



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS
GERAIS**



Dissertação

Ana Flávia Rodrigues Sales Curtts

**Processamento, caracterização e avaliação de biocompatibilidade
de blendas de PLGA e Colágeno com potencial utilização para
sistema de liberação controlada**

**Belo Horizonte
2018**



Ana Flávia Rodrigues Sales Curtts

**Processamento, caracterização e avaliação de
biocompatibilidade de blendas de PLGA e Colágeno com
potencial utilização para sistema de liberação controlada**

Dissertação de Mestrado em Engenharia de
Materiais do Centro Federal de Educação
Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), na
área de concentração de Ciência e
Desenvolvimento de Materiais, na Linha de
Pesquisa em Biomateriais.

Área de concentração: Ciência e Desenvolvimento de Materiais

Linha de Pesquisa: Biomateriais

Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

Belo Horizonte

2018

C981p Curtts, Ana Flávia Rodrigues Sales.
Processamento, caracterização e avaliação de biocompatibilidade de blendas de PLGA e colágeno com potencial utilização para sistema de liberação controlada / Ana Flávia Rodrigues Sales Curtts. – 2018.
100 f. : il., fotos, grafs.
Orientador: Sidney Nicodemos da Silva

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2018.

Bibliografia.

1. Tecnologia Farmacêutica. 2. Ácidos - Biocompatibilidade. 3. Colágeno. 4. Vasos sanguíneos - Doenças - Tratamento. 5. Biomateriais. I. Silva, Sidney Nicodemos da. II. Título.

CDD: 620.118



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
“PROCESSAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
DE BIOCOMPATIBILIDADE DE BLENDS DE PLGA E
COLÁGENO COM POTENCIAL UTILIZAÇÃO PARA
SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA”

Autora: Ana Flávia Rodrigues Sales Curtts

Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva (ORIENTADOR)
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof.ª Dr.ª Ivete Peixoto Pinheiro
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof.ª Dr.ª Viviane Gomes da Costa Abreu
Centro Universitário UNA

Belo Horizonte, 23 de Novembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Sidney Nicodemos, por sempre acreditar que tudo daria certo e por me orientar neste trabalho, a Sílvia Fialho e a Lorena Vieira, cujo trabalho delas serviu de inspiração para o desenvolvimento deste.

Ao Cleverson Garcia, professor do Departamento de Química do CEFET e a Kátia Freitas, do ICB/UFMG, pela ajuda que me foi dada na realização dos ensaios.

Aos amigos e companheiros de laboratório, em especial à Letícia Tasca, ao Marcelo Madureira, a Wânia Oliveira, a Ana Esther Amaral e a Camila Cruz, pelas horas de companhia, de amizade e pelo apoio.

À Eng^a. Cristina Esteves pelo auxílio nas caracterizações que foram realizadas e, também, pela amizade e pela companhia, e à empresa Phosther Tecnologia de Aglomerações LTDA pela estrutura para que algumas das análises necessárias para a realização deste trabalho fossem feitas.

Ao Laboratório de Caracterização do CEFET-MG e aos laboratórios do Departamento de Química, que também me ajudaram nas caracterizações necessárias para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPEMIG, pela estrutura oferecida ao CEFET que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos meus maiores incentivadores, meu marido, Vinícius Curtts, e aos meus pais, Janete Sales e Luiz Sales. Sem o apoio de vocês, não seria possível a realização deste sonho.

À minha avó, Maria Júlia Rodrigues, e minha irmã, Fabiana Sales. Aos meus sogros, Lilian Curtts e Eduardo Curtts, por todo carinho e apoio durante esta etapa. Ao meu avô, Leandro Rodrigues, e a minha avó, Maria Martins (Lia), que sempre estarão comigo e fazem parte das minhas vitórias.

Às minhas amigas que compreenderam o motivo das minhas ausências neste período, em especial à Anne Caroline Santos, Sílvia Cussiol, Priscilla Dias e Mariana Almeida.

RESUMO

Implantes intra oculares têm sido estudados com o objetivo de melhorar o tratamento de patologias oftalmológicas relacionadas a neovascularização. Um dos fármacos cuja função anti angiogênica (anti-VEGF) vem sendo estudada recentemente é o Ácido Rosmarínico (AR). Neste trabalho foram produzidas blendas com 50% de PLGA – poli (ácido láctico-co-glicólico) 75/25 e 50% de colágeno e 75% de PLGA 75/25 e 25% de colágeno para avaliação físico-química e de biocompatibilidade destes materiais para potencial utilização em sistemas de liberação de fármacos. Foram encontrados materiais com diferentes taxas de degradação em solução PBS a 37°C por 28 dias, evidenciando que a confecção destas blendas é promissora o controle da liberação de fármaco. O colágeno tipo I possui uma organização das fibrilas que é semelhante à cristalização quando ensaiadas por Difração de Raios X e, quando em contato com solução contendo acetona, essas fibrilas desnaturam-se e as regiões de cristalização desaparecem. A blenda composta de 75% de PLGA e 25% de colágeno possui uma degradação mais lenta que a blenda de 50% de PLGA e 50% de colágeno, no final dos 28 dias pelo qual o ensaio foi realizado. As blendas processadas não possuem interação química e, portanto, o produto da degradação das mesmas é composto pela soma dos produtos de suas matérias primas, já sendo conhecidos neste caso. As blendas produzidas são hidrofílicas ou superhidrofílicas, não são hemolíticas, não apresentam citotoxicidade relevante para fibroblastos isolados de sangue periférico humano e produzem uma redução de espécies reativas de oxigênio, sendo essas características bons indicadores de biocompatibilidade do material.

Palavras-chave: liberação controlada de fármacos, PLGA, anti-VEGF, colágeno, biomateriais, ácido rosmarinico.

ABSTRACT

Intraocular implants have been studied with the aim of improving the treatment of ophthalmological diseases related to neovascularization. One of the drugs whose antiangiogenic function (anti-VEGF) has been recently studied is Rosmarinic Acid (RA). In this work, blends were produced with 50% PLGA-poly (lactic-co-glycolic acid) 75/25 and 50% collagen and 75% PLGA 75/25 and 25% collagen for physico-chemical evaluation and biocompatibility of these materials for potential use in drug delivery systems. Materials with different degradation rates were found in PBS solution at 37°C for 28 days, evidencing that the preparation of these blends promises the control of drug release. Type I collagen has an organization of fibrils that is similar to crystallization when assayed by X-ray Diffraction and, upon contact with a solution containing acetone, these fibrils are denatured and the regions of crystallization disappear. The blend consists of 75% PLGA and 25% collagen has a slower degradation than the blend of 50% PLGA and 50% collagen, at the end of 28 days in which the test was performed. The processed blends do not have chemical interaction and, therefore, the product of the degradation of the same is composed by the sum of the products of their raw materials, already being known in this case. The blends produced are hydrophilic or superhydrophilic, non-hemolytic, do not present relevant cytotoxicity to fibroblasts isolated from human peripheral blood and produce a reduction of reactive oxygen species, these characteristics being good indicators of the biocompatibility of the material.

Keywords: controlled release of drugs, PLGA, anti-VEGF, collagen, biomaterials, rosmarinic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR: *Attenuated total reflectance*;

AR: Ácido Rosmarínico;

CSS: Colágeno após solubilização e secagem;

DMRI: Degeneração macular relacionada a idade;

DTG: Termogravimetria derivada;

DRX: Difração de raios X;

EDX: Espectroscopia de raios X por dispersão de energia;

EPR: Epitélio Pigmentado da Retina;

FTIR: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier;

FRX: Fluorescência de raios X;

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura;

MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium];

PBS: Solução Salina Tamponada;

P50C50: Blenda de 50% de PLGA 75/25 e 50% de colágeno;

P50C50AR: Blenda de 50% de PLGA 75/25 e 50% de colágeno com Ácido Rosmarínico;

P75C25: Blenda de 75% de PLGA 75/25 e 25% de colágeno;

P75C25AR: Blenda de 75% de PLGA 75/25 e 25% de colágeno com Ácido Rosmarínico;

PLGA: Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico);

RD: Retinopatia Diabética;

ROS: *Reactive oxygen species*

TG: Termogravimetria;

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Anatomia do olho.	15
Figura 2 - Esquema de DMRI.....	18
Figura 3 - Estrutura molecular do Ácido Rosmarínico	22
Figura 4 - Ensaio realizados	29
Figura 5 - Implantes poliméricos de P50C50 (a) e P75C25 (b).....	37
Figura 6 - Perda de massa da blenda P75C25 em PBS durante 28 dias.....	38
Figura 7 - Perda de massa da blenda P50C50 em PBS durante 28 dias.....	38
Figura 8 - Blendas P50C50 e P75C25 no 28º dia de ensaio de degradação em PBS.	40
Figura 9 - Difratoograma de Raios X da Matriz de Colágeno.....	41
Figura 10 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier da Matriz de Colágeno.....	43
Figura 11 - TG e DTG da Matriz de Colágeno tipo I.....	45
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura da matriz de Colágeno tipo I em ampliações diferentes.	47
Figura 13 - Difratoograma de Raios X do PLGA 75/25.	48
Figura 14 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do PLGA 75/25	49
Figura 15 - TG e DTG do PLGA 75:25.....	50
Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura do PLGA.....	52
Figura 17 - Difratoograma de Raios X do Ácido Rosmarínico.....	53
Figura 18 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do Ácido Rosmarínico	54
Figura 19 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do Ácido Rosmarínico de 1800 a 700 cm ⁻¹	55
Figura 20 - TG e DTG do Ácido Rosmarínico.....	56
Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura do Ácido Rosmarínico.	58
Figura 22 - DRX do Colágeno	59
Figura 23 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do Colágeno.....	60

Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura da matriz de Colágeno tipo I pós solubilização e secagem	61
Figura 25 - DRX da blenda P75C25.....	62
Figura 26 - FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno e P75C25.....	63
Figura 27 - FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno e P75C25 no intervalo de 2000 cm^{-1} e 500 cm^{-1}	63
Figura 28 - Termogravimetria da blenda P75C25	65
Figura 29 - MEV da blenda P75C25.....	66
Figura 30 - Ângulo de contato da blenda P75C25.....	66
Figura 31 - DRX da blenda P75C25AR.....	67
Figura 32 - MEV da blenda P75C25AR.....	68
Figura 33 - FTIR comparativo entre P75C25, Ácido Rosmarínico e P75C25AR.....	69
Figura 34 - FTIR comparativo entre P75C25, Ácido Rosmarínico e P75C25AR no intervalo de 2000 cm^{-1} e 500 cm^{-1}	70
Figura 35 - Termogravimetria e derivada da termogravimetria da blenda P75C25AR	71
Figura 36 - Ângulo de contato P75C25AR	72
Figura 37 - DRX da blenda P50C50.....	74
Figura 38 - FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno e P50C50, para o intervalo de (A) 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} e (B) 2000 cm^{-1} a 500 cm^{-1}	75
Figura 39 - Termogravimetria da blenda P50C50	76
Figura 40 - MEV da blenda P50C50.....	77
Figura 41 - Ângulo de contato da blenda P50C50.....	78
Figura 42 - DRX da blenda P50C50AR.....	79
Figura 43 - FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno, P50C50, Ácido Rosmarínico e P50C50AR	80
Figura 44 - FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno, P50C50, Ácido Rosmarínico e P50C50AR para o intervalo de 2000 cm^{-1} a 500 cm^{-1}	81
Figura 45 - MEV da blenda P50C50AR.....	82
Figura 46 - Análise termogravimétrica da blenda P50C50AR.....	83
Figura 47 - Ângulo de contato da blenda P50C50AR.....	84
Figura 48 - Fotos do ensaio de hemocompatibilidade para os materiais P75C25 e P75C25AR (a) e P50C50 e P50C50AR (b).....	85

Figura 49 - Resultado de MTT para as blendas com e sem o fármaco.....	87
Figura 50 - Microscopia ótica dos fibroblastos após ensaio de MTT.....	89
Figura 49 - Resultados do ROS para as blendas com e sem o fármaco.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das blendas	30
Tabela 2 - Concentração do PBS utilizado para ensaio de degradação.	32
Tabela 3 - Perda de massa das blendas P75C25 e P50C50.	39
Tabela 4 - Bandas apresentadas no ensaio de FTIR para Colágeno tipo I.....	44
Tabela 5 - Porcentagem de massa resultante nas temperaturas de 100°C, 319°C, 400°C e 700°C.....	46
Tabela 6 - Indicações no FTIR do PLGA 75:25.....	50
Tabela 7 - Porcentagem de massa inicial para as temperaturas citadas.	51
Tabela 8 - Indicações no FTIR do Ácido Rosmarínico.	54
Tabela 9 - Massa de AR resultante nas temperaturas citadas.	57
Tabela 10 - Porcentagem de massa da blenda nas temperaturas citadas.....	64
Tabela 11 - Porcentagem de massa para as temperaturas citadas.	71
Tabela 12 - Porcentagem de massa para as temperaturas citadas.	77
Tabela 13 - Porcentagem de massa inicial presente nas temperaturas citadas.	83
Tabela 14 - Resultado do ensaio de hemocompatibilidade.....	86
Tabela 15 - Viabilidade celular para blendas com e sem o fármaco.	87
Tabela 16 – Porcentagem de ROS para blendas com e sem o fármaco.	90

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Anatomia do olho	15
3.2 Angiogênese e patologias oftalmológicas da neovascularização.....	16
3.2.1 Degeneração macular relacionada com a idade	16
3.2.2 Retinopatia diabética	18
3.2.3 VEGF e fármacos Anti-VEGF	19
3.3 Polímeros e utilização como biomateriais	23
3.3.1 Implantes poliméricos para liberação controlada de drogas.....	24
3.3.2 Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) - PLGA	24
3.3.3 Colágeno	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Materiais.....	28
4.2 Metodologia	28
4.2.1 Proporção de PLGA e Colágeno nas blendas	29
4.2.2 Métodos de obtenção das blendas e dos implantes.....	30
4.2.3 Método de obtenção da massa dos implantes de P50C50 e P75C25	31
4.2.4 Incorporação do Ácido Rosmarínico	31
4.2.5 Ensaio de degradação das blendas poliméricas em PBS	31
4.2.6 Ensaio de caracterização físico-química	33
4.2.7 Caracterização biológica	34
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Obtenção de massa dos implantes.....	37
5.2 Ensaio de degradação das blendas sem o fármaco.....	37

5.3 Ensaios de caracterização físico-química das matérias primas	41
5.3.1 Matriz de Colágeno tipo I.....	41
5.3.2 Poli (ácido-lático-co-glicólico) – PLGA - em proporção 75:25	48
5.3.3 Ácido Rosmarínico	52
5.3.4 Colágeno após solubilização e secagem	58
5.3.5 P75C25 – PLGA em proporção 75% e Colágeno em proporção 25%	62
5.3.6 P75C25AR – Blenda P75C25 com AR.....	67
5.3.7 P50C50 – PLGA em proporção 50% e Colágeno em proporção 50%	72
5.3.8 P50C50AR – Blenda P50C50 com AR.....	79
5.4 Caracterização biológica	84
6. CONCLUSÃO	92
7. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1. INTRODUÇÃO

A angiogênese, ou seja, a criação de vasos sanguíneos a partir dos pré-existentes pode ocorrer de forma natural ou patológica nos seres humanos. Dentre as patologias que se agravam pela angiogênese, pode-se destacar duas patologias oculares responsáveis pela maioria dos casos de cegueira irreversível: A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) e a Retinopatia Diabética (RD).

Em pacientes jovens, a RD é a principal causa de cegueira anual, sendo responsável por 10% dos casos da faixa etária de 20 a 64 anos. A DMRI é a segunda maior causa de cegueira em pacientes de 45 a 64 anos e a principal em pacientes de 65 a 75 anos, em países desenvolvidos.

Um dos principais fatores da angiogênese é o VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*) que se liga as células epiteliais promovendo esse crescimento de vasos sanguíneos. A função do fármaco anti-VEGF (função anti angiogênica) é se ligar aos receptores do VEGF não permitindo que haja a ligação entre VEGF e os receptores das células e, por consequência, impedir a formação de novos vasos sanguíneos.

Atualmente, as drogas utilizadas com essa função para a região intra vítrea são aplicadas diretamente através de injeções repetidas que podem gerar complicações e desconforto ao paciente. Por isso, sistemas alternativos de liberação de drogas vêm tomando importância por vantagens como aumento da biodisponibilidade, liberação prolongada e redução de efeitos colaterais, aumentando, portanto, a adesão dos pacientes ao tratamento.

Nesse contexto, foram produzidas blendas com base em PLGA e Colágeno tipo I para avaliar o comportamento das blendas como sistemas de liberação do fármaco Ácido Rosmarínico (AR) para tratamento destas patologias. As blendas produzidas foram caracterizadas físico-quimicamente e biologicamente para avaliar a sua utilização na região intraocular.

2. OBJETIVOS

Geral:

Processar, caracterizar físico-quimicamente e avaliar a biocompatibilidade de blendas de PLGA/Colágeno tipo I para avaliar a possibilidade de utilização do Colágeno em associação com o PLGA para retardar a sua degradação e, possivelmente, obter uma taxa mais lenta da liberação do Ácido Rosmarínico.

Específicos:

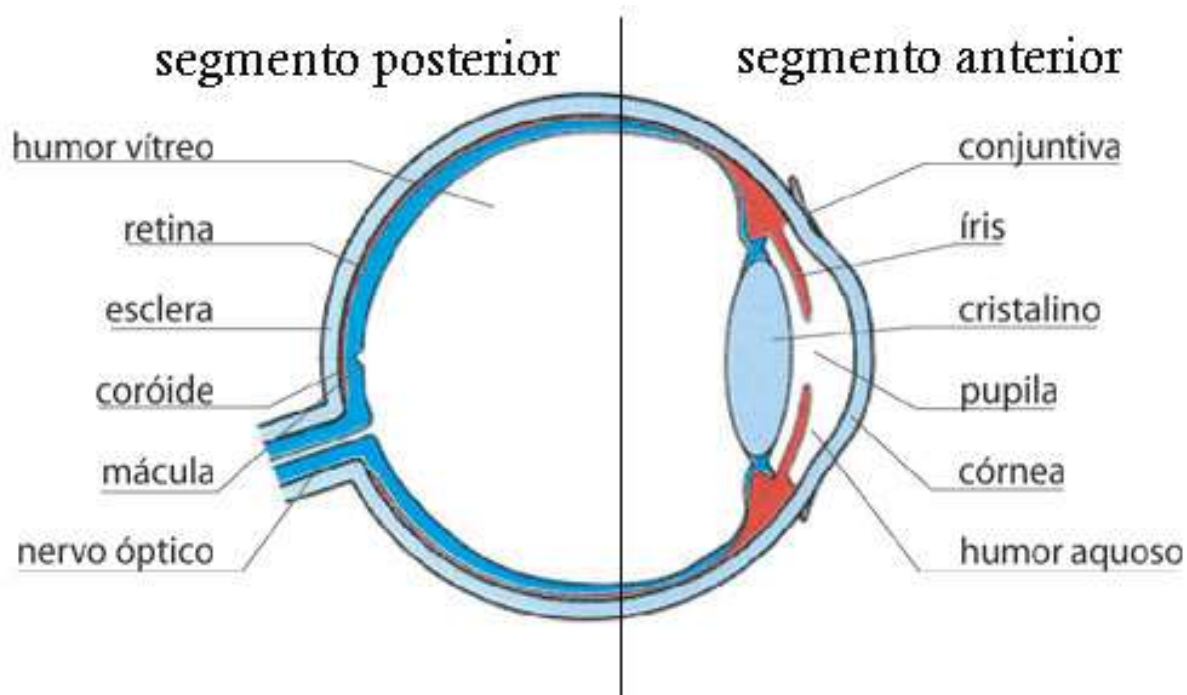
- Processamento das blendas de PLGA/Colágeno em proporções 75:25 e 50:50 pela técnica de *solvent casting*.
- Caracterização físico-química da matéria prima, das blendas e das blendas com a presença do medicamento por meio dos ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). No caso da matéria prima foi executado ainda Espectroscopia de Fluorescência de Raios X (FRX) ou Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS).
- Avaliar o comportamento térmico dos materiais por meio de termogravimetria (TG) e derivada da termogravimetria (DTG).
- Avaliar o ângulo de contato das blendas com e sem o fármaco.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro*, por contato direto do material, através de colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), avaliar a hemocompatibilidade e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) das blendas com e sem o fármaco.
- Avaliar a degradação dos polímeros por meio da perda de massa durante 28 dias.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Anatomia do olho

Autores como Colthurst et al (2000) e Byrro (2008) fazem uma divisão do olho em apenas dois segmentos, o anterior e o posterior, conforme pode ser identificado na figura 1. Para os primeiros autores, a parte anterior do olho, constituída por córnea e lente, é responsável por direcionar os raios luminosos para a retina, sendo esta, responsável pela transformação dos raios luminosos, através dos receptores, em impulsos elétricos que possam ser traduzidos pelo cérebro.

Figura 1 – Anatomia do olho.



Retirado de: Byrro (2008).

Colthurst et al (2000) classifica como região posterior do olho aquela que compreende a esclera, a coróide e a retina, estruturas que se localizam em contato com a cavidade vítrea, onde se localiza o humor vítreo, ou simplesmente vítreo, composto por água (em aproximadamente 99%), colágeno e outras proteínas.

Segundo Seeley (2008, apud RAWAS-QALAJI, 2012), esse fluido gelatinoso que preenche a região vítrea é responsável por garantir o formato da região entre a lente e a retina e por manter a pressão e o índice de refração ideal no olho.

As estruturas principais nas quais este trabalho pretende atuar são a mácula, a retina e a coróide, por isso, é importante destacar a funcionalidade destas estruturas.

Segundo Snell e Lemp (1998 apud VIEIRA, 2011), a retina é a estrutura responsável pela captação dos raios luminosos através dos fotorreceptores que estão nela presentes. Tal estrutura possui duas regiões: a *fóvea centralis* e o ponto cego.

A fóvea é a região onde a luz atinge os cones presentes nela e permite que a imagem do objeto possa ser visualizada com nitidez. A mácula é definida por Provis et al (2013) como sendo a região na qual a *fóvea centrallis* está contida.

Segundo Byrro (2008), a coróide, estrutura localizada entre esclera e retina, é muito vascularizada e é a principal fonte de nutrição da retina. Colthurst et al (2000) apresentam informações sobre a nutrição da retina pela coróide e explicam que ambas são separadas por uma membrana conhecida como membrana de Bruch.

3.2 Angiogênese e patologias oftalmológicas da neovascularização

A angiogênese, ou seja, a criação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes é essencial no desenvolvimento normal e na homeostase de tecidos, mas pode também aparecer de forma patológica em uma série de transtornos (RISAU, 1997 apud CAPP et al, 2009).

Sobre doenças oculares que são decorrentes da angiogênese, Damico (2007) cita a Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) e a Retinopatia Diabética (RD) e diz que o fator de crescimento do endotélio vascular, conhecido pela sigla VEGF ou VEGF-A, desempenha papel muito importante nesse processo.

3.2.1 Degeneração macular relacionada com a idade

A degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) é um dos principais fatores relacionados à perda de visão irreversível em adultos conhecida, sendo

responsável por 50% destes casos. No caso de países desenvolvidos, para pacientes de 45 a 64 anos, é a segunda maior causa de cegueira anual e, para pacientes de 65 a 75 anos, é a principal causa.

Embora a prevenção desta patologia seja satisfatória, a mesma não possui tratamentos eficazes para casos mais avançados (COLQUITT et al, 2008; GUIMARÃES; GERENUTTI, 2013).

Os fatores de risco para o DMRI são, segundo Torres (2009) et al apud Guimarães e Gerenutti (2013):

idade avançada, caucasianos, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, portadores de hipercolesterolemia, aterosclerose, catarata ou pós cirurgia de catarata, dieta pobre em nutrientes, falta de atividade física, obesidade, consumo de álcool e exposição à radiação solar.

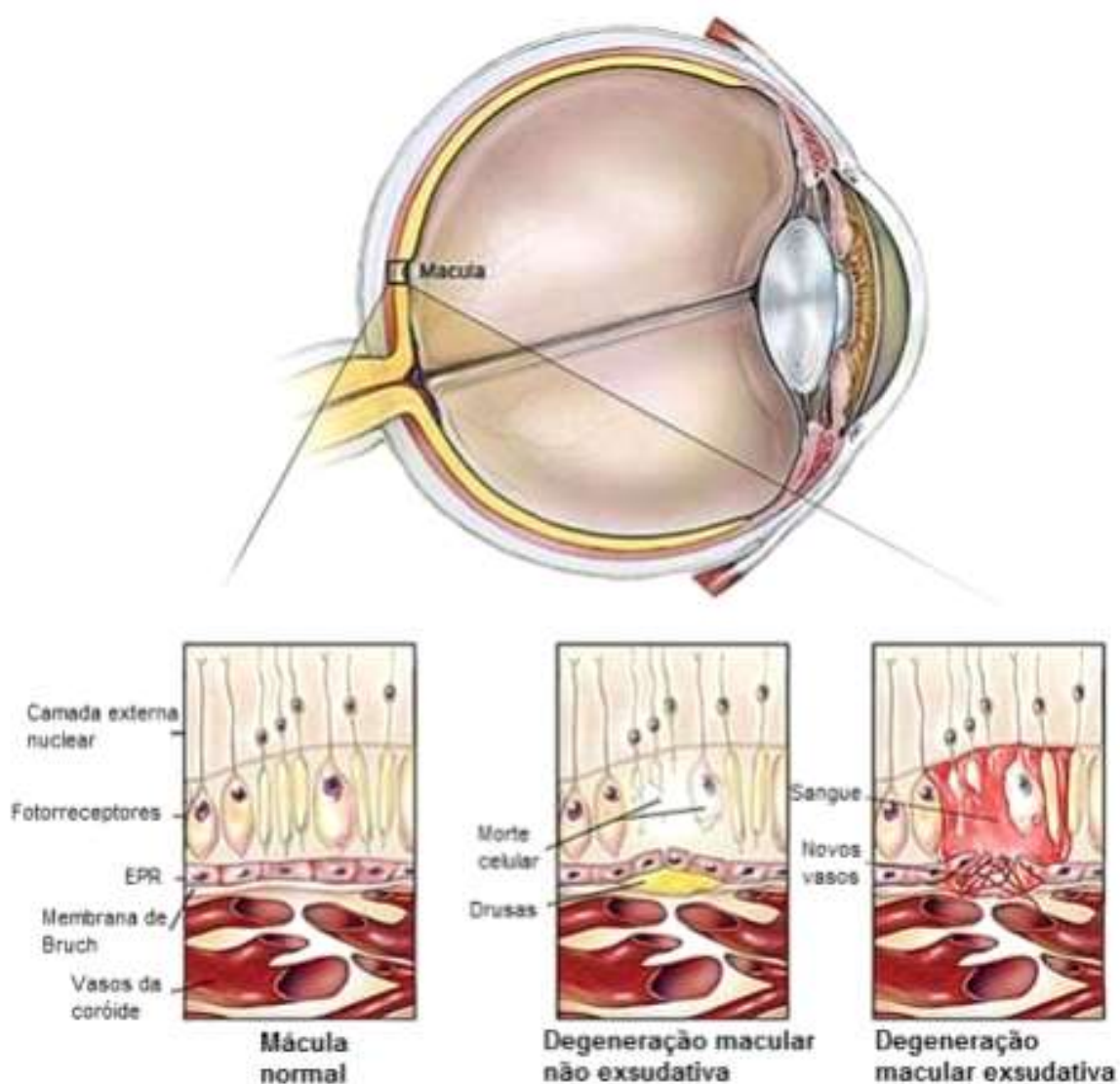
Nessa patologia, a retina apresenta dificuldade de eliminação dos resíduos gerados, gerando um processo inflamatório que resulta no encapsulamento dos restos celulares entre a membrana de Bruch e o epitélio pigmentado. Esse acúmulo de substâncias, conhecidas como drusas, dificulta a difusão de oxigênio e nutrientes para a retina.

Com isso, as células do Epitélio Pigmentado da Retina (EPR) aumentam a produção de VEGF. A DMRI evolui, portanto, com a neovascularização que, juntamente com a anatomia alterada, invade a retina avascular e provoca sangramentos e exsudações. A reação inflamatória aumenta, induzindo a morte de mais receptores centrais e, com isso, ocorre uma maior perda da visão central (GUIMARÃES; GERENUTTI, 2013).

Um esquema do acontecimento desse processo inflamatório e do surgimento de novos vasos pode ser visto na figura 2 para melhoria da compreensão.

Ainda os mesmos autores (GUIMARÃES; GERENUTTI, 2013) consideram que o principal tratamento para a DMRI é a aplicação de fármacos anti-VEGF por administração intravítrea, destacando para esse uso os medicamentos pegaptanibe, bevacizumabe e o ranibizumabe, que serão explicados posteriormente.

Figura 2 - Esquema de DMRI



Fonte: American Health Assistance Foundation (apud VIANA, 2011).

3.2.2 Retinopatia diabética

Responsável por 10% do total de casos de cegueiras anuais, a Retinopatia Diabética (RD) é a principal quando se trata de pacientes de 20 a 64 anos, em países desenvolvidos. Os fatores de risco da retinopatia diabética são os níveis de hiperglicemia, o tempo de duração da diabetes mellitus, pressão sanguínea elevada e fatores genéticos (ALISEDA; BERAESTEGUI, 2008; ESTEVES et al, 2009).

Tal patologia se inicia por uma alteração na permeabilidade dos vasos sanguíneos da retina, fazendo com que o líquido interno extravase, formando exsudatos e edemas no interior da retina podendo, ainda, comprometer a mácula, ocasionando piora na condição clínica. Esta isquemia retiniana pode desenvolver VEGF, ocasionando em neovascularização que, novamente, continuam a proliferar hemorragias e tensões sobre a retina (ALISEDA; BERÁSTEGUI, 2008; AGARWAL et al, 2014).

