

Influência do colágeno tipo I na propriedade físico-química, morfológica e biológica de blendas poliméricas de PLGA para aplicação oftálmica

Influence of type I collagen on physicochemical, morphological and biological properties of polymeric PLGA blends for ophthalmic application

André de Barros Ferreira^{1,2} , Ana Flávia Rodrigues Sales¹ , Sidney Nicodemos da Silva¹ ,
Kátia Michelle Freitas^{1,3} 

¹Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Materiais. Av. Amazonas, 5253, 30421-169, Belo Horizonte, MG, Brasil.

²Oculare Hospital de Oftalmologia. Rua Maranhão, 653, Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. Av. Antônio Carlos, 6627, campus UFMG, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

e-mail: debarrosnle@hotmail.com, anafsales@gmail.com, sidneynicodemos@yahoo.com.br, artemisk_farma@yahoo.com.br

RESUMO

Implantes biodegradáveis associados ao sistema de liberação de drogas são promissores para o sucesso do tratamento de doenças oftálmicas. Dentre os diversos materiais empregados para o desenvolvimento desses dispositivos, o colágeno possui propriedades singulares e bastante consideráveis na biomédica como a biocompatibilidade e segurança conhecidas. O presente estudo desenvolveu blendas poliméricas e investigou a influência do colágeno nas características térmicas, química, morfológicas e biológicas, em combinação com PLGA (poliácido láctico-co-glicólico). As blendas foram obtidas em diferentes proporções de PLGA e colágeno: P75C25 (75 % PLGA e 25 % colágeno) e P50C50 (50 % PLGA e 50% colágeno). Em análises de difratometria de raio X (DRX) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), os produtos obtidos preservaram a propriedade amorfa e apresentaram semelhanças nos perfis de espectro de absorção de bandas em relação as matrizes poliméricas. O aumento de colágeno é inversamente proporcional à redução do pico de temperatura de degradação térmica sem perda máxima de massa da blenda, ao contrário do que foi observado na amostra P75C25. Além disso, P50C50 apresentou redução de molhabilidade, ou seja, menor hidratação que contribuiu na degradação controlada da blenda e uma morfologia heterogênea. Na caracterização biológica, ambas amostras apresentaram características hemocompatíveis sem alteração morfológica dos linfócitos isolados ou mudança nos níveis de espécies reativas de oxigênio. Desse modo, as blendas poliméricas podem ser potencialmente aplicáveis como uma plataforma multifuncional visando o aprisionamento e sistema de liberação de fármacos.

Palavras-chave: Blendas; PLGA; colágeno; biomateriais; sistema de liberação drogas.

ABSTRACT

Biodegradable implants associated to the drug delivery system are promising for the successful treatment of ophthalmic diseases. Among these materials used for the development of ophthalmic devices, collagen has unique and considerable properties in biomedicine, such well-known biocompatibility and safety. The present study developed polymeric blends and investigated the influence of collagen on thermal, chemical, morphological and biological characteristics in combination with PLGA (polylactic-co-glycolic acid). The blends were obtained in different proportions of PLGA and collagen: P75C25 (75% PLGA and 25% collagen) and P50C50 (50% PLGA and 50% collagen). In X-ray diffractometry (XRD) and Fourier transform infrared spectrometry analysis (FTIR), the obtained products preserved the amorphous property and revealed similar of bands absorption

spectrum profiles compared the polymeric matrices. The increase in collagen is inversely proportional to reduced the thermal degradation temperature peak without maximum loss of material mass, contrary to the observed in the P75C25 sample. In addition, P50C50 showed low wettability in relation to P75C25, so less hydration that contributed to the controlled degradation of the blend and a heterogeneous morphology. In the biological characterization, both samples showed hemocompatible characteristics, preserved the morphology of isolated lymphocytes and no induction of oxidative stress was observed. Thus, polymeric blends could be used potentially as multifunctional platform aimed at drug-entrapment and delivery system.

Keywords: Blends; PLGA; collagen; biomaterials; delivery system of drugs.

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação de drogas são desenvolvidos visando a obtenção de produtos mais estáveis, ativos e/ou com pouco efeito colateral para melhor adesão da terapêutica e conforto pelo paciente, além disso, devem garantir a manutenção de concentrações terapêuticas no local e efeito duradouro [1]. Nesse sentido, polímeros bio-absorvíveis como poli (ácido lático) e poli (ácido glicólico) e seus copolímeros PLGA (poli-ácido lático-co-glicólico), são amplamente empregados na engenharia de tecnologia visando otimizar a entrega, além de garantir a segurança, eficácia e controle da taxa, tempo e local de liberação de fármacos [2]. Avanços importantes foram feitos a partir de polímeros sintéticos, porém as suas propriedades individuais não atendem às complexas demandas dos biomateriais e assim, alguns sistemas necessitam de uma combinação de constituintes sintéticos e naturais a fim de obter características vantajosas de ambos [3].

O desenvolvimento de dispositivos poliméricos para tratamento, direcionamento, imagem e diagnóstico de drogas deve considerar a toxicidade como parâmetro importante para sua caracterização. A hemocompatibilidade é um dos principais critérios adotados para avaliação citotóxica de um biomaterial, pois o sangue, geralmente, é o primeiro tecido de contato. O tecido sanguíneo compreende de hemácias (45 % do volume total), além de células polimorfonucleares, responsáveis pela defesa do organismo como os linfócitos. Assim, é considerável a análise da interação do polímero com o sangue a fim de avaliar a ativação e destruição dos componentes desse tecido. Para isso, o material é incubado direto ou indiretamente com sangue e, assim acompanha-se liberação ou não da hemoglobina, esta indicadora direta de destruição das hemácias. Apesar dos dados serem rudimentares, é um modelo rápido que pode ser bastante útil em ensaios de triagem de materiais, além de ser simples e de baixo custo financeiro [4, 5].

Os poliésteres biodegradáveis como o PLA (poli-ácido lático), PGA (poli-ácido glicólico), e seu composto PLGA possuem diversas aplicações biomédicas, por exemplo, implantes destinados às patologias oftálmicas. O PLGA gera metabólitos resultantes da hidrólise das cadeias de ésteres que são facilmente metabolizados pelo organismo humano [6, 7]. A biodegradabilidade do material possibilita um conforto adicional para o paciente, uma vez que se abstém de procedimento invasivo para remoção do implante polimérico. Essas vantagens associadas à biocompatibilidade, característica inerte [8], grande capacidade de encapsular moléculas de diversos tamanhos [9] e garantia de segurança resultou em sua aprovação por diversas agências reguladoras como *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicine Agency* (EMA), além de ser relatado como principal carreador para a administração sustentada de medicamentos [7].

Contudo, PLGA pode apresentar um comportamento autocatalítico [10] que resulta em uma degradação heterogênea do material devido à formação de produtos acidificados a partir da hidrólise não-enzimática, consequentemente, formação de gradientes de pH entre a superfície e o interior do biomaterial. E assim, a degradação do copolímero progride para uma erosão em massa do produto e não somente de superfície. Além disso, durante a síntese do copolímero há redução do grau de cristalinidade do material o que favorece a hidratação e hidrólise do PLGA [9]. A perda de massa, acentuada e variável, pode ser uma desvantagem para o desenvolvimento de sistemas de controle de liberação de fármacos.

