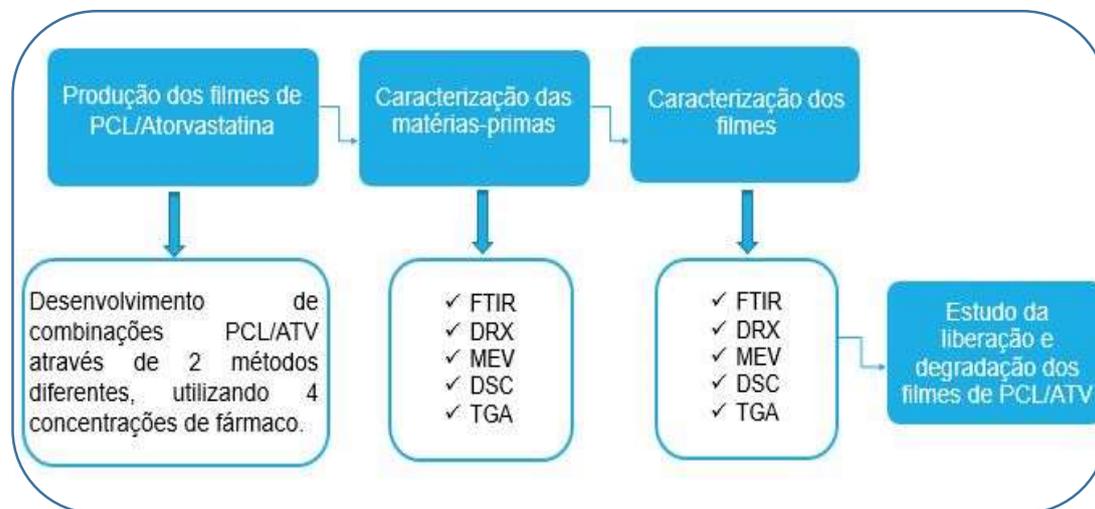


Figura 3: Representação esquemática da sequência experimental utilizada para a produção do pó e subsequente preparo dos filmes.

4.1 Produção dos filmes de PCL/ATV por *solvent casting*

Para a produção dos filmes foram utilizados os seguintes materiais: PCL na forma de grânulos Polymorph Mw 60000, atorvastatina (doada pela Fiocruz) e Clorofórmio P.A. A.C.S. (estabilizado com amileno) 100% (Labsynth).

A produção dos filmes foi conduzida por dois métodos:

Método 1: Foi utilizada uma solução de PCL na concentração de 10% p/v. Para o preparo da solução de PCL 10% p/v, 5g do polímero foi solubilizado em 50 ml de clorofórmio. O processo foi conduzido a temperatura ambiente, dentro da capela, com auxílio de um condensador e sob agitação magnética constante (3000 rpm por 60min) em agitador magnético digital (LAB1000, modelo LM-MS-H280-Pro).

Para a produção dos filmes, 2ml da solução de PCL foi adicionada em um recipiente retangular de silicone contendo atorvastatina nas proporções de 40mg (PA4-1), 80mg (PA8-1), 120mg (PA12-1) e 160mg (PA16-1). As misturas foram agitadas com bastão de vidro, continuamente por 1 minuto e deixada em repouso por 3 dias em temperatura ambiente dentro da capela. Após o tempo de repouso, os filmes foram removidos do molde caracterizados.

Método 2: Foi utilizada solução de PCL na concentração de 10% p/v. Para o preparo dessa solução, 0,2g do polímero foram solubilizados em 2,0 ml de clorofórmio, junto da atorvastatina nas proporções de 40mg (PA4-2), 80mg (PA8-2), 120mg (PA12-2) e 160mg (PA16-2). O processo foi conduzido a temperatura ambiente, dentro da capela, com auxílio de um condensador sob agitação magnética constante (3000 rpm por 60min) em agitador magnético com aquecimento digital (LAB1000, modelo LM-MS-H280-Pro).

Para a produção dos filmes, 2,0 ml da solução de PCL/ATV, em diferentes proporções, foram adicionadas em um molde retangular de silicone. As misturas foram agitadas com bastão de vidro, continuamente por 1 minuto e deixada em repouso por 3 dias em temperatura ambiente dentro da capela. Após o tempo de repouso, os filmes foram removidos do molde e caracterizados.

4.2 Caracterização da ATV, PCL e filmes de PCL/ATV

4.2.1 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho (espectroscopia IR) utiliza a região do infravermelho do espectro eletromagnético. Se fundamenta, basicamente, na análise da absorção da radiação de diferentes frequências e sua principal função é identificar grupos funcionais em amostras orgânicas ou inorgânicas, através dos valores peculiares de absorção de cada elemento. A espectroscopia no infravermelho baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados, nesse caso, de níveis vibracionais). Tais frequências dependem da forma da superfície, da energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e, eventualmente, do acoplamento vibrônico (SILVERSTEIN *et al.*, 1991).

Para investigar possíveis interações entre o PCL e a Atorvastatina nos filmes, as amostras produzidas pelo método 1 e 2, assim como o fármaco e o polímero, foram analisadas em espectrômetro com transformada de Fourier na região do infravermelho (FTIR) (Vertex 70 com Platinum ATR, Bruker - Laboratório de Análises químicas IQ/UFRRJ). A análise das amostras foi realizada sob as seguintes condições operacionais:

- resolução do equipamento: 4 cm⁻¹;
- número de varreduras: 64;

- faixa de número de onda: $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

4.2.2 Difração de raios X (DRX)

É um fenômeno no qual os átomos de um cristal, em virtude do seu espaçamento uniforme, causam um padrão de interferência das ondas presentes em um feixe incidente de raio X. A cristalinidade de materiais poliméricos interfere em suas propriedades físico-químicas e pode ser influenciada pela presença de um segundo material, por fatores estruturais e pelas condições de processamento (CANEVAROLO, 2010).

Muitas das propriedades físico-químicas de um sólido também variam quando a estrutura cristalina deste é alterada. Propriedades elétricas e ópticas, dureza, ponto de fusão, solubilidade, densidade, estabilidade física e química são exemplos de características que podem apresentar divergências em formas cristalinas diferentes de um mesmo composto. Como consequência, muitas das propriedades importantes para o fármaco podem ser afetadas, dentre elas a velocidade de dissolução (que pode acarretar em desvios na disponibilidade do mesmo na corrente sanguínea), a densidade aparente e verdadeira, a morfologia do cristal, a compactação e o escoamento do pó, estabilidade química e física (pode ocasionar desvios de qualidade durante o processo produtivo e influenciar o desempenho dos medicamentos) (de Araujo, Pitaluga, Antonio, Santos, & Matos, 2012).

Com o intuito de avaliar o efeito da metodologia no grau de cristalinidade (X_c), o PCL, a atorvastatina e os filmes de PCL/ATV, foram analisados por difração de raios-X. A análise foi conduzida em difratômetro de raios X (Rigaku, modelo Mini Flex II – Laboratório de Catálise IT/DEQ/UFRRJ) operado com a fonte $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 15,2 \text{ nm}$), sob as seguintes condições de análise:

- velocidade: 2 graus/ min.;
- Passo: 0,02 graus;
- Tempo presente: 1 seg;
- Faixa de varredura: $2\theta = 2 - 60$ graus.

A atorvastatina foi submetida à análise de DRX no formato de pó, enquanto que os materiais PA4-1, PA8-1, P12-1, PA16-1, PA4-2, PA8-2, PA12-2, PA16-2 e PCL foram analisados no equipamento no formato de filme.

4.2.3 Análises Térmicas (TGA e DSC)

O polímero (PCL) na forma de filme foi submetido à análise térmica a fim de se obter dados referentes às temperaturas de cristalização (T_c), de fusão (T_m) e de degradação (T_g). Com o intuito de investigar o efeito da concentração de atorvastatina nos filmes, estes também foram submetidos às análises térmicas, sob as mesmas condições de análise do material polimérico, para avaliar possíveis mudanças nas propriedades térmicas.

Análise termogravimétrica (TGA) e DTG

A análise termogravimétrica permite determinar a variação da massa da amostra em função da temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa de substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química fixa, definida e constante, a temperatura em que começam a decompor, acompanhar o andamento de reações de desidratação (perda de umidade), oxidação, combustão, decomposição, dentre outras (CANEVAROLO JR., 2004). Os filmes foram submetidos a análise termogravimétrica (modelo 550, TA Instruments – Fiocruz), onde a análise foi conduzida em atmosfera de nitrogênio a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ até atingir 700°C . Foram obtidas curvas de TGA e de sua derivada, DTG.

Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

O equipamento de DSC mede a variação de energia entre a amostra e uma determinada referência em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de variação de temperatura. Os eventos térmicos que geram modificações em curvas de DSC podem ser basicamente transições de primeira e de segunda ordem. As transições de primeira ordem apresentam variações de entalpia (T_g , T_c e T_m) e as de segunda ordem caracterizam-se pela variação de capacidade calorífica. Também é possível obter dados referentes à cristalinidade de um material polimérico através do DSC (CANEVAROLO JR., 2004).

Filmes de PCL puro, filmes de PCL/ATV e a ATV foram caracterizados por DSC em um calorímetro diferencial de varredura (modelo DSC 250, TA Instruments - Fiocruz). As amostras foram aquecidas até 210°C a uma taxa de 10 °C/min.

4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura convencional (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

MEV é um tipo de microscópio eletrônico capaz de produzir imagens superficiais e subsuperficiais de uma amostra, dependendo do tipo de detector utilizado. Devido à maneira com que as imagens são criadas, imagens de MEV têm uma aparência tridimensional característica e são úteis para avaliar a estrutura superficial da amostra, avaliar aspectos topográficos e verificar a composição do material que compõem as amostras (J. R. Canevarolo, 2004).

A versatilidade da utilização da microscopia eletrônica se encontra na possibilidade de se captar e medir as diversas radiações provenientes das interações elétron-amostra. Estas interações podem revelar informações da natureza da amostra como composição, topografia, potencial eletrostático, campo magnético local e outras propriedades (Canevarolo, 2003).

Para compreender a morfologia e estrutura dos filmes de PCL/ATV, as amostras foram observadas em microscópio de varredura convencional com filamento de tungstênio (JEOL modelo JSM-6390LV - Fiocruz). As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro utilizando a voltagem de aceleração de elétrons igual a 15 KV e magnitude de ampliação de imagem de 500 vezes.

Foi realizada, também, nesse microscópio, a análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para investigar a distribuição do fármaco no filme polimérico. A EDS é uma técnica analítica utilizada para a análise elementar ou caracterização química de uma amostra. É uma das variantes da espectroscopia por fluorescência de raio X que se baseia na investigação de uma amostra através de interações entre partículas ou radiação eletromagnética e matéria, analisando os raios X emitidos pela matéria em resposta à incidência de partículas carregadas (J. R. Canevarolo, 2004).

Para a realização das análises todas as amostras foram vaporizadas com carbono (79 mA durante 30 segundos); Para aquisição do espectro do fármaco puro, filme de PCL e filme de PCL/ATV (PA4-2 e PA8-2) foi utilizado um feixe de 15kV e 79 mA, a uma distância de 10 mm e *spot size* de 71. A exposição fo materia ao feixe foi de 30s. Já para

a aquisição dos mapas de elementos dos filmes de PCL/ATV (PA4-2 e PA8-2) utilizou-se os mesmos parâmetros que o anterior, no entanto foram adquiridos 500 frames e o *dead time* ficou entre 17-19%. Não foi possível fazer aquisição do filme de PCL puro pois o mesmo não aguentou o tempo e a voltagem do feixe de exposição necessário para aquisição dos mapas.

4.2.5 Análise de liberação do fármaco presente na estrutura dos filmes de PCL/Atorvastatina (SUV)

Para avaliar a liberação do fármaco, os filmes de PCL/ATV foram imersos em cubas contendo 900 mL de solução tampão fosfato (pH 7,4), com agitação (75 rpm) e temperatura constante (37°C), utilizando dissolutor com aparato tipo I. A liberação foi avaliada por um período de aproximadamente 5 dias consecutivos. O processo de liberação foi acompanhado através de espectroscopia com detecção UV (Evolution Tmodel 6300, Dissolution Test System – FIOCRUZ), sendo lido nos intervalos de: 5, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 1440, 1800, 2880, 3180, 4320, 5760 e 5940 minutos. A Figura 4 mostra o Dissolutor utilizado.



Figura 4: Aparelho para teste de dissolução de bancada (Evolution Model 6300, Distek). Autoria própria.

4.2.6 Análise de degradação dos filmes de PCL/ATV após liberação do fármaco.

A resposta local *in vivo* dos tecidos em relação aos filmes depende da biocompatibilidade do material constituinte e da degradação no organismo, onde o ideal é a completa degradação do filme sem causar nenhum mal ao paciente e a liberação do fármaco ali contido (Saghazadeh *et al.*, 2018). No presente trabalho os filmes de PCL/Atorvastatina foram analisados por MEV após o estudo de liberação *in vitro*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os filmes foram preparados pelo método *solvent casting*, e, após a evaporação do solvente, os mesmos foram facilmente removidos e caracterizados. A diferença entre os métodos se torna visível na aparência final das amostras, assim como as diferenças de concentração de atorvastatina utilizada e podem ser visualizados na Figura 5 abaixo.

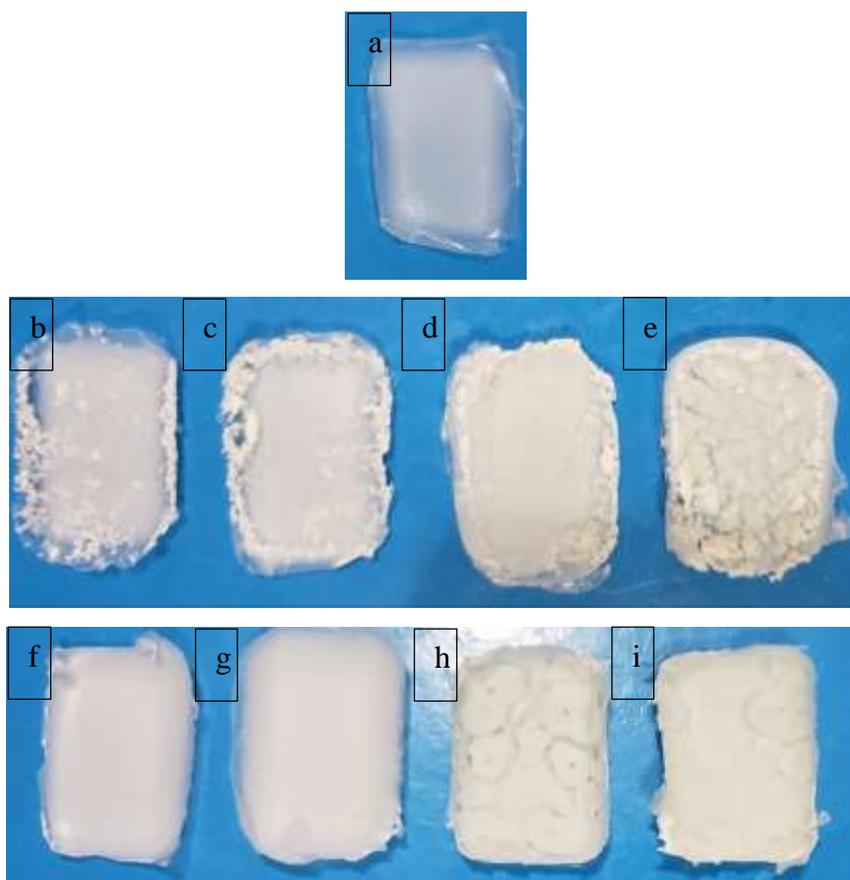


Figura 5: Filmes produzidos pelo método 1, 2 e pcl puro: (a) filme de PCL puro, (b) PA4-1, (c) PA8-1, (d) PA12-1, (e) PA16-1, (f) PA4-2, (g) PA8-2, (h) PA12-2 e (i) PA16-2.

Os filmes produzidos pelo método 2 se mostraram mais homogêneos do que os produzidos pelo método 1. Os filmes PA4-2 e PA8-2 não mostraram aglomerados de fármaco ao longo da superfície como os filmes PA12-2, PA16-2 e nos filmes produzidos através do método 1, o que pode influenciar nas caracterizações, liberação posterior além de não passar em um controle de qualidade de produção. O filme de PCL puro mostrou superfície lisa e com coloração transparente. Com a adição do fármaco se tornou esbranquiçada.

5.1 Análise química do fármaco, polímero e filmes – FTIR

Visando avaliar as possíveis interações intermoleculares entre o PCL e a atorvastatina, os filmes PA4-1, PA8-1, PA12-1, PA16-1, PA4-2, PA8-2, PA12-2, PA16-2 e PCL puro, bem como a atorvastatina foram analisados por FTIR.

O espectro tanto da atorvastatina quanto PCL apresentaram bandas características que estão de acordo com o que é reportado na literatura (E. P. Da Silva et al., 2016; Gómez-Lizárraga et al., 2017; Lakshmi Narasaiah et al., 2010; Sasmazel, 2016; Wan et al., 2009), e as mesmas podem ser observadas Figuras 6 e 7, e sumarizadas nas Tabela 1 e na Tabela 2.

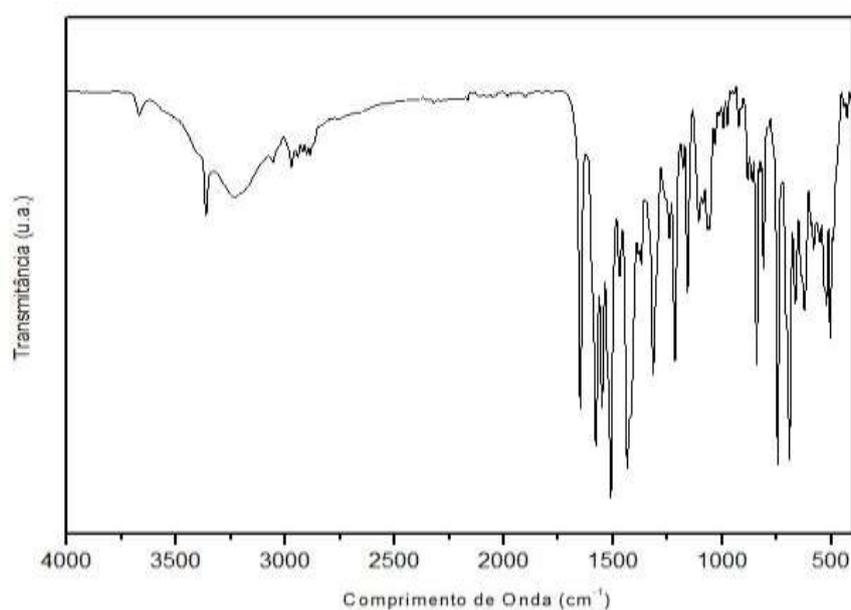


Figura 6: Espectro do FTIR da ATV

Tabela 1: Bandas características da Atorvastatina na região do infravermelho.

| Comprimento de onda (cm ⁻¹) | Atribuição |
|---|--|
| 3361 | Estiramento da ligação –OH |
| 3237 | Estiramento da ligação –NH |
| 2953 | Estiramento da ligação -CH ₃ |
| 2873 | Estiramento da ligação –CH |
| 1646 | Deformação axial da ligação C=O de amida |
| 1575 | Deformação angular da ligação N-H |
| 1433 | Deformação de grupos funcionais C-C |

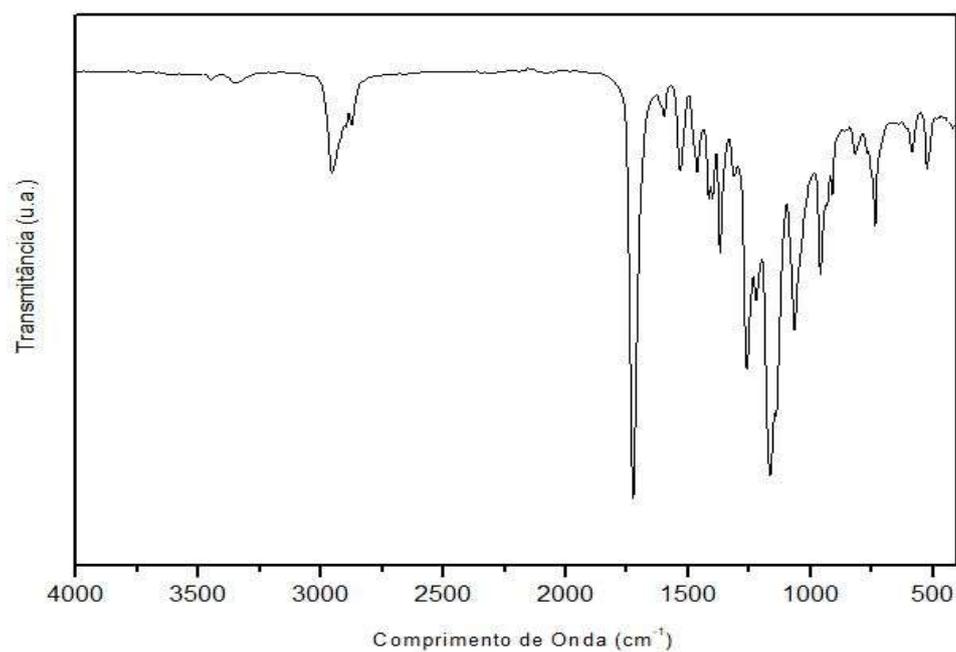


Figura 7: Espectro do FTIR do PCL

Tabela 2: Bandas características do PCL na região do infravermelho.