Agarwal et al (2014) também falam da utilização dos medicamentos Bevacizumabe, Ranibizumab e Pegaptanib para inibir o fator VEGF e evitar a neovascularização para casos de RD.

3.2.3 VEGF e fármacos Anti-VEGF

Segundo Ferrara (2004, apud DAMICO, 2007), existem pelo menos 4 isoformas de VEGF que estão ativas em seres humanos. Destas, Damico (2007) diz que a predominante no olho e a provável responsável pela neovascularização ocular patogênica no olho humana é a VEGF₁₆₅ (proteína recombinante).

Baseado no conhecimento sobre neovascularização patológica e seus níveis avançados deste fator VEGF na região, foram desenvolvidos estudos para inibir a ação deste. Essas drogas, conhecidas como anti-VEGF, tem mostrado eficazes em manter ou melhorar a qualidade visual do paciente inibindo a permeabilidade dos vasos e crescimentos de novos (GARCIA FILHO et al, 2012; PRASAD et al, 2010).

Sobre a utilização destes medicamentos em patologias da retina, Guimarães e Gerenutti (2013) dizem que medicamentos para evitar tais doenças que são causadas por esse processo podem ser por via sistêmica, via tópica, via periocular, por implante escleral, por iontoforese e por sistemas de micro e nanopartículas por meio de injeção intra vítrea.

Segundo Fialho et al (2003), as doenças que acometem o vítreo e a retina tem uma dificuldade maior de tratamento devido à dificuldade da penetração de medicamento nesse segmento do olho. Rawas-Qalaji e Williams (2012) também dizem sobre o mesmo fato e afirmam que para melhorar a adesão de pacientes aos tratamentos, é necessária a utilização de métodos para maximizar o benefício do medicamento e reduzir possíveis reações.

Vieira (2011) corrobora da mesma idéia e diz que “a eficácia do tratamento depende, basicamente, do sucesso no transporte de drogas efetivas de agentes farmatológicos para os locais a serem tratados”.

Fialho et al (2003) dizem que as injeções seriam uma boa alternativa para obtenção de uma concentração adequada de medicamento no vítreo e na retina, mas, a velocidade de circulação sanguínea desses locais faz com que a concentração de drogas seja reduzida a níveis subterapêuticos.

Vieira (2011) juntamente com Fialho et al (2003) complementam dizendo que para que a concentração seja mantida em níveis terapêuticos, é necessária a aplicação repetida de injeções no interior da cavidade que causam desconforto ao paciente e podem ocasionar complicações como infecções, hemorragias vítreas, catarata e o deslocamento da retina.

Dessa maneira, sistemas alternativos de liberação de medicamento por período mais prolongado, com o objetivo de manter as concentrações de drogas no segmento posterior do olho tem sido objeto de vários estudos. Segundo Vieira (2011), as vantagens proporcionadas por esses estudos são:

Aumento da biodisponibilidade; liberação prolongada; redução de efeitos adversos sistêmicos e a frequência de injeções intravítreas, reduzindo as suas complicações e aumentando o conforto e a adesão do paciente ao tratamento.

Kim et al (2014) destaca que alguns fármacos macromoleculares são utilizados na terapia anti-VEGF, destacando nesse contexto, o tratamento da DMRI. Para minimizar a injeção destas macromoléculas, os autores afirmam a necessidade de métodos como liberação controlada que aumentam a ação de fármacos, aumentando a eficácia e a segurança.

Dentro desse mesmo contexto, Colthurst et al (2000) afirmam que o material ideal para a liberação destes fármacos utilizados para o segmento posterior do olho ainda não foi desenvolvido e que os atuais materiais utilizados são, muitas vezes, de duração curta.

Estão descritos nesse trabalho os fármacos Pegaptanibe, Ranibizumabe, Bevacizumabe e Ácido Rosmarínico, todos com função anti-VEGF.

3.2.3.1 Pegaptanibe

O primeiro fármaco utilizado de forma intraocular com função anti-VEGF foi o *Pegaptanibe*, comercialmente representado pelo Macugen[®], do laboratório Pfizer. Aplicado na cavidade vítrea com um intervalo de 6 (seis) semanas, o medicamento se liga a molécula VEGF₁₆₅ e, assim, impede a ligação dela com o receptor (PRASAD et al, 2010).

Ainda segundo os mesmos autores, depois que os primeiros estudos sobre o pegaptanibe sódico foram promissores, surgiu uma nova geração desses medicamentos com propriedades anti-VEGF, o Ranibizumabe.

3.2.3.2 Ranibizumabe

O medicamento Ranibizumabe recebe o nome comercial de Lucentis[®] e é produzido pelo laboratório Novartis. O mesmo é parte de um anticorpo que se liga ao VEGF-A, presente na retina para tratamentos de DMRI e edema macular (LUCENTIS, 2013).

Prasad et al (2010) dizem que o Ranibizumabe é uma molécula de tamanho pequeno e que, teoricamente, tem tamanho para penetrar na retina e agir no espaço subretiniano.

3.2.3.3 Bevacizumabe

Embora tenha sido desenvolvido para auxiliar no tratamento de câncer, o Bevacizumabe apresenta resultados na oftalmologia desde que Mason et al (2006) apud Jiménez-Ortiz et al (2012) propuseram a utilização deste anti-VEGF após pesquisas anteriores identificarem o aumento do fator VEGF-A em casos de Glaucoma Neovascular.

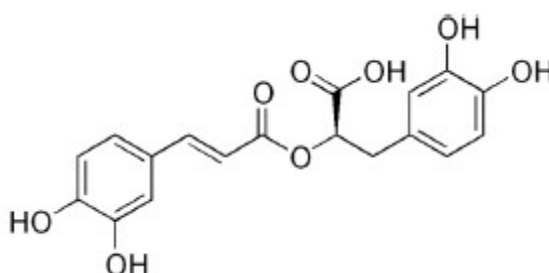
A versão de Martin et al (2011) conta que enquanto o Estados Unidos aguardava a aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) para a utilização no país, os oftalmologistas iniciaram o uso *off-label* do Bevacizumabe, uma droga cuja a atuação é similar ao Ranibizumabe mas é encontrado com um custo mais baixo.

A conclusão desses autores quanto aos medicamentos Ranibizumabe e Bevacizumabe é que, se administrados com a mesma frequência, ambos possuem efeitos equivalentes para a acuidade visual de pacientes em tratamento com os medicamentos, para o tempo em que foi realizado o estudo.

3.2.3.4 Ácido Rosmarínico

Isolado das folhas de *Rosmarinus officinalis* L. pela primeira vez em 1958 (SCARPATI; ORIENTE, 1958 apud VIEIRA, 2011), Petersen e Simmonds (2003, apud KIM et al, 2015) afirmam que o Ácido Rosmarínico (AR) atualmente pode ser extraído de 39 famílias de plantas. A estrutura molecular do AR pode ser observada na figura 3, um ácido fenólico que apresenta diversas propriedades biológicas.

Figura 3 - Estrutura molecular do Ácido Rosmarínico



Fonte: Vieira (2011).

Kim et al (2015) fazem um levantamento da bibliografia já existente e relatam que o AR possui função anti-inflamatória, anti-angiogênica, anti-oxidante, anti-tumoral, anti-alérgica, anti-microbiana, anti-viral e neuroprotetora.

Em seu trabalho, Huang et al (2006) comprovam a atividade anti-angiogênica do Ácido Rosmarínico utilizando o cordão umbilical para a realização de ensaios *in vivo* e comprovando que o ácido inibe as 4 etapas da formação destes novos vasos sanguíneos: a proliferação, a migração, a adesão e a formação de tubo com células endoteliais.

Neste mesmo trabalho, além de reduzir essas atividades, o AR ainda apresentou relação com a diminuição de espécies reativas do oxigênio (ROS, do

inglês *reactive oxygen species*) que possui relação direta com o fator VEGF e, consequentemente, com a neovascularização.

Sobre o uso do fármaco para inibição desta função em células da retina, o mesmo pode ser comprovado no trabalho de Kim e colaboradores (2009).

Vieira (2011) comprova a viabilidade de se utilizar Ácido Rosmarínico na sua análise de citotoxicidade, já que o fármaco, ainda que em concentrações elevadas, não afetou a viabilidade de linhagens de células testadas de forma significativa e, comprovou ainda, que esse efeito não é agravado com o tempo, sugerindo um tratamento seguro para tecidos oculares e células ditas como normais.

O mesmo teste foi realizado com o PLGA 75/25 e com o mesmo medicamento em concentração 25% no polímero, comprovando que o mesmo pode ser utilizado de forma segura também na forma de implantes com matriz de PLGA com estas concentrações.

3.3 Polímeros e utilização como biomateriais

Polímeros são materiais orgânicos constituídos por “grandes macromoléculas compostas por várias unidades de repetição (chamadas ‘meros’)” (tradução nossa) cuja ligação entre essas macromoléculas é de natureza covalente. A não ser que haja reticulação, as macromoléculas interagem entre si com forças de ligação secundária e por meio de emaranhamento (DEE et al, 2003).

Biomateriais são materiais de origem natural ou sintética que tenha relação com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, ampliar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Para que um material seja considerado como biomaterial, é necessário que ele não cause respostas imunológicas ou tóxicas significativas e, quando degradado, o mesmo deverá gerar resíduos que deverão ser metabolizados (MOURA, 2014; TIAN et al, 2012).

Dee et al (2003) diz que os polímeros são os materiais mais utilizados em aplicações médicas, sendo utilizado em dispositivos cardiovasculares, tecidos moles, liberação controlada de droga e *scaffolds* para engenharia de tecido. Para a aplicação de polímeros como biomateriais, Moura (2014) acrescenta que devem ser levadas em conta as propriedades mecânicas do mesmo e o seu tempo de degradação, para cada aplicação.

3.3.1 Implantes poliméricos para liberação controlada de drogas

Orloff et al (1997, apud ALEXIS, 2005) explicam que a “liberação controlada refere-se ao uso de um material polimérico para liberar drogas incorporadas em uma taxa controlada por um período de tempo desejado” (tradução nossa).

No caso de liberação controlada de drogas para impedir a neovascularização na coróide, os primeiros implantes estudados eram constituídos de poli(acetato de vinilo), PVA, e de acetato-vinilo de etileno, EVA. Estes polímeros, não biodegradáveis, eram responsáveis por regular a taxa de medicamento liberada e por limitar a área superficial do implante, respectivamente (YASUKAWA et al, 2005).

As pesquisas de polímeros biodegradáveis para liberação controlada de medicamentos são relatadas por Makadia e Siegel (2011) como iniciadas depois que os polímeros foram utilizados como materiais bioabsorvíveis em cirurgias há aproximadamente três décadas.

Segundo Fialho et al (2003), somente alguns destes polímeros, seja de origem natural ou sintética, tem demonstrado biocompatibilidade, ou seja, “os componentes devem ser quimicamente inertes, não-carcinogênicos, hipoalergênicos, mecanicamente estáveis e não causadores de resposta inflamatória no local de aplicação”.

Makadia e Siegel (2011) destacam que a biocompatibilidade não é uma característica intrínseca do material e, com isso, é dependente do meio biológico e da interação entre polímero e fármaco.

Sobre a liberação de medicamento por um polímero, Fialho et al (2003) destacam que os mesmos podem ocorrer por meio de dois sistemas: o matricial e o de reservatório. Neste trabalho, o implante que foi desenvolvido segue o sistema matricial, que segundo a autora citada anteriormente, é o sistema no qual possui o fármaco incorporado na matriz ou aderido a sua superfície e, com isso, a liberação pode acontecer pelos poros da matriz, pela degradação do polímero ou pode ser uma combinação destes dois mecanismos.

3.3.2 Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) - PLGA

No caso de polímeros para liberação controlada de medicamento, poliésteres biodegradáveis têm atraído atenção especial por serem de utilização segura e, além disso, sofrerem degradação gerando produtos que são metabolizados. Dentro dessa classificação, destacam-se a poli(ϵ -caprolactona), o poli(D,L-lático) (PLA) e copolímeros derivados de ácidos lático e glicólico (PLGA) (FIALHO et al, 2003; Mi et al, 2002).

O poli(ácido lático-co-ácido glicólico), conhecido como PLGA, é o polímero mais utilizado quando se trata de implantes biodegradáveis e biocompatíveis para o carregamento e a liberação controlada de drogas, conforme Liu et al (2010a). Esta grande utilização, segundo Danhiel et al (2012) e Motta e Duek (2006), se dá pela hidrólise do polímero em ácido lático e ácido glicólico, produtos que são absorvíveis e, com isso, altamente biocompatível e atóxico.

Makadia e Siegel (2011) complementam dizendo que o PLGA pode “ser processado de quase todas as formas e tamanhos e pode encapsular moléculas de praticamente todos os tamanhos” (tradução nossa). É por esse motivo, aliada a compatibilidade com outros polímeros, que Chereddy et al (2016) dizem que o PLGA é considerado a primeira escolha para carregamento de drogas. Além disso, Danhiel et al (2012) relata que o PLGA pode ser encontrado comercialmente em diferentes massas moleculares e composição.

Esse polímero tem um potencial imenso para a liberação de drogas e para a confecção de *scaffolds*, utilizados para engenharia de tecidos porque é possível fazer ajuste nas suas propriedades físicas controlando parâmetros como peso molecular, razão entre ácido lático e ácido glicólico e em casos de liberação controlada, é possível ajustar a concentração de medicamentos e o intervalo de liberação dos mesmos (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

A degradação do PLGA se dá pela hidrólise da sua cadeia de éster e, por isso, a quantidade de água em contato com o polímero é um dos fatores de determinação da degradação do mesmo, segundo Mi et al (2002).

Ainda sobre a hidrólise do polímero, Makadia e Siegel (2011) dizem que a presença do grupo metil no ácido lático faz com que o poli ácido lático – PLA - seja mais hidrofóbico que o poli ácido glicólico – PGA - e, com isso, quanto maior a proporção de PLA no copolímero, menor tende a ser a sua taxa de degradação. Uma exceção é o PLGA 50/50 que exhibe uma maior taxa de degradação se comparado a composições com maior razão de PLA.

Mi et al (2002) afirma que o PLGA, juntamente com outros poliésteres, também tem sido usado em forma de blendas juntamente com outros polímeros biodegradáveis que modificam, fisicamente e mecanicamente, as propriedades do polímero inicial.

Como o objetivo deste trabalho é conseguir que o fármaco AR tenha uma liberação com um tempo maior que os implantes de PLGA 75/25 produzidos por Vieira (2011), buscou-se na literatura polímeros que poderiam ser utilizados como blendas para prolongar esta liberação na região intra ocular.

O estudo de Chiu et al (2007, apud JOSE et al, 2009) diz que a reticulação de PLLA e Colágeno preveniu a rápida hidrólise do colágeno, retardando a degradação do polímero sintético.

Sobre a degradação de PLGA 50/50 com colágeno tipo I, em forma de blenda, Liu et al (2010b) encontraram como resultado que o Colágeno degrada de forma mais lenta que o PLGA e que, dentre as concentrações testadas, quanto maior a porcentagem de colágeno, menor a perda de massa do material.

3.3.3 Colágeno

Segundo Liu et al (2010b), o Colágeno é um componente natural de diversos tecidos, tais como “pele, osso, tendões, ligamentos e outros tecidos que sejam de conexão” (tradução nossa). Awang et al (2014) diz que o colágeno pode ser isolado de diversos animais e o mesmo possui uma “excelente biocompatibilidade, biodegradação e funcionalidade, combinada com a baixa imunogenicidade” (tradução nossa).

Dentre todas as isoformas que podem ser encontradas de colágeno, a principal proteína estrutural e funcional é o colágeno tipo I. Em sua condição de matriz extracelular natural, o colágeno tipo I possui fibras de diâmetro que variam de 50 a 500nm que podem ser isoladas de diversas formas com uma conservação alta (LIU et al, 2010b).

Reddy et al (2015) diz que biomateriais feitos de biopolímeros, proteínas e polissacarídeos são utilizados preferencialmente, mas possuem baixa resistência mecânica e baixa estabilidade quando em meio aquoso. Como exemplo desse contexto, no trabalho de Jose et al (2009), os mesmos dizem que a aplicação do

colágeno como biomaterial deve ser observada devido às baixas propriedades mecânicas e sua rápida degradação. Essa taxa de degradação, ainda segundo os mesmos autores, pode ser modulada por meio da formação de blendas.

Sobre o uso de proteínas como o Colágeno para liberação de medicamentos, Reddy et al (2015) fala que os grupos funcionais que elas apresentam facilitam as interações destas com os medicamentos e com a liberação dos mesmos.

Dentro do contexto de formação de blendas, do qual já foi falado, foi escolhido para este trabalho o colágeno para utilização conjunta com o PLGA em razão 75:25 (PLA:PGA) para comparação com os implantes de Vieira (2011), constituídos de PLGA 75:25 para liberação do mesmo fármaco, o AR. Com estes polímeros, foram constituídas duas blendas com concentração polimérica diferentes e com a presença ou não do fármaco AR.

Outros estudos de interações entre proteínas e o AR já foram executadas por Ferraro et al (2015) e Silva et al (2014) todas resultando em somente interações físicas com as proteínas estudadas. É esperado que o mesmo ocorra para os materiais estudados neste trabalho, quando incorporado o fármaco.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

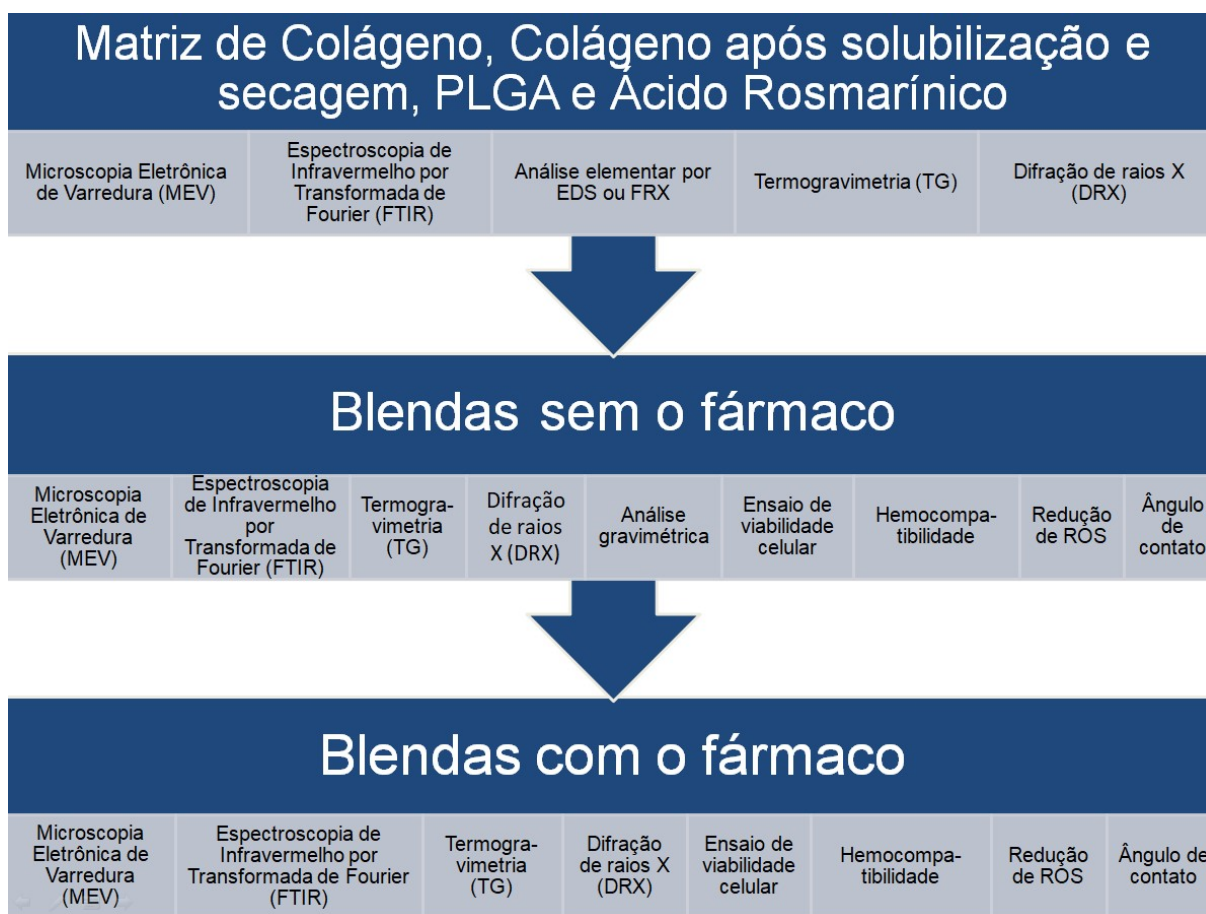
- a) O Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) foi adquirido da empresa United Chemicals, vendedora de produtos da Sigma Aldrich. O nome comercial do material adquirido é Resomer[®] RG 756S. A proporção entre os monômeros no copolímero é de 75:25 (75% de ácido láctico e 25% de ácido glicólico).
- b) Matriz de Colágeno tipo I cedida pela empresa Technodry.
- c) Ácido Rosmarínico com teor de pureza superior a 98% da empresa Sigma Aldrich, doado pela Divisão de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).
- d) Acetona 99,8% da empresa Sulfal Química, adquirida diretamente na empresa em Belo Horizonte.
- e) Água Destilada fornecida pelo Laboratório de Biomateriais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG).
- f) Ácido Acético Glacial com 99,8% de pureza, grau P.A., da marca Neon, previamente disponível no Laboratório de Biomateriais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG).
- g) Fosfato de sódio bibásico heptahidratado, grau P. A., da marca Cromoline, disponível no Laboratório de Biomateriais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG).
- h) Fosfato de potássio bibásico, grau P.A., da marca Cinética, disponível no Laboratório de Biomateriais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG).
- i) Cloreto de sódio, grau P.A., da marca Neon, disponível no Laboratório de Biomateriais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG).

4.2 Metodologia

Foram confeccionadas blendas de PLGA/Colágeno conforme o fluxograma, e os ensaios que foram realizados nas matérias primas, no colágeno após solubilização e secagem, nas blendas e nas blendas com Ácido Rosmarínico

seguem representados na figura 4. Tanto os processos utilizados quanto os ensaios possuem detalhamento nos próximos subitens.

Figura 4 - Ensaios realizados



Fonte: do autor.

4.2.1 Proporção de PLGA e Colágeno nas blendas

A Tabela 1 identifica as blendas de acordo com a letra em que serão trabalhadas nos ensaios e a proporção de PLGA, colágeno e Ácido Rosmarínico em cada uma delas.

Tabela 1 - Identificação das blendas

Identificação	PLGA 75:25	Colágeno tipo I	Ácido Rosmarínico
P75C25	75%	25%	Não
P50C50	50%	50%	Não
P75C25AR	75%	25%	Sim
P50C50AR	50%	50%	Sim

Fonte: do autor.

As proporções escolhidas estudadas em forma de blendas foram 50% de PLGA 75/25 e 50% de Colágeno tipo I e 75% de PLGA 75/25 e 25% de Colágeno tipo I. Além disso, as blendas cujo a nomenclatura é finalizada com AR significam que há a presença do Ácido Rosmarínico em proporção de 75% de blenda e 25% do fármaco.

4.2.2 Métodos de obtenção das blendas e dos implantes

Para a solubilização do Colágeno tipo I, utilizou-se 0,25% p/v do material em solução 30% de Ácido Acético em Acetona, em agitação magnética com auxílio de temperatura (40°C) até a completa solubilização (aproximadamente 24 horas).

Uma amostra deste material foi seca em estufa por 60°C, por 24 horas, para análises das transformações que o processo pode ter ocasionado. As análises realizadas com esse material estão descritas neste trabalho identificadas por Colágeno após solubilização e secagem (CSS).

Para a confecção das blendas, solubilizou-se o Colágeno de maneira descrita anteriormente e, após 24h, o PLGA, na proporção desejada do material, foi vertido no mesmo béquer e colocado para homogeneização por aproximadamente 4 horas, ainda em agitação magnética. Após esse processo, a mistura foi vertida em placas de petri de vidro e colocada para secagem em estufa por 24 horas, em temperatura de 60°C.

Após esse processo, o material foi retirado da placa de petri de vidro por meio de raspagem e obtido um pó destes materiais. Para a obtenção dos implantes, os mesmos foram moldados a quente, em temperatura de 70 a 90°C com auxílio de espátulas. As dimensões obtidas para os implantes foram de aproximadamente 6mm de comprimento por 0,45mm de diâmetro, escolhidas com base no trabalho de Vieira (2011).

4.2.3 Método de obtenção da massa dos implantes de P50C50 e P75C25

A massa média dos implantes moldados em material reticulado foi verificada com a utilização da balança analítica digital, da empresa Bioscale, disponível no laboratório de Cerâmicas Finas do CEFET-MG, e foram calculadas as médias e os desvios padrões. Os dados foram obtidos de três implantes escolhidos de forma aleatória entre os implantes P50C50 e P75C25.

4.2.4 Incorporação do Ácido Rosmarínico

Para a incorporação do AR foi utilizada a mesma proporção que a utilizada por Vieira (2011), 1:3 do fármaco para a massa da blenda polimérica. A incorporação se deu dissolvendo o fármaco e a blenda, utilizando os pós em proporção de 0,25% p/v em solução 30% de Ácido Acético em Acetona e adicionando o Ácido Rosmarínico, mantendo a solução em agitação magnética por 2h para homogeneização.

Posteriormente, a solução foi vertida em placa de petri de vidro e deixada para secagem por 24h a 60°C. Foi obtido o pó do material por meio da raspagem do mesmo na placa de petri.

4.2.5 Ensaio de degradação das blendas poliméricas em PBS

Para testar a degradação dos implantes construídos somente das blendas, sem o Ácido Rosmarínico, os mesmos foram pesados, individualmente, e colocados em 3ml de solução PBS, a quantidade de solução PBS respeitou a proporção da

degradação de Vieira (2011), onde os mesmos eram colocados em aproximadamente 1ml de solução por 1mg. Para medição da perda de massa escolheu-se os intervalos de 24 e 48 horas de submersão, 4, 7, 14, 21 e 28 dias.

O ensaio de degradação foi realizado em tubos de ensaio de vidro tampados com três amostras, em vidros independentes, de cada um dos materiais por cada tempo a ser determinado. Estes tubos de ensaio foram imersos em água destilada a 37°C nos 28 dias de realização da degradação.

A elaboração do PBS para utilização neste ensaio também teve como referência o produzido por Vieira (2011) e a composição do mesmo está apresentada na tabela 2. Em relação ao trabalho da autora, modificou-se somente a massa de fosfato de sódio, uma vez que o composto presente no laboratório era hidratado e, com isso, manteve-se a relação molar do composto, aumentando a massa utilizada.

Tabela 2 - Concentração do PBS utilizado para ensaio de degradação.

Componentes	Quantidade
Fosfato de sódio hidratado	4,49g
Fosfato de potássio	0,19g
Cloreto de sódio	8,0g
Água destilada	500mL

Fonte: do autor.

Em todos os intervalos, utilizou-se filtro quantitativo faixa azul para separar o PBS com os produtos da degradação e a parte sólida. O filtro, juntamente com a parte sólida resultante, foi levado em estufa a 60°C por 24 horas para obter a massa final dos implantes, presentes naquela data.

Os dados foram dispostos graficamente em porcentagem de perda de massa com a utilização do software Origin®.

4.2.6 Ensaios de caracterização físico-química

Foi realizada a caracterização físico-química dos materiais nas seguintes etapas: matérias primas, colágeno após solubilização e secagem, blendas e blendas com AR, conforme representado na figura 4.

Para a execução do ensaio de Difração de Raios X (DRX) foi utilizado o equipamento XDR-6000 da empresa Shimadzu com velocidade de 3°/min e com variação de ângulo de 10° a 100°, utilizando a radiação de Cu, voltagem de 40kV e corrente de 30mA, presente no Laboratório de Caracterização do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET-MG.

Para a realização do ensaio de Termogravimetria (TG) foi utilizado o equipamento DTG-60/60H da Shimadzu, com cadinho de Alumina, atmosfera de Nitrogênio (50ml/min) e 10°C/min, presente no Laboratório do Departamento de Química do CEFET/MG. A derivada da termogravimetria (DTG) foi obtida pelo software Origin®.

Para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da Matriz de Colágeno, do PLGA e do Ácido Rosmarínico, foi utilizado o metalizador SC7620, da empresa Quorum, nas amostras, juntamente com o equipamento Vega3 Tescan, presentes em laboratório da empresa Phosther Tecnologia de Aglomerações LTDA.

Para a realização do MEV nas blendas com e sem o fármaco e no Colágeno após solubilização e secagem, utilizou-se o metalizador SC-701, da Sanyu Electron e o equipamento SSX-550 da marca Shimadzu, presentes no Laboratório de Caracterização do CEFET-MG.

Sobre a realização da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), o ensaio foi executado em todas as amostras sob técnica de ATR (*Attenuated total reflectance*) no equipamento IR-Prestige-21 da Marca Shimadzu, disponível no Departamento de Química do CEFET-MG.

O único ensaio que foi realizado somente na matéria prima é a Espectroscopia de raios X com Energia Dispersiva (FRX) ou a Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), que são equivalentes.

No caso da matriz de Colágeno, utilizou-se do equipamento EDX-720 da empresa Shimadzu para a realização do ensaio, através da técnica de Espectroscopia de Fluorescência de Raios X (FRX), disponível no Laboratório da empresa Phosther Tecnologia de Aglomerações LTDA.

No caso do Ácido Rosmarínico e do PLGA 75/25, em que os materiais possuem um valor comercial considerável, optou-se por realizar a Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) pelo equipamento X-Max^N, da marca Oxford Instruments, disponível no Laboratório da empresa Phosther Tecnologia de Aglomerações LTDA. Tal opção se deu porque o ensaio é realizado com a mesma amostra que o MEV, não demandando mais material, como é o caso do EDX.

