

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAL A BASE DE  
COLÁGENO VISANDO REGENERAÇÃO DE TECIDOS  
CARTILAGINOSOS, NAS ÁREAS DE MEDICINA E  
ODONTOLOGIA.

Adriane Colombo Liberales Rodrigues\*

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
MESTRE PROFISSIONAL EM  
QUÍMICA, área de concentração:  
QUÍMICA TECNOLÓGICA.

**Orientador: Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira**

**\*Vínculo empregatício: DMC Importação e Exportação de Equipamentos  
LTDA**

São Carlos – SP

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Adriane Colombo Libérale Rodrigues, realizada em 19/12/2024.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira (EMBRAPA)

Profa. Dra. Renata Lang Sala (UFSCar)

Prof. Dr. Caio Gomide Otoni (UNICAMP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*“Todas as religiões, artes e ciências são ramos da mesma árvore. Todas essas aspirações se dirigem a enobrecer a vida do homem, levantando-a da esfera da mera existência física e conduzindo o indivíduo à liberdade”.*

*(Albert Einstein)*

Dedico ao meu marido **Gerson**, por ser meu companheiro de vida, pelo apoio, cumplicidade e por todos os nossos momentos vividos; à minha filha, **Ana Sofia**, por ser tão carinhosa, inteligente, falante e compreensível. É o milagre da minha vida.

Dedico também aos meus pais **Antônio e Alzira**, que se dedicaram à formação do meu caráter e que não mediram esforços para me proporcionar condições de estudar e crescer; e ao meu irmão **Alexandre**, pelas alegrias, experiências trocadas e por desejarmos sempre o bem um ao outro.

## **Agradecimentos**

A Deus, que é a minha força, minha motivação para acordar todos os dias e acreditar que grandes coisas acontecem para quem não desiste.

Ao meu marido Gerson e minha filha Ana Sofia por me proporcionarem segurança, amor, força e alegria todos os dias; aos meus pais Antônio e Alzira a quem honro por tudo o que sou hoje; ao meu irmão Alexandre, pela vivência, amizade e pelo bem que desejamos um ao outro; aos meus sogros Gerson e Dirlene, que são como pais para mim, sempre presentes em minha vida; às amigas Renata e Ariele, que embora distantes fisicamente, aquecem meu coração com as conversas diárias, compartilhando as experiências, trazendo alegrias e encorajamento. Com certeza, melhoram o meu dia.

Ao Dr. Marcos Aurélio Napolitano, pela parceria diária no trabalho, por ser um exemplo de otimismo e resiliência, sempre me encorajando e incentivando nos momentos difíceis, pelas vivências compartilhadas, por contribuir diretamente na realização deste projeto agregando conhecimento teórico e prático, e pela grande amizade construída.

Ao Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira, pela orientação, dedicação, motivação, atenção e pela amizade, sempre pronto para atender às necessidades que surgiram para a realização deste trabalho.

Aos membros das bancas desde a apresentação do projeto até a defesa, Prof.<sup>o</sup> Dr. Caio Gomide Otoni, Prof.<sup>o</sup> Dr. Caio Paranhos, Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Cruz, Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata Lang Sala, pela disponibilidade e grande contribuição com sugestões e ideias.

Ao Sr. Renaldo Massini Jr. e Sr. Renaldo Massini, pela confiança, por todas as oportunidades oferecidas e por fornecerem todos os recursos para a realização deste trabalho.

À DMC, pela infraestrutura fornecida, pelo incentivo para a realização deste trabalho e a todos os meus colegas que sempre motivaram e ajudaram em cada etapa.

Às colaboradoras da DMC, Karen Jampani e Izabel Dutra, pela ajuda e esforço com as preparações e análises das amostras, pelo companheirismo, por acrescentar ideias e pela amizade.

À Dra. Luciana Almeida Lopes por fornecer a estrutura do Laboratório de Cultura Celular do Instituto Nupen e por ter sido.

Ao PPGPQ e à UFSCar, pelo curso e infraestrutura ofertados, bem como a todos os funcionários pela colaboração e ajuda.

Ao CNPDIA/EMBRAPA, pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho, e aos técnicos Adriana Thomazi, Silviane Hubinger, Alice Raabe, Viviane Soares e Paulo Lasso pela disponibilidade e esforço em ajudar em cada análise.

À UNIMEP e todos os professores que fizeram parte da minha formação em química.

