

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ**

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS EM  
SCAFFOLDS ELETROFIADOS DE  
POLICAPROLACTONA (PCL) E PIPERINA (PIP) NA  
ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA.**

**SAMARA RAQUEL PEREIRA OLIVEIRA**

**ORIENTADOR(A): PROF. DR. GUSTAVO OLIVEIRA DE MEIRA  
GUSMÃO**

**CO-ORIENTADOR(A): PROF. DR. ANDERSON DE OLIVEIRA LOBO**

Teresina – PI  
2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ**

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS EM  
SCAFFOLDS ELETROFIADOS DE  
POLICAPROLACTONA (PCL) E PIPERINA (PIP) NA  
ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA.**

**SAMARA RAQUEL PEREIRA OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química de Materiais

Orientador(a): Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão.

Teresina – PI

2022

O481	Oliveira, Samara Raquel Pereira. Liberação controlada de fármacos em scaffolds eletrofiados de Policaprolactona (PCL) e Piperina (PIP) na engenharia tecidual óssea /Samara Raquel Pereira Oliveira. - 2022. 60 f.
	Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Piauí – UESPI, Programa de Pós- Graduação em Química - PPGQ, Mestrado em Química, <i>Campus Poeta Torquato Neto, Teresina - PI, 2022.</i> “Área de concentração: Química de Materiais.” “Orientador: Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão.”

Ficha elaborada pelo Serviço de Catalogação da Universidade Estadual do Piauí – UESPI  
Ana Angélica  
P. Teixeira (Bibliotecária) CRB 3ª/1217

**Liberação Controlada de Fármacos em Scaffolds eletrofiados de  
Policaprolactona (PCL) e Piperina (PIP) na Engenharia Tecidual Óssea.**

**SAMARA RAQUEL PEREIRA OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química de Materiais.

Aprovado em 15 de junho de 2022.

Membros da Banca:

---

Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão  
(Presidente da Banca – UESPI)

---

Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho  
(Membro Titular – UESPI)

---

Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo  
(Membro Titular – UFPI)

---

Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto  
(Membro Suplente – UFPI)

Teresina – PI

2022

*Dedico à meu avô Pedro Marcelino de Oliveira, pela sua simplicidade e amor (in memorian), meus pais, financiadores desse sonho, e a meu esposo, João Gamaliel Fialho pela compreensão e apoio nessa trajetória.*

## AGRADECIMENTOS

---

- ❖ A Deus, por sua infinita Graça e Poder que permitiu-me sonhar e ter acesso ao programa de Pós-graduação.
- ❖ As minhas companheiras de Laboratório Keylla Batista e Gabrielly Gonçalves Lima que estiveram desde o início nesta pesquisa e ao incentivo inestimável durante esta jornada.
- ❖ A Marleane pela sua contribuição técnica no tratamento de dados raman.
- ❖ Aos professores Eroni Santos, Bartolomeu Viana pelo auxílio nas caracterizações realizadas. Ao professor Antônio Luiz Maia Filho e ao seu Aluno de pós-graduação Daniel nas análises in vivo. E, a professora Lucielma pela contribuição na discussão e obtenção de dados para a análise histológica.
- ❖ Aos Alunos do Doutorado da Universidade Federal do Piauí: Moisés e André pelo conhecimento compartilhado e sua prestatividade. Além dos demais alunos, que de forma indireta contribuíram para a conclusão deste trabalho.
- ❖ Aos orientadores da pesquisa, Anderson de Oliveira Lobo e Gustavo Oliveira de Meira Gusmão, idealizadores do tema proposto neste trabalho, e que mesmo em condições precárias de desenvolvimento da pesquisa devido a situação de Pandemia desenvolveram outras formas de conseguir lograr êxito e dar continuidade ao trabalho.
- ❖ A Universidade Federal do Piauí da qual obtive acesso ao Laboratório de Materiais Avançados (LIMAV), local de trabalho da pesquisa
- ❖ A Universidade Estadual do Piauí ao acesso no Núcleo de Biotecnologia e Diversidade, no qual tive oportunidade de compartilhamento de informações e desenvolvimento acadêmico em pesquisa com animais.
- ❖ A FAPEPI que como órgão de fomento à pesquisa no Piauí, concedeu a bolsa e possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

*Bendize, ó minha alma, ao SENHOR, e tudo o que há em mim bendiga o seu santo nome. Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e não te esqueças de nenhum de seus benefícios”*  
*(Salmos 103:1,2-Bíblia Sagrada)*

## **RESUMO**

**OLIVEIRA, S.R.P. Liberação controlada de fármacos em scaffolds eletrofiados de Policaprolactona (PCL) e Piperina (PIP) na engenharia tecidual óssea.** 2022. 58 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

Scaffolds poliméricos com fármacos têm sido intensivamente estudados no campo da cirurgia ortopédica devido à capacidade de libertarem o fármaco de uma forma controlada e direcionada no local desejado. Nesse contexto, a eletrofiação é uma técnica promissora para produzir scaffolds utilizando polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. No presente estudo, scaffolds de Policaprolactona (PCL) com Piperina (PIP) incorporada em diferentes concentrações (1, 3 e 5%) foram obtidos por eletrofiação. Os grupos eletrofiados PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5% foram analisados por espectroscopia UV-Vís para identificação do fármaco incorporado e avaliar a liberação controlada do mesmo. Além disso, o reparo ósseo foi verificado por espectroscopia raman através de dados de vibração  $\nu_1$ PO43- obtidos por análise in vivo. A morfologia e o diâmetro das nanofibras foram obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os scaffolds PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3%, PCL/PIP 5%, apresentaram diâmetros  $0,0015 \pm 0,002 \mu\text{m}$ ,  $1,08 \pm 0,007 \mu\text{m}$ ,  $1,09 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ,  $0,59 \pm 0,016 \mu\text{m}$ , respectivamente. A liberação de piperina foi pronunciada após 15 dias. Portanto, aos 30 dias, o scaffold PCL/PIP 1% liberou  $64\% \pm 0,00062$ , enquanto os scaffolds PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5% liberaram apenas  $16,06 \pm 0,00012$  e  $9,08\% \pm 0,00031$ , respectivamente. A espectroscopia Raman, por meio de análise estatística, mostrou a ênfase de reparo ósseo significativo no grupo PCL/PIP1% aos 15 dias em relação ao PCL/PIP 3% e 5%, conforme previsto na liberação sustentada desses scaffolds. No entanto, aos 30 dias, os dados estatísticos mostraram um padrão de reparação óssea entre os grupos.

**Palavras-chave:** Eletrofiação, Policaprolactona, Piperina, liberação controlada, reparação óssea.

## ABSTRACT

Polymeric drug scaffolds have been intensively studied in the field of orthopedic surgery due to their ability to release the drug in a controlled and targeted manner at the desired location. In this context, electrospinning is a promising technique to produce scaffolds using biodegradable and biocompatible polymers. In the present study, scaffolds of Polycaprolactone (PCL) with Piperine (PIP) incorporated at different concentrations (1, 3 and 5%) were obtained by electrospinning. The electrospun groups PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3% and PCL/PIP 5% were analyzed by UV-vis spectroscopy to identify the incorporated drug and evaluate its controlled release. In addition, bone repair was verified by Raman spectroscopy using  $\nu_1\text{PO}_4\text{3}$ -vibration data obtained by in vivo analysis. The morphology and diameter of the nanofibers were obtained by scanning electron microscopy (SEM). The scaffolds PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3%, PCL/PIP 5%, showed diameters  $0.0015 \pm 0.002 \mu\text{m}$ ,  $1.08 \pm 0.007 \mu\text{m}$ ,  $1.09 \pm 0.02 \mu\text{m}$ ,  $0.59 \pm 0.016 \mu\text{m}$ , respectively. The release of piperine was pronounced after 15 days. Therefore, at 30 days, the PCL/PIP 1% scaffold released  $64\% \pm 0.00062$ , while the PCL/PIP 3% and PCL/PIP 5% scaffolds released only  $16.06 \pm 0.00012$  and  $9.08\% \pm 0.00031$ , respectively. Raman spectroscopy, by statistical analysis, showed the emphasis of significant bone repair in the PCL/PIP1% group at 15 days compared to PCL/PIP 3% and 5%, as predicted in the sustained release of these scaffolds. However, at 30 days, the statistical data showed a pattern of bone repair between the groups.

**Keywords:** Electrospinning, Polycaprolactone, Piperine, controlled release, bone repair.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Células ósseas atuantes na reparação óssea.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de liberação de um fármaco.....	19
<b>Figura 3.</b> Equipamento da eletrofiação e elementos para sua realização.....	21
<b>Figura 4.</b> Monômero da Policaprolactona.....	24
<b>Figura 5.</b> Polimerização por abertura do anel de ε- caprolactona.....	24
<b>Figura 6.</b> Estrutura molecular da piperina, alcalóide.....	25
<b>Figura 7.</b> Esquema de preparo das soluções poliméricas sob agitação magnética .....	28
<b>Figura 8.</b> Equipamento de eletrofiação e scaffolds de PCL, PCL/PIP1%, PCL/PIP3%, PCL/PIP5% .....	29
<b>Figura 9.</b> Preparação das diluições para obtenção de curva de calibração.....	32
<b>Figura 10.</b> Imagem MEV de PCL e PCL-Piperina: (a) Scaffold de PCL (b) Scaffold de PCL/Piperina1% (c) Scaffold de PCL/Piperina 3% e (d) Scaffold de PCL/Piperina 5% .....	36
<b>Figura 11.</b> Distribuição gaussiana de 400 medidas obtidas no software Image J: (a) Scaffold de PCL (b) Scaffold de PCL-Piperina1% (c) Scaffold de PCL-Piperina 3% e (d) Scaffold de PCL-Piperina 5% .....	38
<b>Figura 12.</b> Espectro FTIR dos scaffolds poliméricos eletrofiados.....	39
<b>Figura 13.</b> Curva de calibração.....	40
<b>Figura 14.</b> Liberação cumulativa da Piperina nos scaffolds PCL/PIP1%, PCL/PIP3% e PCL/PIP 5% no período de 15 e 30 dias de tratamento.....	42
<b>Figura 15.</b> Espectros Raman dos defeitos do tecido ósseo nos grupos: osso cortical; coágulo; PCL; PCL/PIP 1%; PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5%; após (A)15 dias e (B) aos 30 dias do tratamento. Espectros representativos mostrando o v1-PO4 3- pico de vibração (960 cm-1) dos grupos para ambos os períodos.....	44
<b>Figura 16.</b> (A) Área do pico 960cm-1 dos animais tratados com scaffold de PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP3 %, PCL/PIP 5% após 15 dias de tratamento (B) Área do pico 960cm-1 dos animais tratados com scaffold de PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP3 %, PCL/PIP 5% após 30 dias de tratamento.....	46
<b>Figura 17.</b> (A) Score de neoformação óssea dos animais tratados com PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP3%, PCL/PIP5% após 15 dias de tratamento; (B) Score de remodelação óssea dos animais tratados com PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP3%, PCL/PIP5% após 15 dias de tratamento; (C) Score de neoformação óssea dos animais tratados com PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP3%, PCL/PIP5% após 30 dias de tratamento; (D)	

Score de remodelação óssea dos animais tratados com PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP3%, PCL/PIP5% após 30 dias de tratamento. Control- grupo sem tratamento(controle negativo). a=p<0,05 quando comparado ao grupo controle negativo..... 47

**Figura 18.**Análise histológica dos grupos de scaffolds após 15 dias de implantação. (A) coágulo 4X; (B) coágulo 10X; (C) PCL 4X; (D) PCL 10X; (E) PCL/PIP1% 4X; (F) PCL/PIP1% 10X;(G) PCL/PIP3% 4X; (H) PCL/PIP3% 10X; (I) PCL/PIP5%. 4X; (J) PCL/PIP5%.10X..... 48

**Figura 19.**Análise histológica dos grupos de scaffolds após 30 dias de implantação. (A) coágulo 4X; (B) coágulo 10X; (C) PCL 4X; (D) PCL 10X; (E) PCL/PIP1% 4X; (F) PCL/PIP1% 10X ; (G) PCL/PIP3% 4X; (H) PCL/PIP3% 10X; (I) PCL/PIP5%. 4X; (J) PCL/PIP5%. 10X . B- Osso saudável; NB- Osso neoformado..... 49

## **LISTA DE TABELAS**

---

**Tabela 1.** Parâmetros da eletrofiação na síntese dos scaffolds. .... 29

**Tabela 2.** Diâmetro das fibras dos scaffolds de PCL e PCL-Piperina..... 37

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

---

**ETO** - Engenharia Tecidual Óssea.

**PCL** - Policaprolactona.

**PIP** – Piperina.

**PCL/PIP 1%** - Scaffold de Policaprolactona com Piperina 1%.

**PCL/PIP 3%** - Scaffold de Policaprolactona com Piperina 3%.

**PCL/PIP 5%** - Scaffold de Policaprolactona com Piperina 5%.

**SLF** - Sistema de Liberação de Fármaco.

**MEV**- Microscopia Eletrônica de Varredura.

**HFIP** – Hexafluoropropanol.

**PBS** – Phosphate buffer solution (Solução tampão fosfato).

**CHA**- Hidroxiapatita carbonatada.

## SUMÁRIO

---

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 Apresentação .....	13
1.2 Objetivos.....	15
<b>CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>27</b>
2.1 Liberação controlada de fármacos na Engenharia Tecidual Óssea .....	16
2.1.1 Tecido ósseo e a reparação em defeitos ósseos .....	27
2.2 Scaffolds Poliméricos na liberação controlada de fármacos .....	18
2.3 Eletrofiação .....	20
2.3.1 Parâmetros da Eletrofiação.....	22
2.4 Policaprolactona (PCL).....	23
2.5 Piperina.....	25
2.5.1 Aplicações da Piperina.....	25
<b>CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>27</b>
3.1 Materiais utilizados.....	27
3.2 Síntese dos scaffolds nanofibrosos .....	27
3.2.1 Preparação das Soluções Poliméricas.....	28
3.2.2 Eletrofiação das soluções Poliméricas.....	29
3.3 Estudo morfológico dos scaffolfs de PCL e PCL-piperina .....	30
3.4 Espectroscopia FTIR.....	30
3.5 Ensaio de liberação controlada da Piperina.....	31
3.6 Animais.....	32
3.6.1 Aspectos éticos.....	32
3.6.2 Procedimento experimental.....	32
3.7 Análise por espectroscopia raman.....	33
3.8 Análise histopatológica.....	34
3.9 Análise estatística.....	34
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
4.1 Morfologia do scaffolds nanofibrosos de PCL e PCL-piperina .....	35
4.2 Incorporação do fármaco nos scaffolds .....	37
4.3 Análise da liberação controlada da piperina .....	38

4.4 Espectroscopia Raman no defeito ósseo.....	41
4.5. Análise estatística.....	43
4.5.1 Análise raman.....	43
4.5.2. Análise histológica.....	44
<b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Apresentação

As fraturas ósseas, além das óbvias consequências à saúde dos indivíduos, apresentam significativo impacto na saúde pública, tendo em vista os altos índices de mortalidade provocados em acidentes de trânsito [1,2]. O processo de consolidação da fratura é altamente dinâmico e complexo e, atualmente, a maioria dos materiais utilizados em fraturas na cirurgia são implantes metálicos (titânio, aço inoxidável, e ligas metálicas), que podem provocar complicações como infecções, rejeição do implante ao tecido ósseo, e/ou intolerância ao metal [3].

No campo da engenharia tecidual óssea (ETO), novos dispositivos biomédicos são de fundamental relevância para regeneração do tecido ósseo danificado por fraturas, que inviabilizam as funções motoras do organismo [4,5,6]. A aplicação de fármacos em ETO é muito ampla e um campo de pesquisa de interesse relevante. Nos últimos anos, o foco da engenharia de tecidos ósseos é o uso de scaffolds poliméricos carreadores de fármacos para a liberação sustentada, pois é um sistema de entrega para curar o defeito ósseo, além de prevenir infecções recorrentes, que agregam valor aos scaffolds [7].

Os scaffolds são suportes estruturais para fixação e regeneração de tecidos [8], pois apresentam uma estrutura tridimensional que mimetiza a matriz extracelular, permitindo a adesão, migração e proliferação celular que resulta na regeneração do tecido ósseo [8,9]. Neste sentido, várias pesquisas tem demonstrado que a eletrofiação ou electrospinning é um processo viável para fabricar scaffolds com tais propriedades. A incorporação do fármaco nas fibras obtidas por eletrofiação dá-se normalmente em simultâneo com a formação destas, através da simples dissolução ou dispersão do fármaco na solução polimérica submetida ao processo de eletrofiação [10].

Uma das suas principais vantagens é manter os medicamentos em níveis terapêuticos ideais no corpo durante o tratamento. Nesse cenário, os scaffolds poliméricos são ideais para carregamento, pois liberam o fármaco incorporado em uma taxa de liberação desejada durante

todo o tempo da terapia [11]. Além disso, atuam como carreadores de drogas ao incorporar o fármaco e retê-lo até atingir o alvo específico, ser gradualmente degradado, e entregar a droga de forma controlada ao longo do tempo [12,13].

Todos esses critérios são bem atendidos pela policaprolactona (PCL), um biopolímero sintético, semi-cristalino, hidrofóbico e biodegradável, que apresenta propriedades mecânicas flexíveis para o reparo ósseo, pois sua biocompatibilidade [14,15,16,17,18,19] com diversos tipos de fármacos permite a distribuição uniforme da droga [20,21]. Além disso, apresenta alta processabilidade e capacidade de manter sua rigidez estrutural no ambiente fisiológico [22]. Neste contexto, uma diversidade de fármacos incorporados à matriz polimérica de PCL tem recebido especial destaque em aplicações biomédicas [23,24].

A piperina, princípio pungente da pimenta-do-reino, derivada da espécie *Piperacae nigrum*, é um fármaco que possibilita sua incorporação à matriz polimérica para a liberação sustentada do fármaco, como um modelo hidrofóbico [25]. Além disso, em pesquisas recentes, a piperina tem demonstrado possuir propriedades osteoprogenitoras, ao induzir a atividade osteogênica, inibindo a resposta inflamatória no reparo ósseo [26] bem como propiciou a neoformação óssea em modelos animais osteoporóticos [27].

Nos últimos anos, a espectroscopia raman tem apresentado diversas vantagens na sua utilização, pois, além de ser uma técnica não destrutiva, também permite a avaliação da qualidade óssea. Para isto, mede as características das frequências vibracionais dos cristais de hidroxiapatita formados a partir da deposição do íon fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e, pesquisas demonstram que a concordância destas medidas com a análise histológica permite a investigação do reparo ósseo [25,28,29].

Diante da perspectiva científica de incorporação de fármacos à biomateriais poliméricos com propriedades eficazes para o reparo ósseo em fraturas, o presente estudo visou investigar a eficácia dos scaffolds de PCL com piperina através da liberação do fármaco no período de 15 e 30 dias por espectroscopia Uv- vis e o reparo ósseo obtido em tibias de ratos por espectroscopia raman e análise histológica.