Para a realização da medição do ângulo de contato, utilizou-se o goniômetro DSA 100, fabricado pela empresa Kruss, disponível no Laboratório de Biomateriais do CEFET-MG. O equipamento possui uma agulha que aproxima do material e deposita sobre este 5µL água destilada.

Para a confecção das amostras para a medição do ângulo de contato, utilizou-se o pó dos materiais P75C25AR, P50C50AR, P75C25 e P50C50, que foram colocados em lâmina de vidro a 90°C para que o material se fixasse e, com isso, tornando possível a realização do ensaio.

4.2.7 Caracterização biológica

Foram realizadas nas blendas P75C25, P75C25AR, P50C50 e P50C50AR os testes de hemocompatibilidade, ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e viabilidade celular com utilização de sal de tetrazólito (MTT) com fibroblastos em triplicata.

Amostras em triplicata das blendas P75C25, P75C25AR, P50C50 e P50C50AR, de dimensões aproximadas de 1,5mm de comprimento por 0,5mm de diâmetro, foram colocadas em contato com a mistura de sangue humano diluído nos parâmetros da norma ASTM F756-00 e incubadas em estufa a 37°C durante 3 horas e com agitação a cada 30 minutos. Para a realização do controle negativo optou-se pelo uso de polietileno e para controle positivo, do látex.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 4°C e o plasma sobrenadante foi coletado para a realização dos testes de hemocompatibilidade e ROS.

Para o teste de hemocompatibilidade, 500µL de cada sobrenadante foi homogeneizada com 500µL de reagente Drabkin (Labtest, São Paulo, Brasil) por cerca de 30 minutos. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540nm e a

concentração de hemoglobina foi determinada por interpolação linear dos valores de absorbância das amostras na curva de calibração, utilizando padrões comerciais. O índice de hemólise foi calculado de acordo com equação 1, onde [Hb] corresponde à concentração de hemoglobina.

$$\%Hemólise = \frac{[Hb]_{amostra} - [Hb]_{controle\ negativo}}{[Hb]_{controle\ positivo} - [Hb]_{controle\ negativo}} \quad (1)$$

Para a realização do ensaio de ROS, foi utilizado o protocolo de Siqueira et al (2004). Os sobrenadantes obtidos nos testes de hemólise foram colocados em placas de 96 poços e adicionado 10µL de detector de diclorofluorescência oxidada (DCF-DA - Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA) a 37°C durante 30 minutos, protegidos de luz. A fluorescência de diclorofluorescência oxidada (DCF) foi detectada no plasma pelo comprimento de onda de excitação de 485nm e emissão de 535nm no leitor de microplacas de fluorescência (Synergy, Biotek Instruments, Vermont, USA). Utilizou-se uma curva padrão com DCF e a porcentagem foi expressa em porcentagem do controle positivo (100%).

Para a realização do ensaio de MTT, foram cultivados linfócitos em placas de 96 poços com densidade de $0,5 \times 10^6$ células/poço de linfócitos isolados de sangue humano por 24 horas em meio RPMI 1640 (Gibco-BRL Corporate, Headquarter, Gaithersburg, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS, Thermos Fisher Scientific, MA, USA), 4% de fitohemaglutina, 100U/ml penicilina e 100µg/ml de estreptomicina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA) na presença das blendas P75C25, P75C25AR, P50C50 e P50C50AR em medidas aproximadas de 1,5mm de comprimento por 0,5mm de diâmetro, em formato cilíndrico.

As suspensões contendo as células foram gotejadas em lâmina e secas à temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com kit comercial Panótico Rápido LB – Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, por 15 segundos, sendo 5 segundos em cada uma das soluções, uma fixadora e duas corantes. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas para análise em microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany) e digitalização através da microcâmera JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan).

A viabilidade celular foi determinada por meio da capacidade da mitocôndria converter o sal brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT)

conforme descrito por Mosmann (1983). Foram adicionados, portanto, 100µL de 1mg/ml do reagente de MTT por poço e incubado por 4h.

O MTT não convertido foi removido e a quantidade de cristais formados (é diretamente proporcional ao número de células viáveis) foi determinado pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO) e medido por densidade óptica com comprimento de onda de 570nm pelo leitor de multiplacas da marca Shimadzu. Este ensaio foi realizado em, no mínimo, três amostras independentes e a viabilidade foi obtida em porcentagem em relação ao grupo controle.

Para os ensaios biológicos, os dados foram expressos em função da média e do desvio padrão com uso do programa Graph Prism 5.0[®] utilizando análise de variância (One-way ANOVA) seguido de teste de *Student Newman Keuls*. Foram considerados significativos resultados de “p” inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

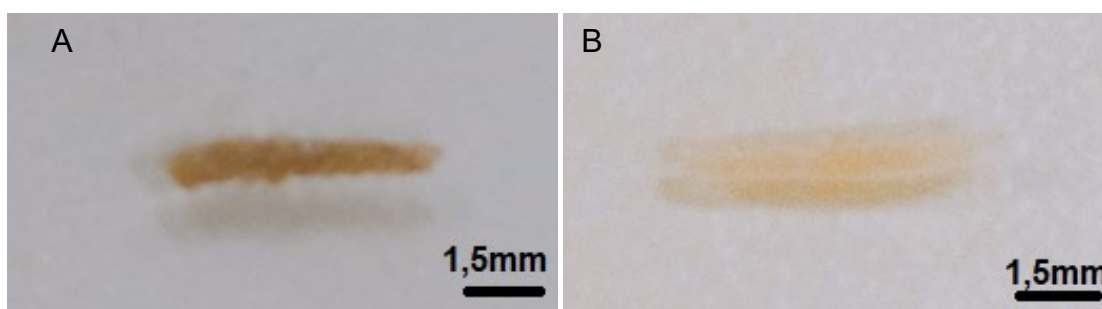
5. RESULTADOS

Com base na metodologia explicitada, foram obtidos os resultados apresentados nos subitens abaixo.

5.1 Obtenção de massa dos implantes

Após a moldagem dos implantes com auxílio de temperatura, obteve-se implantes de P50C50 como o que aparece na figura 5A e P75C25 na figura 5B.

Figura 5 - Implantes poliméricos de P50C50 (a) e P75C25 (b)



Fonte: do autor.

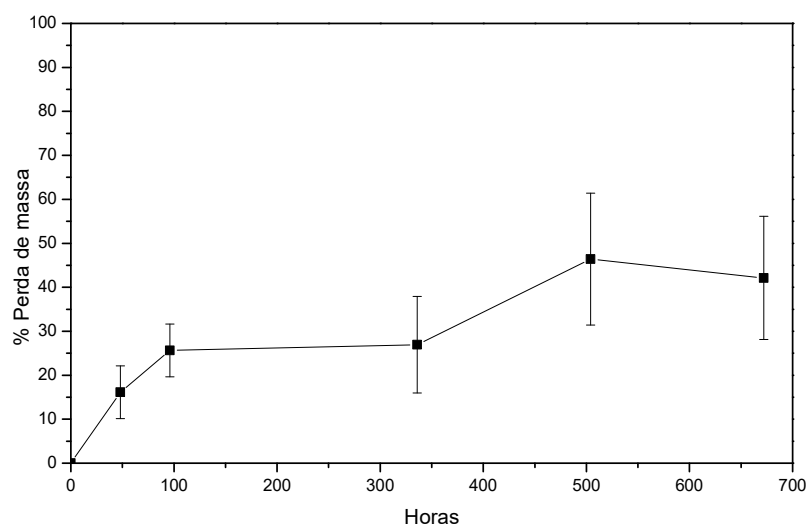
Nota-se que a coloração dos implantes obtidos é diferente, devido à proporção dos polímeros nas blendas P50C50 e P75C25, visto que o processamento das mesmas é realizada de forma semelhante.

Dez amostras escolhidas aleatoriamente entre os implantes P50C50 e P75C25 foram pesadas tendo sido obtido valores de $(2,83 \pm 0,53)\text{mg}$ e $(2,86 \pm 0,49)\text{mg}$ para os respectivos.

5.2 Ensaio de degradação das blendas sem o fármaco

Conforme descrito na metodologia, as blendas P75C25 e P50C50 foram ensaiadas para a verificação da perda de massa durante 28 dias. A figura 6 representa a perda de massa ao longo dos 28 em que o ensaio foi realizado para a blenda P75C25.

Figura 6 - Perda de massa da blenda P75C25 em PBS durante 28 dias

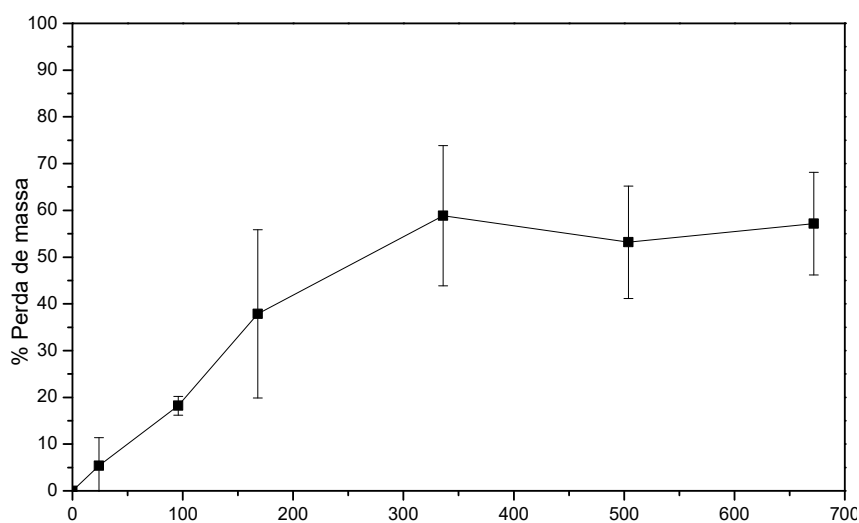


Fonte: do autor

A perda de massa na blenda P75C25 no final dos 28 dias foi de 42,12 (± 12)% da massa inicial. A blenda P75C25 apresentou uma perda de massa próxima nos dias 21 e 28.

A perda de massa para a blenda P50C50 está representada na figura 7..

Figura 7 - Perda de massa da blenda P50C50 em PBS durante 28 dias



Fonte: do autor.

Nota-se que a porcentagem de perda de massa em 336 horas (14 dias) é próxima a perda de massa em 21 dias (504 horas) e de 28 dias (672 horas). No final do ensaio, a blenda havia perdido 57,16 (± 17)% da sua massa inicial. Os períodos estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Perda de massa das blendas P75C25 e P50C50.

	24 horas	48 horas	4 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
P75C25		16,13 $\pm$ 6%	25,61 $\pm$ 6%		26,94 $\pm$ 11%	16,42 $\pm$ 15%	42,12 $\pm$ 14%
P50C50	5,39 $\pm$ 6%		18,21 $\pm$ 2%	37,85 $\pm$ 18%	58,88 $\pm$ 15%	53,17 $\pm$ 12%	57,16 $\pm$ 11%

Fonte: do autor.

Para o ensaio das duas blendas, nota-se que há um desvio padrão alto que se dá pela massa dos implantes serem muito pequenas e a precisão da balança e a confiabilidade da mesma não são apropriadas para o ensaio. Por isso, tem-se que os resultados deste ensaio de degradação são indicativos do comportamento da blenda e não podem ser tido como padrão, de uma forma geral.

Somente os dados de perda de massa para 14 e 21 dias, quando comparados em triplicata pelo método de variância ANOVA apresentaram significância estatística com $p < 0,05$. Ou seja, as diferenças entre as amostras podem ser tidas como reais nesses intervalos de tempo do ensaio.

Com base nos dados, consegue-se perceber que há alteração na degradação das blendas com a alteração de proporção de colágeno e PLGA e, portanto, a porcentagem de cada um dos polímeros possui um efeito de controle na degradação destas.

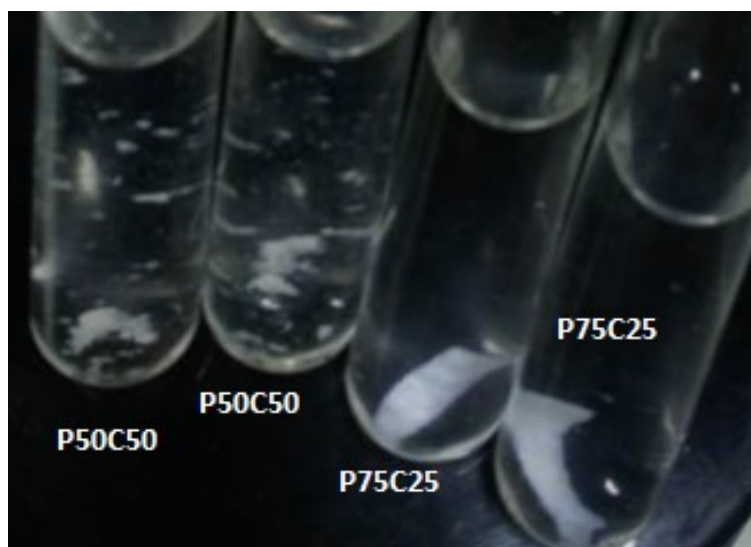
Se for considerada que a liberação do fármaco é proporcional a degradação das blendas, temos que as blendas de PLGA e Colágeno apresentam potencial para prolongar essa liberação, com base nos implantes que Vieira (2011) desenvolveu, visto que os implantes desenvolvidos pela autora liberam 92,7% do fármaco em 21 dias.

Infelizmente, não se pode afirmar que é proporcional visto que Kanou et al (2000, apud Vieira, 2011) fala sobre três etapas da liberação do fármaco. A primeira

é uma alta taxa devido à liberação do fármaco na superfície do sistema de liberação, a segunda é a difusão do fármaco da matriz para o meio externo e a terceira é um aumento devido ao entumescimento e desintegração da matriz. O resultado da autora não apresenta perda de massa para efeito de comparação.

No 28º dia de ensaio, os implantes de P50C50 apresentavam-se de forma dispersa na solução PBS, conforme pode ser observado na figura 8, enquanto os implantes de P75C25 apresentavam de forma inteira, como também pode ser observado na mesma figura.

Figura 8 - Blendas P50C50 e P75C25 no 28º dia de ensaio de degradação em PBS.



Fonte: do autor

As P50C50 demonstravam uma desintegração que, possivelmente indica a terceira etapa deste processo de degradação descrito anteriormente, enquanto as amostras de P75C25 não apresentavam essa modificação física. Com isso, juntamente com os ensaios de degradação, pode-se dizer que as blendas de P50C50, apresentam uma degradação mais rápida que a P75C25. Portanto, pode-se concluir que a formação de blendas de PLGA e Colágeno apresentam potencial uso para o controle da liberação de degradação polimérica e, possivelmente, da liberação de fármacos.

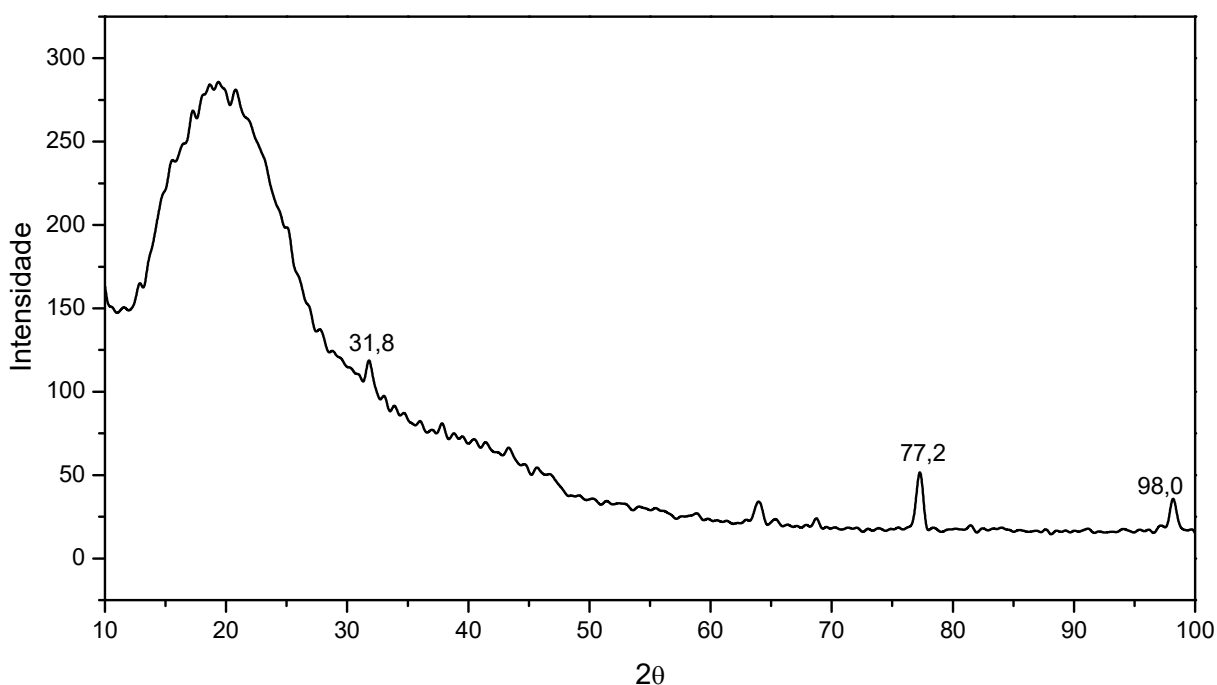
5.3 Ensaios de caracterização físico-química das matérias primas

Conforme apresentado na metodologia, foi realizada a caracterização físico-química das matérias primas, do CSS, das blendas P50C50, P50C50AR, P75C25 e P75C25AR.

5.3.1 Matriz de Colágeno tipo I

A figura 9 mostra o difratograma de Raios X da matriz de Colágeno tipo I. Sobre o mesmo, pode-se observar um halo amorfo que se inicia por volta de 15° e segue até aproximadamente 30° , tendo como valor da máxima intensidade o ângulo de $20,76^\circ$. Além disso, pode-se observar picos menores que estão representados na figura 9.

Figura 9 - Difratograma de Raios X da Matriz de Colágeno



Fonte: do autor.

No trabalho de Rolim (2013), que utiliza colágeno bovino hidrolisado, foi apresentado um gráfico semelhante, cujo pico é apresentado em $20,89^\circ$. A mesma autora não diz a respeito do ângulo e afirma que o material está em concordância com a literatura por apresentar um material amorfo com pico largo e de alta intensidade, que é característico do colágeno.

Sobre os outros picos encontrados neste trabalho, estes não são identificados em outras literaturas pesquisadas, mas são justificadas no trabalho de Prockop e Fertala (1998) em que os autores dizem que a orientação da fibrila do colágeno faz com que o mesmo tenha locais de ligação específicos, semelhante à cristalização. Além disso, o grau de cristalinidade da fibrila varia com fatores como temperatura e tensão e regiões que possuem fibrilas espessas podem apresentar cristalinidade. Com isso, o autor acredita que os picos de leitura do DRX estão relacionados com a presença destas fibrilas.

Os dados da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier da matriz de Colágeno podem ser observados na figura 10 entre os comprimentos de onda de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ com a finalidade de verificar as ligações covalentes presentes no material e compará-las com as da literatura.

Segundo resultados apresentados por Wolf (2007), tanto a fibra de colágeno tipo I quanto o pó deste mesmo colágeno, apresentam resultados de FTIR de forma semelhante e, portanto, os resultados apresentados por ele para o colágeno em pó são válidos também para o formato apresentado nesse trabalho.

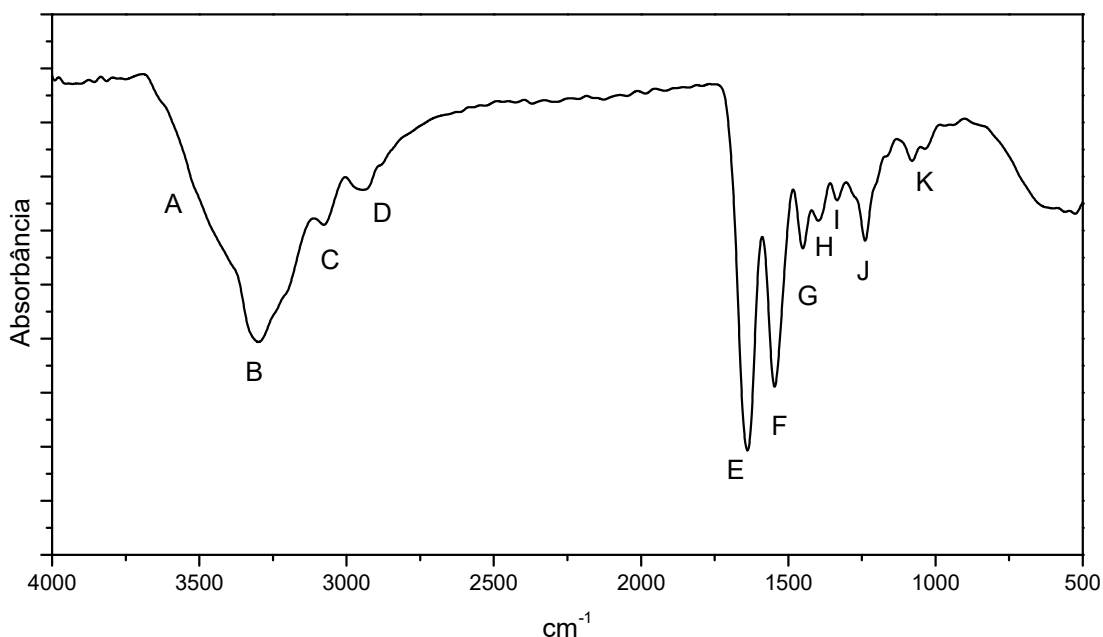
Sobre a realização do ensaio de FTIR na Matriz de Colágeno tipo I, o mesmo apresentou similaridade com as bandas apresentadas por Wolf e, com isso, foram indicados com as mesmas letras utilizadas por ele, cujos significados estão dispersos na tabela 4.

Sadeghi-avalshahr et al (2017) destacam as bandas que representam a amida I (entre $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$) associada ao estiramento da carbonila (C=O), a amida II (entre $1540\text{-}1555\text{ cm}^{-1}$), associada ao estiramento da ligação C-N e deformação da ligação N-H , e a amida A (entre $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$), relacionada ao alongamento da ligação N-H . Jose et al (2009) destacam as bandas do Colágeno

tipo I os comprimentos de onda 3274, 2918, 1645, 1552 e 1241 cm^{-1} como sendo, respectivamente, amidas A, B, I, II e III.

Sobre a amida A, Santos et al (2013) afirmam que a banda de alongamento do alceno em 2850-3000 cm^{-1} e da hidroxila em 3200-3600 cm^{-1} sobrepõe esta banda de estiramento do N-H, que se apresenta entre 3360-3320 cm^{-1} .

Figura 10 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier da Matriz de Colágeno.



Fonte: do autor.

Os dados do FTIR obtidos apresentam todas essas bandas citadas pelos autores e, por isso, confirmam as ligações presentes no material como sendo típicas do colágeno, de acordo com a bibliografia utilizada para tal.

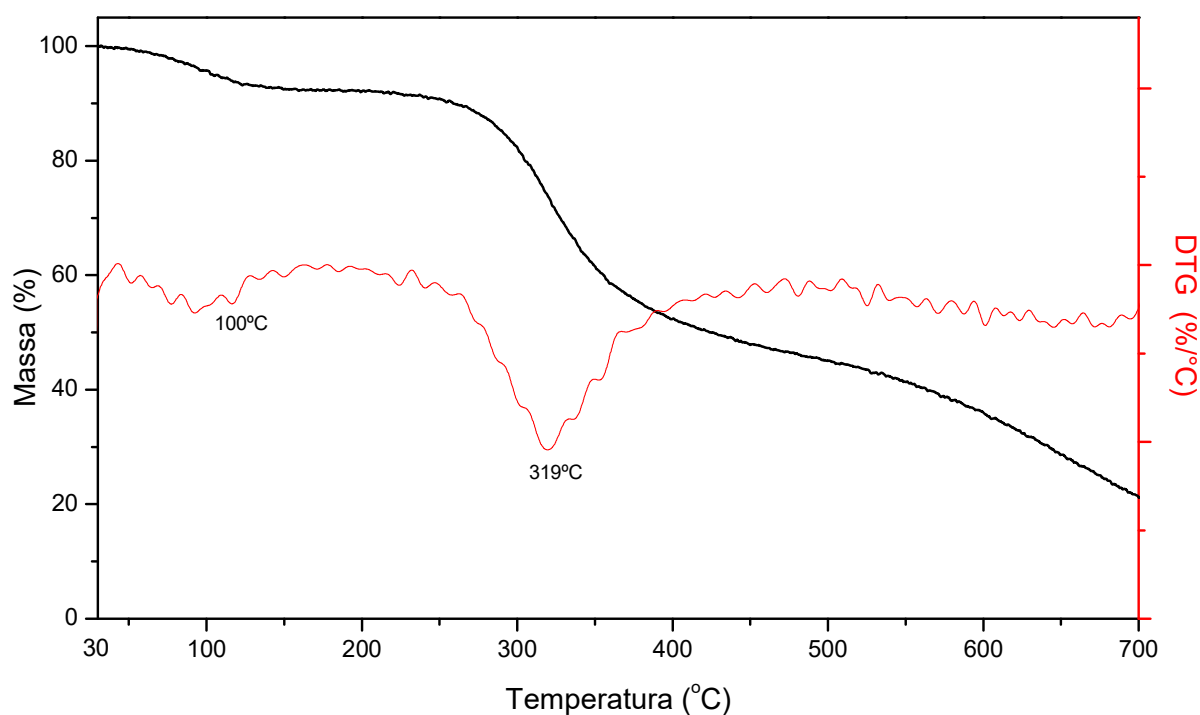
Tabela 4 - Bandas apresentadas no ensaio de FTIR para Colágeno tipo I

LETRA	REPRESENTAÇÃO
A	Água livre
B	Estiramento de N-H
C	Amida II
D	Estiramento de C-H
E	Estiramento de C=O (Amida I)
F	N-H (Amida II) e C-N
G	-CH ₂ e -CH ₃ (assimétrico)
H	-COO ⁻
I	Estiramento de -C-N e -N-H no plano (Amida III)
J	CO (vibrações de -OH)
K	Deformação de N-H

Fonte: Arvanitoyannis (1999, apud WOLF, 2007).

A figura 7 mostra a termogravimetria (TG) e a análise diferencial termogravimétrica (DTG) da matriz de Colágeno tipo I para as temperaturas de 30 a 700°C.

Figura 11 - TG e DTG da Matriz de Colágeno tipo I.



Fonte: do autor

Através da realização da termogravimetria, é possível perceber que as maiores variações de massa do material se deram em 3 eventos, desde 30°C até aproximadamente 100°C, de 270°C a 400°C e de 400°C em diante.

A derivada da termogravimetria (DTG) mostra que a perda de massa é maior quando a temperatura é próxima de 319°C e que a primeira etapa de perda de massa varia até 100°C e pode ser vinculada a perda de água estrutural no polímero.

A porcentagem da massa resultante nas temperaturas aqui citadas está presente na tabela 5.

Tabela 5 - Porcentagem de massa resultante nas temperaturas de 100°C, 319°C, 400°C e 700°C.

Temperatura (°C)	% massa
100	95,70
270	88,98
319	74,15
400	52,37
700	21,15

Fonte: do autor

No trabalho de Pedroso (2009), foram utilizadas amostras liofilizadas de colágeno e há estágios de perda de massa que variam de 25 a 200°C, 200 a 400°C e acima de 400°C. O mesmo autor atribui que estas faixas estão ligadas a perda de água estrutural, a decomposição térmica do colágeno e a carbonização do mesmo. Outros trabalhos que apresentam termogravimetria similar para o Colágeno são o de Moreira (2014) e Souza (2015). As mesmas condições são condizentes com este trabalho, por apresentarem resultados similares dentro da faixa de temperatura em que o teste foi executado.

Na análise de EDX (caracterizando presença apenas de elementos com número atômico superior a 11) da matriz de Colágeno tipo I, foram encontrados os seguintes elementos químicos Cloro (Cl) em porcentagem 77,99% ($\pm 0,56\%$), Cálcio (Ca) 16,09% ($\pm 0,22\%$), Enxofre (S) em 3,53% ($\pm 0,07\%$), Potássio (K) em 1,17% ($\pm 0,30\%$) e Fósforo em 1,07% ($\pm 0,31\%$). Quantidades não significativas de Ferro (Fe), Cobre (Cu) e Zinco (Zn) também foram relatadas pelo equipamento.

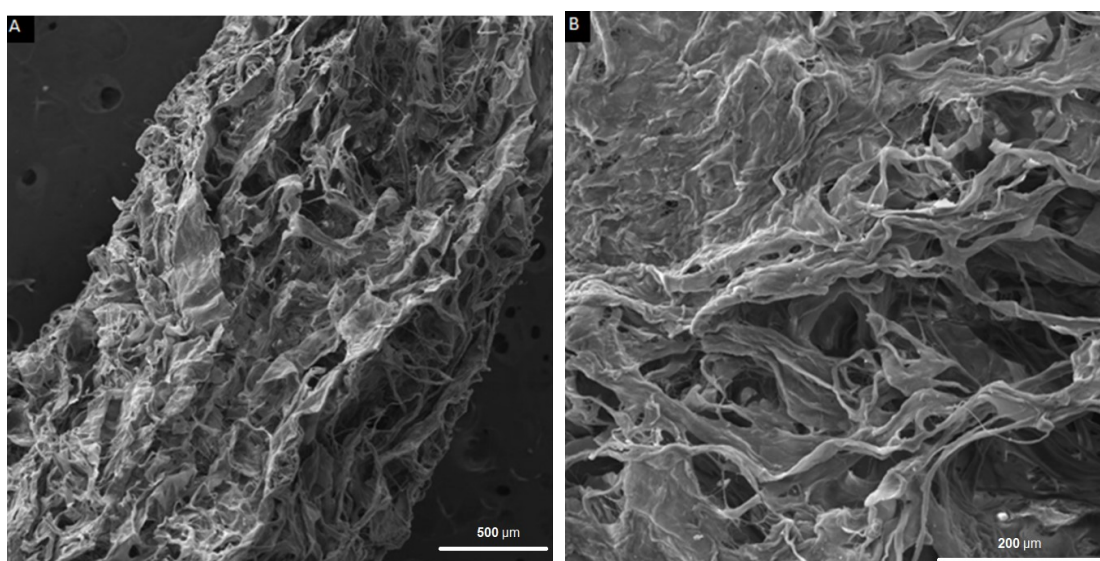
Sobre a técnica em que foram encontrados estes elementos, sabe-se que a mesma não é capaz de identificar elementos com números atômicos inferiores ao Sódio e, por essa razão, não se identifica elementos como Carbono, Oxigênio e Nitrogênio que sabe-se ser maioria na amostra analisada. Dessa forma, as porcentagens que foram encontradas são relativas somente a estes elementos com número atômico entre 11 e 92.