Implantes intravítreos de PLGA como Ozurdex[®], comercializado pela empresa Allergan[™], foi desenvolvido e destinado para o tratamento de edema macular diabético (EMD), cujo o dispositivo libera o fármaco anti-inflamatório, Dexametasona, para a retina permanecendo no vítreo por até seis meses. Administração desse implante oftálmico pode ser manipulada em uma única vez, ou repetidas vezes, resultando na melhora da acuidade visual corrigida e da espessura morfológica retiniana. Em contrapartida, Ozurdex não é recomendado para olhos glaucomatosos devido ao risco de aumento da pressão intraocular, e para olhos que tiveram ruptura de capsula posterior do cristalino, pois resulta em aumento do fluxo de humor aquoso, com consequente diminuição da secreção, então, a presença do dispositivo pode acarretar efeitos deletérios sobre o endotélio corneano com formação de edema e demanda imediata de sua remoção [11].

Desse modo, a combinação de polímeros sintéticos e naturais pode contribuir para o aprimoramento das propriedades desejáveis dos poliésteres. De acordo com GEANALIU-NICOLAE e ANDRONESCU [12], o uso

de colágeno em associação ao polímero sintético favorece o sistema de liberação de drogas, pois oferecem diversas vantagens como tamanhos de poros específicos para o carreamento de princípio ativo e estabilidade no organismo humano, além da versatilidade do composto para diferentes aplicações.

Ologen[®] (Aeon Astron Corporation[™], Taipei, Taiwan), implante com matriz de colágeno, surgiu como uma estratégia no mercado com objetivo de substituir a trabeculectomia (drenagem do humor aquoso) com Mitomicina-C (MMC) utilizado em cirurgia de antiglaucomatosa. O dispositivo consiste de uma superfície porosa inserido mecanicamente na conjuntiva com função reservatória e auxiliar na redução da fibrose subconjuntival do tecido pós-cirurgia. Todavia, estudos clínicos revelaram que tanto a pressão intraocular e taxas de complicações não apresentaram diferenças entre Ologen[®] e trabeculectomia MMC [13]. Em um estudo de revisão sobre sistemas de liberação a partir do colágeno, CHARK *et al.* [14] relataram a versatilidade dessa matriz como lentes e implantes aumentando a permeação de fármacos como antibióticos (Polimixina-B, Tobramicina e Gentamicina) e corticosteróides conjuntivais no olho, porém com liberação a curto prazo. Apesar da excelente biocompatibilidade e baixa imunogenicidade do colágeno, este possui fracas propriedades mecânicas e térmicas que podem ser corrigidas pela adição de PLGA [15, 16]. De acordo com PINTO e MARIANO [17] o PLGA, *in vivo*, sofre degradação gradual sem acarretar problemas ao sistema biológico na área do implante.

No campo biomédico oftálmico, PLGA e colágeno já são usados para o desenvolvimento de lentes e implantes destinados desde à proteção da superfície do olho em traumas pós cirúrgicos, doenças da córnea à melhora da biodisponibilidade de fármacos oftálmicos [18, 14]. Tratamentos convencionais com o uso de soluções aquosas oftálmicas oferecem baixa biodisponibilidade de drogas devido a fatores relacionados com o órgão como movimentos constante das pálpebras, drenagem lacrimal, além da córnea (membrana) que serve como barreira anatômica e fisiológica, dessa maneira, há baixa permeação ou dificuldade de retenção do fármaco e possibilidade de falhas no tratamento de doenças oftálmicas [19]. Em adição, ressalta-se que as soluções podem oferecer efeitos colaterais consideráveis, aumento de risco, altos custos e a exigência da frequência contínua de administração e assim, compromete a adesão terapêutica dos pacientes, com consequente aumento da quantidade de indivíduos com baixa visão ou cegueira legal [20].

Diversas estratégias de obtenção de novos sistemas de liberação de drogas associados a biotecnologia e desenvolvimento de biomateriais, tem sido alvo de constantes de pesquisas devido as grandes vantagens que oferecem à terapêutica, tais como aumento da biodisponibilidade, liberação prolongada e controlada de drogas, redução de efeitos colaterais, redução dos riscos de infecção, redução ou anulação da frequência de administração proporcionando maior conforto, menor custo e portanto, maior adesão ao tratamento [21, 22]. Nesse sentido, as propriedades desejáveis dos polímeros de PLGA e colágeno encontradas em sistema de liberação de drogas impulsiona a descoberta de novos produtos versáteis e aplicáveis na área médica.

Diante do exposto, o presente estudo propõe o desenvolvimento e caracterização físico-química e biológica de um possível biomaterial de perfil matricial para aplicação em sistema liberação de drogas a partir da combinação de polímeros PLGA e diferentes concentrações do colágeno tipo I.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Ácido Acético Glacial com 99,8% de pureza, grau P.A (Neon, Suzano, Brasil); Matriz de Colágeno tipo I (Technodry, Belo Horizonte, Brasil); Acetona 99,8% 9 (Sulfal Química, Belo Horizonte, Brasil); PLGA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Fosfato de sódio bibásico heptahidratado, grau P. A. (Cromoline, Diadema, Brasil); Fosfato de potássio bibásico, grau P.A. (Cinética, Londrina, Brasil); Cloreto de sódio, grau P.A. (Neo, Suzano, Brasil).

2.2. Preparação das blendas

Para a obtenção das blendas, inicialmente, colágeno tipo I (0,25 %) p/v do material foi solubilizado em solução 30% de ácido acético em acetona sob agitação magnética a 40 °C até a completa solubilização. Após, uma fração dessa amostra foi seca em estufa (60 °C) e denominada de Colágeno Solubilizado e Seco (CSS), a qual foi usada para caracterização. O restante foi incorporado juntamente com PLGA, numa proporção em massa de 3:1 (PLGA:Colágeno – P75C25) e 1:1 (PLGA:Colágeno – P50C50) sob agitação magnética por 4 horas. Para confecção das blendas, as suspensões obtidas foram vertidas em placa de petri e inseridas em estufa a 60 °C por 24 h de acordo com [21]. Após a formação de um filme e raspagem do material da placa de petri, o pó obtido foi moldado à quente (70–90 °C) em forma de haste com 6 mm de comprimento e 0,45 mm de diâmetro.

2.3. Caracterização físico-química, morfológica das blendas

Blendas de PLGA associadas ao colágeno tipo I foram confeccionadas e submetidas aos ensaios físico-químicos de difração de Raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e medição de ângulo de contato (AC).

Caracterização química: A estrutura cristalina das blendas, bem como das matérias-primas foram examinadas por Difração de Raios X (DRX) (Shimadzu Corporation, XDR-7000), operando à velocidade de 3°/min e variação de ângulo de 10° a 100° (radiação de Cu), voltagem de 40 kV e corrente 30 mA. Para avaliação dos grupos químicos funcionais, as análises foram realizadas em Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) através do equipamento IR-Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) sob técnica de ATR (*Attenuated total reflectance*) no equipamento.

Caracterização térmica: O estudo do perfil térmico das blendas foi realizado por análise termogravimétrica (TGA) em equipamento DTG-60/60H (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), com cadinho de alumina, atmosfera de Nitrogênio (50 mL/min) e taxa de 10 °C/min. A derivada da termogravimetria (DTG) foi obtida pelo software Origin®.

Caracterização morfológica: O aspecto morfológico das amostras foi investigado por equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) modelo SSX-500 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) operado a 10 Kv e as imagens obtidas por elétrons secundários. Para o recobrimento das amostras foi utilizado o equipamento metalizador SC-701 (Sanyu Electron, Shangai, China).

Avaliação da molhabilidade: foi utilizado o goniômetro (Kruss, DAS-100) para a medição do ângulo de contato com o intuito de se verificar a molhabilidade das blendas. Esse ensaio é realizado pelo Método da Gota Sêssil em que é depositado 5 µL de água destilada sob as amostras pulverizadas com auxílio de uma seringa. O ângulo é medido entre as fases sólida, líquida e o ar.