**Lista de Tabelas**

TABELA 4.1: Resultados obtidos dos ensaios de compressão normal e diametral de todas as amostras de misturas de colágeno e gelatina ...	44
TABELA 4.2: Resultados obtidos dos ensaios de compressão normal e diametral de todas as amostras de blendas .....	46
TABELA 4.3: Resultados do ensaio de intumescimento de todas as amostras .....	48
TABELA 4.4: Resultados dos ensaios de citotoxicidade realizados em 7 amostras .....	49
TABELA 4.5: Projeção de custos calculadas para a amostra 3 e a amostra 11.....	50

## Lista de Figuras

FIGURA 1.1: Possível Esquema de reticulação dos grupos amino do Colágeno e Gelatina e do grupo OH do PLGA com o Glutaraldeído. Adaptada de Han, W. H. <i>et al</i> (47) .....	10
FIGURA 3.1: Separação por grupo de amostras das misturas de Colágeno e Gelatina, sem reticulação e com reticulação, partindo das matérias-primas utilizadas .....	13
FIGURA 3.2: Separação por grupo de amostras das blends de PLGA/colágeno e PLGA/colágeno e gelatina, sem reticulação e com reticulação.....	13
FIGURA 3.3: (a) Amostra Colágeno 100%, (b) Amostra Colágeno 100% com 0,5% de Glutaraldeído, (c) Amostra Colágeno 100% com 1% de Glutaraldeído .....	14
FIGURA 3.4: (a) Amostra Gelatina 100% + 0,5% de glutaraldeído, (b) Gelatina 100% + 1% de glutaraldeído.....	15
FIGURA 3.5: Sequência de montagem no suporte para envase. (A) Suporte metálico; (B) Disposição das formas metálicas envasadas no suporte metálico; (C) Encaixar da manta de silicone sobre o suporte das formas metálicas e (D) Inserção da placa metálica por cima da manta de silicone .....	17
FIGURA 3.6: Sequência de fechamento das porcas borboletas para a etapa de congelamento. (A) Suporte com as porcas posicionadas; (B) Torquímetro regulado e (C) Fechamento das porcas .....	17
FIGURA 3.7: Amostras acondicionadas e identificadas nos microcubos para caracterização físico-química .....	19
FIGURA 3.8: a) Forma de silicone hexagonal usada para conformação dos corpos de prova, b) amostra de mistura de colágeno e gelatina, c) e d) medida da amostra .....	22
FIGURA 4.1: Difração de Raios x do grupo Colágeno 100% e Gelatina 100%, com e sem glutaraldeído, com a legenda .....	25

FIGURA 4.2: Difração de Raios X do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda .....	26
FIGURA 4.3: Difração de Raios X do grupo das blendas, com e sem glutaraldeído, com a legenda .....	27
FIGURA 4.4: Curvas de DSC do grupo do grupo Colágeno 100% e Gelatina 100%, com e sem glutaraldeído, com legenda .....	29
Figura 4.5: Curvas de DSC do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda .....	32
FIGURA 4.6: Curvas de DSC do grupo das blendas, com e sem glutaraldeído, com legenda .....	32
FIGURA 4.7: Curvas de TGA/DTG do grupo do grupo Colágeno 100% e Gelatina 100%, com e sem glutaraldeído, com legenda .....	33
FIGURA 4.8: Curvas de TGA/DTG do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda .....	34
FIGURA 4.9: Curvas de TGA/DTG do grupo das blendas, com e sem glutaraldeído, com legenda .....	35
FIGURA 4.10: FTIR do grupo do grupo Colágeno 100% e Gelatina 100%, com e sem glutaraldeído, com legenda .....	36
FIGURA 4.11: FTIR do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda .....	37
FIGURA 4.12: FTIR do grupo das blendas, com e sem glutaraldeído, com legenda .....	39
FIGURA 4.13: MEV das matérias-primas e o grupo Colágeno 100%, com legenda .....	40
FIGURA 4.14: MEV do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda .....	41
FIGURA 4.15: MEV do grupo das Blendas, com legenda.....	41

FIGURA 4.16: EDS das matérias-primas e o grupo Colágeno 100%, com legenda .....	42
FIGURA 4.17: EDS do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda .....	42
FIGURA 4.18: EDS do grupo das Blendas, com legenda.....	43
FIGURA 4.19: Ensaio de compressão normal no momento da ruptura da amostra 1 .....	45
FIGURA 4.20: (a) Produto Bio-Gide, da empresa Geistich. (b) Produto Lumina Coat, da empresa Critéria.....	51