Sobre os elementos Cl e S, os mesmos também foram encontrados no estudo de Andrade, Ferreira e Domingues (2004) sendo considerado como elementos do

colágeno padrão utilizado por eles. O mesmo acontece quanto aos elementos Ca, P e K nos estudos de Thitiset et al (2013).

As micrografias da matriz de Colágeno tipo I em duas magnitudes de ampliação diferentes para que a morfologia deste material seja avaliada podem ser observadas na figura 12.

Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura da matriz de Colágeno tipo I em ampliações diferentes.



Fonte: do autor.

Na realização do MEV da matriz de Colágeno, pode-se observar que a estrutura é fibrosa, não orientada e sem regularidade, com isso, é possível observar regiões com baixa concentração do material e regiões onde a concentração do mesmo é maior. A figura 12A mostra uma ampliação e demonstra essa falta de padrão estrutural do mesmo, enquanto a figura 12B, mostra uma região em que a concentração de colágeno é aparentemente maior e outra em que a concentração é menor, mostrando que o material não está distribuído de forma homogênea.

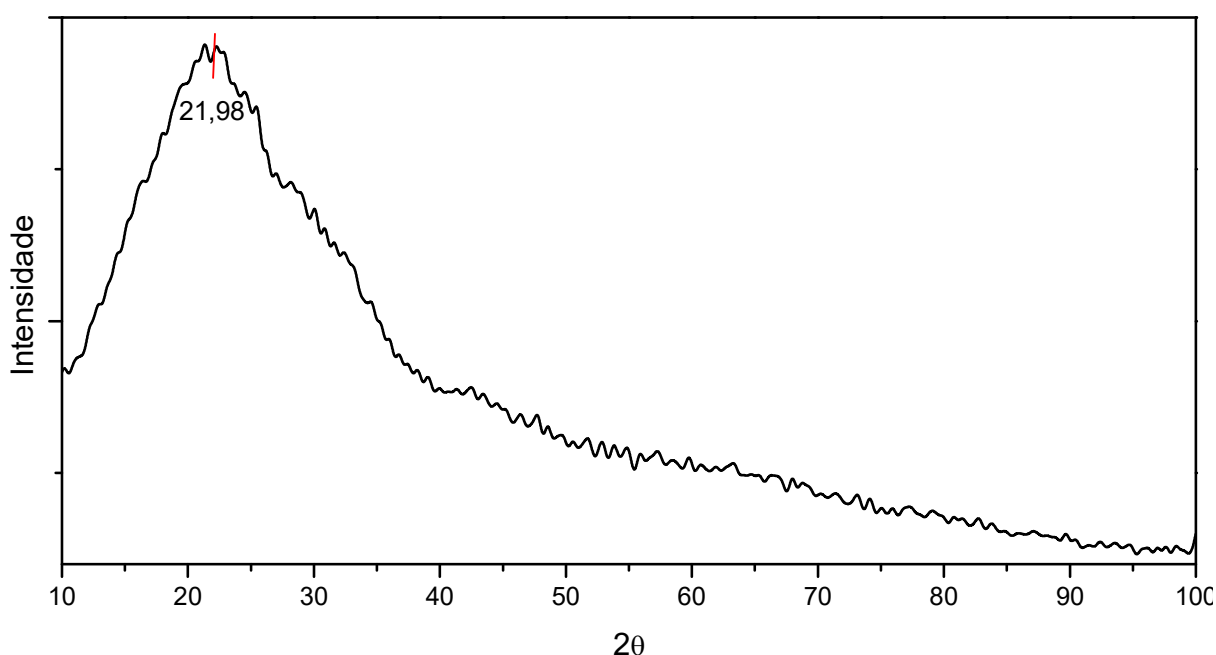
O MEV comprova que há fibras dispersas na matriz de colágeno e, com isso, torna a hipótese dos picos de DRX como uma hipótese aceitável, mesmo que não comprovada.

Sobre a caracterização das matérias primas, pode-se afirmar que o material cedido pela empresa TechnoDry é, de fato, composto de Colágeno tipo I fibrilar e, com isso, toda a pesquisa pode ser realizada tomando como base este material.

5.3.2 Poli (ácido-lático-co-glicólico) – PLGA - em proporção 75:25

Sobre a realização do difratograma de raios X do PLGA 75:25, os dados obtidos foram colocados em forma de gráfico e estão representados na figura 13.

Figura 13 - Difratograma de Raios X do PLGA 75/25.



Fonte: do autor.

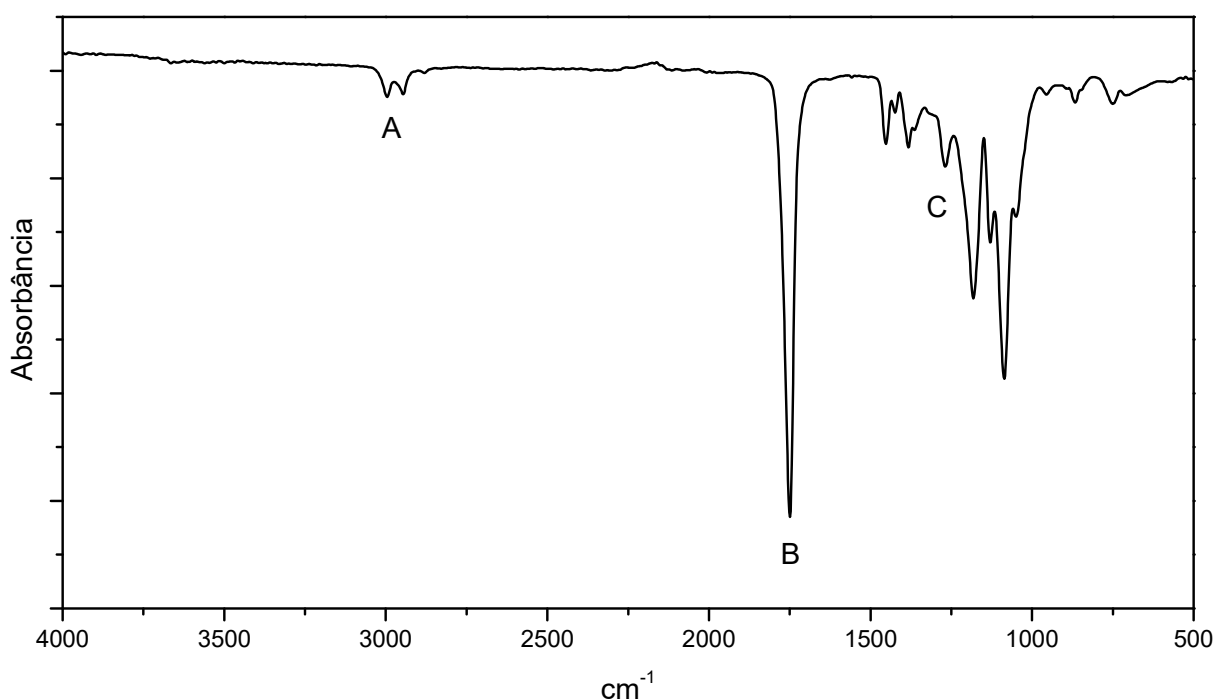
O resultado obtido pelo ensaio mostra um material de natureza amorfa que possui uma banda com valor máximo em torno de 22°. Não são perceptíveis picos de cristalinidade no material.

Sobre o Difratograma de Raios X do PLGA 75:25, Saliba et al (2008) afirmam que nenhum pico foi encontrado para o material e, com isso, pode-se afirmar que o mesmo possui natureza amorfa, além disso, a autora apresenta um gráfico para o

PLGA nesta proporção bem semelhante ao apresentado neste trabalho. O mesmo resultado também foi apresentado por Campos (2016).

Sobre a realização do ensaio de FTIR no material PLGA 75:25 neste trabalho, o gráfico gerado está apresentado na figura 14.

Figura 14 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do PLGA 75/25



Fonte: do autor.

A tabela 4 mostra as informações do trabalho de Vieira (2011) sobre o número de onda e a representação das bandas encontradas pela autora. As letras utilizadas na figura 14 foram colocadas na tabela 6 para ilustrar a similaridade dos resultados do trabalho.

Com base nessa similaridade, pode-se afirmar que os números de onda produzem estiramento de ligações que são do PLGA 75:25 e, com isso, auxiliam na identificação da matéria prima utilizada como sendo tal material.

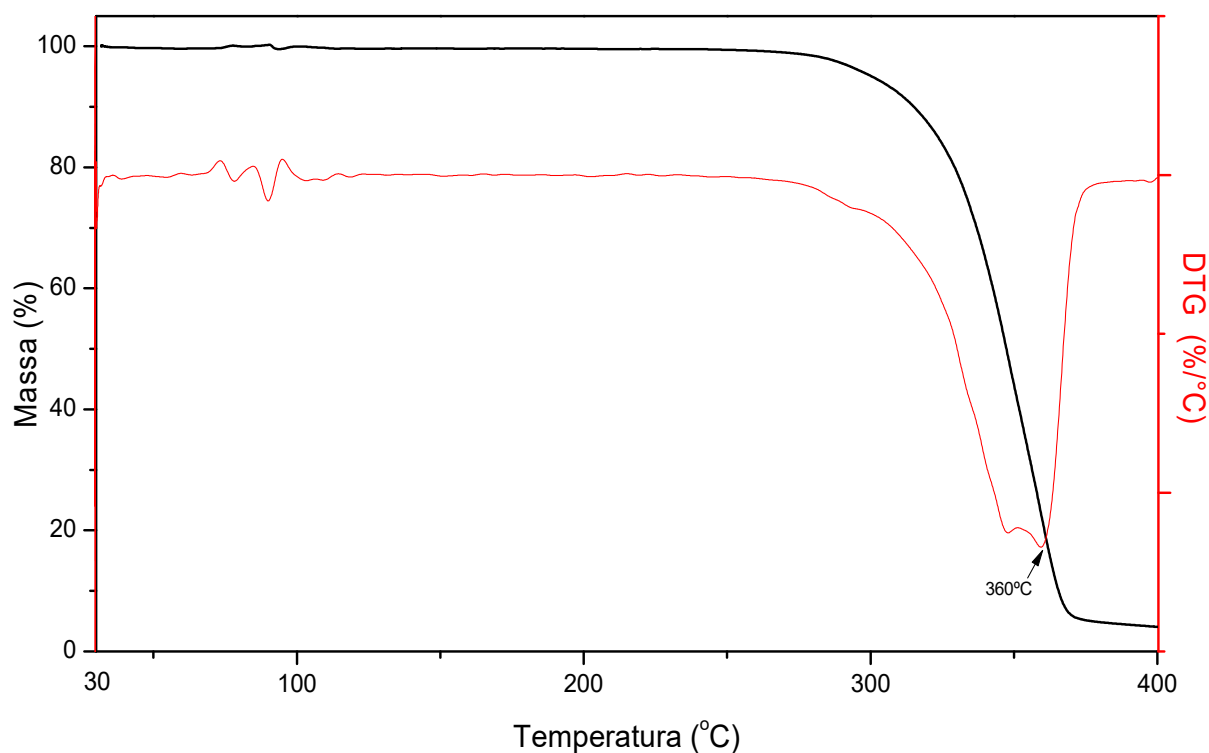
Tabela 6 - Indicações no FTIR do PLGA 75:25

Letra	cm ⁻¹	Representação
A	2947 e 2995	Estiramento de grupos metila (C-H)
B	1748	Estiramento de grupos carbonilas (C=O)
C	1460 a 1000	Estiramentos das ligações C-O e O-H

Fonte: do autor, com base nos dados de Vieira (2011).

O gráfico de termogravimetria (TG e DTG) obtido com os dados do ensaio da amostra PLGA 75:25 está representado na figura 15 e foi adquirido pelo tratamento no software já citado.

Figura 15 - TG e DTG do PLGA 75:25.



Fonte: do autor

O ensaio de DTG do PLGA 75/25 foi realizado até 400°C e pode-se observar uma perda de massa significativa quando o material é aquecido a partir de 275°C, tendo seu fluxo máximo em 360°C. Há uma pequena variação de massa até 100°C, identificada principalmente pelo DTG, que pode ser vinculada com a perda de umidade da amostra. Também foi realizada a derivada da Análise Térmica Diferencial e foi encontrada para o PLGA a temperatura de transição vítrea de 60,17°C.

Tabela 7 - Porcentagem de massa inicial para as temperaturas citadas.

Temperatura (°C)	% massa
100	99,98
275	98,75
360	21,29
400	4,04

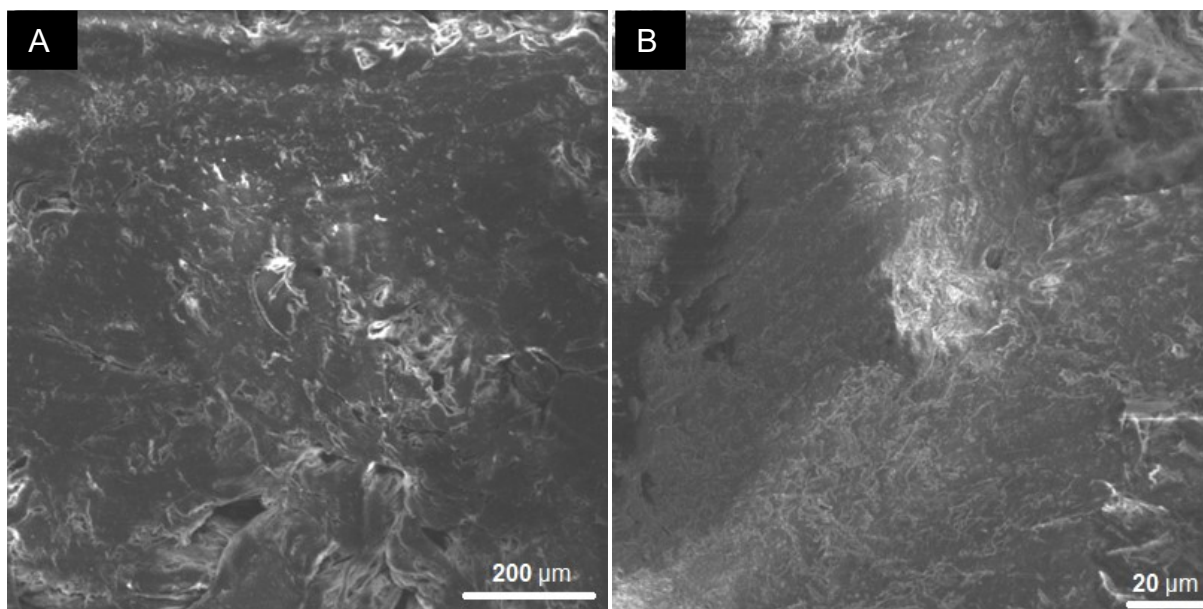
Fonte: do autor

Campos (2016) identifica como temperatura de início da degradação do PLGA 75:25 como sendo 302,1°C em seu ensaio de TG. Tais dados são próximos ao encontrado e, com isso, pode-se dizer que há similaridade com a referência, embora os valores encontrados não sejam exatamente os mesmos.

A realização do EDX no PLGA relata a presença dos elementos Alumínio (Al) em porcentagem 15,85% ($\pm 16,39\%$), Sílica (Si) 2,28% ($\pm 9,94\%$), Titânio (Ti) 5,16% ($\pm 8,93\%$), Vanádio (V) 9,22% ($\pm 10,03\%$), Cobalto (Co) 2,46% ($\pm 7,84\%$), Níquel (Ni) 2,10% ($\pm 6,83\%$), Cobre (Cu) 1,26% ($\pm 7,60\%$), Zinco (Zn) 7,78% ($\pm 9,96\%$), Molibidênio (Mo) 35,64% ($\pm 44,04\%$) e Paládio (Pd) 3,14% ($\pm 32,13\%$). Estatisticamente, nenhum destes elementos possui uma informação consistente, visto que o desvio padrão é maior que a média.

As imagens obtidas da microscopia do PLGA estão dispostas na figura 16 para a compreensão da morfologia deste polímero. Através dessas imagens pode-se perceber o que foi descrito por Vieira (2011), uma massa homogênea e ligeiramente irregular, sendo, portanto, compatível com a referência citada.

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura do PLGA, em ampliações diferentes.



Fonte: do autor.

Com base nessas caracterizações, pode-se afirmar que a matéria-prima caracterizada é, de fato, o PLGA, o que já era esperado, visto que o material foi adquirido de empresa com qualidade mundialmente reconhecida.

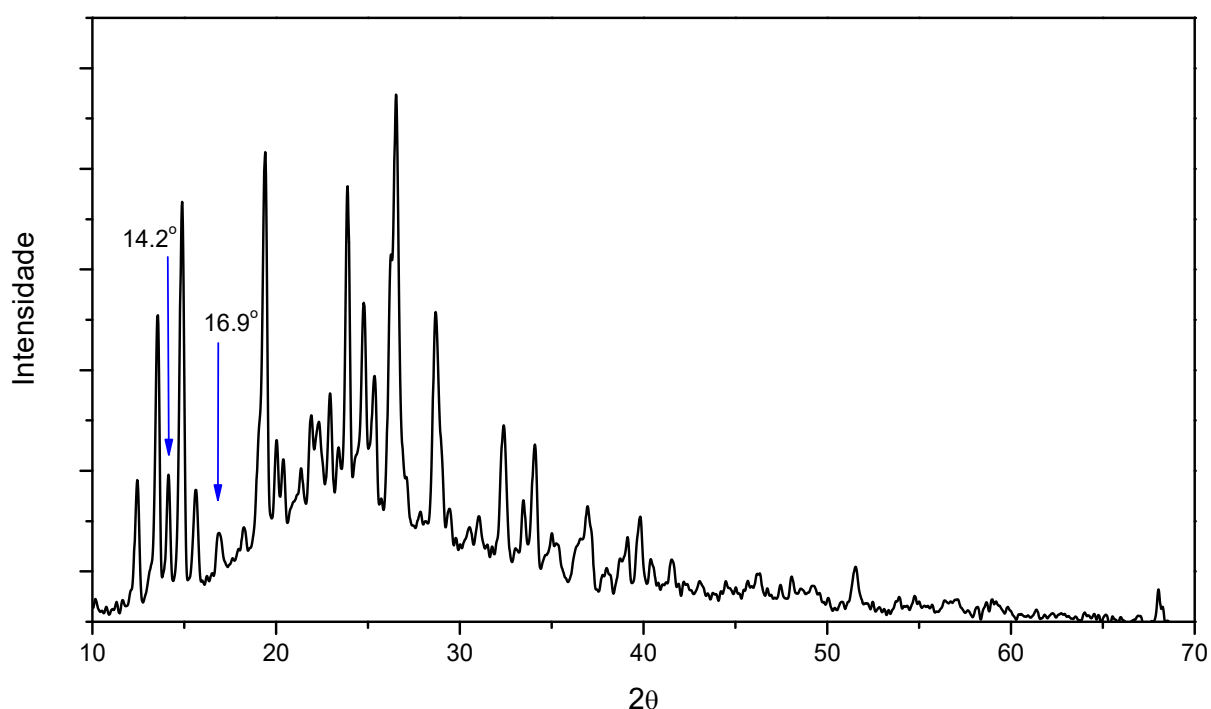
5.3.3 Ácido Rosmarínico

Sobre a realização do difratograma de raios X realizado no Ácido Rosmarínico apresenta-se graficamente na figura 17, para os ângulos de 10° a 70°.

Pode-se perceber que o Ácido Rosmarínico é um material semicristalino, já que o mesmo possui banda de amorfismo que varia de 10 a 50°, aproximadamente, e picos de cristalinidade em praticamente todas as regiões pela qual o ensaio foi conduzido.

Foi calculado um índice de cristalinidade de 18% para o Ácido Rosmarínico, com a criação de uma *baseline* no software Origin®.

Figura 17 - Difratoograma de Raios X do Ácido Rosmarínico.



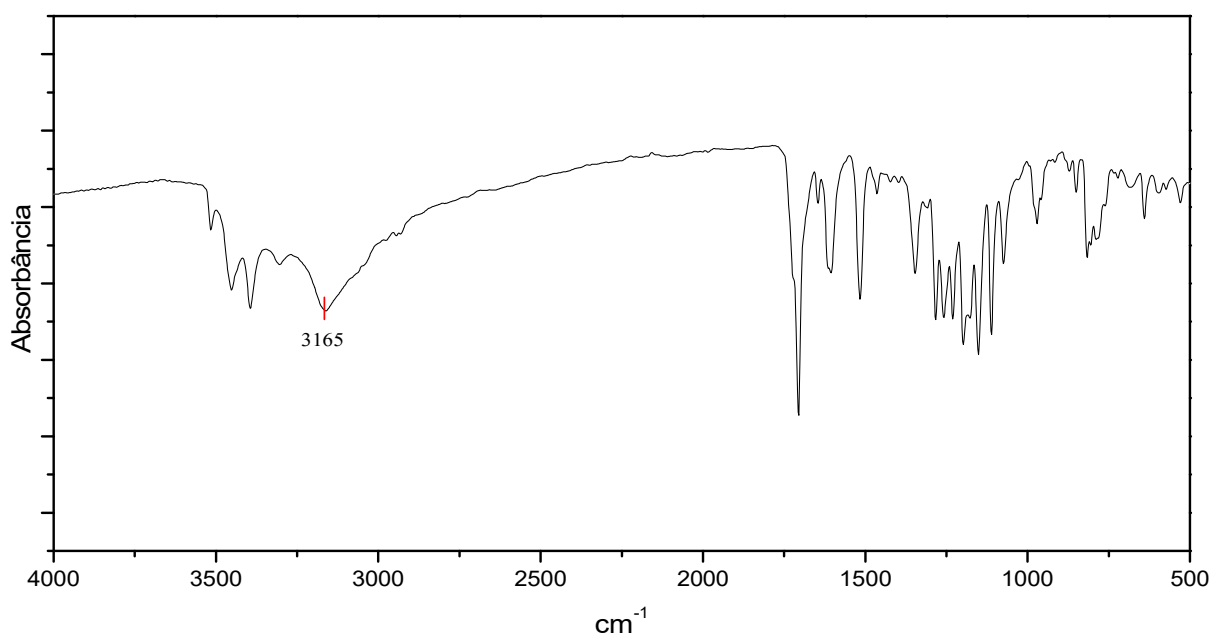
Fonte: do autor.

Os resultados apresentados por Baranauskaite et al (2018) apresentam um gráfico para o AR com variação de ângulo de 4° (aproximadamente) a 70° , em que há uma banda também de amorfismo entre 10° e 50° , identificado pelo gráfico, e a presença de picos cristalinos, principalmente na região de 10 a 35° .

Os autores não destacam graficamente os picos cristalinos e não abordam o grau de cristalinidade para comparação. Somente os picos de $14,29^\circ$ e $16,90^\circ$ são abordados pelos autores como picos de cristalinidade do material e estes também são encontrados neste trabalho.

O gráfico obtido dos resultados do ensaio de FTIR do AR está representado na figura 18 para a faixa na qual o ensaio foi realizado, de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} . Neste gráfico, pode-se destacar o número de onda de 3165 cm^{-1} , cujo significado está representado na tabela 8.

Figura 18 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do
Ácido Rosmarínico



Fonte: do autor.

Os números de onda que apresentam as ligações interatômicas características do composto estão representados na tabela 8.

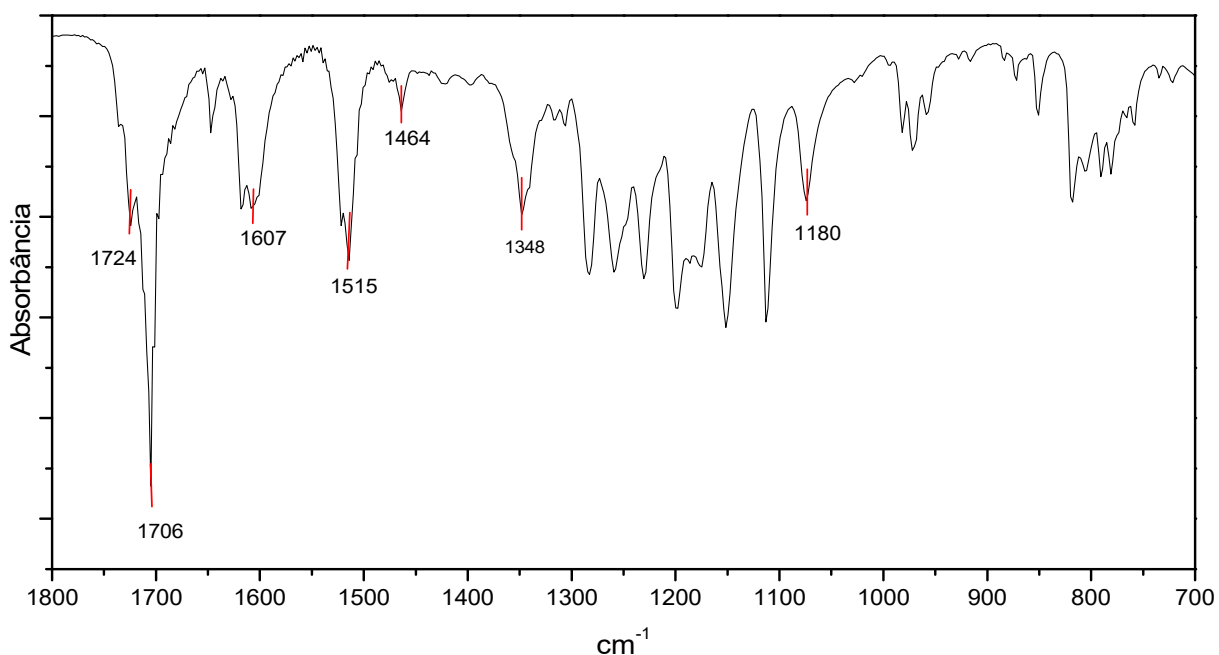
Tabela 8 - Indicações no FTIR do Ácido Rosmarínico.

Letra	cm ⁻¹	Representação
A	3165	Estiramento de ligações aromáticas (C-H) e ligações carboxílicas e fenólicas (O-H)
B	1724 a 1706	Presença de C=O em ácido carboxílico e ésteres
C	1607, 1515 e 1464	Estiramento de ligações em grupos aromáticos (C=C)
D	1348 a 1180	Estiramentos das ligações C-O e O-H

Fonte: do autor, adaptado de Vieira (2011).

Corroborando com os dados de Vieira (2011) expressos na tabela 8, Silva et al (2015) afirma que as principais bandas estão localizadas entre os números de onda de 1800 a 700 cm^{-1} e, portanto, para facilitar a visualização destas, optou-se por representar esta faixa do ensaio de FTIR na figura 19.

Figura 19 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do Ácido Rosmarínico de 1800 a 700 cm^{-1}

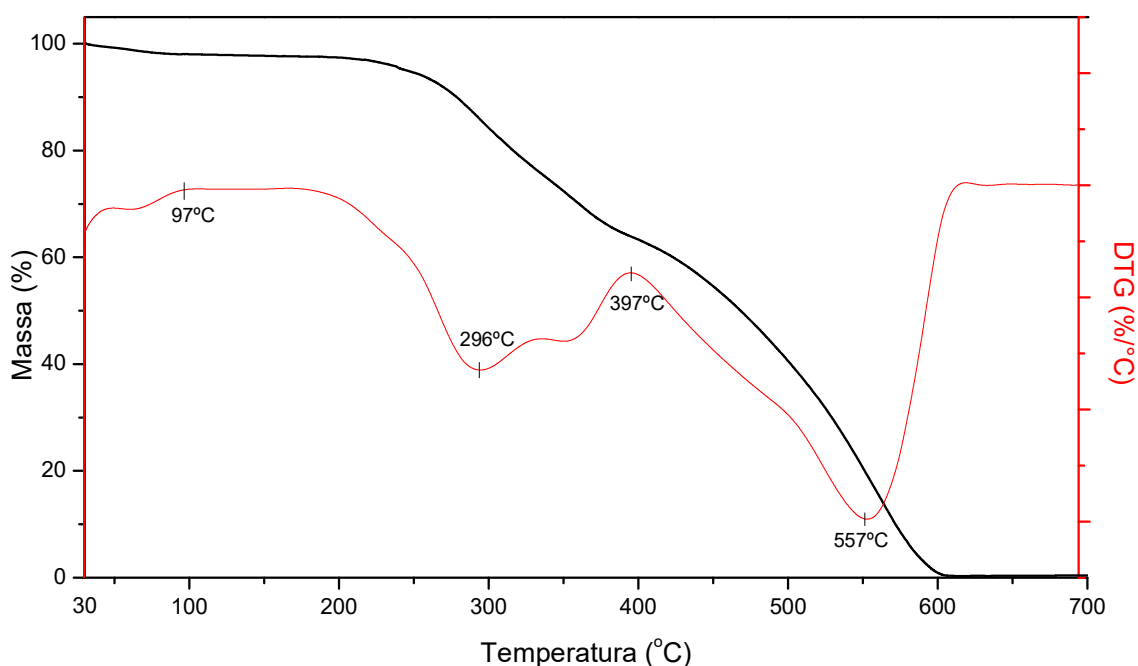


Fonte: do autor.