Ensaio de degradação: Para testar a degradação das blendas, as amostras foram imersas, separadamente, em solução tampão de fosfato (PBS) e mantidas em banho-maria a temperatura de 37 °C, como descrito por [23]. O volume da solução foi calculado conforme norma ISO-23317 [24] e inseridos em tubos transparentes. Os experimentos foram realizados em intervalos 4, 7 e 14 dias, em triplicata, assim, para cada intervalo, as amostras foram retiradas dos tubos, secas em estufa por 24 h e com a massa comparada, individualmente, com a massa inicial de cada implante. Os dados foram expressos em porcentagem (%) de perda de massa em relação à massa inicial.

2.4. Ensaios e caracterizações biológicas

As blendas foram submetidas aos ensaios biológicos *in vitro* em linfócitos humano isolados para hemocompatibilidade, viabilidade celular e análise de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Isolamento dos linfócitos humano do sangue periférico: O sangue humano foi obtido de um doador saudável através da coleta de sangue de sangue periférico, por punção venosa, em tubo a vácuo contendo EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) 1 mg/mL, como anticoagulante. Após a coleta e descanso do sangue total anticoagulado, pipetou 5 mL de meio de gradiente de densidade Ficoll Paque® em um tubo de poliestireno de fundo redondo de 15 mL (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) e acrescentou delicadamente 3 mL de sangue, evitando a mistura das soluções. Em seguida, centrifugou os tubos a 500 x g por 45 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, removeu, cuidadosamente, a camada clara e amarela que estava acima da camada das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), esta camada PBMC aparece, de cima para baixo, como a primeira faixa nebulosa. A camada PBMC foi transferida para um tubo cônico de 15 mL e lavou-se 2 x em PBS centrifugando 500 x g por 5 minutos, cada. O pellet celular foi ressuspenso e transferido para uma garrafa de cultivo contendo meio RPMI 1640 (Gibco-BRL Corporate Headquarters, Gaithersburg, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 4% de fitohe-maglutinina, 100 U/ml penicillina and 100 µg/ml estreptomicina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA) e incubado em estufa (Nuair Equipaments, Plymouth, Minneapolis, EUA.) com 5% CO₂ a 37 °C. Os linfócitos coletados foram utilizados no ensaio de citotoxicidade e produção de espécies reativas de oxigênio na presença das blendas.

Ensaio de hemocompatibilidade: Amostras em triplicata das blendas P75C25 e P50C50 foram colocadas em contato com a mistura de sangue humano diluído de acordo com os parâmetros estabelecidos pela norma ASTM F756-00 [25] e incubadas em estufa a 37 °C por 3 horas e com agitação a cada 30 minutos. Os controles negativo e positivo correspondem os materiais polietileno e látex, respectivamente. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 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, 500 μL de cada sobrenadante foi homogeneizada com 500 μL de reagente Drabkin (Labtest, São Paulo, Brasil) por cerca de 30 minutos. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nm e a concentração de hemoglobina foi determinada por interpolação linear dos valores de absorbância das amostras na curva de calibração, utilizando padrões comerciais.

Ensaio de citotoxicidade: Para a realização do ensaio de citotoxicidade, linfócitos $0,5 \times 10^6$ células/poço isolados do sangue periférico humano foram cultivados em placas de 96 poços por 24 horas em meio RPMI 1640 (Gibco-BRL Corporate, Headquarter, Gaithersburg, EUA) e suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 4% de fitohemaglutina, 100 U/ml penicilina e 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA) na presença das blendas P75C25, P50C50 e polietileno como controle negativo. A viabilidade celular foi determinada através da capacidade da mitocôndria converter o sal brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) conforme descrito por MOSMANN [26]. Foram adicionados, portanto, 10 μL /poço de 10 mg/ml do reagente de MTT e incubado por 4 h. O sal MTT não convertido foi removido e a quantidade de cristais formazan formado (é diretamente proporcional ao número de células viáveis) foi determinada pela adição de 100 μL dimetilsulfóxido (DMSO) e mensurado por leitor de multiplacas (Shimadzu, Japão) à 570 nm. O ensaio foi realizado em hexaplicata a viabilidade celular foi obtida em porcentagem (%) em relação ao grupo controle. Para avaliação da morfologia dos linfócitos após o contato com as blendas, as suspensões contendo meio e células foram gotejadas sobre a lâmina a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram coradas com kit comercial Panótico Rápido LB (Laborclin, Brasil). As imagens foram analisadas em microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Alemanha) acoplada com microcâmera JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japão).

Ensaio de hemocompatibilidade: Amostras em triplicata das blendas P75C25 e P50C50 foram colocadas em contato com a mistura de sangue humano diluído de acordo com os parâmetros estabelecidos pela norma ASTM F756-00 [25] e incubadas em estufa a 37 °C por 3 horas e com agitação a cada 30 minutos. Os controles negativo e positivo correspondem os materiais polietileno e látex, respectivamente. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 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, 500 μL de cada sobrenadante foi homogeneizada com 500 μL de reagente Drabkin (Labtest, São Paulo, Brasil) por cerca de 30 minutos. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nm e a concentração de hemoglobina foi determinada por interpolação linear dos valores de absorbância das amostras na curva de calibração, utilizando padrões comerciais.

Ensaio de produção de EROS: O ensaio de ROS foi realizado conforme descrito por ARANDA *et al.* [27] Os sobrenadantes, obtidos nos testes de hemólise, foram alíquotados (100 μL) em placas de 96 poços e adicionado 10 μL de detector de diclorofluorescência oxidada (DCF-DA - Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA) a 37 °C por 30 minutos, protegidos de luz. A fluorescência de diclorofluorescência oxidada (DCF) foi detectada no plasma pela medição em leitor de microplacas de fluorescência (Synergy, Biotek Instruments, Vermont, USA) medida a excitação de 485 nm e a emissão de 535 nm. Utilizou-se uma curva padrão com DCF e a porcentagem foi expressa em porcentagem em relação ao controle positivo (100%).

Para os ensaios de hemocompatibilidade, espécies reativas de oxigênio e viabilidade celular, os dados foram expressos em relação à média e do desvio padrão com uso do programa Graph Prism 8.0[®]. As comparações paramétricas entre dois ou mais grupos foram feitas usando o teste *t-Student* ou análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido de teste de *Student Newman Keuls*. Foram considerados significativos resultados de “*p*” inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As amostras de blendas obtidas apresentaram valores de pesos entre 2,83 ($\pm 0,53$) mg e 2,86 ($\pm 0,49$) mg para P50C50 e P75C25, respectivamente. O cálculo da média das massas foi obtido a partir de dez amostras selecionadas, aleatoriamente.

3.1. Caracterização físico-químicas

3.1.1. Difratoograma de Raios X (DRX)

A Figura 1 mostra os difratogramas das matérias primas e blendas. O perfil raio-X dos padrões PLGA e CSS não apresentam picos de difração devido à sua estrutura amorfa. Outrossim, as blendas P50C50 e P75C25 apresentaram o perfil difratômetro semelhantes às matérias primas, assim, o processo de obtenção das blendas também preservou a propriedade amorfa sem rearranjo atômico.