| Comprimento de onda (cm⁻¹) | Atribuição |
|--|--|
| 2949 | Deformação axial assimétrica da ligação CH ₂ |
| 2865 | Deformação axial simétrica da ligação CH ₂ |
| 1727 | Deformação axial da carbonila (C=O) |
| 1297 | Deformação axial da ligação C-O e C-C na fase cristalina |
| 1257 | Deformação axial assimétrica da ligação COC |
| 1166 | Deformação axial da ligação OC-O |
| 1104 | Deformação axial simétrica da ligação COC |

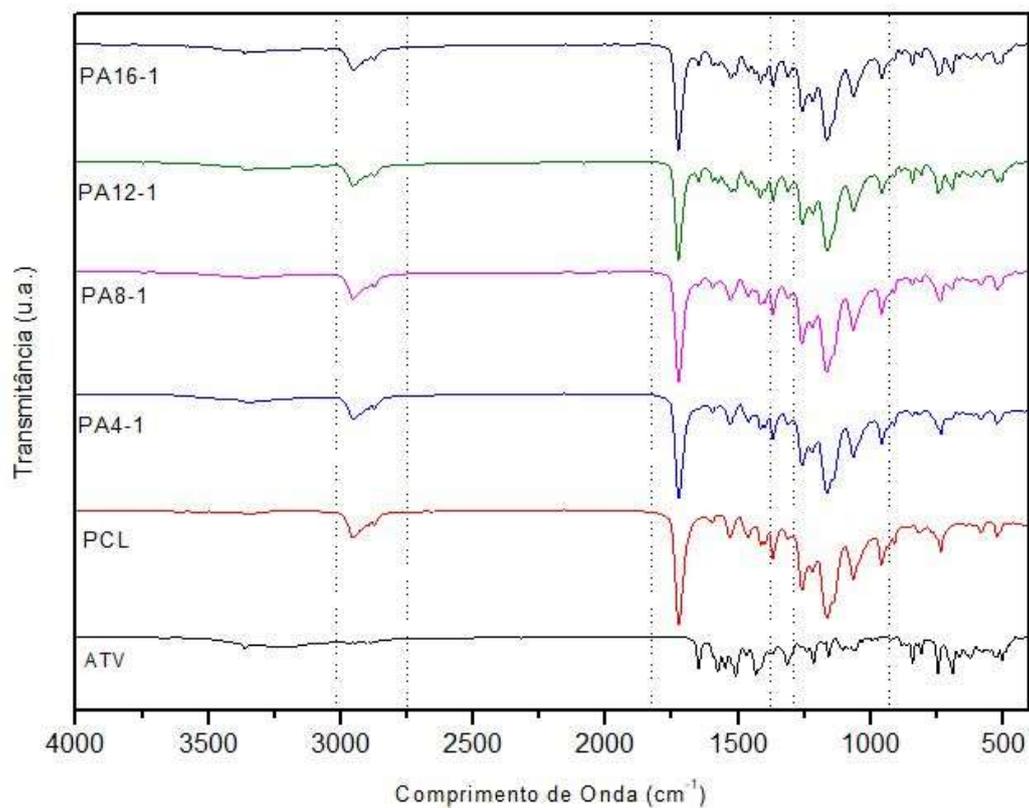


Figura 8: Espectros de FTIR dos filmes, do PCL e Atorvastatina utilizando método 1. As linhas pontilhadas indicam algumas das bandas características dos materiais puros.

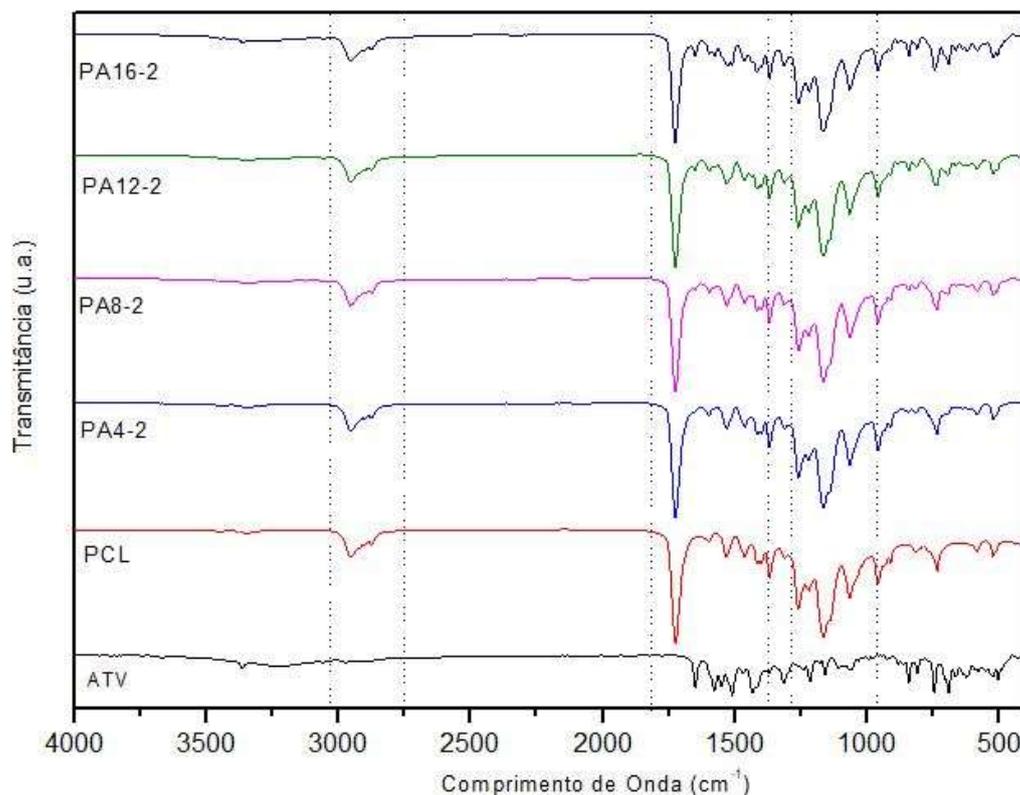


Figura 9: Espectros de FTIR dos filmes, do PCL e Atorvastatina utilizando método 2. As linhas pontilhadas indicam algumas das bandas características dos materiais puros.

Nas Figuras 8 e 9, os filmes produzidos por ambas metodologias obtiveram resultados semelhantes entre si nos espectros, mostrando que não sofreram alterações significativas durante o processo. Caso houvesse uma interação direta entre o ATV e o PCL, esperava-se alterações nas bandas referentes ao polímero e ao fármaco devido a solubilização separada (método 1) e em conjunto (método 2), deslocamento de bandas, desaparecimento de picos característicos devido a interações entre ambos. No entanto foram observados picos referentes a PCL e a ATV em todos os filmes preparados.

Na região compreendida entre 3700 cm^{-1} e 2600 cm^{-1} as bandas características da ATV são melhor observadas nos filmes produzidos com maior concentração do fármaco, como nas amostras PA12-1, PA16-1, PA12-2 e PA16-2, enquanto nas amostras com PA4-1, PA8-1, PA4-2 e PA8-2 os picos foram menos aparentes (Figuras 8 e 9). De acordo com a literatura, a banda relacionada ao grupamento amino da atorvastatina ocorre por volta de 1649 cm^{-1} para (C = O), 1578 cm^{-1} para (CN) (E. P. Da Silva *et al.*, 2016), sendo valores semelhantes aos encontrados no presente trabalho (1646 para ligação C=O e 1575 para CN). Quando esta banda é deslocada para um comprimento de onda menor é um

indicativo de que ligações hidrogênio foram formadas entre o fármaco e o polímero (E. P. Da Silva *et al.*, 2016).

A região do espectro de 1900 cm^{-1} a 1350 cm^{-1} abriga as bandas C=O de amida primária a aproximadamente 1646 cm^{-1} e de -NH₂ por volta de 1575 cm^{-1} da ATV (E. P. Da Silva *et al.*, 2016). Nas Figuras 8 e 9 é possível notar que somente os filmes PA12-1, PA16-1, PA12-2 e PA16-2 evidenciam esses picos, mostrando que dependendo da concentração de fármaco utilizada esses picos podem não aparecer.

K.K. Gómez-Lizárraga e colaboradores (2017) também observaram bandas de absorção características do PCL, como estiramento assimétrico de CH₂ em 2943 cm^{-1} , estiramento simétrico de CH₂ a 2865 cm^{-1} e alongamento de carbonila (C = O) em torno de 1720 cm^{-1} , assim como observado neste trabalho (Figura 7).

A análise do espectro na região de 1300 cm^{-1} a 950 cm^{-1} mostrou uma redução da banda atribuída à região cristalina do PCL referente ao grupo funcional éster, que normalmente está em 1257 e 1055 cm^{-1} , proporcionalmente ao aumento de atorvastatina nos filmes, indicando alguma interação entre o grupo funcional do polímero e o fármaco, como ligações de hidrogênio. Em regiões onde ocorrem bandas intensas referentes ao PCL, como regiões entre 1257 cm^{-1} a 1066 cm^{-1} , com bandas relacionadas ao estiramento da ligação C – O do grupo éster, picos referentes ao fármaco não foram observados (Figuras 9 e 10).

As amostras PA12-1, PA16-1, PA12-2 e PA16-2 apresentam as bandas características do polímero e do fármaco, com pequenas diferenças, devido, provavelmente, as metodologias diferentes. Esses resultados sugerem que nas amostras PA12-1, PA16-1, PA12-2 e PA16-2 houve menos interação do fármaco com o polímero, o que para a área farmacêutica pode ser uma desvantagem, visto que haverá menor controle na liberação do fármaco

5.2 Análise de Cristalinidade das partículas do fármaco, filme de PCL puro e filmes PCL/ATV - DRX

Com o intuito de estudar como a metodologia e a composição poderiam alterar a cristalinidade, os filmes produzidos pelos métodos 1 e 2, o filme de PCL puro e a ATV foram analisados por DRX e os difratogramas são apresentados nas Figura 10, 11, 12 e

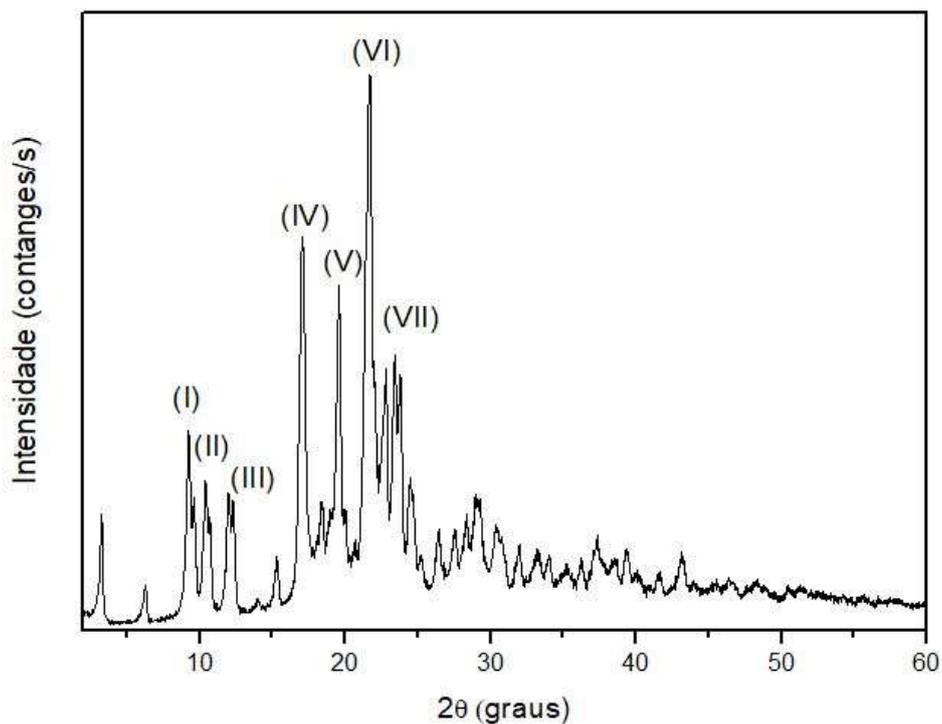


Figura 10: Difratoograma de raios X da atorvastatina: I ($2\theta = 9,24^\circ$ e $9,59^\circ$), II ($2\theta = 10,37^\circ$), III ($2\theta = 11,96^\circ$ e $12,30^\circ$), IV ($2\theta = 17,05^\circ$), V ($2\theta = 19,57^\circ$) VI ($2\theta = 21,65^\circ$) e VII ($2\theta = 22,78^\circ$, $23,40^\circ$, $23,81^\circ$)

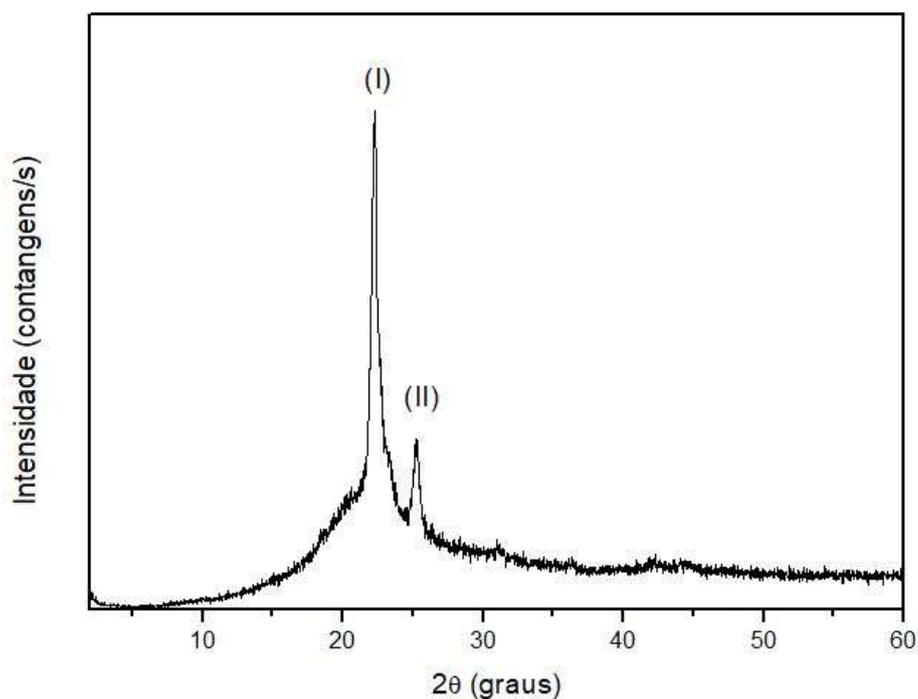


Figura 11: Difratoograma de raios X do filme de PCL: I ($2\theta = 22,2$) e II ($2\theta = 25,2$)

O difratograma da ATV e o do filme PCL apresentaram picos de acordo com o reportado na literatura (Rong *et al.*, 2012; Woodruff & Hutmacher, 2010). Um ponto

importante para ser ressaltado é que os picos importantes tanto da atorvastatina quanto do filme de PCL ocorrem na mesma região, podendo se sobrepor uns aos outros. Logo o pico encontrado próximo aos 22° pode ser tanto referente ao pico $2\theta=21,65^\circ$ da atorvastatina (VI) ou $2\theta=22,5^\circ$ da PCL (I) (Figuras 10 e 11).

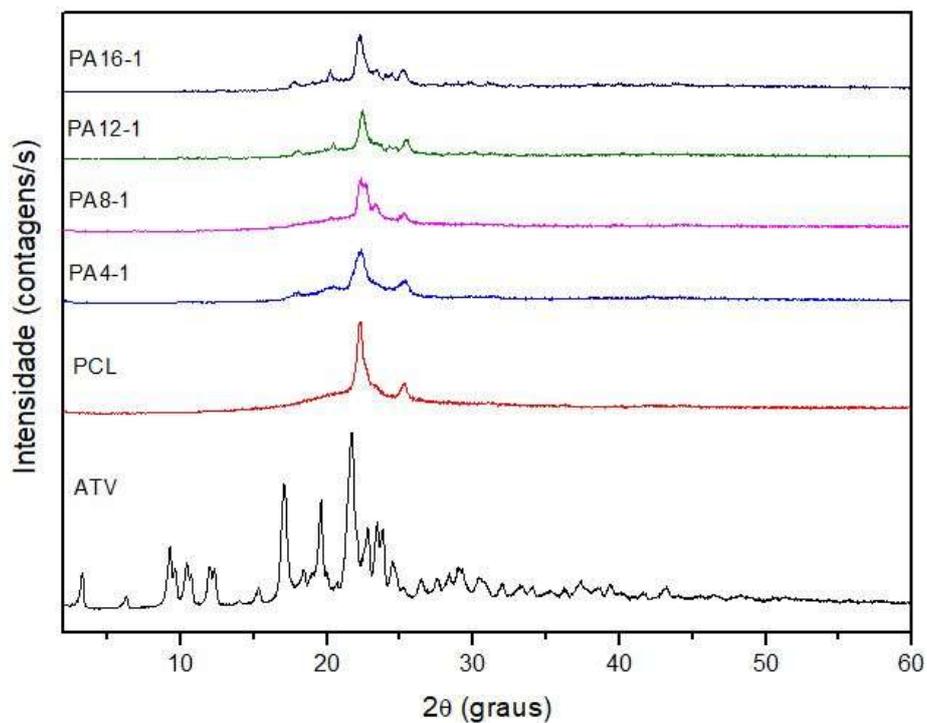


Figura 12: Difratograma de raios X da ATV, PCL e dos filmes obtidos através do método 1, com solubilização do fármaco: PA4-1 (40mg de ATV), PA8-1 (80mg de ATV), PA12-1 (120mg de ATV) e PA16-1 (160mg de ATV).

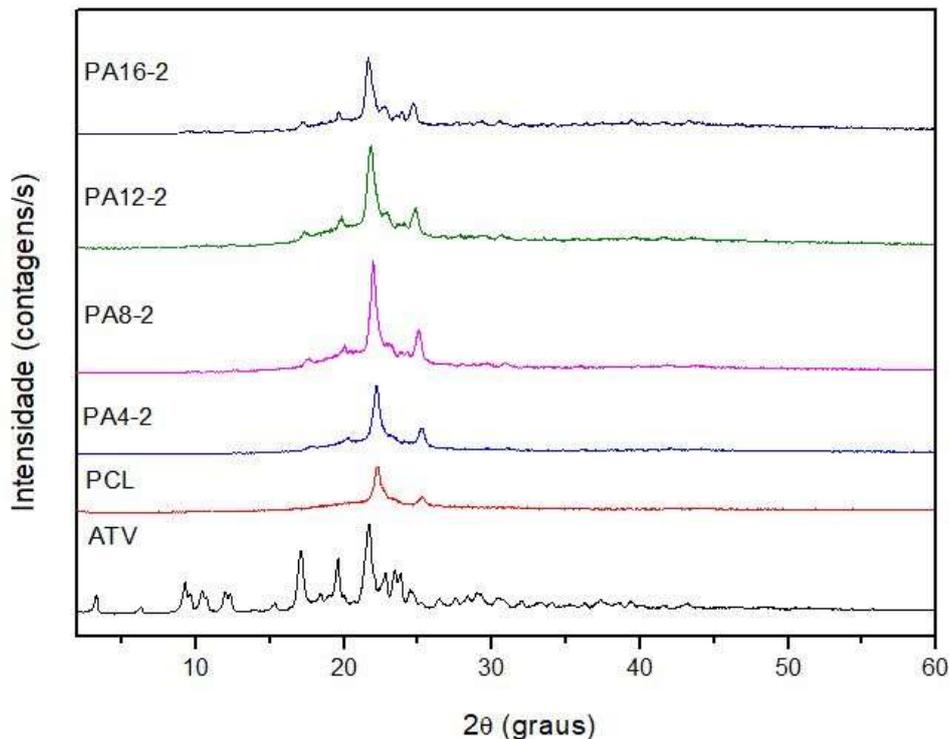


Figura 13: Difratoograma de raios X da ATV, PCL e dos filmes obtidos através do método 2, com solubilização do fármaco: PA4-2 (40mg de ATV), PA8-2 (80mg de ATV), PA12-2 (120mg de ATV) e PA16-2 (160mg de ATV).

Para os filmes, produzidos por qualquer um dos métodos, os picos relacionados ao PCL são claramente observados, enquanto os picos relacionados a atorvastatina, em $2\theta=22,78^\circ$, $23,40^\circ$, $23,81^\circ$ (VII), só são observados nas amostras com maior concentração do fármaco (PA12-1, PA16-1, PA12-2 e PA16-2). Nos filmes produzidos pelo método 1, o pico (I) relacionado a PCL teve sua intensidade reduzida com a presença do fármaco, sugerindo que o mesmo possa estar interferindo na cristalinidade do polímero (figura 12). Em todos os filmes produzidos, foram observados os picos referentes a PCL.