Com base na tabela apresentada e nos gráficos do ensaio, pode-se afirmar que os picos encontrados nesse trabalho estão de acordo com a referência e, portanto, as ligações presentes neste material são as mesmas encontradas na referência.

O resultado do ensaio de TG do Ácido Rosmarínico está representado através de gráfico pela figura 20 da temperatura de 30°C até 700°C.

Figura 20 - TG e DTG do Ácido Rosmarínico.



Fonte: do autor

Analisando a figura 20, pode-se perceber que o Ácido Rosmarínico sofre perda de massa até 97°C que pode estar associada à perda de água no composto. A perda de massa significativa acontece a partir da temperatura de 200°C, chegando ao fluxo máximo em 296°C e, posteriormente, há uma nova fase de perda de massa que tem seu fluxo máximo em 557°C. Dessa forma, pode-se afirmar que o mesmo inicia a sua decomposição térmica em aproximadamente 200°C e o processo de carbonização se dá por volta de 400°C, quando se acelera a perda de massa, e finaliza-se por volta de 600°C. A massa resultante em cada uma dessas temperaturas segue na tabela 9.

Os ensaios de Análise Termogravimétrica comprovam que o PLGA, o Colágeno e o Ácido Rosmarínico sofrem somente perda de água quando trabalhados a até pouco mais de 100°C, e, com isso, torna-se viável trabalhar com estes materiais até esta temperatura para a confecção dos implantes.

Tabela 9 - Massa de AR resultante nas temperaturas citadas.

Temperatura (°C)	% massa
97	98,05
296	85,30
400	63,31
557	17,19
600	0,91

Fonte: do autor

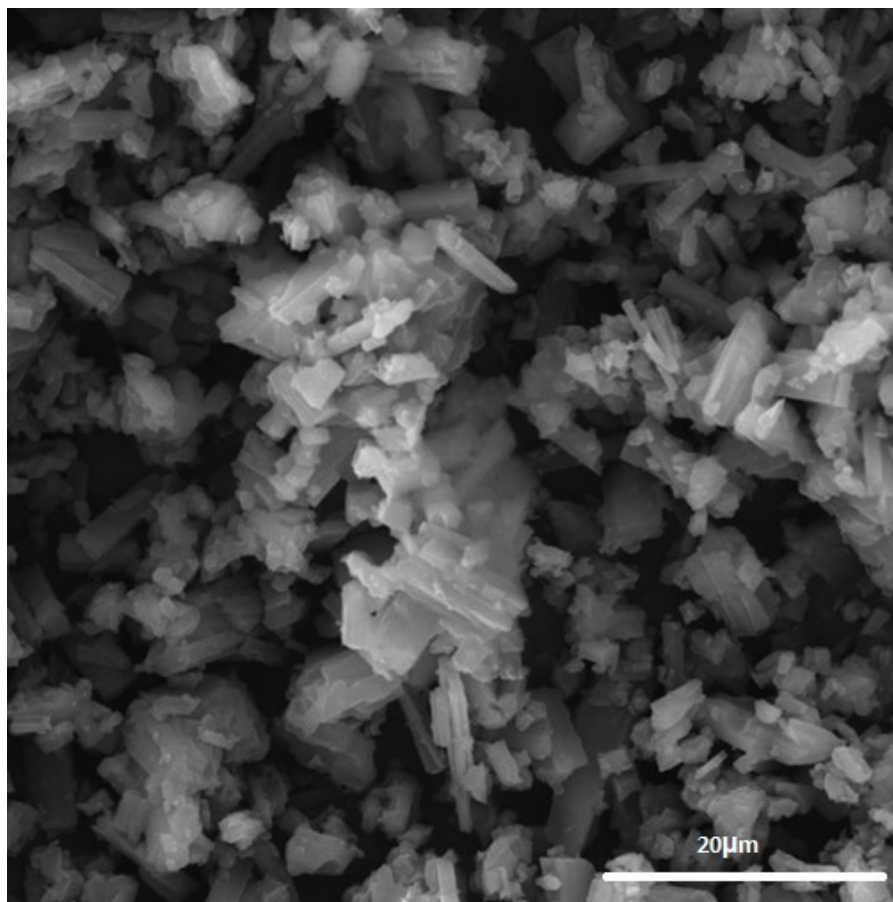
A temperatura escolhida de 60°C para secagem das blendas e de 70°C a 90°C para a confecção dos implantes, portanto, não fazem com que os materiais sofram decomposição.

Para o Ácido Rosmarínico, com a utilização do EDS, foram encontrados os elementos Carbono (C) representando 63,2% ($\pm 2,3\%$), Oxigênio (O) em 36,0% ($\pm 2,2\%$) e quantidades baixas dos elementos Cobre (Cu) 0,3% ($\pm 0,0\%$), Molibidênio (Mo) 0,1% ($\pm 0,2\%$) e Estrôncio (Sr) 0,1% ($\pm 0,0\%$).

Sobre a realização da microscopia eletrônica de varredura no Ácido Rosmarínico, pode-se observar na figura 21 a morfologia deste material. Por meio dela, pode-se afirmar que o AR apresenta uma distribuição de tamanho e forma de partículas sem regularidade.

Não foram encontrados referenciais bibliográficos que trouxessem tal microscopia deste fármaco para efeito de comparação neste trabalho.

Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura do Ácido Rosmarínico.



Fonte: do autor.

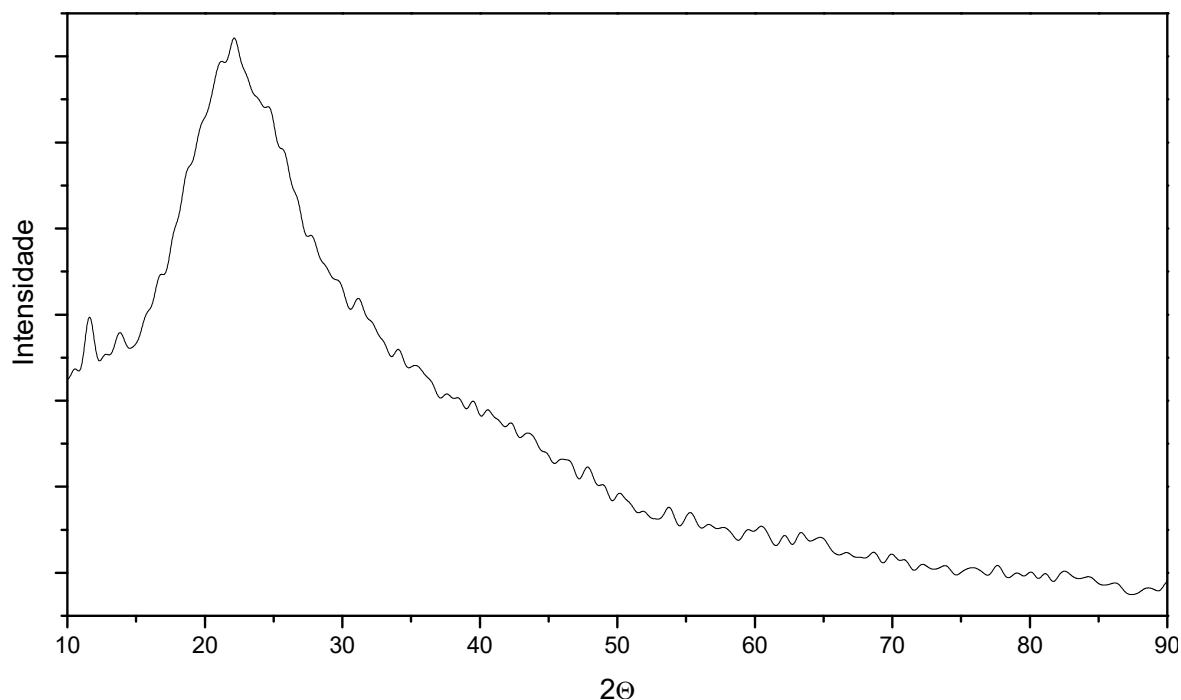
5.3.4 Colágeno após solubilização e secagem (CSS)

O DRX do colágeno após solubilização em solução de 30% de ácido acético e 70% de acetona e secagem em estufa a 60°C está representado na figura 22, para os ângulos de 10° a 90°.

Ao comparar o DRX do CSS com o DRX da matriz de colágeno como recebido, representado na figura 9, pode-se perceber que o halo amorfo do material se mantém e os 3 picos discretos de cristalinidade (31,8; 77,2 e 98,0 graus) presentes na matriz de colágeno não foram mantidos, aparecendo entretanto outros 2 picos em torno de 12 e 14 graus, além da conformação mais estreita do halo

amorfo, indicando possível mudança na estrutura deste colágeno após processamento.

Figura 22 - DRX do Colágeno

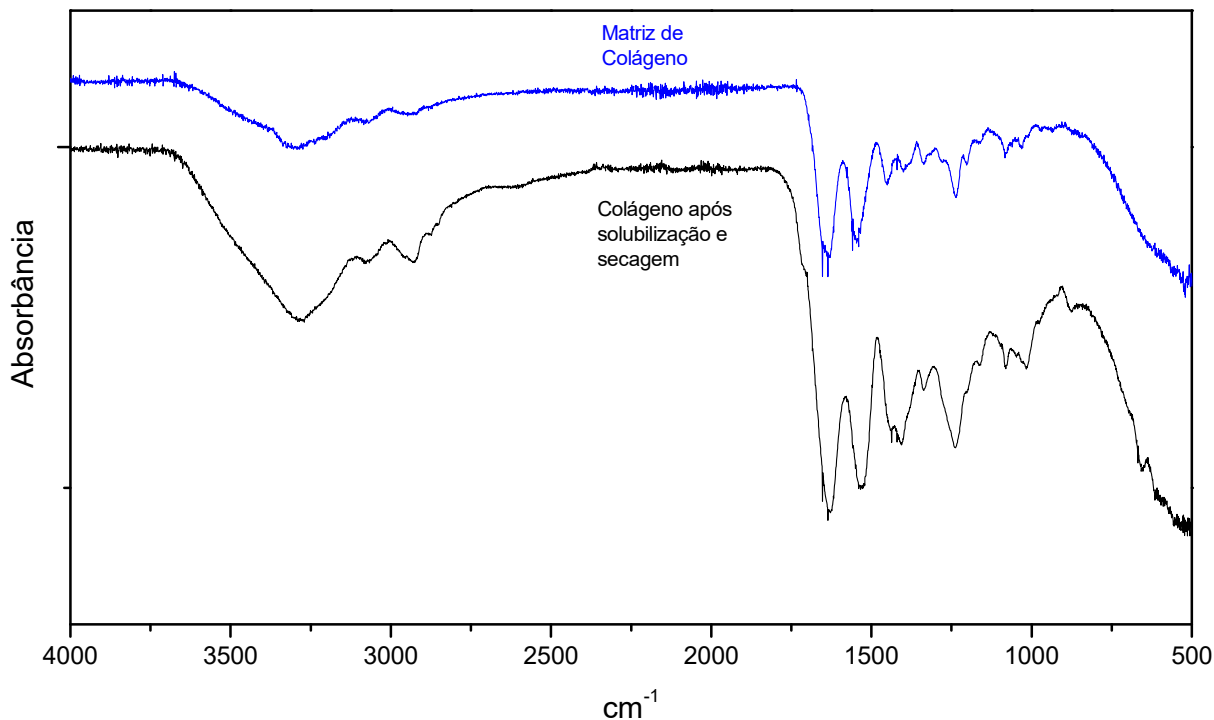


Fonte: do autor.

O resultado do FTIR do colágeno após o processo de solubilização e de secagem em comparação com o FTIR da matriz de colágeno, graficamente representado no Origin[®] está explícito na figura 23. Com base nesta, pode-se perceber que os resultados das bandas são iguais para o CSS e para a matriz e que, portanto, não há formação de ligação química neste processo de solubilização e secagem.

Modificações estruturais de colágeno com a presença de acetona também foram relatadas por Zeugolis et al (2008, apud CAVES et al, 2010) destacando, entre outros fatores, a desestabilização da tripla hélice.

Figura 23 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do Colágeno.



Fonte: do autor.

Após a solubilização e secagem do colágeno, pode-se obter a microscopia do material, exposta na figura 24.

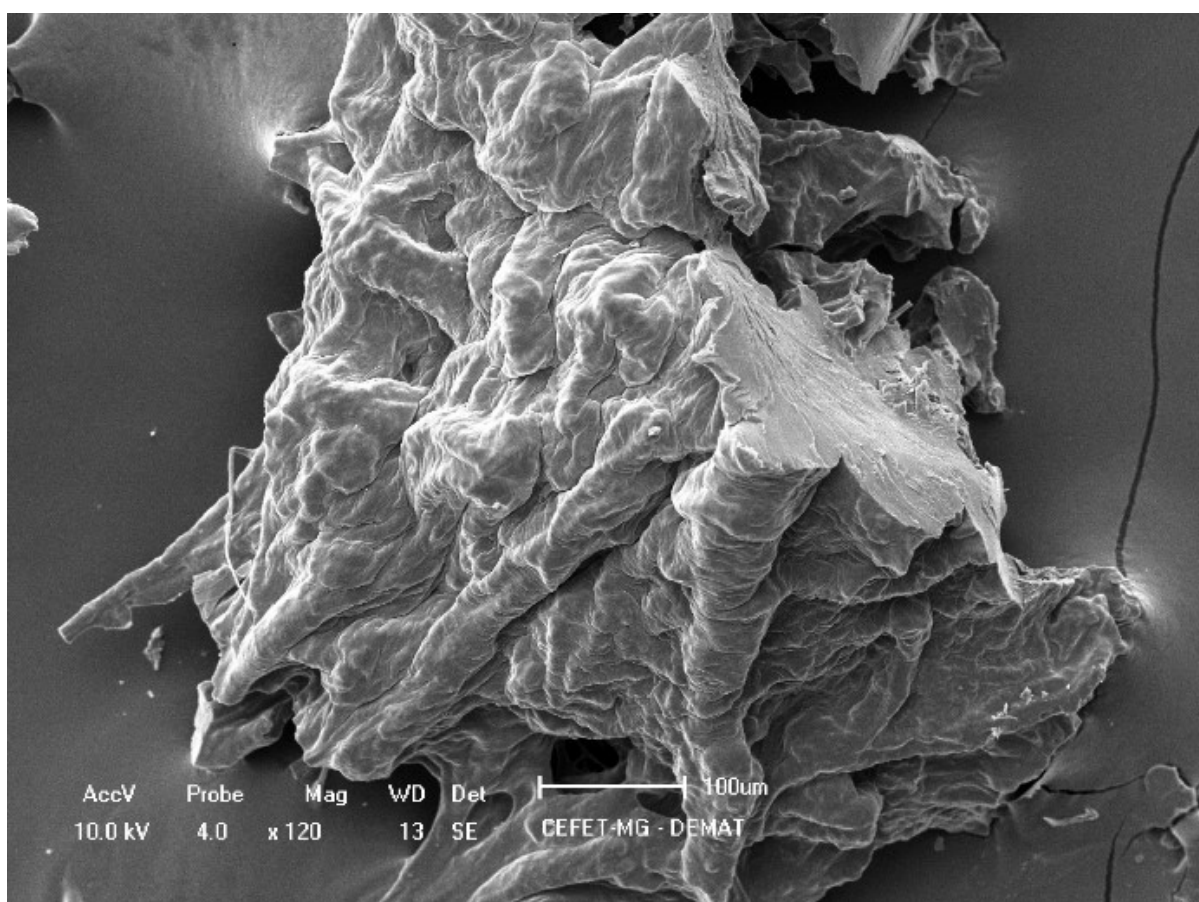
Através das imagens de microscopia (MEV), não se consegue mais observar a presença das fibrilas do colágeno (textura fibrosa, vide figura 12), fazendo com que o mesmo se tornasse um material com superfície rugosa e irregular em forma de massa aparentemente homogênea em composição mais compacta.

Pode-se, portanto, concluir que o solvente alterou a forma como o colágeno está disposto fisicamente. Após a solubilização e secagem do colágeno, é possível perceber, na realização do DRX, que a banda de amorfismo do material permanece enquanto os picos cristalinos ditos anteriormente não estão mais presentes.

Juntamente com a análise de DRX, pode-se perceber também através do MEV, que após o uso do solvente, não há mais a presença das fibrilas. Com isso, a

hipótese de que a cristalinidade parcial apresentada na caracterização físico-química da Matriz de Colágeno tipo I é provavelmente relacionada à organização dessas fibrilas do material como recebido.

Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura do colágeno após solubilização e secagem



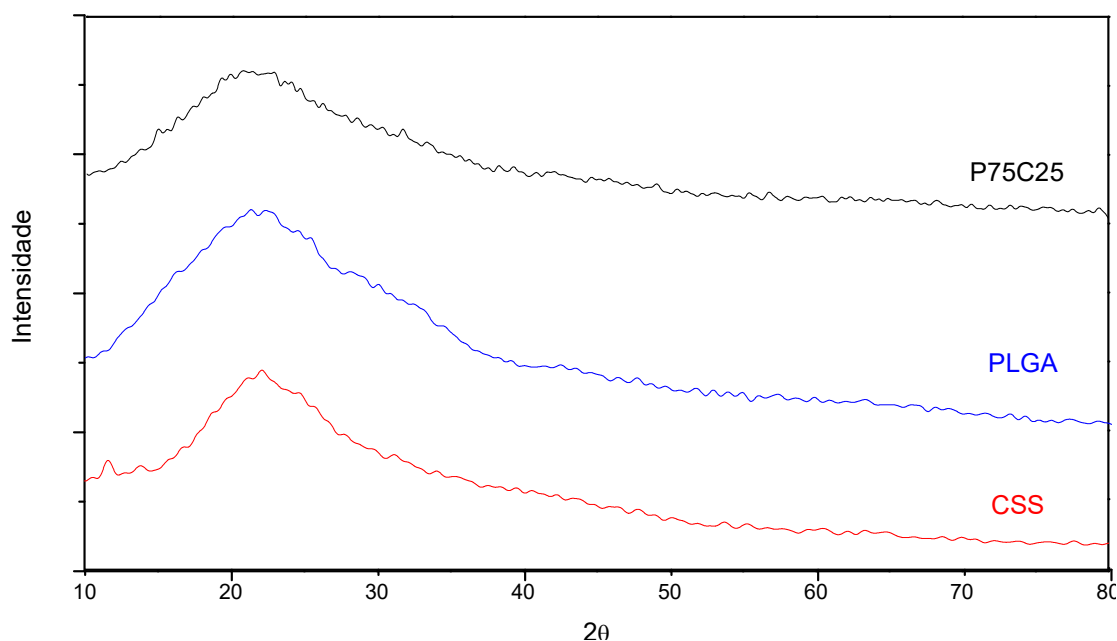
Fonte: do autor.

Portanto, o material apresentado como CSS possui provavelmente ligações químicas ou ordem cristalina de curta distância semelhantes à do colágeno tipo I, embora a sua morfologia tenha sido alterada. No entanto, não se pode mais afirmar que o material é colágeno tipo I porque como dito na revisão bibliográfica, tal tipo de colágeno se caracteriza pela presença de fibrilas com diâmetros de até 500nm, as quais após esse processo de solubilização e secagem não podem ser observadas.

5.3.5 P75C25 – PLGA em proporção 75% e Colágeno em proporção 25%

O difratograma de raios X da blenda P75C25 está representada na figura 25, juntamente com o DRX do PLGA e do colágeno após solubilização e secagem.

Figura 25 - DRX da blenda P75C25



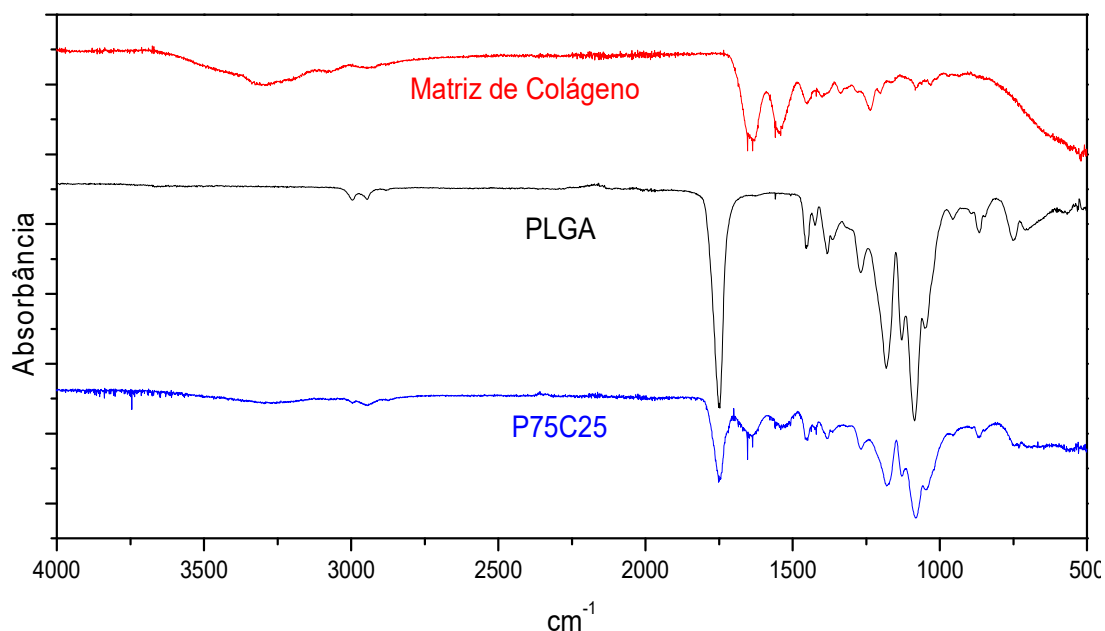
Fonte: do autor.

Segundo o Difratograma de Raios X, a organização dos materiais utilizados permanece amorfo. Como pode ser observado a característica da banda de amorfismo aproxima-se da banda do PLGA, resultado esperado já que a maior parte do material é composto por esta matéria prima.

A figura 26 apresenta os dados de FTIR da amostra P75C25, representado graficamente, juntamente com o da matriz de colágeno e do PLGA, para comparação.

Pode-se perceber que as ligações presentes na blenda P75C25 são provenientes do PLGA e do colágeno, comprovando que não há a formação de novos compostos ou ligações.

Figura 26 - FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno e P75C25.

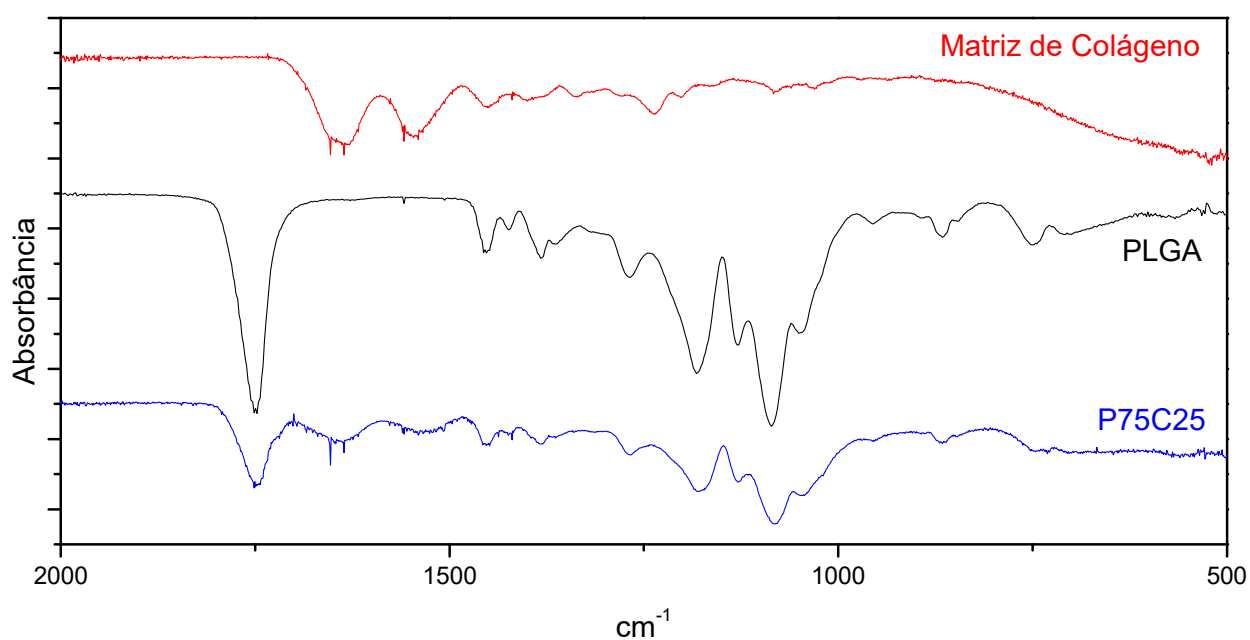


Fonte: do autor.

Para melhor compreensão das bandas entre os comprimentos de onda de 2000 cm⁻¹ e 500 cm⁻¹, optou-se por representar esta faixa do ensaio na figura 27.

A imagem mostra, novamente, que as ligações químicas dos materiais de origem foram preservadas na blenda e que não houve a formação de novas bandas. Com base nisso, pode-se dizer que o produto que será gerado pela blenda P75C25, após degradação, é a soma dos produtos gerados na degradação do PLGA e do colágeno. Tal afirmação é relevante uma vez que os insumos já são homologados para uso clínico, e não apresentam aparentemente riscos para utilização como biomaterial.

Figura 27 - FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno e P75C25 no intervalo de 2000 cm⁻¹ e 500 cm⁻¹.



Fonte: do autor.

A termogravimetria (TG e DTG) da blenda P75C25 está representada na figura 28 e a tabela 10 retrata a porcentagem de massa nas temperaturas principais da análise.

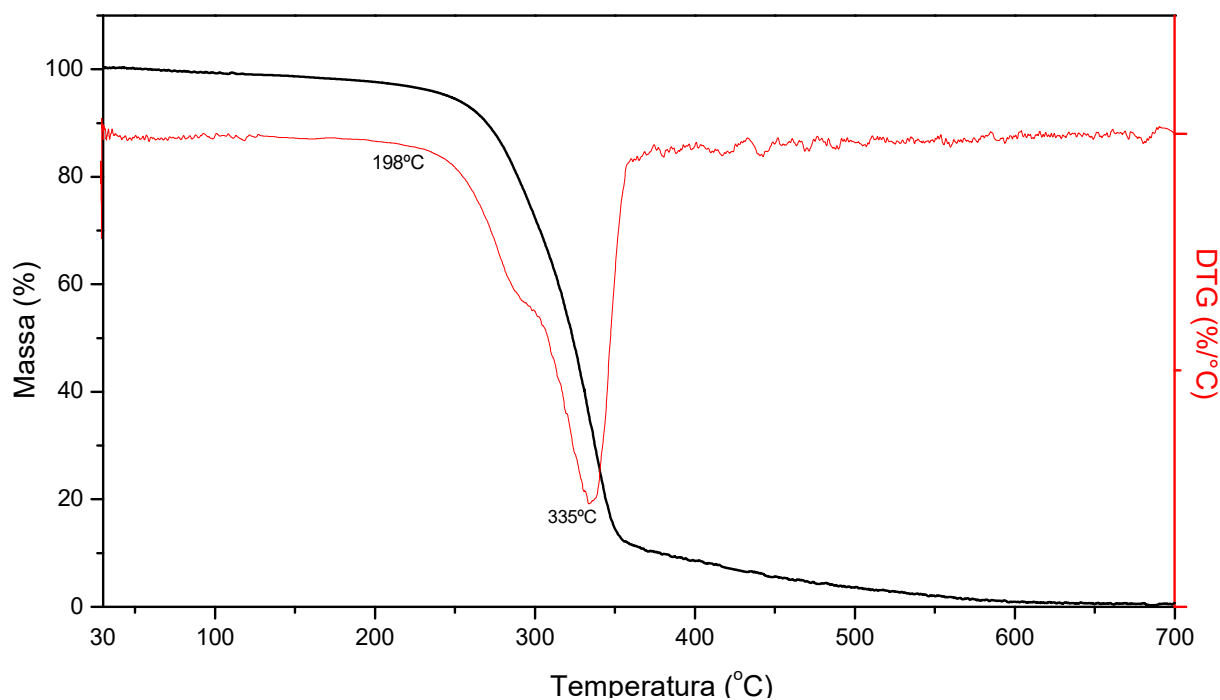
O processo de degradação da blenda se inicia próximo de 200°C, o fluxo máximo de perda de massa se dá a 335°C e a carbonização da blenda ocorre próximo de 625°C.

Tabela 10 - Porcentagem de massa da blenda nas temperaturas citadas.

Temperatura (°C)	% massa
200	97,64
335	33,62
650	0,55

Fonte: do autor.

Figura 28 - Termogravimetria da blenda P75C25



Fonte: do autor.

Pode-se perceber ainda que há uma redução, pequena, de massa até 200°C que se dá pela perda de água estrutural do polímero. Após esse período, acontece a perda de massa maior da blenda, em que ocorre a decomposição polimérica e, em sequência, a carbonização da mesma.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) da blenda P75C25 está representada na figura 29. De acordo com a microscopia, a blenda formada é um material aparentemente homogêneo, não sendo possível, portanto, diferenciar a presença dos polímeros de origem, PLGA e do colágeno.

Quando depositada a gota sobre o material, a mesma se espalha sobre ele e o goniômetro utilizado não pode determinar o ângulo que se forma. Segundo Santos (2014, p.10), ângulos de contato menores de 5° demonstram um comportamento super-hidrofílico do material.