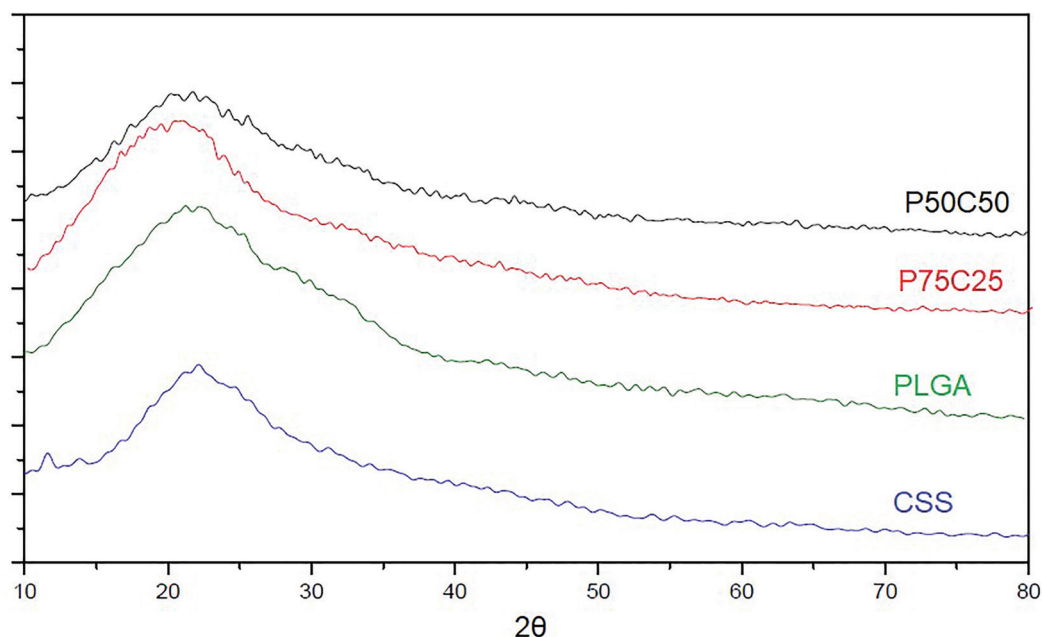


Figura 1: DRX das blendas P75C25 e P50C50 em comparação com o PLGA e o CSS.

3.1.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 2 mostra as bandas de estiramento de ligações na faixa de $2000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ referentes às matérias primas colágeno, PLGA e das blendas P50C50 e P75C25. O espectro do colágeno exibe bandas características de absorção de grupos funcionais como a amida I (apontado como número 1 no espectro, abaixo) correspondendo $1.700 - 1.760 \text{ cm}^{-1}$ e amida II (número 2) compreendendo valores entre 1.515 e 1550 cm^{-1} , como relatados na literatura [28, 7]. Como relatado por SINGH *et al.* [29], o polímero PLGA exibe vibrações moleculares intensas na região entre 1.770 e 1.750 cm^{-1} (número 4) atribuídas ao estiramento de grupos carbonila semelhante ao espectro obtido pelo presente trabalho. Em adição, observa-se também bandas aproximadamente em 1.150 cm^{-1} (número 3), correspondentes ao grupo ésteres do material [7]. Portanto, é possível confirmar que os mesmos picos foram observados nas blendas P50C50 e P75C25.

3.1.3. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica do composto foi usada para avaliar a estabilidade térmica das blendas frente a diferentes concentrações de colágeno. De acordo com CHEN *et al.* [30], os dados fornecidos pela temperatura de transição vítrea (T_g) são uma importante ferramenta usada para determinar as propriedades físicas dos polímeros. Alterações na estabilidade térmica de polímeros puros e blendas foram avaliadas e suas curvas de perda de massa em função da temperatura foram apresentadas nas Figuras 3 e 4.

A decomposição do colágeno puro (Figura 3A) compreende, inicialmente, em perda de água estrutural e grupos hidrofílicos do polímero em temperaturas entre 30 a 100 °C (A, primeiro estágio) e perda máxima de massa, aproximadamente, em 319 °C que corresponde ao segundo estágio (B) e posteriormente, carbonização do material em temperaturas acima de 400 °C (C, terceiro estágio). Enquanto que a matriz pura de PLGA (Figura 3B) apresenta uma taxa máxima de degradação em 360 °C .

Assim, a incorporação de colágeno ao PLGA para obtenção das blendas mostra um perfil de decomposição térmica em três etapas, semelhantes ao colágeno puro (Figura 3A). No entanto, observa-se (Figura 4) que à 250 °C , segundo estágio, a diferença de massa entre as blendas P75C25 e P50C50 foi de $94,5\%$ e $88,6\%$, respectivamente, em relação a massa inicial. Além disso, o pico da temperatura (derivadas da termogravimetria, Figura 4) reduz com aumento de concentração de colágeno, ou seja, a blenda P75C25 possui um pico de degradação em 335 °C congruente com o material que possui apenas PLGA (331 °C), e temperatura de pico que a blenda P50C50, esta correspondente a 280 °C . Apesar da blenda P50C50 apresentar um pico antecipado de decomposição, observa-se que à 400 °C possui maior valor de massa ($24,11\%$) em comparação com P75C25 ($8,5\%$) e se estende à 700 °C , 10% e $0,7\%$, respectivamente.

Esses dados são semelhantes com aqueles encontrados por JOSE *et al.* [31] em estudos sobre a influência diferentes concentrações de colágeno em combinação ao PLGA para obtenção de nanofibras pela técnica de

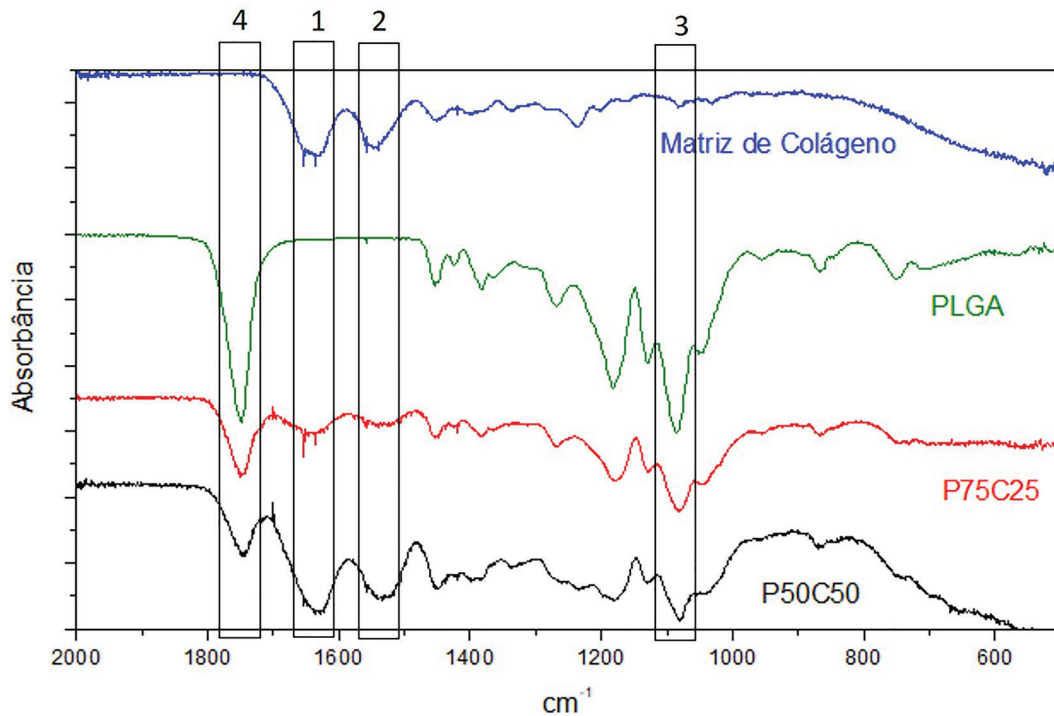


Figura 2: FTIR comparativo entre PLGA, Matriz de Colágeno, P75C25 e P50C50, para o intervalo de 2000 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹.