De acordo com Sefat *et al.* (2019) a sobreposição dos picos pode ser atribuída ao aumento do espaço interplanar de ambas as fases. Dessa forma, evidencia-se a possibilidade de alguma interação entre os grupos hidroxilas presentes na ATV e grupos carbonílicos da PCL. Mínimas diferenças são observadas no difratograma dos filmes quando comparados aos materiais iniciais puros, podendo ter ocorrido devido alterações na estrutura cristalina do polímero. Essas diferenças vistas nas amostras podem afetar a liberação do fármaco (Jeong, Lee, & Cho, 2003).

5.3 Análise térmica do fármaco, polímero e filmes - TGA, DTG e DSC.

A atorvastatina, o PCL e os filmes contendo ambos foram termicamente analisados por TGA e DSC visando obter informações sobre a estabilidade térmica através da análise da temperatura de degradação e sobre a ocorrência de alteração na cristalinidade do fármaco e das transições térmicas desses materiais.

Nas figuras 14, 15, 16 e 17 são apresentados, respectivamente, as curvas de TGA e DTG da PCL (Figura 14), ATV (figura 15), dos filmes produzidos pelo método 1 (figura 16), e dos filmes pelo método 2 (figura 17).

Referente ao filme de PCL, a curva de TGA (Figura 14), mostrou que o início da degradação do mesmo ocorreu em torno de 390 °C. Essa temperatura é definida como a menor temperatura na qual pode ser detectado o início da perda de massa (T_i). A T_f , temperatura final de degradação do PCL, foi aproximadamente, 490 °C. Também consta à derivada da curva de decomposição térmica, onde é possível observar que a temperatura em que a degradação do PCL é máxima é de, aproximadamente, 448 °C, apresentando um único estágio de perda de massa.

Na literatura está descrito que o filme de PCL degradou completamente em um único estágio, com pico de degradação máxima em torno de 430°C. Esse estágio corresponde à despolimerização da PCL a partir das extremidades da cadeia polimérica, com os grupos terminais hidroxila formando a ϵ -caprolactona (Canbolat, Celebioglu, & Uyar, 2014; Tous, Ruseckaite, & Ciannamea, 2019). Assim, os valores de T_i e T_f obtidos no presente trabalho variaram em, aproximadamente, 20 °C, em relação aos trabalhos encontrados na literatura.

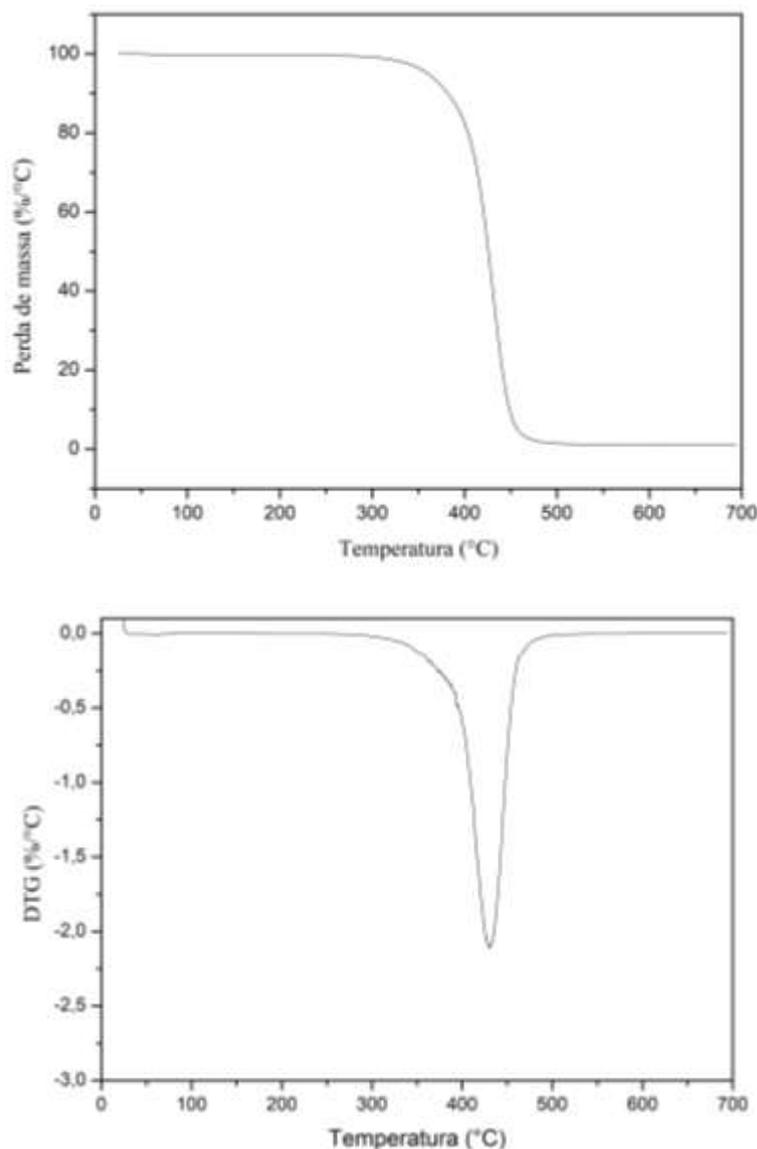


Figura 14: Curvas de TGA e DTG da PCL, respectivamente

A decomposição do fármaco ocorreu em etapas, como é possível visualizar na figura 15. A curva referente a atorvastatina tem padrão compatível com a literatura, como pode ser observado nos trabalhos desenvolvidos por Kim *et. al* (2008) e Zhang *et.al* (2009), onde são observadas 3 regiões de perda de massa relativas. Após o aquecimento, a ATV sofre uma pronunciada perda massa na região de 75-140°C, que pode ser atribuída à perda de três moléculas de água, indicando a forma tri-hidratada (Kim *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Pode-se observar também, na curva de TGA, que a maior perda de massa se dá após 200°C, devido a degradação do fármaco, sugerindo assim que é possível trabalhar até essa temperatura sem que haja degradação térmica.

Shete *et. al.* (2010) obtiveram em suas curvas termogravimétricas da ATV resultados semelhantes a este trabalho. Segundo os autores, a primeira e a segunda etapa foram relacionadas à perda de água, sendo a primeira relacionada à perda de água ligada e a segunda a perda de água de hidratação. A primeira etapa se deu entre 80-125°C e a segunda na faixa de 141 a 147 °C. Esses dados corroboram com os observados neste trabalho, em que a primeira perda de água se deu na faixa de 50-120 °C e a segunda na faixa de 140-144 °C.

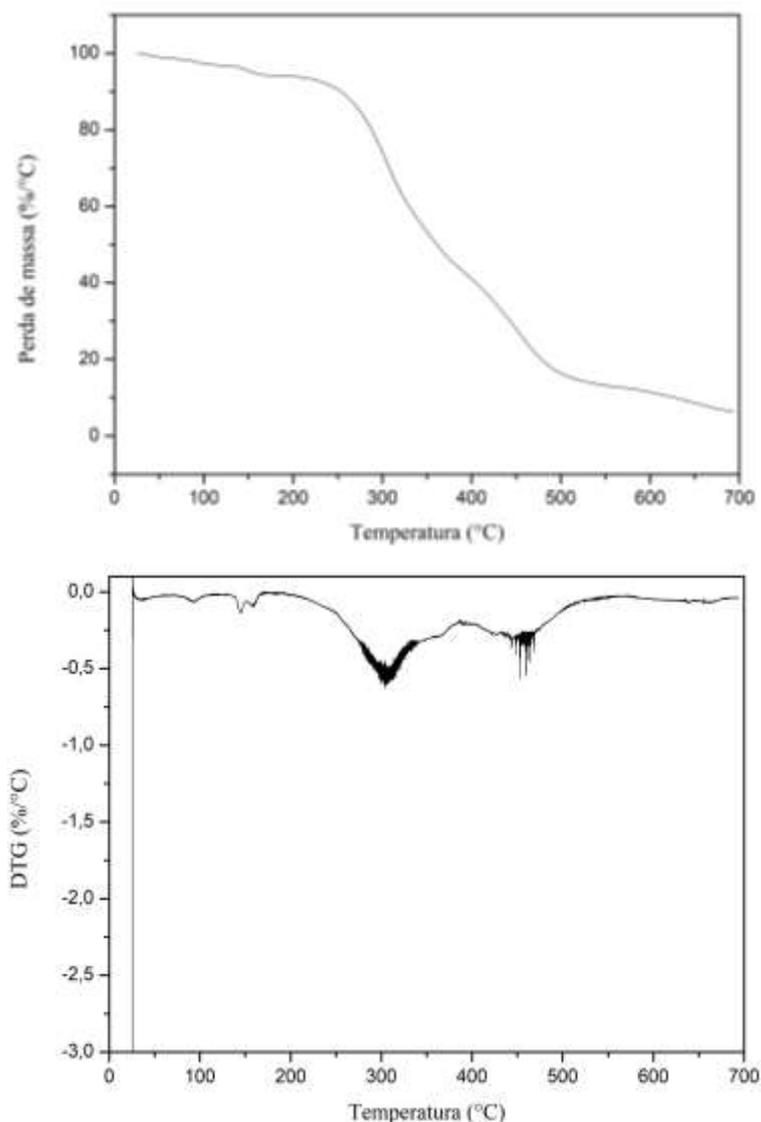


Figura 15: Curvas de TGA e DTG da ATV, respectivamente

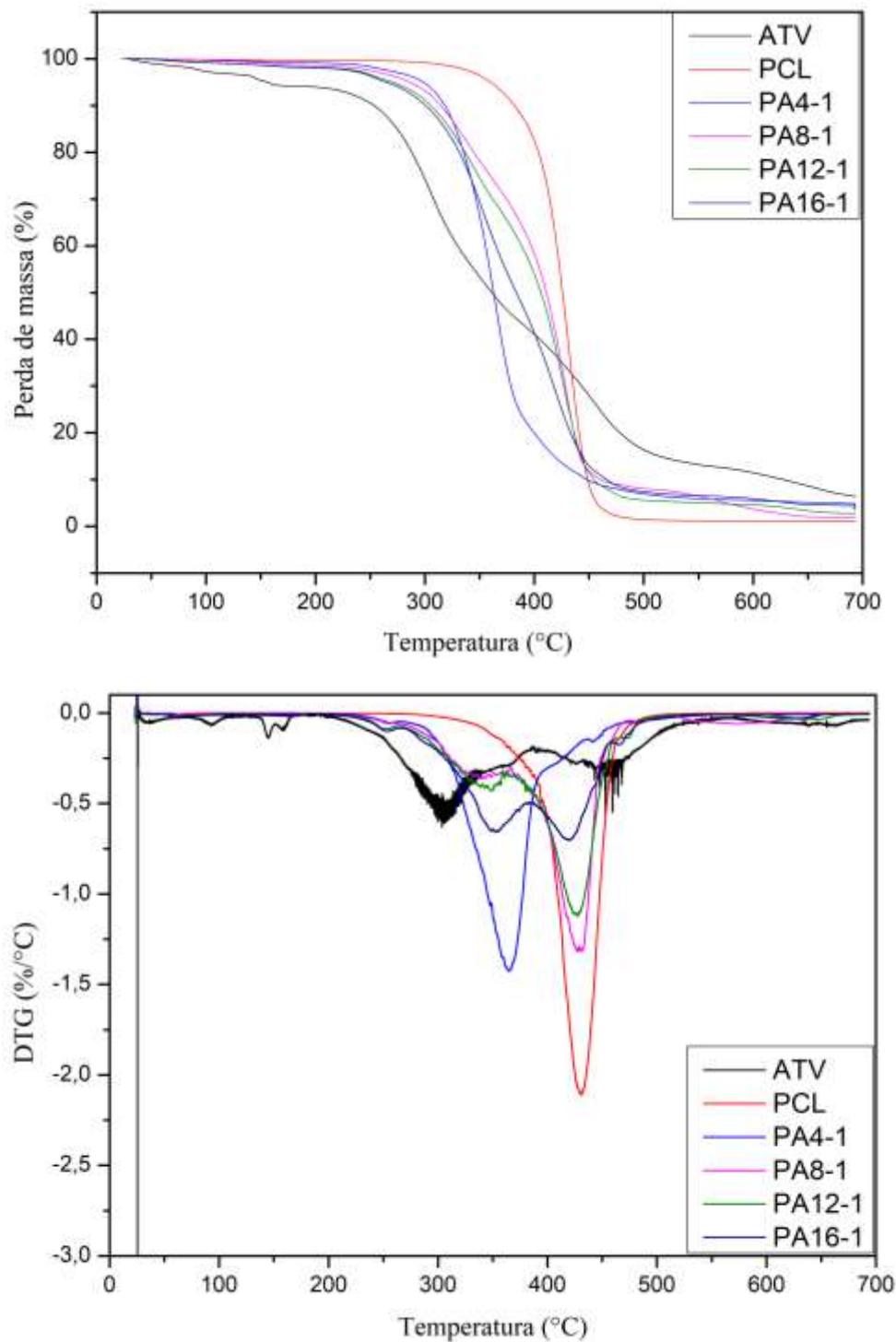


Figura 16: Termograma de TGA e DTG da ATV, PCL e dos filmes de PCL/ATV utilizando o método 1: PA4-1 (40mg de ATV), PA8-1 (80mg de ATV), PA12-1 (120mg de ATV) e PA16-1 (160mg de ATV).

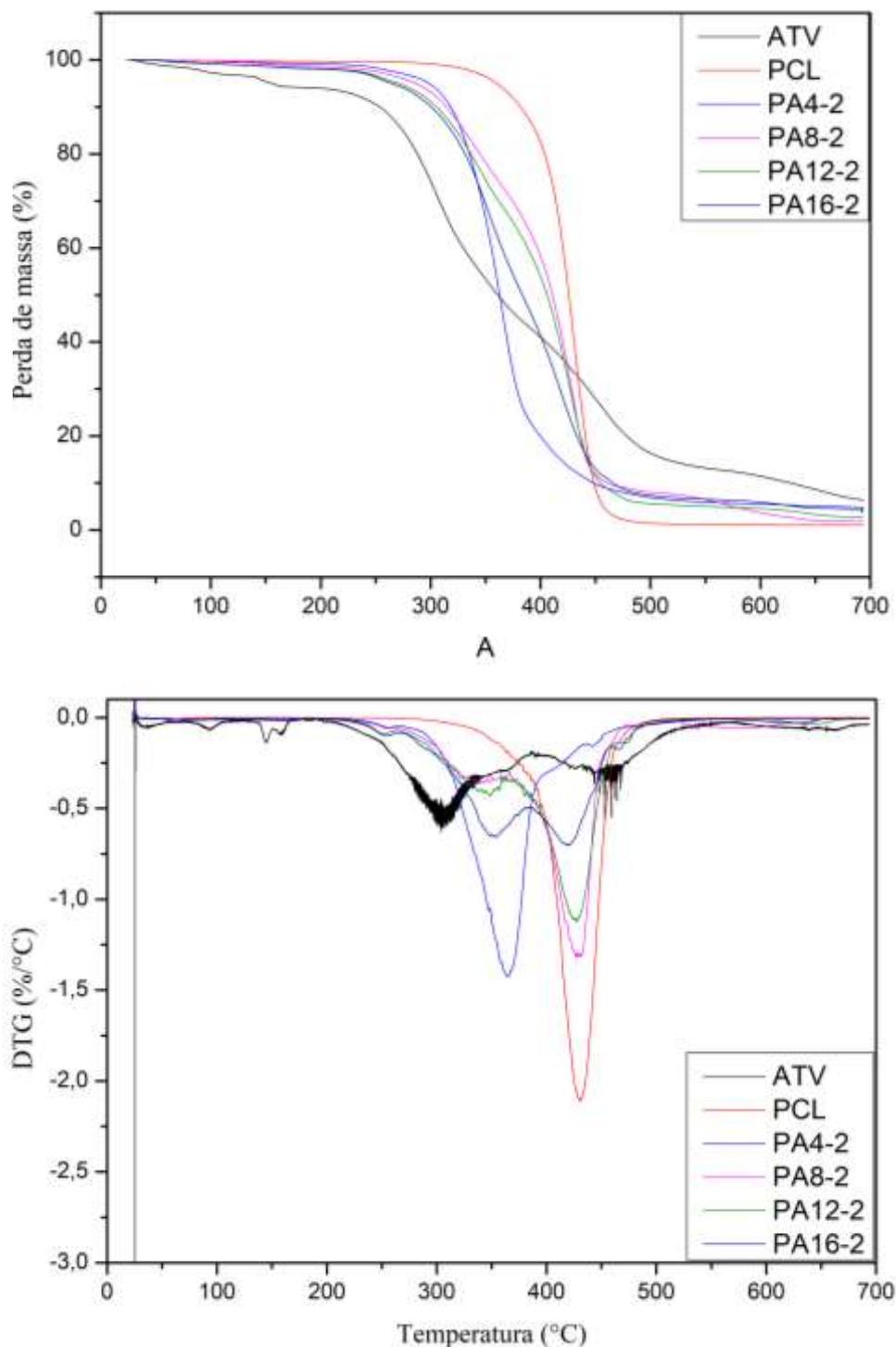


Figura 17: Termograma de TGA e DTG da ATV, PCL e dos filmes de PCL/ATV utilizando o método 2: PA4-2 (40mg de ATV), PA8-2 (80mg de ATV), PA12-2 (120mg de ATV) e PA16-2 (160mg de ATV).

Nas tabelas 3 e 4 são apresentados os valores de temperatura onde a degradação térmica é máxima nos filmes produzidos por ambos os métodos.

Tabela 3: Valores de temperatura onde a degradação térmica é máxima nos filmes obtidos com base na curva de DTG dos filmes de PCL.

| Amostra | T (°C) |
|---------|--------|
| PCL | 430,57 |
| PA4-1 | 426,24 |
| PA8-1 | 423,69 |
| PA12-1 | 438,55 |
| PA16-1 | 422,86 |
| PA4-2 | 417,64 |
| PA8-2 | 430,27 |
| PA12-2 | 427,96 |
| PA16-2 | 419,43 |

Tabela 4: Valores de temperatura onde a degradação térmica é máxima nos filmes obtidos com base na curva de DTG da atorvastatina.

| Amostra | T (°C) | T (°C) | T (°C) |
|---------------|--------|--------|--------|
| Atorvastatina | 250 | 350 | 470 |
| PA4-1 | 251,90 | 353,04 | 472,53 |
| PA8-1 | 251,01 | 354,19 | 478,53 |
| PA12-1 | 249,37 | 340,04 | 466,45 |
| PA16-1 | 252,16 | 346,44 | 468,29 |
| PA4-2 | 254,96 | 373,27 | 451,57 |
| PA8-2 | 252,17 | 333,52 | 484,56 |
| PA12-2 | 250,30 | 347,92 | 473,88 |
| PA16-2 | 252,39 | 352,28 | 465,72 |

Segundo a Tabela 4, a degradação da atorvastatina começa por volta de 250°C com três etapas, mantendo-se termicamente estável até essa temperatura. Nos filmes, o fármaco apresenta pequenos eventos com pouca perda de massa, em aproximadamente 250 °C, 350 °C e 470 °C (figuras 16 e 17) também apresentam as etapas de decomposição compatíveis com o PCL (~430 °C) (figuras 16 e 17).

A perda de massa da Atorvastatina presente nos filmes teve início em temperaturas superiores a 200°C, valores superiores àqueles observados no TGA do fármaco puro

(figuras 16 e 17). Tal fato pode estar relacionados com o aprisionamento do fármaco no filme polimérico. No estudo de Lins T. B. (2015), observou-se que os solventes clorofórmio, etanol e metanol levaram à formação de uma estrutura amorfa do ATV, sendo relacionado com alterações no FTIR na faixa de estiramento hidroxila e nos dados do DSC como diminuição da entalpia e desaparecimento do pico de fusão. Enquanto, os solventes éter e acetato de etila não levaram a uma mudança no hábito cristalino quando comparados ao fármaco antes do processo de recristalização. Foi possível observar uma modificação nos filmes PA4-1 e PA4-2 (figuras 16 e 17), onde a banda relacionada ao pico de degradação do PCL ocorreu em uma menor temperatura, podendo estar relacionado com interações entre o fármaco e o polímero. Também foi observado alterações nas amostras PA16-1 e PA16-2, onde ocorreu uma redução na intensidade do pico referente a degradação da PCL e o aparecimento de um novo pico, podendo estar relacionado ao pico referente a ATV, por volta de 350°C (figuras 16 e 17)

Tanto os materiais iniciais quanto os filmes produzidos também foram avaliados através do DSC e os resultados são apresentados nas figuras 18, 19, 20 e 21. No caso da ATV aqueceu-se a amostra até 180°C devido a temperatura de degradação desse fármaco. Já para o PCL e para os filmes, foi maior, pois a degradação ocorre em temperaturas mais altas.