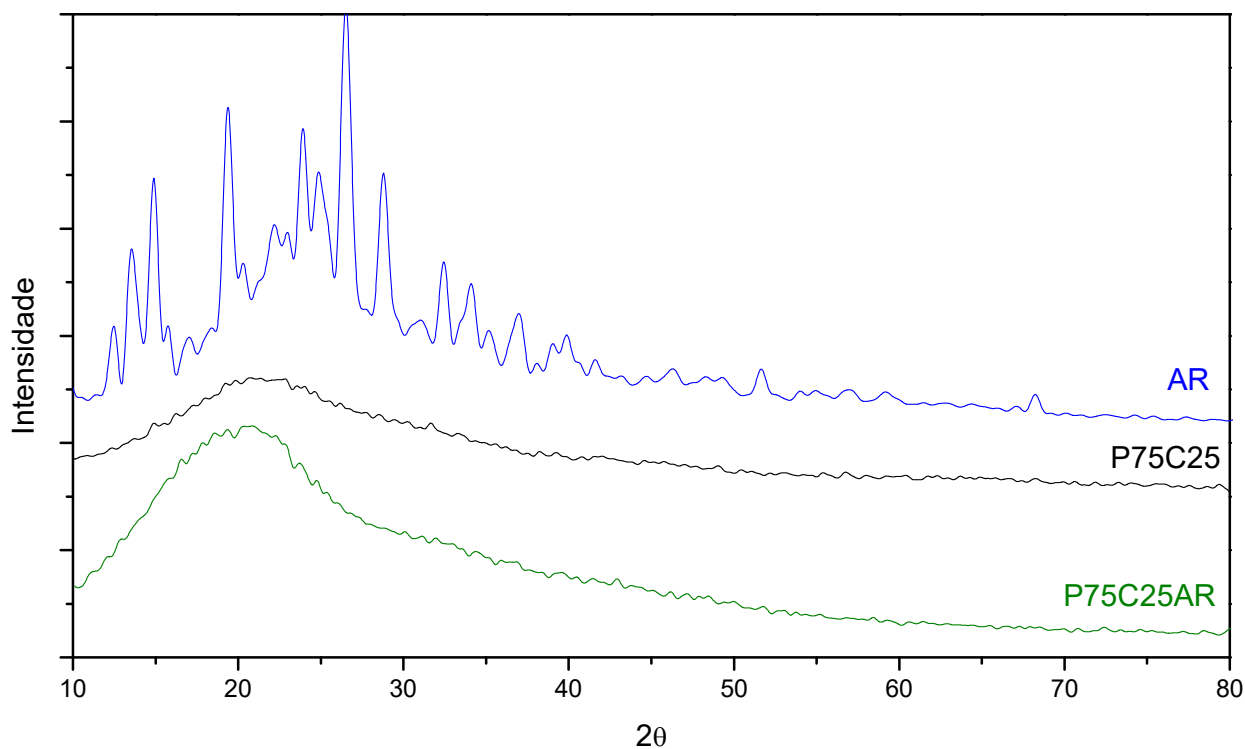
Ainda segundo a mesma autora, a hidrofiliicidade para biomateriais aumenta o contato entre o material e as células. Com base nisso, um material hidrofílico tem maior potencial biocompatível, quando se comparado a um material hidrofóbico.

5.3.6 P75C25AR – Blenda P75C25 com AR

Depois de confeccionada a blenda com 25% da massa de Ácido Rosmarínico e 75% da blenda P75C25, a mesma foi caracterizada e os resultados estão dispostos abaixo.

O Difratoograma de raios X da blenda está apresentada na figura 31.

Figura 31 - DRX da blenda P75C25AR



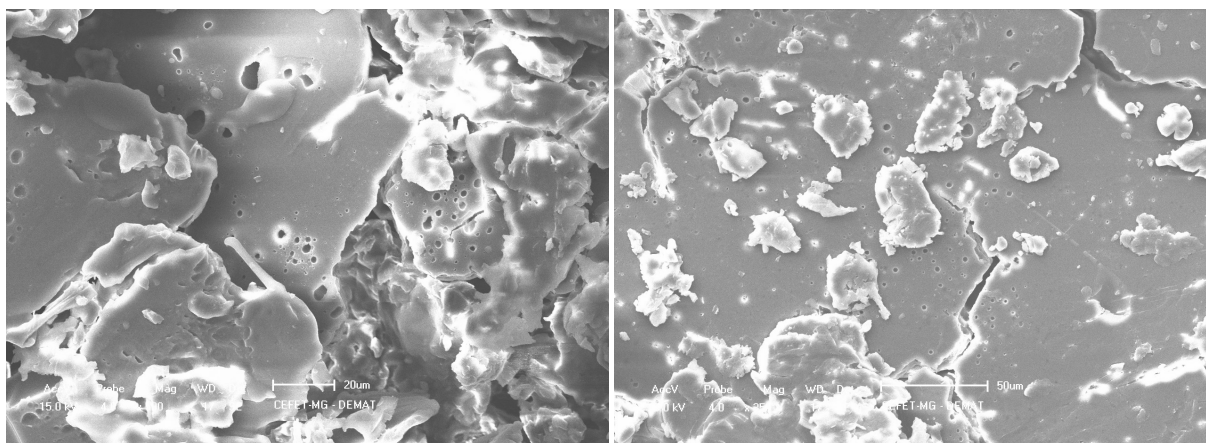
Fonte: do autor

Observa-se que o comportamento da blenda P75C25AR é predominantemente amorfo, com comportamento próximo a blenda P75C25. Porém, a banda de amorfismo no material P75C25AR está mais larga, apresentando também a característica da banda de amorfismo presente no AR. Tal organização auxilia na comprovação da presença do fármaco nessa blenda, embora não seja o suficiente para se fazer essa afirmação.

A ausência de picos cristalinos característicos do AR também foi relatada no trabalho de Baranauskaitea et al (2018) no qual o autor diz que a ausência destes picos comprova que todo o AR foi solubilizado no veículo e absorvido e adsorvido no material transportador, o que pode contribuir para a biodisponibilidade do composto.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da blenda P75C25AR foram realizadas com ampliações diferentes e estão representadas na figura 32.

Figura 32 - MEV da blenda P75C25AR.



Fonte: do autor.

Acredita-se que estas partículas dispersas na massa homogênea, de formato irregular, como não haviam sido observadas no material P75C25 possa provavelmente ter relação com a presença do fármaco (AR).

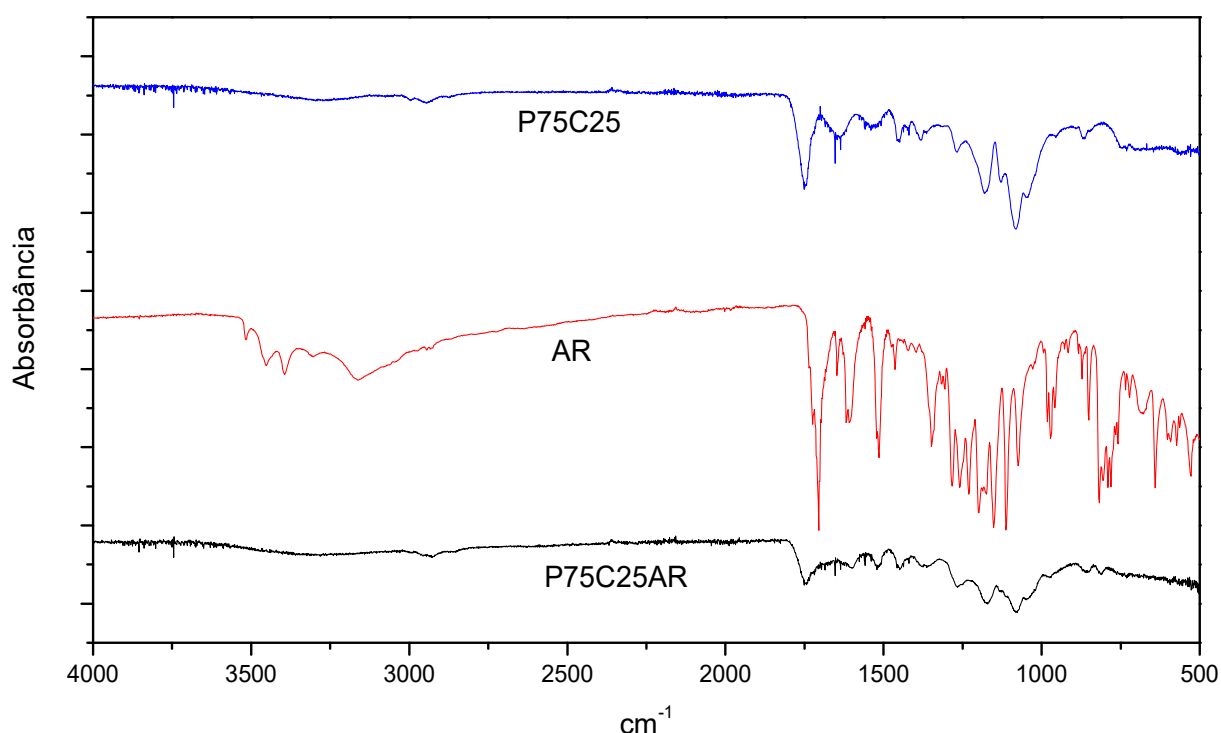
Além disso, o trabalho de Darie-Niță et al (2018) apresentam o MEV do polímero PLA e, posteriormente, do PLA com extrato de alecrim em pó, no qual a mesma autora destaca estar presente também o AR e dos polímeros PLA e PEG – Poli (etileno glicol), juntamente com o mesmo extrato. Neste trabalho, partículas

dispersas de dimensões variáveis foram apresentadas como sendo relacionadas ao extrato de alecrim que modifica a sua distribuição e tamanho de acordo com a utilização do PLA ou PLA e PEG em forma de blenda.

Portanto, tal trabalho justifica a hipótese apresentada, indicando a presença de Ácido Rosmarínico na superfície da blenda, sendo, portanto, identificada pelas partículas.

A figura 33 representa o FTIR do material, juntamente com a blenda P75C25 e com o AR, para evidenciar as ligações interatômicas presentes no material e comparar com os materiais utilizados para a produção deste.

Figura 33 - FTIR comparativo entre P75C25, Ácido Rosmarínico e P75C25AR.



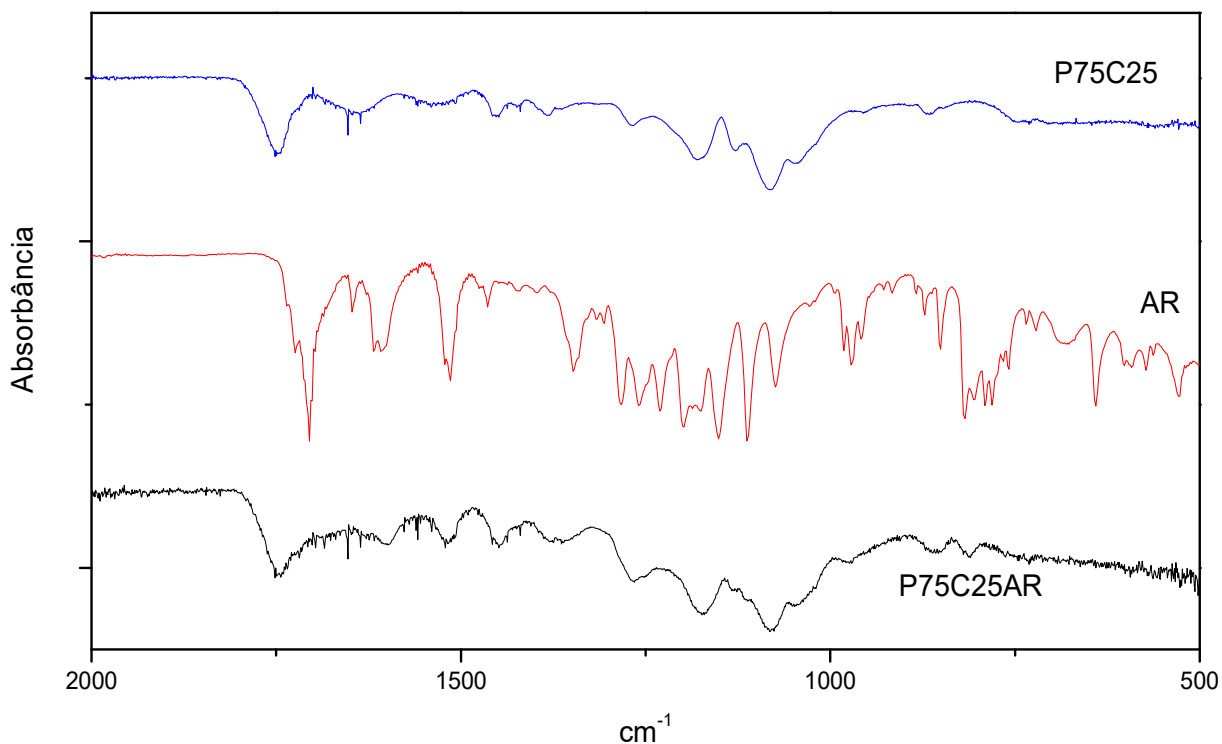
Fonte: do autor.

Semelhante a blenda anterior, o autor optou em apresentar o ensaio de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier para os números de onda de 2000 cm⁻¹ e 500 cm⁻¹, para facilitar a visualização nesta faixa. Tal representação segue na figura 34, também com a possibilidade de comparação entre a blenda de origem e o fármaco.

Os números de onda em que há absorbância no P75C25AR são os mesmos que no P75C25 e no Ácido Rosmarínico, comprovando que não há interações químicas entre os materiais.

Essa informação é relevante porque na degradação da blenda serão liberados produtos provenientes da degradação do PLGA, do Colágeno e do Ácido Rosmarínico somente, sendo esses, já estudados e de produtos de degradação já conhecidos.

Figura 34 - FTIR comparativo entre P75C25, Ácido Rosmarínico e P75C25AR no intervalo de 2000 cm^{-1} e 500 cm^{-1} .



Fonte: do autor.

A análise termogravimétrica da blenda P75C25AR está representada na figura 35.

Sobre o ensaio de termogravimetria na blenda P75C25AR, pode-se perceber que há uma perda de massa acentuada a partir de aproximadamente 250°C . Essa perda possui fluxo máximo em 312°C , evidenciado pela curva de derivada da

termogravimetria, e, próximo a 600°C o material já perdeu quase toda a sua massa. Também há uma redução da massa em até 100°C que representa a perda de água estrutural na blenda P75C25AR, que também pode ser observada na curva da derivada da termogravimetria.

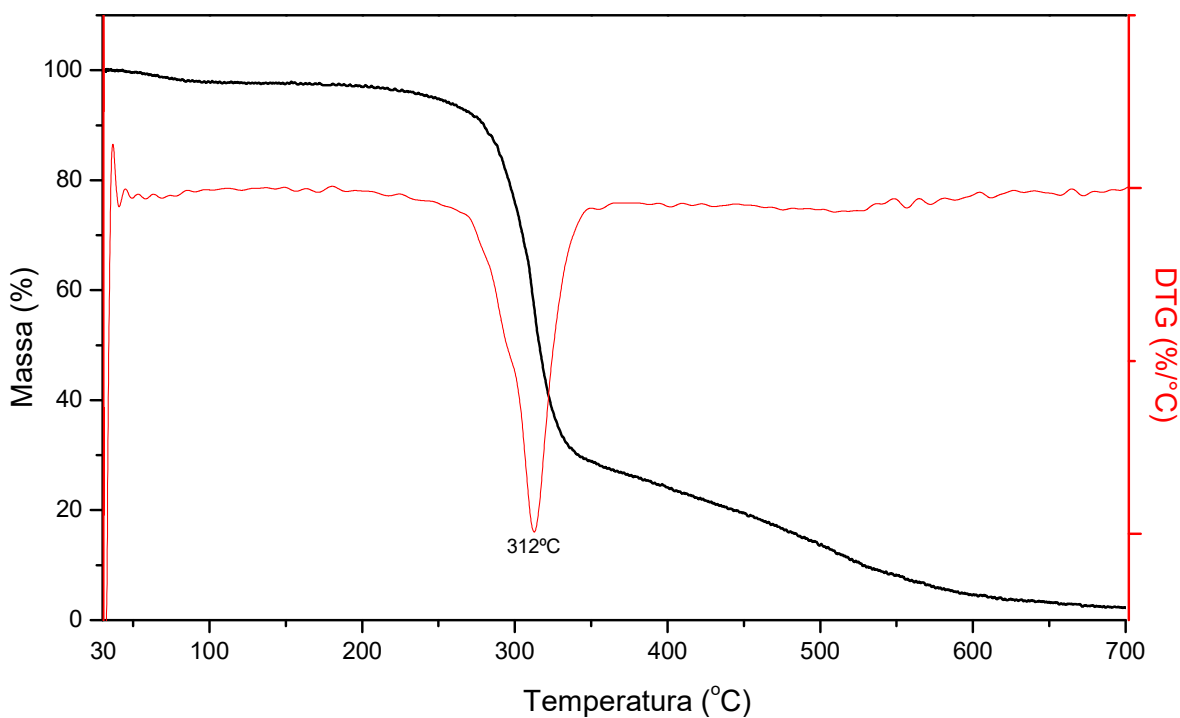
As porcentagens residuais de massa nessas temperaturas estão representadas na tabela 11.

Tabela 11 - Porcentagem de massa para as temperaturas citadas.

Temperatura (°C)	% massa
100	97,77
250	94,84
312	58,11
600	4,64

Fonte: do autor.

Figura 35 - Termogravimetria e derivada da termogravimetria da blenda P75C25AR



Fonte: do autor.

Sobre a realização do ângulo de contato da blenda P75C25AR, a mesma está representada na figura 36.

Tal comportamento é também super-hidrofílico, semelhante à blenda P75C25, e o ângulo não pôde ser calculado pelo equipamento. De forma semelhante, quando a gota é depositada sobre o material, a mesma se espalha instantaneamente.

Figura 36 - Ângulo de contato P75C25AR



Fonte: do autor.

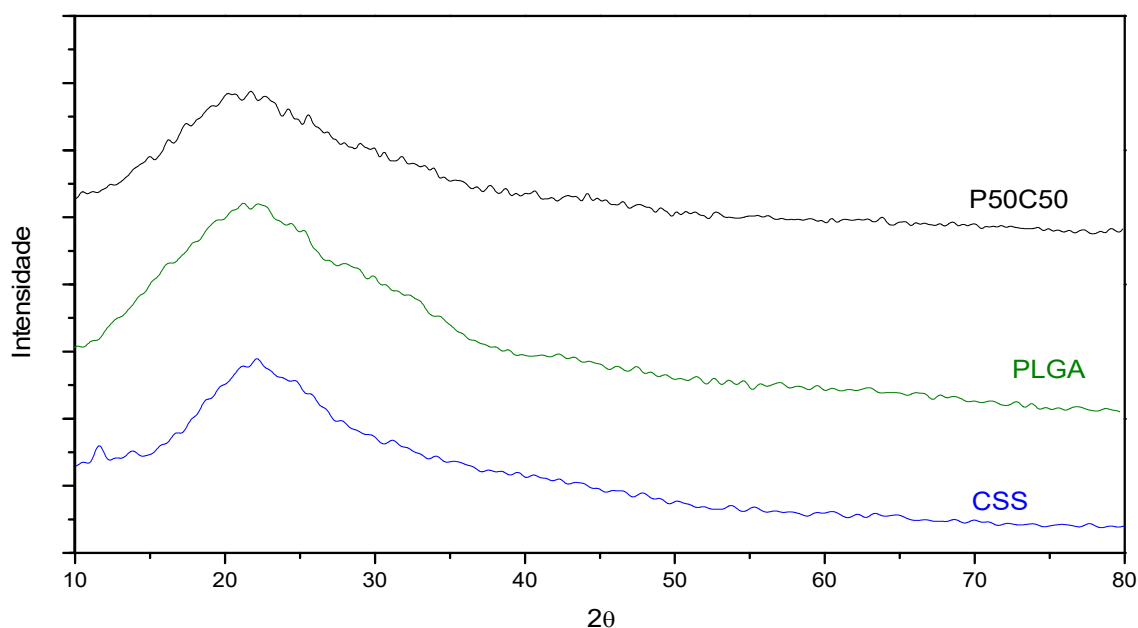
5.3.7 P50C50 – PLGA em proporção 50% e Colágeno em proporção 50%

Após a confecção da blenda P50C50, a mesma foi caracterizada. A realização do DRX da blenda está representada na figura 36, juntamente com os materiais utilizados na produção da blenda, o CSS e o PLGA.

Percebe-se, através desta, que o comportamento do material é, também, amorfo. Mas se comparado com a blenda de amorfismo do P75C25, pode-se perceber que há uma redução da largura deste halo que apresenta um resultado intermediário entre o difratograma do P75C25 e da matriz de colágeno. Isso acontece porque a proporção do colágeno na blenda é superior à proporção utilizada

na produção do P75C25 e, com isso, o DRX deste tende a ser mais próximo do DRX do colágeno do que o P75C25.

Figura 37 - DRX da blenda P50C50



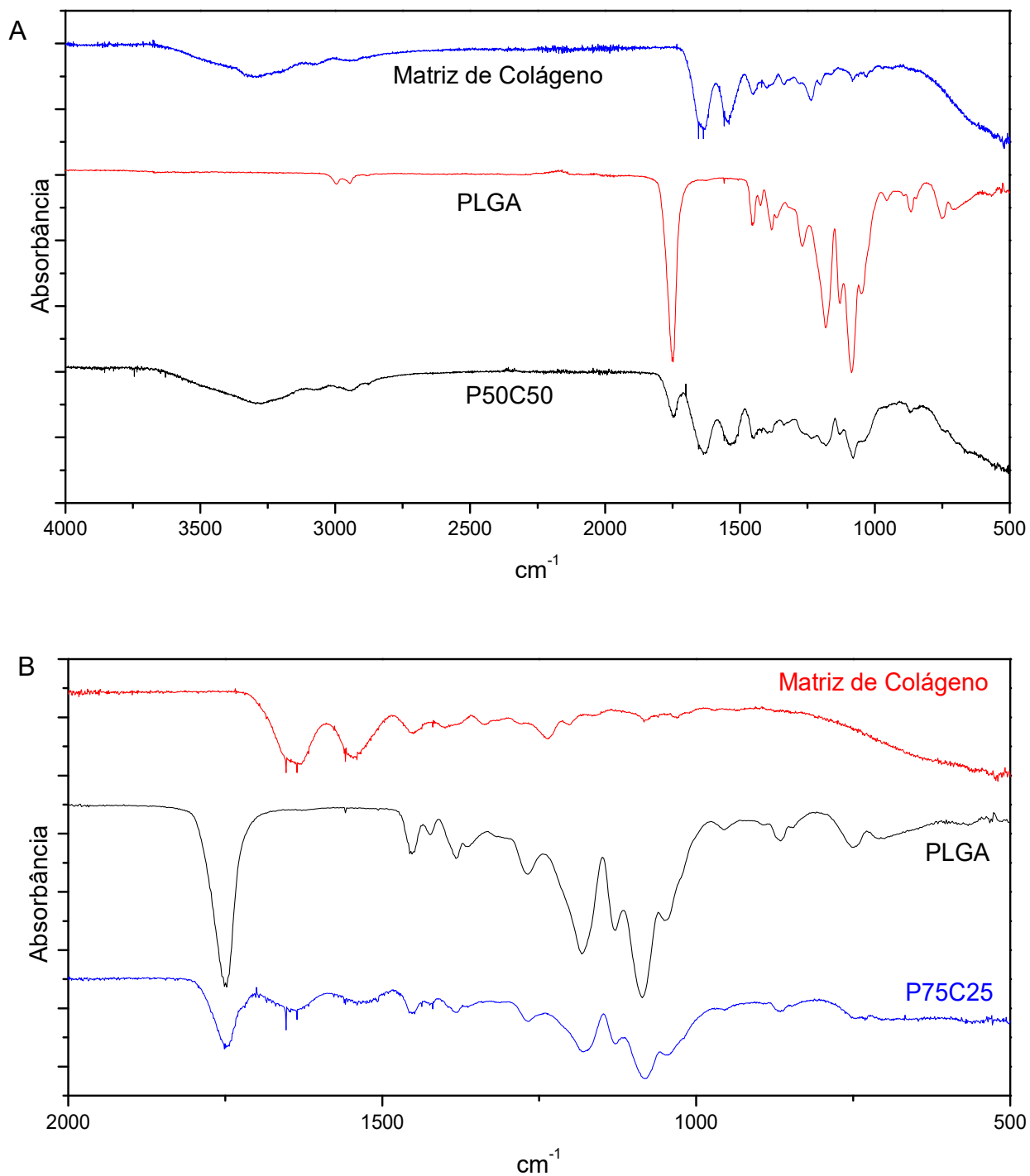
Fonte: do autor.

O FTIR realizado neste material está representado na figura 38A para o intervalo em que o ensaio foi realizado, de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} . Pode-se observar bandas que se localizam próxima de 3500 a 2750 cm^{-1} e, posteriormente, a maioria das bandas dos polímeros que está localizada no intervalo de 2000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} , optou-se por representar esse intervalo na figura 38B.

Essa espectroscopia confirma que não há interação química entre o Colágeno e o PLGA e que a blenda P50C50 é composta destes materiais, possuindo as ligações provenientes destes. Com isso, a degradação da blenda deve gerar somente produtos provenientes do PLGA e do Colágeno.

Tais resultados são semelhantes aos apresentados anteriormente para a blenda P75C25, o que já era esperado pelo autor já que a metodologia de processamento das blendas e as matérias primas são os mesmos para a P50C50 e a P75C25.

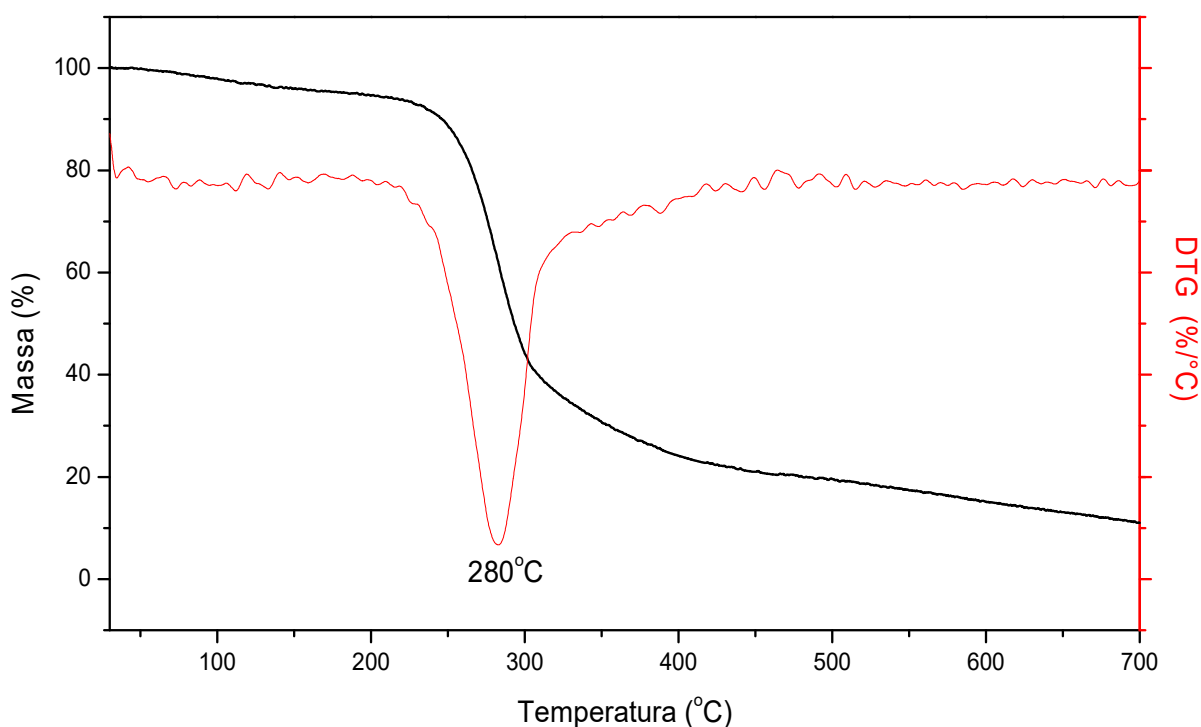
Figura 38 - FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno e P50C50, para o intervalo de (A) 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} e (B) 2000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} .



Fonte: do autor.

A perda de massa por aquecimento do material P50C50 está representada na figura 39, bem como a sua derivada.

Figura 39 - Termogravimetria da blenda P50C50



Fonte: do autor.

Com a presença da DTG, pode-se perceber que há uma pequena perda de massa em torno de 100°C, que pode ser atribuída a perda de água do material e, em seguida, há uma perda grande de massa que se inicia por volta de 200°C que pode ser atribuída a degradação do mesmo. A temperatura em que essa perda de massa é máxima é de 280°C. O ensaio foi realizado até 700°C e, nesta temperatura, não ocorreu carbonização do mesmo, tal fato pode ser evidenciado pela presença de massa no final do experimento nesta temperatura.

Para esses valores de temperatura, também foi elaborada uma tabela com a porcentagem de massa presente no ensaio de termogravimetria. Essas informações estão presentes, portanto, na tabela 12.