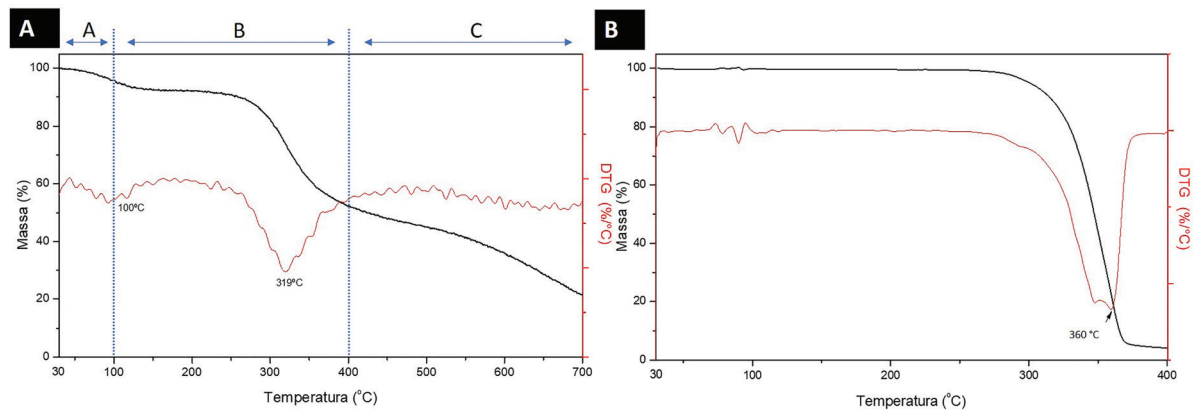


Figura 3: Análise termogravimétrica (A) da matriz de colágeno e (B) de PLGA.

eletrofição. No presente trabalho, observou-se que a blenda P7525 apresentou acentuada degradação térmica com perda máxima (~100 %) de massa acerca de 500 °C. Em comparação, P50C50 apresentou temperatura inicial de degradação similar à blenda P75C25, porém, o material careceu de maior temperatura (acima de 500 °C) para a perda máxima do material (~ 90%), sugerindo que a interação proporcional dos polímeros pode oferecer vantagens por apresentarem maior resistência e retardam a decomposição do copolímero.

3.1.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das blendas foram utilizadas para determinar o perfil da estrutura microscópica dos scaffolds.

A Figura 5 mostra as imagens capturadas do MEV. Observa-se que a blenda P50C50 (Figura 5A) apresenta uma estrutura heterogênea, onde as setas indicadas na figura mostram estruturas superficiais de fibrilas de colágeno anexadas à matriz de PLGA. Enquanto que a blenda P75C25 (Figura 5B) apresentou uma superfície com poucas rugosidades e artefatos em formato de placa, não sendo possível, portanto, diferenciar a presença dos polímeros de origem, PLGA e do colágeno.

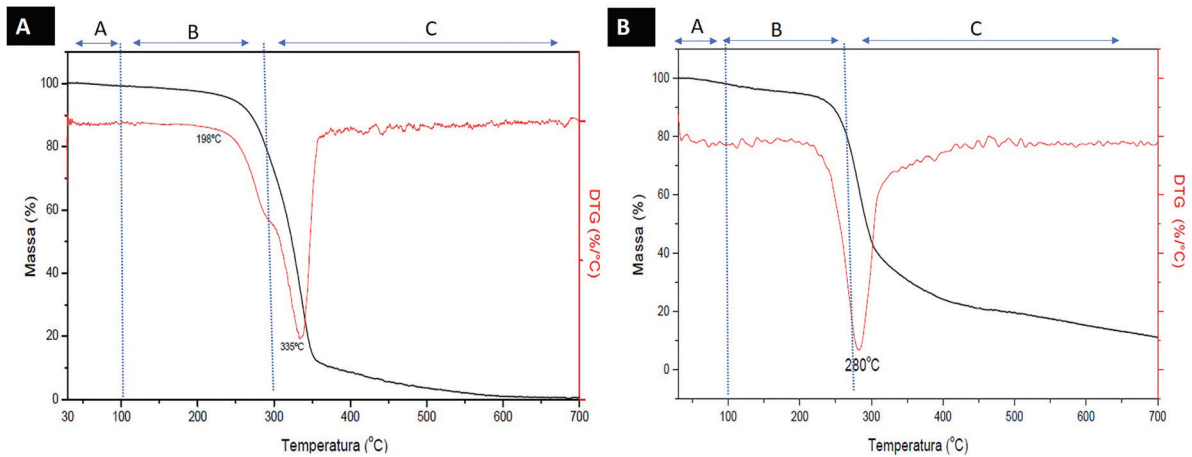


Figura 4: Análise termogravimétrica das blendas (A) P75C25 e (B) P50C50.

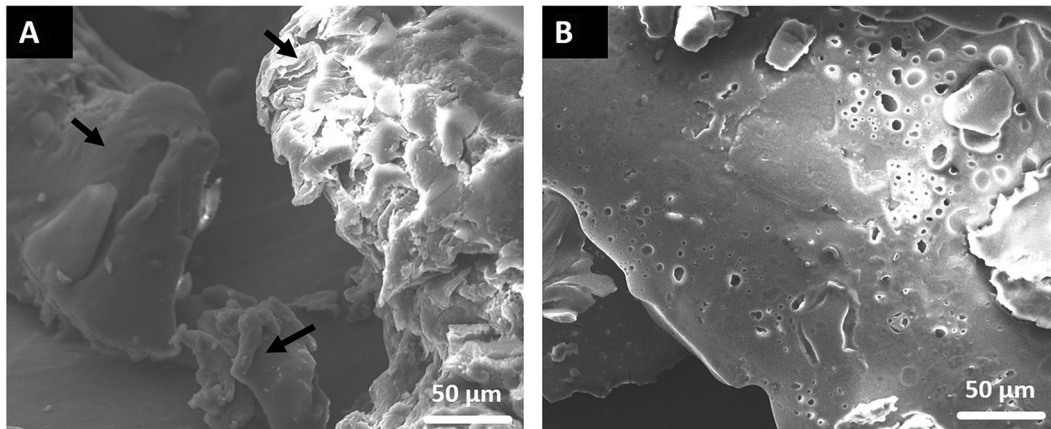


Figura 5: Micrografias das blendas (A) P50C50 e (B) P75C25.

3.1.5. Molhabilidade das blendas

Um estudo preliminar sobre a molhabilidade das blendas mostra que o aumento de colágeno reduz a hidrofili-idade, significando menor absorção de água feita pelo material. A Figura 6 apresenta qualitativamente a diferença entre o ângulo de contato formado sobre as superfícies das blendas. Observou-se que a gota séssil depositada sobre a blenda P75C25 não formou ângulo de contato, enquanto P50C50 apresentou ângulo aproximadamente 18 °. As fibrilas de colágeno que se apresentam na superfície da blenda P50C50 (Figura 5A) são formadas devido as interações hidrofóbicas entre as moléculas de colágeno e são estáveis por ligações cruzadas covalentes. Esses dados sugerem hidrofobicidade do copolímero oferecida pelo colágeno pode conferir ao material uma proteção contra a hidrólise do polímero, e assim pode atuar como componente controlador de sistemas de liberação de drogas.