## 1.2 Objetivos

- **Objetivo Geral**

- ✓ Sintetizar scaffolds de PCL e piperina (PIP) para liberação controlada de fármacos na engenharia tecidual óssea.

- **Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar a interação entre a matriz polimérica de PCL e a piperina nos grupos de amostras sintetizados através da espectroscopia UV- Vís;
- ✓ Identificar as disposições e diâmetros das fibras nos scaffolds por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ✓ Determinar a quantidade da piperina liberada no tempo pré-determinado em ensaios de Drug delivery das amostras PCL/ PIP por espectroscopia UV- Vís;
- ✓ Verificar a reparação óssea das análises in vivo por espectroscopia Raman;
- ✓ Comparar a liberação do fármaco nos scaffolds PCL/PIP com a reparação óssea obtida com base na análise estatística das medidas obtidas nos espectros Raman.
- ✓ Avaliar a reparação óssea obtida com base na análise estatística das medidas obtidas na análise histológica nos scaffolds PCL/PIP.

# **Capítulo 2**

## **REFERENCIAL TEÓRICO**

---

### **2.1 Liberação controlada de fármacos na Engenharia tecidual óssea.**

A engenharia tecidual consiste numa área multidisciplinar, em que são aplicados princípios da engenharia e da ciência para o desenvolvimento de substitutos biológicos que permitam a restauração, melhoramento e manutenção de tecidos e órgãos [30,31,32]. Desta forma, os biomateriais na engenharia tecidual possuem o potencial para criar ambientes sintéticos favoráveis a formação de tecidos funcionais [33,34,35].

A utilização de biomateriais tem se destacado em pesquisas recentes, devido suas propriedades osteogênicas e sua biocompatibilidade [36,37]. Dentre estes, temos os polímeros biodegradáveis, largamente utilizados em aplicações biomédicas nos últimos anos, pois não é necessária a remoção do mesmo depois de serem implantados no organismo, reduzindo o risco para o paciente, além de se degradarem por ação enzimática ou hidrolítica produzindo produtos e subprodutos não tóxicos para o organismo humano [8,38].

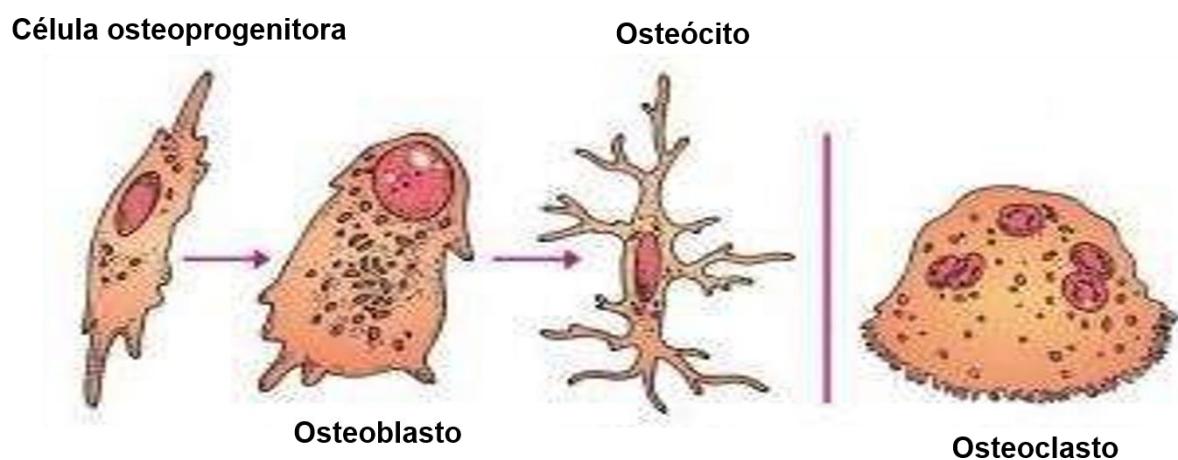
A ETO apresenta excelentes vantagens em relação às terapias convencionais de tratamento de ossos lesados, pois permite a fabricação de membranas a partir de biomateriais poliméricos. Os quais apresentam propriedades que, geralmente, imitam a matriz extracelular óssea (MEC) [39,40,41,42,43]. Neste contexto, é relevante a aplicação de biomateriais sintéticos na regeneração de tecido ósseo pelo pouco dano causado aos tecidos saudáveis, boa dissolução e absorção no meio fisiológico, baixo risco de contaminação, e estímulo à formação óssea [4].

Neste contexto, uma gama de sistemas de liberação de drogas a partir de biomateriais poliméricos foram desenvolvidos para obter diferentes padrões de liberação de drogas em aplicações específicas de tratamento [1,44,45,46]. Atualmente, a aplicação de biomateriais com propriedades osteocondutora, osteoindutora e biocompatíveis, associada a liberação de fármacos são largamente utilizadas na investigação da reparação óssea [47,48,49].

### 2.1.1 Tecido ósseo e a reparação em defeitos ósseos

O tecido ósseo é dinâmico, vascularizado, mantém-se ativo e em crescimento durante toda a vida do organismo [50,51]. É um tecido conjuntivo especializado, mineralizado, capaz de suportar forças mecânicas, e remodelar-se. Além disso, aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue e contribui na regulação metabólica dos íons cálcio, fosfato e magnésio [52], além de ser responsável por várias funções e capaz de responder a inúmeros estímulos (p.ex. metabólitos, físicos e endócrinos) [50].

O conhecimento dos constituintes do tecido ósseo e sua relação na remodelação óssea são relevantes para a compreensão da sua atividade biológica, sendo o mesmo constituído por células, matriz extracelular (MEC) e outras substâncias fundamentais na reparação óssea. As células que o compõem são as osteoprogenitoras, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos [52].



**Figura 1.** Células ósseas atuantes na reparação óssea.

Fonte: TORTORA; DERICKSON, 2016.

Os osteoclastos são umas das células do tecido ósseo que desempenham um papel importante no desenvolvimento da osteoporose e outras doenças próprias do aparelho locomotor. Sua principal função é a reabsorção óssea, que ocorre através de um conjunto de enzimas, adesão e mecanismos de reconhecimento, e assim permite o equilíbrio entre a reabsorção e a deposição de tecido ósseo [53,54]. As células de linha osteoblástica são responsáveis pelo processo de formação e mineralização do osso da matriz óssea. Elas agrupam quatro subposições de células: as pré-osteoblásticas, as osteoblásticas maduras, as células de revestimento ósseo e os osteócitos. Estes são altamente ramificados, localizados nas lacunas ósseas, onde se comunicam entre si e com outras células da superfície óssea, permitindo a entrada e saída de nutrientes [54].

No processo de reparação óssea, essa dinâmica de reabsorção e remodelação conjuntamente com outros íons minerais, como cálcio e fósforo, e células ósseas mantém a microarquitetura do tecido ósseo e sustentação do esqueleto [50, 55].

A remodelação óssea consiste na substituição contínua do tecido ósseo antigo pelo tecido ósseo neoformado. Este processo envolve reabsorção óssea, que consiste, na remoção de minerais e fibras de colágeno do osso pelos osteoclastos, em contrapartida, os osteoblastos realizam a deposição óssea, representada pela adição de minerais e de fibras de colágeno no osso [55, 56]. O colágeno tem um papel fundamental na arquitetura tecidual, especialmente no tecido ósseo, em uma ampla variedade de interações célula-célula e célula-matriz, pois possui grande resistência mecânica conferida pela sua organização macromolecular que resulta na formação de fibras [52, 57].

Há décadas, os substitutos ósseos sintéticos com a propriedade osteocondutora vem sendo investigados devido a sua estrutura servir de suporte para a migração celular e deposição óssea, desta forma, podem ser gradativamente reabsorvidos e simultaneamente substituídos por novo tecido ósseo [58,59].

Uma alternativa adequada, atualmente, é desenvolver e utilizar biomateriais que acelerem ou, ao menos, permitam o reparo normal e completo do defeito ósseo, diminuindo o insucesso pós-operatório [58]. Portanto, um grande desafio para os pesquisadores da área de engenharia tecidual óssea é desenvolver e aperfeiçoar técnicas e biomateriais que possam devolver a estrutura e funcionalidade do tecido ósseo em situações de perdas ósseas extensas [60].

## 2.2 Scaffolds poliméricos na liberação controlada de fármacos.

Os Scaffolds são estruturas tridimensionais e porosas que permitem o suporte e crescimento de um tecido corporal. Quando implantados de forma *in vivo*, é necessário que tenham a porosidade e a capacidade de entregar biomoléculas solúveis e insolúveis, orientando de forma funcional a regeneração de tecidos e órgãos defeituosos [61,62,63].

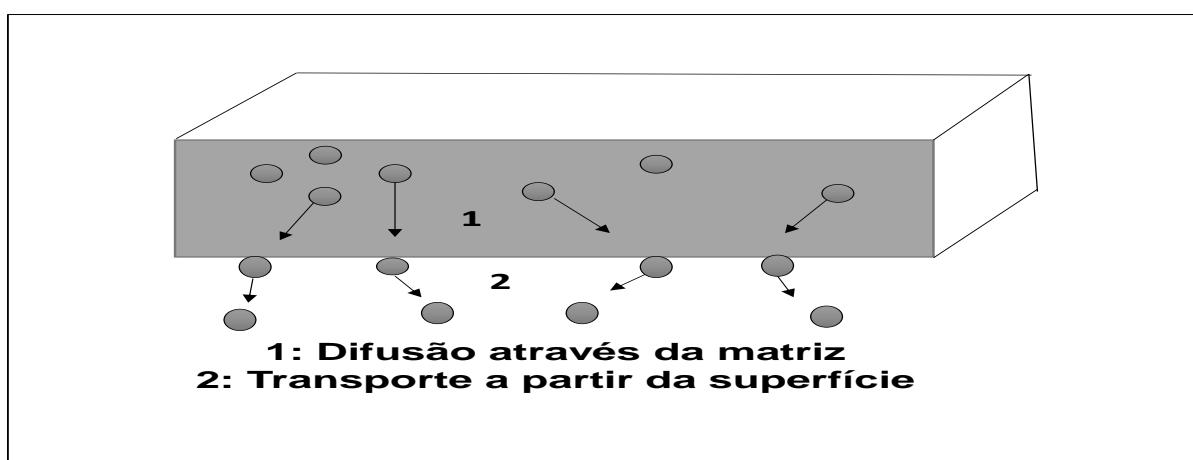
Os scaffolds devem, dessa forma, propiciar um suporte em que as células se proliferem e diferenciem [8,64,65]. Para auxiliar na regeneração e restauração de tecidos danificados, a engenharia de tecidos propicia a síntese de substitutos biológicos capazes de reparar, manter, ou aperfeiçoar seu desempenho e atividade [66,67].

Para a engenharia de tecido ósseo, um scaffold ideal deve permitir fixação e proliferação celular, diferenciação osteogênica, vascularização e integração com o tecido hospedeiro [68]. Para isto, a tecnologia envolvida na produção dessas estruturas tridimensionais está diretamente ligada ao biomaterial escolhido e ao processo utilizado para sua confecção [40,42,69].

Um sistema de liberação de fármacos (SLF) é definido como um dispositivo que permite a introdução de uma substância terapêutica, no organismo humano ou animal, proporcionando maior eficiência e segurança através de um controle de taxa, tempo e local onde o fármaco é libertado [10,70].

Em geral, a constituição básica de um sistema de liberação de fármaco inclui um fármaco associado a um transportador, geralmente scaffolds poliméricos, nos quais a taxa de liberação está relacionada com as características químicas do polímero, tal como sua hidrofobicidade ou hidrofilicidade. Estes sistemas podem ser classificados em matriciais ou monolíticos, em que o fármaco está uniformemente distribuído na matriz polimérica em forma de uma solução, suspensão ou sólido disperso. Neste caso, o mecanismo de liberação mais comum é a difusão do fármaco, no qual este migra para a superfície exterior e, em seguida, para o corpo. Além disso, a difusão é a etapa limitante, sendo a taxa de liberação dependente da escolha do polímero [71].

Como esquematizado na figura 2, o processo de liberação do fármaco ocorre predominantemente por difusão/solução na matriz polimérica. A interação do fármaco com o polímero e a morfologia da membrana são importantes fatores no controle cinético do processo de liberação do fármaco, que resultam em mudanças expressivas do tempo de liberação e na quantidade de fármaco retido.



**Figura 2.** Mecanismo de liberação de um fármaco a partir de um sistema monolítico.

Nas formulações de entrega de fármacos convencionais, a concentração do fármaco no sangue sobe drasticamente quando o fármaco é administrado, atingindo-se a concentração máxima do fármaco no organismo, seguindo-se uma diminuição até à próxima administração [72,73]. Desta forma, para manter a concentração do fármaco no organismo dentro de um intervalo terapêutico eficaz, é necessário administrá-lo várias vezes ao dia, resultando numa flutuação significativa dos seus níveis no organismo. Em contrapartida, a liberação controlada apresenta uma constância na liberação durante quase todo o tempo de ação do fármaco, o qual é administrado uma dose terapêutica durante a maior faixa de tempo [74, 75].

Os ensaios de dissolução *in vitro*, utilizando sistemas matriciais com fármacos incorporados constituem uma importante ferramenta na investigação da qualidade e eficácia dos fármacos. Entretanto, esses testes adquirem maior relevância ao correlacionar os dados obtidos com testes *in vivo*, através do qual permite prever o comportamento do fármaco no organismo humano. Assim, a avaliação de scaffolds contendo fármaco por meio de ensaios de dissolução tem sido investigado em pesquisas recentes, uma vez que os mesmos podem fornecer indicações importantes sobre o desempenho *in vivo* do fármaco em aplicação [71].

## 2.3 Eletrofiação

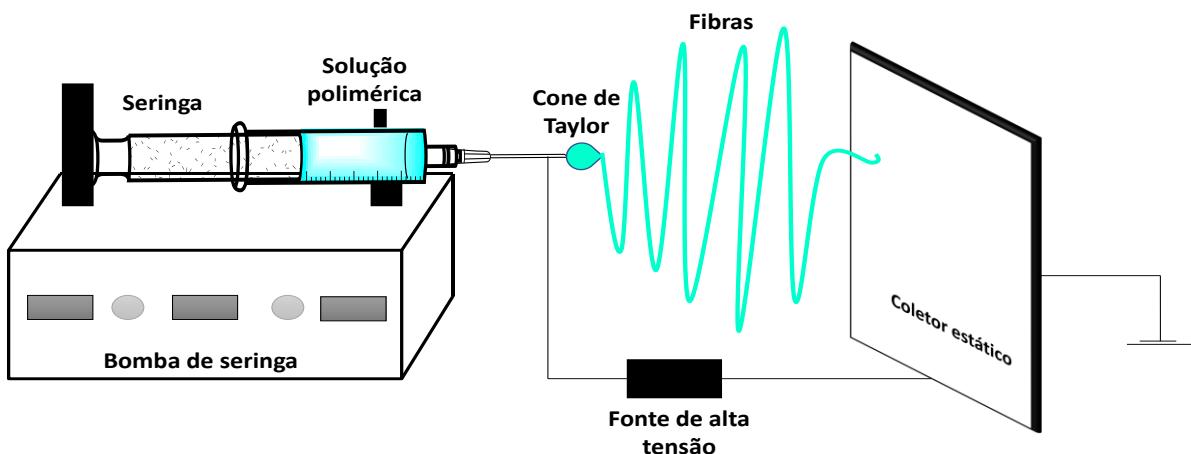
A técnica de electrospinning, ou eletrofiação apresenta vantagens na síntese de estruturas fibrosas para aplicações elétricas e óticas [8,69], assim como para a produção de sensores, compósitos reforçados com nanofibras [8,76,77], entre outros. Na área biomédica, a técnica de electrospinning encontra maior aplicabilidade, com destaque em engenharia tecidual, mas também em sistemas de liberação controlada de fármaco, cirurgia e cicatrização de feridas [8,78,79,80]. Trata -se de uma técnica de simples utilização e bastante eficaz para a produção de matrizes poliméricas. Não requer equipamento sofisticado e permite o controle do diâmetro das fibras produzidas (da ordem dos nanômetros), uma vez que o alongamento das mesmas é conseguido pela aplicação de um campo elétrico externo [64].

As nanofibras podem ser usadas como scaffolds na regeneração de tecidos e órgãos danificados, tornando-o promissor para aplicação na engenharia de tecidos [78,82]. Os scaffolds implantáveis à base de nanofibras auxiliam na regeneração óssea, regeneração neural,

regeneração vascular e cicatrização de feridas [69,78]. Outra vantagem das nanofibras inclui condutividade térmica e elétrica e estabilidade estrutural [78]. Atualmente a técnica de eletrofiação é a mais estudada e pesquisada para produção de nanofibras poliméricas [83], permitindo sintetizar matrizes com uma elevada área superficial e porosidade, compostas por fibras ultrafinas. Estas propriedades contribuem para uma melhor adesão, proliferação, migração e diferenciação celular, e dessa forma mimetiza a morfologia da matriz extracelular [8,84].

O electrospinning é uma técnica simples e eficiente na produção de matrizes poliméricas, que permite o controle do diâmetro das fibras produzidas. Uma das vantagens desta técnica é a versatilidade, uma vez que permite o emprego de uma vasta gama de polímeros, mistura destes materiais inorgânicos, biomoléculas e células vivas [85]. Neste trabalho foi adotada a forma mais simples e convencional de electrospinning, com a solubilização prévia do polímero seguida da incorporação do fármaco que compõem o scaffold.

Os elementos necessários para a realização da técnica incluem uma alimentação de alta tensão, uma bomba injetora e um coletor ligado à terra, como é ilustrado na Figura 3.



**Figura 3.** Equipamento da eletrofiação e elementos para sua realização.

Adaptado: Bhattarai et al., 2019.

A bomba injetora impulsiona a solução polimérica, que está contida numa seringa, fazendo-a passar por uma agulha que, por sua vez está eletricamente ligada ao pôlo positivo da fonte de alta tensão [8,64]. O princípio de funcionamento deste método baseia-se na aplicação de um potencial elétrico à solução polimérica que passa pela agulha, para que a solução fique carregada eletricamente. A partir de um certo valor da tensão aplicada, as forças electroestáticas sobrepõem-se à tensão superficial da solução polimérica, deformando a geometria esférica da gota, propiciando que esta adquira uma configuração cônica denominado cone de Taylor. Este

representa a gota de polímero pendente na agulha, que é deformada dando origem à projeção de uma fibra contínua que vai ser depositada no coletor, o qual se encontra no lado oposto à agulha e com polaridade oposta [10,86,87,88,89]. No trajeto entre a ponta da agulha e o coletor, o jato de solução polimérica é acelerado e esticado, fazendo com que o solvente se evapore e forme as fibras que vão depositar-se no coletor [8,90,91].

