



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Aplicadas



FLÁVIO LOPES DANTAS

# **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FIBRAS DE ÁCIDO POLI-L-LÁTICO E CETOPROFENO**

LIMEIRA  
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Aplicadas



FLÁVIO LOPES DANTAS

## **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FIBRAS DE ÁCIDO POLI-L-LÁTICO E CETOPROFENO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Produção e de Manufatura, na área de Manufatura de Materiais Avançados.

Orientadora: Profa. Dra. Laís Pellizzer Gabriel

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO FLÁVIO LOPES DANTAS, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LAÍS PELLIZZER GABRIEL

LIMEIRA

2023

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas Ana  
Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

D235p Dantas, Flávio Lopes, 1987-  
Produção e caracterização de fibras de ácido poli-l-lático e cetoprofeno /  
Flávio Lopes Dantas. – Limeira, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Laís Pellizzer Gabriel.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade  
de Ciências Aplicadas.

1. Cetoprofeno. 2. Engenharia tecidual. 3. Membrana. 4. PLLA. 5.  
Regeneração óssea. 6. Rotofiação. I. Gabriel, Laís Pellizzer, 1987-. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III.  
Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Production and characterization of membranes based on poly-l-lactic acid incorporated with ketoprofen

**Palavras-chave em inglês:**

Ketoprofen

Tissue engineering

Membrane

Poly(l-lactide) Bone

Regeneration Rotary

jet spinning

**Área de concentração:** Manufatura de Materiais Avançados

**Titulação:** Mestre em Engenharia de Produção e de Manufatura

**Banca examinadora:**

Laís Pellizer Gabriel

Ana Luiza Cardoso Pereira

Maria Ingrid Rocha Barbosa Schiavon

**Data de defesa:** 21-06-2023

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia de Produção e de Manufatura

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6831-5696>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8534968833499652>

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Autor:** Flávio Lopes Dantas

**Título:** Produção e caracterização de fibras de ácido poli-l-lático e cetoprofeno

**Natureza:** Dissertação

**Área de Concentração:** Manufatura de Materiais Avançados

**Instituição:** Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

**Data da Defesa:** Limeira-SP, 21 de junho de 2023.

### BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Laís Pellizzer Gabriel (orientador)  
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Profa. Dra. Ana Luiza Cardoso Pereira (membro)  
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Profa. Dra. Maria Ingrid Rocha Barbosa Schiavon (membro externo)  
Universidade Estadual de Campinas

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero expressar minha profunda apreciação pelo apoio, carinho e dedicação que sempre recebi de meu pai Francisco, minha mãe Amélia e minha irmã Cássia. Agradeço por cada gesto de bondade, por cada palavra de encorajamento e por todo o amor que sempre recebi de vocês. Nos momentos de alegria e nos momentos desafiadores, sua presença e apoio me fortalecem. Agradeço a Deus todos os dias por ter me abençoado com uma família tão maravilhosa.

Agradeço a Laís, pela gentileza em dedicar seu tempo para discutir minhas idéias, responder às minhas dúvidas e oferecer orientações valiosas que contribuíram significativamente para o desenvolvimento do meu projeto. Sou grato por ter tido a oportunidade de aprender com você, não apenas no aspecto técnico da pesquisa, mas também no desenvolvimento de habilidades de pensamento crítico, organização e autonomia intelectual.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a Camila e Isabela pela valiosa ajuda que me proporcionaram durante a realização dos experimentos. Sem a colaboração e o suporte de vocês, o sucesso do meu projeto teria sido muito mais difícil de alcançar. Agradeço por serem excelentes colegas de equipe, por sua disposição em ajudar e por tornar essa jornada de pesquisa uma experiência enriquecedora.

Agradeço a banca examinadora, pelas perguntas, sugestões e críticas apresentadas que foram de extrema importância para o aprimoramento da minha pesquisa. Agradeço por terem dedicado seu tempo e esforço para avaliar cuidadosamente meu trabalho e compartilhar suas considerações e observações.

## RESUMO

Medicamentos anti-inflamatórios não esteroides, como cetoprofeno (CET), são comumente prescritos para tratamento da dor e inflamação. A possibilidade de processar membranas como um sistema de liberação controlada de fármacos é um desafio. O ácido poli-L-lático (PLLA) é um polímero bioabsorvível comumente usado em aplicações ósseas na forma de membranas. O objetivo deste estudo é produzir membranas PLLA incorporadas com 5, 10 e 15% (m/m) de CET através do processo de rotofiação (RJS), e caracterizar suas propriedades e adequação para engenharia de tecidos (TE) na regeneração óssea. As membranas foram fabricadas e testadas para avaliar o processamento e a morfologia, molhabilidade, determinar grupos químicos funcionais e cristalinidade, propriedades térmicas, absorção e liberação de fármacos em ambiente corporal simulado e propriedades biológicas. Os resultados morfológicos demonstraram que o processo RJS produziu com sucesso fibras de escala micrométrica. O ensaio de molhabilidade demonstrou que as membranas PLLA incorporadas com 15 % de CET são hidrofóbicas. A análise química revelou a presença de grupos funcionais característicos de PLLA e CET, sem quaisquer resíduos de solventes tóxicos. A análise termogravimétrica revelou que as membranas exibiam estabilidade térmica à temperatura do corpo humano, e foi verificado o efeito plastificante do CET. Além disso, o teste de liberação do fármaco confirmou que as membranas foram capazes de liberar o fármaco. O ensaio biológico mostrou maior viabilidade celular na membrana de PLLA com 10% de CET. Em conclusão, as membranas produzidas apresentam potencial promissor para aplicações em reparo de tecidos ósseos.

**Palavras-chave:** Cetoprofeno; Engenharia de tecidos; Membrana; PLLA; Regeneração óssea; Rotofiação; Sistema de entrega de fármaco.

## ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, such as ketoprofen (KET), are commonly prescribed for pain and inflammation treatment. The possibility of processing membranes with controlled drug release is a challenge in drug delivery. Poly-L-lactic acid (PLLA) is a bioabsorbable polymer commonly used in bone applications in form of membranes. The objective of this study is to produce PLLA membranes incorporated with 5, 10 and 15% (w/w) KET through the rotary jet spinning (RJS) process, and to characterize their properties and suitability for tissue engineering (TE) in bone regeneration. The membranes were fabricated into fibers and were tested to evaluate the processing and morphology, wettability, to determine the chemical functional groups and crystallinity, thermal properties, absorption and, drug release in a simulated corporeal environment and, biological properties. The morphological results demonstrated that the RJS process successfully produced micrometric scale fibers. The wettability test demonstrated that PLLA membranes incorporated with 15% KET are hydrophobic. Chemical analysis revealed the presence of characteristic functional groups of both PLLA and KET, without any toxic solvent residues. Thermogravimetric analysis revealed that the membranes exhibited thermal stability at human body temperature and the plasticizer effect of CET. Additionally, the drug release test confirmed that PLLA membranes were capable of releasing the drug. The biological test showed better cell viability for the PLLA/10% KET membrane. In conclusion, the produced membrane shows promising potential for applications in bone tissue repair.

**Keywords:** Bone regeneration, Drug delivery system; Ketoprofen; Membrane; PLLA; Rotary jet spinning; Tissue engineering.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Estrutura química do PLLA.....	18
<b>Figura 2</b>	Estrutura química do cetoprofeno.....	21
<b>Figura 3</b>	Gráfico de viscosidade aparente por concentração de PLLA.....	37
<b>Figura 4</b>	Gráfico de viscosidade do PLLA com 10% de CET.....	38
<b>Figura 5</b>	Gráfico de viscosidade do PLLA com diferentes concentrações de CET.....	39
<b>Figura 6</b>	Micrografias obtidas por MEV. A) PLLA com 5% de CET ,B) PLLA com 10% de CET e C) PLLA com 15% de CET.....	40
<b>Figura 7</b>	Imagem da gota de água estática usado para a medida do ângulo de contato para as diferentes membranas. A) PLLA/5% de CET. B) PLLA/10% de CET. C) PLLA/15% de CET.....	41
<b>Figura 8</b>	Gráficos de FTIR de diferentes amostras. 1)CET, 2)PLLA, 3)PLLA/5% de CET, 4)PLLA/10% de CET e 5) PLLA/15% de CET.....	43
<b>Figura 9</b>	Espectros de FTIR das diferentes amostras analisadas.....	44
<b>Figura 10</b>	Difratogramas das diferentes amostras analisadas. A) CET puro, B) PLLA puro, C) PLLA 5% CET, D) PLLA 10% CET, E) PLLA/15% CET.....	46
<b>Figura 11</b>	Termograma da amostra de PLLA/5% de CET.....	47
<b>Figura 12</b>	Termograma de PLLA/10% de CET.....	48
<b>Figura 13</b>	Termograma de PLLA/15% de CET.....	49
<b>Figura 14</b>	Gráficos de DSC das diferentes amostras analisadas.....	50
<b>Figura 15</b>	Curva de calibração por UV-Vis para o CET em PBS 0,1 M pH 7,4.....	52
<b>Figura 16</b>	Curva de calibração por UV-Vis para o CET em PBS 0,1 M pH 7,4.....	52
<b>Figura 17</b>	Curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/5% de CET.....	54
<b>Figura 18</b>	Curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/10% de CET.....	54
<b>Figura 19</b>	Curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/15% de CET.....	55
<b>Figura 20</b>	Gráficos contendo a curva experimental e a curva do modelo matemático. A) Amostra de PLLA com 5% de CET, B) Amostra de PLLA com 10% de CET e C) Amostra de PLLA com 15% de CET.....	59
<b>Figura 21</b>	O perfil de atividade celular de MC3T3-E1 após 24 horas foi realizado utilizando o ensaio de brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT)...	61
<b>Figura 22</b>	O perfil de atividade celular de MC3T3-E1 após 48 horas foi realizado utilizando o ensaio de brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT)...	62
<b>Figura 23</b>	O perfil de atividade celular de MC3T3-E1 após 72 horas foi realizado utilizando o ensaio de brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT)...	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Dados dos preparos das soluções.....	31
<b>Tabela 2</b>	Viscosidade aparente de soluções contendo diferentes concentrações de PLLA.....	36
<b>Tabela 3</b>	Viscosidade aparente de soluções contendo diferentes concentrações de PLLA contendo 10% de CET.....	37
<b>Tabela 4</b>	Viscosidade aparente de soluções contendo diferentes concentrações de CET.....	39
<b>Tabela 5</b>	Diâmetros médios gerados usando o SIMPoly. A) PLLA/5% de CET, B) PLLA/10% de CET, C) PLLA/15% de CET.....	41
<b>Tabela 6</b>	Dados referentes ao ângulo de contato e hidrofobicidade das membranas analisadas.....	42
<b>Tabela 7</b>	Grupos funcionais do PLLA e do CET identificados no espectro de FTIR das amostras de PLLA com 5, 10 e 15% de CET.....	45
<b>Tabela 8</b>	Dados de diferentes temperaturas das amostras analisadas.....	50
<b>Tabela 9</b>	Testes estatísticos para verificar a adequação de diferentes modelos matemáticos a curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/5% de CET.....	56
<b>Tabela 10</b>	Testes estatísticos para verificar a adequação de diferentes modelos matemáticos a curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/10% de CET.....	57
<b>Tabela 11</b>	Testes estatísticos para verificar a adequação de diferentes modelos matemáticos a curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/15% de CET.....	57
<b>Tabela 12</b>	Parâmetros obtidos pela regressão do modelo matemático escolhido.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AFM</b>	Microscopia de força atômica
<b>AINEs</b>	Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais
<b>ATR</b>	Reflectância Total Atenuada
<b>BMP2</b>	Moléculas de proteína morfogenética óssea 2
<b>CBS</b>	Classificação Biofarmacêutica
<b>CET</b>	Cetoprofeno
<b>DRX</b>	Difração de raios-X
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
<b>HA</b>	Hidroxiapatita nanocristalina
<b>HAP</b>	Hidroxiapatita
<b>MCSs</b>	Células-tronco mesenquimais
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>PDLA</b>	Poli(D-láctido)
<b>PDLLA</b>	Poli (D, L) láctido
<b>PCL</b>	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
<b>PLA</b>	Ácido poli láctico
<b>PLGA</b>	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
<b>PLLA</b>	Ácido poli-L-láctico
<b>ScCO<sub>2</sub></b>	Processo de incorporação supercrítico assistida por CO <sub>2</sub>
<b>TEM</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>TIPS</b>	Separação de fase induzida termicamente
<b>TGA</b>	Análise termogravimétrica
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusão
<b>T<sub>g</sub></b>	Temperatura de transição vítrea
<b>T<sub>c</sub></b>	Temperatura de cristalização

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 Objetivos .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Processo de recuperação de fraturas .....	15
2.1.1 Procedimentos cirúrgicos para auxiliar a regeneração óssea .....	15
2.2 Engenharia de tecidos .....	16
2.3 Polímeros .....	16
2.4 Características de <i>scaffold</i> para regeneração óssea .....	16
2.5 Processamento de <i>scaffolds</i> na forma de fibras para entrega de medicamentos .....	17
2.6 PLLA para aplicação na ET .....	17
2.7 Fármacos .....	18
2.7.1 Cetoprofeno .....	19
2.7.1.1 Propriedades físico-químicas do cetoprofeno .....	20
2.8 Análise da Cinética de Liberação de Cetoprofeno .....	21
2.8.1 Modelo monofásico de liberação de fármaco .....	22
2.9 Processamento de fibras .....	23
2.9.1 Rotofiação .....	24
2.9.2 Fatores que afetam a qualidade das fibras .....	24
2.9.2.1 Velocidade de rotação .....	24
2.9.2.2 Diâmetro do orifício .....	24
2.9.2.3 Distância de coleta .....	25
2.9.2.4 Tensão superficial .....	25
2.9.2.5 Viscosidade da solução de fiação .....	25
2.10 Emprego de PLLA com cetoprofeno .....	26
2.11 Emprego de PLLA na regeneração do tecido ósseo .....	29
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 Materiais .....	31
3.2 Preparo das soluções poliméricas incorporadas com fármaco .....	31
3.3 Estudo de processamento por ensaio de viscosidade .....	31
3.4 Processamento das fibras por rotofiação .....	32
3.5 Análise morfológica por MEV .....	32
3.6 Análise de molhabilidade por ângulo de contato .....	32
3.7 Análise Química por FTIR .....	33
3.8 Análise de cristalinidade por DRX .....	33
3.9 Análise térmica por TGA .....	33
3.10 Análise térmica por DSC .....	33
3.11 Ensaio de liberação de fármaco .....	34
3.11.1 Análise estatística .....	34
3.12 Ensaio biológico .....	34
3.12.1 Cultura celular .....	34
3.12.2 Preparo dos <i>scaffolds</i> para o ensaio biológico .....	35
3.12.3 Ensaio de viabilidade celular (MTT) .....	35
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>36</b>

4.1 Ensaio de processamento por viscosidade .....	36
4.2 Análise morfológica por MEV .....	39
4.3 Molhabilidade por ângulo de contato.....	41
4.4 Análise Química por FTIR .....	42
4.5 Difração de raios-X (DRX).....	46
4.6 Análise térmica por TGA .....	47
4.7 Análise térmica por DSC .....	49
4.8 Ensaio de liberação de fármaco .....	51
4.9 Ensaio biológico .....	60
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O avanço da medicina no tratamento de doenças promove o aumento da qualidade de vida da população e a elevação da taxa de envelhecimento da população mundial. Com isso, verifica-se o aumento de doenças relacionadas ao tecido ósseo tais como, lombalgia, escoliose, osteoporose, infecções ósseas ou tumores, defeitos congênitos e doenças orais e maxilofaciais.

Devido a isso, novas técnicas para o tratamento de doenças do tecido ósseo estão sendo desenvolvidas. O osso é um tecido conectivo mineralizado de grande importância funcional, como: locomoção, suporte e proteção de tecidos moles, armazenamento de cálcio e fosfatos, e alojamento de medula óssea (ROSETI et al. 2017). Sua estrutura complexa e hierárquica consiste em hidroxiapatita nanocristalina inorgânica (HA), componentes orgânicos (principalmente colágenos) e água. As proteínas agrupam-se para formar uma matriz extracelular (ECM) que influencia a adesão, proliferação e diferenciação de várias categorias de células: osteoblastos, células de revestimento ósseo, osteócitos e osteoclastos (ZHANG et al., 2016; BLAIR; SUN; KOHANSKI, 2007; BIANCO et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2016, apud ROSETI et al., 2017). No entanto, lesões ósseas são de difícil cicatrização devido principalmente a vascularização (ROSETI et al., 2017).

Embora os enxertos ósseos sejam usados na prática clínica há mais de uma década, eles apresentam algumas desvantagens que limitam seu uso, como oferta limitada, reabsorção variável, risco de morbidade do doador, elevada taxa de insucesso em certos locais e necessidade de uma segunda cirurgia.

No entanto, atualmente, existe uma nova técnica que permite a regeneração óssea sem a necessidade do emprego do enxerto ósseo. A nova técnica provém da engenharia de tecidos (ET) em que o enxerto ósseo é substituído por um biopolímero que consegue promover a regeneração do tecido ósseo. A ET surgiu como uma nova área da ciência que encontra materiais que sejam compatíveis ao corpo humano de maneira a minimizar os impactos negativos provocados pela interação desses materiais no organismo.

Atualmente, os biopolímeros como o ácido poli-L-lático (PLLA) tem destaque por apresentarem propriedades físicas e químicas que se adequam para o uso no corpo

humano. A principal vantagem dos biopolímeros é de que seu processo de degradação pelo corpo humano não produz substâncias tóxicas.

Além disso, a possibilidade de incorporação de fármacos como o cetoprofeno (CET) em biopolímeros pode auxiliar o processo de regeneração de tecidos lesionados com liberação controlada e localizada de fármacos que podem, por exemplo, atenuar o processo inflamatório que ocorre sempre durante a recuperação de um tecido lesionado.

Nesse sentido, este trabalho investiga a possibilidade do processamento e aplicação de um biopolímero incorporado com um fármaco processado na forma de fibra para auxiliar a regeneração do tecido ósseo do corpo humano.