3.1.6. Ensaio de degradação

A fim de delinear o comportamento da degradação das blendas em função do tempo, estas foram imergidas em tampão fosfato-salina por 14 dias. Observa-se na Figura 7 que a blenda P75C25 apresentou, nas primeiras horas, maior degradação da blenda quando comparado com P50C50 ($p > 0,05$). Esse fenômeno pode ser atribuído a elevada absorção de água e conseqüentemente maior hidrólise das ligações de estères da estrutura polimérica que foi favorecido pela maior concentração de PLGA na blenda P75C25 [32]. Em seguida, observa-se um aumento gradual da perda após 7 dias ($p < 0,05$). De acordo com SALAMA *et al.* [33], implantes oculares que visam sistema de liberação de drogas devem oferecer um efeito controlado e prolongado no tecido-alvo. Nesse sentido, os dados da blenda P50C50 mostram que o aumento da concentração de colágeno favorece uma degradação contínua e linear ao longo do tempo analisado. Tal característica do copolímero pode ser promissora para o desenvolvimento de novas terapêuticas e sua aplicação em sistema de liberação sustentada de fármacos.

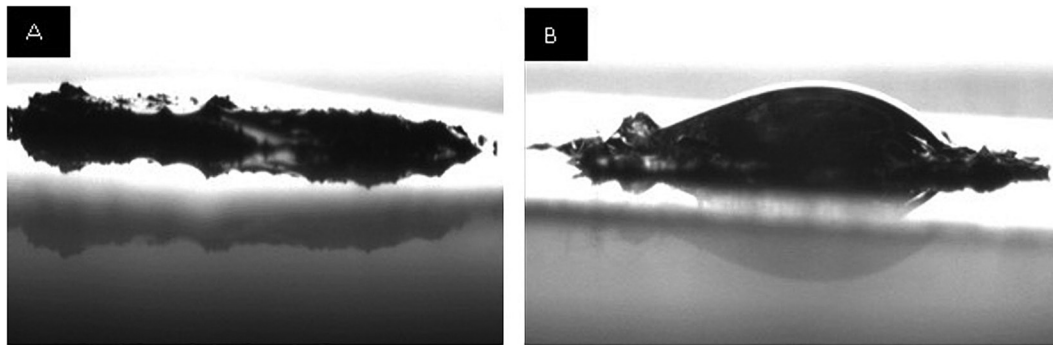


Figura 6: Ensaio de ângulo de contato das blendas: (A) P75C25 e (B) P50C50.

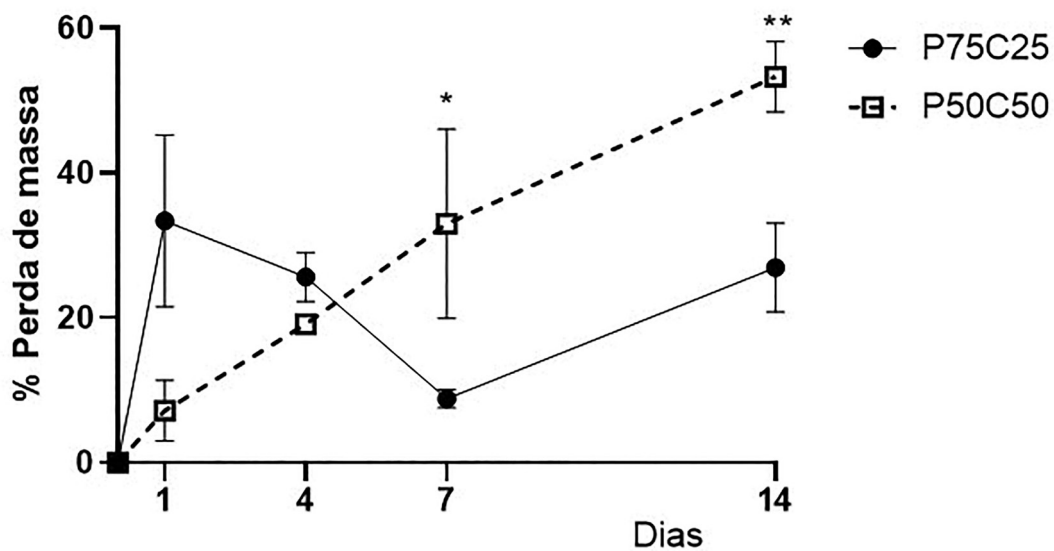


Figura 7: Perda de massa das blendas P75C25 e P50C50 analisadas em teste de degradação. $p < 0,05$.

Estudos conduzidos por WANG *et al.* [34] mostraram que a adição do colágeno ao polímero sintético (PLGA) melhora as propriedades mecânicas e modifica positivamente as características físico-químicas do material, além disso, a combinação sugere um aumento da biocompatibilidade, uma vez que aumenta a ligação celular.

3.1.7. Ensaio de hemocompatibilidade

O teste de hemólise determina o grau de lise dos eritrócitos (ou hemácias) presentes no sangue. Os dispositivos médicos implantáveis devem possuir características inócuas quando em contato com sistema sanguíneo, caso contrário, pode resultar em destruição mecânica precoce dos eritrócitos e liberação da hemoglobina. Essa hemo-proteína quando presente em tecidos apresenta característica vasoativa e efeito redox ativa e, conseqüentemente, tóxica para os tecidos vasculares, miocárdicos, renal e sistema nervoso levando a diversas condições patológicas, como anemia, icterícia, dentre outros [4]. A Tabela 1 apresenta os índices hemolíticos das blendas e controles. Segundo WEBER *et al.* [5] uma superfície polimérica é classificada como hemolítica quando apresentam índices hemolíticos acima de 2%. Em vista disso, os resultados da determinação dos índices hemolíticos mostraram que as blendas poliméricas obtiveram perfis de hemólise semelhantes aos controles negativo (PE e PBS, $p > 0,05$ seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*), ver Figura 8. Assim os copolímeros não induziram danos à membrana celular das hemáceas, assim demonstraram compatibilidade com o tecido sanguíneo.

3.1.8. Ensaio de viabilidade celular

Com intuito de investigar a resposta biológica das demais células que compõem o sistema sanguíneo, em presença das blendas, foi realizado o ensaio de citotoxicidade em linfócitos. As células linfócitos foram selecionadas para o ensaio devido a sua presença em grande quantidade em pequenas amostras de sangue, além disso,

Tabela 1: Índice de hemólise das blendas e controles em ensaio de atividades hemolítica.

MATERIAL	% HEMÓLISE
PBS	0,44 ± 0,014
PE	0,31 ± 0,04
P75C25	0,46 ± 0,21
P50C50	0,68 ± 0,11

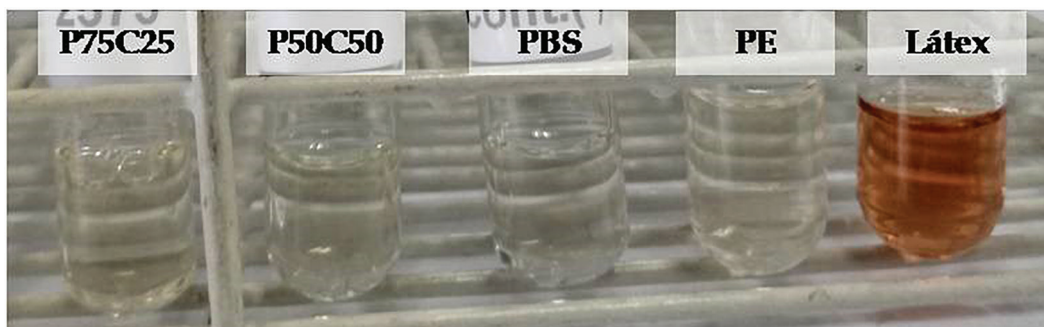


Figura 8: Imagem ilustrativa do ensaio hemolítico em tubos de ensaio. P75C25 e P50C50, blendas poliméricas; PBS, tampão fosfato; PE, polietileno.