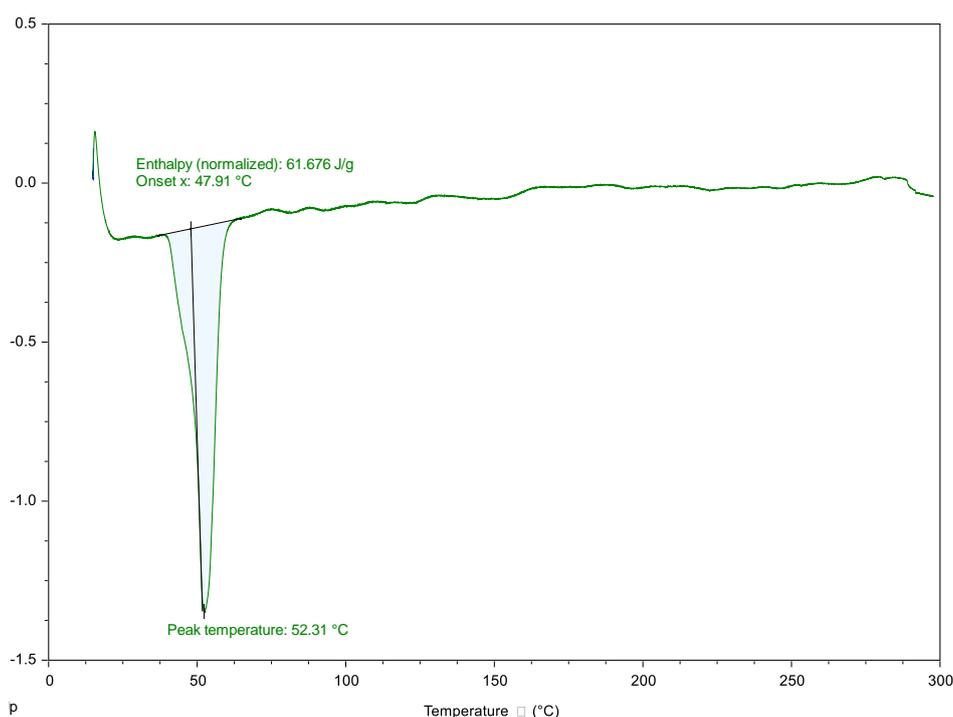


Figura 18: Curvas de DSC da PCL.

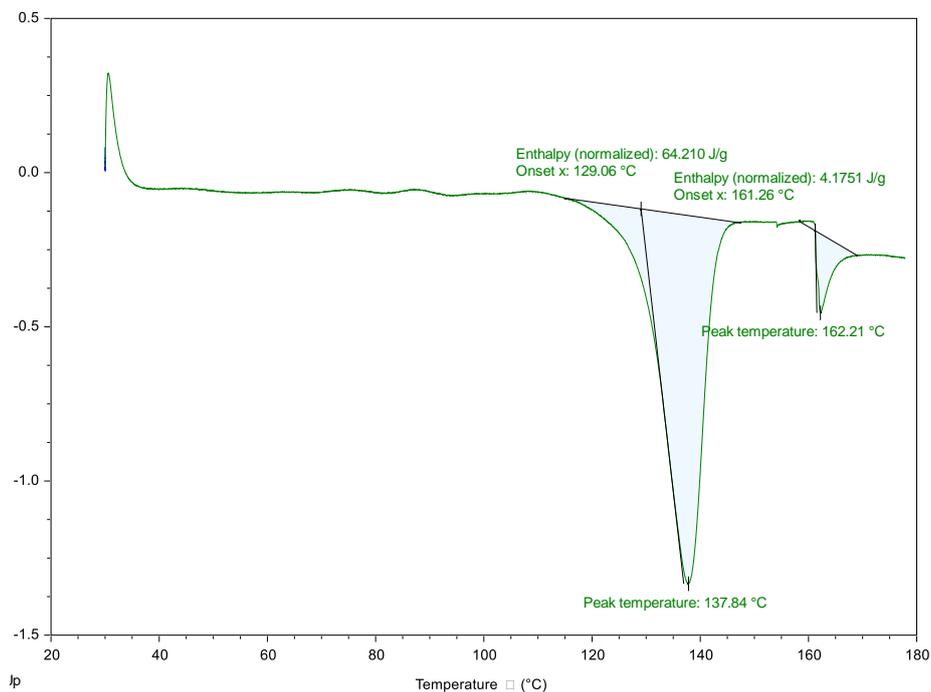


Figura 19: Curvas de DSC da Atorvastatina.

O filme de PCL puro (Figura 18) apresentou um único pico endotérmico que corresponde à fusão cristalina a 54° C. Fukushima, Tabuani, & Camino (2009) e Wan *et al.* (2009) observaram o mesmo em seus trabalhos. Para este polímero não foi detectada a temperatura de transição vítrea (T_g), sendo registrada somente temperatura de fusão (T_m), tanto na literatura quando nesse trabalho.

As curvas de DSC (figura 19) da ATV apresentam dois eventos endotérmicos: o primeiro na faixa de 100-140°C e o segundo em torno de 160°C, corroborando com os achados da literatura (Choudhary, Rana, Aggarwal, Kumar, & Zakir, 2012; Jahangiri *et al.*, 2015; Sonje *et al.*, 2010). Segundo Zhang e colaboradores (2009) verificou-se que a atorvastatina apresenta, na curva de DSC, dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro evento entre 75-125°C e atribuído a perda de três moléculas de água, consistente com os dados da TGA. Segundo o mesmo autor, o pico de fusão da Atorvastatina aconteceu em 158,8°C. Para Kim e colaboradores (2008), a fusão da Atorvastatina é observada como um pico endotérmico entre 159-160°C e a partir de 180°C seguem-se eventos endotérmicos referentes a sua decomposição. Logo, pode-se relacionar os valores encontrados neste trabalho com os trabalhos da literatura.

Os picos referentes a fusão da PCL se mantiveram semelhantes para os filmes produzidos por ambos os métodos, no entanto, para os picos referentes ao fármaco, a quantidade de energia foi modificada. O pico referente a perda de água da atorvastatina desapareceu no DSC dos filmes e o pico referente a sua fusão foi deslocado, indicando que seria necessária maior temperatura para degradação do filme. Esse fato corrobora com os dados de TGA dos filmes (figuras 16 e 17).

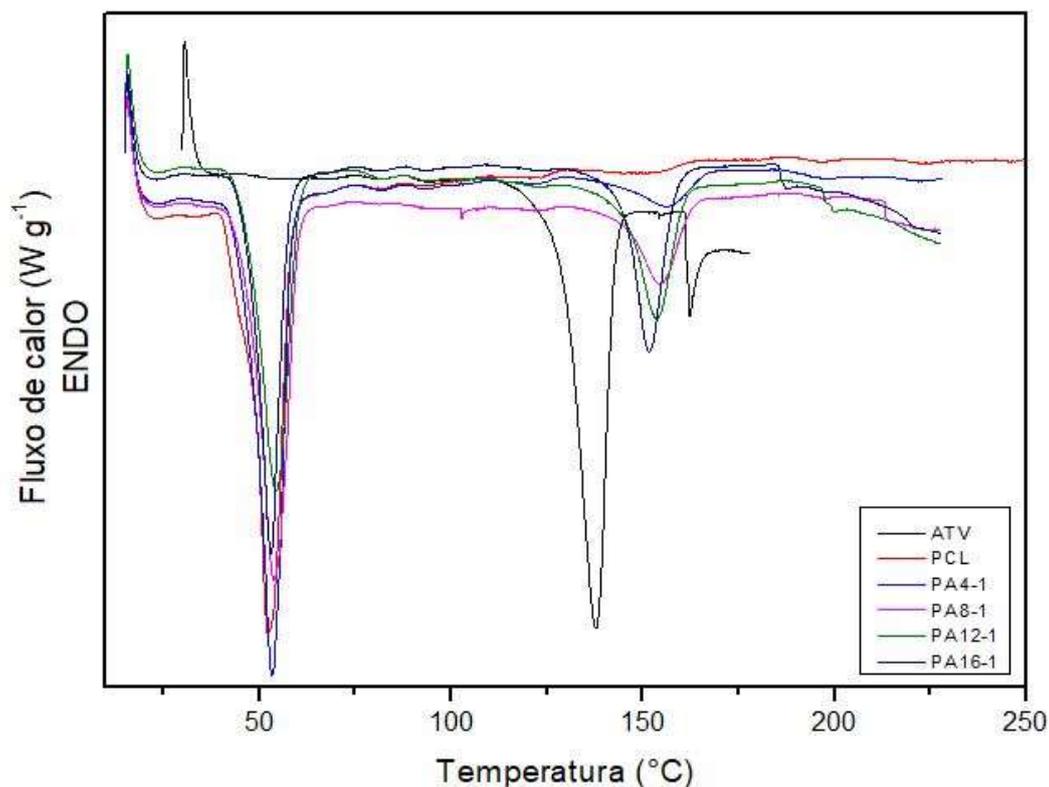


Figura 20: Curvas de DSC da ATV, PCL e filmes de PCL/ATV produzidas pelo método 1: PA4-1 (40mg de ATV), PA8-1 (80mg de ATV), PA12-1 (120mg de ATV) e PA16-1 (160mg de ATV).

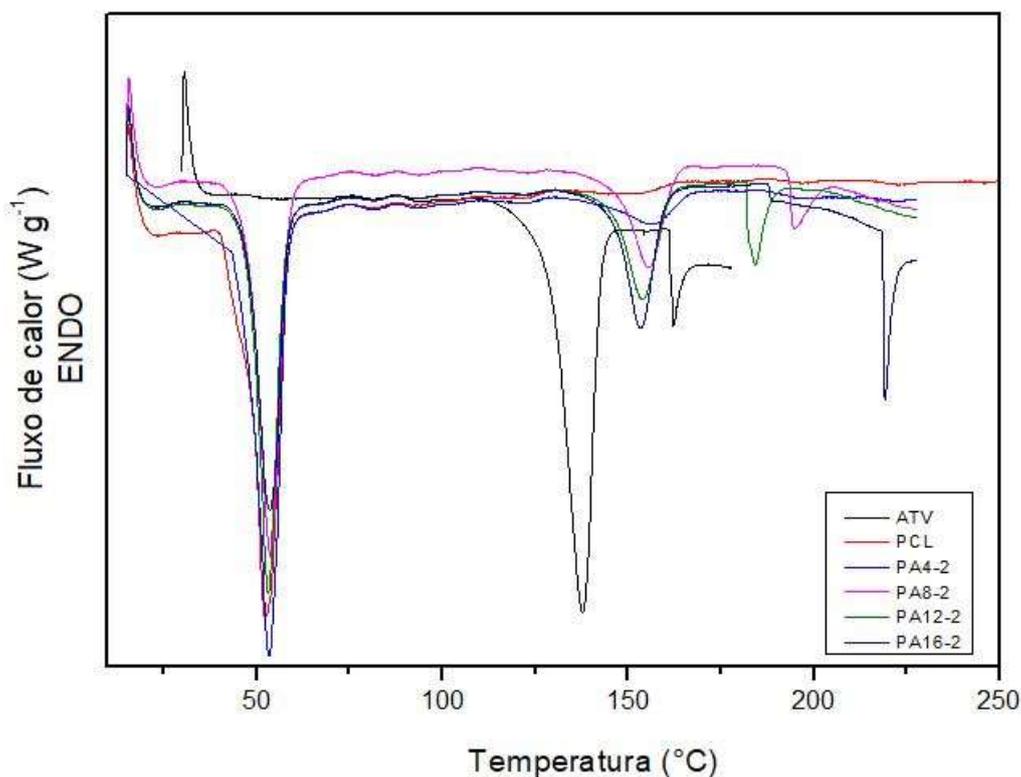


Figura 21: Curvas de DSC da ATV, PCL e filmes de PCL/ATV produzidas pelo método 1: PA4-2 (40mg de ATV), PA8-2 (80mg de ATV), PA12-2 (120mg de ATV) e PA16-2 (160mg de ATV).

5.4 Análise morfológica do fármaco, polímero e filmes – MEV/EDS

Tendo em vista que foram utilizadas duas metodologias distintas para a produção dos filmes e que estas metodologias podem afetar a dispersão da atorvastatina nos mesmos, alterando conseqüentemente suas características morfológicas, análises por MEV, foram realizadas para a ATV e para os filmes produzidos pelos métodos 1 e 2 contendo ou não o fármaco. As micrografias podem ser observadas nas figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31. Na micrografia da ATV observa-se estruturas em agulhas com comprimento e largura variáveis (figura 22). Antes da adição do fármaco, o filme de PCL puro apresenta uma superfície lisa, sem relevos aparentes (figura 23).

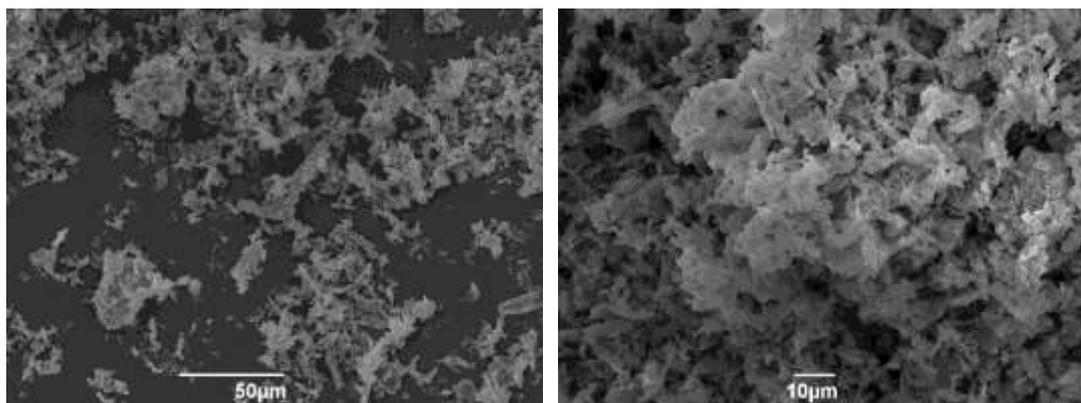


Figura 22: Imagens de MEV da Atorvastatina em pó

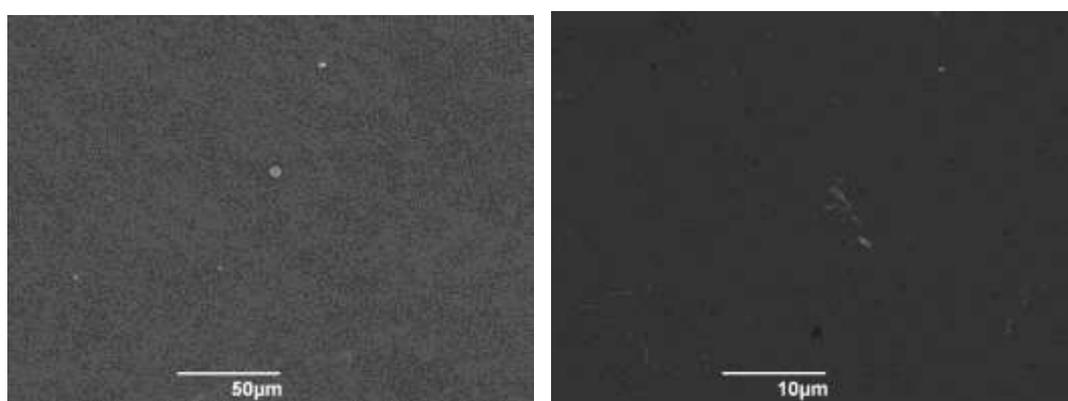


Figura 23: Imagens de MEV do filme de PCL

As figuras 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31 mostram imagens de MEV da superfície dos filmes formados através dos métodos 1 e 2. As imagens revelam aglomerados, e esses aumentam com o aumento da concentração, sendo um indicativo da presença de fármaco sem estarem dispersos. Nos filmes produzidos pelo método 1, as figuras em maior aumento mostravam pequenos grânulos, correspondente ao fármaco aglomerado e não disperso no filme de forma homogênea. Já nos filmes produzidos pelo método 2, esses aglomerados só são observados nas maiores concentrações de ATV (PA12-2 e PA16-2). Nas figuras 26, 27, 30 e 31, as partículas do fármaco estão mais visíveis, devido ao aumento da concentração. É sugerido, pelo que pode ser visto na imagem, assim como visualmente, que houve a formação de um aglomerado de fármaco sobre a superfície do filme polimérico. Assim, o fármaco não está homogêneamente disperso o que pode alterar o processo de liberação do fármaco. Nos filmes PA4-2 e PA8-2 (figuras 28 e 29), as superfícies mostraram melhor dispersão do fármaco na matriz polimérica, sendo possível a visualização de micropartículas do fármaco bem distribuídas ao longo do filme para

duas as concentrações de atorvastatina utilizada. Nos filmes PA12-2 e PA16-2 foram observadas depressões, que mostram um filme não homogêneo.

Dentre os resultados apresentados, os filmes PA4-2 e PA8-2 podem ser considerados as melhores amostras produzidas, pela superfície bem integrada entre o fármaco e o polímero e sem a presença de grumos.

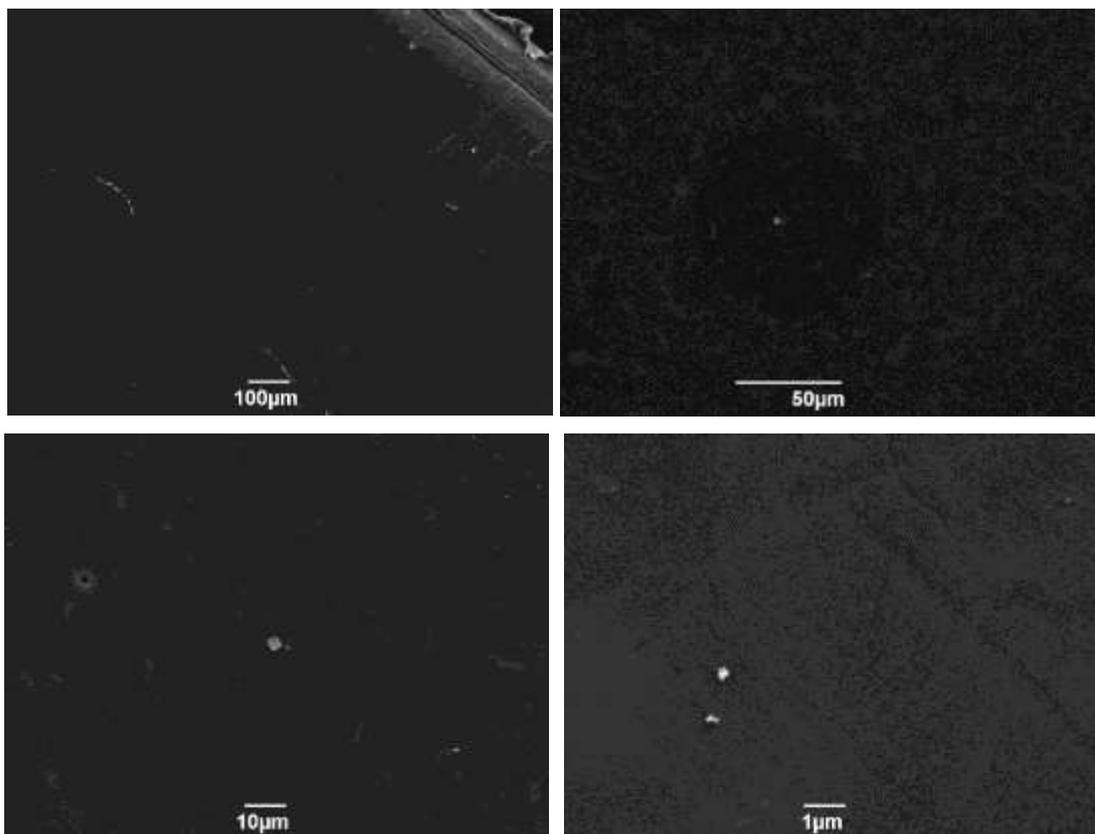


Figura 24: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA4-1

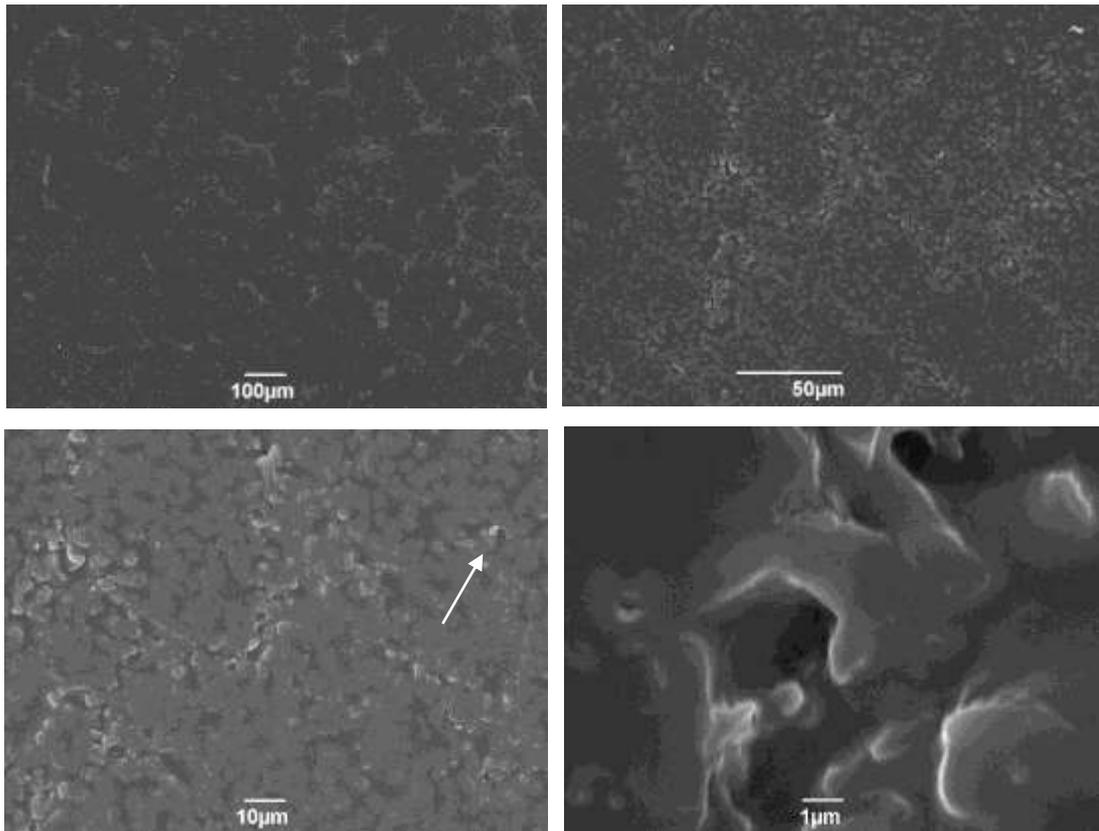


Figura 25: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA8-1.