### **1.1 Objetivos**

O objetivo deste trabalho é produzir através do processo de rotofiação, fibras de ácido poli-L-lático (PLLA) incorporadas com cetoprofeno (CET) e caracterizá-las quanto às suas propriedades e sua aplicabilidade na ET para auxiliar o processo de regeneração do tecido ósseo. Têm-se como objetivos específicos:

- a) avaliar o processamento e a morfologia de superfície da membrana;
- b) determinar os grupos funcionais químicos presentes na membrana;
- c) verificar as propriedades térmicas da membrana;
- d) Verificar o perfil de molhabilidade da membrana;
- e) Verificar a liberação do fármaco em ambiente corpóreo simulado;
- f) Caracterizar biologicamente a membrana.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Processo de recuperação de fraturas

A cicatrização de fraturas trata-se de um processo em série caracterizado por etapas complexas, em resposta a lesões. De acordo com Shrivats et al. (2014), a cicatrização da fratura começa imediatamente após a lesão e termina com a transformação do osso recém-formado em osso maduro.

O processo de cicatrização de fraturas é uma sequência de eventos multifásica e em vários estágios, dividida em quatro etapas principais:

- formação de hematoma;
- migração e mitose das células mesenquimais;
- formação de cartilagens e substituição da cartilagem por osso;
- remodelação.

#### 2.1.1 Procedimentos cirúrgicos para auxiliar a regeneração óssea

A cicatrização óssea e subsequente formação de osso novo ocorrem através dos processos de osteogênese, osteoindução e/ou osteocondução (WANG; KIYONOBU; NEIVA, 2004).

As três etapas da cicatrização óssea citadas (osteogênese, osteoindução e osteocondução) são descritas por Shrivats et al. (2014): “a osteogênese é o processo pelo qual os osteoblastos expressam osteóide no local do defeito, que subsequentemente se mineraliza para formar novo osso, a osteoindução é a indução de células osteoprogenitoras (ou de outras células não diferenciadas) para se diferenciarem numa linhagem de osteoblastos e a osteocondução é a propriedade pela qual um enxerto suporta a fixação de novos osteoblastos e células osteoprogenitoras”.

## 2.2 Engenharia de tecidos

Trata-se de uma técnica multidisciplinar em que as diferentes áreas do conhecimento como a engenharia, química, biologia e medicina estão interligadas ao longo de todo o processo de produção, caracterização e aplicação dos materiais para o reparo de tecidos lesionados.

Através do uso de uma matriz temporária denominada *scaffold* é fornecido um ambiente e uma arquitetura específicos para o crescimento e desenvolvimento ósseo. Um *scaffold* pode ser descrito como uma estrutura artificial utilizada para apoiar a formação de tecidos tridimensionais (3D) como sistemas celulares ou como veículos para células e/ou drogas, e após a implantação no local lesionado, os materiais celulares devem permitir a colonização adequada com células hospedeiras para fins de regeneração (BOUET *et al.*, 2015).

## 2.3 Polímeros

Scaffolds são comumente baseados em polímeros. O uso de *scaffolds* poliméricos biocompatíveis incorporados com fármacos ou compostos bioativos está sendo considerado uma excelente alternativa para implantes convencionais. Segundo Verano Naranjo *et al.* (2021), os *scaffolds* permitem a liberação local e gradual de um agente específico de interesse para um melhor tratamento de certas doenças. Além disso, são constituídos principalmente por polímeros bioabsorvíveis e biocompatíveis que se dissolvem, geralmente com CO<sub>2</sub> e água, sendo reabsorvidos uma vez cumprida a sua função.

## 2.4 Características de *scaffold* para regeneração óssea

Um suporte adequado para aplicações de regeneração óssea deve permitir a fixação, a proliferação, e a colonização celular, como o suporte mecânico adequado (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012).

## **2.5 Processamento de *scaffolds* na forma de fibras para entrega de medicamentos**

A possibilidade de processar fibras incorporadas com fármacos para entregar os medicamentos ao paciente de uma maneira controlada é um desafio na ET. Atualmente, o medicamento tomado por via oral para várias doenças é entregue no local danificado, mas a quantidade diminui em relação à dose inicial (MORIE et al., 2016).

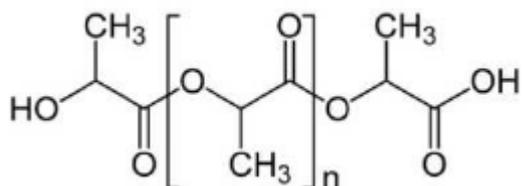
As fibras podem ser usadas como vetor de entrega de fármacos no local da lesão, reduzindo os efeitos colaterais. A taxa de liberação de um fármaco a partir de fibras pode ser manipulada alterando a composição da fibra, a porosidade e sua morfologia para manter uma concentração efetiva de fármacos no local danificado (KAUR et al., 2014).

## **2.6 PLLA para aplicação na ET**

Até a data, vários biomateriais, incluindo biopolímeros foram desenvolvidos como materiais de substituição óssea (ZAN et al., 2022). Entre eles, o PLLA (Figura 1) tem continuamente atraído a atenção devido à sua taxa de biodegradabilidade, boa biocompatibilidade e processabilidade (ZAN et al., 2022).

O PLLA tem aplicações generalizadas na ET como suturas, dispositivos de administração de fármacos, próteses, matrizes de suporte celular, enxertos vasculares (SHIKINAMI; MATSUSUE; NAKAMURA, 2005). Após a implantação, pode ser hidrolisado naturalmente em ácido lático e convertido em água e dióxido de carbono, sendo excretado do organismo (KARIMI; GHASEMI; ABBASSI-SOURKI, 2019, apud ZAN et al., 2022). Os produtos de degradação não são tóxicos e não causam danos ao corpo humano (ZAN et al., 2022). A Figura 1 apresenta a estrutura química do PLLA.

Figura 1. Estrutura química do PLLA.



Fonte: (HAWARI; THAM; HAMID, 2013).

Em contato com o corpo humano, o PLLA degrada-se por hidrólise (ZAN et al., 2022). O processo de degradação começa pela penetração de moléculas de água na matriz do PLLA, promovendo a quebra da ligação éster. Durante este processo, a degradação geralmente começa na região amorfa relativamente solta e gradualmente transita para a região cristalina compacta, mostrando a tendência de apresentar uma degradação rápida no início do processo e em seguida uma degradação lenta (ZAN et al., 2022). A hidrofiliabilidade, como uma propriedade inerente do material, é um fator importante que afeta a taxa de degradação dos polímeros ésteres. Portanto, o aumento da hidrofiliabilidade deve acelerar significativamente a taxa de degradação do PLLA.

O PLLA também tem algumas desvantagens para o uso médico. O PLLA é um polímero frágil e duro, com baixa alongação de ruptura. Em especial, a resistência à tração, a resistência à fratura e o módulo de elasticidade do PLLA variam entre 40–60 MPa, 2–10 MPa m<sup>1/2</sup> e 2–5 GPa, respectivamente (LI et al., 2019). O PLLA, estando na classificação de polímero sintético biodegradável, é reabsorvido pelo organismo e devido a isso é tão utilizado na ET (CHEN et al., 2008; SHARMA et al., 2014).

Além disso, já foi demonstrado que o PLLA é um polímero adequado para a culturas de osteoblastos (SADEGHI-AVALSHAHR et al., 2016; ZENG et al., 2016; CHEN et al., 2017). Também foi demonstrado que devido à natureza hidrofóbica do PLLA, estratégias de modificação de superfície precisam ser desenvolvidas para favorecer a adesão celular (CHEN et al., 2017).

## 2.7 Fármacos

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como o CET, estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo para o tratamento de dores e inflamações, abrangendo cerca de 5–10% de todos os medicamentos prescritos a

cada ano (WONGRAKPANICH et al., 2018). Freitas (2020) alega que a COX-2 é induzida em células inflamatórias, produzindo prostaglandinas diretamente associadas à inflamação, dor e febre. Sendo assim, pode-se considerar que a inibição da COX-2 está associada aos efeitos desejáveis dos AINEs (anti-inflamatório e analgésico), enquanto a inibição da COX-1 representa os efeitos indesejados, ou colaterais, decorrentes da ação dos AINEs (WONGRAKPANICH et al., 2018).

### 2.7.1 Cetoprofeno

O CET pertence ao grupo dos ácidos 2-fenil-propiónicos substituídos. Diversas formas têm sido empregadas para sua comercialização, como cápsulas, soluções injetáveis, supositórios e géis de uso tópico (KANTOR, 1986). Apresenta ação inibidora não seletiva de ciclooxigenases, ou seja, atua inibindo a produção tanto de COX-1 quanto de COX-2. Ao inibir essa produção, obtêm-se efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, antitérmicos e antitrombóticos (CASTAGNETTI; MARIELLA, 2015). Trata-se de um fármaco que é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal com tempo de meia-vida de 2 a 4 horas, estimando-se que 50% da dose administrada é excretada na urina após 6 horas de sua administração (FREITAS, 2020). A necessidade de diversas administrações diárias e a ocorrência de efeitos adversos no trato gastrointestinal tornam o cetoprofeno um excelente candidato para sistemas de liberação controlada (MOREIRA et al., 2012).

Morley et al. (1984) compararam a eficácia e tolerância ao tratamento com CET, submetendo 46 pacientes com osteoartrite no quadril a formulações comerciais convencionais em cápsula (Orudis, 100 mg, Sanofi-Aventis) ou de liberação controlada em cápsula (Oruvail, 100 mg, Sanofi-Aventis). A eficácia do tratamento foi similar para ambas as formas farmacêuticas, no entanto, a forma de liberação controlada (Oruvail) foi mais bem tolerada pelos pacientes, tendo sido reportados menos efeitos colaterais pelos pacientes submetidos a essa medicação. Houghton et al. (1984) também compararam os dois medicamentos supracitados, obtendo maiores tempos para atingir o pico de concentração máxima (4,9 h) e de meia-vida de eliminação (8,4 h) para a forma de liberação controlada (Oruvail).

Visando à obtenção de sistemas de liberação controlada, diversos estudos avaliaram a incorporação de CET em diferentes matrizes poliméricas proteicas, como

no caso do alginato, mediante ensaios *in vitro* (AL-TAHAMI, 2014) e *in vivo*, nos quais se observou ausência de alterações na mucosa gástrica quando o fármaco se encontrava incorporado na matriz polimérica (ELSAYED FATHY et al., 2014).

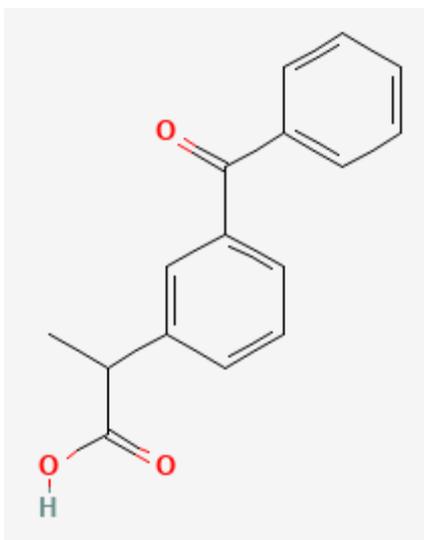
#### 2.7.1.1 Propriedades físico-químicas do cetoprofeno

O cetoprofeno pode apresentar como nomes químicos o ácido m-benzoilhidratrópico, ácido  $\alpha$ -(3-benzoilfenil) propiônico e ácido  $\alpha$ -(3-benzoilfenil) propiônico. Sua fórmula molecular é  $C_{16}H_{14}O_3$ , e sua massa molar é de 254,29 mol/g e apresenta coloração branca, ausência de odor e forma de pó com formação de uma poeira irritante. O ponto de fusão varia entre 92 °C e 97 °C e sua decomposição ocorre em 223 °C (FREITAS, 2020) .

Apresenta solubilidade em éter, etanol, acetona, clorofórmio, dimetilformamida, acetato de etila, benzeno e álcalis fortes, mas praticamente insolúvel em água (0,01 g/L a 37 °C). Apresenta coeficiente de partição (log P) de 3,31, classificado como Classe II pela classificação biofarmacêutica (CBS), o que significa que sua baixa solubilidade em água é a etapa limitante à sua absorção e biodisponibilidade. É um ácido fraco, com pKa em água de 4,6 a 5,02, estável à temperatura ambiente (HERNANDEZ, 2004).

Possui em sua estrutura (Figura 2) um carbono assimétrico, o que pode dar origem a dois enantiômeros, R (-) e S (+). O enantiômero S (+) é o responsável pelos efeitos farmacológicos e o enantiômero R (-) é terapeuticamente menos ativo ou até inativo (RENÇBER; KARAVANA; ÖZYAZICI, 2009).

Figura 2. Estrutura química do cetoprofeno



Fonte: Página do National Center for Biotechnology Information (2022).

Estudos farmacocinéticos em humanos, demonstram que o CET administrado por via oral é rapidamente absorvido, metabolizado e excretado, sendo quase totalmente absorvido ainda no trato gastrointestinal. O cetoprofeno, do mesmo modo da maioria dos AINEs, é metabolizado no fígado em metabólitos inativos, como os conjugados com o ácido glicurônico, que são eliminados pelos rins. Uma quantidade muito pequena de CET é eliminada do organismo na forma original (FREITAS,2020).

## 2.8 Análise da Cinética de Liberação de Cetoprofeno

O processo aparentemente simples de liberação de drogas é influenciado por inúmeros e complexos fatores e suas interações. A composição química, a estrutura da droga e do polímero, a geometria do sistema polimérico, a capacidade de absorção do polímero em contato com o fluido de liberação, a degradação do polímero, a solubilidade da droga, a difusividade da droga e do meio de liberação na matriz polimérica, o pH e a temperatura são alguns desses fatores (VERANO NARANJO et al., 2021).

No entanto, a difusão do soluto e a degradação do polímero são os dois parâmetros que determinam o modo de liberação do fármaco. Um sistema cujo padrão de liberação é inteiramente determinado pela difusão de Fick tem um perfil de liberação que se assemelha à função raiz quadrada, enquanto o perfil de liberação é

linear em tempo (ordem zero) quando a degradação do polímero é a força motriz (VERANO NARANJO et al., 2021).

### 2.8.1 Modelo monofásico de liberação de fármaco

Diferentes modelos matemáticos foram criados para entender o processo de liberação de um fármaco. Os modelos matemáticos foram desenvolvidos de maneira empírica ou semiempírica focados em descrever a transferência de massa do fármaco em relação aos fatores que afetam a liberação da droga, principalmente a taxa de degradação do polímero e a solubilidade do fármaco.

O modelo matemático mais simples presente na literatura científica que analisa o perfil de liberação de um fármaco, de acordo com Verano Naranjo et al. (2021), é o modelo de ordem zero. Nesse modelo, a taxa de dissolução do fármaco é constante e independente do tempo.

A equação (1) descreve o modelo matemático de ordem zero. A variável  $Q_0$  é definida como sendo a quantidade de fármaco inicial liberado (geralmente zero),  $k_0$  como sendo a constante cinética de ordem zero e  $Q_t$  como sendo a quantidade de fármaco acumulada liberada no tempo  $t$  relativo à massa total.

$$Q_t = Q_0 + k_0 \times t \quad (\text{Eq.1})$$

A hidrólise de polímeros pode seguir diferentes ordens cinéticas. Se a dissolução do fármaco já estiver associada a cinética de primeira ordem, o perfil de liberação deve ser dado pela equação (2), em que  $k_1$  é a constante cinética de primeira ordem.

A equação do modelo (equação 2) é:

$$Q_t = Q_0 \times \exp(k_1 \times t) \quad (\text{Eq.2})$$

Por outro lado, Higuchi propôs um modelo (equação 3) baseado principalmente na difusão do soluto através da matriz para o meio de liberação.

A equação do modelo (equação 3) é:

$$Q_t = k_H \times t^{0,5} \quad (\text{Eq.3})$$

Nesta equação,  $k_H$  é definida como sendo a constante do modelo que contém informações sobre difusividade, capilaridade, porosidade e solubilidade da matriz polimérica.

O modelo de Korsmeyer-Peppas (equação 4), uma modificação do modelo de Higuchi, é um dos modelos de entrega de drogas mais amplamente utilizados; sua equação é a seguinte:

$$Q_t = k_{kp} \times t^n \quad (\text{Eq.4})$$

O termo  $k_{kp}$  é uma constante que incorpora as características estruturais e geométricas do dispositivo e  $n$  é um expoente que indica o mecanismo de liberação. O modelo de Korsmeyer-Peppas é frequentemente usado para descrever a liberação de drogas a partir de polímeros porque permite fazer uma distinção entre os dois principais mecanismos que governam a transferência de massa.

De acordo com RITGER; PEPPAS (1987), o valor de  $n$  determina o mecanismo de liberação de fármaco para um dispositivo de geometria cilíndrica. Caso o valor de  $n$  na equação de Korsmeyer-Peppas (4) for menor ou igual a 0,45, a liberação do fármaco ocorreu pelo mecanismo de difusão de Fick; para valores de 0,45 até 1, a liberação do fármaco ocorre por transporte anômalo e se o valor  $n$  for igual 1, a liberação do fármaco ocorre pela cinética de ordem zero.

Para quantificar a contribuição da difusão ou degradação do polímero em casos de transporte anômalos, o modelo proposto pela Peppas-Sahlin (equação 5) deve ser seriamente considerado (PEPPAS; SAHLIN, 1989, apud VERANO NARANJO et al., 2021).

$$Q_t = k_d \times t^m + k_r \times t^{2m} \quad (\text{Eq.5})$$

O primeiro termo  $k_d \times t^m$  representa a contribuição devido à difusão de Fick e o segundo  $k_r \times t^{2m}$  inclui a degradação do polímero.

## 2.9 Processamento de fibras

### 2.9.1 Rotofiação

A rotofiação é um método de produção de fibras por força centrífuga. O material de fiação presente no reservatório do equipamento gira em alta velocidade de modo que é ejetado quando a força centrífuga é suficientemente grande para equilibrar a tensão superficial e a viscosidade do material, formando um jato a partir do qual as fibras são produzidas.