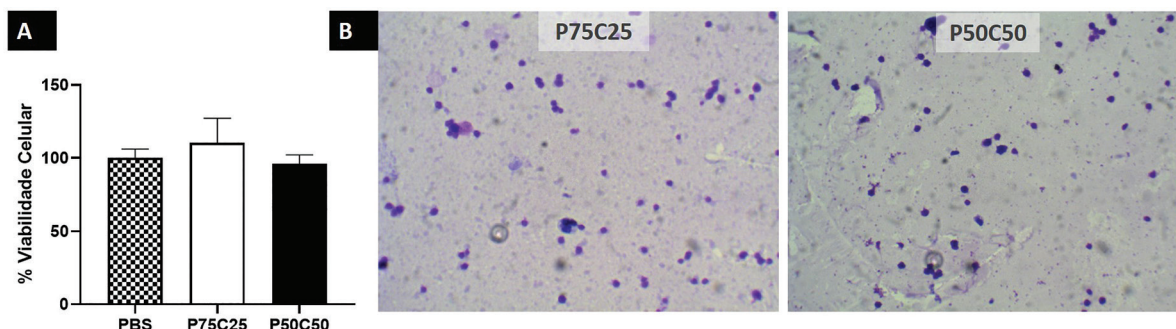


Figura 9: (A) Viabilidade celular dos linfócitos humano na presença das blendas poliméricas através do ensaio de MTT, $p > 0,05$. (B) Micrografia do esfregaço dos linfócitos humano corados pelo ensaio de Panótico rápido.

são células importantes no mecanismo de defesa do sistema imunológico. A Figura 9 mostra os resultados de citotoxicidade sobre os linfócitos obtidos pelo ensaio de MTT. Ambas as blendas poliméricas apresentaram viabilidade celular acima de 90 % ($p > 0,05$ seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*), assim as amostras copoliméricas podem ser consideradas não tóxicas de acordo com a norma ISO 10993-5 [35]. Em adição, em micrografias coletadas do esfregaço (Figura 9B) não se observa alterações microscópicas na morfologia dos linfócitos após o contato com as blendas.

3.1.9. Ensaio de espécies reagentes de oxigênio (ROS)

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) também foi avaliada em sobrenadante do cultivo celular das interações entre os linfócitos e os materiais poliméricos. Segundo IKEDA e NAGASAKI [36] a determinação da geração de EROS também contribui para avaliação da resposta biológica da interação entre as células e o material, uma vez que testes preliminares *in vitro* podem inferir uma possível reatividade do material. É possível estabelecer uma relação entre produção de EROS e mecanismos fisiopatológicos como a inflamação, envelhecimento e morte celular. No presente estudo, o controle negativo (PE, 72,55 ± 1,32 %) e as blendas P75C25 (57,91 ± 4,83 %) e P50C50 (54,53 ± 9,89 %) possuem produção basal de EROS ao contrário do controle positivo (Látex, 100 ± 4,04 %, $p < 0,05$ seguida de pós-teste *Student Newman Keuls*), ver Figura 10.

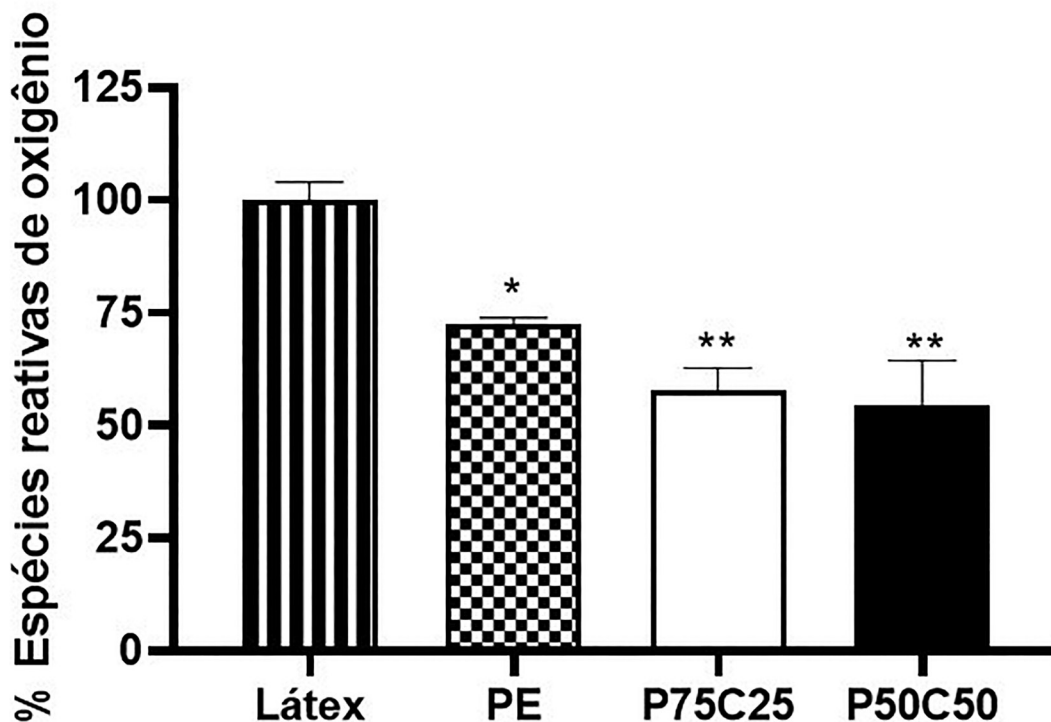


Figura 10: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em sobrenadante do cultivo de linfócitos em contato com os materiais poliméricos.

É importante considerar o sistema redoxi celular quando na presença de um biomaterial, tal parâmetro pode determinar a estabilidade do copolímero. Espécies reativas podem interagir com o material e promover uma degradação precoce resultando em prejuízos na performance dos implantes e dispositivos de liberação controlada de substâncias [37].

4. CONCLUSÕES

A obtenção das blendas de PLGA/Colágeno obtidas por fricção térmica preservou o estado amorfo, bem como, o perfil das bandas de absorção por infravermelho das matrizes. A blenda que continha maior concentração de colágeno apresentou menor hidrofobicidade, o que pode ter contribuído à uma degradação linear e constante do material. Em adição, observou-se que as amostras apresentaram, morfologicamente, superfícies diferentes. P50C50 exibiu um perfil morfológico heterogêneo com preservação das fibrilas de colágeno que potencialmente favorece o aumento de nichos e, conseqüentemente, maior aprisionamento de fármacos e substâncias. Ambas as blendas se mostraram hemocompatíveis, sem observação de citotoxicidade e de indução de produção de EROS quando em contato com linfócitos isolados. A biocompatibilidade, absorvabilidade, baixa toxicidade, interações químicas favoráveis, associadas as propriedades positivas de PLGA e colágeno, a combinação desses polímeros pode ser uma estratégia interessante para pesquisa e desenvolvimento de novos estudos aplicáveis em sistema de sustentação e liberação de fármacos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e ao CEFET-MG pelo apoio no que diz respeito a toda estrutura laboratorial e bolsas de estudo para o desenvolvimento dessa pesquisa, bem como aos professores, funcionários e alunos de Iniciação científica e estagiários do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAT) pelo auxílio prestado, durante todo o trabalho.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] NIKOLOVA, M.P., CHAVALI, M.S., “Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review”, *Bioactive Materials*, v. 4, pp. 271–292, 2019.
- [2] SONG, J., KOOK, M.S., KIM, B.H., *et al.*, “Ciprofloxacin-Releasing ROS-Sensitive Nanoparticles Composed of Poly(Ethylene Glycol)/Poly(D,L-lactide-co-glycolide) for Antibacterial Treatment”, *Materials*, v. 14, n. 15, 4125, 2021.