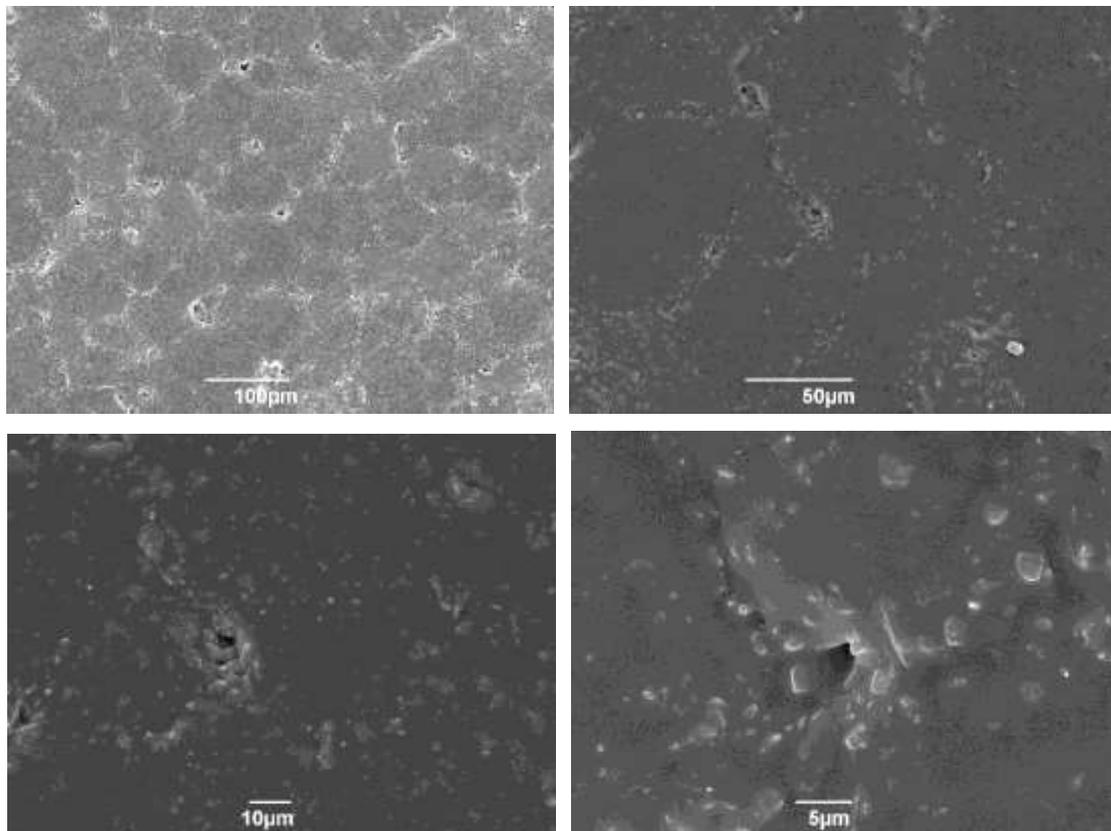


Figura 26: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA12-1.

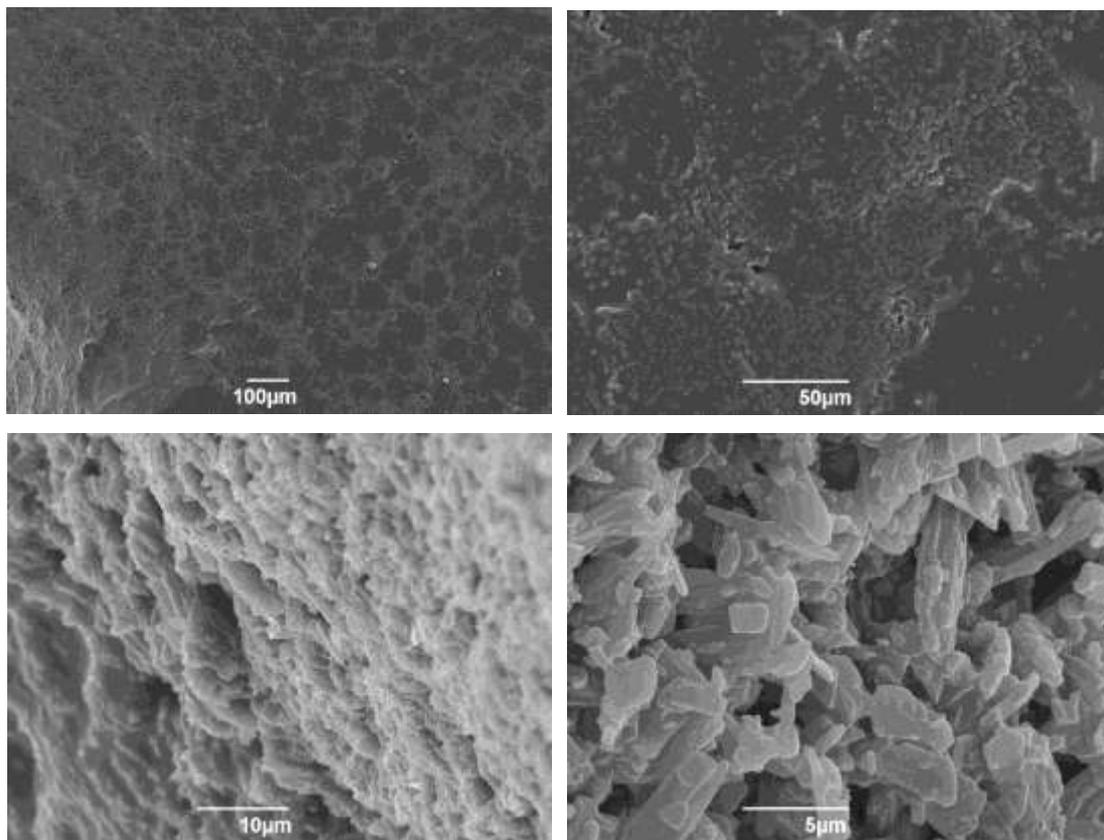


Figura 27: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA16-1.

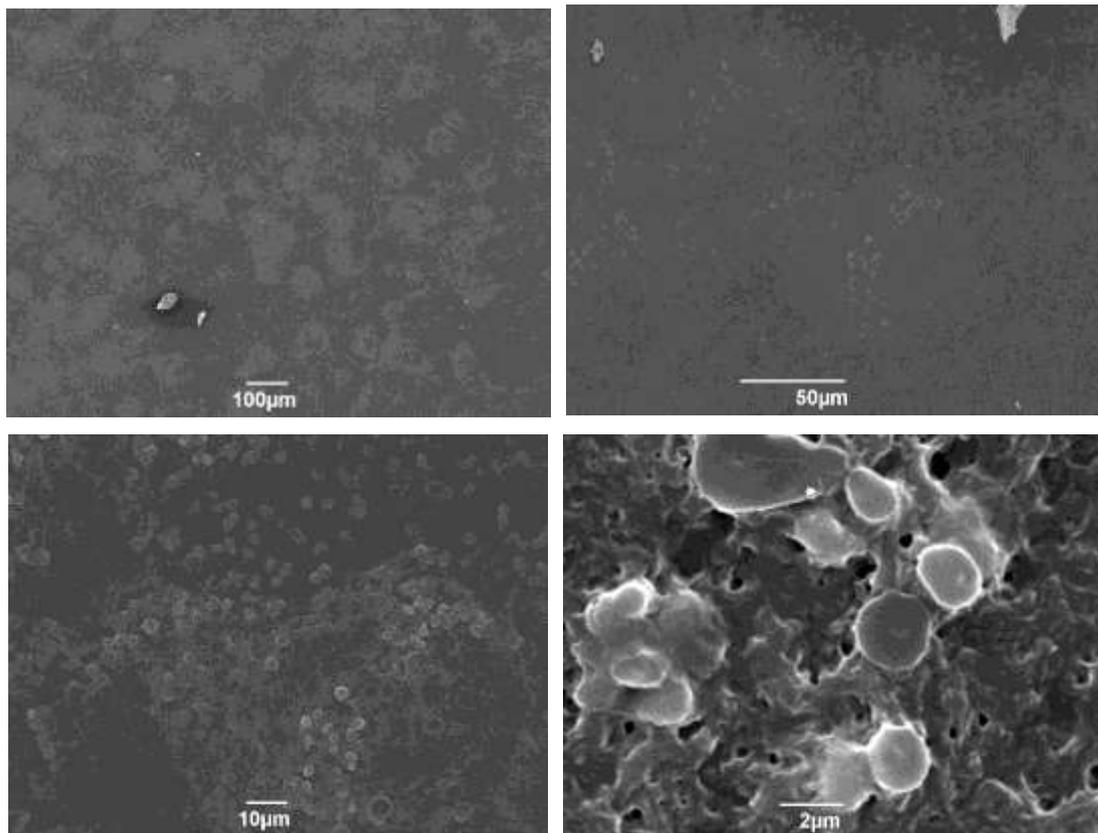


Figura 28: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA4-2.

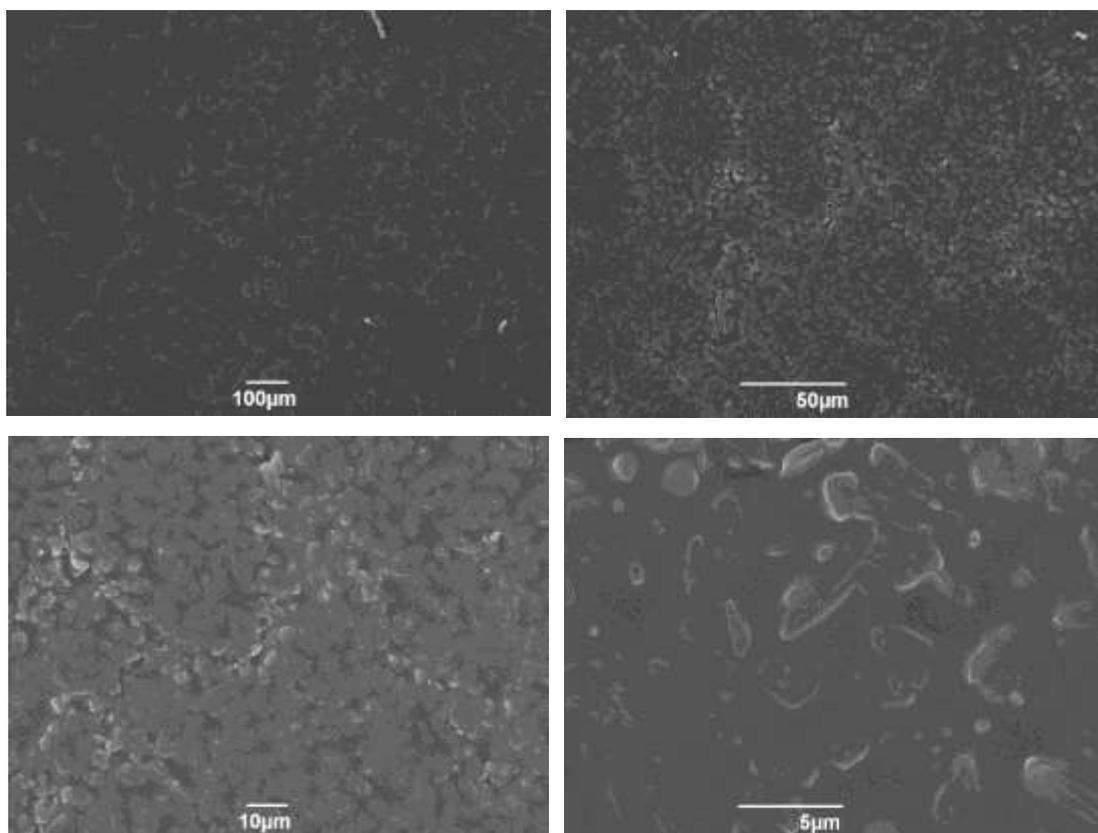


Figura 29: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA8-2.

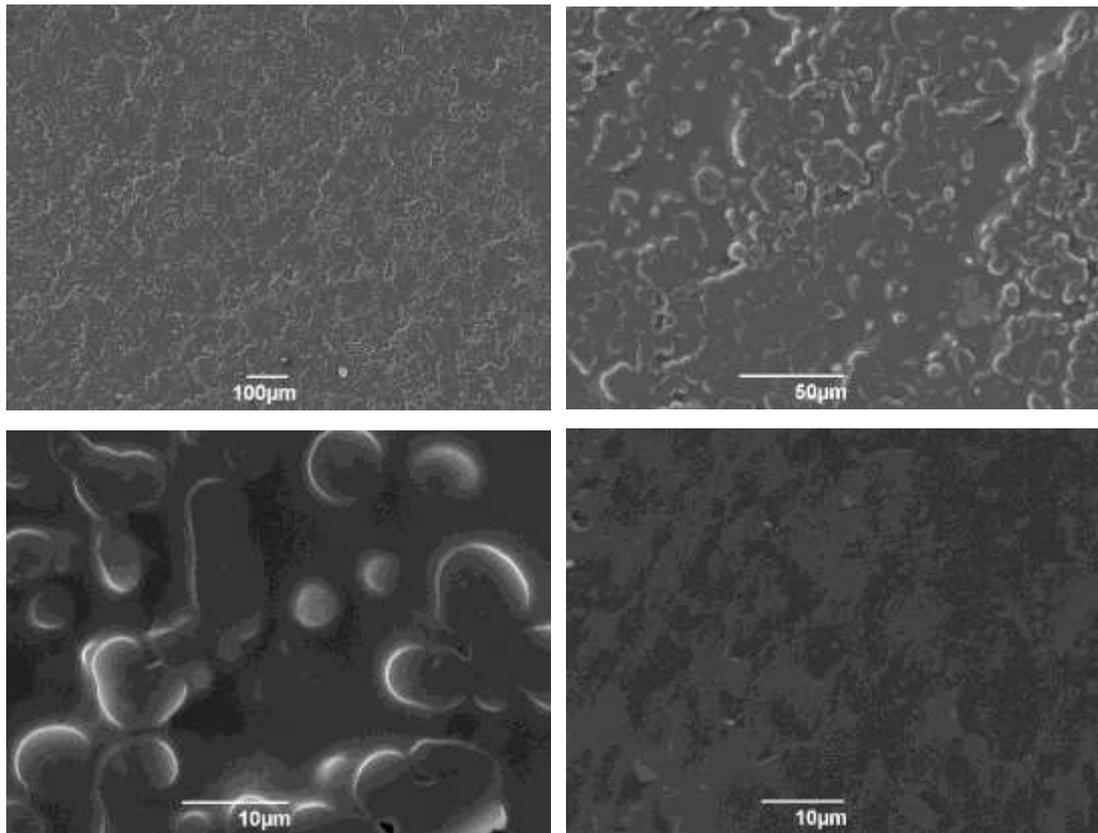


Figura 30: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA12-2.

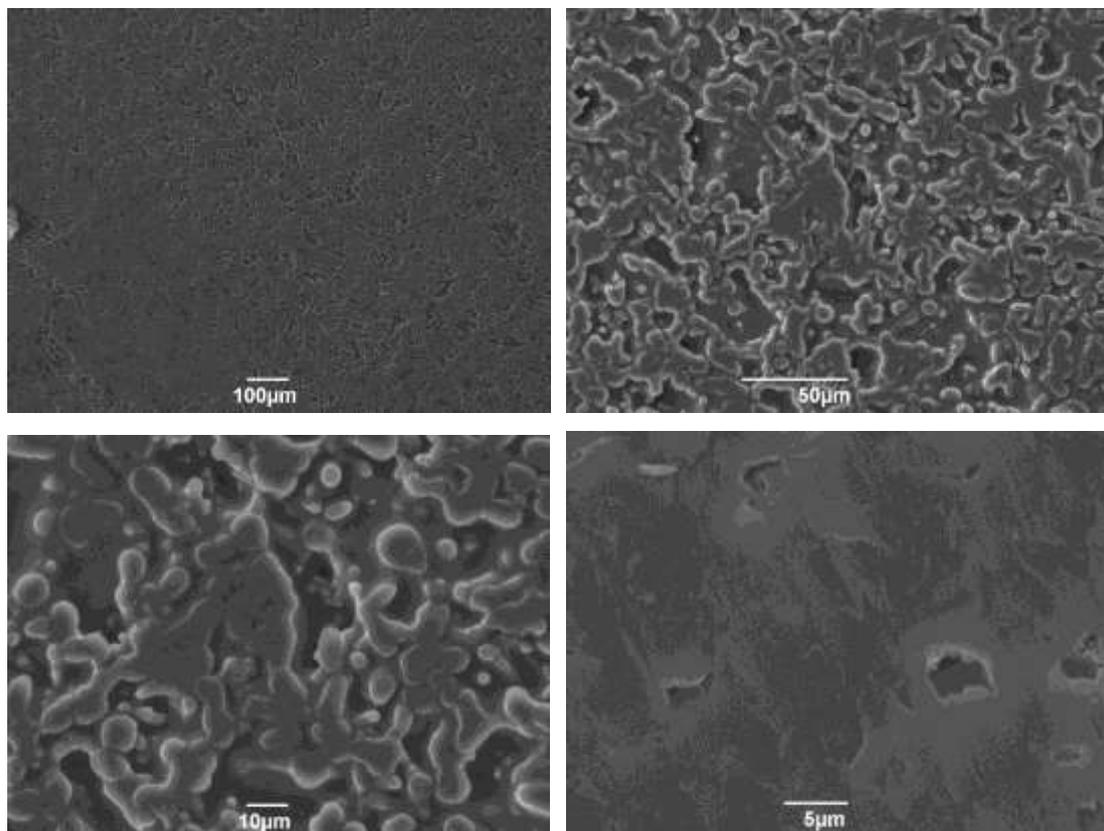


Figura 31: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme PA16-2.

A análise semi-quantitativa da composição química das partículas de ATV e do filme de PCL foi obtida pela técnica de EDS, cujo espectro pode ser visualizado nas figuras 32 e 33. No espectro da ATV é possível observar a presença dos elementos oxigênio (O), carbono (C), nitrogênio (N), flúor (F), cálcio (Ca), Sódio (Na) e enxofre (S). Esses elementos fazem parte da estrutura química do fármaco (Figura 32), sendo característicos do mesmos (Sonje *et al.*, 2010).

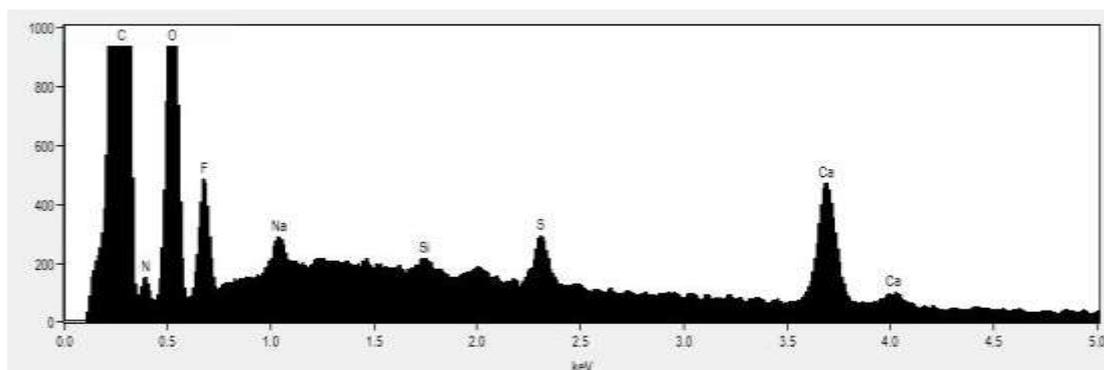


Figura 32: Espectro de EDS para a área analisada da ATV.