### 2.9.2 Fatores que afetam a qualidade das fibras

Na rotofiação, fatores que afetam a morfologia e o diâmetro das fibras estão presentes, como a velocidade de rotação do fiador, o diâmetro e a direção do orifício do fibro e a distância do reservatório (ZHIMING et al., 2018). Além do aparelho de rotofiação empregado, as características da própria solução de fiação, como a tensão superficial da solução de fiação, a concentração da solução de fiação e a taxa de evaporação do solvente afetam a morfologia e diâmetro das fibras produzidas.

#### 2.9.2.1 Velocidade de rotação

O princípio fundamental da rotofiação é usar a força centrífuga para esticar o jato para formar fibras. A velocidade do fiador é um fator que afeta a força centrífuga. O diâmetro da fibra diminui à medida que aumenta a velocidade de rotação, o diâmetro das fibras diminui em menor escala. Se a velocidade de rotação continuar a aumentar, o jato irá quebrar-se em forma de *beads*, resultando num aumento do diâmetro das fibras ou não pode formar uma fibra (ZHIMING et al., 2018).

#### 2.9.2.2 Diâmetro do orifício

O diâmetro do orifício é um fator importante para determinar o caudal da solução de fiação e o diâmetro inicial da fibra. Segundo Zhiming et al. (2018), o diâmetro das fibras diminui à medida que o diâmetro do orifício do fiador diminui. Este fato demonstra igualmente a importância de escolher um orifício de fieira com diâmetro inferior na preparação de fibras mais finas.

Caso o diâmetro do orifício de fiação for demasiado pequeno, a solução de fiação não pode ser ejetada na forma de um jato, mas na forma de um talão, o que impossibilita a formação de um jato e conseqüentemente não há produção de fibras.

#### 2.9.2.3 Distância de coleta

A distância de coleta como sendo à distância entre o fiador e o dispositivo coletor. Para a distância de coleta, o seu tamanho depende da taxa de evaporação do solvente. Ao mesmo tempo, essa distância deve permitir que a fibra tenha uma certa distância de extensão.

#### 2.9.2.4 Tensão superficial

Para formar boas fibras, a tensão superficial deve ser controlada no processo de rotofiação. Isso se deve ao fato de que para gerar o jato de fluido de fiação para formar fibras, a força centrífuga deve ultrapassar a tensão superficial da solução de fiação (ZHIMING et al., 2018). A tensão superficial pode ser modificada através do ajuste da estrutura molecular, da massa molecular, do solvente e pela adição de aditivos e solventes mistos com diferentes tensões superficiais.

#### 2.9.2.5 Viscosidade da solução de fiação

A viscosidade da solução de fiação também é um parâmetro-chave que afeta a formação de fibras. Para as soluções poliméricas, se a viscosidade da solução for grande demais, a atração entre as moléculas será muito grande, fazendo com que as moléculas se enovalem e se a viscosidade for muito pequena, o jato será quebrado ou *beads* serão criados.

Uma das maneiras de controlar a viscosidade da solução de fiação é ajustar a concentração do polímero na solução.

## 2.10 Emprego de PLLA com cetoprofeno

Os resultados do levantamento bibliográfico relativo ao emprego do PLLA, com blendas poliméricas e CET, são apresentados a seguir.

Gabor (1999) estudou a influência dos parâmetros de fabricação sobre o tamanho e a carga de fármacos das microesferas de PLGA sendo biodegradáveis e biocompatíveis, contendo CET, e preparadas pelo método de evaporação com solvente. Nesse estudo, verificou-se que a absorção do CET aumentou com o acréscimo do volume da fase orgânica e a diminuição do pH da fase aquosa, mas foi independente da acidez e viscosidade inerente do PLGA utilizado. Além disso, o perfil de liberação bifásica do CET a partir das microesferas dependia do PLGA empregado, do tamanho das microesferas e da carga do fármaco, dois parâmetros determinados pelo processo de fabricação.

No estudo de Ricci et al. (2005), foi desenvolvido um sistema de liberação de drogas na forma de cápsulas feitas de materiais poliméricos de PLLA e poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA) incorporados com o fármaco CET a fim de prevenir inflamações graves, nos estágios iniciais, após um procedimento cirúrgico. As capsulas foram obtidas através do método de evaporação de solvente. A concentração em massa de 30% (m/m) foi obtida para ambos os materiais poliméricos. O perfil de liberação de capsulas feitas de PLA resultou em um menor efeito de liberação explosiva, com apenas 70% de CET sendo liberado durante as primeiras 24 horas e quase 90% após uma semana.

Um ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) capaz de quantificar a liberação simultânea dos enantiômeros S-(+) e R-(-) do CET foi realizado por Wang, Liang e Zeng (2007). “O CET racêmico (rac-CET) e o seu enantiômero (S-(+)-CET) foram dissolvidos numa solução injetável de polímero viscoso. A solução é constituída por poli (d, l-lactida-coglicolida, 70:30) (d, l-PLG) biodegradável e um solvente, N-metil-2-pirrolidona (NMP) (WANG; LIANG; ZENG, 2007)”. Os resultados de liberação de fármaco *in vitro* mostram que tais implantes, contendo CET num meio de liberação com um pH de 7,4, podem proporcionar uma liberação prolongada do fármaco durante cerca de três meses. Além disso, observou-se uma liberação preferencial mais rápida de S-(+)-CET em comparação com R-(-)-CET, nos implantes

que contêm 4%, 7% e 10% de CET racêmico, no meio de liberação neutro com pH 7,4.

Prabaharan et al. (2007) produziram espumas poliméricas de PLLA utilizando o processo de lixiviação de partículas para serem empregados como *scaffolds* na ET. Nesse processo, a quitosana e o CET foram incorporados aos *scaffolds* por imersão e agitação de solução. Em média, a quantidade de CET incorporada nos *scaffolds* produzidos foi de 13,8% (m/m). Os resultados dos testes de liberação de fármaco obtidos mostraram que aproximadamente de 45 a 70% do CET foi liberado em cerca de 2 h.

Vučen et al. (2013) estudaram a combinação de nano esferas carregadas de CET com microagulhas de silício sólido para melhorar o fornecimento de drogas através da pele. Nanopartículas carregadas de CET foram desenvolvidas por um método de deslocamento de solvente modificado usando poli (ácido D, L-láctido). Os resultados mostram que nanoesferas uniformes foram produzidas com alta eficiência de encapsulamento e permaneceram estáveis por dois meses. Após uma liberação inicial explosiva, as nanopartículas do PDLLA conseguiram sustentar e controlar a liberação de CET, que seguiu a cinética de Korsmeyer-Peppas.

Champeau et al. (2015) investigaram a incorporação supercrítico assistida por CO<sub>2</sub> (ScCO<sub>2</sub>) em três polímeros: PLLA, poli (tereftalato de etileno) e polipropileno, sendo comumente implantados com os anti-inflamatórios CET e aspirina. O estudo mostrou que em todos os sistemas de polímero/ingrediente ativo investigados, a carga do ingrediente ativo aumenta com a temperatura e pressão. Segundo Champeau et al. (2015), foram obtidas imagens que revelaram a capacidade do scCO<sub>2</sub> de transportar o CET para a parte interna da fibra de PLLA. Além disso, afirmou que a quantidade de CET incorporada no PLLA foi de até 32,5%.

Llorens et al. (2015) estudaram o emprego de microfibras, pelo processo de eletrofiação, a partir de dois polímeros de PLLA com composições diferentes dos isômeros do PLLA. O primeiro e o segundo polímero contendo 95,8 e 98 m% respectivamente de isômero L-láctido. Os dois polímeros foram carregados com triclosan, CET ou sua combinação para obter *scaffolds* multifuncionais com propriedades bactericidas e anti-inflamatórias. A concentração de polímero nos *scaffolds* obtidos foi de 10% (m/v) enquanto a concentração de CET obtida foi de 1%

(m/v) e a concentração de triclosan obtida foi de 3% (m/v). O teste de liberação de fármaco foi realizado em dois meios: PBS puro e PBS contendo álcool. O resultado dos testes de liberação de fármaco mostraram que *scaffolds* colocados no meio PBS com álcool liberaram uma maior quantidade de fármaco comparado com os *scaffolds* colocados no meio PBS puro. Além disso, em ambos os meios foi constatado que os *scaffolds* incorporados com triclosan e CET liberaram uma menor quantidade de fármaco comparado com os *scaffolds* incorporados com apenas um fármaco. A biocompatibilidade dos *scaffolds* foi avaliada demonstrando as que amostras carregadas com CET mostraram ligeira atividade bactericida.

Llorens, Del Valle e Puiggali (2016) prepararam *scaffolds* multifuncionais, a partir de duas composições diferentes do polímero de PLLA, com um teor ligeiramente diferente de D-láctido (4,2% wt e 2,0% wt). Nesse estudo, de acordo com Llorens, Del Valle e Puiggali (2016), o triclosan foi empregado como agente bactericida, o CET como anti-inflamatório e o ácido p-cumárico como antioxidante. Para o teste de liberação de fármaco, uma solução de PBS contendo álcool foi empregada para facilitar a liberação de triclosan, CET e o ácido p-cumárico devido as suas moléculas serem altamente hidrofóbicas e evitar o estabelecimento de condições de equilíbrio que normalmente limitam sua liberação quando apenas o PBS é empregado. A liberação rápida sempre foi observada.

Champeau et al. (2020) estudaram fibras de PLLA impregnadas com CET, usando um processo de incorporação supercrítico, assistida por CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>), para desenvolver suturas absorvíveis, liberadoras de fármacos. Champeau et al. (2020) afirmam que a alteração das condições de incorporação do fármaco tais como a temperatura, velocidade e pressão, resultou na otimização do carregamento da droga na matriz polimérica e conseqüentemente, no perfil de liberação de CET do PLLA. Além disso, a taxa de degradação e a perda de resistência à tração das suturas são aceleradas pelo CET, à medida que ele catalisa a hidrólise ácida do PLLA (CHAMPEAU et al., 2020).

Verano Naranjo et al. (2021) investigaram o emprego da técnica de incorporação supercrítico assistida por CO<sub>2</sub> (ScCO<sub>2</sub>) como uma técnica eficiente para a incorporação do CET na blenda polimérica de PLLA e PDLLA com o objetivo de desenvolver um dispositivo de liberação controlada do fármaco. De acordo com

Verano Naranjo et al. (2021), foi constatado que com pressão e temperatura mais elevadas, o poder de incorporação das drogas também aumenta. Os autores afirmam que as quantidades máximas de incorporação (cerca de 9% (m /m)) foram obtidas a 200 bar e 75° C.

## **2.11 Emprego de PLLA na regeneração do tecido ósseo**

Os resultados do levantamento bibliográfico relativo ao emprego do PLLA na regeneração do tecido ósseo são apresentados a seguir.

No estudo de CIAPETTI et al. (2012), scaffolds de PLLA foram produzidos pela técnica de separação de fases e foram amplamente estudados *in vitro* como matrizes para a regeneração óssea. Segundo CAPUANA et al. (2022), os autores desse estudo analisaram a expressão morfológica, bioquímica e genética de células-tronco mesenquimais humanos (MCSs) semeados em scaffolds baseados em PLLA, incluindo nanotubos de carbono de parede única, micropartículas de (HA) e moléculas de proteína morfogenética óssea 2 (BMP2).

No estudo de JAISWAL et al. (2013), scaffolds de nanofibras de PLLA/gelatina obtidos por eletrofiação foram examinados para a verificação de formação óssea *in vivo* utilizando um modelo de defeito calvarial de tamanho crítico de um rato. Os resultados obtidos mostraram que após a implantação, os scaffolds de PLLA/gelatina mostraram ossificação marginal do que os scaffolds de PLLA/gelatina/HA, que induziram uma regeneração óssea mais rápida durante as primeiras seis semanas.

No estudo feito por Weng et al. (2014), os autores compararam a regeneração *in vivo* de um defeito ósseo do cúbito de 15 mm num coelho utilizando scaffolds de PLLA e PLLA/PCL.

No estudo feito por Fu et al. (2018), nanofibras de PLLA eletrofiadas foram modificadas com sucesso pela deposição superficial de ECM osteogênico (secretado por células MC3T3-E1).

No estudo de IKUMI et al.(2018), avaliou-se a eficácia de uma membrana hidrofílica de hidroxiapatita não sinterizada e PLLA como um scaffold para a regeneração óssea. As membranas  $\mu$ HA/PLLA aderiram bem ao osso em torno do defeito, sem necessidade de pinos de fixação.

No estudo de HUANG et al. (2020), espumas contendo PLLA e HA foram produzidas por separação de fases induzida termicamente (TIPS) com diferentes teores de hidroxiapatita (10, 25, 50, 75, 90 % em peso do HA). Segundo CAPUANA et al. (2022), as espumas produzidas foram analisadas em profundidade para a aplicação na engenharia de tecidos para a regeneração do tecido ósseo.

Nos estudos de BISHT et al.(2021), SHIVALKAR; SINGH (2017) e CRUZ (2010), foram produzidos estruturas compósitas de PLLA/cerâmica. Todos esses scaffolds exibiam alta porosidade e resistência mecânica próxima aos do osso humano esponjoso, apoiando a proliferação de células semelhantes aos ossos e a condutividade óssea in vivo.

De acordo com CAPUANA et al. (2022), scaffolds de PLLA para promover a reparação de tecidos ósseos também foram produzidos por manufatura aditiva, especificamente em combinação com materiais biocerâmicos. Uma vez que a principal limitação da biocerâmica é a sua incapacidade de fundir na presença de polímeros termoplásticos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

O CET ( $M_w = 254,28$  g/mol, pureza 98%), o PLLA (L210S) e o clorofórmio ( $M_w = 119,38$  g/mol, pureza 99,8%) foram adquiridos das seguintes empresas: Sigma-Aldrich, Evonik Industries, ACS Científica, respectivamente. Esses materiais foram usados como recebidos.

#### 3.2 Preparo das soluções poliméricas incorporadas com fármaco

Três soluções diferentes de PLLA e CET foram preparadas e rotofiadadas. As massas de PLLA e CET foram pesadas (balança analítica da Mettler Toledo, modelo ME204). A Tabela 1 contém os dados das soluções e da velocidade de rotofiação.

**Tabela 1** - Dados do preparo das soluções.

Solução	PLLA %(m/v)	CET %(m/m)
1	8	0
2	8	5
3	8	10
4	8	15

Fonte: Autor

#### 3.3 Estudo de processamento por ensaio de viscosidade

Soluções diferentes foram feitas para o ensaio de viscosidade. A primeira curva foi construída com os resultados de viscosidade de 8% (m/v) de PLLA em clorofórmio na concentração de polímeros totais de 2 a 10 % g/mL. A segunda curva foi construída com os resultados de 8% (m/v) de PLLA com 10% (m/m) de CET em clorofórmio com concentrações de polímeros totais de 1 a 9% g/mL. Também foram avaliadas as viscosidades das soluções de 5, 10 e 15% (m/m) de CET em 8% (m/v) de PLLA. As soluções poliméricas foram submetidas a agitação em ultrassom da Ultrasonic clear (Unique, São Paulo, Brasil) no período de 5 horas a temperatura ambiente.

Um viscosímetro de cilindros concêntricos (LVDV1, Brookfield) com um eixo cônico SC4-34 e um adaptador para volumes inferiores a 50 mL foi utilizado para as medições, com um cisalhamento oscilatório entre 10 e 60 revoluções por minuto. As

análises foram realizadas com temperatura ambiente. A curva experimental de viscosidade aparente versus concentração de polímeros na solução foi criada a partir dos dados obtidos, para a determinação da concentração crítica. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros (LPol) da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

### **3.4 Processamento das fibras por rotofiação**

O sistema de rotofiação utilizado consiste em um reservatório cônico com quatro orifícios de 1 mm de diâmetro. A partir da extrusão da solução pelos orifícios do reservatório ocorre a formação das fibras, que se aderem em camadas ao papel alumínio presente na superfície interior do coletor, a uma distância do furo de 17 cm. Todos os experimentos foram conduzidos a temperatura ambiente. O rotofiador está presente no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros (LPol) da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

### **3.5 Análise morfológica por MEV**

A caracterização morfológica foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo ZEISS EVO MA 15 com tensão de 10kV. A medição do diâmetro das fibras foi realizada pelo software "SIMPoly" (Semiautomated Image Measurements of Polymers).

### **3.6 Análise de molhabilidade por ângulo de contato**

O método da gota séssil foi utilizado com um medidor de ângulo de contato marca Dataphysics, modelo OCA15. Uma gotícula de 10  $\mu$ L de água destilada foi adicionada à superfície das amostras de PLLA/5% de CET, PLLA/10% de CET e PLLA/15% de CET, e os ângulos de contato das gotas com as superfícies foram medidos por 14 segundos utilizando o software do equipamento SCA20. Foram realizadas quatro replicatas para cada amostra e o valor médio dos ângulos de contato foram calculados.

### 3.7 Análise Química por FTIR

A caracterização química das amostras de CET, PLLA, PLLA/5% de CET, PLLA/10% de CET e PLLA/15% de CET foi realizada por espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) por reflectância total atenuada (ATR) em um equipamento Perkin-Elmer Spectrum 100, através de 16 varreduras de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , a temperatura ambiente.

### 3.8 Análise de cristalinidade por DRX

Os difratogramas do CET, PLLA, PLLA/5% de CET, PLLA/10% de CET e PLLA/15% de CET foram obtidos utilizando um difratômetro de raios-X (X'Pert-MPD, Philips), com as seguintes condições de análise: radiação  $K\alpha$  do Cobre (1,54 Å), voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA, com passo de 0,026° e velocidade de 0,026°/s. A amostra de PLLA teve a condição de análise de  $2\theta$  na faixa de 10 a 90° enquanto para as demais amostras, a condição de análise foi de  $2\theta$  na faixa de 10 a 70°.