### 2.3.1 Parâmetros da eletrofiação

A necessidade de produção de fibras com diâmetro e morfologia controlados levou à realização de vários estudos sobre a relação entre as propriedades das fibras e os parâmetros variáveis do processo. Estes parâmetros são classificados em três categorias: parâmetros associados à solução polimérica, parâmetros de operação e parâmetros ambientais [8, 64,92,93]. Entre os parâmetros de operação temos o campo elétrico aplicado, a distância entre a agulha e o coletor, a taxa de fluxo e o diâmetro da agulha. Os parâmetros da solução incluem o solvente, a concentração do polímero, a viscosidade e a condutividade da solução. Já os parâmetros ambientais dizem respeito à umidade relativa e a temperatura [94,95].

A aplicação de um fluxo de corrente de alta tensão em uma solução polimérica por meio de uma agulha metálica, fará com que ocorra a formação de uma gota esférica, denominada cone de Taylor. Esta gota resultará na produção de fibras ultrafinas quando atingida uma tensão crítica. Este valor da tensão aplicada varia de polímero para polímero [95]. De modo geral, observa-se que o aumento da diferença de potencial no processo de eletrofiação favorece um maior estiramento da solução polimérica, provocando a redução das fibras eletrofiadas, concomitantemente à evaporação do solvente. Logo a tensão aplicada influencia diretamente no diâmetro das fibras [96,97].

Semelhantemente ao campo elétrico, a distância entre a ponta da agulha e o coletor também varia com o sistema polimérico. A morfologia da nanofibra pode ser facilmente afetada pela distância, pois determinará o tempo que o solvente tem para evaporar antes da solução atingir o coletor. Portanto, é necessário manter uma distância crítica para que seja possível obter nanofibras eletrofiadas lisas e uniformes [85,94].

A vazão ou taxa de fluxo é o controle da quantidade de solução disponível para a eletrofiação. O controle desse parâmetro pode determinar o diâmetro e a morfologia das fibras, além de determinar o sucesso do processo da eletrofiação. Em suma, o aumento da vazão favorece o aumento do diâmetro das fibras. Entretanto, vazões muito elevadas podem originar

defeitos nas fibras, uma vez que aumenta a quantidade de solvente, dificultando a evaporação do mesmo antes da fibra atingir a placa coletora [98].

A concentração do polímero e, consequentemente, a viscosidade da solução, é um parâmetro de fundamental importância na eletrofiação [96]. As forças viscoelásticas entre as moléculas do polímero em solução são determinadas pela sua viscosidade, que depende da concentração e do peso molecular do polímero. Estas forças devem ser suficientemente fortes para impedir a interrupção da fibra durante o seu estiramento, não devendo, porém, inibi-lo [83,85].

A condutividade elétrica da solução também influencia na morfologia das fibras produzidas. Em geral, a adição de um sal à solução faz com que a condutividade elétrica da solução aumente. Com a aplicação de um campo elétrico externo, estas cargas se orientam permitindo que a gota sofra um maior alongamento, resultando numa diminuição no diâmetro das fibras [96].

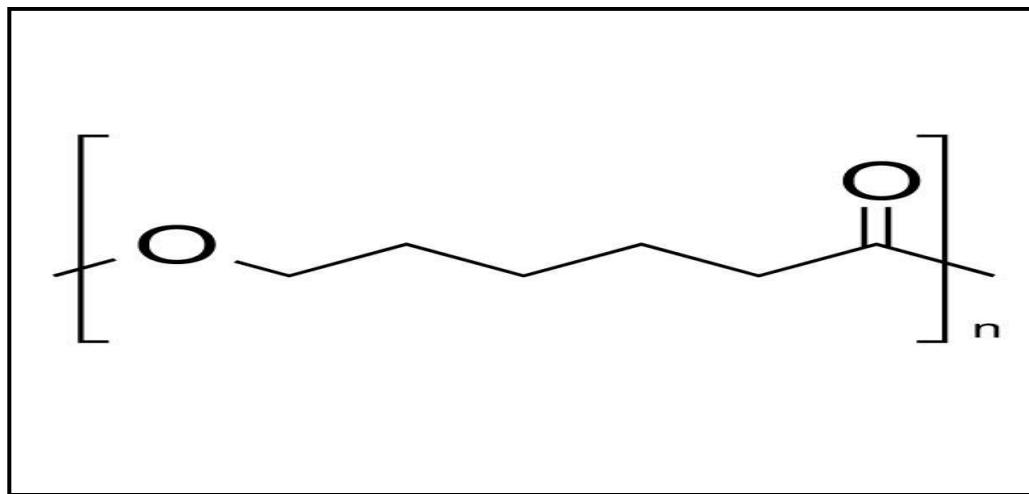
Para além dos parâmetros da solução e de operação é importante ter em conta os parâmetros ambientais, tais como a umidade relativa e a temperatura, dado a sua influência no diâmetro e morfologia das fibras resultantes [8,99].

Quanto mais úmido for o ambiente mais porosa será a fibra formada. O tamanho dos poros aumenta com o aumento da umidade, podendo ocorrer a coalescência destes resultando na obtenção de fibras não uniformes [8,94,96]. Para além disso, a umidade do ambiente pode ainda determinar a taxa de evaporação do solvente. Quando os níveis de umidade são elevados, a taxa de evaporação de solvente será baixa, consequentemente, a fibra que irá depositar-se no coletor conterá solvente, provocando a dissolução e fusão das fibras formadas [8].

A temperatura pode influenciar na viscosidade e condutividade da solução, dependendo do polímero utilizado. O aumento da temperatura provoca um aumento da taxa de evaporação e um aumento da viscosidade [8,96].

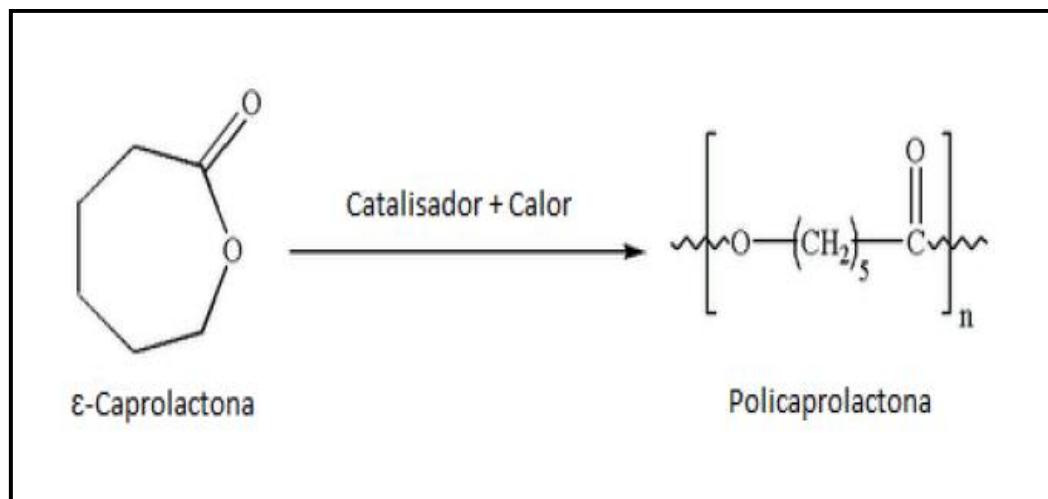
## 2.4 Policapro lactona (PCL)

A policaprolactona (PCL) é um polímero sintético, biocompatível e hidrofóbico [83, 100]. O monômero do PCL é representado na figura 4.



**Figura 4.** Monômero da Policaprolactona

É um polímero que pertence à família dos poliésteres alifáticos, sendo sintetizado por meio de polimerização por abertura de anel de  $\epsilon$ -caprolactona, para a obtenção da unidade repetitiva. A figura 5 mostra a reação de polimerização para obtenção do PCL.



**Figura 5.** Polimerização por abertura do anel de  $\epsilon$ -caprolactona.

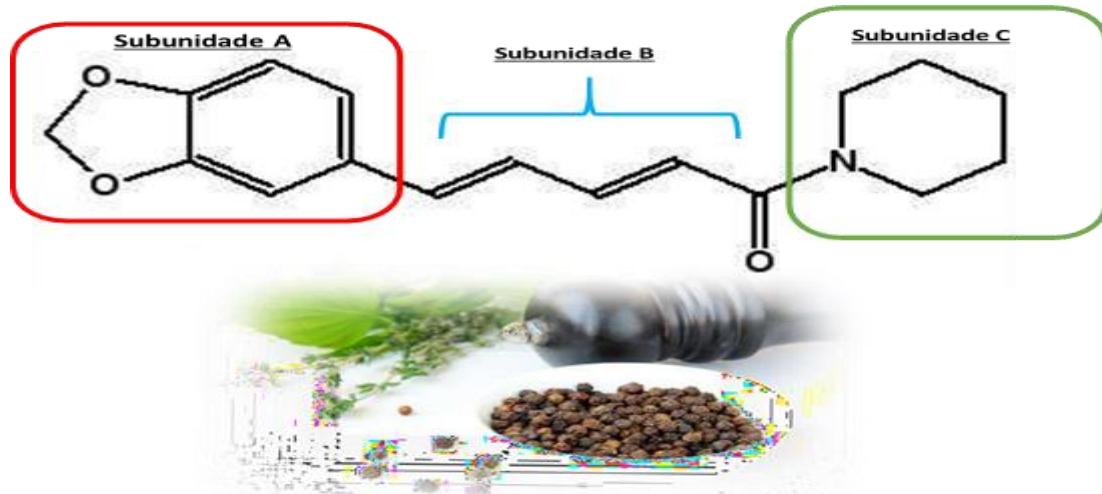
Fonte: RAMOS, 2011.

Este polímero tem uma bioestabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, solubilidade em diversos solventes orgânicos, capacidade de ser processado a baixas temperaturas e boas propriedades mecânicas. Dessa forma, isto permite que este polímero seja utilizado em scaffolds (membranas ideais como suporte em tecidos do organismo) para engenharia de tecidos [8,101]. Além disso, o PCL e outros poliésteres, tais como seus copolímeros, são comumente estudados para a entrega controlada de fármacos associada a ETO, pois sua biocompatibilidade com diversos tipos de fármacos permite a distribuição uniforme da

droga, e a degradação a longo prazo possibilita a atuação do medicamento até vários meses [20,21].

## 2.5 Piperina

A aplicação de biomateriais empregados como matrizes poliméricas tem sido promissor, assim como a associação com extratos naturais [3]. A amida natural piperina (amida piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil) -2E-4E-pentadienóico- Figura 6), é o principal constituinte químico de *Piper nigrum* (Piperaceae), ocorrendo em maior proporção nos frutos da planta [102,103]. A piperina é composta por um grupo 1,3-benzodioxola (subunidade A), ao lado de uma cadeia de ácido pentadienóico (subunidade B) e o fragmento piperidina (subunidade C).



**Figura 6.** Estrutura molecular da piperina.

A piperina é o alcalóide majoritário da planta [103,104,105]. *Piper nigrum* (popularmente conhecida como pimenta do reino) tem seu uso bastante difundido na medicina popular da Índia, país de onde é originária, sendo que no Brasil, seu principal uso é como condimento [102,103]. É uma das especiarias mais consumidas no mundo, em que a piperina é um dos componentes que contribui principalmente para sua distinta pungência [106,107].

### 2.5.1 Aplicações da Piperina

Dentre os pesticidas utilizados, os herbicidas são os mais consumidos, com destaque no Brasil que é o segundo maior consumidor no mundo [53]. Esses compostos representam uma ferramenta amplamente utilizada na administração de plantas daninhas em sistemas agrícolas

[54,55]. No entanto, a dosagem correta é um dos principais focos durante a aplicação de herbicidas, pois administrar quantidades imprecisas e uso abusivo além de perdas econômicas, aumentam o risco de contaminação ambiental e possíveis danos a organismos não-alvo [56].

A piperina apresenta diversas atividades farmacológicas e efeitos bioquímicos como, por exemplo, antimicrobiano, antifúngico e hepatoprotetor [108,109]. Este alcalóide tem potencial depressor no sistema nervoso central, apresentando também atividades analgésica, antipirética, antiinflamatória e antioxidante [110,111,112]. Alguns estudos têm evidenciado que a piperina auxilia na inibição das reações de oxidação tanto *in vitro* como *in vivo* causadas por radicais livres de forma a prevenir ou retardar os danos às células e aos tecidos [103,113,114]. Apesar das propriedades terapêuticas da piperina, suas aplicações biomédicas ainda são limitadas, devido sua baixa solubilidade em água [115]. Apesar de ser um alcalóide de reconhecida atividade biológica, requer novos estudos para comprovação das suas demais atividades biológicas.

Na síntese de scaffolds poliméricos com fármacos incorporados, a piperina é considerada um modelo hidrofóbico, na investigação de liberação controlada de fármaco [25].

Para aplicações *in vitro*, a piperina em associação com a curcumina, composto que faz parte do componente ativo do açafrão-da-índia, apresentaram em pesquisas recentes a diferenciação osteogênica melhorada [26] e de forma análoga a piperina melhorou a biodisponibilidade da curcumina, bem como inibiu a osteoclastogênese, desfavorecendo a reabsorção óssea em estruturas ósseas, como dentes reimplantados [116].

Nas análises *in vivo*, a avaliação da piperina isolada em camundongos não demonstrou efeitos tóxicos no fígado e rins [117], enquanto na engenharia tecidual óssea, a avaliação do tratamento com a piperina em modelos animais osteoporóticos demonstrou que algumas doses da piperina impediu a perda da massa óssea induzida pela deficiência de estrogênio, viabilizando o tratamento com piperina para a osteoporose [27].

# Capítulo 3

## METODOLOGIA EXPERIMENTAL

---

---

### 3.1 Materiais e Reagentes

A síntese das nanofibras foram realizadas com a utilização dos materiais listados abaixo:

- **Biopolímero**

Policaprolactona (PCL) – Sigma- Aldrich pellets, Mn= 80.000 g/mol

- **Fármaco**

Piperina (PIP) – Sigma- Aldrich Massa molar: 285,34 g/mol

- **Solvente**

HFIP (1,1,1,3,3,3- Hexafluoro-2-isopropanol)

Massa molar: 168,04 g/mol, 99,8%.

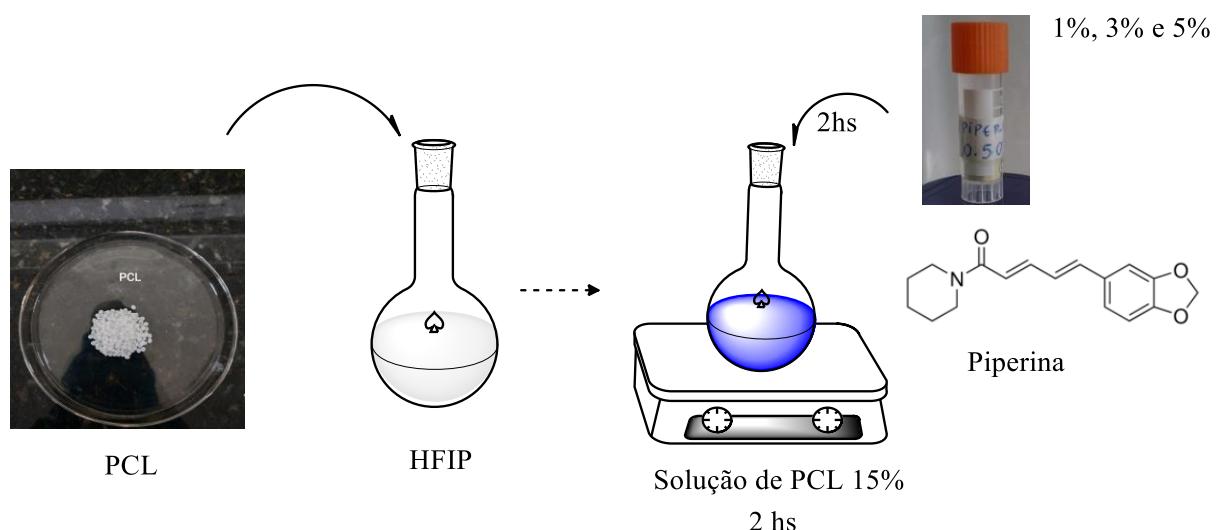
Nos ensaios de liberação do fármaco in vitro foram obtidos da Sigma- Aldrich a solução salina tampão fosfato (pH=7,4), o álcool isopropílico (Massa Molar: 60,1g/mol, pureza 99,8%) e o álcool metílico (Massa molar: 32,04 g/mol, pureza 99,8%) fornecidos pela dinâmica. Nos ensaios in vivo foram utilizados cloridrato de cetamina (10%) e cloridrato de xilazina (2%) e formol tamponado com fosfato de sódio monobásico obtido da farmácia Galeno para análise histológica.

### 3.2 Síntese dos scaffolds nanofibrosos

A síntese dos scaffolds nanofibrosos consistiu em duas etapas: a preparação de quatro soluções poliméricas e a eletrofiação destas. Na primeira etapa foram pesadas as massas de PCL e Piperina para adição no solvente HFIP na concentração adequada para posterior eletrofiação. Na segunda etapa, o processo de eletrofiação iniciou-se após a completa dissolução do fármaco na solução de PCL, utilizando parâmetros adequados para formação de nanofibras eletrofiadas.

### 3.2.1 Preparação das soluções poliméricas

As soluções poliméricas foram preparadas com o solvente HFIP, o biopolímero PCL e o fármaco piperina. Na preparação destas fibras, o PCL foi dissolvido à temperatura ambiente em HFIP e sob agitação magnética controlada, por 2 horas até a completa dissolução do polímero. Por conseguinte, diferentes teores de piperina (1%, 3% e 5%) foram adicionados a solução de PCL, e seguido de agitação magnética por 2 horas, para sua incorporação ao polímero [118,119].