A partir do EDS é possível confirmar a presença dos elementos oxigênio (O) e carbono (C) presentes no PCL (Figura 33), assim como Pereira e colaboradores (2014). Dessa forma, é possível utilizar os compostos F e Ca para identificar a ATV dispersa no filme.

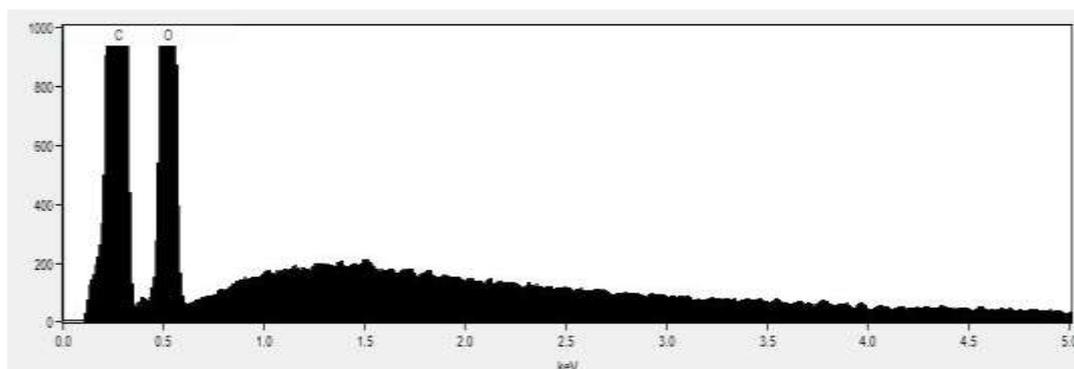


Figura 33: Espectro de EDS para a área analisada da PCL.

A análise semi-quantitativa da composição química dos filmes PA4-2 e PA8-2 foi obtida pela técnica de EDS, cujo espectro pode ser visualizado nas figuras 34 e 35. Foi feita a análise de EDS apenas desses filmes, pois esses apresentavam a maior dispersão

da ATV no filme polimérico antes da liberação e por apresentarem os melhores resultados após a liberação.

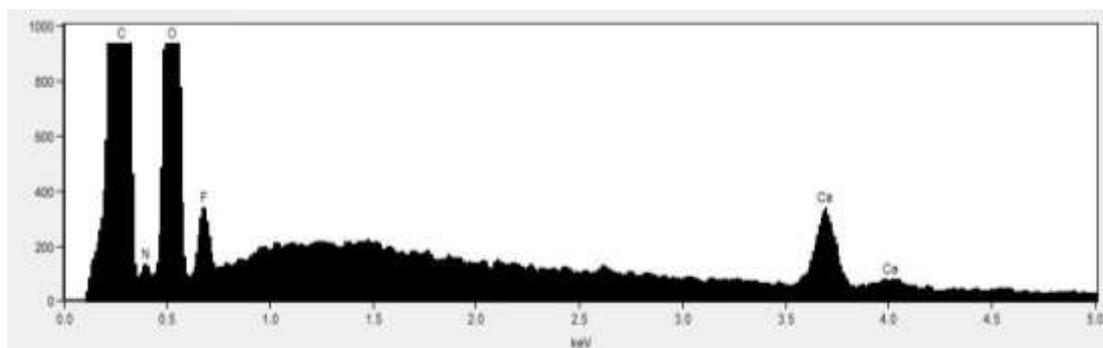


Figura 34: Espectro de EDS para a área analisada do filme PA4-2 em solução tampão fosfato pH 7,4.

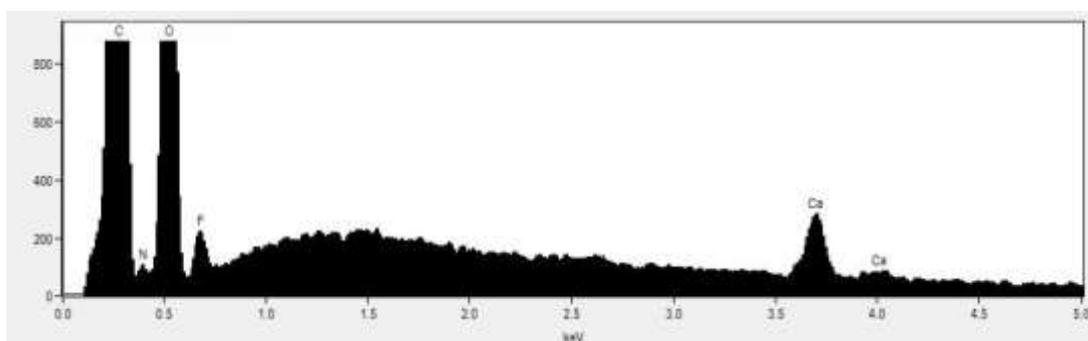


Figura 35: Espectro de EDS para a área analisada do filme de PA8-2 em solução tampão fosfato pH 7,4.

É possível perceber que no filme de PCL sem fármaco (figura 33), não aparece os elementos F e Ca presente no espectro da ATV (figura 32). No caso dos filmes, observa-se a presença desse pico, comprovando que o fármaco está disperso no mesmo.

Nos mapas dos elementos, observa-se que nos pontos de aglomerado são aqueles com maior quantidade dos elementos Ca e F, constatando que são aglomerados do fármaco (figuras 36 e 37). Na área sem aglomerado existe a presença do fármaco, com maior dispersão (figura 36).

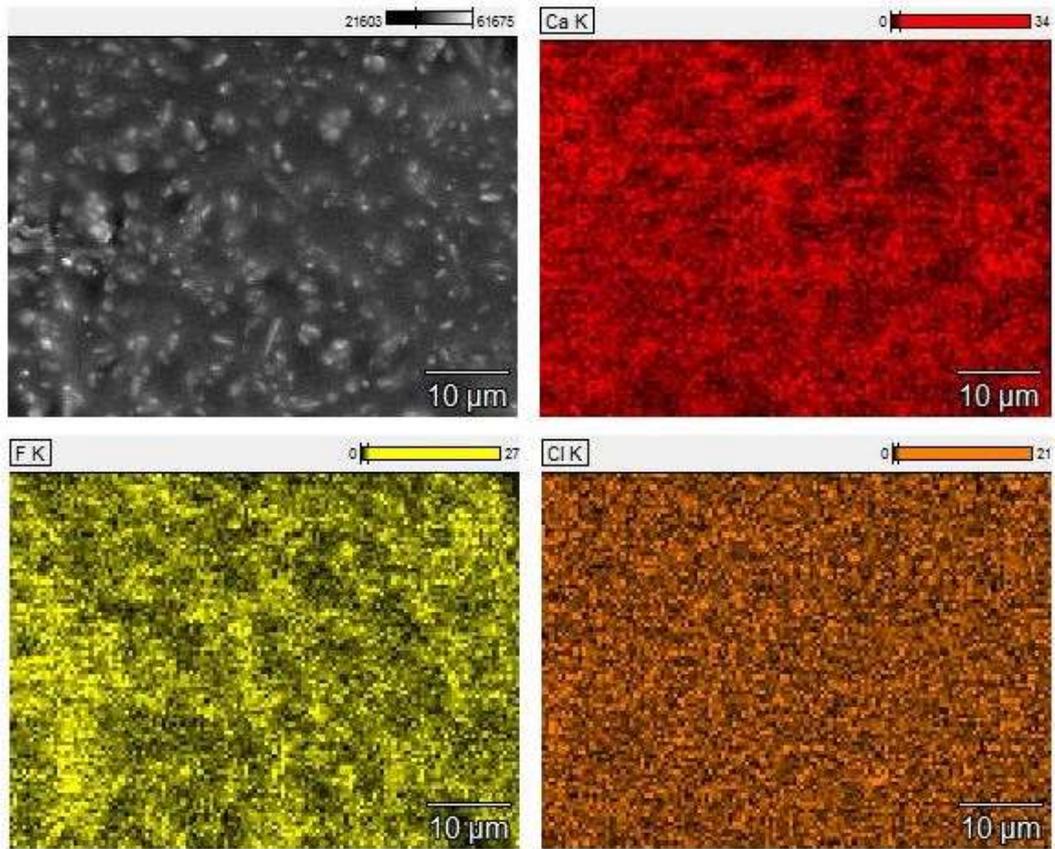


Figura 36: EDS dos elementos presentes no filme PA4-2.

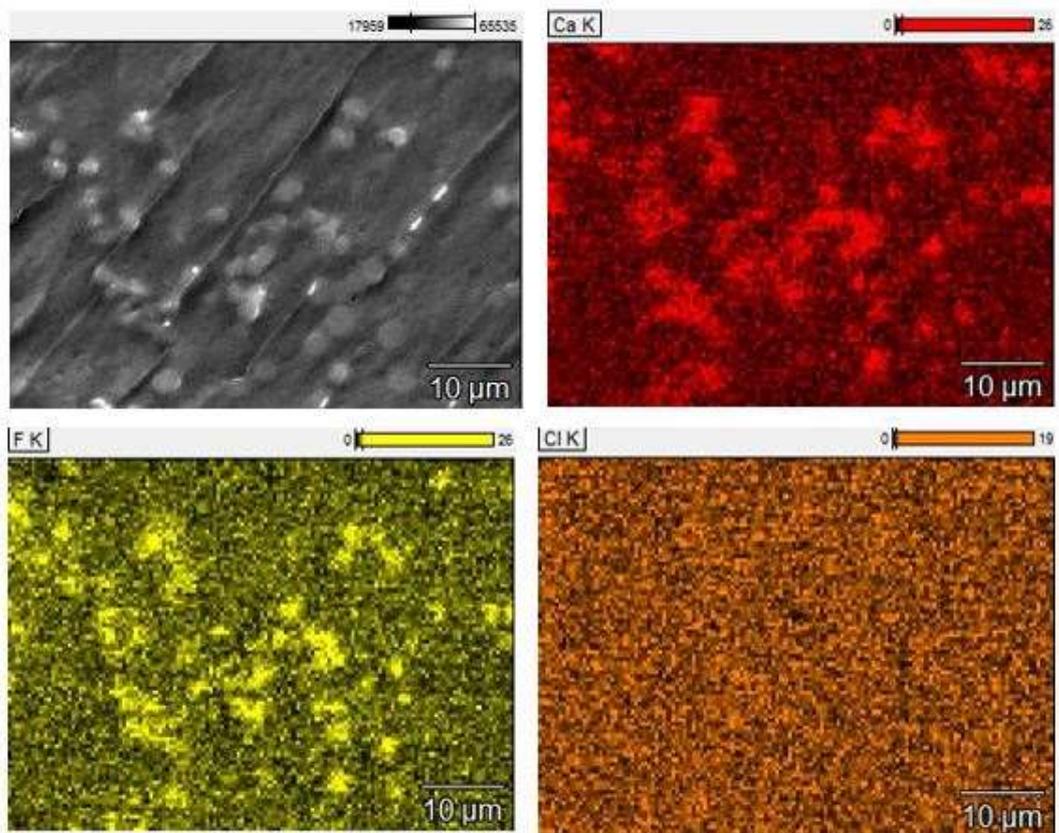


Figura 37: EDS dos elementos presentes no filme PA8-2.

Durante a aquisição do mapa de EDS, é possível observar a presença de um pequeno resíduo de Cl, que está homogeneamente disperso. Provavelmente, este elemento está presente devido a um resíduo do solvente orgânico, clorofórmio, utilizado no preparo dos filmes.

Junto com os resultados das demais caracterizações (FTIR, DRX, MEV, TGA), é possível chegar à conclusão que para a aplicação desejada, a segunda metodologia, e em menores concentrações de fármaco, foi mais eficiente visto que os filmes foram mais uniformes. Como os filmes produzidos pelo método 1 não apresentaram aparência satisfatória, com a presença de aglomerados do fármaco na superfície, e estes podendo interferir na liberação, apenas nos filmes produzidos pela segunda metodologia foram feitos os estudos de liberação.

5.5 Estudo da liberação da ATV em filmes de PCL/ATV

Com o objetivo de avaliar a capacidade de liberação de ATV presente nos filmes de PCL obtidos pelo método 2, os mesmos foram submetidos a um ensaio de liberação. Entretanto a liberação foi realizada apenas nos filmes PA4-2 e PA8-2 por serem os filmes mais uniformes e mais promissoras para um futuro produto.

Para a quantificação de ATV por UV-Vis, foi necessária a construção de uma curva padrão que correlaciona absorvância com a concentração do fármaco liberado. A curva obtida é apresentada na figura 38. A curva de calibração do fármaco foi preparada em solução tampão fosfato pH 7,4 e a ATV apresentou banda de absorção na faixa de comprimento de onda de 240 nm.

De acordo com os resultados apresentados na curva analítica, o modelo linear que correlaciona a absorvância e a concentração é dado pela equação 10.

$$y = 33,195x + 0,0176 \quad \text{(Equação 10)}$$

Em que x é a concentração e y a absorvância obtida. O coeficiente linear da curva (R^2) foi de 0,9663, sendo que segundo a literatura, valores de R^2 maior do que 0,95 indicam um ajuste satisfatório da equação aos dados obtidos (DASH *et al.*, 2010). Através da equação 10, foram calculados os valores de concentrações de atorvastatina nos ensaios de liberação *in vitro*, medindo a liberação nos tempos determinados.

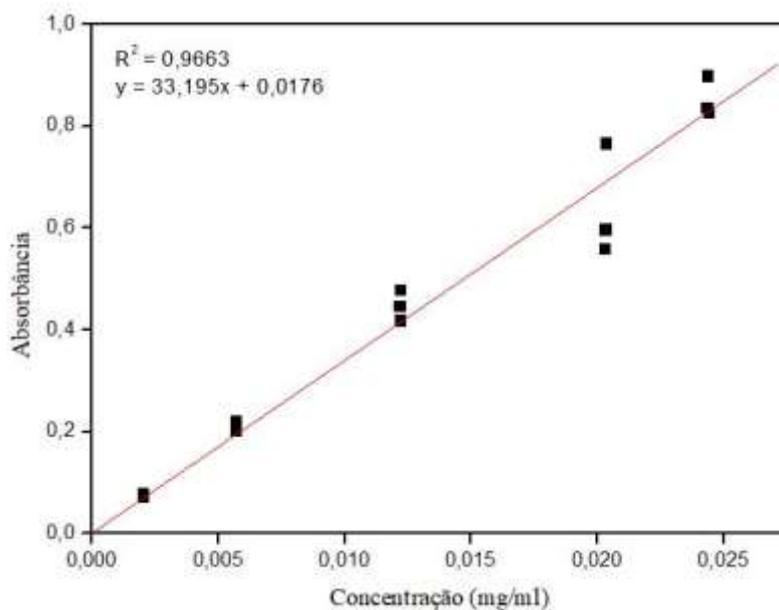


Figura 38: Curva analítica da atorvastatina em solução tampão fosfato pH=7,4.

A avaliação quantitativa da liberação do fármaco nos filmes PA4-2 e PA8-2 foi feita utilizando o espectrofotômetro UV-VIS nos diferentes tempos e o perfil de liberação obtido pode ser observado na figura 39.

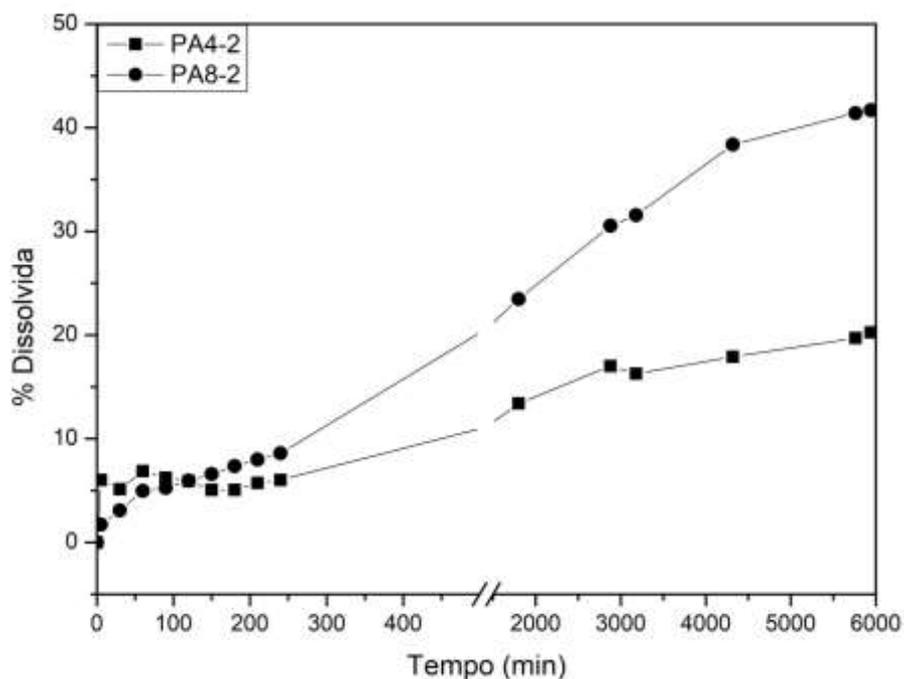


Figura 39: Perfil de dissolução da ATV contida nos filmes PA4-2 e PA8-2. Filmes produzidos pela técnica de *solvent casting* em solução tampão fosfato pH 7,4.

É possível observar na figura 39, que, ao final do ensaio, nenhum dos filmes liberou 100% da atorvastatina no tempo estudado. O filme que obteve a maior dissolução do fármaco foi o filme PA8-2 com 41,7 %, seguido do filme PA4-2 com 20,3% dissolvido.

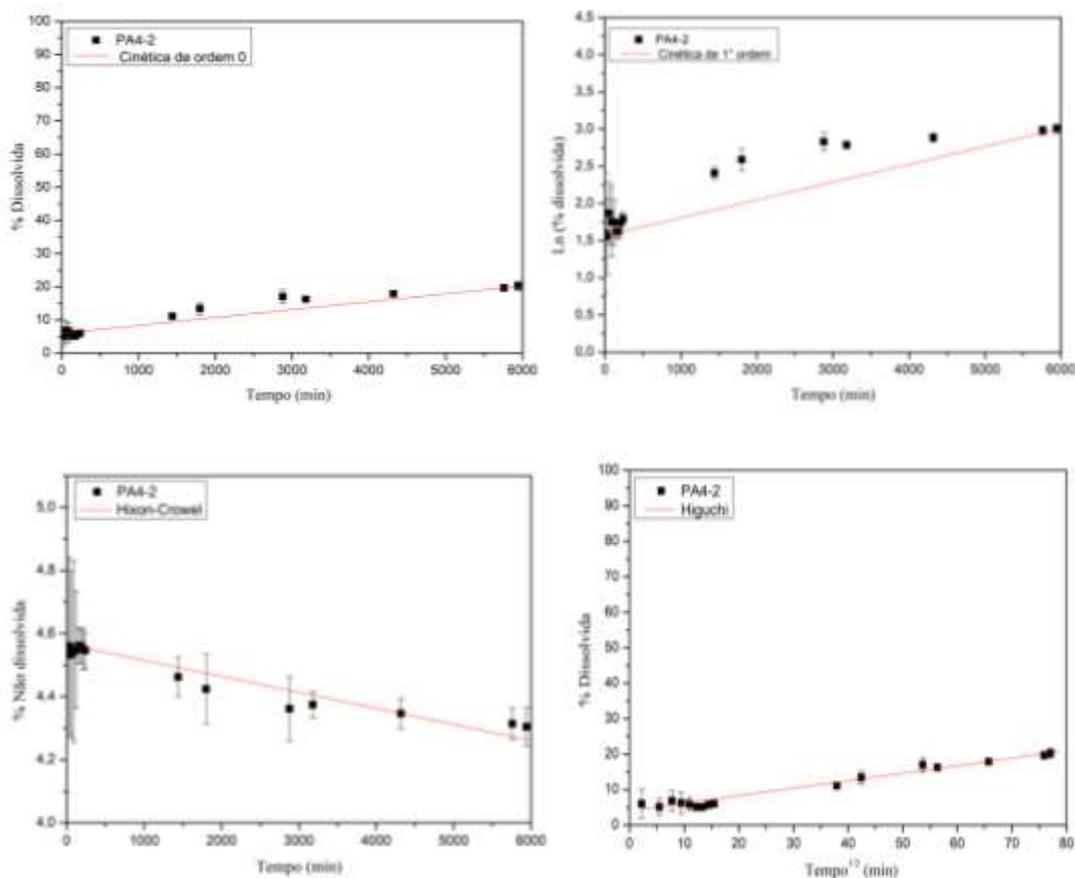
De acordo com Cai e colaboradores (2002) a morfologia de matrizes poliméricas influencia no comportamento da liberação do fármaco, assim como a taxa de degradação, hidrofilicidade/hidrofobicidade e na composição dos dispositivos de liberação controlada. Polímeros como a PCL e blendas que a tenham em sua composição, tendem a liberar o fármaco mais facilmente devido a sua temperatura de fusão. Neste estudo os autores observaram que a copolilactona com Tg por volta de 37°C seria um portador de drogas em potencial (Cai, Bei, & Wang, 2002). Como visto no tópico 5.4, nas imagens obtidas pela análise no MEV, a superfície dos filmes PA4-2 e PA8-2 (figuras 28 e 29) aparentaram ser mais homogêneas e lisas do que a dos filmes PA12-2 e PA16-2 (figuras 30 e 31), que possuíam maior concentração de ATV ao longo do filme e na sua superfície, o que pode ter relação direta com a liberação do fármaco. É válido ressaltar que os filmes foram produzidos utilizando apenas a técnica de *solvent casting*, logo a produção de filmes através de outras técnicas pode ser utilizada, já que a técnica de produção empregada altera morfologia e conseqüentemente a resposta de liberação do fármaco.