### 3.9 Análise térmica por TGA

A análise termogravimétrica por termogravimetria (TGA) e sua diferencial (DTG) das amostras foi efetuada em um equipamento TGA 2950 HR V5.3C. A rampa de aquecimento partiu da temperatura ambiente até 600 °C, sob atmosfera inerte de argônio, com fluxo de 60 mL/min e taxa de aquecimento de 10 °C /min.

### 3.10 Análise térmica por DSC

Amostras de massa aproximada de 20 mg foram submetidas a análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) em um calorímetro Q100, com temperatura inicial de 30°C, e aquecimento de 10 °C/min até 200 °C, resfriamento de 10 °C/min até 30 °C e segundo aquecimento de 10 °C/min até 200 °C, sob atmosfera inerte de Argônio. Foram considerados os dados da segunda rampa de aquecimento.

### 3.11 Ensaio de liberação de fármaco

A liberação e conseqüente quantificação do CET foi realizada através da espectroscopia UV-Vis. Primeiramente, para a construção da curva de calibração, diferentes soluções de CET, com concentrações conhecidas, foram preparadas em PBS 0,1M e pH 7,4. Foi construída uma curva de calibração na faixa de 0,01 a 0,04 mg/mL. Para cada solução, de concentração conhecida, foi retirada uma amostra de 4 mL para leitura da absorbância. A leitura de cada amostra foi feita utilizando-se um espectrofotômetro UV Visível (Q 898U, Quimis) na região do ultravioleta em 260 nm.

Quatro replicatas de cada membrana produzida foram colocadas em tubos de ensaio. Alíquotas de 50 mL de PBS 0,1M e pH 7,4 foram adicionadas em cada tubo, os quais foram deixados em estufa (Ethik Techonology), com temperatura controlada a 37°C. Em períodos pré-determinados, alíquotas de 4 mL da solução foram retiradas para análise quantitativa de CET e substituídas por uma nova. O tempo total do teste foi de 48 horas.

#### 3.11.1 Análise estatística

Todos os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A diferença estatística foi medida por uma análise unidirecional da variância (ANOVA). Uma ANOVA de medidas repetidas foi realizada entre as amostras de PLLA com 10 e 15% de CET para comparar o efeito do tempo sobre a quantidade de droga liberada. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Um teste t de student foi realizado para comparar o efeito do crescimento de CET na matriz polimérica de PLLA na liberação do fármaco entre as amostras de PLLA com 10 e 15% de CET. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O programa SPSS foi empregado para realizar a análise dos dados.

### 3.12 Ensaio biológico

O ensaio biológico foi realizado em três etapas: cultura celular, preparo dos scaffolds para o ensaio biológico e ensaio de viabilidade celular.

#### 3.12.1 Cultura celular

A linhagem celular do pré-osteoblasto de rato (MC3T3-E1) foi mantida no meio essencial alfa mínimo ( $\alpha$ -MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS),

100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, EUA) em atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### 3.12.2 Preparo dos scaffolds para o ensaio biológico

As células MC3T3-E1 com uma confluência de 80% foram tripsinizadas e depois inativadas com α-MEM e contadas em um contador automático Countess II (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). Os scaffolds foram dispostos em placa de 96 poços (1 scaffold por poço). Os scaffolds foram esterilizados com luz UV durante a noite e semeados com células a uma densidade de 8x10<sup>3</sup> células por poço em 100 µl de meio de cultura e incubados a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C durante 24, 48 e 72 h.

### 3.12.3 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A atividade da exposição das células aos discos foi avaliada por um ensaio modificado de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Esta técnica é utilizada para medir a atividade metabólica celular como indicador de viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade. O ensaio do MTT baseia-se na redução de um sal de tetrazólio amarelo (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio ou MTT) a cristais de formazano púrpura por células metabolicamente ativas. Após 24, 48 e 72 horas de chapeamento, os meios de cultura foram aspirados e o MTT (0,5 mg/mL em PBS) foi adicionado às células e incubado por 3 horas em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. O meio de crescimento foi descarregado e 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço para dissolver o MTT. A absorbância foi determinada a 570 nm utilizando leitor espectrofotométrico de placas multwell de varrimento (leitor de microplacas F5, sondas moleculares).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Ensaio de processamento por viscosidade

Considerando a importância da relação da viscosidade da solução com a concentração total de polímeros na formação de fibras, as viscosidades de diferentes concentrações totais de PLLA na solução foram medidas (Tabela 2) e a curva de viscosidade aparente versus concentração total de polímeros foi construída (Figura 3). Além disso, as viscosidades de diferentes concentrações de PLLA contendo 10% de CET na solução foram medidas (Tabela 3) com o intuito de verificar o efeito do fármaco na viscosidade das soluções (Figura 4).

De acordo com BARBOSA et al. (2022), a concentração de polímero de 8% g/mL é a mais adequada para obter fibras homogêneas de PLLA puro. Devido a isso, a concentração de 8% foi adotada nesse trabalho. Nota-se que a concentração do polímero escolhida está na região de concentração crítica conforme indica o teste de viscosidade de PLLA puro.

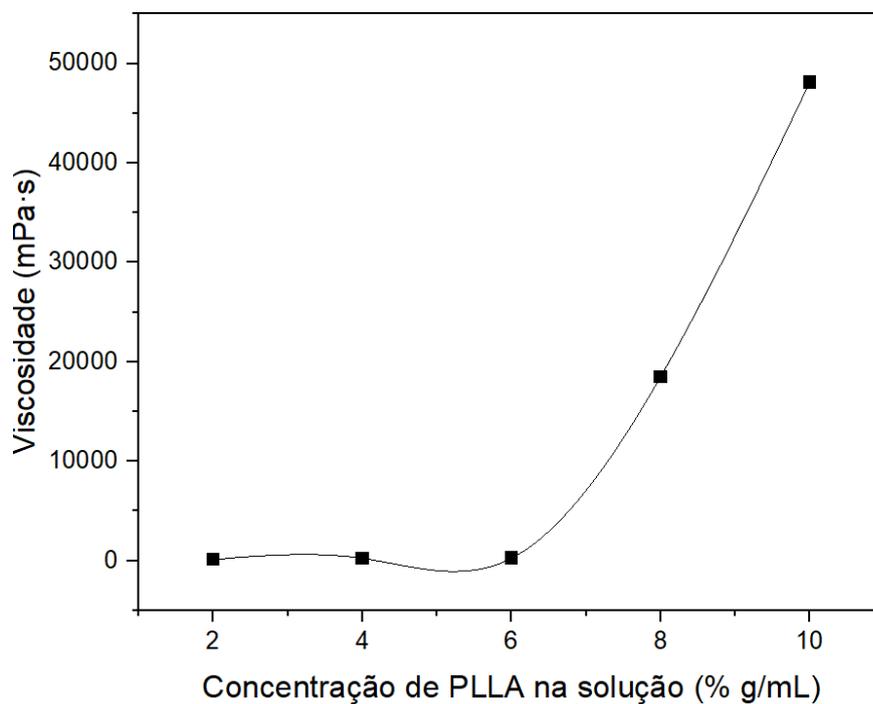
Para investigar o efeito da incorporação de CET na viscosidade da solução contendo 8% (g/mL) de PLLA foram realizados testes de viscosidade em três soluções contendo 5, 10 e 15% de CET respectivamente. A Figura 5 e a Tabela 4 contém os resultados dos testes.

Tabela 2. Viscosidade aparente de soluções contendo diferentes concentrações de PLLA

Concentração de PLLA (% g/mL)	Viscosidade Aparente (mPa·s)
2	104
4	221
6	250
8	18500
10	48100

Na Tabela 2 contendo os dados da viscosidade das soluções contendo PLLA puro nota-se que o valor da viscosidade aumenta consideravelmente entre 6 a 8 % g/mL. Nesse intervalo, há uma mudança da inclinação da curva do gráfico presente na Figura 3, o que indica que o valor da concentração crítica se encontra entre 6 a 8 % g/mL.

Figura 3. Gráfico de viscosidade aparente por concentração de PLLA.



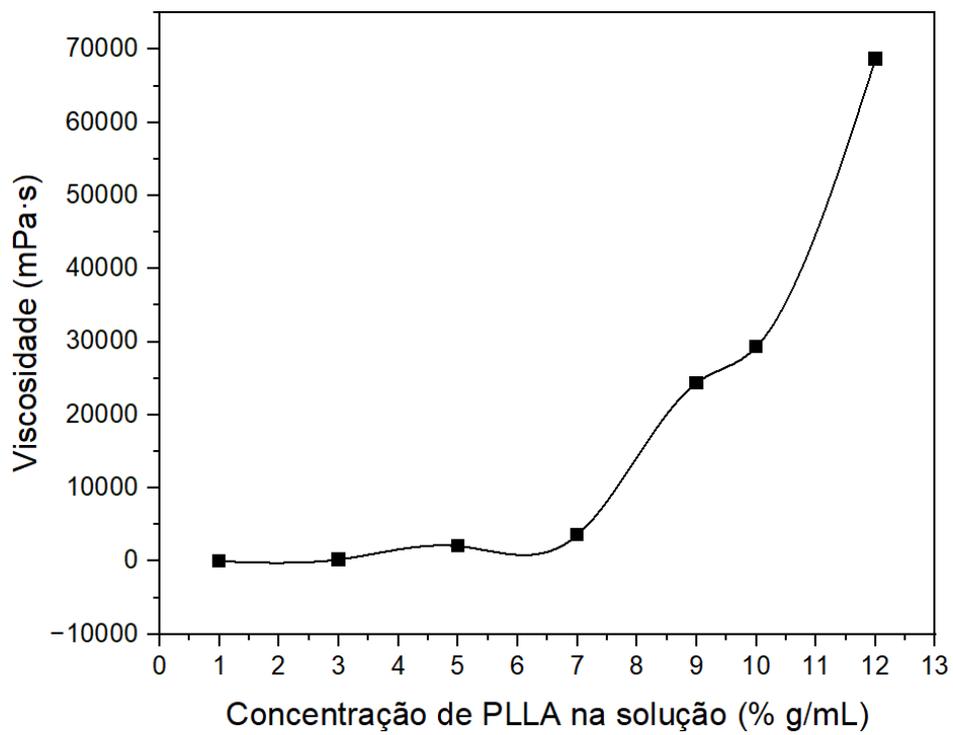
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3. Viscosidade aparente de soluções contendo diferentes concentrações de PLLA contendo 10% de CET

Concentração de PLLA (% g/mL)	Viscosidade Aparente (mPa·s)
1	9
3	258
5	2085
7	3590
9	24400
10	29300
12	68700

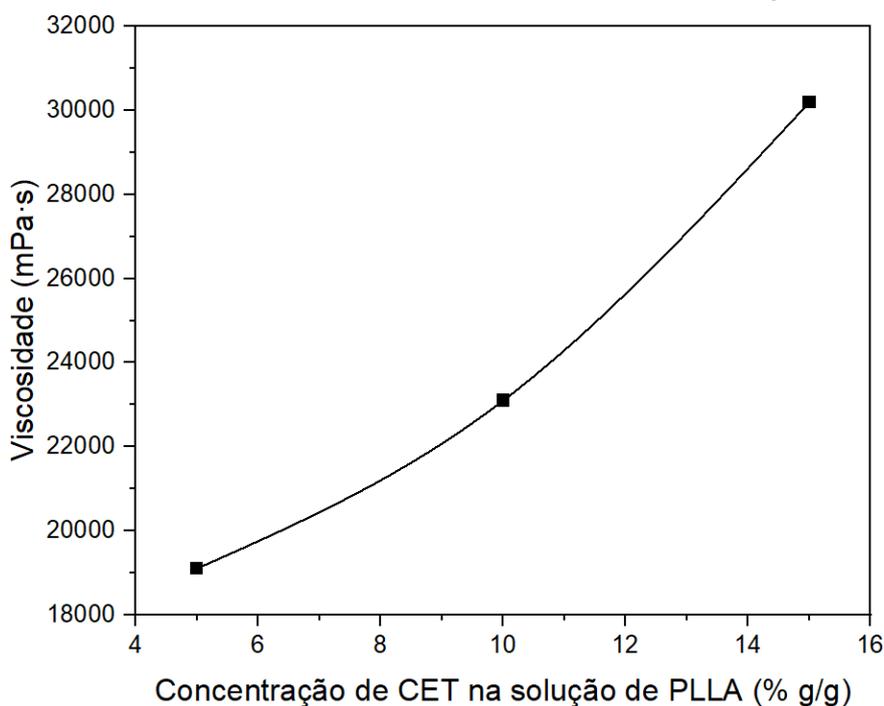
Na Tabela 3, nota-se que o valor da viscosidade aumenta consideravelmente entre 7 a 9 % g/mL. Nesse intervalo, há uma mudança da inclinação da curva do gráfico presente na Figura 4, o que indica que o valor da concentração crítica se encontra entre 7 a 9 % g/mL.

Figura 4. Gráfico de viscosidade do PLLA com 10% de CET.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5. Gráfico de viscosidade do PLLA com diferentes concentrações de CET



Fonte: Autor

Tabela 4. Viscosidade aparente de soluções contendo diferentes concentrações de CET

Concentração de CET na solução de PLLA (% g/mL)	Viscosidade Aparente (mPa·s)
5	19100
10	23100
15	30200

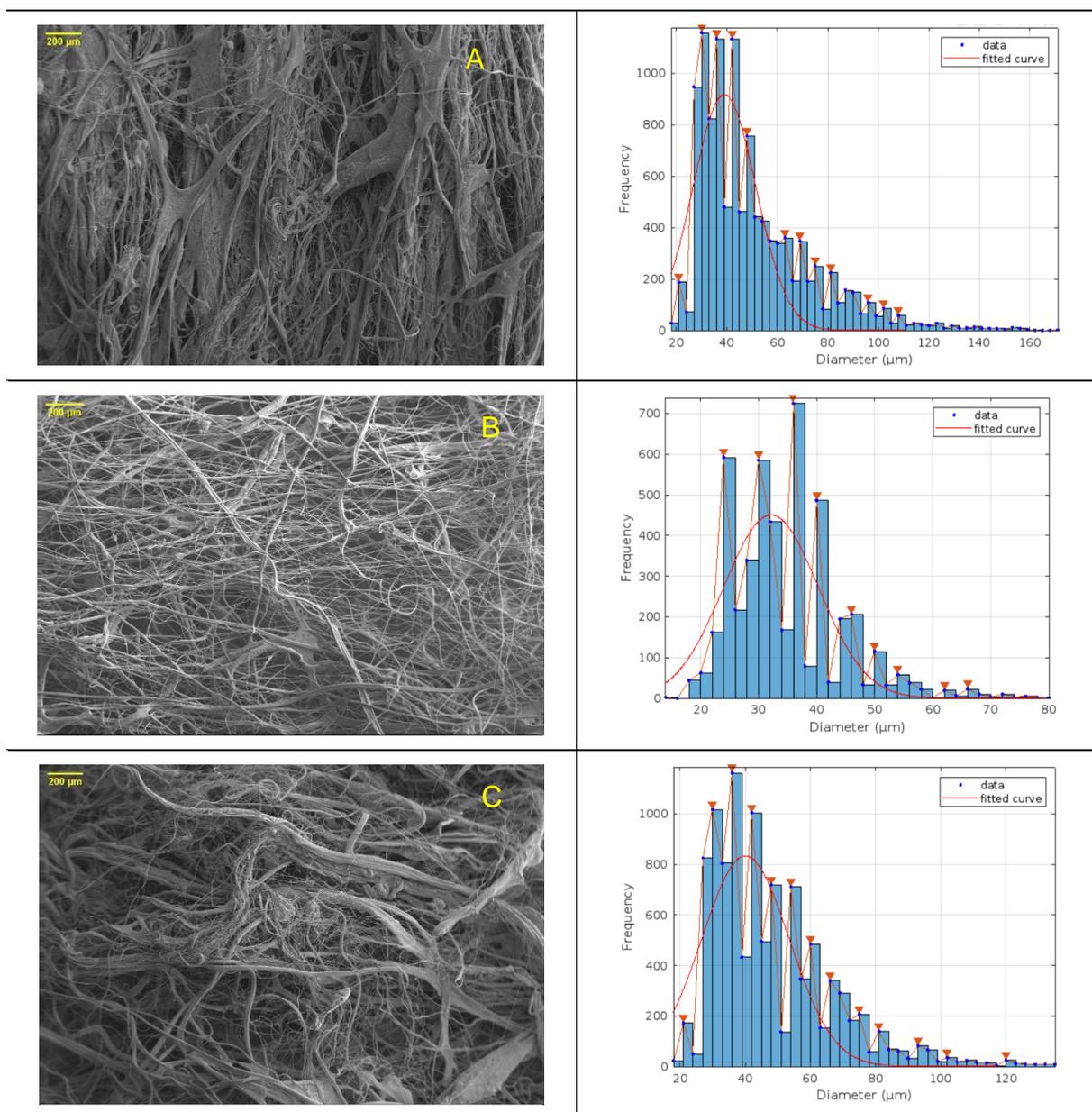
Na Tabela 4, nota-se que o crescimento de CET na solução contendo 8% (g/mL) de PLLA promove a elevação da viscosidade da solução de PLLA. A Figura 5 evidencia a relação entre quantidade do fármaco e viscosidade, ou seja, quanto maior for a quantidade de CET na solução de PLLA maior será a sua viscosidade.

#### 4.2 Análise morfológica por MEV

A morfologia dos scaffolds fibrosos de PLLA/ 5% de CET, PLLA/10% de CET e PLLA/15% de CET produzidos na velocidade de rotação de 18.000 rpm foram analisadas utilizando o MEV. As imagens presentes na Figura 6 foram empregadas

para a medição dos diâmetros das fibras. Os valores dos diâmetros estão na Tabela 5.