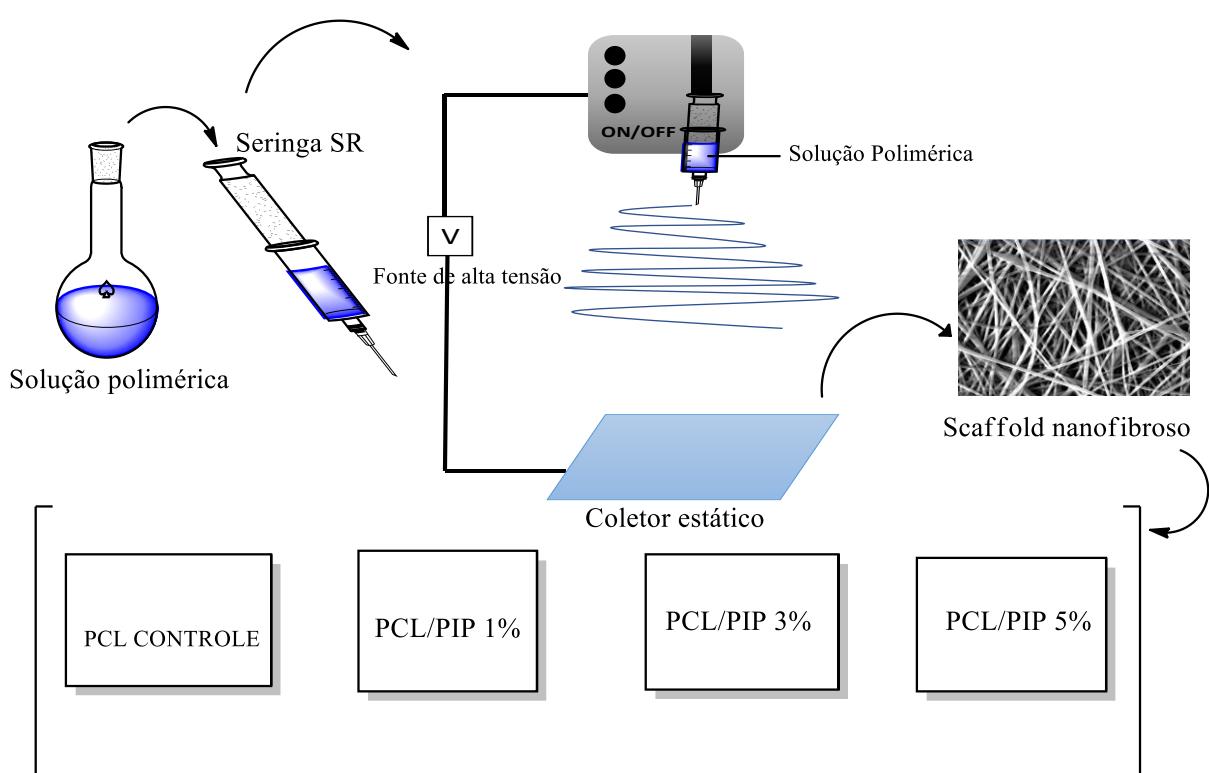
**Figura 7.** Esquema de preparo das soluções poliméricas sob agitação magnética.

A designação dos scaffolds iniciou-se no preparo das soluções. Uma solução de PCL controle, ou seja, sem adição da piperina foi realizada com concentração de 15% (m/v). Para as soluções com piperina, foram preparadas três soluções de PCL 15% e adicionado três concentrações (m/v) do fármaco piperina (1%, 3% e 5%).

### 3.2.2 Eletrofição das soluções poliméricas

As soluções de PCL/Piperina preparadas foram eletrofiadas a 22°C, utilizando uma seringa descartável SR de 5 mL, com uma agulha descartável com ponta metálica de 0,55mm de diâmetro interno. O pólo positivo de uma fonte de alta tensão, projetada para trabalhar na

faixa de 0 a 30 kV, foi conectado a ponta da agulha metálica da seringa, enquanto que o eletrodo terra foi utilizado para aterrkar a placa coletora de cobre, com as dimensões de 5,0 x 10,0 cm. A vazão foi controlada por uma bomba de infusão (kdScientific, Modelo KDS-100), conectada a seringa e a tensão foi controlada por uma fonte de alta tensão (Testtech). A distância da ponta da agulha ao coletor foi de 10 cm. As soluções foram processadas a uma tensão positiva de 13 kV, corrente elétrica de 2 A e a uma vazão de 1 mL/h. As amostras das membranas eletrofiadas foram coletadas em folhas de papel alumínio, as quais revestiam a placa de cobre durante os experimentos. Em cada teste foram eletrofiadas aproximadamente 5 mL de solução polimérica. A Figura 8 mostra um esquema do equipamento de eletrofiação utilizado neste trabalho, bem como os scaffolds nanofibrosos eletrofiados.



**Figura 8.** Equipamento de eletrofiação e scaffolds sintetizados de PCL, PCL/PIP1%, PCL/PIP3%, PCL/PIP5%.

**Tabela 1.** Parâmetros da eletrofiação na síntese dos scaffolds.

<b>Parâmetros</b>	<b>PCL</b>	<b>PCL/PIP1%</b>	<b>PCL/PIP3%</b>	<b>PCL/PIP5%</b>
Corrente	2A	1A	1A	2A
Voltagem	13kV	9kV	9kV	13kV
Vazão	1,0mL/h	0,4mL/h	0,4mL/h	1,0mL/h
Temperatura	22 ± 1°C	22 ± 1°C	22 ± 1°C	22 ± 1°C
Umidade do ar	48-50%	48-50%	48-50%	48-50%
Distância do coletor	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm

### 3.3 Estudo morfológico dos scaffolds de PCL e PCL-piperina

As medidas qualitativas e quantitativas das fibras obtidas nos scaffolds de PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5% foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM) (Quanta 200F Model, FEI, Netherland). Foram obtidas imagens com ampliações de 150x, 500 x, 2000 x, 7000x e 10000x, que permitiram estimar o diâmetro médio das fibras através de um programa de análise de imagem (Image J), pelo menos 400 medidas das fibras foram consideradas para o cálculo. A distribuição dos diâmetros foi obtida aplicando a distribuição gaussiana no software Origin.

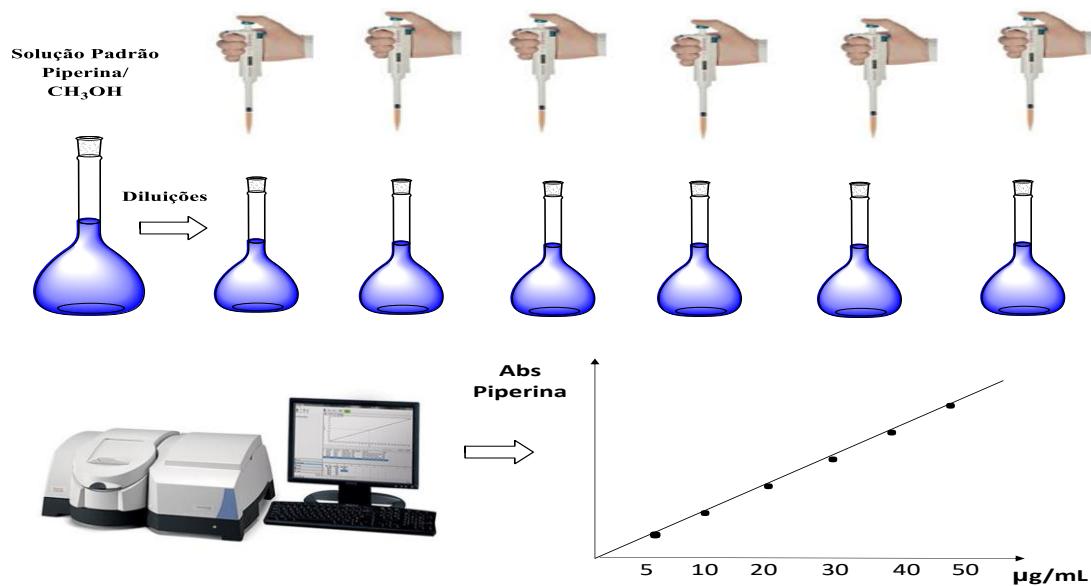
### 3.4 Espectroscopia FTIR

A análise por FTIR dos scaffolds foi feita com o equipamento Spectrum 400 Perkin Elmer FTIR/FTNIR Spectrometer. Os espectros foram obtidos no modo absorbância na faixa de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.5 Ensaio de liberação controlada da Piperina

Para o experimento de liberação da piperina *in vitro* seccionou-se as membranas que continham o fármaco (PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5%) em peças de 1x 1cm<sup>2</sup>. Estas foram previamente pesadas ( $m=0,0009\text{ g}$ ), mergulhadas e incubadas a 37°C em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) fresca a pH= 7,4± 0,1 sob agitação (100 rpm).

Em intervalos de tempo fixados, 3,0 mL de solução foi retirada do meio de dissolução contendo e por conseguinte a quantidade do fármaco foi detectada em um espectrofotômetro UV- vis a 342 nm, a partir da curva de calibração obtida. Cada experimento foi realizado em triplicata ( $n=3$ ).



**Figura 9.** Preparação das diluições para obtenção de curva de calibração.

A porcentagem de liberação cumulativa da droga em função do tempo foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Quantidade cumulativa de liberação (\%)} = (Ct / C\infty) \times 100 \quad (1)$$

Onde, Ct é a quantidade de piperina liberada no tempo t e C $\infty$  refere-se à quantidade total de droga carregada na amostra de 1 × 1 cm<sup>2</sup>. Todos os resultados foram realizados em triplicata para confirmar a reprodutibilidade dos resultados.

### 3.6 Animais

Cinquenta ratos *Rattus norvegicus* machos, com um peso médio entre 200 e 300 g, eram clinicamente saudáveis, fornecidos pelo biotério da Universidade Estatal do Piauí. Os animais eram alimentados com comida e água ad libitum, alojados em gaiolas de aço, sob temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), e mantida em condições 12:12 hr ciclo luz/obscurecimento.

#### 3.6.1 Aspectos éticos

Esta investigação foi aprovada pelo Comitê de Ética para a Utilização de Animais da Universidade Estatal do Piauí (CEUA), de acordo com o protocolo 00057/18, em conformidade com os Princípios Orientadores para a Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório e em conformidade com a Lei Federal n.º 11974 de 2008-Experimentação em Animais, e foi

registados na Plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Património Genético e dos Conhecimentos Tradicionais Associados... SISGEN (A22C996), em conformidade com a Lei da Biodiversidade nº 13123 de 2015.

### 3.6.2 Procedimento experimental

O procedimento experimental foi desenvolvido no Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estatal do Piauí. A amostra foi dividida em cinco grupos: grupo controle, PCL, PCL/PIP1%, PCL/PIP3% e PCL/PIP5% ( $n = 5$  animais, cada). Por sua vez, cada grupo foi subdividido em dois períodos de observação, de acordo com a eutanásia período, aos 15 e 30 dias. Os animais receberam pré-tratamento com atropina numa dose de 0,04 mL para cada 100 g de peso corporal. Após 15 min, foram anestesiados dissociativamente por via intramuscular (cloridrato de cetamina 10% com uma dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso corporal e 2% de cloridrato de xilazina com uma dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso corporal). Após a anestesia, cada animal foi submetido à remoção e assepsia na região da tibia direita com tópicas polvidina. Após uma incisão longitudinal da pele e separação do tecido conjuntivo subcutâneo, o defeito crítico foi induzido nos animais na tibia direita com um micromotor com uma broca de trefina de 3 mm de diâmetro, seguido da implantação do biomaterial no local da lesão no grupo tratado (forma circular, 3 mm de diâmetro). O grupo controle não recebeu qualquer tratamento. Então, em ambos os grupos, nas margens da ferida foram suturadas (fio de seda 4-0) para uma coaptação perfeita. Os animais receberam 50 mg/kg de dipirona por gavagem a cada 12 horas como analgesia durante todo o tratamento de acordo com o protocolo adoptado por Alves et al. [119]. Os animais foram sacrificados aos 15 e 30 dias após a indução da lesão por overdose de sódio thionembutal (150 mg/kg). As amostras de tecido ósseo foram retiradas dos grupos, as quais foram mantidas em líquido nitrogénio. Em seguida, as amostras de cada grupo foram submetidas a análise por espectroscopia Raman e processo laboratorial de rotina para inclusão em parafina e análise histopatológica.

## 3.7 Análise por espectroscopia raman

A fim de obter os espectros, as amostras foram retiradas do nitrogênio e mantido à temperatura ambiente. Um espetrômetro Raman (modelo Senterra, Bruker) com  $\lambda = 785$  nm laser foi utilizado para excitação. A potência de saída do laser era de cerca de 50 mW na amostra superfície. A resolução espectral foi ajustada para  $9\text{--}15\text{ cm}^{-1}$  para 15 s, gama espectral 400a, 90-3,  $500\text{ cm}^{-1}$ , 10x objetiva. Em cada região óssea de interesse, ou seja, na região de transição

fronteiriça, foram recolhidos três espectros com uma distância aproximada de 10 µm entre os pontos. O espectro de osso cortical normal também foi obtido, que foi denotado como saudável, numa região distante da lesão induzida, após sacrifício em 15 e 30 dias. Finalmente, o espectro Raman do biomaterial baseado em PCL, PCL/PIP1%, PCL/PIP3% e PCL/PIP5% foram comparados com a região tratada e a região saudável. O programa Labspec 5.0 foi utilizado para remover a fluorescência do espectro em bruto na região de 90-3500 cm<sup>-1</sup> através do ajustamento polinomial de quinta ordem. Além disso, também permitiu etapas de pré-processamento, tais como o ajustamento da linha de base. Na sequência, o processamento foi concluído no software Origin 2018, no qual os espectros eram submetidos a um vetor normalização (cada intensidade Raman foi dividida pela raiz quadrada da soma das intensidades quadradas calculadas de todo o espectro); foram identificados os picos e as áreas integradas dos principais picos avaliados, que foram realizados nos seguintes intervalos: 957-962 cm<sup>-1</sup> (fosfato), representativo do conteúdo mineral. A fim de quantificar a composição óssea, bem como de caracterizar alterações ósseas no mineral e, o conteúdo mineral foi obtido calculando a razão da área integrada da banda de fosfato v1(~960 cm<sup>-1</sup>).

### 3.8 Análise histopatológica

Após fixação em formalina tamponada durante 48 horas, as amostras foram descalcificadas com 10% m/v ETDA (ácido etilenodiaminotetracético), pH 7,2 para 4 semanas. Após a descalcificação, os espécimes foram desidratados utilizando uma bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes e tratado com xylol num processador automático de tecidos (PT05 TS Luptec, São Paulo, Brasil). Depois de ser incluído na parafina, foram obtidas secções com uma distância entre 2 e 3 µm e uma espessura de 5 µm num microtoma rotativo (MRP09 Luptec, São Paulo, Brasil), que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), duas secções/lâmina. As secções de todas as amostras foram analisadas com um microscópio de luz trinolucular (Olympus CX31, Japão) e fotografadas em triplicado com uma câmera digital (Moticam WiFi X, MoticMicroscópios, Richmond, VA) anexada a um computador. A análise histopatológica semi-quantitativa relativa à inflamação, união e maturação do tecido ósseo ocorreu através um sistema de pontuação numérica descrito por Alves et al. [117] e Hedner e Linde [120].

### **3.9 Análise estatística**

Os resultados foram expressos em médias e desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando o teste ANOVA unidirecional teste t Tukey e Student's. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Graphpad Prism (versão 8.3.0). As diferenças foram consideradas como significativas quando  $p < 0.05$ .

# Capítulo 4

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

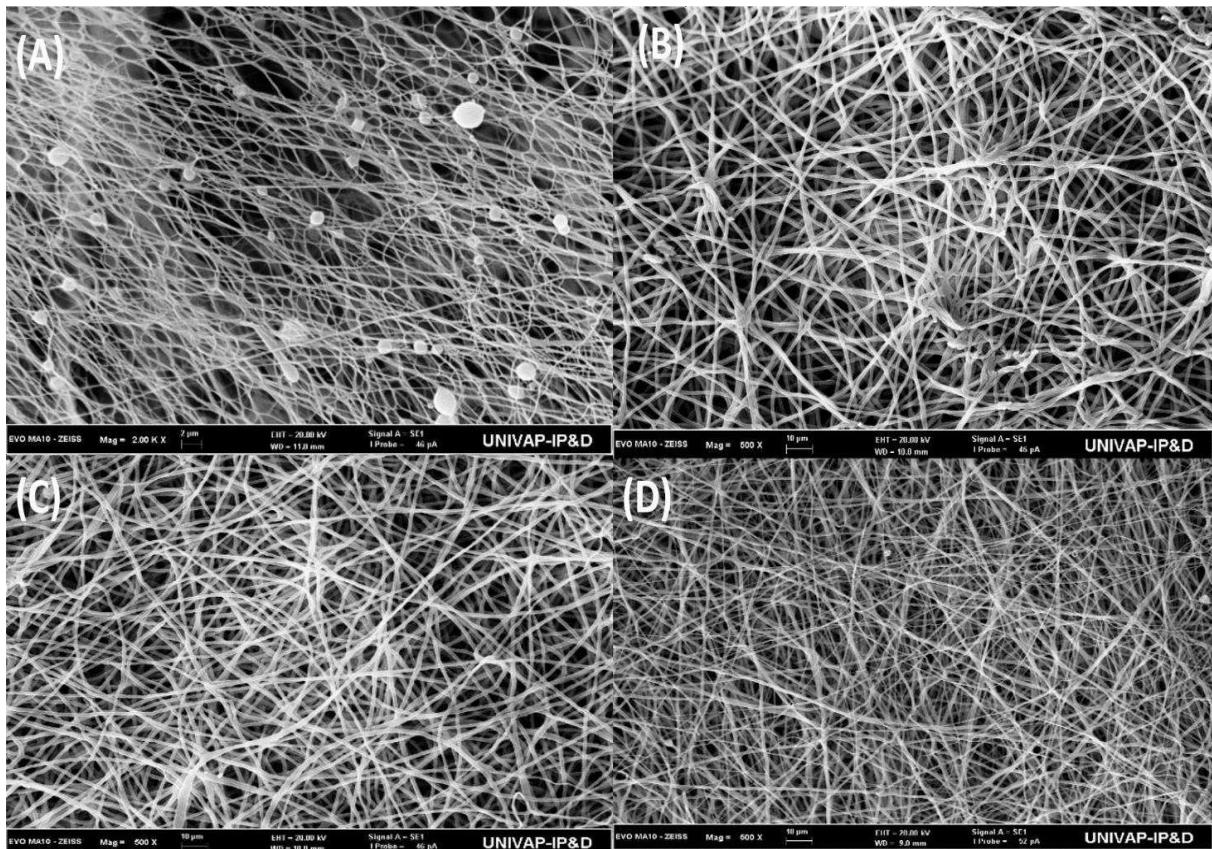
---

### 4.1 Morfologia do scaffolds nanofibrosos de PCL e PCL-piperina

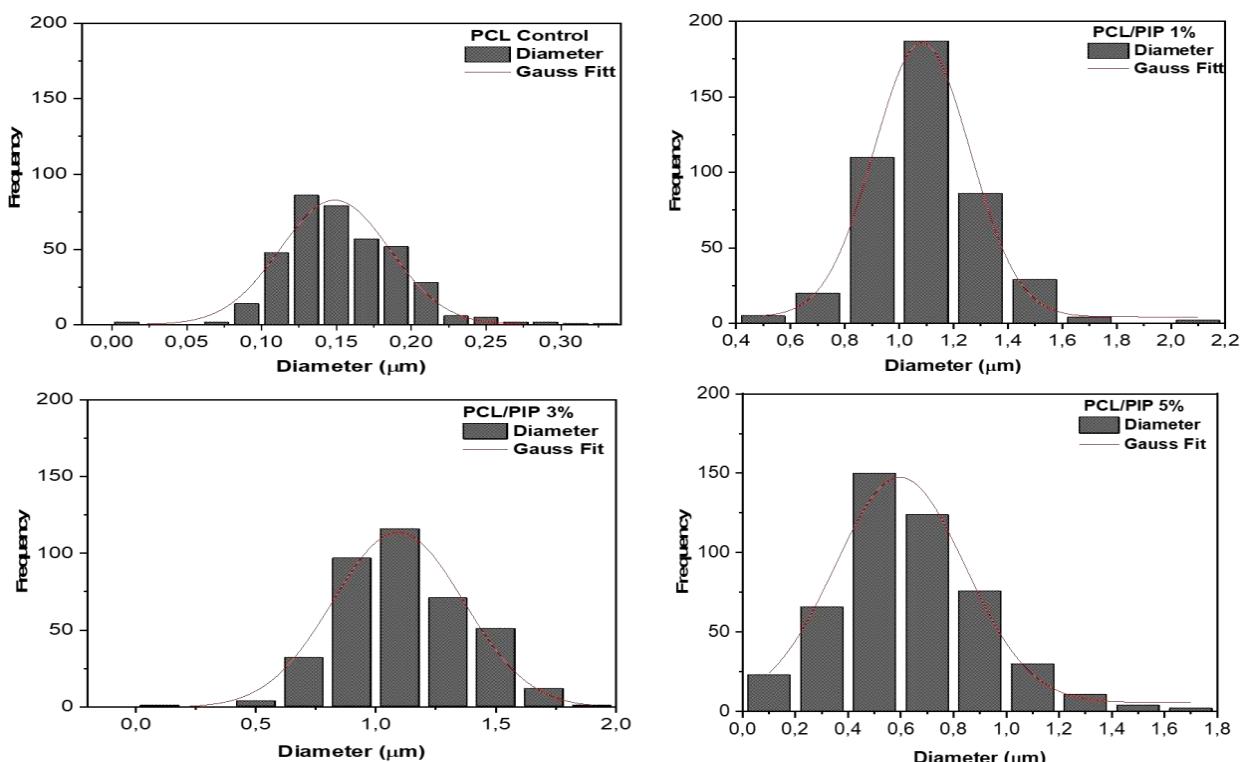
Quatro fibras foram obtidas por um sistema de eletrofiação padrão descrito na seção experimental 3.2, de acordo com os parâmetros de eletrofiação descritos na Tabela 2. A imagem MEV mostrada na figura 1 representa a morfologia das fibras eletrofiadas e na figura 2 os diâmetros obtidos pela distribuição Gaussiana, mostrando pequenos desvios padrão. As fibras PCL contendo piperina apresentam maior diâmetro com maior desvio em relação às fibras PCL, devido ao incremento da piperina à solução, alterando suas propriedades, pois o aumento da viscosidade proporciona aumento das fibras com o aumento da viscosidade [98].