A dissolução do fármaco contido nos filmes pode ser considerada como prolongada, quando a liberação do insumo ativo dos filmes não alcançou 50% de liberação após 6000 minutos de análise. Rong e colaboradores (2012) estudaram a dissolução de nanopartículas de PCL contendo paclitaxel/5-fluorouracil e observaram a liberação controlada dos fármacos nos primeiros 16 dias. No sistema de liberação prolongada, são disponibilizadas duas doses do fármaco, a primeira, chamada de dose inicial de liberação imediata, necessária para produzir o efeito farmacológico desejado sem causar danos ao organismo. A segunda, chamada dose de manutenção, é liberada de modo gradual, com a finalidade de prolongar a extensão da resposta farmacológica (Bizerra & Silva, 2016).

O perfil cinético de dissolução foi afetado pela composição da amostra (figura 39). Embora a amostra de PA4 contenha menos ATV, nos primeiros 100 minutos, a liberação de ATV do PA4 foi maior do que a observada na amostra de PA8. Após 100 minutos, a taxa de liberação de ATV da amostra PA8 foi maior que a do PA4. De acordo com a figura 39, foi possível observar que não houve liberação total de ATV para nenhuma das amostras estudadas. As amostras de PA4 e PA8 liberaram 41,7% e 20,3% de ATV. Este fato pode ser explicado pela ATV presente na superfície dos filmes, que é liberada mais

rápido. Isso é observado nas micrografias (figuras 28 e 29), onde é possível observar partículas do fármaco inserido no filme. Efeito semelhante foi observado para a liberação de ibuprofeno em filmes de PCL produzidos no trabalho de Salmoria (2016), onde metade da concentração do fármaco (4mg) já havia sido liberada nos primeiros 200 minutos. Essa liberação inicial rápida não é tão interessante para o trabalho, visto que era esperado uma liberação prolongada desde os instantes iniciais.

Para entender melhor o comportamento da liberação do fármaco e os fenômenos envolvidos durante esse processo, os dados experimentais foram ajustados pelos modelos de liberação mais utilizados na literatura: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, Hixson-Crowell, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. As equações foram linearizadas para aplicação dos modelos e o ajuste dos resultados obtido pode ser visto nas figuras 40 e 41 para os filmes PA4-2, PA8-2, respectivamente. Os coeficientes de correlação (R^2) obtidos estão apresentados na tabela 5.



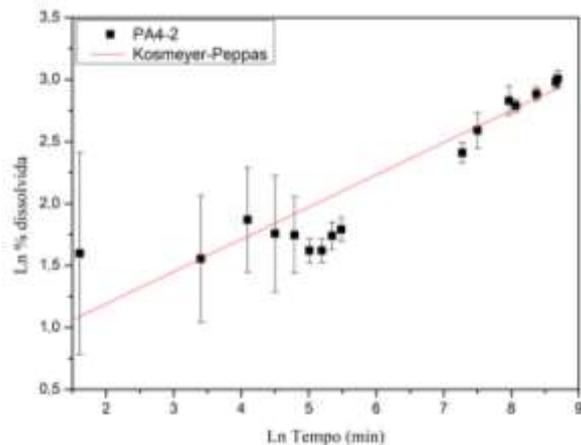


Figura 40: Avaliação do perfil de liberação do fármaco do filme PA4-2 em solução tampão fosfato pH 7,4 de acordo com diferentes modelos linearizados: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, Hixson-Crowell, Higuchi e Korsmeyer-Peppas.

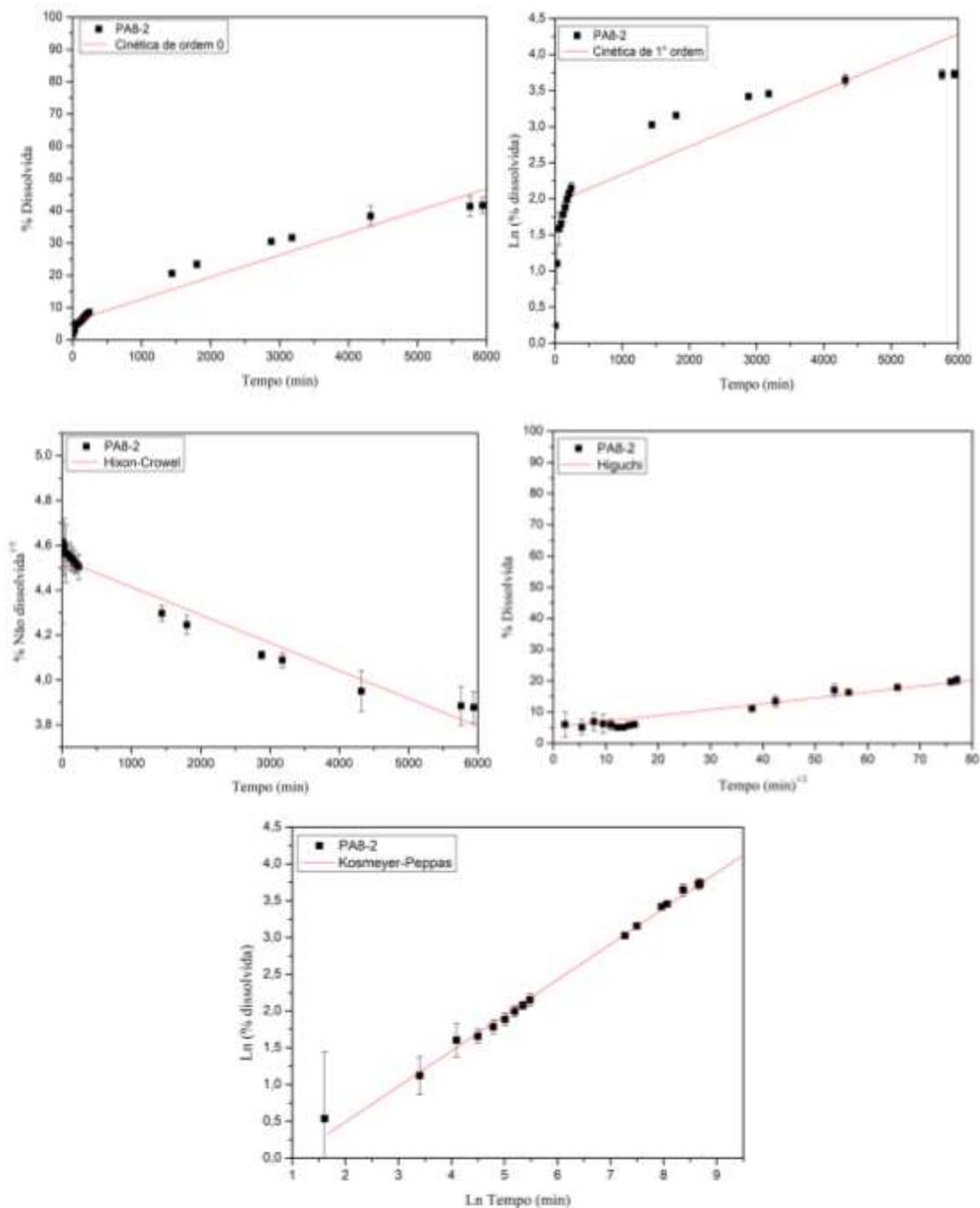


Figura 41: Avaliação do perfil de liberação do fármaco do filme PA8-2 em solução tampão fosfato pH 7,4 de acordo com diferentes modelos linearizados: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, Hixson-Crowell, Higuchi e Korsmeyer-Peppas.

Tabela 5: Coeficientes de correlação dos modelos (modelos de cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, Hixson-Crowell, Higuchi e Korsmeyer-Peppas) para a cinética de liberação dos filmes PA4-2 e PA8-2.

| Modelo | PA4-2 | PA8-2 |
|----------------------------|--------|--------|
| Cinética de ordem zero | 0,8920 | 0,9427 |
| Cinética de primeira ordem | 0,8669 | 0,7184 |

| | | |
|------------------|--------|--------|
| Hixson-Crowell | 0,9391 | 0,9634 |
| Higuchi | 0,9688 | 0,9688 |
| Korsmeyer-Peppas | 0,8439 | 0,9947 |

Analisando os gráficos (figuras 40 e 41) e a tabela 5, é possível constatar que o modelo que mais se aproxima de descrever o comportamento da liberação da ATV nos filmes é o modelo de Higuchi. Entretanto, é possível observar que alguns pontos ainda não são explicados pelo modelo: pontos 11 e 12 para PA4-2 e PA8-2 (figura 39)

Para o filme PA4-2, o modelo de Hixson-Crowell também se mostrou satisfatório em descrever a liberação do fármaco. Já para o filme PA8-2, o modelo de Cinética de ordem 0, Hixson-Crowell e Kosmeyer-Peppas obtiveram coeficiente de correlação maior que 0,90, mostrando capacidade em descrever a liberação do fármaco. Entretanto o modelo de Higuchi foi o que mais se aproximou em descrever o comportamento de ambos os filmes, uma vez que os valores obtidos foi acima de 0,96. Destaca-se o modelo de cinética de primeira ordem como o pior entre eles para descrever a liberação, o que era esperado, pois avalia normalmente formulações de liberação imediata.

O modelo de Higuchi é baseado na lei de Fick e para que possa ser utilizado é necessário considerar diferentes fatores: o transporte de massa pela difusão do fármaco, sendo a etapa limitante; a condição *sink* para a ATV (que é pouco solúvel em tampão fosfato pH 7,4 (Sonje et al., 2010)); o dispositivo não pode sofrer erosão enquanto durar a liberação do fármaco; o coeficiente de difusão das espécies deve ser constante; o inchamento do dispositivo deve ser insignificante ou acontecer rápido para assim atingir o equilíbrio; dentre outros (Siepmann & Siepmann, 2012).

Como o modelo de Higuchi foi o que melhor explicou a liberação do fármaco sugere-se que a difusão é uma etapa importante no processo de liberação, porém não é possível afirmar que todas as condições para a aplicação deste modelo foram realizadas só com a cinética, sendo necessário análises do filme após a liberação do fármaco. Salmoria (2016) afirmou em seu trabalho que a liberação do fármaco a partir das amostras PCL/IBP não foi linear em relação ao tempo, sugerindo a ação de diferentes mecanismos. A análise que aplica o modelo de Higuchi indicou a cinética de Fick para a liberação de ibuprofeno a partir de amostras PCL/IBP, sendo o principal mecanismo difusão. No entanto, pode haver uma combinação de mecanismos de difusão e erosão atuando, com reservatórios de fármacos nos poros fechados da matriz também afetando esse

comportamento. Para entender por quais processos o filme passou, foram feitas análises de MEV nos filmes após a liberação do fármaco e são explicadas no tópico 5.6.

5.6 Estudo da degradação após testes *in vitro*.

Após a liberação do fármaco, os filmes foram removidos e secos para serem analisados novamente por MEV. As micrografias dos filmes PA4-2 e PA8-2 podem ser vistas nas figuras 42 e 43. De acordo com o observado nessas imagens, é possível perceber a diferença na morfologia quando comparada à micrografia antes da liberação do fármaco (figuras 28 e 29). Essa diferença pode ser atribuída à saída das partículas do fármaco, que permitiu a formação dos poros na estrutura desses filmes.

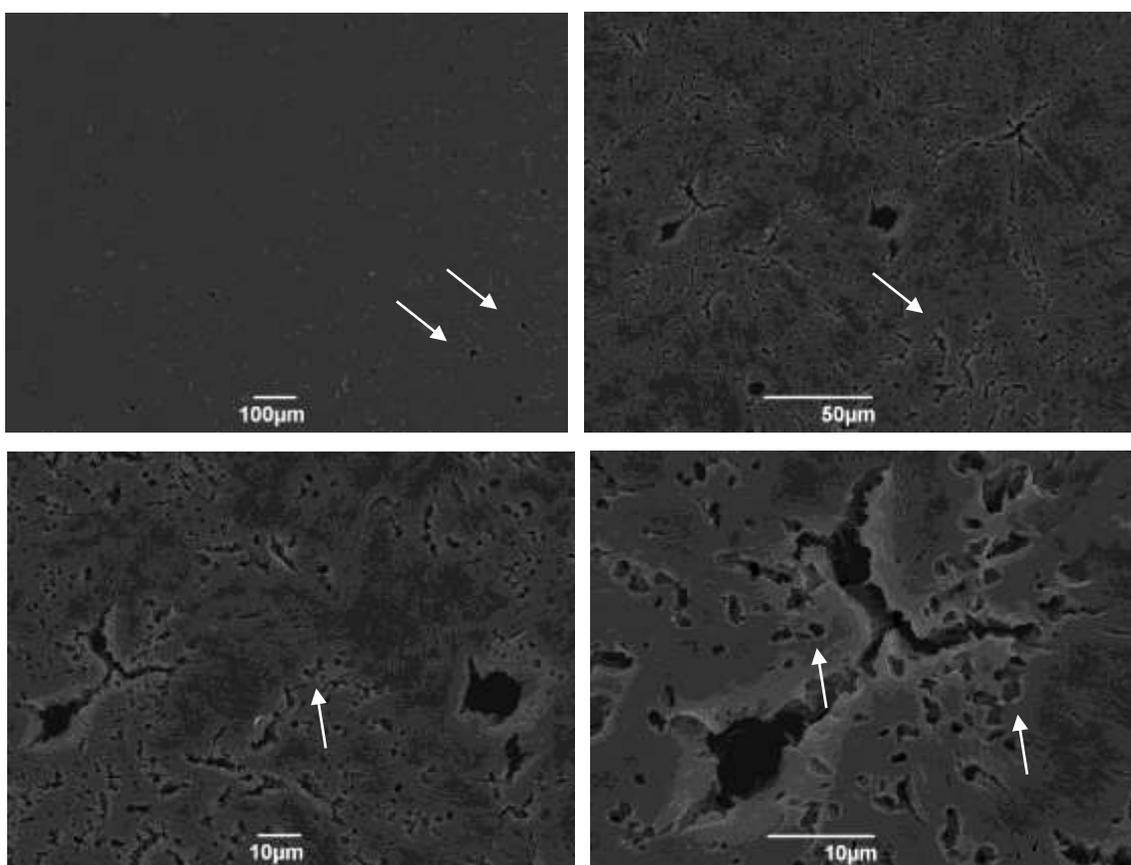


Figura 42: MEV filme PA4-2 (40mg de ATV) após a liberação do fármaco (6000 minutos).

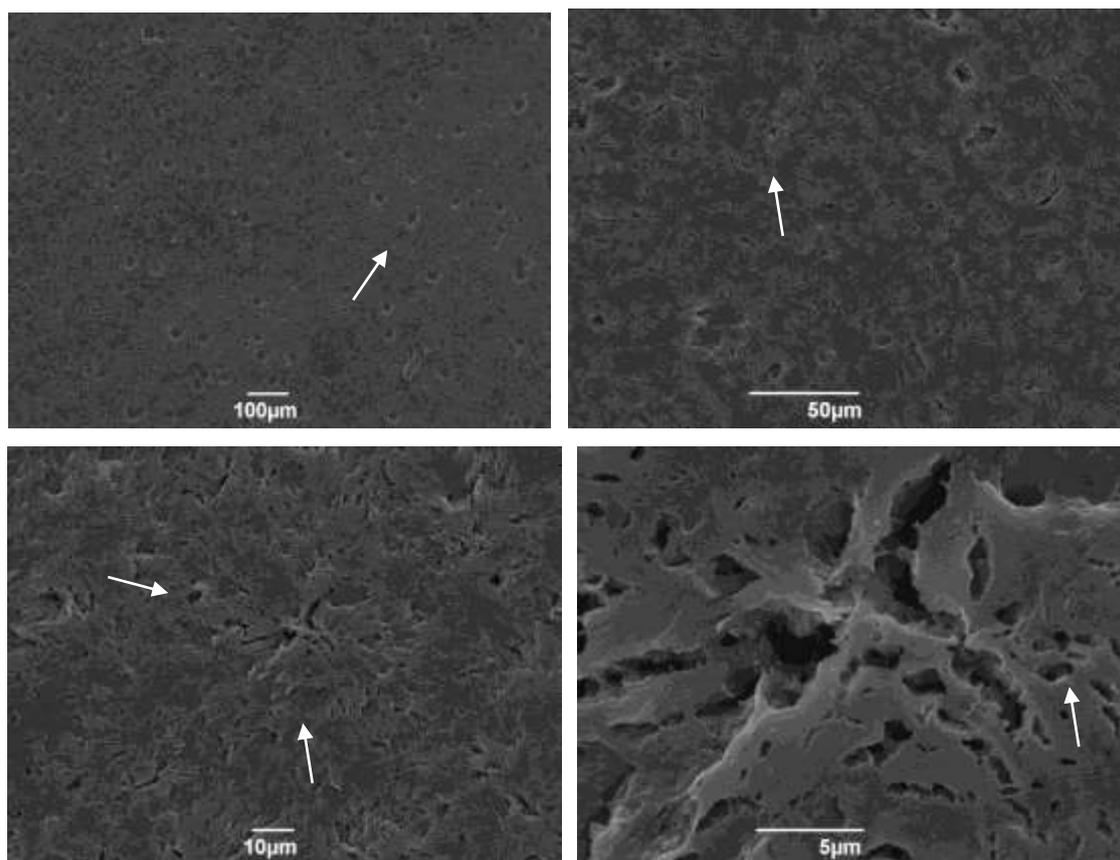


Figura 43: MEV filme PA8-2 (80mg de ATV) após a liberação do fármaco (6000 minutos).

Nessas imagens (figuras 42 e 43), é possível observar que houve a formação de poros possivelmente devido à saída das partículas do fármaco que, como mostrado pelas micrografias antes da liberação (figuras 28 e 29), estavam bem incorporadas aos filmes.

A importância da formação de poros na estrutura dos filmes se dá pois permite a fixação celular inicial, servindo como arcabouço, e posterior formação do tecido ósseo (Hutmacher et al., 2001). Dessa forma, os filmes produzidos a partir da PCL e ATV podem ser utilizados como matrizes, uma vez que se observa a formação de estruturas porosas tridimensionais que facilitam o crescimento tecidual. A saída das partículas do fármaco causou a erosão em alguns pontos da superfície polimérica, o que corrobora o fato dessas amostras não atenderem aos requisitos para a utilização do modelo de Higuchi e terem a sua liberação explicada por mais de um modo de liberação.

De acordo com o que foi observado nas análises de liberação do fármaco dos filmes e na comparação dos filmes antes e após a liberação por MEV, é sugerido que o mecanismo da liberação do fármaco pode conter as seguintes etapas: (1) Solubilização das partículas de fármaco que estavam mais próximas da superfície das amostras; (2) Difusão das partículas de fármaco que estavam no interior da estrutura do filme para a

solução, formando poros onde havia anteriormente as partículas do fármaco, podendo causar a erosão do polímero; (3) Difusão da solução tampão fosfato para dentro do filme após o início da dissolução do fármaco, ocorrendo a erosão do filme polimérico. Devido a PCL ser hidrofóbica, o processo de intumescimento pode ser mais difícil, sendo um fator de menor impacto na liberação.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, filmes de PCL contendo atorvastatina, através de duas metodologias (métodos 1 e 2) foram obtidas pelo método de *solvent casting*, entretanto, apenas o método 1 pode ser considerado viável.

A distribuição da atorvastatina nos filmes foi uniforme apenas no método 2, nas quantidades 40mg e 80mg do fármaco, alterando sua coloração de translúcida até branca com o aumento da concentração de fármaco. Nos filmes produzidos pelo método 1 o fármaco não foi uniformemente distribuído.

Todas as caracterizações comprovaram a incorporação do fármaco nos filmes, mantendo sua estrutura com alterações mínimas. Diferenças morfológicas foram verificadas entre filmes preparados nos seguintes métodos através da microscopia eletrônica de varredura.

Os espectros obtidos por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier indicaram que nenhuma ligação química entre a atorvastatina e a PCL foi formada durante o processo.

A análise de liberação do fármaco dos filmes obtidos indicou que, ao final dos ensaios (após 6000 minutos), a dissolução obtida chegou no máximo a 50%, indicando uma liberação prolongada da ATV. Os filmes PA4-2 e PA8-2 foram os que apresentaram melhores resultados tanto nas caracterizações, quanto na liberação, com liberação de 20,3% e 41,7% de ATV respectivamente para o meio em aproximadamente 5 dias de análise.