Figura 6. Micrografias obtidas por MEV. A) PLLA com 5% de CET ,B) PLLA com 10% de CET e C) PLLA com 15% de CET



Fonte: Autor

Tabela 5. Diâmetros médios gerados usando o SIMPoly. A) PLLA/5% de CET, B) PLLA/10% de CET, C) PLLA/15% de CET

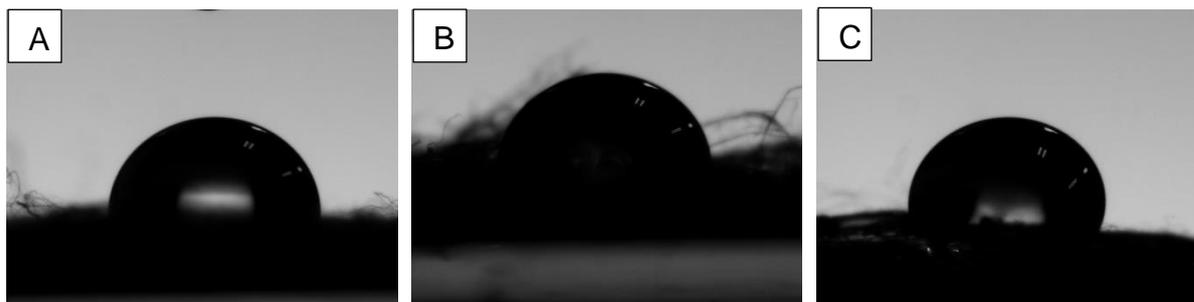
Referência	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )
A	$39 \pm 8,9$
B	$32 \pm 5,8$
C	$40 \pm 9,5$

Com os resultados obtidos, verificou-se que os scaffolds produzidos com velocidade de 18.000 rpm apresentaram fibras ramificadas sem a presença de *beads*. Previamente a esse estudo, em nosso grupo de pesquisas, foi feito o estudo de BARBOSA et al. (2022), com o PLLA no equipamento de rotofiação, e o teste de MEV nas membranas de PLLA puro indicaram diâmetro médio de fibras de  $5,1 \pm 3,3 \mu\text{m}$ . Como observado na Tabela 5, as fibras de PLLA com 5, 10 e 15 % de CET apresentaram diâmetros de fibras semelhantes. Quando comparado com o PLLA puro, nota-se que o valor do diâmetro das três membranas com CET é superior ao diâmetro da membrana de PLLA puro. Esse fenômeno provavelmente ocorreu devido a elevação da viscosidade da solução proporcionada pela incorporação de CET a matriz polimérica de PLLA, o que promove a obtenção de fibras com maiores diâmetros.

### 4.3 Molhabilidade por ângulo de contato

Os resultados obtidos para as amostras PLLA com 5, 10 e 15% de CET estão apresentados na Figura 7 e na Tabela 6.

Figura 7. Imagem da gota de água estática usado para a medida do ângulo de contato para as diferentes membranas. A) PLLA/5% de CET. B) PLLA/10% de CET. C) PLLA/15% de CET.



Fonte: Autor

Tabela 6. Dados referentes ao ângulo de contato e hidrofiliicidade das membranas analisadas

<b>Membrana</b>	<b>Ângulo de contato</b>	<b>Hidrofiliicidade</b>
PLLA/ 5% de CET	$80^{\circ} \pm 3,6^{\circ}$	Hidrofílica
PLLA/10% de CET	$77^{\circ} \pm 1,4^{\circ}$	Hidrofílica
PLLA/15% de CET	$99^{\circ} \pm 7,5^{\circ}$	Hidrofóbica

Fonte: Autor

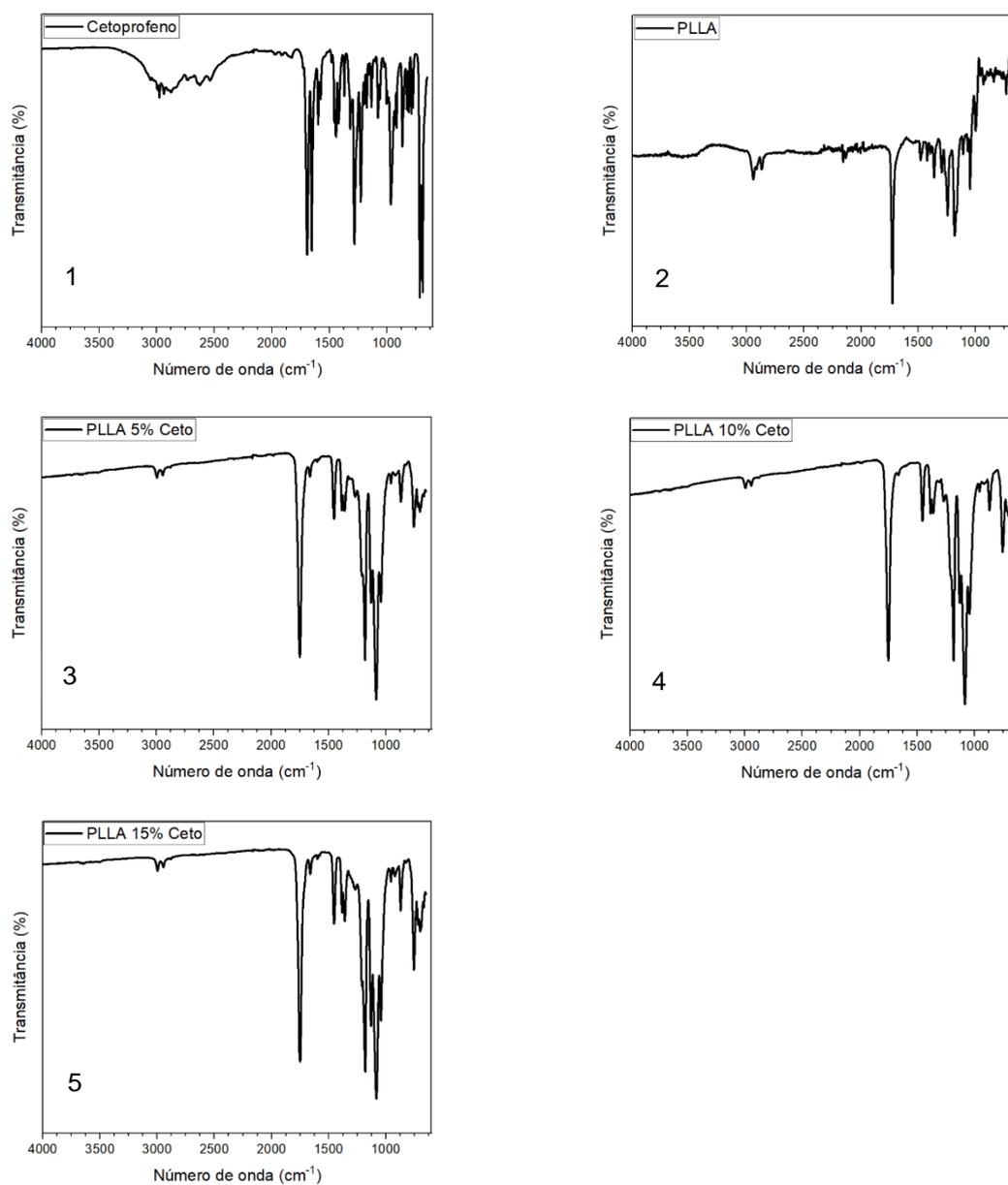
A partir dos resultados de molhabilidade obtidos, observa-se ângulos de  $80^{\circ} \pm 3,6^{\circ}$  para a amostra de PLLA/5% de CET,  $77^{\circ} \pm 1,4^{\circ}$  para a amostra de PLLA/10% de CET e  $99^{\circ} \pm 7,5^{\circ}$  para a amostra de PLLA/15% de CET. Foi observado que as fibras contendo 15% de CET apresentaram o maior valor do ângulo de contato. Os valores contidos na Tabela 6 indicam que em concentrações abaixo de 15% as membranas apresentam propriedades hidrofílicas, e a adição da concentração de 15% de CET torna a membrana hidrofóbica.

No estudo de BARBOSA et al. (2022), foi realizado o teste de ângulo de contato com fibras de PLLA puro cujo resultado foi de  $111,0^{\circ} \pm 3,6^{\circ}$ . Nota-se que o valor obtido indica que a membrana de PLLA é hidrofóbica e a incorporação de CET promove a diminuição do ângulo de contato nas três amostras analisadas, o que pode ser interessante para a engenharia de tecidos óssea.

#### 4.4 Análise Química por FTIR

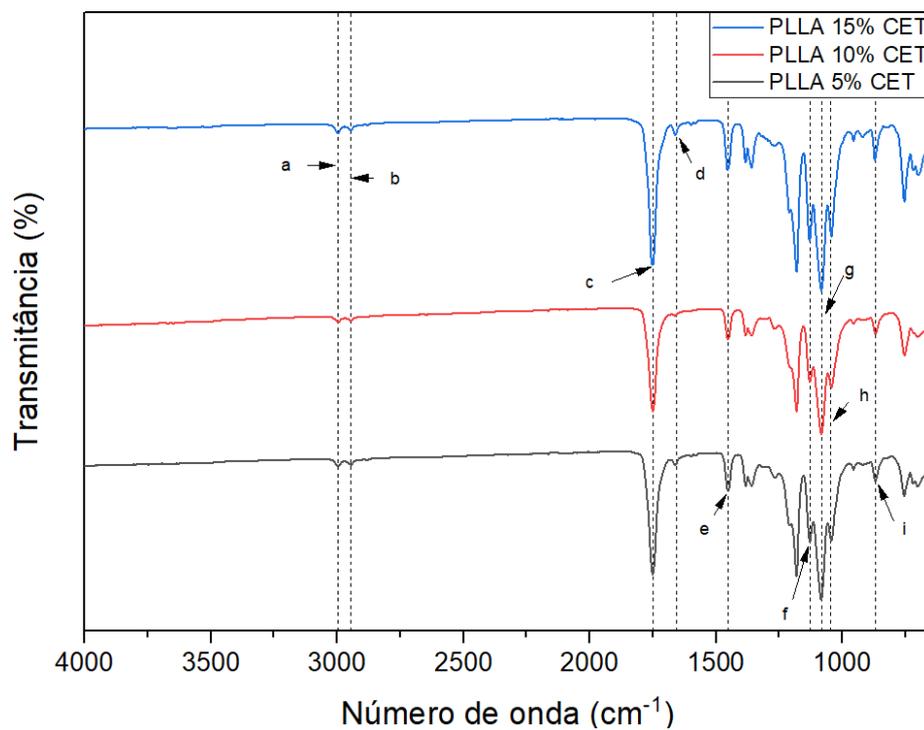
As amostras de PLLA com 5, 10 e 15 % de CET foram analisadas por FTIR para a determinação das bandas químicas presentes no material. A Figura 8 contém os gráficos de FTIR de diferentes amostras e a Figura 9 contém a identificação das bandas das amostras analisadas.

Figura 8. Gráficos de FTIR de diferentes amostras. 1) CET, 2) PLLA, 3) PLLA/5% de CET, 4) PLLA/10% de CET e 5) PLLA/15% de CET



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9. Espectros de FTIR das diferentes amostras analisadas.



Fonte: Autor

A Tabela 7 contém as informações das bandas identificadas na Figura 9. A banda denominada de *d* pertence ao CET e as bandas denominadas a, b, c, e, f, g, h e i pertencem ao PLLA.

Tabela 7. Grupos funcionais do PLLA e do CET identificados no espectro de FTIR das amostras de PLLA com 5, 10 e 15% de CET.

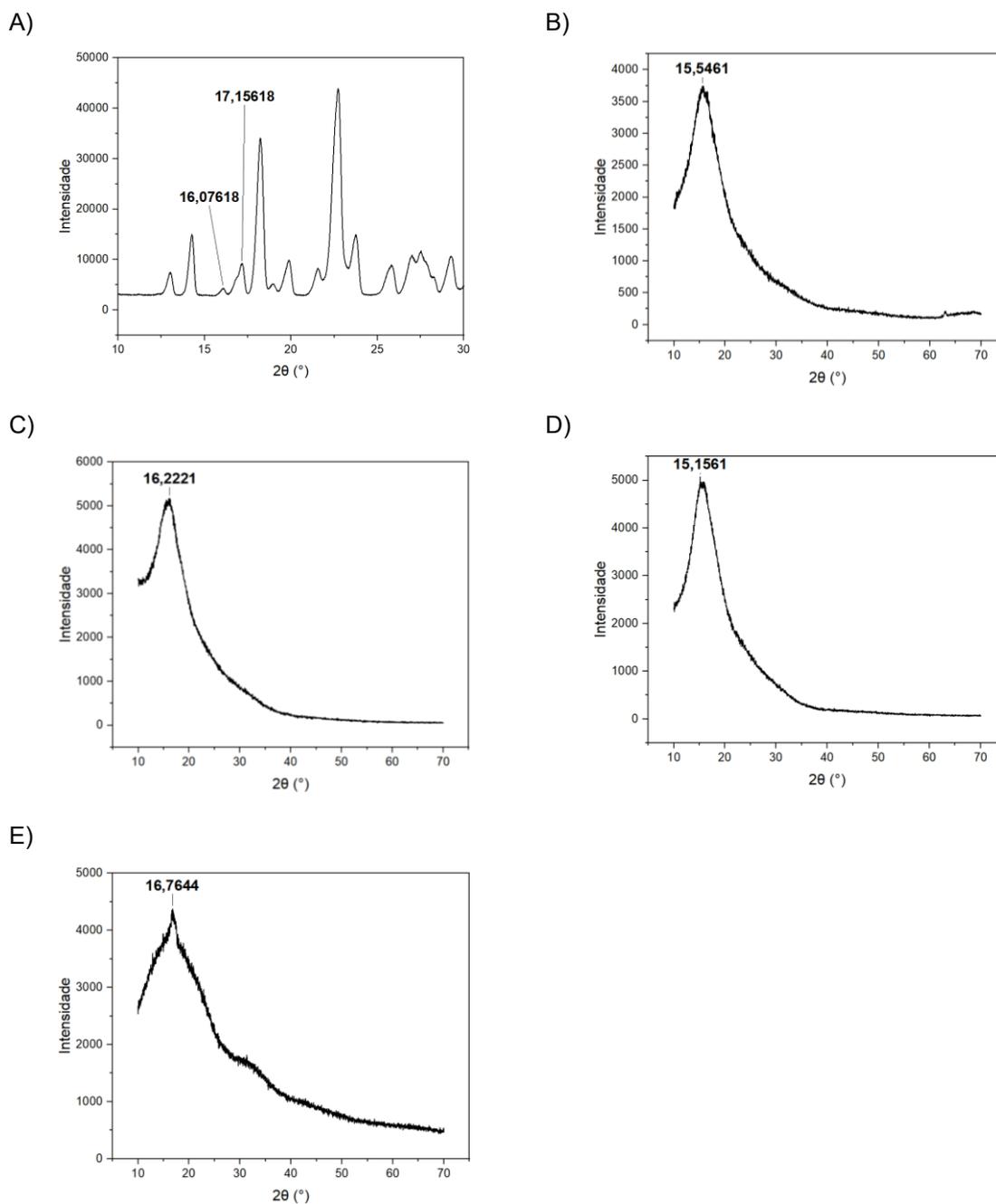
Referência	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Vibração	Grupo funcional	Atribuição
a	2996	flexão e estiramento	CH <sub>3</sub>	PLLA
b	2946	flexão e estiramento	CH <sub>3</sub>	PLLA
c	1749	estiramento	C=O	PLLA
d	1655	estiramento	C=O	CET
e	1452	flexão e estiramento	CH <sub>3</sub>	PLLA
f	1128	flexão e estiramento	CH <sub>3</sub>	PLLA
g	1081	estiramento	C-O	PLLA
h	1045	estiramento	C-O	PLLA
i	868	estiramento	C-O	PLLA

É possível observar que as bandas associadas ao PLLA são semelhantes às encontradas no estudo de BARBOSA et al. (2022). A única banda associada ao KET em 1655 cm<sup>-1</sup> é semelhante a encontrada no estudo de NIE et al. (2012). Desse modo, o teste FTIR mostrou que o CET foi incorporado na matriz polimérica de PLLA das amostras analisadas. Não houve bandas características do solvente nos espectros, portanto todo o clorofórmio foi evaporado.

## 4.5 Difração de raios-X (DRX)

A Figura 10 contém os difratogramas de DRX das amostras de CET puro, PLLA puro, PLLA com 5% de CET, PLLA com 10% de CET e PLLA com 15 % de CET.

Figura 10. Difratogramas das diferentes amostras analisadas. A) CET puro, B) PLLA puro, C) PLLA/5% de CET, D) PLLA/10% de CET, E) PLLA/15% de CET.



Fonte: Autor

É possível verificar pelos espectros de DRX que o PLLA é um polímero semicristalino e o CET é cristalino. O difratograma do CET obtido é semelhante ao encontrado no estudo de VUČEN et al. (2013) em que a estrutura cristalina do CET foi evidenciada pela presença de picos intensos e estreitos, devido a cristalinidade.

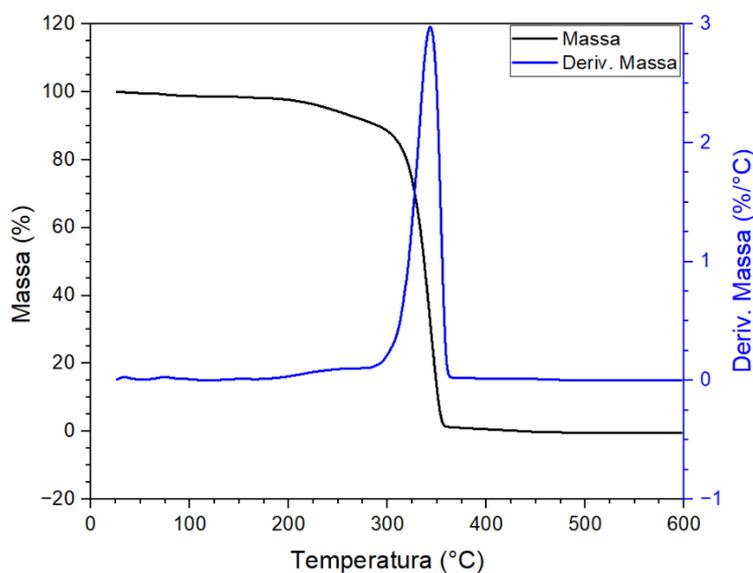
Segundo o estudo de OGBOMO et al. (2009), os picos no difratograma de PLLA puro ocorrem na faixa de 15° até 22.3°, a mesma região em que foram encontrados os picos das amostras de PLLA, PLLA com 5, 10 e 15 % de CET, respectivamente como indicado na Figura 7.