A fibra mostrada na figura 1A apresentava "grânulos", defeitos na formação da fibra, causados pelo maior estresse aplicado. Quando esta é acelerada e associada a um maior distanciamento do coletor, favorece um maior alongamento da solução e consequente redução do diâmetro da fibra [121]. No entanto, as fibras mostradas nas figuras 1B e 1C, apresentaram maior diâmetro e maior uniformidade devido à menor vazão e estresse aplicado, também causado pela lenta evaporação do solvente HFIP com o aumento da concentração do fármaco [98]. A morfologia da fibra desempenha um papel importante na porcentagem de fármaco liberado, pois o principal mecanismo de transporte do fármaco é o processo de difusão. Membranas simétricas mais densas têm maior mobilidade por difusão através delas para o meio de liberação [69].

Os scaffolds com diâmetros menores foram PCL e PCL / PIP 5% devido à maior tensão, vazão e corrente aplicada. No entanto, PCL / PIP 1% e PCL / PIP 3% apresentaram diâmetro maior, conforme mostrado na tabela 3. Portanto, PCL / PIP 1% e PCL / PIP 3% formaram membranas mais densas com taxa de liberação de droga provavelmente mais rápida em comparação com PCL / PIP 5 % membranas.



**Figura 10.** Imagem MEV de PCL e PCL-Piperina: (A) scaffold de PCL (B) scaffold de PCL-Piperine 1% (C) scaffold de PCL-Piperine 3% e (D) scaffold de PCL-Piperine 5%.



**Figura 11.** Distribuição gaussiana de 400 medições obtidas no software Image J: (A) scaffold PCL (B) scaffold PCL-Piperine 1% (C) scaffold PCL-Piperine 3% e (D) scaffold PCL-Piperine 5%.

**Tabela 2.** Diâmetro das fibras dos scaffolds de PCL e PCL-Piperina.

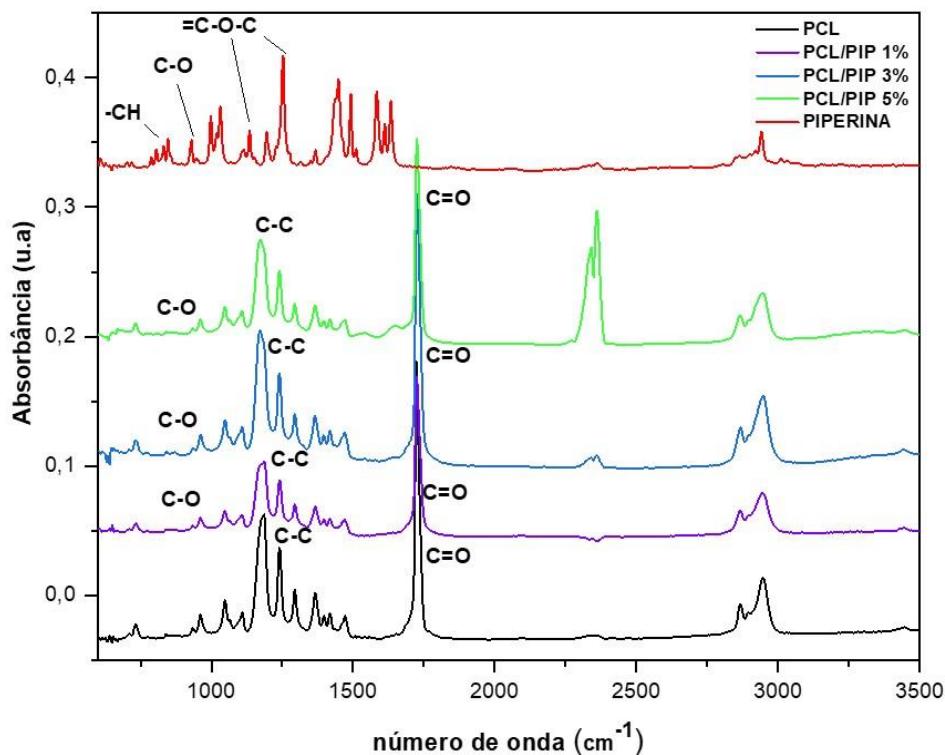
Scaffolds	Diâmetro das fibras
PCL	0,15 ± 0,002µm
PCL/PIP1%	1,08± 0,007µm
PCL/PIP3%	1,09± 0,02µm
PCL/PIP5%	0,59± 0,016µm

## 4.2 Incorporação do fármaco nos scaffolds

Os dados espectroscópicos do FTIR confirmam a incorporação da piperina nos scaffolds demonstrado na figura 12. O fármaco puro exibiu bandas características da piperina em 1253cm<sup>-1</sup> e 1033 cm<sup>-1</sup>, correspondente a vibração de estiramento assimétrico e simétrico do grupo =C-O-C, respectivamente. O grupo C-O que compreende a banda mais característica apresentou banda em 929cm<sup>-1</sup>, e bandas em 805, 829 e 850 cm<sup>-1</sup> correspondentes a flexão das ligações -CH nas posições 1, 2, 4 do grupo fenil, em concordância com a literatura [122,123,124].

Os scaffolds apresentaram picos 1724,59cm<sup>-1</sup> correspondente à vibração do grupo éster (correspondente ao estiramento do grupo carbonila presente na estrutura do polímero) característico do PCL e as bandas próximas ao número de onda em 1293 cm<sup>-1</sup> são características dos estiramendos das ligações C-C. Os scaffolds de PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5% apresentaram alargamentos bem discretos dos picos em 930cm<sup>-1</sup> do grupo mais característico C-O e em 1047cm<sup>-1</sup> correspondente à vibração de estiramento simétrico do grupo =C-O-C. Neste aspecto, o scaffold PCL/PIP 1%, apresentou alargamento mais expressivo em relação aos outros scaffolds. Entretanto, os outros picos característicos da piperina em 805, 829 e 850 cm<sup>-1</sup> correspondentes a flexão das ligações -CH nas posições 1, 2, 4 do grupo fenil e em 1253cm<sup>-1</sup> relacionado ao estiramento assimétrico de =C-O-C não foram observadas nos scaffolds [125,126]

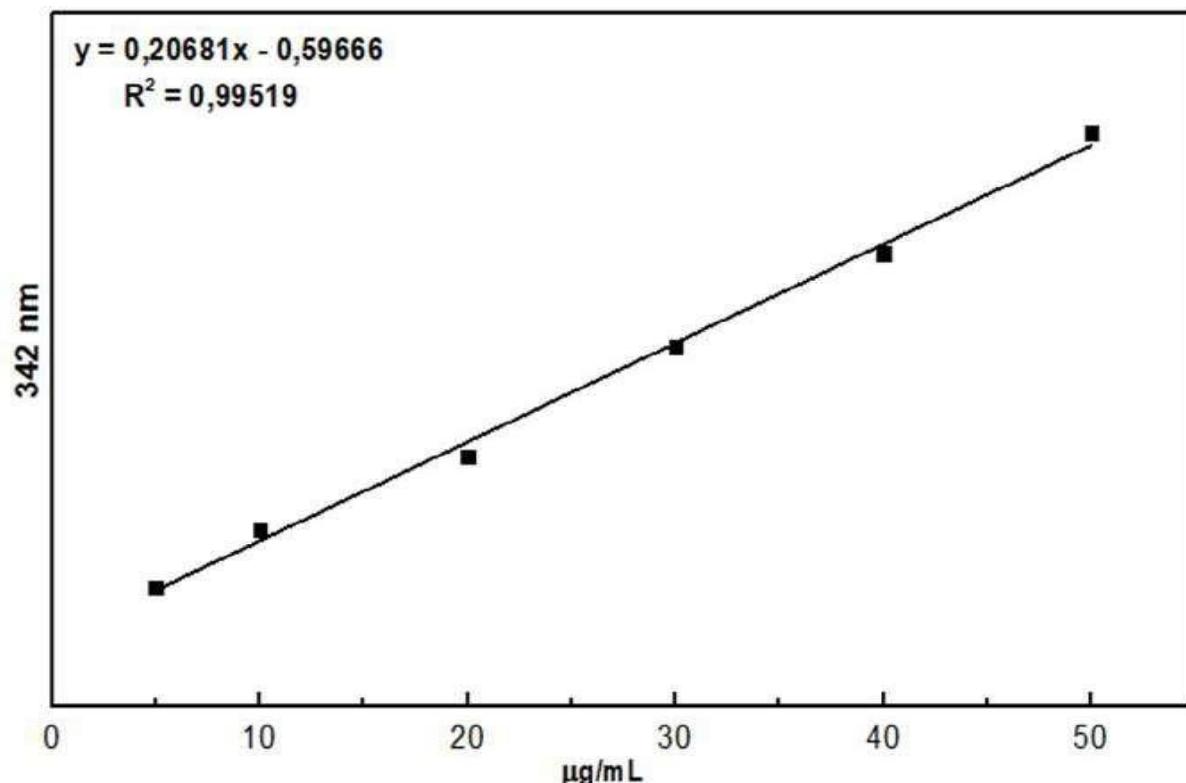
O alargamento dos picos em 1047cm<sup>-1</sup> correspondentes às vibrações de estiramento simétrico do grupo =C-O-C e do grupo mais característico em 930 cm<sup>-1</sup> correspondente ao alongamento vibracional da ligação C-O indicam que houve interação entre o fármaco piperina e a policaprolactona [127].



**Figura 12.** Espectro FTIR dos scaffolds poliméricos eletrofiados.

### 4.3 Análise da liberação controlada da piperina

O espectro na figura 13 mostra a análise espectroscópica no Uv- vís, para identificação do pico ( $\lambda_{\text{máx}} = 342\text{nm}$ ) da piperina, para posterior construção da curva padrão. A curva de calibração de absorbância-concentração da solução de piperina na faixa de 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$  foi obtida a partir da solução de uma concentração inicial de 1 mg/mL em metanol, mostrando que a piperina obedece à lei de Beer- Lambert dentro desta faixa de concentração [119,128], como representado na figura 13. Os resultados mostram que há uma boa relação linear entre a absorbância e a concentração no experimento, apresentando uma curva analítica ( $y = 0,29681x + 0,59666$ ) obtida pelo método dos mínimos quadrados e coeficiente de correlação ( $r^2$ ) igual a 0,99519. Em alguns trabalhos é comum discutir um pouco sobre as dificuldades e limitações encontradas no decorrer da pesquisa.



**Figura 13.** Curva de calibração da Piperina.

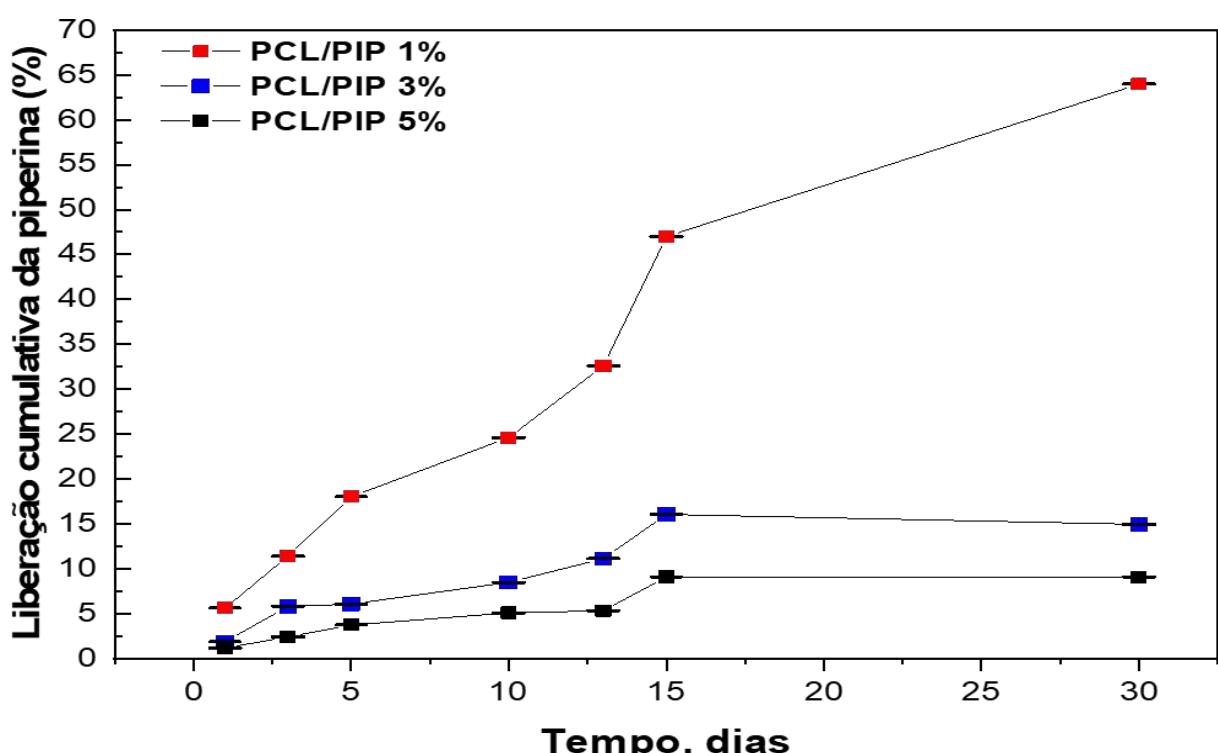
O perfil de liberação do fármaco nas membranas fibrosas para serem utilizadas como sistema de libertação controlada de fármacos, procedeu-se como referido na subseção na seção de materiais e métodos. Os ensaios de liberação de todas as amostras consistiram na incubação das membranas fibrosas em PBS a 37 °C com o intuito de simular o plasma sanguíneo. Os perfis de liberação dos scaffolds contendo piperina (PCL/PIP 1%; PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5%) foram analisados no período de 15 e 30 dias, semelhantemente ao período de tratamento na análise *in vivo* como descrito na metodologia no item 3.4.1.

A liberação controlada de medicamento é um dos aspectos relevantes na utilização de biomateriais como veículos de entrega, através do qual a droga liberada de forma sustentável pode obter efeito terapêutico máximo dentro de um período de tempo desejável. Diversos fatores como absorção de líquido na membrana nanofibrosa, dissolução da droga incorporada no polímero, e o processo de difusão afetam o mecanismo de liberação do fármaco, podendo qualquer um deles ser uma etapa determinante na taxa de liberação [69,127].

O perfil de liberação dos scaffolds estão representados na figura 14. As amostras utilizadas apresentaram a porcentagem de liberação da piperina para o meio de dissolução no tempo pré-determinado. Nos primeiros dias, não ocorreu burst release, liberação acentuada do fármaco após introduzir as membranas no meio de liberação. As nanofibras PCL/PIP 1%,

PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5% liberaram apenas  $5,6\%\pm0,0051$ ,  $1,86\%\pm0,00031$  e  $1,16\%\pm0,00026$  do fármaco, respectivamente, no primeiro dia. Isso está associado a hidrofobicidade do PCL e a retenção da piperina nas membranas, que promoveu uma liberação sustentada do fármaco, pois tanto o PCL como o fármaco são hidrofóbicos.

Em 15 dias, ocorreu uma liberação mais acentuada da piperina nas nanofibras PCL/PIP 1%, que liberou  $47\%\pm0,004$ , enquanto as nanofibras PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5% liberaram apenas  $16,06\%\pm0,00012$  e  $9,08\%\pm0,00031$ , respectivamente. O período de maior liberação do fármaco no meio de dissolução está entre 15 e 30 dias, nesse período  $64\%\pm0,00062$  da piperina foi liberada nas nanofibras de PCL/PIP 1%. Entretanto,  $14,93\%\pm0,0002$  da piperina foi liberada nos scaffolds PCL/PIP 3% e  $9,07\%\pm0,0246$  nos scaffolds PCL/PIP 5%, indicando uma liberação mais sustentada, em relação aos scaffolds PCL/PIP 1%. A liberação é rápida para o meio de dissolução por difusão quando há pouca incorporação do fármaco, enquanto que uma melhor incorporação do fármaco, mantém a droga aprisionada nas fibras. A hidrofobicidade do PCL desempenhou um papel importante na taxa de liberação da droga, pois o perfil hidrofóbico da piperina possibilita uma maior interação e, consequentemente, formação de membranas homogêneas [127, 118]. As nanofibras PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5% apresentaram liberação mais sustentada do que as nanofibras PCL/PIP 1%.



**Figura 14.** Liberação cumulativa da Piperina nos scaffolds PCL/PIP1%, PCL/PIP3% e PCL/PIP 5% no período de 15 e 30 dias de tratamento.