Os dados experimentais da análise de liberação dos filmes foram ajustados para diferentes modelos e o que mostrou melhor ajuste para os dois filmes estudados foi o modelo de Higuchi, apresentando coeficiente de correlação acima de 0,95 para ambos. As condições para a aplicação do modelo de Higuchi não foram completamente satisfeitas no presente trabalho, mas, devido ao valor de R^2 obtido, é sugerido que a difusão seja uma etapa importante no processo de liberação da ATV dos filmes de PCL produzidos por *solvent casting*. Assim, essas diferenças observadas no trabalho sugerem que o processamento e a morfologia das amostras têm influência direta na liberação do fármaco. Assim, é possível sugerir que os filmes poliméricos elaborados com o polímero biodegradável PCL apresentam as condições adequadas para o controle da liberação da atorvastatina, sendo uma alternativa interessante para melhorar a biodisponibilidade do fármaco.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Segue abaixo algumas sugestões para trabalhos posteriores:

- ✓ Analisar os filmes produzidos quanto a alterações físico-químicas e na composição após teste de liberação;
- ✓ Realizar testes biológicos para averiguar a eficiência da formulação no tratamento dessas doenças;
- ✓ Alterar a proporção PCL/ATV nos filmes, junto com a diminuição do solvente;
- ✓ Produzir os filmes de PCL/ATV por outras técnicas;
- ✓ Testar a adição de outros polímeros e plastificantes, para avaliar as mudanças nas propriedades do produto final.

8 REFERÊNCIAS

- Amass, W., Amass, A., & Tighe, B. (1998). *A Review of Biodegradable Polymers : Uses , Current Developments in the Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyesters , Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradation Studies.* 47.
- Barrère, F., Mahmood, T. A., Groot, K. De, & Blitterswijk, C. A. Van. (2008). Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration : Instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering R*, 59, 38–71. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.12.001>
- Bastos, V. D. (2007). Biopolímeros e polímeros de matérias-primas renováveis alternativos aos Petroquímicos. *Revista Do BNDES*, 14(28), 201–234.
- Beier, F. (2019). Cholesterol and cartilage do not mix well. *Nature Reviews Rheumatology*, 15(5), 253–254. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0204-z>
- Bernhard, J. C., & Vunjak-novakovic, G. (2016). Should we use cells , biomaterials , or tissue engineering for cartilage regeneration ? *Stem Cell Research & Therapy*, 3–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0314-3>
- Bizerra, A., & Silva, V. (2016). Sistema de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. *Revista Saúde e Meio Ambiente*, 3(2), 1–12.
- Bone, H. G., Kiel, D. P., Lindsay, R. S., Lewiecki, E. M., Bolognese, M. A., Leary, E. T., ... McClung, M. R. (2007). Effects of atorvastatin on bone in postmenopausal women with dyslipidemia: A double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(12), 4671–4677. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1909>
- Brugts, J. J., Yetgin, T., Hoeks, S. E., Gotto, A. M., Shepherd, J., Westendorp, R. G. J., ... Deckers, J. W. (2009). The benefits of statins in people without established cardiovascular disease but with cardiovascular risk factors: Meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ (Online)*, 339(7711), 36. <https://doi.org/10.1136/bmj.b2376>
- Cai, Q., Bei, J., & Wang, S. (2002). Relationship among drug delivery behavior, degradation behavior and morphology of copoly lactones derived from glycolide, L-lactide and ϵ -caprolactone. *Polymers for Advanced Technologies*, 13(2), 105–111. <https://doi.org/10.1002/pat.161>
- Canbolat, M. F., Celebioglu, A., & Uyar, T. (2014). Drug delivery system based on

- cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.11.021>
- CANEVAROLO JR., S. V. (2004). Técnicas de Caracterização de Polímeros. *Técnicas de Caracterização de Polímeros*, 229–261. Retrieved from www.artliber.com.br
- Carlos, A., Herrera, A., Físico-química, D. De, Química, I. De, Paulista, U. E., Prof, R., & Degni, F. (2010). *Revisão*. 33(6), 1352–1358.
- Chan, K. A., Andrade, S. E., Boles, M., Buist, D. S. M., Chase, G. A., Donahue, J. G., ... Platt, R. (2000). Inhibitors of Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A Reductase and Risk of Fracture Among Older Women. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 55(11), 696–697. <https://doi.org/10.1097/00006254-200011000-00019>
- Chen, Q., Liang, S., & Thouas, G. A. (2013). Progress in Polymer Science Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 38(3–4), 584–671. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.05.003>
- Choi, W., Lee, G., Song, W., Koh, J., Yang, J., Kwak, J., ... Chun, J. (n.d.). metabolism regulates osteoarthritis. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0920-1>
- Choudhary, A., Rana, A. C., Aggarwal, G., Kumar, V., & Zakir, F. (2012). Development and characterization of an atorvastatin solid dispersion formulation using skimmed milk for improved oral bioavailability. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(4), 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.05.002>
- Costa, B. R., Reichenbach, S., Keller, N., Nartey, L., Wandel, S., Jüni, P., & Trelle, S. (2017). Articles Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis : a network meta-analysis. *The Lancet*, 390(10090), e21–e33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31744-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31744-0)
- Costa, P. J. C. da. (2002). Avaliação in vitro da lioequivalência de formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(2), 141–153. <https://doi.org/10.1590/s1516-93322002000200003>
- Costa, P., & Lobo, J. M. S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutics Sciences*, 13, 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- da Silva. M. A. C. (2014). MEMBRANAS BIOREABSORVÍVEIS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) CARREGADAS COM METRONIDAZOL PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA. *Implementation Science*, 39(1), 1–15. <https://doi.org/10.4324/9781315853178>

- Da Silva, E. P., Pereira, M. A. V., De Barros Lima, I. P., Lima, N. G. P. B., Barbosa, E. G., Aragão, C. F. S., & Gomes, A. P. B. (2016). Compatibility study between atorvastatin and excipients using DSC and FTIR. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *123*(2), 933–939. <https://doi.org/10.1007/s10973-015-5077-z>
- DASH, S., MURTHY, P. N., NATH, L., & CHOWDHURY, P. (2010). REVIEW KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, *67*(3), 217–223.
- Dash, T. K., & Konkimalla, V. B. (2012). Poly- ϵ - caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*, *158*(1), 15–33. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.064>
- de Araujo, G. L. B., Pitaluga, A., Antonio, S. G., Santos, C. de O. P., & Matos, J. do R. (2012). Polimorfismo na produção de medicamentos. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, *33*(1), 27–36.
- Franchetti, S. M. M., & Marconato, J. C. (2006). Polímeros biodegradáveis - Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Quimica Nova*, *29*(4), 811–816. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000400031>
- Fukushima, K., Tabuani, D., & Camino, G. (2009). Nanocomposites of PLA and PCL based on montmorillonite and sepiolite. *Materials Science and Engineering C*, *29*(4), 1433–1441. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.11.005>
- Gazzerro, P., Proto, M. C., Gangemi, G., Malfitano, A. M., Ciaglia, E., Pisanti, S., ... Bifulco, M. (2012). Pharmacological actions of statins: A critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacological Reviews*, *64*(1), 102–146. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004994>
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Kolahreez, D., Ramakrishna, S., & Williams, D. (2019). Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, *10*, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.02.004>
- Gómez-Lizárraga, K. K., Flores-Morales, C., Del Prado-Audelo, M. L., Álvarez-Pérez, M. A., Piña-Barba, M. C., & Escobedo, C. (2017). Polycaprolactone- and polycaprolactone/ceramic-based 3D-bioplotted porous scaffolds for bone regeneration: A comparative study. *Materials Science and Engineering C*, *79*, 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.003>
- Gupta, A., Badyal, D. K., Khosla, P. P., Uppal, B., Jaison, T. M., & Chopra, S. (2008). Effect of atorvastatin on hs-CRP in acute coronary syndrome. *British Journal of*

- Clinical Pharmacology*, 66(3), 411–413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2008.03172.x>
- Hakkarainen, M., & Albertsson, A. (2002). *Heterogeneous Biodegradation of Polycaprolactone – Low Molecular Weight Products and Surface Changes*. 1357–1363.
- Higuchi, T. (1961). Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(10), 874–875.
- Hixson, A. W., & Crowell, J. H. (1931). Dependence of Reaction Velocity upon Surface and Agitation. *Industrial and Engineering Chemistry*, 23(8), 923–931. <https://doi.org/10.1021/ie50260a018>
- Hudecki, A., Kiryczyn, G., & Łos, M. J. (2019). *Overview*. (ii), 85–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1>
- Hutmacher, D. W., Schantz, T., Zein, I., Ng, K. W., Teoh, S. H., & Tan, K. C. (2001). Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 55(2), 203–216. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200105\)55:2<203::AID-JBM1007>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:2<203::AID-JBM1007>3.0.CO;2-7)
- Jackson, R. W., & Nordentoft, S. (2010). A History of Arthroscopy. *YJARS*, 26(1), 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2009.10.005>
- Jahangiri, A., Barzegar-Jalali, M., Garjani, A., Javadzadeh, Y., Hamishehkar, H., Afroozian, A., & Adibkia, K. (2015). Pharmacological and histological examination of atorvastatin-PVP K30 solid dispersions. *Powder Technology*, 286, 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.047>
- Jeong, J. C., Lee, J., & Cho, K. (2003). Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of Controlled Release*, 92(3), 249–258. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00367-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00367-5)
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). *Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles : Mechanisms of Controlling Drug Release*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>
- Kaushal, A. M., Gupta, P., & Bansal, A. K. (2004). Amorphous drug delivery systems: Molecular aspects, design, and performance. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21(3), 133–193. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v21.i3.10>
- Kim, M. S., Jin, S. J., Kim, J. S., Park, H. J., Song, H. S., Neubert, R. H. H., & Hwang,

- S. J. (2008). Preparation, characterization and in vivo evaluation of amorphous atorvastatin calcium nanoparticles using supercritical antisolvent (SAS) process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(2), 454–465. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.01.007>
- Korani, S., Korani, M., Bahrami, S., Johnston, T. P., Butler, A. E., Banach, M., & Sahebkar, A. (2019). Application of nanotechnology to improve the therapeutic benefits of statins. *Drug Discovery Today*, 24(2), 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.09.023>
- Korsmeyer, R. W., Gummy, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), 25–35.
- Lakshmi Narasaiah, V., Kalyan Reddy, B., Kishore, K., Raj Kumar, M., Srinivasa Rao, P., & Venkateswara Reddy, B. (2010). Enhanced dissolution rate of atorvastatin calcium using solid dispersion with PEG 6000 by dropping method. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(8), 484–491.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (n.d.). - *ARTICLES Tissue Engineering*.
- Lanza, R., Langer, R., & Vacanti, J. P. (2013). Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition. In *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-07193-4>
- Li, X., Xing, Y., Jiang, Y., Ding, Y., & Li, W. (2009). Original article Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. 2161–2168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02055.x>
- Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A. (2010). Polymers for Drug Delivery Systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1(1), 149–173. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847>
- Lins T. B. (2015). ESTUDO DE CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS TÉRMICOS E DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE DIFERENTES CRISTAIS E DISPERSÕES SÓLIDAS DE ATORVASTATINA. *Programa de Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas - UFPE*.
- Malam, Y., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(11), 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.08.004>
- Manadas, R., Eugénia, M., & Veiga, F. (2002). A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 38.

- Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H., & Elaissari, A. (2015). Enhancement of alendronate encapsulation in chitosan nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.04.007>
- Mora-Raimundo, P., Manzano, M., & Vallet-Regí, M. (2017). Nanoparticles for the treatment of osteoporosis. *AIMS Bioengineering*, 4(2), 259–274. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2017.2.259>
- Morais, L. S. De, Guimarães, G. S., & Elias, C. N. (2007). *Liberação de íons por biomateriais metálicos*. 48–53.
- Narasimhan, B. (2001). *Mathematical models describing polymer dissolution: consequences for drug delivery*. 48, 195–210.
- Oladapo, B. I., Zahedi, S. A., & Adeoye, A. O. M. (2019). 3D printing of bone scaffolds with hybrid biomaterials. *Composites Part B: Engineering*, 158(September 2018), 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.09.065>
- Oliveira, L. S. de A. F., Oliveira, C. S., Machado, A. P. L., & Rosa, F. P. (2010). Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 9(1), 37. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v9i1.4730>
- Oshiro Junior, J. A., Shiota, L. M., & Chiavacci, L. A. (2014). Desenvolvimento de formadores de filmes poliméricos orgânico-inorgânico para liberação controlada de fármacos e tratamento de feridas. *Revista Materia*, 19(1), 24–32. <https://doi.org/10.1590/S1517-70762014000100005>
- Pachau, L. (2015). *Recent developments in novel drug delivery systems for wound healing*. 1–15. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1070143>
- Page, C. J., Hinman, R. S., & Bennell, K. L. (2011). *Physiotherapy management of knee osteoarthritis*. 145–151.
- Pasco, J. A., Kotowicz, M. A., Henry, M. J., Sanders, K. M., & Nicholson, G. C. (2002). Statin Use, Bone Mineral Density, and Fracture Risk. *Archives of Internal Medicine*, 162(5), 537. <https://doi.org/10.1001/archinte.162.5.537>
- Peppas, N. A. (1985). Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 60(4), 110–111.
- Pereira, I. H. L., Ayres, E., Averous, L., Schlatter, G., Hebraud, A., De Paula, A. C. C., ... Oréfice, R. L. (2014). Differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on mineralized electrospun co-axial poly(ϵ -caprolactone) (PCL)/gelatin nanofibers.

- Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(4), 1137–1148.
<https://doi.org/10.1007/s10856-013-5133-9>
- Perera, J. R., Gikas, P. D., & Bentley, G. (2012). *The present state of treatments for articular cartilage defects in the knee*. 381–387.
<https://doi.org/10.1308/003588412X13171221592573>
- Pignatello, R., Paolino, D., Panto, V., Pistara, V., Calvagno, M., Russo, D., ... Fresta, M. (2009). Lipoamino Acid Prodrugs of Paclitaxel: Synthesis and Cytotoxicity Evaluation on Human Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells. *Current Cancer Drug Targets*, 9(2), 202–213. <https://doi.org/10.2174/156800909787580944>
- Portinho, D., Boin, V. G., & Bertolini, G. R. F. (2008). Efeitos sobre o tecido ósseo e cartilagem articular provocados pela imobilização e remobilização em ratos Wistar. *Revista Brasileira de Medicina Do Esporte*, 14(5), 408–411.
<https://doi.org/10.1590/S1517-86922008000500001>
- Rahmati, M., Mobasheri, A., & Mozafari, M. (2016). Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the art, prospects, and future challenges. *Bone*. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.01.019>
- Ram, D. G., Saghazadeh, S., Herck, S. Van, Geest, B. De, Jonas, A. M., & Demoustier-champagne, S. (2017). *Uptake of Long Protein-Polyelectrolyte Nanotubes by Dendritic Cells*. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01353>
- Rezende, M. U. of, Hernandez, A. J., Camanho, G. L., & Amatuzzi, M. M. (2000). Cartilagem Articular e Osteoartrose. *Acta Ortopédica Brasileira*, 8(2), 100–104.
<https://doi.org/10.1590/s1413-78522000000200005>
- Rong, H. J., Chen, W. L., Guo, S. R., Lei, L., & Shen, Y. Y. (2012). PCL films incorporated with paclitaxel/5-fluorouracil: Effects of formulation and spacial architecture on drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 427(2), 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.02.007>
- Saghazadeh, S., Rinoldi, C., Schot, M., Saheb, S., Shari, F., Jalilian, E., ... Khademhosseini, A. (2018). *Drug delivery systems and materials for wound healing applications* ☆. 127, 138–166. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.008>
- Salmoria, G. V., Cardenuto, M. R., Roesler, C. R. M., Zepon, K. M., & Kanis, L. A. (2016). PCL/Ibuprofen Implants Fabricated by Selective Laser Sintering for Orbital Repair. *Procedia CIRP*, 49, 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2015.11.013>
- Sasmazel, H. T. (2016). *Comparison of cellular proliferation on dense and porous PCL scaffolds*. (November). <https://doi.org/10.3233/BME-2008-0515>

- Schachter, M. (2005). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 19(1), 117–125. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x>
- Sci, P. P. (2017). *Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering*. 86–168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>.Advancing
- Sefat, F., Raja, T. I., Zafar, M. S., Khurshid, Z., Najeeb, S., Zohaib, S., ... Mozafari, M. (2019). Nanoengineered biomaterials for cartilage repair. In *Nanoengineered Biomaterials for Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813355-2.00003-x>
- Shete, G., Puri, V., Kumar, L., & Bansal, A. K. (2010). Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. *AAPS PharmSciTech*, 11(2), 598–609. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9419-7>
- Siepmann, J., & Siepmann, F. (2012). Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.006>
- Silva, C., & Revisão, A. D. E. (2010). *Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual*. 9, 28–36.
- Silva, G. F., da Silva, T. G., Gobbi, V. G., Portela, T. L., Teixeira, B. N., dos Santos Mendonça, T., ... Mendonça, R. H. (2019). Swelling degree prediction of polyhydroxybutyrate/chitosan matrices loaded with “Arnica-do-Brasil.” *Journal of Applied Polymer Science*, 136(32), 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.47838>
- Singh, S., Ramakrishna, S., & Singh, R. (2017). Material issues in additive manufacturing: A review. *Journal of Manufacturing Processes*, 25, 185–200. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2016.11.006>
- Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., & Trehan, A. (2004). *Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview*. 278, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.044>
- Sonje, V. M., Kumar, L., Meena, C. L., Kohli, G., Puri, V., Jain, R., ... Brittain, H. G. (2010). Atorvastatin calcium. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (1st ed., Vol. 35). [https://doi.org/10.1016/S1871-5125\(10\)35001-1](https://doi.org/10.1016/S1871-5125(10)35001-1)
- Sostres, C., Gargallo, C. J., Arroyo, M. T., Staff, P., Lanás, A., & Chief, C. (2010). Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs , aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract.

- Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24(2), 121–132.
<https://doi.org/10.1016/j.bpg.2009.11.005>
- Suave, J., Coelho, L. A. F., Amico, S. C., & Pezzin, S. H. (2009). *Effect of sonication on thermo-mechanical properties of epoxy nanocomposites with carboxylated-SWNT*. 509, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2009.01.036>
- Tous, L., Ruseckaite, R. A., & Ciannamea, E. M. (2019). Sustainable hot-melt adhesives based on soybean protein isolate and polycaprolactone. *Industrial Crops and Products*, 135(November 2018), 153–158.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.043>
- Ulici, V., Chen, A. F., Cheng, A. W. M., & Tuan, R. S. (2017). Hip Joint Restoration. *Hip Joint Restoration*, 15–22. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0694-5>
- Vaquero, M., Caballero, R., Gómez, R., Núñez, L., Tamargo, J., & Delpón, E. (2007). Effects of atorvastatin and simvastatin on atrial plateau currents. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(5), 931–945.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.03.807>
- Villanova, J. C. O., Oréfice, R. L., & Cunha, A. S. (2010). *Aplicações Farmacêuticas de Polímeros*. 20, 51–64.
- Vinatier, C., & Guicheux, J. (2016). Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 59(3), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2016.03.002>
- Wan, Y., Lu, X., Dalai, S., & Zhang, J. (2009). *Thermochimica Acta Thermophysical properties of polycaprolactone / chitosan blend membranes*. 487, 33–38.
<https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.01.007>
- Weeren, V., Badylak, S. F., Benders, K. E. M., & Rene, P. (2013). *Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration*. 31(3), 169–176.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.004>
- Wen, J., Huang, Y., Lu, Y., & Yuan, H. (2019). Associations of non-high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides and the total cholesterol/HDL-c ratio with arterial stiffness independent of low-density lipoprotein cholesterol in a Chinese population. *Hypertension Research*, 1223–1230. <https://doi.org/10.1038/s41440-019-0251-5>
- Willerth, S. M., & Sakiyama-elbert, S. E. (2018). *rre cte d Au tho r P roo f Un co Un Au tho r P roo f co rre cte d*. <https://doi.org/10.3233/STJ-180001>
- Williams, J. M., Adewunmi, A., Schek, R. M., Flanagan, C. L., Krebsbach, P. H.,

- Feinberg, S. E., ... Das, S. (2005). Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, 26(23), 4817–4827. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.057>
- Woodruff, M. A., & Huttmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 35(10), 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
- Yassue-Cordeiro, P. H., Zandonai, C. H., Da Silva, C. F., & Fernandes-Machado, N. R. C. (2015). Desenvolvimento e caracterização de filmes compósitos de quitosana e zeólitas com prata. *Polimeros*, 25(5), 492–502. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2059>
- Zeybek, N. D., Gulcelik, N. E., Kaymaz, F. F., Sarisozen, C., Vural, I., Bodur, E., ... Asan, E. (2011). Rosuvastatin induces apoptosis in cultured human papillary thyroid cancer cells. *Journal of Endocrinology*, 210(1), 105–115. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0411>
- Zhai, G. (2019). *Alteration of Metabolic Pathways in Osteoarthritis*. <https://doi.org/10.3390/metabo9010011>
- Zhang, H. X., Wang, J. X., Zhang, Z. B., Le, Y., Shen, Z. G., & Chen, J. F. (2009). Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process. *International Journal of Pharmaceutics*, 374(1–2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.02.015>