A ausência de picos de CET nos difratogramas das amostras de PLLA se deve ao fato do fármaco ter sido incorporado a matriz polimérica em pequena massa.

#### 4.6 Análise térmica por TGA

A análise termogravimétrica (TGA) e a derivada da perda de massa (DTG) dos scaffolds de PLLA contendo 5, 10 e 15% de CET estão apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13, respectivamente.

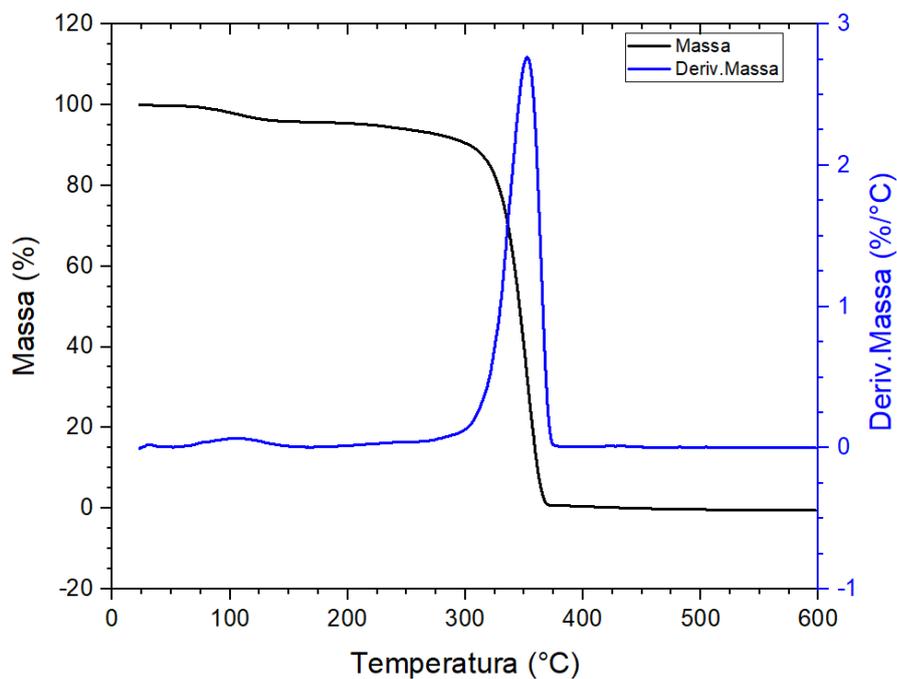
Figura 11. Termograma da amostra de PLLA/5% de CET



Fonte: Elaborado pelo autor

O processo de perda de massa das fibras de PLLA contendo 5% de CET se dá em uma única etapa, a partir da temperatura de 241 °C e termina em 354 °C de acordo com o termograma presente na Figura 11. Além disso, na curva de DTG a temperatura do pico é de 343 °C em que ocorre a maior taxa de perda de massa da amostra.

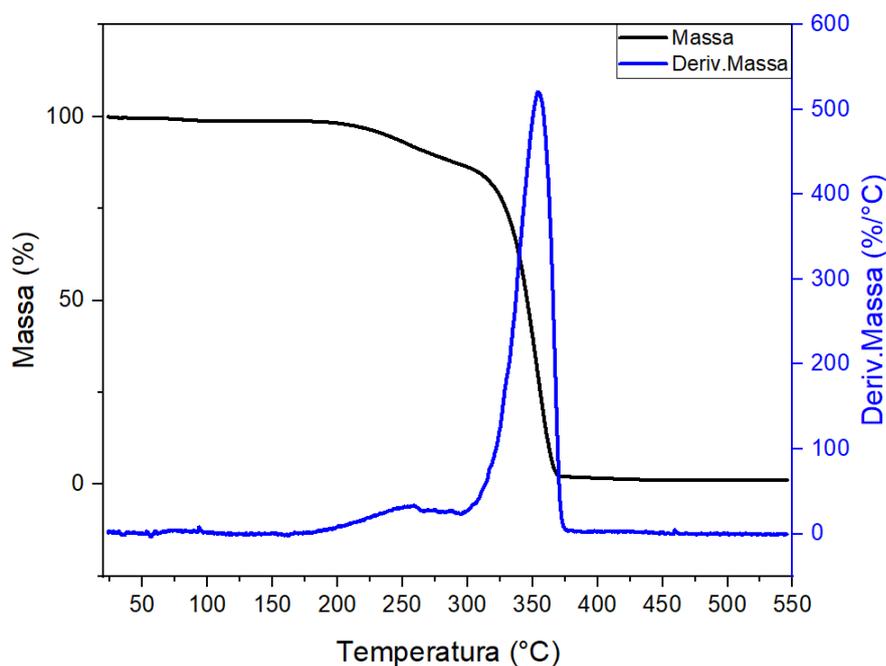
Figura 12. Termograma de PLLA/10% de CET



Fonte: Elaborado pelo autor

O processo de perda de massa das fibras de PLLA contendo 10% de CET começa a partir da temperatura de 280 °C e termina em 364 °C de acordo com o termograma presente na Figura 12. Além disso, na curva de DTG a temperatura de pico é de 352 °C em que ocorre a maior taxa de perda de massa da amostra.

Figura 13. Termograma de PLLA/15% de CET



Fonte: Autor

O processo de perda de massa das fibras de PLLA contendo 15% de CET começa a partir da temperatura de 225 °C e termina em 370 °C de acordo com o termograma presente na Figura 13. Além disso, na curva de DTG a temperatura de pico é de 354 °C em que ocorre a maior taxa de perda de massa da amostra.

No estudo de BARBOSA et al. (2022), os testes de TGA e DTG do scaffold de PLLA puro foram realizados. O processo de perda de massa das fibras de PLLA começa a partir da temperatura de 290 °C e termina em 373 °C.

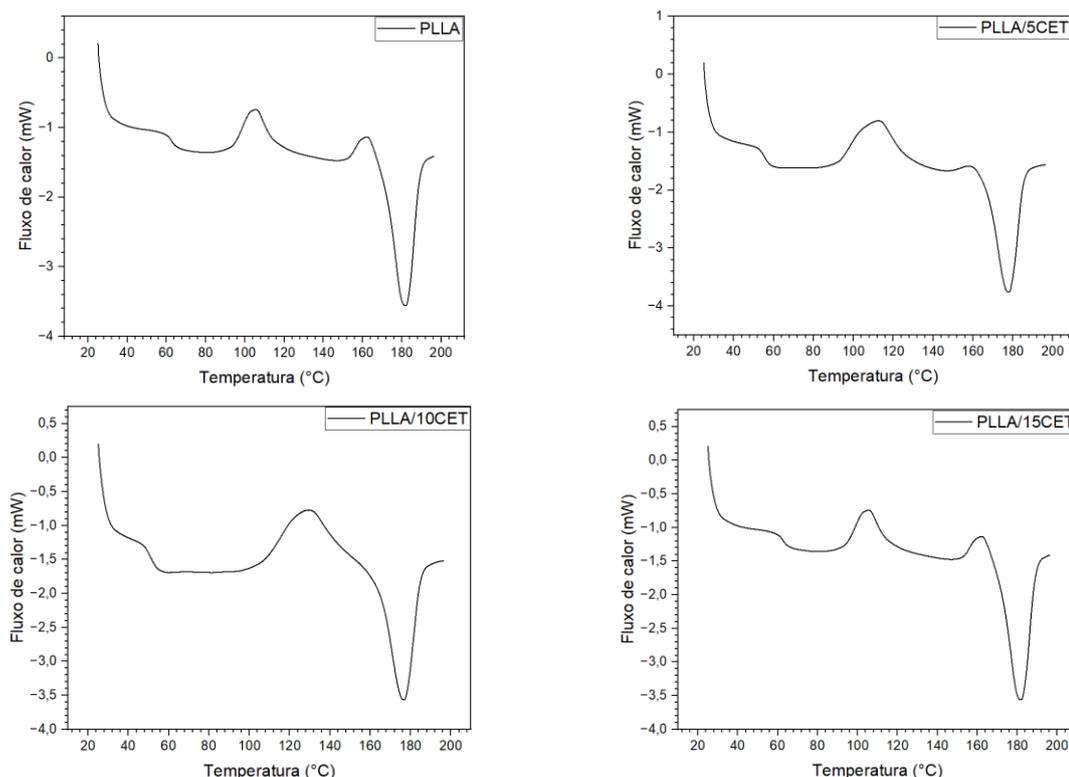
#### 4.7 Análise térmica por DSC

A análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos scaffolds de PLLA puro e PLLA contendo 5, 10 e 15% de CET estão apresentadas na Figura 14. As temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), de cristalização ( $T_c$ ) e de fusão ( $T_m$ ) de cada amostra estão na Tabela 8.

Segundo TIȚA et al (2011), a curva de DSC de KET apresenta um pico endotérmico em que a  $T_m$  é igual a 96,8 °C. De acordo com MOHAMED EL-HADI; ALAMRI (2018), o PLLA puro apresenta uma  $T_g$  de cerca de 61 °C e  $T_m$  igual a 188 °C. Na Tabela 8, os valores de  $T_g$  e  $T_m$  obtidos experimentalmente da amostra de PLLA

puro aproximam-se dos valores obtidos no estudo de MOHAMED EL-HADI; ALAMRI (2018).

Figura 14. Gráficos de DSC das diferentes amostras analisadas.



Fonte: Autor

Tabela 8. Dados de diferentes temperaturas das amostras analisadas

Amostra	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_m$ (°C)
PLLA	62	105	180
PLLA/5%CET	55	112	178
PLLA/10%CET	51	128	176
PLLA/15%CET	41	110	170

Fonte: Autor

OLIVEIRA; YOSHIDA; LIMA GOMES (2011) alega que uma interação entre o fármaco e o excipiente pode ser visualizada na curva de DSC como uma mudança no ponto de fusão, na forma, na área de picos, no aparecimento de uma transição, aparecimento ou desaparecimento de picos. Devido a isso, nota-se que a incorporação de CET na matriz polimérica de PLLA promove a diminuição das

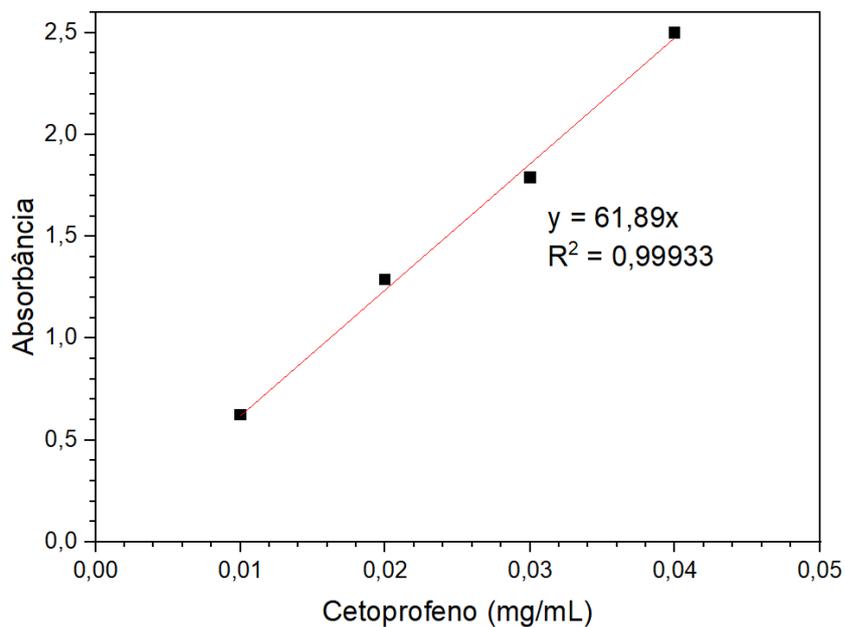
temperaturas de  $T_g$  e de  $T_m$ , o que evidencia a ocorrência de uma interação entre o fármaco e o polímero.

Segundo Champeau et al. (2015), a diminuição de  $T_g$  das membranas de PLLA incorporadas com CET ocorre pelo efeito plastificante do fármaco. De acordo com Champeau et al. (2020), a excelente afinidade química entre o polímero e o fármaco permite ao CET plastificar o PLLA, o que facilita a difusão de moléculas de CET na matriz polimérica de PLLA.

#### **4.8 Ensaio de liberação de fármaco**

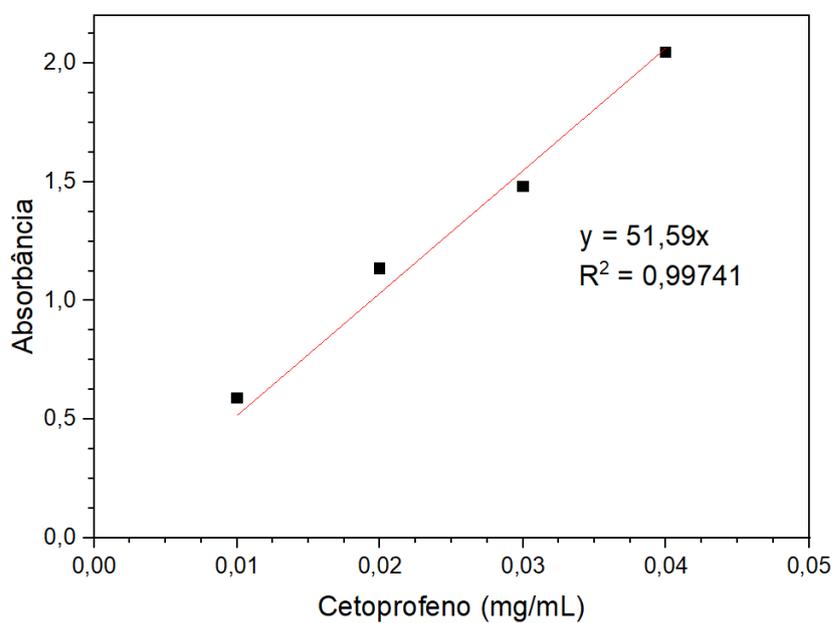
Antes do início do teste de liberação do CET, foi necessário obter a curva de calibração. A curva foi feita através da determinação da absorbância em espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) em 260 nm, conforme já citado anteriormente. Duas curvas de calibração foram obtidas, a Figura 14 representa a curva de calibração empregada na amostra de PLLA/5% de CET e a Figura 15 representa a curva de calibração empregada nas amostras de PLLA com 10 e 15% de CET. Nota-se que as duas curvas mostram uma relação linear da concentração do CET com a absorbância.

Figura 15. Curva de calibração por UV-Vis para o CET em PBS 0,1 M pH 7,4



Fonte: Autor

Figura 16. Curva de calibração por UV-Vis para o CET em PBS 0,1 M pH 7,4

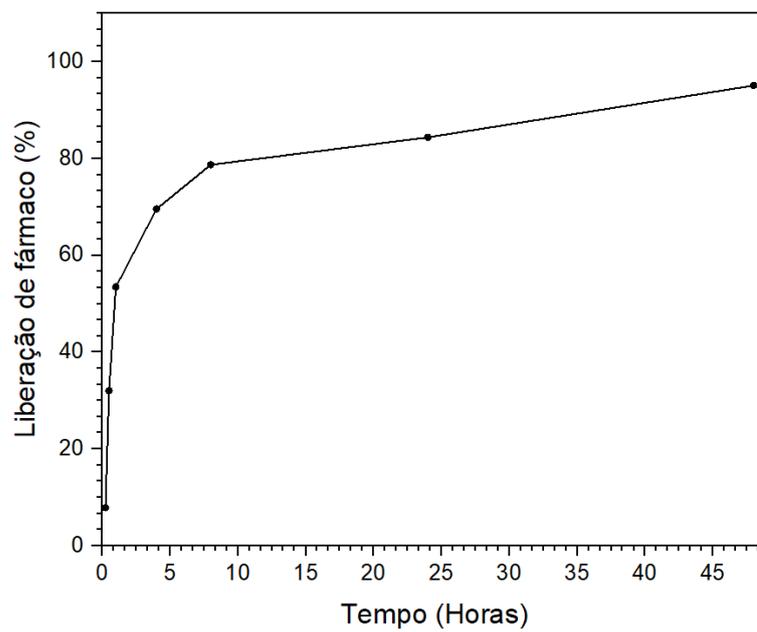


Fonte: Autor

As equações obtidas foram utilizadas para a determinação quantitativa do fármaco, no teste de liberação das membranas produzidas. Os valores de  $R^2$  obtidos são superiores a 0,99 para as duas curvas, o que indica que as equações podem ser utilizadas com confiabilidade no teste de liberação de CET dentro desta faixa de concentração.

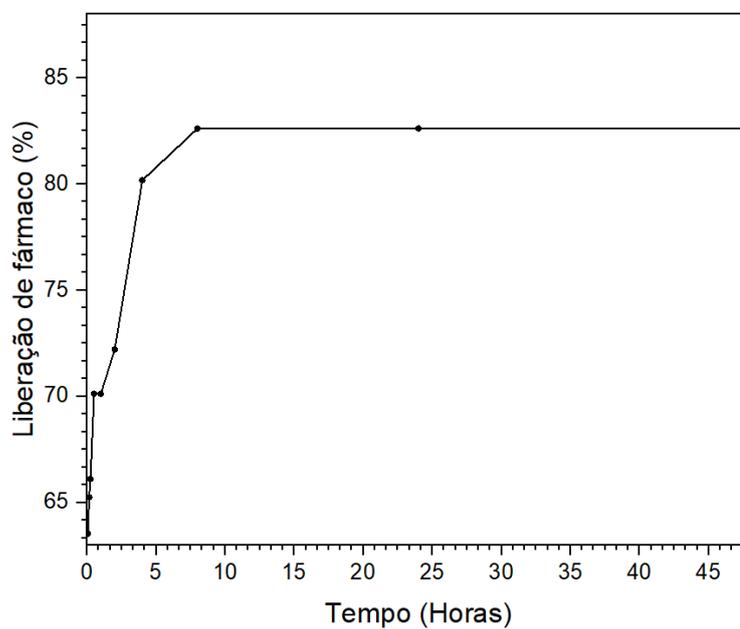
Os resultados do teste de liberação de CET das amostras de PLLA com 5, 10 e 15% de CET estão presentes nas Figuras 16, 17 e 18, respectivamente.