Estas, apresentaram uma incorporação bem menor em relação as membranas de PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5% em concordância com os dados obtidos no espectro UV-Vís.

Embora o polímero policaprolactona (PCL) tenha surgido, nas últimas duas décadas, como uma classe de biomateriais de crescente interesse para aplicação em cirurgias como suturas, dispositivos para fixação interna de fraturas ósseas, drug delivery e scaffolds para regeneração de tecidos ou órgãos [129,130,131], a sua natureza altamente hidrofóbica e a cinética de degradação lenta tendem a dificultar seu uso em diversas aplicações, exigindo nesse caso taxas de absorção mais rápidas [126]. Neste trabalho, foi incorporado a piperina de caráter hidrofóbico e devido a sua afinidade com o PCL possibilitou a lenta liberação observada nos períodos de liberação analisados.

A morfologia da fibra tem um papel importante na porcentagem de fármaco liberado, pois o principal mecanismo de transporte do fármaco é o processo de difusão em membranas simétricas densas, apresentando maior mobilidade e difusão através delas para o meio de liberação [69]. Desta forma, nas membranas com maior diâmetro há formação de poros para que absorção de líquido nas fibras não ocasione a fusão das mesmas e dificultem a migração do fármaco para a superfície e, posteriormente, para o meio de dissolução.

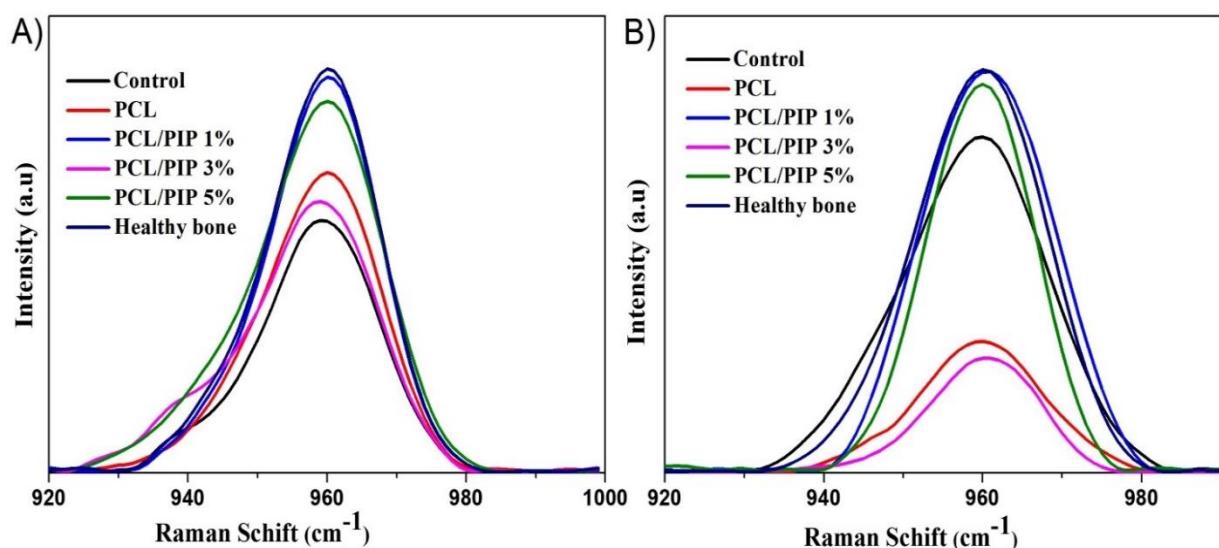
A liberação total da piperina não ocorreu no tempo pré determinado, indicando que algumas moléculas do fármaco ainda se encontravam aprisionadas no scaffold devido a baixa solubilidade do PCL em PBS. E por conseguinte, não apresentaram uma cinética de liberação rápida, necessitando da degradação do PCL para a liberação total do fármaco. De acordo com Wu et al 2020 [118], a curva de liberação de um fármaco apresenta diferentes estágios. O último estágio de liberação consiste na liberação total do fármaco após a quebra da estrutura polimérica em fragmentos oligoméricos, formando microporos que propiciam a liberação por difusão.

#### 4.4 Espectroscopia raman do osso

A cicatrização óssea é monitorada por espectroscopia raman através da concentração/incorporação da hidroxiapatita, que representa o principal componente do osso mineralizado, com um pico de fosfato da hidroxiapatita a ~ 960 cm<sup>-1</sup>[132,133]. Este pico foi utilizado como marcador de reparação óssea no presente estudo, no espectro ósseo basal não tratado [134,135,136].

A concentração/incorporação de hidroxiapatita carbonatada (CHA) pelo osso foi calculada e isso foi usado para monitorar as alterações no conteúdo mineral ósseo no pico de  $960\text{ cm}^{-1}$ , onde quanto maior a intensidade do pico maior é a concentração de CHA [131].

A figura 15 mostra os espectros raman dos defeitos ósseos tratados com os scaffolds sintetizados, sem tratamento com scaffold (grupo coágulo) e do osso cortical em 15 dias de tratamento (figura 15 A) e em 30 dias de tratamento (figura 15B). O espectro Raman do componente inorgânico ósseo mostrou diferenças significativas nas intensidades dos picos entre os grupos aos 15 dias, aproximando mais do osso cortical (B) os grupos PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5%, respectivamente. Em 30 dias, as intensidades dos picos foram similares, identificando um padrão de incorporação da hidroxiapatita carbonatada.



**Figura 15.** Espectros Raman dos defeitos do tecido ósseo nos grupos: osso cortical; coágulo; PCL; PCL/PIP 1%; PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5%; após (A)15 dias e (B) aos 30 dias do tratamento. Espectros representativos mostrando o  $\nu_1\text{-PO}_4\text{ 3-}$  pico de vibração ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) dos grupos para ambos os períodos.

## 4.5 Análise estatística

A análise estatística das amostras de tibias com defeito ósseo foram utilizadas para verificação da área integrada do pico fosfato( $\sim 960\text{cm}^{-1}$ ), com o objetivo de verificação da reparação óssea entre os grupos de scaffolds contendo o fármaco. Além disso, comparar os dados estatísticos da área integrada com a reparação óssea verificada através da análise do tecido ósseo.

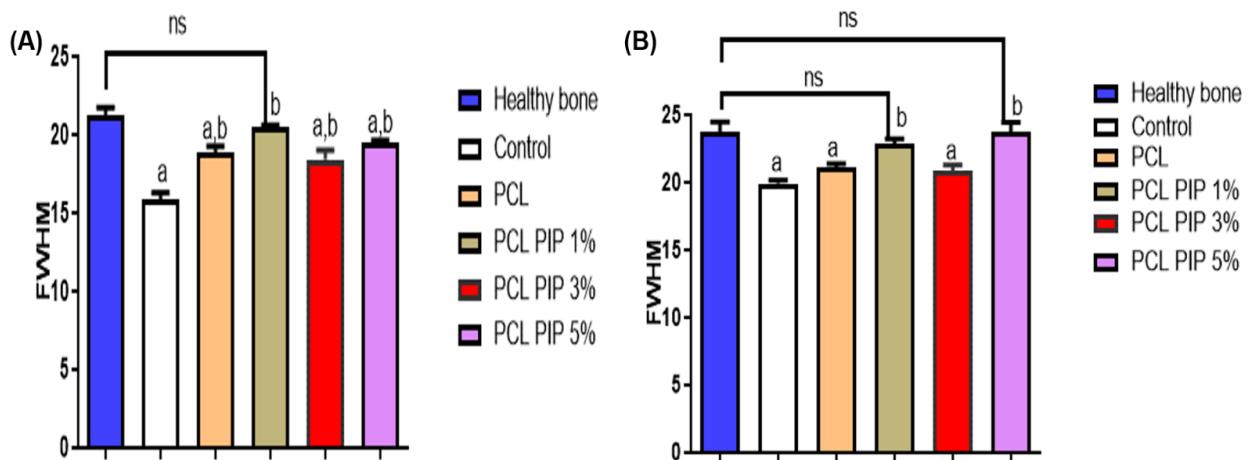
### 4.5.1 Análise Raman

A área integrada do pico em  $960\text{ cm}^{-1}$  foi calculada para todos os grupos e tempos experimentais de 15 e 30 dias e os dados obtidos da área integrada no defeito ósseo cortical são apresentados na Fig. 16 A, B. Este pico foi utilizado como marcador de reparo ósseo [132, 133, 134] no presente estudo, assim como no espectro raman do item 4.4 desta seção, pois o cálculo de áreas integradas da banda de hidroxiapatita em  $\sim 960\text{ cm}^{-1}$  em vibração ( $v_1\text{-PO}_4^{3-}$ ) propicia a obtenção de dados da apatita carbonatada. O monitoramento da reparação óssea por espectroscopia raman através da concentração/incorporação de hidroxiapatita, que representa o principal componente do osso mineralizado [46,47] foi corroborado com as intensidades dos picos observadas no item 4.4 e na figura 15.

A Figura 16A mostrou que, no tratamento em 15 dias todos os grupos apresentaram deposição de fosfato significativamente ( $p<0,001$ ) menor do que o osso cortical (B). No tratamento em 15 dias, o grupo PCL/PIP 1% acelerou o processo de deposição de fosfato de cálcio, pois como se observa na figura 16 A, este grupo apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo coágulo e igual em relação ao osso hígido. Entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos PCL, PCL/PIP3% e PCL/PIP 5% em relação ao coágulo, indicando que houve deposição de fosfato de cálcio semelhante ao grupo coágulo. Estes dados corroboram com os dados obtidos na liberação da piperina no scaffold PCL/PIP 1%, que teve uma liberação crescente e mais rápida em relação aos outros scaffolds em 15 dias de tratamento.

No entanto, no tratamento em 30 dias (Figura 16B), não houve diferenças estatísticas entre os grupos PCL/PIP 1%, PCL/PIP 5% e o osso cortical, indicando a aceleração da deposição de fosfato de cálcio nos grupos PCL/PIP 1% e PCL/PIP 5%. Estes dados corroboram com os resultados observados na liberação da piperina em 30 dias, pois ambos os scaffolds apresentaram uma liberação mais sustentada em relação a 15 dias de tratamento. Vale salientar que, diante dos dados apresentados e do potencial osteocondutora da piperina era esperado que houvesse uma reparação óssea mais significativa com a continuidade da liberação do fármaco.

Esta, também foi limitada devido a interação do PCL- Piperina possibilitar uma taxa de absorção mais lenta.



**Figura 16.** (A) Área do pico  $960\text{cm}^{-1}$  dos animais tratados com scaffold de PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3 %,PCL/PIP 5% após 15 dias de tratamento (B) Área do pico  $960\text{cm}^{-1}$  dos animais tratados com scaffold de PCL,PCL/PIP 1%, PCL/PIP3 %, PCL/PIP 5% após 30 dias de tratamento.

#### 4.5.2 Análise histológica

Os defeitos ósseos são bons modelos para o estudo de reparação tecidual, pois os defeitos são menos propensos a influência de fatores mecânicos e influências maiores do suprimento sanguíneo [137,138,139,140].

Na utilização do biomaterial na reparação de defeitos ósseos é desejável que a estrutura seja simulada e imitada a do osso biológico, para que ele possa se adaptar às mudanças de estresse num certo intervalo de tempo e circular o sangue bem, garantindo o crescimento normal e o metabolismo do tecido ósseo, com a finalidade de acelerar a reconstrução óssea [141]. Dentre os biomateriais poliméricos, os scaffolds se destacam devido sua biocompatibilidade e atuação como estimulantes da proliferação e diferenciação celular, ou como carreadores de fármacos com atividade osteocondutora. O PCL atua como um scaffold carreador do fármaco, devido suas propriedades de hidrofobicidade e excelentes propriedades mecânicas [142] e a Piperina como fármaco com propriedades osteocondutora. Portanto, a ideia de combinar PCL e Piperina neste estudo, foi baseada no fato da piperina ter apresentado propriedades osteocondutora [26,41] e além disso, atividades analgésica, antipirética, antiinflamatória e antioxidante [109,110, 111].

Para avaliação do reparo ósseo, foram escolhidos dois períodos experimentais, 15 e 30 dias. Tendo em vista a análise estatística dos achados histológicos, em critérios quantitativos e

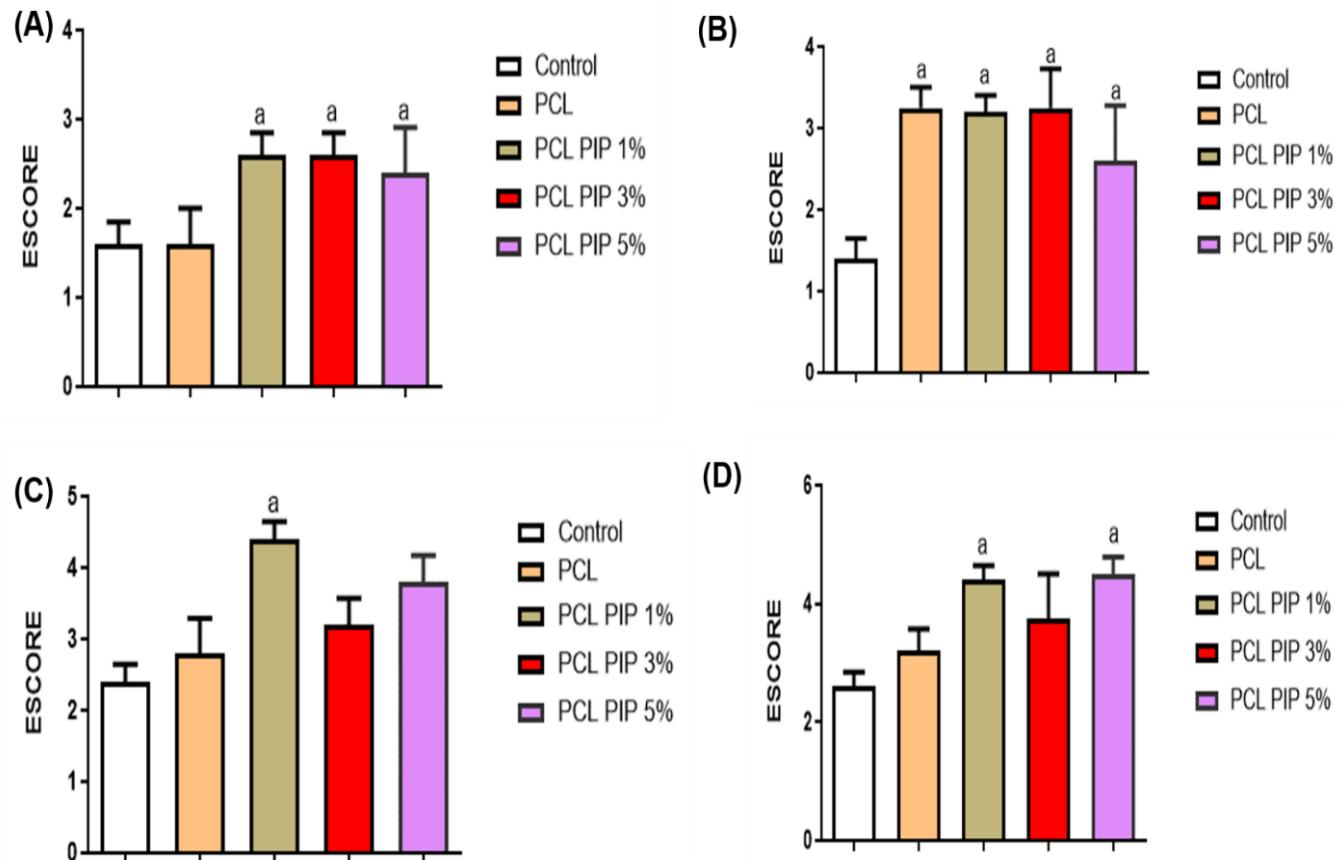
qualitativos do presente estudo, optou-se por avaliar os critérios quantitativos e, posterior avaliação qualitativa para descrever os mecanismos envolvidos no processo de reparo ósseo de defeitos tratados ou não com os scaffolds PCL- Piperina.

O processo de reparo ósseo é descrito pela fase reparadora e fase de remodelação [49]. Estas fases foram avaliadas pela análise histopatológica semiquantitativa utilizando os critérios de união e maturação óssea pelo sistema de escore histológico descrito por Alves et al 2018[117] e Hedner e Linde, 1995[120] como parâmetros para avaliação quantitativa do reparo ósseo.

No tratamento em 15 dias (Figura 17 A) os grupos PCL não apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo controle negativo, indicando um reparo ósseo semelhante ao grupo controle. Entretanto, os grupos PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5% apresentaram reparo ósseo estatisticamente iguais e em relação ao grupo controle apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, indicando melhor reparo ósseo nos grupos contendo a piperina. A remodelação óssea do tratamento em 15 dias (Figura 17B) não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5%, indicando um processo de diferenciação celular estimulado nos grupos contendo a membrana policaprolactona.

No tratamento em 30 dias (Figura 17C) a reparação óssea do grupo PCL/PIP 1% apresentou reparação óssea estatisticamente diferente do grupo controle. Entretanto, os grupos PCL, PCL/PIP 3% e PCL/PIP 5% não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, indicando atraso na reparação óssea comparado ao grupo PCL/PIP 1%. A remodelação óssea do tratamento em 30 dias (Figura 17D), os grupos PCL/PIP 1% e PCL/PIP5% não apresentaram diferenças estatísticas significativas, e em relação ao grupo controle apresentaram diferenças significativas, indicando um padrão remodelação óssea significativa dos grupos PCL/PIP 1% e PCL/PIP 5% em relação aos demais grupos.