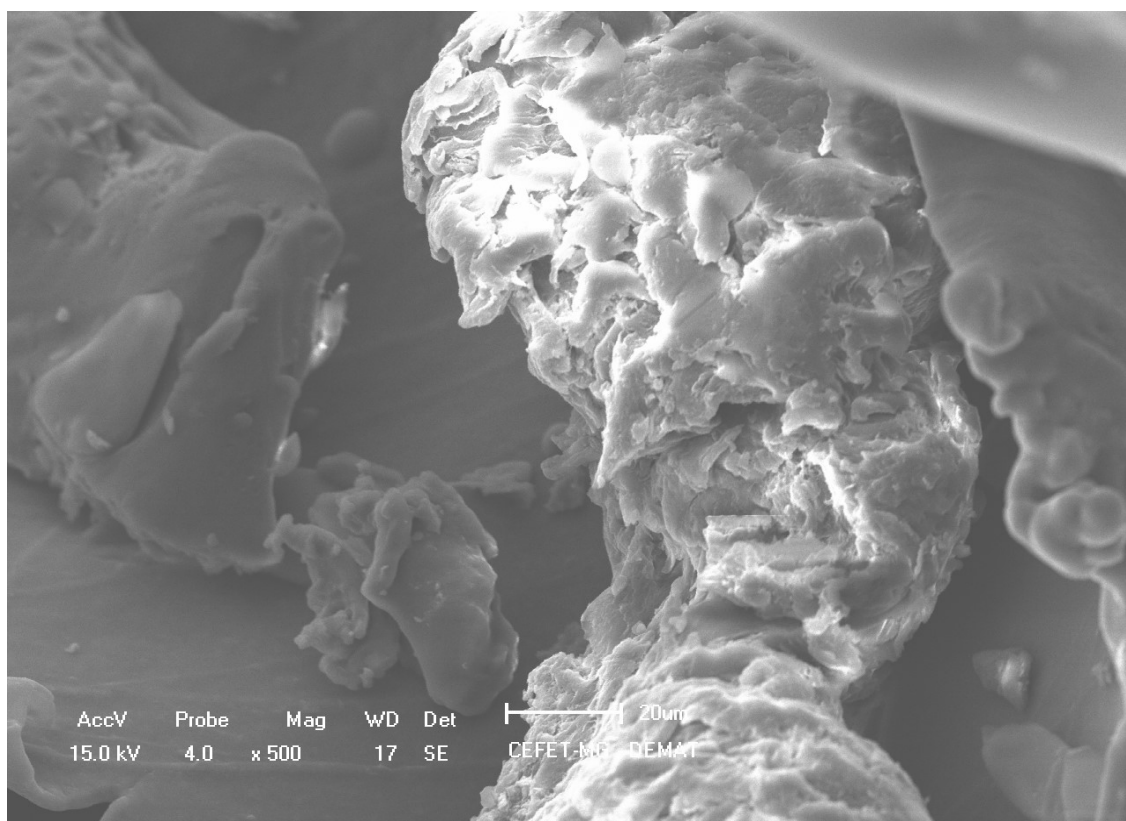
Tabela 12 - Porcentagem de massa para as temperaturas citadas.

Temperatura (°C)	% massa
100	97,89
200	94,62
280	64,93
700	10,99

Fonte: do autor.

A Microscopia eletrônica de varredura da blenda P50C50 está representada na figura 40.

Figura 40 - MEV da blenda P50C50

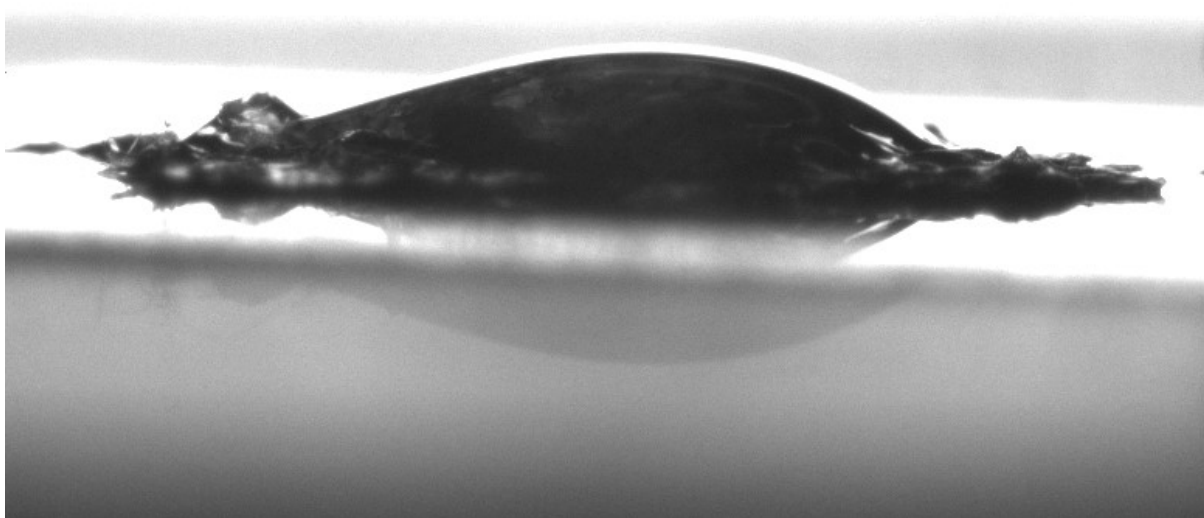


Fonte: do autor.

A blenda apresenta característica de massa homogênea e também não é possível diferenciar o PLGA do colágeno.

Sobre a realização do ângulo de contato, a imagem obtida pelo auxílio do goniômetro está representada na figura 41.

Figura 41 - Ângulo de contato da blenda P50C50



Fonte: do autor.

Tal representação mostra que a gota, ao contrário do que aconteceu com os materiais P75C25 e P75C25AR, não se espalhou totalmente sobre o material, embora esse ainda tenha um comportamento hidrofílico. Com isso, pode-se afirmar que a maior proporção de colágeno na blenda alterou o comportamento hidrofílico do material.

Tal afirmação pode ser justificada pelo trabalho de Silva e Penna (2012) no qual as autoras dizem que o colágeno apresenta uma alta concentração de aminoácidos hidrofóbicos, tanto no interior da proteína quanto em sua superfície.

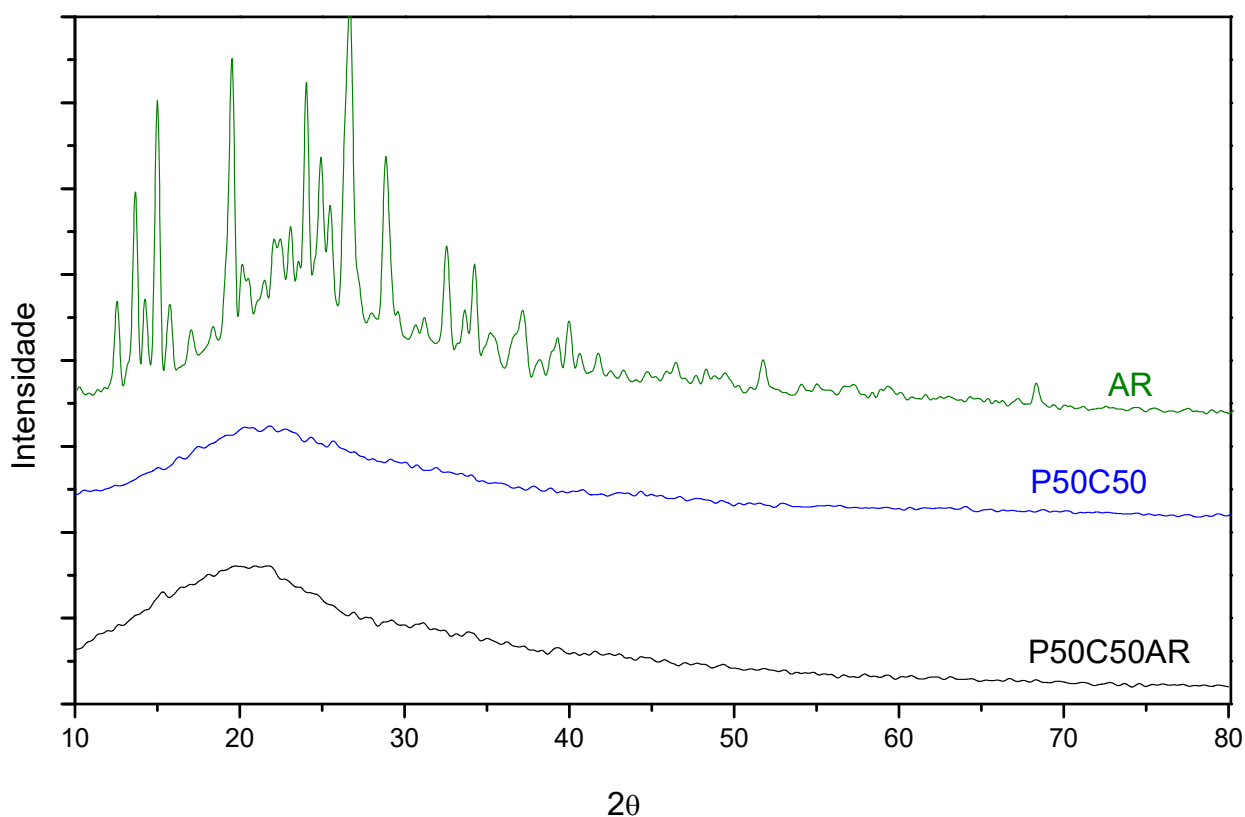
Não foi obtido pelo equipamento o ângulo desta, mas este foi obtido pelo autor por cálculo manual, traçando-se tangente. O ângulo calculado é de aproximadamente 18,25°.

5.3.8 P50C50AR – Blenda P50C50 com AR

Após confeccionada a blenda P50C50AR com 25% de AR e 75% de blenda P50C50, a mesma foi caracterizada.

Sobre a realização do DRX da blenda, a mesma está representada na figura 42.

Figura 42 - DRX da blenda P50C50AR



Fonte: do autor.

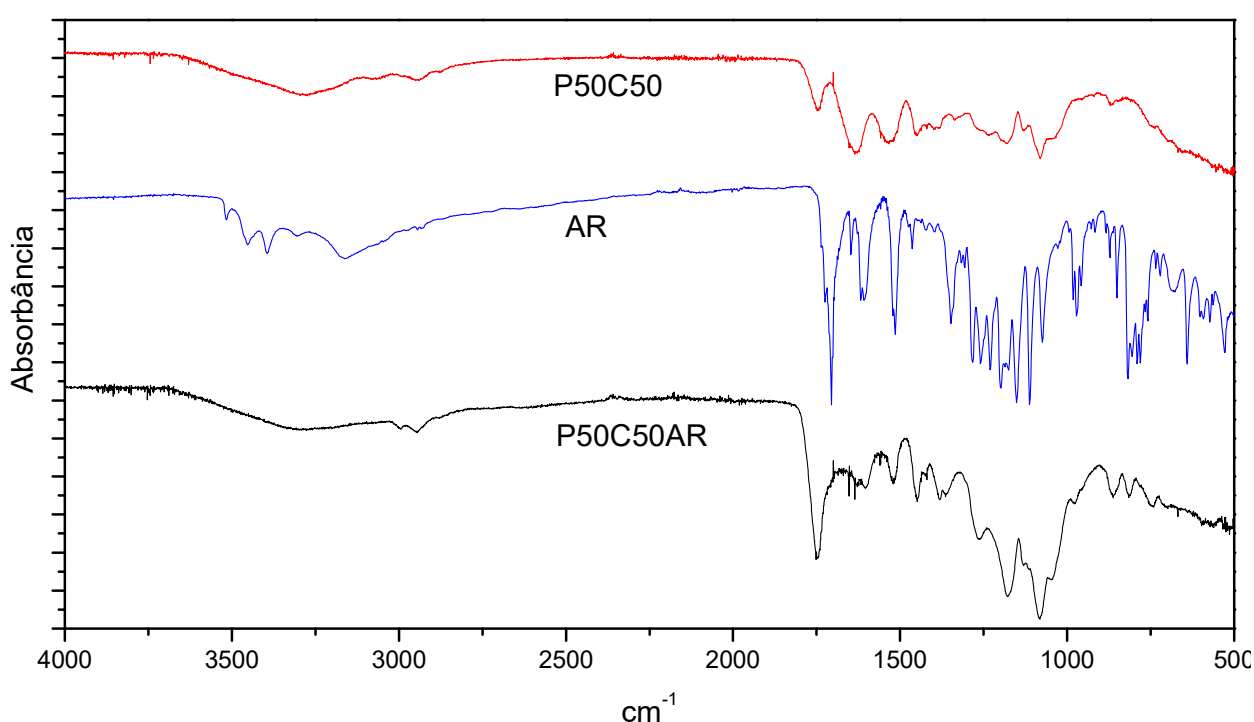
Semelhante a blenda P75C25AR, o resultado da P50C50AR se assemelha ao DRX da blenda de origem (P50C50) com a presença de uma banda mais larga que tende a ser proveniente do AR.

O aumento do halo amorfo é positivo, segundo Kaushal, Gupta e Bansal (2004) para sistemas de liberação de medicamento. Os autores afirmam que sistemas amorfos tem um aumento de energia que pode ser traduzido em benefícios

in vivo e aumentam a previsibilidade de desempenho, ocasionado por propriedades transportadoras, uma melhor cinética e mecanismos de liberação controlada.

O ensaio de FTIR realizado na blenda está graficamente representado na figura 43, juntamente com o da blenda P50C50 e do Ácido Rosmarínico para comparação.

Figura 43 - FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno, P50C50, Ácido Rosmarínico e P50C50AR



Fonte: do autor.

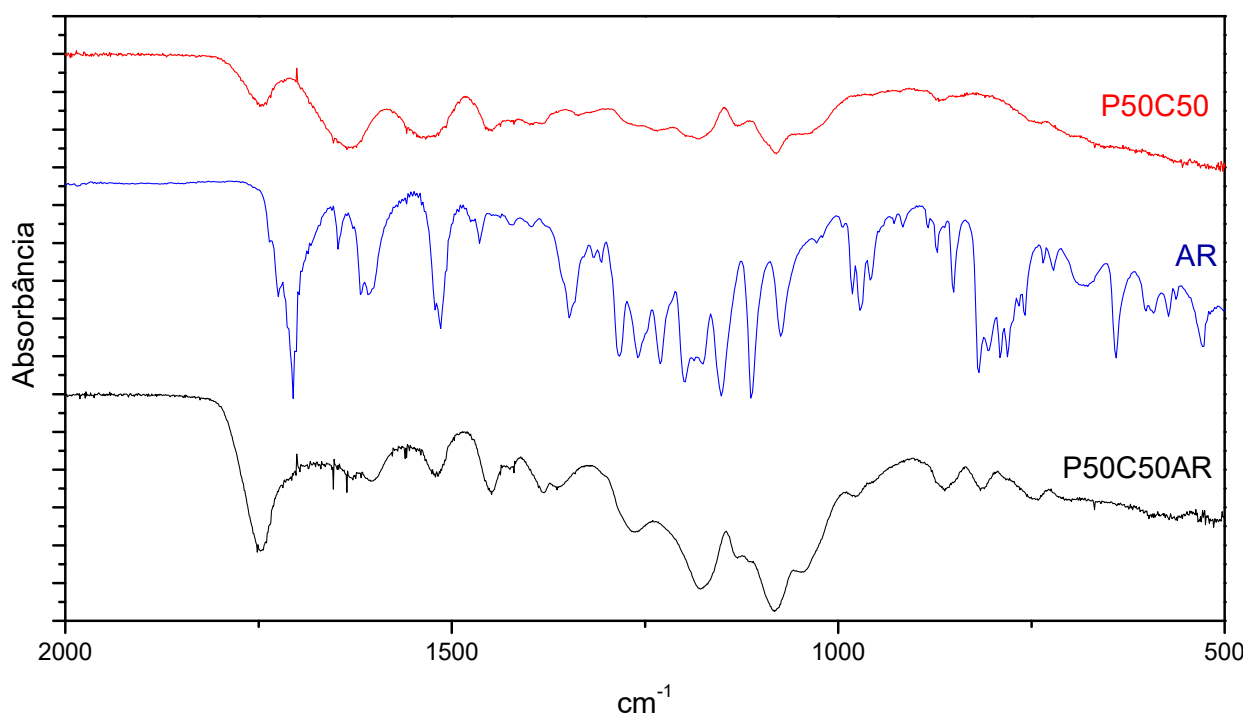
Semelhante ao que acontece nas blendas anteriores, as vibrações do FTIR acontecem, em maior parte, entre os números de onda de 2000 a 500 cm⁻¹ e, com isso, optou-se por representar esse intervalo na figura 44.

Tal imagem reflete as vibrações das interações químicas dos materiais e mostra que as ligações presentes no P50C50AR é uma combinação das interações dos materiais P50C50 e do Ácido Rosmarínico. Isso acontece porque há somente

interações físicas nestes materiais e, com isso, os produtos de degradação dos mesmos serão produtos já conhecidos.

Tal resultado já era esperado pelo autor, com base no resultado da blenda P75C25AR que apresenta o mesmo processamento e as mesmas matérias primas que a blenda P50C50AR.

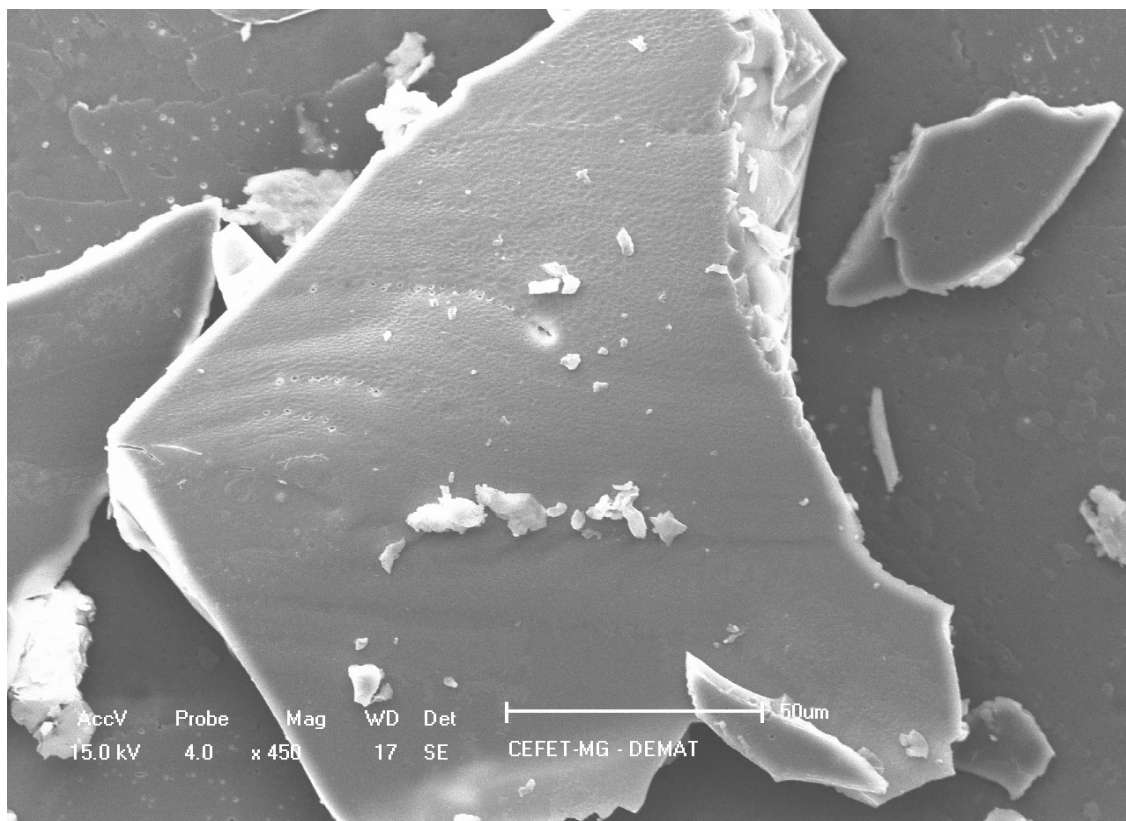
Figura 44 - FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno, P50C50, Ácido Rosmarínico e P50C50AR para o intervalo de 2000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} .



Fonte: do autor.

A realização do MEV da blenda pode ser visualizada na figura 45. Observa-se no MEV a presença de uma massa homogênea, onde não se consegue observar diferenças entre o PLGA e o colágeno, o que ocorre de maneira semelhante à blenda P50C50, e a presença de pequenas partículas dispersas no material, de acordo com o que também aconteceu na blenda P75C25AR. Essas partículas, novamente, apareceram devido à presença do Ácido Rosmarínico que foi incorporado a blenda polimérica.

Figura 45 - MEV da blenda P50C50AR.



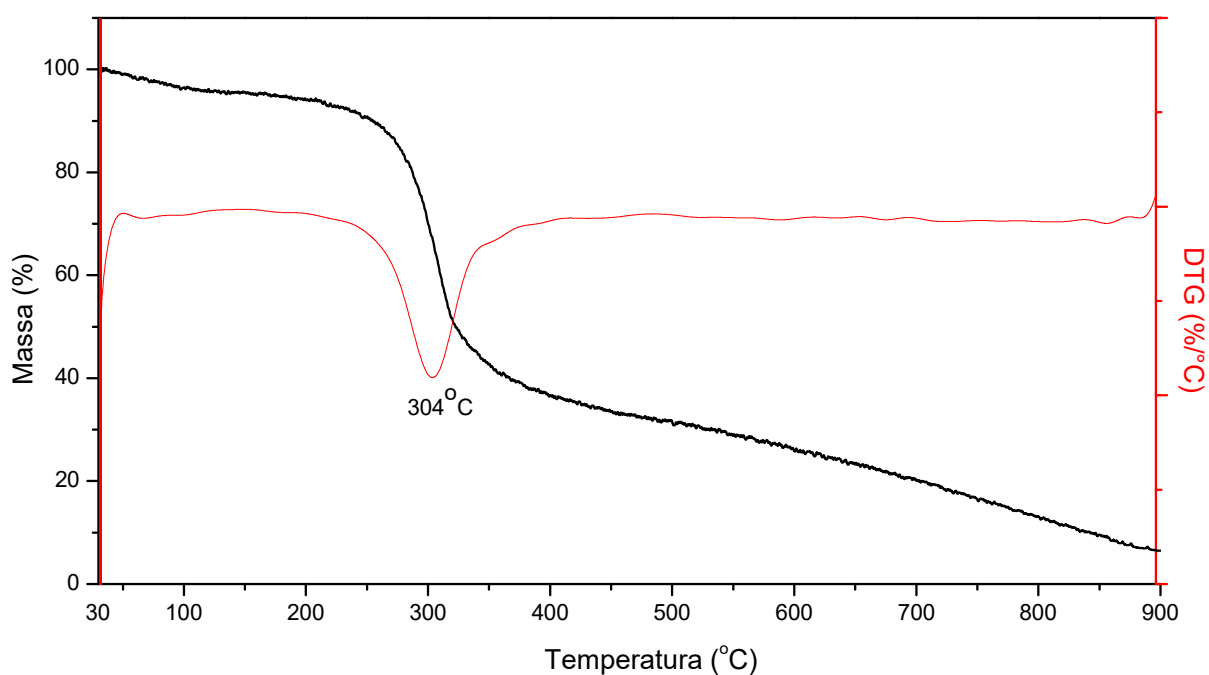
Fonte: do autor.

A realização da Análise Termogravimétrica da blenda P50C50AR, após o tratamento de dados, gerou o gráfico da figura 46.

Pode-se afirmar com base na termogravimetria do material que há uma perda de massa em torno de 60 a 100°C que está associada à perda de massa de água no material e, posteriormente, a decomposição térmica do material se inicia por volta de 195°C atingindo o seu fluxo máximo em 304°C.

A tabela 13 apresenta as porcentagens de massa inicial resultante no polímero no ensaio de termogravimetria para as temperaturas citadas, de 60°C, 100°C, 195°C, 304°C e para o final do ensaio, na temperatura de 900°C, em que é possível perceber que o material não chegou ainda em sua carbonização, visto que possui massa no término do ensaio.

Figura 46 - Análise termogravimétrica da blenda P50C50AR



Fonte: do autor.

Tabela 13 - Porcentagem de massa inicial presente nas temperaturas citadas.

Temperatura (°C)	% massa
60	98,59
100	96,53
195	94,34
304	66,61
900	6,49

Fonte: do autor.

Sobre a realização do ângulo de contato, a figura 47 apresenta o resultado do ensaio.

Figura 47 - Ângulo de contato da blenda P50C50AR



Fonte: do autor.

Sobre a realização deste, pode-se perceber que a gota espalha-se sobre o material e, com isso, não é possível medir o ângulo de contato. Novamente, pode-se perceber que se trata de um material super-hidrofílico.

A diferença entre as blendas P50C50 e P50C50AR se dá somente pela presença do fármaco em P50C50AR. Segundo Ramanauskiene, Raudonis e Majiene (2016), os ácidos fenólicos são de natureza hidrofílica. Com base nisso, a presença do AR na blenda aumentou o comportamento hidrofílico desta.

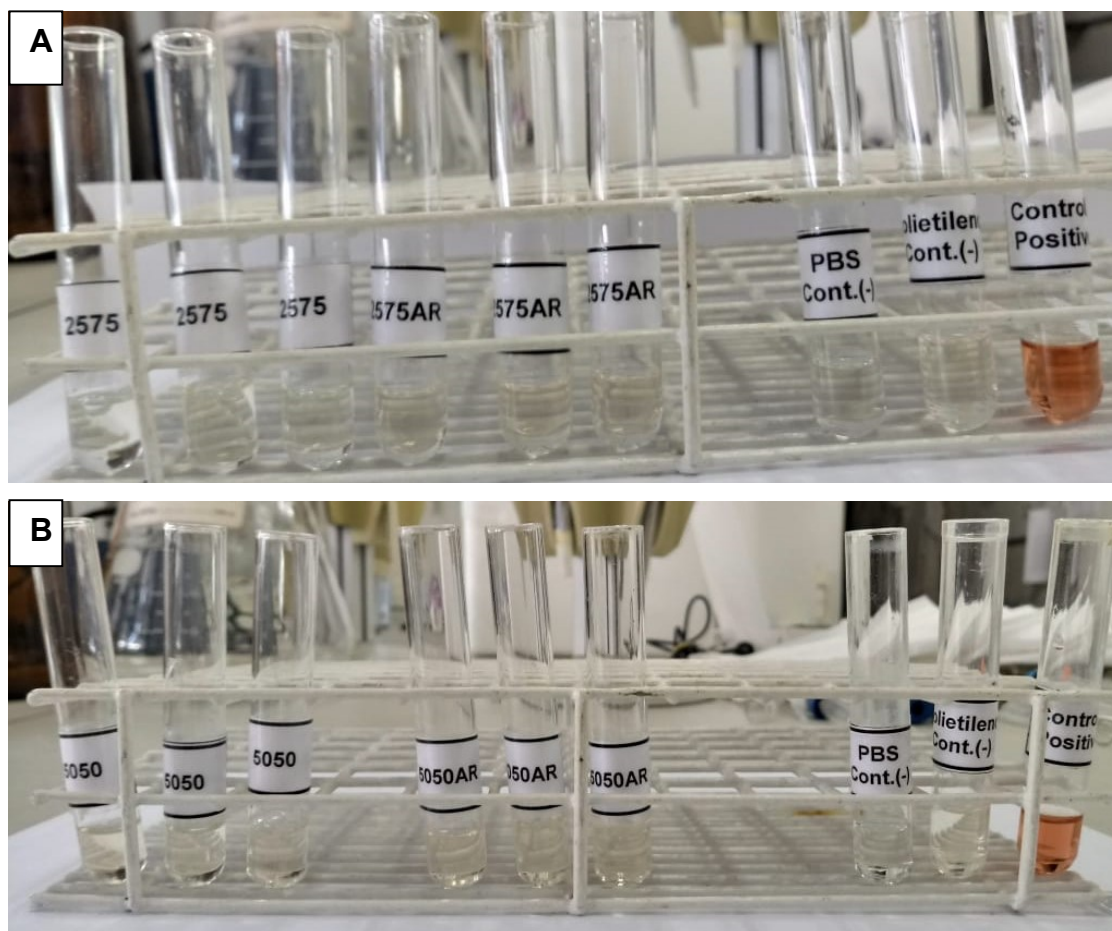
5.4 Caracterização biológica

Sobre o ensaio de hemocompatibilidade realizada, fotos dos tubos com a coloração obtida estão dispostas na figura 48.

A figura 48A mostra os tubos de P75C25 e P75C25AR representados, nesta ordem, em triplicata. Na figura 48B estão os tubos de P50C50 e P50C50AR, também nessa ordem e em triplicata.

Em ambas as imagens estão representados também tubos de solução PBS e de polietileno, controles negativos, e do látex, controle positivo, respectivamente.

Figura 48 - Fotos do ensaio de hemocompatibilidade para os materiais P75C25 e P75C25AR (a) e P50C50 e P50C50AR (b).



Fonte: do autor.

Através das imagens, não se pode observar significativa mudança de colocação dos líquidos, tendo como base o controle negativo e o controle positivo. Esperava-se, portanto, que os resultados de hemólise, expressos em porcentagem, sejam próximos ao do controle negativo.

A quantificação destes dados está demonstrada na tabela 14, juntamente com o controle negativo (polietileno).

Tabela 14 - Resultado do ensaio de hemocompatibilidade.

Material	% Hemólise
Polietileno	0,44 ± 0,01
P75C25	0,52 ± 0,03
P75C25AR	0,46 ± 0,12
P50C50	0,31 ± 0,03
P50C50AR	0,68 ± 0,06

Fonte: do autor.

As blendas, com e sem o fármaco, podem ser consideradas não hemolíticas já que Weber et al (2018) diz que os materiais podem ser classificados em três categorias, dependendo da porcentagem de hemólise. Materiais com mais de 5% são hemolíticos, entre 5% e 2% são levemente hemolíticos e abaixo de 2% são não hemolíticos.

O mesmo autor diz que a hemólise que gera o aumento de hemoglobina no plasma é um indicador da destruição de eritrócitos e os danos a esse tipo de célula podem levar à redução de transporte de oxigênio para tecidos além do aumento da hemoglobina livre pode induzir toxicidade ou alterar a função celular.