Figura 17. Curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/5% de CET.



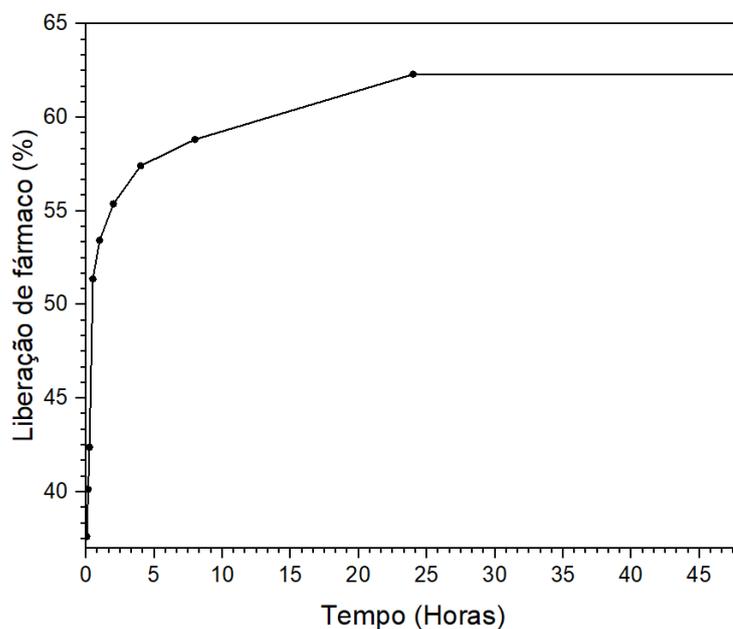
Fonte: Autor

Figura 18. Curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/10% de CET.



Fonte: Autor

Figura 19. Curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/15% de CET.



Fonte: Autor

Na Figura 17, a curva do perfil de liberação da amostra de PLLA/5% de CET é crescente e mostra que 95% do fármaco foi liberado em 48 horas. Além disso, houve uma liberação muito rápida de fármaco no período de 1 hora em que 53% de CET foi liberado.

Na Figura 18, a curva do perfil de liberação da amostra de PLLA/10% de CET mostra que 83% do fármaco foi liberado em 48 horas. Nota-se que não ocorreu liberação de fármaco nos períodos de 0,5 hora a 1 hora e de 8 horas a 48 horas. Além disso, nos demais períodos houve uma liberação rápida do fármaco.

Na Figura 19, a curva do perfil de liberação da amostra de PLLA/15% de CET mostra que 66% do fármaco foi liberado em 48 horas. Nota-se que não ocorreu liberação de fármaco no período de 24 horas a 48 horas. Além disso, ocorreu uma liberação rápida de fármaco até o período de 1 hora em que 57% do CET foi liberado.

Uma ANOVA de medidas repetidas foi realizada de cada amostra para comparar o efeito do tempo sobre a quantidade de droga liberada. Em ambos os casos, não houve uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na quantidade de droga liberada entre pelo menos dois grupos. Um teste t de duas amostras foi realizado para comparar o efeito do acréscimo de CET na matriz polimérica de PLLA na liberação

do fármaco entre as amostras de PLLA/10% CET e PLLA/15% CET. O resultado do teste t foi que a amostra de PLLA/10% CET ( $74 \pm 7$ ) foi capaz de liberar uma maior quantidade de CET do que a amostra de PLLA/15% CET ( $55 \pm 9$ ) em que o valor de p é menor do que 0,001.

A aplicação de modelos matemáticos nos sistemas de liberação controlada in vitro é fundamental para compreender as informações relativas aos mecanismos de cinética de liberação de CET pela matriz polimérica de PLLA. Desse modo, cinco modelos matemáticos diferentes foram empregados para a análise de liberação de fármaco.

O método dos mínimos quadrados foi empregado utilizando a ferramenta Solver do Microsoft Excel para o ajuste de cada modelo proposto. Critérios de aceitação do modelo, tais como o coeficiente de regressão ( $R^2$ ), erro quadrático médio da raiz (RMSE). Adicionalmente, o valor do Critério de Informação Akaike ajustado (AICc) e do Critério de Informação Bayesiana (BIC) foi calculado para cada um dos ajustes (HEREDIA et al., 2022).

Os resultados dos testes estatísticos feitos para verificar qual modelo matemático mais adequado para analisar a cinética de liberação de CET estão nas Tabelas 9, 10 e 11. O critério usado na escolha do melhor modelo matemático foi a partir dos valores obtidos dos testes AICc e BIC (HEREDIA et al., 2022).

Tabela 9. Testes estatísticos para verificar a adequação de diferentes modelos matemáticos a curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/5% de CET.

Equações	SSE	$R^2$	RMSE	AICc	BIC
$Q_t = Q_0 + k_0 \times t$	2772,21	1,00	19,90	75,74	67,57
$Q_t = Q_0 \times \exp(k_1 \times t)$	3102,94	0,99	21,05	76,52	68,36
$Q_t = k_H \times t^{0,5}$	4412,71	0,95	740,19	71,99	68,88
$Q_t = k_{kp} \times t^n$	977,94	0,84	11,82	68,44	60,28
$Q_t = k_d \times t^m + k_r \times t^{2m}$	69,18	0,49	3,14	63,90	43,68

Fonte: Autor

Tabela 10. Testes estatísticos para verificar a adequação de diferentes modelos matemáticos a curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/10% de CET.

Equações	SSE	R <sup>2</sup>	RMSE	AICc	BIC
$Q_t = Q_0 + k_0 \times t$	310,33	1,00	5,57	72,73	69,64
$Q_t = Q_0 \times \exp(k_1 \times t)$	320,12	1,00	5,66	73,04	69,95
$Q_t = k_H \times t^{0,5}$	23837,92	0,94	2564,06	111,86	110,75
$Q_t = k_{kp} \times t^n$	45,30	0,66	2,13	53,48	50,39
$Q_t = k_d \times t^m + k_r \times t^{2m}$	39,56	0,58	1,99	58,13	51,34

Fonte: Autor

Tabela 11. Testes estatísticos para verificar a adequação de diferentes modelos matemáticos a curva de liberação de fármaco da amostra de PLLA/15% de CET.

Equações	SSE	R <sup>2</sup>	RMSE	AICc	BIC
$Q_t = Q_0 + k_0 \times t$	546,37	1,00	7,39	78,39	75,29
$Q_t = Q_0 \times \exp(k_1 \times t)$	563,13	1,00	7,50	78,69	75,60
$Q_t = k_H \times t^{0,5}$	12286,13	0,94	1306,20	105,23	104,12
$Q_t = k_{kp} \times t^n$	112,27	0,68	3,35	62,56	59,47
$Q_t = k_d \times t^m + k_r \times t^{2m}$	28,43	0,38	1,69	54,81	48,02

Fonte: Autor

Para o perfil de liberação da amostra de PLLA com 5% de CET, o modelo de Peppas-Sahlin é o que mais adequado por apresentar os menores valor de AICc e BIC. No entanto, o melhor ajuste desse modelo apresenta um valor negativo para o parâmetro  $m$ , o que viola as condições para o emprego desse modelo na identificação do mecanismo de liberação do fármaco dessa amostra.

Devido a isso, o modelo de Korsmeyer-Peppas é o mais adequado ao perfil de liberação da amostra de PLLA/5% de CET. Além disso, o modelo mais adequado ao perfil de liberação da amostra de PLLA/10% de CET é o Korsmeyer-Peppas enquanto

o modelo Peppas-Sahlin é o mais adequado ao perfil de liberação da amostra de PLLA/15% de CET. Os valores dos parâmetros obtidos na regressão dos modelos escolhidos estão na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros obtidos pela regressão do modelo matemático escolhido.

Amostra	Equação	Parâmetros
PLLA com 5% de CET	$Q_t = k_{kp} \times t^n$	$k_{kp} = 42,60$ $n = 0,23$
PLLA com 10% de CET	$Q_t = k_{kp} \times t^n$	$k_{kp} = 72,99$ $n = 0,05$
PLLA com 15% de CET	$Q_t = k_d \times t^m + k_r \times t^{2m}$	$k_d = 78,75$ $k_r = -23,27$ $m = 0,17$

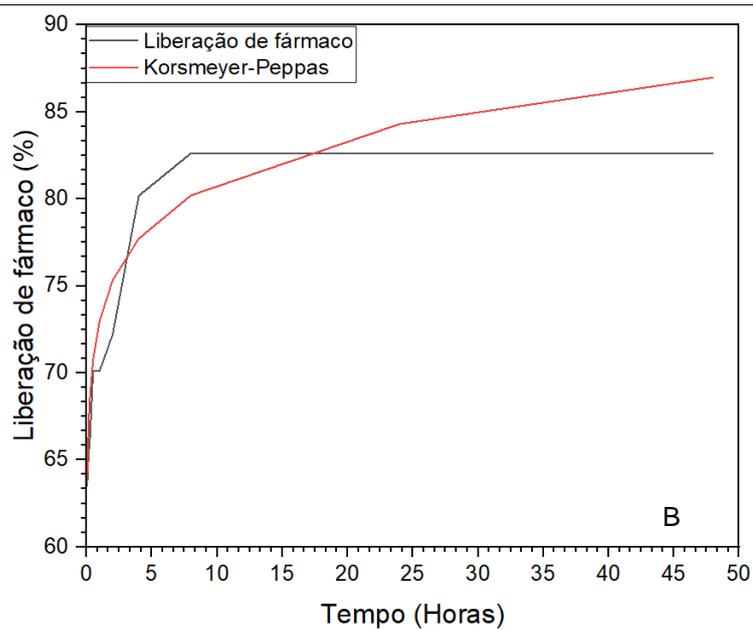
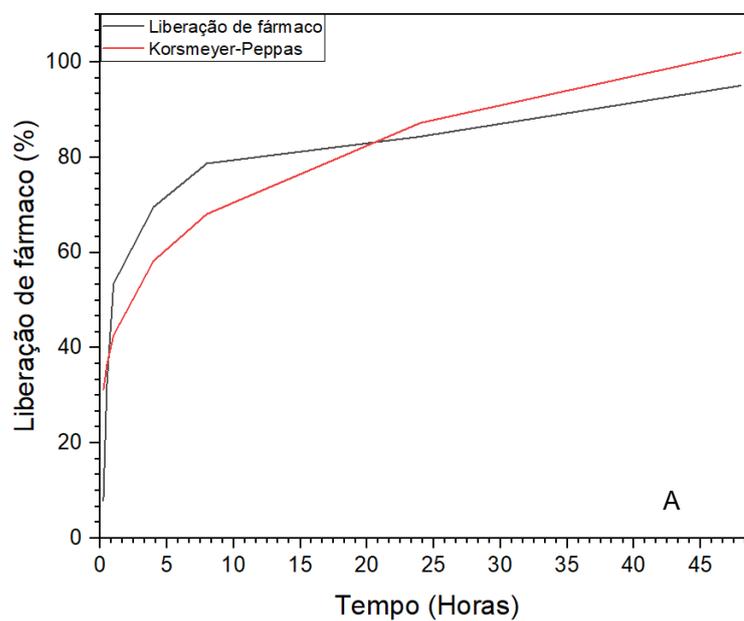
Fonte: Autor

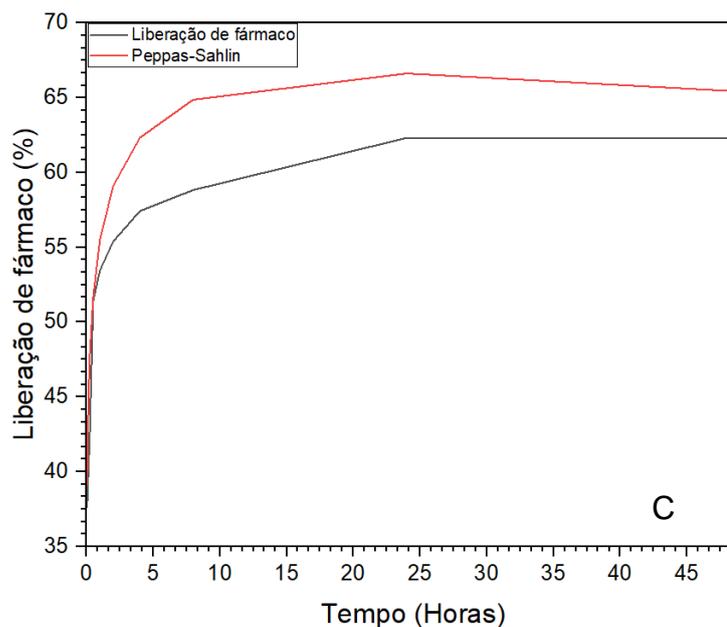
O valor de n obtido pelo ajuste do modelo Korsmeyer-Peppas aos perfis de liberação das amostras de PLLA com 5 e 10% de CET são menores do 0,45 e de acordo com Verano Naranjo et al. (2021), a liberação do fármaco ocorreu pelo mecanismo de difusão de Fick.

O modelo de Peppas-Sahlin evidencia o perfil anômalo de liberação do fármaco da amostra de PLLA/15% de CET. Devido a isso, a difusão de Fick e a degradação do polímero regem o processo de liberação de fármaco dessa amostra.

A Figura 20 contém os gráficos com as curvas dos modelos escolhidos das três amostras.

Figura 20. Gráficos contendo a curva experimental e a curva do modelo matemático de cada amostra obtida com os valores dos parâmetros contidos na Tabela 12. A) Amostra de PLLA com 5% de CET, B) Amostra de PLLA com 10% de CET e C) . Amostra de PLLA com 15% de CET





Fonte: Autor

O perfil de liberação pode ser influenciado pela capacidade da matriz polimérica em incorporar o CET. No estudo de CHAMPEAU et al. (2020), as amostras que apresentaram somente a liberação regida pelo mecanismo de difusão de Fick foram as que obtiveram a maior incorporação de CET enquanto as amostras que apresentaram a menor incorporação foram as que tiveram o perfil anômalo de liberação.

Nesse sentido, as amostras de PLLA com 5 e 10% de CET provavelmente obtiveram uma maior incorporação de fármaco do que a amostra de PLLA/15% de CET por apresentarem um perfil de liberação regido somente pelo mecanismo de difusão de Fick.

#### 4.9 Ensaio biológico

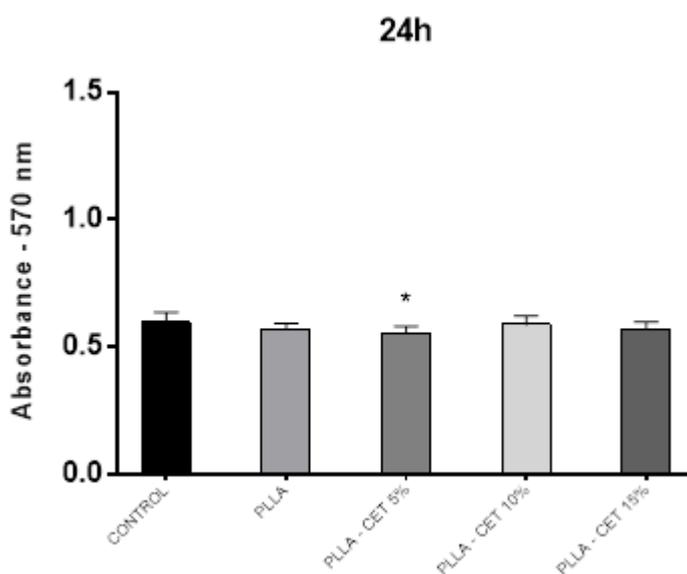
O contato entre as fibras produzidas e uma linhagem celular do pré-osteoblasto de rato (MC3T3-E1) foi avaliada em relação a viabilidade celular.

A citotoxicidade do material é um importante fator a ser avaliado já que no processo de rotofiação envolve o emprego de solvente e somado a isso, o material libera um fármaco o que pode ser um fator que comprometa a viabilidade celular. Portanto, para verificar se as fibras de PLLA com diferentes concentrações de CET

apresentam alguma toxicidade, a viabilidade de células MC3T3-E1 foi avaliada usando ensaio de MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) por 24, 48 e 72 horas.

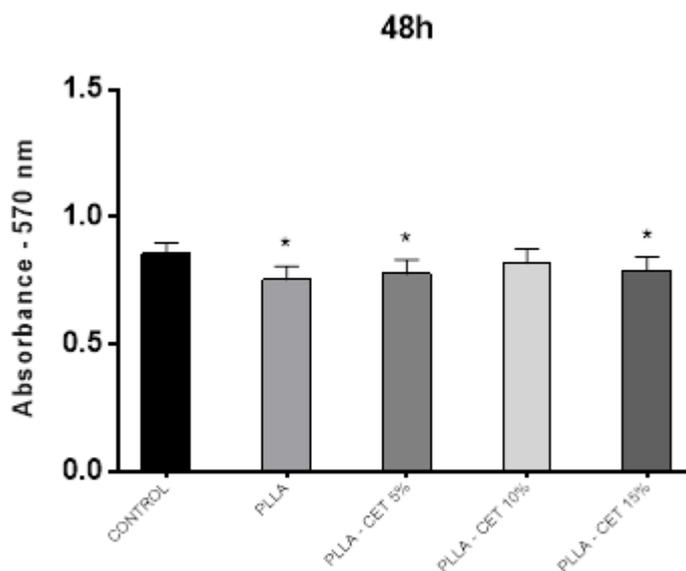
As Figuras 21, 22 e 23 contêm gráficos que apresentam perfis de viabilidade celular no período de 24, 48 e 72 horas. As diferenças estatisticamente significativas entre o material das fibras comparado com o controle negativo foram indicadas por \* ( $p < 0.05$ ).