- [3] PANDURANGA RAO, K., “Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems”, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 7, n. 7, pp. 623–645, 1995.
- [4] JEONG, H., HWANG, J., LEE, H., *et al.*, “In vitro blood cell viability profiling of polymers used in molecular assembly”, *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, pp. 1–13, 2017.
- [5] WEBER, M., STEINLE, H., GOLOMBEK, S., *et al.*, “Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 6, 99, 2018.
- [6] FIALHO, S.L., REGO, M.G.B., CARDILLO, J.A., *et al.*, “Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular”, *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 66, n. 6, pp. 891–896, 2003.
- [7] SADEGHI-AVALSHAHR, A., NOKHASTEH, S., MOLAVI, A.M., *et al.*, “Synthesis and characterization of collagen/ PLGA biodegradable skin scaffold fibers”, *Regenerative Biomaterials*, v. 4, n. 5, pp. 309–314, 2017.
- [8] DANHIER, F., ANSORENA, E., SILVA, J.M., *et al.*, “PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications”, *Journal of Controlled Release*, v. 161, n. 2, pp. 505–522, 2012.
- [9] MAKADIA, H.K., SIEGEL, S.J., “Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier”, *Polymers*, v. 3, n. 3, pp. 1377–1397, 2011.
- [10] HINES, D.J., KAPLAN, D.L., “Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: Experimental and modeling insights”, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 30, n. 3, pp. 257–276, 2013.
- [11] GARCÍA-ESTRADA, P., GARCÍA-BON, M.A., LÓPEZ-NARANJO, E.J., *et al.*, “Polymeric implants for the treatment of intraocular eye diseases: Trends in biodegradable and non-biodegradable materials”, *Pharmaceutics*, v. 13, n. 5, 701, 2021.
- [12] GEANALIU-NICOLAE, R.E., ANDRONESCU, E., “Blended natural support materials—collagen based hydrogels used in biomedicine”, *Materials*, v. 13, n. 24, pp. 1–31, 2020.
- [13] PATEL, K., CHANDNA, S., RADHAKRISHNAN, O., *et al.*, “OLOGEN[®] implant in the management of glaucoma in an unusual case of Axenfeld-Rieger syndrome”, *Oman Journal of Ophthalmology*, v. 7, n. 2, p. 90, 2014.
- [14] SAHITHI, B., SK, A., SK, H., *et al.*, “A review on collagen based drug delivery systems”, *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, v. 1, n. 3, pp. 461–468, 2013.
- [15] ARABPOUR, Z., BARADARAN-RAFII, A., BAKHSHAIESH, N.L., *et al.*, “Design and characterization of biodegradable multi layered electrospun nanofibers for corneal tissue engineering applications”, *Journal of Biomedical Materials Research – Part A*, v. 107, n. 10, pp. 2340–2349, 2019.
- [16] DINIZ, C.M.G.P, BURITI, J.S., BARBOSA, R.C., *et al.*, “Estudo comparativo entre agentes retinulantes para possível aplicação no tratamento do ceratocone”, *Matéria (Rio J.)*, v. 24, n. 3, e12479, 2019.
- [17] PINTO, M.R.F., MARIANO, E.C., ALBERTO-RINCON, M.C, *et al.*, “Análise histológica da Blenda de PLLA/PCL como prótese de menisco”, *Matéria (Rio J.)*, v. 14, n. 4, pp. 1162–1171, 2009.
- [18] GUPTA, H., AQIL, M., KHAR, R.K., *et al.*, “Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery”, *Journal of Drug Targeting*, v. 19, n. 6, pp. 409–417, 2011.
- [19] STEWART, S.A., DOMÍNGUEZ-ROBLES, J., DONNELLY, R.F., *et al.*, “Implantable polymeric drug delivery devices: Classification, manufacture, materials, and clinical applications”, *Polymers*, v. 10, n. 12, 1379, 2018.
- [20] 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, n. 4, pp. 459–468, 2013.
- [21] YÜKSEL, N., KARABAŞ, L., ALTINTAŞ, Ö., *et al.*, “A Comparison of the Short-Term Hypotensive Effects and Side Effects of Unilateral Brimonidine and Apraclonidine in Patients with Elevated Intraocular Pressure”, *Ophthalmologica*, v. 216, n. 1, pp. 45–49, 2002.
- [22] FIALHO, S.L., CUNHA JÚNIOR, A.S., “Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações”, *Arq. Bras. Oftalmol.*, v. 70, n. 1, pp. 173–179, 2007.
- [23] TOLEDO, C.R., PEREIRA, V.V., ANDRADE, G.F., *et al.*, “PLGA-corosolic acid implants for potential application in ocular neovascularization diseases”, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 56, pp. 1–13, 2020.

- [24] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO), *ISO 23317 – Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials*, Geneva: ISO, 2007.
- [25] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM), “F813 - Practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices”, In: *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia: ASTM, 1995. pp. 233–236.
- [26] MOSMANN, T., “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays”, *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, pp. 55–63, 1983.
- [27] ARANDA, A., SEQUEDO, L., TOLOSA, L., *et al.*, “Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells”, *Toxicology in Vitro*, v. 27, n. 2, pp. 954–963, 2013.
- [28] BELBACHIR, K., NOREEN, R., GOUSPILLOU, G., *et al.*, “Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 395, n. 3, pp. 829–837, 2009.
- [29] SINGH, R., KESHARWANI, P., MEHRA, N.K., *et al.*, “Development and characterization of folate anchored Saquinavir entrapped PLGA nanoparticles for anti-tumor activity”, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 41, n. 11, pp. 1888–1901, 2015.
- [30] CHEN, G., TAO, L., LI, Y., “Predicting polymers’ glass transition temperature by a chemical language processing model”, *Polymers*, v. 13, n. 11, pp. 1–14, 2021.
- [31] JOSE, M.V., THOMAS, V., DEAN, D.R., *et al.*, “Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Collagen blends as bone tissue scaffolds”, *Polymer*, v. 50, n. 15, pp. 3778–3785, 2009.
- [32] COSSÉ, A., KÖNIG, C., LAMPRECHT, A., *et al.*, “Hot Melt Extrusion for Sustained Protein Release: Matrix Erosion and In Vitro Release of PLGA-Based Implants”, *AAPS PharmSciTech*, v. 18, n. 1, pp. 15–26, 2017.
- [33] SALAMA, H.A., GHORAB, M., MAHMOUD, A.A., *et al.*, “PLGA Nanoparticles as Subconjunctival Injection for Management of Glaucoma”, *AAPS PharmSciTech*, v. 18, n. 7, pp. 2517–2528, 2017.
- [34] WANG, J., CUI, X., ZHOU, Y., *et al.*, “Core-shell PLGA/collagen nanofibers loaded with recombinant FN/CDHs as bone tissue engineering scaffolds”, *Connective Tissue Research*, v. 55, n. 4, pp. 292–298, 2014.
- [35] INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION (ISO). *ISO 10993 - Biological evaluation for medical devices — Tests for cytotoxicity in vitro methods*. Geneva: 1992.
- [36] IKEDA, Y., NAGASAKI, Y., “Antioxidative biointerface: biocompatible materials scavenging reactive oxygen species”, *Biomedical Materials*, v. 13, n. 4, 044103, 2018.
- [37] LIU, W.F., MA, M., BRATLIE, K.M., *et al.*, “Real-time in vivo detection of biomaterial-induced reactive oxygen species”, *Biomaterials*, v. 32, n. 7, pp. 1796–1801, 2011.