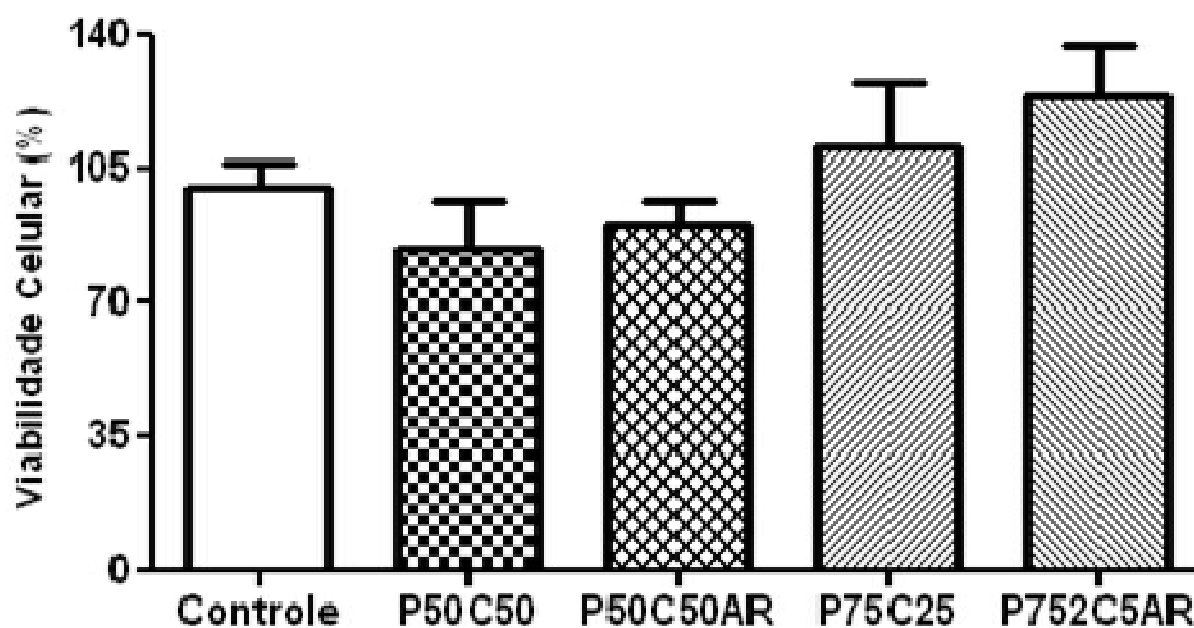
Com isso, como as blendas produzidas não foram hemolíticas, pode-se dizer que os resultados apresentados nesse ensaio são bons indicativos de biocompatibilidade e, com isso, sugerem que os materiais produzidos neste trabalho têm aplicação como biomaterial.

Os resultados do ensaio de MTT estão representados na figura 49, em termos de média e desvio padrão.

Os resultados de viabilidade celular para as blendas estão também representadas em tabela para facilitar a leitura. Tais dados seguem na tabela 15.

Na realização deste ensaio, pode-se perceber que as blendas com o fármaco possuem maior viabilidade celular do que as blendas sem o fármaco para a linhagem de células estudada. Além disso, seria possível dizer que nenhum dos materiais é citotóxico, já que a norma ISO 10993-5 (2009) diz que materiais com viabilidade celular acima de 70% possuem essa classificação.

Figura 49 - Resultado de MTT para as blendas com e sem o fármaco.



Fonte: do autor.

Tabela 15 - Viabilidade celular para blendas com e sem o fármaco.

Material	Viabilidade celular (%)
Controle	100,0 ± 6,1
P75C25	110 ± 17
P75C25AR	124 ± 14
P50C50	83 ± 13
P50C50AR	90,4 ± 6,2

Fonte: do autor.

Porém, segundo Shoemaker, Cohen e Campbell (2004), o resultado de MTT com extrato de plantas pode não refletir a verdadeira viabilidade celular e, com isso, os autores sugerem a utilização de outros ensaios para estes casos. O

procedimento utilizado por Mosmann (1983) e repetido neste trabalho não segue a recomendação destes autores para as blendas com o fármaco.

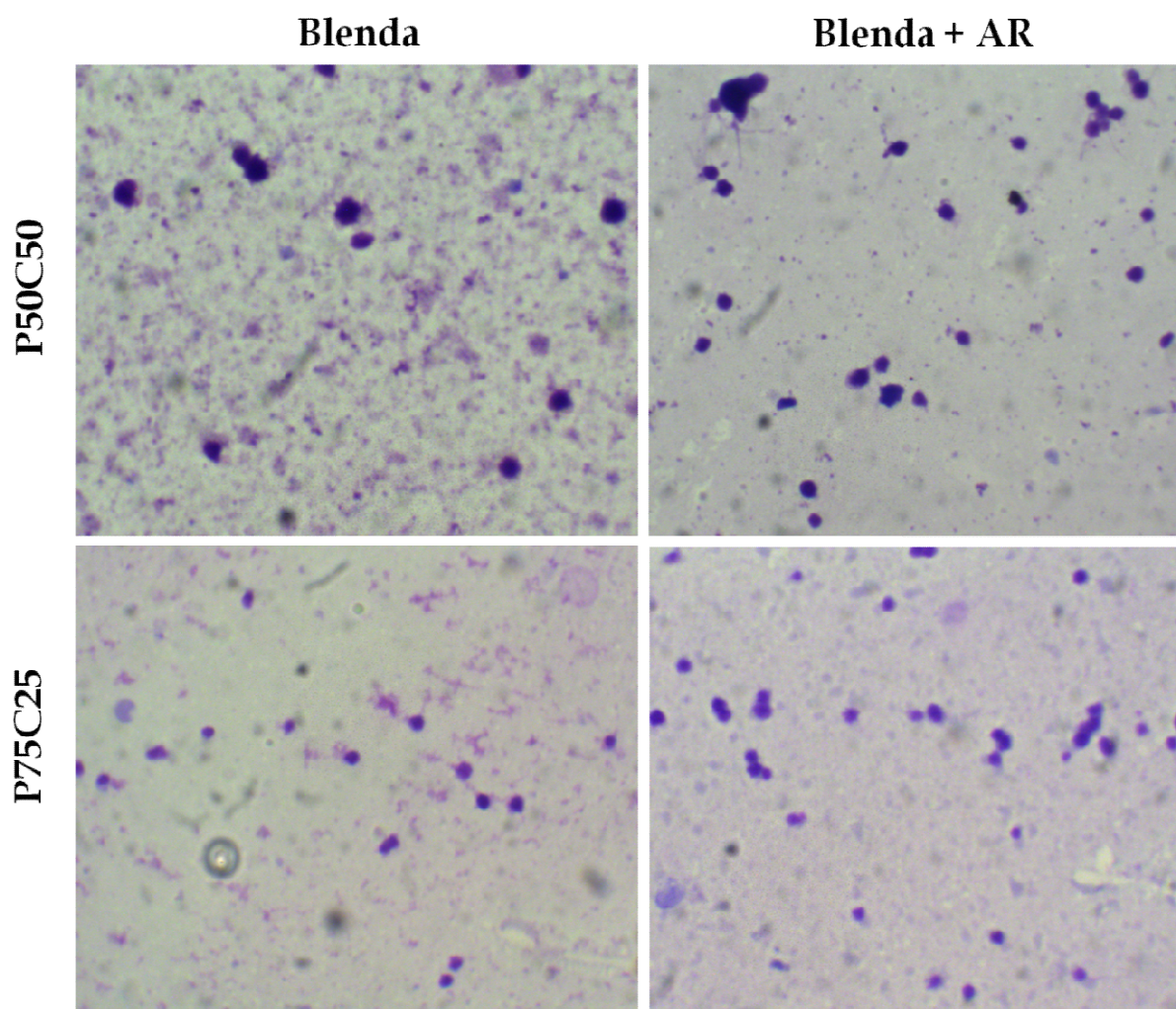
Pode-se perceber que a blenda P75C25AR apresentou resultado de viabilidade celular superior ao do grupo controle, o que foi, portanto, afetado pelo método utilizado para a realização do ensaio.

A única blenda que não se apresentou como super hidrofílica foi a P50C50 e também foi a blenda que se apresentou com menor viabilidade celular. Pode haver alguma correlação entre estas propriedades visto que já se conhece a relação entre contato celular e hidrofiliidade e, com isso, esta análise segue como sugestão de trabalhos futuros.

As imagens de microscopia ótica dos fibroblastos após a realização do ensaio de viabilidade celular, para cada uma das blendas, efetuada nos fibroblastos após a exposição com os materiais está na figura 50. Tais imagens estão dispostas de forma em que a blenda sem o fármaco está na primeira coluna e a com o fármaco está representada na segunda coluna.

As imagens não estão nítidas a ponto de o autor conseguir observar se houveram modificações na membrana destas células. Tal dado pode ser relevante porque as modificações na morfologia celular são parte de uma análise qualitativa de citotoxicidade, conforme relata Ikeda e Cruz (2003).

Figura 50 - Microscopia ótica dos fibroblastos após ensaio de MTT.

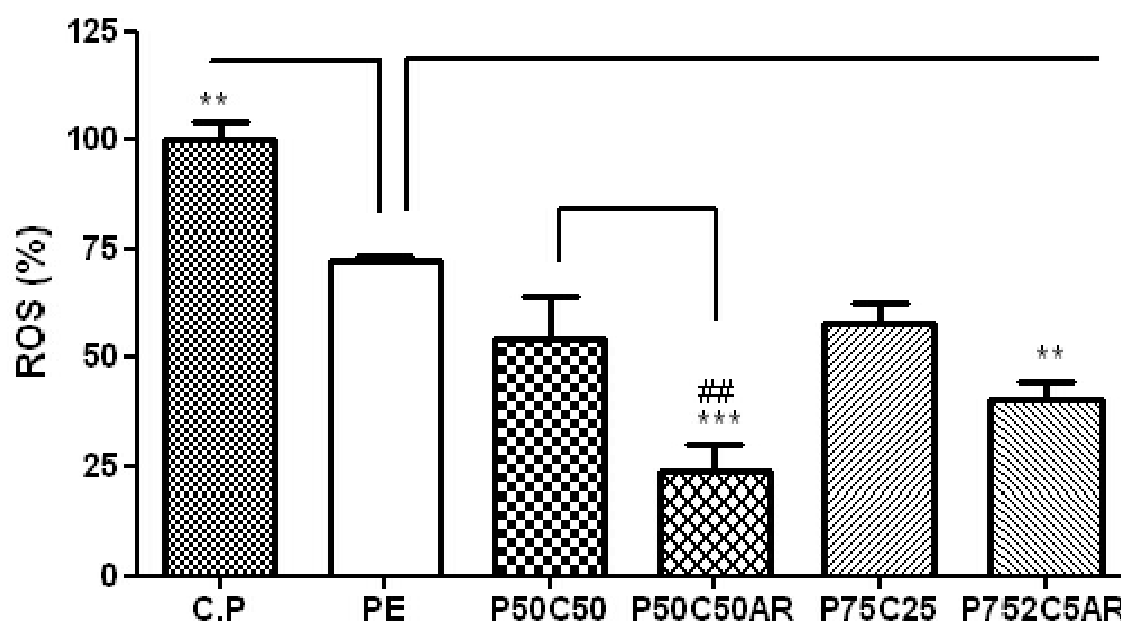


Fonte: do autor.

Sobre os resultados do ensaio de redução de espécies reativas de oxigênio, os resultados estão representados graficamente na figura 49 e podem também ser observados numericamente na tabela 16.

Os resultados apresentados mostram uma redução nas espécies reativas de oxigênio, principalmente no que se diz a respeito das blendas com o fármaco. Esse resultado para as blendas com fármaco já era esperado porque, como dito na referência bibliográfica, Huang et al (2006) comprovou essa redução em ROS para o Ácido Rosmarínico, além da inibição das etapas de vascularização.

Figura 51 - Resultados do ROS para as blendas com e sem o fármaco.



Fonte: do autor.

Tais valores também são expressos, para quantificação, em tabela. Os resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 16 - Porcentagem de ROS para blendas com e sem o fármaco.

Material	ROS (%)
Controle positivo	100,0 ± 4,1
Polietileno (PE)	72,6 ± 1,3
P75C25	57,9 ± 4,8
P75C25AR	40,3 ± 4,2
P50C50	54,5 ± 9,9
P50C50AR	23,6 ± 6,3

Fonte: do autor.

Tais resultados são bons indicativos de biocompatibilidade já que Ikeda e Nagasaki (2018) confirmam que a geração de ROS podem causar respostas biológicas negativas entre elas a inflamação, envelhecimento e morte celular.

Como não há diferença significativa estatisticamente entre P75C25 e P50C50 e percebe-se uma redução maior significativamente de ROS na blenda de P50C50AR do que na P75C25AR, provavelmente há uma liberação maior do fármaco pela blenda P50C50AR, se comparado a P75C25AR, visto que o AR possui esse potencial e o ensaio para as blendas foi realizada em mesmo período de tempo.

6. CONCLUSÃO

As caracterizações físico-químicas foram realizadas com sucesso, demonstrando que a Matriz de Colágeno proveniente da empresa Technodry é, de fato, composta somente por Colágeno tipo I e que, como esperado, o PLGA 75:25 e o Ácido Rosmarínico, produzidos pela Sigma Aldrich, também apresentam as características esperadas para estes materiais.

Por meio da metodologia de processamento das blendas de PLGA/Colágeno em proporções 75:25 e 50:50 pela técnica de *solvent casting* pode-se obter que as blendas com e sem o fármaco foram confeccionadas sem que houvesse nenhuma interação química.

As temperaturas de 60°C, que foram utilizadas para secagem no método *solvent casting*, e as temperaturas de 70 a 90°C, na moldagem dos implantes, de acordo com os resultados de termogravimetria, não são prejudiciais para a estrutura química das blendas formadas, o que se confirma nos demais ensaios de caracterização.

Foram moldados implantes de 6mm de comprimento por 0,45mm de diâmetro, aproximadamente que obtiveram a massa de $(2,83 \pm 0,53)\text{mg}$ e $(2,86 \pm 0,49)\text{mg}$ para as blendas P50C50 e P75C25, respectivamente. Tais blendas, quando colocadas para degradação em PBS por 28 dias, demonstraram perda de massa de $57,16 (\pm 17)\%$ e $42,12 (\pm 12)\%$.

Outro fator que evidenciou a maior perda de massa da blenda P50C50 foi a desintegração da matriz, o que não ocorreu na blenda P75C25. Tais blendas demonstram potencial para controle de degradação e, com isso, para liberação controlada de fármacos. Embora os resultados de degradação da matriz polimérica fossem apresentados neste trabalho, estes não podem ser associados à liberação do fármaco, da qual não foi possível quantificar neste trabalho.

Picos identificados no DRX da Matriz de Colágeno foram justificados pela presença das fibrilas do material, o que fica evidente, principalmente após a solubilização do mesmo em meio com acetona. O Colágeno após solubilização e

secagem, embora tenha perdido as suas fibrilas, apresentava as mesmas ligações químicas, e apresentavam também ensaio de DRX compatível com a referência.

As blendas formadas, quando realizada a caracterização físico-química, também demonstraram ser compostas dos materiais de base sem apresentarem ligações químicas que não sejam provenientes dos materiais dos quais foram feitos. Essa informação é importante porque o produto de degradação destas blendas serão a soma dos produtos de degradação dos polímeros, sendo esses já conhecidos. Esse fator caracteriza também a blenda com potencial para liberação controlada de fármacos.

Sobre a realização do ensaio de ângulo de contato, todos os materiais se mostraram hidrofílicos ou superhidrofílicos, o que é um indicador de possível biocompatibilidade do material.

Sobre os ensaios biológicos *in vitro* realizados, pode-se dizer que as blendas com e sem o AR não são hemolíticos, já que todas apresentaram índice de hemólise inferior a 2%.

Os resultados do ensaio de MTT mostram que todas as blendas não apresentam citotoxicidade pelo resultado obtido, mas, pode-se afirmar que o procedimento realizado não foi o mais adequado para as blendas com o fármaco, já que essas possuem polifenóis que podem fazer com que o resultado do ensaio se altere.

O ensaio de redução de ROS é também um bom indicativo para a aplicação, já que o objetivo da aplicação é reduzir a neovascularização e, um dos fatores que inibe tal processo é a redução destas espécies.

Com isso, o procedimento realizado neste trabalho produz materiais que possuem características físico-químicas e biológicas adequadas para a aplicação de implantes de liberação controlada para inibição das etapas de neovascularização para patologias como a RD e DMRI.

7. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros, podem ser executados trabalhos que consigam traçar o perfil de liberação do fármaco pelo ensaio de cromatografia líquida (HPLC) nestas blendas e a associação deste com a perda de massa do polímero por microscopia confocal. Outra sugestão que o autor apresenta é a avaliação da correlação entre o ângulo de contato dos polímeros e a viabilidade celular que esse apresenta. Também segue como sugestão de trabalhos futuros a análise de degradação térmica do Ácido Rosmarínico, já que pouco deste tema se encontra na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXIS, F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]. **Polymer International**. v. 54, p. 36-46, 2005.
- ALISEDA, D.; BERÁSTEGUI, L. Retinopatía diabética. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**. v. 31, 2008.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **F756**: standart pratice for assessment of hemolytc properties of materials, 2000.
- ANDRADE, A. L.; FERREIRA, J. M. F.; DOMINGUES, R. Z. Zeta potential measurement in bioactive collagen. **Materials Research**. v. 7, n. 4, p. 631-634, 2004.
- AWANG, M. A.; BAKAR, M. F. A.; BUSRA, M. F. M.; CHOWDHURY, S. R.; RAJAB, N. F.; KAMAL, W. H. W.; YUSOF, M. R.; SAIM, A. B.; IDRUS, R. B. Cytotoxic evaluation of biomechanically improved crosslinked ovine collagen on human dermal fibroblasts. **Bio-Medical Materials and Engineering**. v. 24, p. 1715-1724, 2014.
- BARANAUSKAITEA, J.; KOPUSTINSKIENEA, D.; MASTEIKOVAB, R.; GAJDZIOKB, J.; BARANAUSKASA, A.; BERNATONIENEA, J. Effect of liquid vehicles on the enhancement of rosmarinic acid and carvacrol release from orégano extract liquisolid compacts. **Colloids and Surfaces A**. v. 539, p. 280-290, 2018.
- BARNES, C. P.; PEMBLE IV, C. W.; BRAND, D. D.; SIMPSON, D. G. BOWLIN, G. L. Cross-linking electrospun type II collagen tissue engineering scaffolds with carbodiimide in etanol. **Tissue Engineering**. v. 13, n. 7, p. 1593-1605, 2007.
- BYRRO, R. M. D. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas biodegradáveis de liberação de Ácido Micofenólico para administração intraocular**. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).
- CAMPOS. M. S. T. **Caracterização de implantes poliméricos biodegradáveis contendo sirolimus e avaliação de sua estabilidade em condições de estresse químico**. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.
- CAPP, C; ZENNING, N; WAJNER, S; MAIA, A. L. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Revista HCPA**. Porto Alegre, v. 29, n. 1, 2009.
- CHEREDDY, K. K.; VANDERMEULEN, G.; PRÉAT, V. PLGA based drug delivery systems: promising carriers for wound healing activity. **Wound Repair and Regeneration**. v. 24, n. 2, p. 223-236, 2016.

COLTHURST, M. J.; WILLIAMS, R. L.; HISCOTT, P. S.; GRIERSON, I. Biomaterials used in the posterior segment of the eye. **Biomaterials**. v. 21, p. 649-665, 2000.

COLQUITT, J. L.; JONES, J.; TAN, S. C.; TAKEDA, A.; CLEGG, A. J.; PRICE, A. Ranibizumab and pegaptanib for the treatment of age-related macular degeneration: a systematic review and economic evaluation. **Health Technol Assess**. 2008

DAMICO, F. M. Angiogênese e doenças da retina. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**. v. 70, p. 547-553, 2007.

DARIE-NIȚĂ, R. N.; VASILE, C.; STOLERU, E.; PAMFIL, D.; ZAHARESCU, T.; TARȚĂU, L.; TUDORACHI, N.; BREBU, M. A.; PRICOPE, G. M.; DUMITRIU, R. P.; LELUK, K. Evaluation of the rosemary extract effect on the properties of polylactic acid-based materials. **Materials**. v. 11, 2018.

DEE, K. C.; PUELO, D. A.; BIZIOS, R. **Na introduction to tissue-biomaterial interaction**. Nova Iorque: Wiley, 2003.

DOMINGUES, J. A.; CHERUTTI, G.; MOTTA, A. C.; HAUSEN, M. A.; OLIVEIRA, R. T. D.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; BARBO, M. L. P.; DUEK, E. A. R. Bilaminar Device of poly(lactic-co-glycolic acid)/collagen cultured with adipose-derived stem cells for dermal regeneration. **Artificial Organs**. v. 40, p. 938-949, 2016.

FIALHO, S. L.; REGO, M. G. B.; CARDILLO, J. A.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; CUNHA JÚNIOR, A. S. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**. v. 66, p. 891-896, 2003.

GARCIA FILHO, C. A. A.; PENHA, F. M. GARCIA, C. A. A. Tratamento da DMRI exsudativa: revisão das drogas antiangiogênicas. **Revista Brasileira de Oftalmologia**. v. 71, p. 63-9, 2012.

GOPINATH, A.; REDDY, S. M. M.; MADHAN, B.; SHANMUGAM, G.; RAO, J. R. Effect of aqueous ethanol on the triple helical structure of collagen. **European Biophysical Journal**. v. 43, p. 643-652, 2014.

GRABAREK, Z.; GERGELY, J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. **Analytical Biochemistry**. v. 185, n. 1, p. 131-135, 1990.

GROVER, C. N.; GWYNNE, J. H.; PUGH, N.; HAMAIA, S.; FARNDAL, R. W.; BEST, S. M.; CAMERON, R. E. Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films. **Acta Biomaterialia**. v. 8, p. 3080-3090, 2012.

GUIMARÃES, H. C.; GERENUTTI, M. Alternativas terapêuticas para o tratamento da degeneração macular relacionada à idade: um desafio para a saúde pública. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 34, p. 459-468, 2013.

HUANG, S.; ZHENG, R. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. **Cancer Letters**. v. 239, p. 271-280, 2006.

IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparative entre duas metodologias. **Materials Research**. v. 6, n.3, p. 317-320, 2003.

IKEDA, Y.; NAGASAKI, Y. Antioxidative biointerface: biocompatible materials scavenging reactive oxygen species. **Biomedical Materials**. v. 13, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5**: Biological evaluation of medical devices: tests for *in vitro* cytotoxicity. Switzerland, 2009.

JOSE, M. V.; THOMAS, V.; DEAN, D. R.; NYAIRO, E. Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Colagen blends as bone tissue scaffolds. **Polymer**. v. 50, p. 3778-3785, 2009.

JIMÉNEZ-ORTIZ, H. F.; MARTINEZ, S. P.; FERNANDÉZ, N. T.; GIRAL, E. M. Intracameral bevacizumab (Avastin®) in the management of neovascular glaucoma surgery. **Archivos de la sociedad española de oftalmología**. v. 87, p. 396-400, 2012.

KAUSHAL, A.M.; GUPTA, P.; BANSAL, A. K. Amorphous Drug Delivery Systems: Molecular Aspects, Design, and Performance. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. v. 21, 2004.

KIM, J. H.; LEE, B. J.; KIM, J. H., YU, Y. S.; KIM, M. Y.; KIM, K. W. Rosmarinic acid supresses retinal neovascularization *via* cell cycle arrest with increase of p21^{WAF1} expression. **European Journal of Pharmacology**. v. 615, p. 150-154, 2009.

KIM, G. D.; PARK, Y. S.; JIN, Y. H.; PARK, C. S. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 99, p. 2083-2092, 2105.

KIM, Y. C.; CHIANG, B.; WU, X.; PRAUSNITZ, M. R. Ocular delivery of macromolecules. **Journal of Controlled Release**. v. 190, p. 172-181, 2014.

LIU, J.; WAN, Y.; ZHAO Z.; CHEN, H. Determination of content of rosmarinic acid by HPLC and analytical comparison of volatile constituents by GC-MS in different parts of *Perilla frutescens* (L.) Britt. **Chemistry Central Journal**. 2013.

LIU, Q.; ZHANG, H.; ZHOU, G.; XIE S.; ZOU, H.; YU, Y.; LI, G.; SUN, D.; ZHANG, G.; LU, Y.; ZHONG, Y. *In vitro* and *in vivo* study of thymosin alpha 1 biodegradable in situ forming poly(lactide-co-glycolide) implants. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 397, p. 122-129, 2010a.

LIU, S.; KAU, Y.; CHOU, C.; CHEN, J.; WU, R. YEH, W. Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing. **Journal of Membrane Science**. v. 355, p. 53-59, 2010b.

LUCENTIS: Ranibuzumabe. Farmacêutica responsável Virginia da Silva Giral di. São Paulo: Novartis Biociências S.A. Bula de remédio.

MALCOR, J. D.; BAX, D.; HAMAIA, S. W.; DAVIDENKO, N.; BEST, S. M.; CAMERON, R. E.; FARNDAL, R. W.; BIHAN, D. The synthesis and coupling of photoreactive collagen-based peptides to restore integrin reactivity to an inert substrate, chemically-crosslinked collagen. **Biomaterials**. v. 85, p. 65-77, 2016.

MARTIN, D. F.; MAGUIRE, M. G.; YING, G.; GRUNWALD, J. E. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. **The New England Journal of Medicine**. v. 364, n. 20, p. 1897-1908, 2011.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery Carrier. **Polymers**. n. 3, p. 1377-1397, 2011.

MI, F.; LIN, Y.; WU, Y.; SHYU, S.; TSAI, Y. Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, degradation and release behavior. **Biomaterials**. v. 23, p. 3257-3267, 2002.

MOREIRA, C. D. F. **Avaliação da adição de colágeno tipo I e nanopartículas de vidro bioativo a hidrogéis termossensíveis de quitosana para uso na engenharia de tecido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação “*in vitro*” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**. v. 11, n. 3, p. 340-350, 2006.

MOURA, L. M. **Produção, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de blendas de PLGA e PHB**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

OLDE DAMINK, L. H.; DIJKSTRA, P. J.; VAN LUYN, M. J.; NIEUWENHUIS, P. FEIJEN, J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. **Biomaterials**. v. 17, n. 8, p. 765-773, 1996.

PEDROSO, M. G. V. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

PRASAD, P. S.; SCHWARTZ, S. D.; HUBSCHMAN, J. P. Age-related macular degeneration: current and novel therapies. **Maturitas**. v. 66, p. 46-50, 2010.

PROCKOP, D. J.; FERTALA, A. The collagen fibril: the almost crystalline structure. **Journal of Structural Biology**. v. 122, p. 111-118, 1998.

PROVIS, J. M.; DUBIS, A. M.; MADDESS, T.; CARROLL, J. Adaptation of the central retina for high acuity vision: cones, the *fovea* and the avascular zone. **Progress in Retinal and Eye Research**. v. 35, p. 63-81, 2013.

RAMANAUSKIENE, K.; RAUDONIS, R.; MAJIENE, D. Rosmarinic acid and *melissa officinalis* extracts differently affect glioblastoma cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016.

RAWAS-QLAJI, M.; WILLIAMS, C. Advances in ocular drug delivery. **Current Eye Research**. v. 37, p. 345-356, 2012.

REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. **Trends in Biotechnology**. p. 1-8, 2015.

ROLIM, A. E. H. **Estudo *in vivo* de materiais biomiméticos, associados ou não à administração enteral de estrôncio, para reparo de defeito ósseo**. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

SADEGHI-AVALSHAHR, A. R.; KHORSAND-GHAYENI, M.; NOKHASTEH, S.; MOLAVI, A. M.; NADERI-MESHKIN, H. Synthesis and characterization of PLGA/collagen composite scaffolds as skin substitute produced by electrospinning though two different approaches. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 2017.

SALIBA, J.B.; FARACO, A. A. G.; YOSHIDA, M. I.; VASCONCELOS, W. L.; CUNHA, A. S.; MANSUR, H. S. Development and characterization of na intraocular biodegradable polymer system containing cyclosporine-a for the treatment of posterior uveitis. **Materials Research**. v. 11, n. 2, p. 207-211, 2008.

SANTOS, L. S. **Obtenção e caracterização morfológica, estrutural, mecânica e de molhabilidade de nanotubos de TiO₂ para aplicação em biomateriais**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SANTOS, M. H.; SILVA, R. M.; DUMONT, V. C.; NEVES, J. S.; MANSUR, H. S.; HENEINE, L. G. D. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. **Materials Science and Engineering C**. v. 33, p. 790-800, 2013.

SHOEMAKER, M.; COHEN, I.; CAMPBELL, M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 93, p. 381-384, 2004.

SILVA, S. B.; AMORIM, M.; FONTE, P.; MADUREIRA, R.; FERREIRA, D.; PINTADO, M.; SARMENTO, B. Natural extracts into chitosan nanocarriers for rosmarinic acid drug delivery. **Pharmaceutical Biology**. v. 53, p. 642-652, 2015.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.

SIQUEIRA, I. R.; CIMAROSTI, H.; FOCHESSATTO, C.; SALBEGO, C.; NETTO, C. A. Age-related susceptibility to oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices. **Brain Research**. v. 1025, p. 226-230, 2004.

STAROS, J. V.; WRIGHT, R. W.; SWINGLE, D. M. Enhancement by n-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. **Analytical Biochemistry**. v. 156, n. 1, p. 220-222, 1986.

THITISSET, T.; DAMRONGSAKKUL, S.; BUNAPRASERT, T.; LEEANANSAKSIRI, W.; HONSAWEK, S. Development of collagen/demineralized bone powder scaffolds and periosteum-derived cells for bone tissue engineering application. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 2056-2071, 2013

VEIRA, L. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de Ácido Rosmarínico para o tratamento de doenças oculares causadoras de neovascularização**: obtenção e caracterização dos sistemas. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; SAKURAI, E.; TABATA, Y.; KIMURA, H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 57, p. 2033-2046, 2005.

WEBER, M.; STEINLE, H.; GOLOMBEK, S.; HANN, L.; SCHLENSAK, C.; WENDEL, H. P.; AVCI-ADALI, M. Blood-contacting biomaterials: in vitro evaluation of the hemocompatibility. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**. v. 6, 2018.

ZIBETTI, A. W.; AYDI, A.; CLAUMANN, C. A.; ELADEB, A.; ADBERRABA, M. Correlation of solubility and prediction of the mixing properties of rosmarinic acid in different pure solvents and in binary solvent mixtures of ethanol + water and methanol + water from (293.2 to 318.2)K. **Journal of Molecular Liquids**. v. 216, p. 370-376, 2016.