Figura 21. O perfil de atividade celular de MC3T3-E1 após 24 horas foi realizado utilizando o ensaio de brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT).



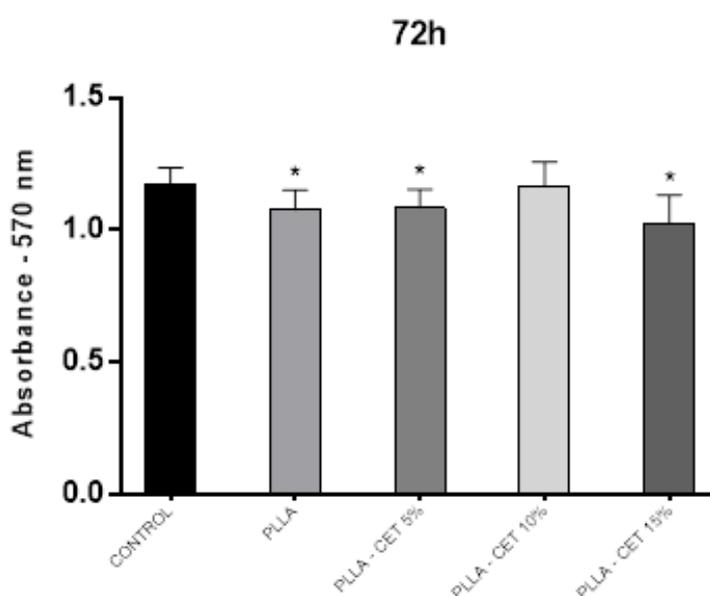
Após 24 horas de contato das membranas com o MTT, observa-se que as amostras de PLLA/10% de CET e PLLA/15% CET acompanharam a viabilidade do controle (células) e do PLLA puro. A membrana de PLLA/5% de CET, por sua vez, apresentou diferença significativa na viabilidade, tendo absorvância reduzida.

Figura 22. O perfil de atividade celular de MC3T3-E1 após 48 horas foi realizado utilizando o ensaio de brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT).



Após 48 horas de contato das membranas com o MTT, observa-se que a amostra de PLLA/10% de CET acompanhou a viabilidade do controle (células). Por sua vez, as membranas de PLLA, PLLA/5% de CET, e PLLA/15% de CET apresentaram diferença significativa na viabilidade, tendo absorvância reduzida.

Figura 23. O perfil de atividade celular de MC3T3-E1 após 72 horas foi realizado utilizando o ensaio de brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT).



Após 72 horas de contato das membranas com o MTT, observa-se que a amostra de PLLA/10% de CET acompanhou a viabilidade do controle (células). Por sua vez, as membranas de PLLA, PLLA/5% de CET, e PLLA/15% de CET acompanharam o perfil de 48 h, e apresentaram diferença significativa na viabilidade, tendo absorvência reduzida.

De acordo com os resultados obtidos para 24, 48 e 72h, e a partir dos três gráficos, nota-se que a membrana contendo PLLA/10% de CET teve uma proliferação celular maior do que as demais fibras testadas, resultado que a destaca das demais membranas.

## 5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foi estudada a viabilidade do emprego da membrana rotofiada de PLLA incorporado com CET para a regeneração do tecido ósseo. Ao todo, foram produzidos três tipos de membranas incorporadas com diferentes concentrações do fármaco CET. De acordo com os resultados obtidos, as fibras de PLLA com 5, 10 e 15% de CET apresentaram vantagens e desvantagens para o emprego na engenharia tecidual.

De acordo com os resultados de viscosidade, a elevação da concentração de CET na matriz polimérica de PLLA provoca o aumento da viscosidade da solução. Nota-se que a viscosidade aumenta consideravelmente em concentrações superiores a concentração crítica.

As membranas foram processadas por rotofiação e observou-se a presença de fibras homogêneas, sem a presença de beads. Os resultados de molhabilidade indicaram que o aumento na concentração de CET torna a membrana hidrofóbica.

A análise química indicou a presença dos grupos funcionais do PLLA e do CET, e a análise de cristalinidade indicou que o PLLA é semicristalino e mostrou os picos característicos da cristalinidade do CET nas membranas.

Para o emprego como scaffold para o auxílio na regeneração óssea, as fibras de PLLA com 5, 10 e 15% de CET apresentaram estabilidade térmica na temperatura do corpo humano, ou seja, o processo de perda de massa não irá ocorrer por degradação térmica. Além disso, o efeito plastificante do CET foi verificado por DSC.

Para o emprego como um sistema de liberação de fármaco, as fibras de PLLA com 5, 10 e 15% de CET apresentaram um perfil de liberação característico, ou seja, grande quantidade de fármaco liberada em um curto período e a seguir uma liberação lenta do conteúdo restante da matriz polimérica. Foram aplicados cinco modelos matemáticos aos dados experimentais de liberação das amostras sendo que o mecanismo predominante de liberação das membranas de PLLA/5% de CET e PLLA/10% de CET foram a difusão de Fick, e para a membrana de PLLA/15% de CET tanto a difusão de Fick como a degradação do polímero foram os mecanismos que atuaram na liberação do fármaco dessa membrana.

A membrana contendo PLLA com 10% de CET foi que apresentou o melhor resultado de viabilidade celular o que a torna candidata para o emprego como scaffold para o auxílio na regeneração óssea.

Em resumo, as membranas de PLLA incorporadas com CET foram processadas por rotofiação, o pré-processamento foi estudado, obtendo-se membranas que foram caracterizadas e demonstraram propriedades adequadas para uso na engenharia de tecidos, como possíveis candidatas para serem aplicadas em reparos ósseos.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em um novo estudo, os testes de ensaio mecânico, perda de massa e absorção hídrica necessitam ser realizados para complementar os resultados apresentados neste estudo. Além disso, o novo estudo pode apresentar como objetivo encontrar os parâmetros de fabricação de membranas por rotofiação que mais se adequem a regeneração óssea empregando a metodologia de superfície de resposta.

A metodologia de superfície de resposta é uma das metodologias que podem ser empregadas para auxiliar na obtenção dos melhores parâmetros de produção de membranas de PLLA incorporadas de cetoprofeno. Uma das vantagens dessa metodologia está no fato de ela ser capaz de realizar o planejamento de experimentos para encontrar os melhores parâmetros de maneira a minimizar o número total de experimentos a serem realizados.

O planejamento de experimentos ocorre a partir dos conhecimentos obtidos dos resultados dos testes das três membranas produzidas que ajudaram a compreender o efeito da adição de diferentes concentrações de cetoprofeno na matriz polimérica de PLLA. Determinar a melhor concentração de polímero, melhor concentração de fármaco, melhor concentração de solvente e melhor velocidade de rotofiação são alguns exemplos de parâmetros a serem testados para se obter uma membrana adequada para a regeneração óssea.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-TAHAMI, K. Preparation, characterization, and in vitro release of ketoprofen loaded alginate microspheres. **Article in International Journal of Applied Pharmaceutics**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/269261131>>.
- AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.
- BARBOSA, K. A. et al. Rotary jet-spun curcumin-loaded poly L-lactic acid membranes for wound-healing applications. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 18, p. 3273–3282, maio 2022.
- BIANCO, P. et al. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. **STEM CELLS**, v. 19, n. 3, p. 180–192, maio 2001.
- BISHT, B. et al. Advances in the Fabrication of Scaffold and 3D Printing of Biomimetic Bone Graft. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 49, n. 4, p. 1128–1150, 5 abr. 2021.
- BLAIR, H. C.; SUN, L.; KOHANSKI, R. A. Balanced Regulation of Proliferation, Growth, Differentiation, and Degradation in Skeletal Cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1116, n. 1, p. 165–173, 1 nov. 2007.
- BOUET, G. et al. In Vitro Three-Dimensional Bone Tissue Models: From Cells to Controlled and Dynamic Environment. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 21, n. 1, p. 133–156, fev. 2015.
- CAPUANA, E. et al. Poly-L-Lactic Acid (PLLA)-Based Biomaterials for Regenerative Medicine: A Review on Processing and Applications. **Polymers**, v. 14, n. 6, p. 1153, 14 mar. 2022.
- CASTAGNETTI, C.; MARIELLA, J. Anti-inflammatory Drugs in Equine Neonatal Medicine. Part I: Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 6, p. 475–480, jun. 2015.
- CHAMPEAU, M. et al. Drug Loading of Sutures by Supercritical CO<sub>2</sub> Impregnation: Effect of Polymer/Drug Interactions and Thermal Transitions. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 300, n. 6, p. 596–610, jun. 2015.
- CHAMPEAU, M. et al. Tuning the release profile of ketoprofen from poly (L-lactic acid) suture using supercritical CO<sub>2</sub> impregnation process. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, n. August 2019, p. 101468, fev. 2020.
- CHEN, B.-Q. et al. Investigation of silk fibroin nanoparticle-decorated poly (L-lactic acid) composite scaffolds for osteoblast growth and differentiation. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 1877–1890, 8 mar. 2017.
- CHEN, Y. et al. In vitro behavior of osteoblast-like cells on PLLA films with a biomimetic apatite or apatite/collagen composite coating. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 6, 2008.
- CIAPETTI, G. et al. Enhancing osteoconduction of PLLA-based nanocomposite scaffolds for bone regeneration using different biomimetic signals to MSCs. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 2, p. 2439–2458, 22 fev. 2012.
- CRUZ, F. Fabrication of HA/PLLA Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Using Additive Manufacturing Technologies. Em: **Biopolymers**. [s.l.] Sciyo, 2010.

ELSAIED FATHY, M. et al. Preparation and Evaluation of Ketoprofen-loaded Calcium alginate beads. **Article in International Journal of PharmTech Research**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/270106258>>.

FREITAS, Emanuelle Dantas de. **Desenvolvimento de partículas a partir da blenda de sericina e alginato para incorporação e liberação modificada de anti-inflamatórios cetoprofeno e naproxeno**. 2021. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, [S. l.], 2020. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/359268>. Acesso em: 5 jul. 2022.

FU, Y. et al. ECM Decorated Electrospun Nanofiber for Improving Bone Tissue Regeneration. **Polymers**, v. 10, n. 3, p. 272, 6 mar. 2018.

GABOR, F. Ketoprofen-poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: influence of manufacturing parameters and type of polymer on the release characteristics. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 29 jan. 1999.

HEREDIA, N. S. et al. Comparative statistical analysis of the release kinetics models for nanoprecipitated drug delivery systems based on poly (lactic-co-glycolic acid). **PLOS ONE**, v. 17, n. 3, p. e0264825, 10 mar. 2022.

HERNANDEZ, C. **Desenvolvimento e avaliação in vitro de matrizes de cetoprofeno para liberação prolongada**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 7 out. 2004.

HOUGHTON, G. W. et al. Comparative pharmacokinetics of ketoprofen derived from single oral doses of ketoprofen capsules or a novel sustained-release pellet formulation. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 5, n. 3, 1984.

HUANG, Q. et al. Comparing the regeneration potential between PLLA/Aragonite and PLLA/Vaterite pearl composite scaffolds in rabbit radius segmental bone defects. **Bioactive Materials**, v. 5, n. 4, p. 980–989, dez. 2020.

IKUMI, R. et al. Guided bone regeneration using a hydrophilic membrane made of unsintered hydroxyapatite and poly (L-lactic acid) in a rat bone-defect model. **Dental Materials Journal**, v. 37, n. 6, p. 912–918, 27 nov. 2018.

JAISWAL, A. K. et al. Bone Healing Evaluation of Nanofibrous Composite Scaffolds in Rat Calvarial Defects: A Comparative Study. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 12, p. 2073–2085, 1 dez. 2013.

KANTOR, T. G. Ketoprofen: A Review of Its Pharmacologic and Clinical Properties. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 6, n. 3, p. 93–102, 6 maio 1986.

KARIMI, S.; GHASEMI, I.; ABBASSI-SOURKI, F. A study on the crystallization kinetics of PLLA in the presence of Graphene Oxide and PEG-grafted-Graphene Oxide: Effects on the nucleation and chain mobility. **Composites Part B: Engineering**, v. 158, p. 302–310, 1 fev. 2019.

KAUR, M. et al. Current Nanotechnological Strategies for Effective Delivery of Bioactive Drug Molecules in the Treatment of Tuberculosis. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 31, n. 1, p. 49–88, 2014.

KOBAYASHI, Y. et al. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. **Journal of Biochemistry**, v. 159, n. 4, p. 387–392, 1 abr. 2016.

- LI, T. et al. Fabrication, mechanical property and in vitro evaluation of poly (L-lactic acid-co- $\epsilon$ -caprolactone) core-shell nanofiber scaffold for tissue engineering. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 98, 2019.
- LLORENS, E.; DEL VALLE, L. J.; PUIGGALÍ, J. Electrospun scaffolds of polylactide with a different enantiomeric content and loaded with anti-inflammatory and antibacterial drugs. **Macromolecular Research**, v. 23, n. 7, p. 636–648, 30 jul. 2015.
- LLORENS, E.; DEL VALLE, L. J.; PUIGGALÍ, J. Multifunctional ternary drug-loaded electrospun scaffolds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 8, p. n/a-n/a, 20 fev. 2016.
- MOHAMED EL-HADI, A.; ALAMRI, H. The New Generation from Biomembrane with Green Technologies for Wastewater Treatment. **Polymers**, v. 10, n. 10, p. 1174, 22 out. 2018.
- MOREIRA, K. et al. Comprimidos contendo microesferas de cetoprofeno como sistema de liberação bifásica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, 2012.
- MORIE, A. et al. Nanofibers as novel drug carrier – An overview. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 135–143, 2 jan. 2016.
- MORLEY, K. D. et al. A comparative trial of a controlled-release formulation of ketoprofen ('Oruvail') and a conventional capsule formulation of ketoprofen ('Orudis') in patients with osteoarthritis of the hip. **Current Medical Research and Opinion**, v. 9, n. 1, p. 28–34, 11 jan. 1984.
- NIE, W. et al. Electrospun zein-PVP fibre composite and its potential medical application. **Materials Research Innovations**, v. 16, n. 1, 2012.
- OGBOMO, S. M. et al. Benefits of low kenaf loading in biobased composites of poly(L-lactide) and kenaf fiber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, n. 3, 2009.
- OLIVEIRA, M. A. DE; YOSHIDA, M. I.; LIMA GOMES, E. C. DE. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224–1230, 2011.
- PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, 1989.
- PRABAHARAN, M. et al. Preparation and characterization of poly (L-lactic acid)-chitosan hybrid scaffolds with drug release capability. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 81B, n. 2, p. 427–434, maio 2007.
- RENÇBER, S.; KARAVANA, S. Y.; ÖZYAZICI, M. Bioavailability File: KETOPROFEN. p. 203–216, 2009.
- RICCI, M. et al. Ketoprofen controlled release from composite microcapsules for cell encapsulation: Effect on post-transplant acute inflammation. **Journal of Controlled Release**, v. 107, n. 3, p. 395–407, out. 2005.
- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23–36, jun. 1987.
- ROSETI, L. et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 78, p. 1246–1262, 1 set. 2017.
- SADEGHI-AVALSHAHR, A. R. et al. Physical and mechanical characterization of PLLA interference screws produced by two stage injection molding method. **Progress in Biomaterials**, v. 5, n. 3–4, 2016.

- SHARMA, S. et al. **Biomaterials in tooth tissue engineering: A review.** *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2014.
- SHIKINAMI, Y.; MATSUSUE, Y.; NAKAMURA, T. The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly l-lactide (F-u-HA/PLLA). *Biomaterials*, v. 26, n. 27, 2005.
- SHIVALKAR, S.; SINGH, S. Solid Freeform Techniques Application in Bone Tissue Engineering for Scaffold Fabrication. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 14, n. 3, p. 187–200, 28 jun. 2017.
- SHRIVATS, A. R. et al. Bone Regeneration. In: **Principles of Tissue Engineering.** Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 1201–1221.
- TIȚA, B. et al. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 56, n. 2, p. 221–227, set. 2011.
- VERANO NARANJO, L. et al. Supercritical Impregnation of Ketoprofen into Polylactic Acid for Biomedical Application: Analysis and Modeling of the Release Kinetic. *Polymers*, v. 13, n. 12, p. 1982, 17 jun. 2021.
- VUČEN, S. R. et al. Improved percutaneous delivery of ketoprofen using combined application of nanocarriers and silicon microneedles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 10, p. 1451–1462, out. 2013.
- WANG, S. H.; LIANG, Z. H.; ZENG, S. Monitoring release of ketoprofen enantiomers from biodegradable poly (d, l-lactide-co-glycolide) injectable implants. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 337, n. 1–2, p. 102–108, jun. 2007.
- WANG, H.-L.; KIYONOBU, K.; NEIVA, R. F. Socket Augmentation: Rationale and Technique. *Implant Dentistry*, v. 13, n. 4, p. 286–296, dez. 2004.
- WENG, W. et al. A Comparative Study of Bioartificial Bone Tissue Poly-L-lactic Acid/Polycaprolactone and PLLA Scaffolds Applied in Bone Regeneration. *Journal of Nanomaterials*, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- WONGRAKPANICH, S. et al. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging and disease*, v. 9, n. 1, p. 143, 2018.
- ZAN, J. et al. Dilemma and breakthrough of biodegradable poly-l-lactic acid in bone tissue repair. *Journal of Materials Research and Technology*, v. 17, p. 2369–2387, mar. 2022.
- ZENG, R. C. et al. In Vitro Corrosion and Cytocompatibility of a Microarc Oxidation Coating and Poly (l-lactic acid) Composite Coating on Mg-1Li-1Ca Alloy for Orthopedic Implants. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 8, n. 15, 2016.
- ZHANG, W. et al. Cell-Derived Extracellular Matrix: Basic Characteristics and Current Applications in Orthopedic Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 22, n. 3, p. 193–207, 1 jun. 2016.
- ZHIMING, Z. et al. Research on modeling, simulation and experiment based on centrifugal spinning method. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering*, v. 40, n. 10, p. 488, 21 out. 2018.