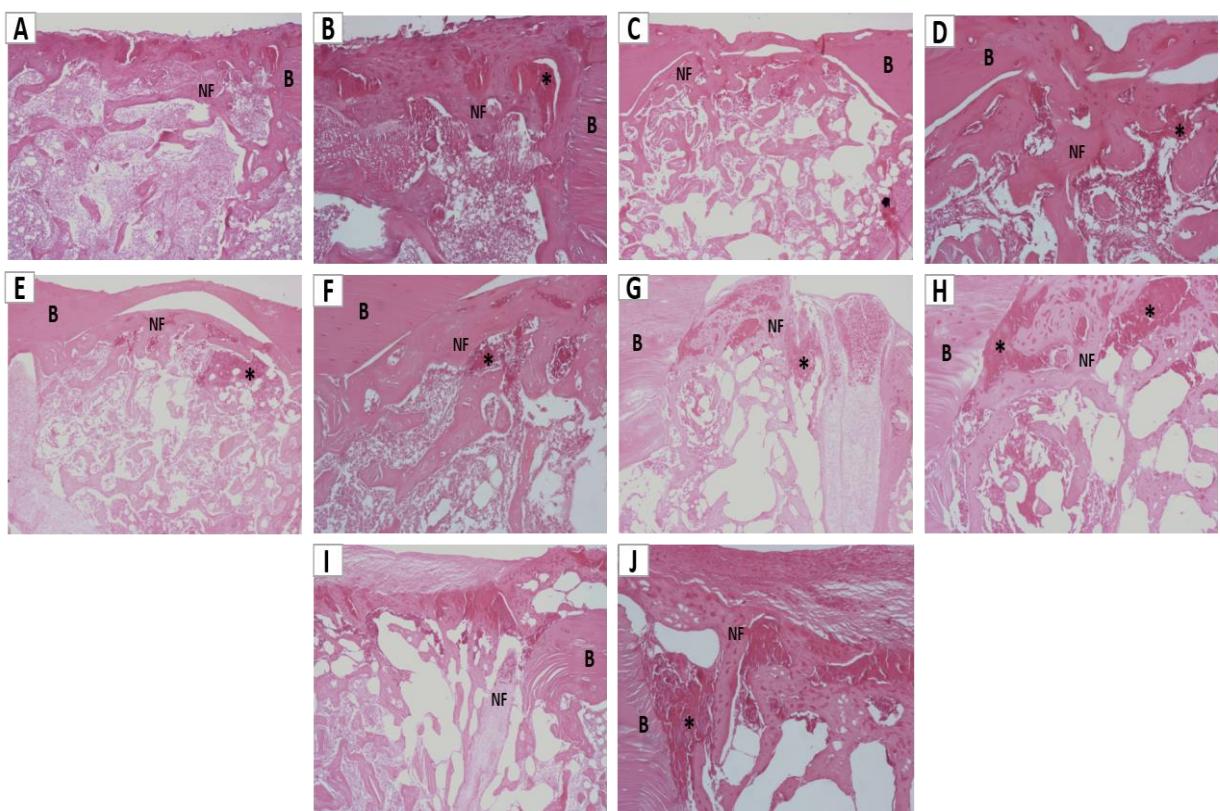
A fase reparadora ocorre com o aparecimento de um grande número de fibroblastos produtores de colágeno tipo III responsáveis pela formação de um calo fibroso, no qual as fibras colágenas envolvem a região lesionada. À medida que a ação dos macrófagos prossegue, uma nova rede capilar é formada oriunda das células endoteliais remanescentes dos vasos rompidos e das células mesenquimais indiferenciadas, as quais invadem a região do coágulo, juntamente com fibroblastos e osteoblastos, para formar, rapidamente, um novo tecido ósseo no local. Na fase remodeladora, processos de reabsorção e neoformação ocorrem até que a região lesionada retome as características morfológicas, biomecânicas e funcionais que possuíam antes da lesão [49].



**Figura 17.** (A) Score de neoformação óssea dos animais tratados com PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP3%, PCL/PIP5% após 15 dias de tratamento; (B) Score de remodelação óssea dos animais tratados com PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP3%, PCL/PIP5% após 15 dias de tratamento; (C) Score de neoformação óssea dos animais tratados com PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP3%, PCL/PIP5% após 30 dias de tratamento; (D) Score de remodelação óssea dos animais tratados com PCL, PCL/PIP 1%, PCL/PIP3%, PCL/PIP5% após 30 dias de tratamento. Control- grupo sem tratamento(controle negativo). a=p<0,05 quando comparado ao grupo controle negativo.

A análise histopatológica qualitativa avaliou o defeito cortical e suas áreas marginais (Figura 20 e 21). Após 15 dias do período experimental, o grupo controle (Figura 18 A, B) apresentou quantidade moderada de osso novo nas bordas, com uma reparação inicial preenchendo a margem óssea. Na lesão, há trabéculas de tecido reparado com resquícios de áreas fibrinohemorrágicas e áreas de neoformação óssea. Entretanto, é um osso imaturo, celularizado e sem evidências de mineralização. O grupo PCL (Figura 18 C, D) apresentou uma área de maior retração óssea e diminuição do defeito ósseo, pois as trabéculas ósseas se

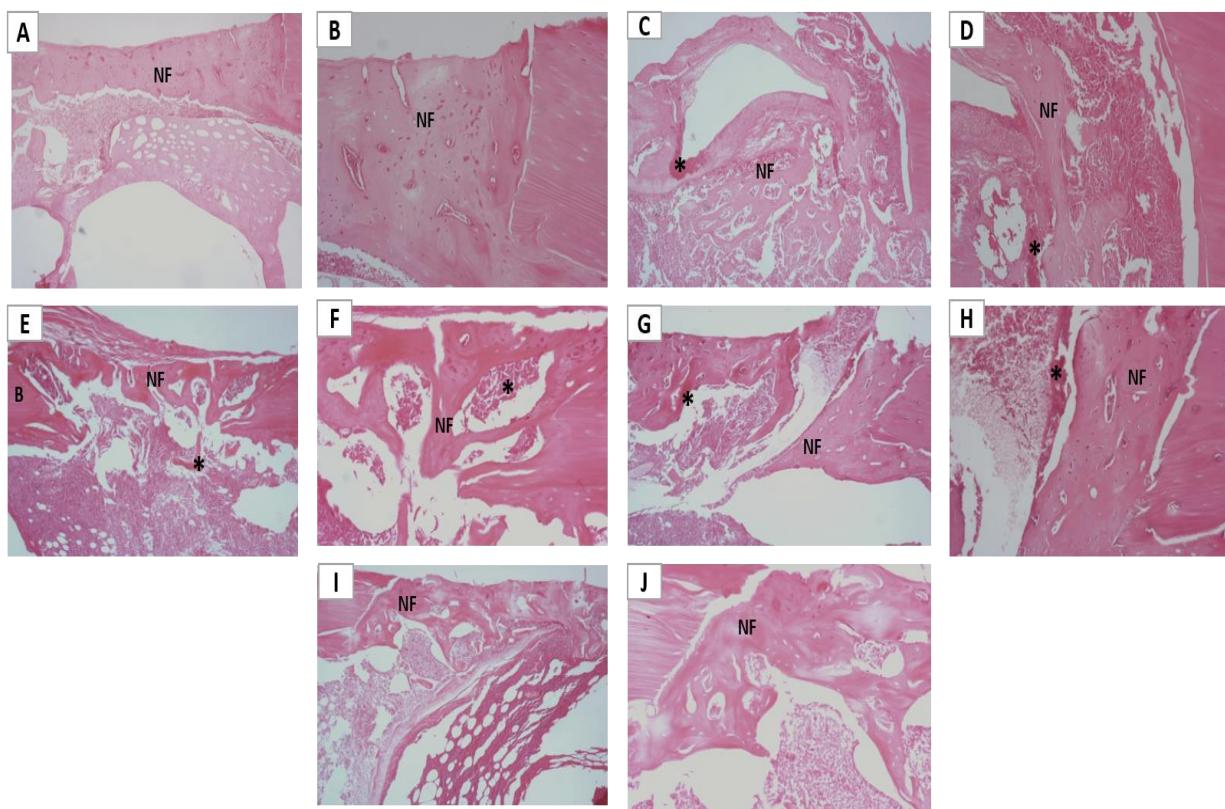
concentraram no interior do defeito ósseo, adentrando na região da medula óssea, enquanto no grupo controle o trabeculado ósseo ficou limitado à superfície externa da cortical. Logo, no grupo PCL, fica mais evidente as células mesenquimais se diferenciando em osteócitos. No grupo PCL/PIP 1% (Figura 18 E, F), PCL/ PIP 3% (Figura 18 G, H) e PCL/PIP 5% (Figura 18 I, J) ficou evidente formação de trabéculas ósseas, estimulando o reparo da lesão semelhante ao PCL, e no entorno do tecido de granulação, áreas de neoformação óssea, onde se encontram células mesenquimais indiferenciadas e outras se diferenciando em osteócitos.



**Figura 18.** Análise histológica dos grupos de scaffolds após 15 dias de implantação. (A) coágulo 4X; (B) coágulo 10X; (C) PCL 4X; (D) PCL 10X; (E) PCL/PIP1% 4X; (F) PCL/PIP1% 10X ; (G) PCL/PIP3% 4X; (H) PCL/PIP3% 10X; (I) PCL/PIP5%. 4X; (J) PCL/PIP5%. 10X . B- Osso saudável; NB- Osso neoformado; \*-vascularização.

Em 30 dias, no grupo controle (Figura 19 A, B) ocorreu reparação óssea em toda extensão do defeito ósseo, com espessura mais delgada, não havendo formação óssea madura, contendo medula óssea, área fibrosa com tecido de granulação e linhas de mineralização mais evidentes. No grupo PCL (Figura 19 C, D) houve formação de trabéculas ósseas na parte mais interna do defeito ósseo, caracterizado por uma neoformação óssea no entorno da membrana PCL, que não foi totalmente degradada, ficando evidente áreas fibrinohemorrágicas e trabéculas de osso neoformado. No grupo PCL/PIP 1% (Figura 19 E, F) houve neoformação óssea em

extensão. Entretanto, isto não foi observado na espessura do defeito, por causa da diferenciação óssea na área do tecido de granulação. No grupo PCL/PIP 3% (Figura 19 G, H) e no grupo PCL/PIP 5% (Figura 19 I, J) houve um preenchimento ao longo de toda a extensão do defeito ósseo às custas de um processo inflamatório no entorno da membrana. A maioria dos animais apresentou reparação óssea completa na sua extensão ou apenas defeitos menores, e quanto à sua maturidade, foram observados exemplares com espículas ramificadas e anastomosadas de osso prematuro organizados em padrão heterogêneo e áreas de tecido ósseo compacto em todos os grupos.



**Figura 19.** Análise histológica dos grupos de scaffolds após 30 dias de implantação. (A) coágulo 4X; (B) coágulo 10X; (C) PCL 4X; (D) PCL 10X; (E) PCL/PIP1% 4X; (F) PCL/PIP1% 10X ; (G) PCL/PIP3% 4X; (H) PCL/PIP3% 10X; (I) PCL/PIP5%. 4X; (J) PCL/PIP5%. 10X . B- Osso saudável; NB- Osso neoformado.

Deste modo, pode-se subjetivamente observar que os grupos experimentais produziram uma maior quantidade de osso, entretanto de forma mais difusa ao redor da membrana utilizada no defeito. Este padrão de reparo ósseo observado nos grupos contendo fármaco pode estar associado a natureza hidrofóbica do PCL e da Piperina, que propiciou a liberação lenta do fármaco, e que apesar de possuir propriedades anti-inflamatórias foi limitada pelo seu aprisionamento no scaffold de PCL, pois embora o PCL tenha demonstrado, em pesquisas

recentes, excelentes biocompatibilidade, eficácia in vitro e in vivo e fácil processamento através da eletrofiação, este polímero apresenta limitações quanto a sua natureza altamente hidrofóbica, pois a hidrofilicidade das superfícies dos scaffolds é muito importante para o comportamento celular[129,130].

Vale ressaltar, que o PCL não foi completamente degradado no período experimental, pois a degradação do PCL é lenta em comparação com seus copolímeros, tornando assim, o PCL mais adequado para aplicações com a degradação a longo prazo na regeneração óssea [142]. A biodegradação do PCL é lenta e ocorre em duas etapas, permitindo que ele seja usado em SLF com liberação de até mais de um ano [6]. Essa biodegradação lenta se deve à hidrofobicidade da superfície e à alta cristalinidade do PCL [4]. Dessa forma, a alta cristalinidade do PCL pode ser um problema para o desenvolvimento de SLF visto que este requer que o polímero apresente uma biodegradabilidade curta [5]. Haja vista que, não ocorrendo a degradação completa do polímero, consequentemente não ocorreu a liberação completa do fármaco e mediante os resultados apresentados de atraso na reparação a liberação rápida da piperina é mais adequada do que a liberação mais prolongada observada nos scaffolds PCL-Piperina.

# **Capítulo 5**

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

A regeneração óssea proposta neste trabalho através da atuação da piperina nos grupos contendo PCL/Piperina foi significativamente acentuada em relação ao grupo controle negativo.

Estes dados foram justificados pela melhor regeneração dos grupos PCL/PIP 1% em 15 dias de tratamento e dos grupos PCL/PIP1% e PCL/PIP 5% em 30 dias de tratamento do defeito ósseo, por espectroscopia raman e análise histológica. Houve uma liberação prolongada promovida pelo PCL, um carreador de fármaco de natureza hidrofóbica, bastante utilizado em estudos de liberação de fármacos, e consequentemente, a liberação da piperina foi gradualmente lenta e a neoformação óssea ficou restrita a parte interna do defeito ósseo, configurando um osso imaturo e com diferenciação celular evidente. Portanto, para verificação da atividade da piperina no reparo ósseo é necessária uma liberação maior no tempo de tratamento utilizado. Então, sugere-se em trabalhos futuros a síntese de scaffolds mais hidrofílicos com o PCL para a aceleração da liberação do fármaco e, consequentemente, reparo ósseo mais significativo.

## REFERÊNCIAS

1. MEDEIROS, J. et al. Nanohydroxyapatite/Graphene Nanoribbons Nanocomposites Induce in Vitro Osteogenesis and Promote in Vivo Bone Neoformation. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 4, n. 5, p. 1580–1590, 2018.
2. LEITE, A. D. F. et al. Estudo in vivo da reparação óssea guiada pela membrana biológica de poliestireno com colágeno e norbixina with collagen and norbixin Study in vivo of the bone repair guided by the polystyrene biological membrane. **Revista Biotecnologia & Ciência**, v. 8, n. 1, p. 15–21, 2019.
3. SOUSA, R. C. et al. In vivo evaluation of bone repair guided with biological membrane based on polyhydroxybutyrate and norbixin. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, n. September, p. 1–12, 2021.
4. SILVA, V.V. Aplicações de biomateriais em ortopedia e engenharia de tecido ósseo. **Revista Saúde e Meio ambiente**, v.5, n.2, p. 14-27, 2017.
5. SABALI et al. Bone regeneration using mesenchymal stem cells: challenges and future perspectives in regenerative surgery. **Regenerative Medicine**, v. 10, n. 5, p. 543-547, 2015.
6. BATTACHARYA. I, GHAYOR. C, WEBER F. E. The use of adipose tissue-derived progenitors in bone tissue engineering: a review. **Transfus Med Hemother**, v. 43, n. 5, p. 336-343, 2016.
7. BAGDE, A. D. et al. State of the Art Technology for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery. **Irbm**, v. 40, n. 3, p. 133–144, 2019.
8. SANTOS, dos.A.S.M. **Desenvolvimento de membranas fibrosas para a libertação controlada e localizada de antibióticos**. 2016. Dissertação (Mestrado Integrado em engenharia Química)- Faculdade de ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Portugal.
9. SHI, D. (2006). **Introduction to biomaterials**. Tsinghua University Press. Beijing. ISBN: 787302108078.
10. CARVALHO, R.M.G. **Desenvolvimento de membranas nanofibrosas para a liberação controlada e localizada de antibióticos**. Dissertação (Mestrado Integrado em engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Portugal,2015.
11. CALORI, I. R. et al. Polymer scaffolds as drug delivery systems. **European Polymer Journal**, v. 129, p. 109-621, 2020.
12. BOSE, S., & TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. **In Acta Biomaterialia**, v.8, n.4, p. 1401– 1421, 2012.

13. BOSE, S. TARAFDER, S. EDGINGTON, J. BANDYOPADHYAY, A. Calcium phosphate ceramics in drug delivery. **JOM**, v.63, n.4, p.93–98, 2011.
14. GHAEI, A. et al. Biomimetic nanocomposite scaffolds based on surface modified PCL-nanofibers containing curcumin embedded in chitosan/gelatin for skin regeneration. **Composites Part B: Engineering**, v. 177, p. 1-10, 2019.
15. ETMINANFAR, M. R. et al. Biocompatibility and drug delivery efficiency of PEG-b-PCL/hydroxyapatite bilayer coatings on Nitinol superelastic alloy. **Ceramics International**, v. 46, n. 8, p. 12711–12717, 2020.
16. LAM, C. X. F. et al. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 90, n. 3, p. 906–919, 2009.
17. MARTINEZ-DIAZ, S. et al. In Vivo Evaluation of 3-Dimensional Polycaprolactone Scaffolds for Cartilage Repair in Rabbits. **American Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 3, p. 509–519, 2010.
18. FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis - Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006.
19. BEHERA, A. K.; BARIK, DR. B.B.; JOSHI, S. Poly- $\epsilon$ -caprolactone based microspheres and nanospheres: a review, **Publication House**, v. 1,n. 2, p. 38-45, 2012.
20. LUKMANUL HAKIM, S.; KUSUMASARI, F. C.; BUDIANTO, E. Optimization of biodegradable PLA/PCL microspheres preparation as controlled drug delivery carrier. **Materials Today: Proceedings**, v. 22, p. 306–313, 2020.
21. GERALDES, A. N; MIYAMOTO, D. M; DE LIRA, R.A; JUNIOR, J A. O; NASCIMENTO, N; DE AZEVEDO, M.B.M. Microspheres of poly( $\epsilon$ -caprolactone) loaded holmium-165: Morphology and thermal degradation behavior. **INAC 2011: International Nuclear Atlantic Conference Nuclear Energy**, p.24-28, 2011.
22. BEHTAJ, S. et al. Electrospun PGS/PCL, PLLA/PCL, PLGA/PCL and pure PCL scaffolds for retinal progenitor cell cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 166, p. 107846, 2021.
23. ESKITOROS-TOGAV, M. BULBUL, Y. E. TORT, S. DEMIRTAS KORKMAZ, F. ACARTURK, F. & DILSIZ, N . Fabrication of doxycycline-loaded electrospun PCL/PEO membranes for a potential drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 565, p. 83–94, 2019.
24. AZIMI, B. NOURPANAH, P. RABIEE, M. ARBAB, S. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Fiber: an overview. **J. Eng. Fiber. Fabr.** v.9, n.3, p. 74–90. 2014.
25. LAHA, A.; SHARMA, C. S.; MAJUMDAR, S. Electrospun gelatin nanofibers as drug carrier: Effect of crosslinking on sustained release. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, n. 10, p. 3484–3491, 2016.