**Resumo:**

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAL A BASE DE COLÁGENO VISANDO REGENERAÇÃO DE TECIDOS CARTILAGINOSOS, NAS ÁREAS DE MEDICINA E ODONTOLOGIA. O tratamento de lesões de origem cartilaginosa é um desafio para os cirurgiões médicos e odontológicos, devido ao baixo potencial de cura da cartilagem humana e ao grau de desconforto que essas lesões causam. A intervenção cirúrgica ainda tem sido amplamente usada na tentativa de preencher os defeitos cartilagosos. Assim, existe um grande interesse pelo desenvolvimento de biomateriais bioabsorvíveis que possam ser usados para tratamento e reparo destas lesões. Os colágenos tipo I e II são utilizados na engenharia de tecidos como scaffolds para o tratamento de lesões de cartilagens, devido a sua biocompatibilidade e ampla aprovação clínica. Neste trabalho foram desenvolvidas formulações de blendas potencialmente biocompatíveis com incremento da resistência mecânica, a partir de Colágeno Porcino tipo 1, a Gelatina Porcina e o PLGA, para suporte ao desenvolvimento de um produto destinado à regeneração de tecidos cartilagosos; e, foi feita a análise de custos para a comercialização do produto. Foram preparadas 18 amostras, em diferentes proporções, com e sem reticulação com glutaraldeído. As amostras foram caracterizadas físico-química e mecanicamente. Os resultados indicaram que a mistura Gelatina Porcina e Colágeno é mais promissora que o uso colágeno puro. A blenda com PLGA aumenta em mais de 10 vezes a resistência mecânica dos materiais mantendo deformações da mesma ordem ou inferiores. Os difratogramas de raios x mostraram que as amostras possuem características amorfas. Os espectros de FTIR indicaram a presença das bandas dos grupos funcionais característicos para o PLGA, colágeno e gelatina e não se observou picos referentes a contaminação. No ensaio de citotoxicidade *in vitro*, as amostras não apresentaram toxicidade. O custo do PLGA, apesar de ser o maior de todas as matérias-primas, não é determinante para o valor final do produto. As formulações Amostra 3: Colágeno 50% + Gelatina 50%, e, a Amostra 11: Blenda 5: PLGA 40% + (Colágeno 75% + Gelatina 25%) 60% mostraram-se mais factíveis no ponto de vista fabril, sem dificuldades de elaboração e conformação e apresentaram bons resultados de compressão.

## **Abstract**

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN-BASED BIOMATERIAL FOR THE REGENERATION OF CARTILAGE TISSUE, IN THE AREAS OF MEDICINE AND DENTISTRY. The treatment of injuries of cartilaginous origin is a challenge for medical and dental surgeons, due to the low healing potential of human cartilage and the degree of discomfort that these injuries cause. Surgical intervention has still been widely used in attempts to fill cartilaginous defects. Thus, there is great interest in the development of bioabsorbable biomaterials that can be used to treat and repair these injuries. Type I and II collagens are used in tissue engineering as scaffolds for the treatment of cartilage injuries, due to their biocompatibility and broad clinical approval. In this work, potentially biocompatible blend formulations with increased mechanical resistance were developed, using Type 1 Porcine Collagen, Porcine Gelatin and PLGA 82/18, to support the development of a product intended for the regeneration of cartilaginous tissues; and a cost analysis was carried out for marketing the product. 18 samples were prepared, in different proportions, with and without cross-linking with glutaraldehyde. The samples were characterized physicochemically and mechanically. The results indicated that the Porcine Gelatin and Collagen mixture is more promising than using pure collagen. The blend with PLGA increases the mechanical resistance of materials by more than 10 times while maintaining deformations of the same order or lower. The x-ray diffractograms showed that the samples have amorphous characteristics. The FTIR spectra indicated the presence of bands of functional groups characteristic of PLGA, collagen and gelatin and no peaks related to contamination were observed. In the *in vitro* cytotoxicity test, the samples showed no toxicity. The cost of PLGA, despite being the highest of all raw materials, is not decisive for the final value of the product. The formulations Collagen 50% + Gelatin 50%, and Blend 5: PLGA 40% + (Collagen 75% + Gelatin 25%) 60% proved to be more feasible from a manufacturing point of view, without difficulties in elaboration and conformation and presented good compression results.