26. KIM, D. Y.; KIM, E. J.; JANG, W. G. Piperine induces osteoblast differentiation through AMPK- dependent Runx2 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 1497–1502, 2018.
27. LI, C. et al. The protective effect of piperine on ovariectomy induced bone loss in female mice and its enhancement effect of osteogenic differentiation via Wnt/β-catenin signaling pathway. **Journal of Functional Foods**, v. 58, p. 138–150, 2019.
28. FILHO, A. L. M. M. et al. Evaluation of inorganic and organic bone components after application of an apatite-coated Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> implants as scaffolds for bone repair. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 334–339, 2014.
29. MANDAIR, G. S.; MORRIS, M. D. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. **BoneKEy Reports**, v. 4, p. 1–8, 2015.
30. SÁ, P. A. DE. **Utilização de engenharia de tecidos no tratamento de feridas crônicas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2015.
31. MACIEL, B. B. **Isolamento, cultivo e caracterização de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade de Santa Catarina. Curitiba, 2010.
32. RODRIGUES, I. C. P. et al. Cardiac tissue engineering: current state-of-the-art materials, cells and tissue formation. **Einstein**, São Paulo, v. 16, n. 3, 2018.
33. OLIVEIRA, L. S. DE A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37-44, 2010.
34. CARDOSO, G. B. C.; ARRUDA, A. C. F. DE. O papel das células tronco na engenharia tecidual. **Cienc. cogn**, v. 14, n. 3, p. 214–219, 2009.
35. KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **Journal of Dental Education**, v. 65, n. 5, p. 456–462, 2001.
36. SHIRANE, Y.H. ODA, Y. D et al. Implantes de biomateriais em falha óssea produzida na fíbula de ratos. **Revista Brasileira Ortopédica**, v.45, n.5, p. 478-482, 2010.
37. FERNANDES, V.A.R et al. Matrizes poliméricas para a regeneração óssea. Revisão da Literatura. **Revista Multidisciplinar da Saúde (RMS)**, v. 2, n.3, p. 42-53, 2020.
38. BARBANTI, S.H., ZAVAGLIA, C.A.C. & DUEK, E.A.R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Ciência e Tecnologia**, v.15, n.1, p. 13–21, 2005.
39. GAUTAM, S. et al. Gelatin-polycaprolactone-nanohydroxyapatite electrospun nanocomposite scaffold for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 119, p. 1-14, 2021.
40. ZHU, G. et al. Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 11, p. 4110–4140, 2021.

41. LI, Y. et al. Characterization and evaluation of polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds with extra surface morphology by cryogenic printing for bone tissue engineering. **Materials & Design**, v. 205, p. 1-9, 2021.
42. O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.
43. MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 30–40, 2004.
44. DU, X. et al. 3D printing of mesoporous bioactive glass/silk fibroin composite scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 103, p. 1-10, 2019.
45. BAGDE, A. D.; KUTHE, A. M.; QUAZI, S.; GUPTA, V.; JAISWAL, S.; JYOTHILAL, S.; LANDE, N., & NAGDEVE, S. State of the Art Technology for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery. **IRBM**, v. 40, n. 3, p. 133–144, 2019.
46. LAHA A., SHARMA, C. S., & MAJUMDAR, S. (2016). Electrospun gelatin nanofibers as drug carrier: Effect of crosslinking on sustained release. **Materials Today: Proceedings**, v.3, n. 10, p. 3484–3491.
47. BI, Y.; LIN, Z.; DENG, S. Fabrication and characterization of hydroxyapatite/sodium alginate/chitosan composite microspheres for drug delivery and bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v.100, p. 576–583, 2019.
48. MORENO, M. S. M. DA S. Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo. **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**, p. 1–30, 2014.
49. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Tecido ósseo**. In: . (Org.) Histologia Básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. p. 111-128.
50. ROLIM, A. E. H. **Estudo in vivo de materiais biomiméticos, associados ou não à administração enteral de estrôncio, para o reparo de defeito ósseo**. Tese (Doutorado em processos interativos entre órgãos e sistemas). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2013.
51. SILVA, P; JUDAS, F. O papel do osteoclasto na fisiopatologia de doenças do aparelho locomotor e na condição de alvo terapêutico. **Repositório do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra**, p.1-43,2013
52. TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 12<sup>a</sup>. edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2016.
53. 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.
54. ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Bone tissue: morphological and histophysiological aspects. **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v. 35, n. 2, p.191-98, 2006.
55. RODRIGUES, V. **Análises dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos**. Dissertação (Mestrado em

- Biotecnologia) –Inter- unidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
56. FABRIS, A. L. S. **Análise do processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos preenchidos com osso autógeno ou Bone Ceramic®.** Um estudo histométrico e imunoistoquímico. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/UNESP. Araçatuba, São Paulo, 2014.
57. LUVIZUTO, R. E. **O efeito da bmp-2 sobre as propriedades osteocondutora do betatricálcio fosfato em defeitos de calvaria de ratos.** Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia/ Unesp. Araçatuba, São Paulo, 2011.
58. RIBEIRO et al.. Biocerâmicas e polímero para a regeneração de defeitos ósseos críticos. **Rev. Ciênc. Méd.** v. 3, n. 3, p. 298-302, 2014.
59. LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**, 3rd Edition. [S.I.]: Academic Press, 2007.
60. SHARMILA, G. et al. Fabrication and characterization of Spinacia oleracea extract incorporated alginate/carboxymethyl cellulose microporous scaffold for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 430-437, 2020.
61. ZHU, T. et al. Engineered three-dimensional scaffolds for enhanced bone regeneration in osteonecrosis. **Bioactive Materials**, v. 5, n. 3, p. 584–601, 2020.
62. VAZ, R.I.L. **Preparação de Scaffolds por combinação das técnicas de fotopolimerização e electrospinning para engenharia de tecidos.** Dissertação (Mestrado Integrado em engenharia Química) - Faculdade de ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Portugal, 2017.
63. ROSA, V. et al. Tissue engineering: From research to dental clinics. **Dental Materials**, v. 28, n. 4, p. 341 – 348, 2012.
64. TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of The Royal Society Interface**. v. 6, n. 3, p. 311–324, 2009.
65. OLIVEIRA, P. S. et al. Obtenção de scaffolds bioabsorvíveis a partir de blenda de PLGA e IR com adição de hidroxiapatita. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 24, n. 3, 2019.
66. ROSETI, L. et al. Scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and new perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 1246 – 1262, 2017.
67. LIU, Y. et al. Electrospinning of aniline pentamer-graft-gelatin/PLLA nanofibers for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 12, p. 5074–5080, 2014.
68. JAIN K.K. Drug delivery systems. Methods in Molecular Biology. **Human Press**. v.437, n.1, p. 1- 51, 2008.
69. PORTA, V.; YAMAMICHI, É.; STORPIRTIS, S. Avaliação biofarmacêutica in vitro de cápsulas de fluconazol. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 333–343, 2002.

70. SHAIK, M.R., KORSAPATI, M. & PANATI, D. PLGA/mesoporous silica hybrid structure for controlled drug release. **International Journal of Pharma Sciences**, v.98, n.2, 112–116, 2012.
71. SANTOS, M. S. A. **Desenvolvimento de membranas fibrosas para a liberação controlada e localizada de antibióticos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. Portugal, 2016.
72. LYRA, et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.26, n.5, p. 784- 793, 2007.
73. NASCIMENTO, R de Souza I.V. **Desenvolvimento de sistemas quitosana|piperina para liberação controlada de fármacos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia dos Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2014.
74. LAÇIN, N. et al. The effect of graft application and simvastatin treatment on tibial bone defect in rats. A histological and immunohistochemical study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 1-12, 2019.
75. RIBEIRO et al.. Biocerâmicas e polímero para a regeneração de defeitos ósseos críticos. **Rev. Ciênc. Méd.** v.13, n.3, p. 298-302, 2014.
76. JAIN, R.; SHETTY, S.; YADAV, K. S. Unfolding the electrospinning potential of biopolymers for preparation of nanofibers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 1-15, 2020.
77. RANGANATHAN, S.; BALAGANGADHARAN, K.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan and gelatin-based electrospun fibers for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 354–364, 2019.
78. SEBASTIAN, T. et al. Synthesis of hydroxyapatite fibers using electrospinning: A study of phase evolution based on polymer matrix. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 40, n. 6, p. 2489–2496, 2020.
79. SARWAR, Z. et al. Fabrication and characterization of PEBA fibers by melt and solution electrospinning. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 6, p. 6074–6085, 2019.
80. TIWARI, A. P; ROHIWAL, S. S. Synthesis and Bioconjugation of Hybrid Nanostructures for Biomedical Applications. In Hybrid Nanostructures for Cancer Theranostics: Elsevier,2019, p. 17-41.
81. RAMOS, S. L. F. **Membranas de policaprolactona obtidas por eletrofiação para utilização em engenharia tecidual**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2011.
82. ELNAKADY, Y.A., AL REZ, M.F., FOUAD, H., ABUELREICH, S., ALBARRAG, A.M., MAHMOOD, A.; FOUAD, H.; ABUELREICH, S.; ALBARRAG, A. M.; MAHMOOD, A.; ALOTHMAN, O. Y.; ELSARNAGAWY, T.; ANSARI, S. G. Vascular Tissue Engineering Using Polycaprolactone Nanofibrous Scaffolds Fabricated via Electrospinning. **Science of Advanced Materials**, v.7, n.3, p. 407–413, 2015.

83. MENDES, S.S. **Desenvolvimento de Membranas Assimétricas Eletrofiadas para Regeneração da Pele.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. Portugal, 2017.
84. PILLAY, V., DOTT, C., CHOONARA, Y.E., TYAGI, C., TOMAR, L., KUMAR, P., TOIT, L., NDESENDO, V.M.K. A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. **Journal of Nanomaterials.** P. 1-22, 2013.
85. GAO, Y., TRUONG, B.Y., ZHU, Y., KYRATZIS, L. I. Electrospun antibacterial nanofibers: Production, activity, and in vivo applications. **Journal of Applied Polymer Science.** v. 131, n. 18, p. 1-13, 2014.
86. HU, X., LIU, S., ZHOU, G.; HUANG, Y., XIE, Z., JING, X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 185, n. 1, p.12-21, 2014.
87. ZHANG, C-L., YU, S-H. Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects. **Chemical Society Reviews**, v.4, n.13, p. 4423-4448, 2014.
88. I, W., SUN, Y., YANG, F., VAN DEN BEUCKEN, J.J.J.P., FAN, M., CHEN, Z., JANSEN, J.A. Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. **Pharmaceutical Research**,v. 28, p.1259–1272, 2011.
89. LI, W. & TUAN, R.S. Fabrication and Application of Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering. **Current Protocols in Cell Biology**, v.25, p.1–12, 2009.
90. PRAMANIK, A., MITRA, A., ARUMUGAM, M., BHATTACHARYYA, A., SADHUKHAN, S., RAY, A., HALDAR, S., MUKHOPADHYAY, U.K., MUKHERJEE, J., Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*, **Folia Microbiol**, v. 57, p. 71–79, 2012.
91. HASAN, A., et. al, Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts, **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 11-25, 2014.
92. SCHEIDT, D. T. **Eletrofiação da quitosana e sua aplicação como curativo para feridas.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 2018.
93. JABUR A., ABBAS L. K., MUHI S. M. The Effects of Operating Parameters on the Morphology o f Electrospun Poly vinyl Alcohol Nanofibres. **Journal of University of kerbala.** p. 35-46, 2015.
94. RAMAKRISHNA, S. **An introduction to electrospinning and nanofibers.** World Scientific, 2005.
95. HAIDER, A., HAIDER, S. & KANG, I.-K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry.** v.11, p. 1165-1188, 2015.
96. MEGELSKI, S. et al. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. **Macromolecules**, v. 35, n. 22, p. 8456–8466, 2002.

97. COSTA, R. G. F. et al. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: Fundamentação teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012.
98. REUL, L. T. A., CARVALHO, L. H; CANEDO, E. L. Características Reológicas e Térmicas de Compósitos Policaprolactona/Babaçu. **REMAP**, v.12, n.3, 174–182, 2017.
99. SRAVANTHI, R. Preparation and characterization of poly (  $\epsilon$  -caprolactone ) PCL scaffolds for tissue engineering applications. Degree Of Master of Technology, National Institute of Technology, Rourkela, 2009.
100. FERREIRA, W. S., FTANKLIM, T. N., LOPES, N. D.; de LIMA, M. E. F. Piperine, its analogues and derivatives: Potencial as antiparasitic drugs. **Revista Virtual de Química**, v.4, n.3, p. 208– 224, 2012.
101. PISSINATE, K. **Atividade citotóxica de Piper nigrum e Struthanthus marginatus. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos.** Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.
102. BERTIN CARNEVALLI, D., & PAULA SERRA DE ARAUJO, A. Atividade Biológica da Pimenta Preta (Piper nigrum L.): Revisão de Literatura Biological Activity of Black Pepper (Piper nigrum L.): Literature Review. **In UNICIÊNCIAS**, v.17, n.1, p 41-46, 2013.
103. CHAUDHRY, N.M.; TARIQ, P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. **Pak J. Pharm. Sci.**, v.19, n.3, p.214-218, 2006.
104. WANG, Y. et al. Electrochemical quantification of piperine in black pepper. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125606, 2020.
105. THIEL, A. et al. Black pepper constituent piperine: Genotoxicity studies in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 350–357, 2014.
106. NASCIMENTO, R de Souza I.V. **Desenvolvimento de sistemas quitosana|piperina para liberação controlada de fármacos.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia dos Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2014.
107. SELVENDIRAN, K.; BANU, S. M.; SAKTHISEKARAN, D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Clinica Chimica Acta**, v. 350, n. 1– 2, p. 73-78, 2004.
108. PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597- 673, 1997
109. KHAJURIA, A. et al. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 189, n. 1-2, p. 113-118, 1998.
110. ASASUTJARIT, R. et al. Application of film-forming solution as a transdermal delivery system of piperine-rich herbal mixture extract for anti-inflammation. **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. 1-11, 2020.

111. MITTAL, R.; GRUPTA, R. L. In vitro Antioxidants Activity of Piperine. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 122, p. 163-167, 2000.
112. BALAKOUL, I.; ARUNA, K. Evaluation of the Liver Protective Potential of Piperine on Active Principle of Black and Long Pepper. **Planta Medica**, v. 59, p. 413-4119, 1993.
113. SHITYAKOV, S. et al. Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 149–161, 2019.
114. MARTINS, C. A. et al. Curcumin in combination with piperine suppresses osteoclastogenesis in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 10, p. 1638–1645, 2015.
115. CARDOSO, J. F. R. et al. Piperina Avaliação Do Efeito Tóxico Da Piperina. **Revista de Ciências da Vida**, v. 25, p. 85–91, 2005.
116. ALVES A.M.M, FORTALEZA L.M.M, MAIA FILHO A.L.M, et al. Evaluation of bone repair after application of a norbixin membrane scaffold with and without laser photobiomodulation ( $\lambda$ 780nm). **Lasers Med Sci**, v. 33, n. 7, p. 1.493-1.504, 2018.
117. WU, J. et al. Mechanism of a long-term controlled drug release system based on simple blended electrospun fibers. **Journal of Controlled Release**, v. 320, p. 337–346, 2020.
118. CHONG, W. H. et al. Synthesis and Characterisation of Piperine-loaded Starch Nanoparticles. **Journal of Physical Science**, v. 31, n. 1, p. 57–68, 2020.
119. HEDNER E, LINDE A. Efficacy of bone morphogenetic protein (BMP) with osteopromotive membranes-an experimental study in rat mandibular defects. **Eur J Oral Sci**, v.103, n. 4, p. 236-241, 1995.
120. BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, p.325-347, 2010.
121. WHITE, C. Infrared Analysis of Piperine in Black Pepper. Developed through the National Science Foundation-funded. 2001. Disponível em: <http://www.terrificscience.org/lessonpdfs/PiperineAnalysis.pdf>. Acessado em: 24/07/2021
122. SAHU, P.; CHOORASIYA, A.; GAJBHIYE, V. Higher Therapeutic Benefits of piperine Loaded Optimized Chitosan Microspheres for Improved Hepatoprotective Potentials. **Reserch Gate: Pharmaceutical Sciences**, v.1, p. 39-44, 2012.
123. PENGONG, T. et al. Design, synthesis and in vitro evaluation of mucoadhesive pcoumarate-thiolated-chitosan as a hydrophobic drug carriers. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 86, n. 3, p. 487-497, 2014.
124. BISCAIA, P. B. **Desenvolvimento tecnológico e caracterização de micropartículas poliméricas contendo piperina obtidas pr spray-drying**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2019.

125. MAHANTA, A. K.; PATEL, D. K.; MAITI, P. Nanohybrid Scaffold of Chitosan and Functionalized Graphene Oxide for Controlled Drug Delivery and Bone Regeneration. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 5, n. 10, p. 5139–5149, 2019.
126. SINGH KUMAR, N. et al. Scholars Research Library UV-spectrophotometric method development for estimation of piperine in Chitrakadi Vati. **Scholar Research Library**, v.3, n. 3, p. 178-182, 2014.
127. KIM, G. M., LE, K. H. T., GIANNITELLI, S. M., LEE, Y. J., RAINER, A., & TROMBETTA, M. (2013). Electrospinning of PCL/PVP blends for tissue engineering scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1425–1442, 2013.
128. KUMAR, TT.; KIPPER M.J. R.; POPAT, K.C. Osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells on poly(e-caprolactone) nanofiber scaffolds. **Acta Biomater.** v. 6, n. 8, p.2949– 2959, 2010.
129. CHO, S. J., JUNG, S. M., KANG, M., SHIN, H. S., & YOUNG, J. H. Preparation of hydrophilic PCL nanofiber scaffolds via electrospinning of PCL/PVP-b-PCL block copolymers for enhanced cell biocompatibility. **Polymer**, v.69, n. 1, p. 95–102, 2015.
130. GAMULIN, O. et al. Monitoring the healing process of rat bones using Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1044, p. 308–313, 2013.
131. GONG, B. et al. Raman spectroscopy demonstrates prolonged alteration of bone chemical composition following extremity localized irradiation. **Bone**, v. 57, n. 1, p. 252–258, 2013.
132. FORTALEZA, L. M. D. M. et al. Raman spectroscopy analysis of bone regeneration in a rat model by implantation of a biocompatible membrane scaffold with and without LED photobiomodulation ( $\lambda$  945 ± 20 nm). **Vibrational Spectroscopy**, v. 111, p. 1-9, 2020.
133. FILHO, A. L. M. M. et al. Evaluation of inorganic and organic bone components after application of an apatite-coated Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> implants as scaffolds for bone repair. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 334–339, 2014.
134. MANDAIR, G. S.; MORRIS, M. D. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. **BoneKEy Reports**, v. 4, p. 1–8, 2015
135. PINHEIRO, A. L. B.; SANTOS, N. R. S.; OLIVEIRA, P. C.; et al. The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with miniplates: a Raman spectral study on rabbits. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 513–518, 2013.
136. PINHEIRO, A. L. B.; SOARES, L. G. P.; BARBOSA, A. F. S. et al. Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration: A description of the repair process on rodents. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 5, p. 1013-24, 2012a.
137. PINHEIRO, A. L. B.; SOARES, L. G. P.; CANGUSSU, M. C. T.; et al. Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided

- bone regeneration: a Raman spectroscopic study. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 5, p. 903-16, 2012b.
138. PINHEIRO, A. L. B.; SOARES, L. G. P.; ACIOLE, G. T. S.; et al. Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. **Journal of Biomedical Material Research part A**, v. 98, n. 2, p. 212-21, 2011.
139. RAHIMZADEH, R. Value of color doppler ultrasonography and radiography for the assessment of the cancellous bone scaffold coated with nano-hydroxyapatite in repair of radial bone in rabbit. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 148-154, 2012.
140. GRILLO, R., ROSA, A. H., & FRACETO, L. F. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules carrying the herbicide atrazine: Effect of chitosan-coating agent on physico-chemical stability and herbicide release profile. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 6, 1691–1700, 2014.