## Sumário

1 - Introdução.....	1
1.1 - Tecido Cartilaginoso: Funções e necessidade de regeneração.....	1
1.2 - Biomateriais.....	2
1.3 - Blendas Poliméricas.....	3
1.3.1 - Colágeno.....	5
1.3.2 - Gelatina.....	6
1.3.3 - PLGA.....	7
1.3.4 - Glutaraldeído.....	9
1.4 - Este trabalho .....	10
2 - Objetivos.....	10
3 - Metodologia.....	11
3.1 - Matérias-primas utilizadas.....	11
3.2 - Preparo das misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído.....	12
3.2.1 - Preparo da solução Tampão Fosfato (pH 7,2) .....	15
3.2.2 - Modo de Preparo das formulações das misturas.....	15
3.2.3 - Processo de liofilização.....	16
3.3 - Preparo das blendas.....	17
3.3.1 - Modo de preparo das formulações das blendas.....	18
3.4 - Caracterização físico-química.....	19
3.4.1 - Difração de raios X (DRX).....	19
3.4.2 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	20
3.4.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	20

3.4.4 - Análises térmicas (TGA com DTG; DSC).....	20
3.4.5 - Ensaio de resistência mecânica.....	21
3.4.5.1 - Preparo dos corpos de prova.....	22
3.4.6 – Índice de Intumescimento (Ii%) .....	22
3.4.7 – Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	23
3.4.8 – Análise preliminar de custos de produção.....	23
4 – Resultados e discussão.....	24
4.1 – Difração de raios X.....	24
4.2 – DSC: Caloria Diferencial de Varredura.....	28
4.3 – Análise Termogravimétrica (TGA) com DTG.....	33
4.4 – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR).....	35
4.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	40
4.6 – Ensaio Mecânicos: Resistência a Compressão Normal e Diametral.....	43
4.7 – Índice de Intumescimento (I%) .....	47
4.8 – Ensaio de Citotoxicidade .....	48
4.9 – Projeção Preliminar de Custos de produção.....	49
5 – Conclusões.....	51
6 – Referências.....	54

## 1 - Introdução:

### 1.1 - Tecido Cartilaginoso: Funções e necessidade de regeneração

Lesões na cartilagem articular são um problema clínico significativo, pois sua capacidade de regeneração espontânea é limitada. A cartilagem, composta por condrócitos e uma matriz extracelular altamente especializada, desempenha um papel crucial na lubrificação e amortecimento das articulações (1). Algumas funções da cartilagem incluem sustentação, formação e crescimento dos ossos longos, formação de estruturas como o nariz e orelhas e produzem os componentes da matriz extracelular. Algumas das lesões da cartilagem incluem artrite degenerativa, osteomalácia e costocondrite, que podem ocorrer principalmente devido ao envelhecimento, obesidade ou trauma. Dependendo do avanço da doença, podem ocorrer problemas adicionais como dor intensa e incapacidade física (2). A ausência de vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos na cartilagem dificulta sua reparação e contribui para o desenvolvimento de doenças degenerativas (3, 4, 5). Em caso de lesões graves, é necessária a substituição do tecido e a intervenção cirúrgica, amplamente usada na tentativa de preencher os defeitos cartilaginosos.

Neste sentido, pesquisadores da engenharia de tecidos têm investigado novos biomateriais para o tratamento das lesões condrais. Um estudo mostrou que *scaffolds* preparados a base de colágeno de pés de pato e PLGA (Poliácido láctico-co-glicólico) tiveram um efeito positivo para a regeneração de cartilagem (6). O PLGA é um polímero sintético com alta biocompatibilidade e biodegradabilidade e é utilizado em sistemas de liberação controlada de drogas e como *scaffolds* (7, 8). O colágeno é o principal componente responsável pela estrutura da cartilagem, tem excelente afinidade celular, é biocompatível e tem menor reação de rejeição (9, 10).

Isto posto, a necessidade de estudo e desenvolvimento de biomateriais que possam atuar como enxertos, implantes, e até promover a regeneração cartilaginosa é imprescindível, dadas as implicações que estas lesões ocasionam, como por exemplo, dor intensa e incapacidade física.

## 1.2 - Biomateriais

Biomateriais são materiais de origem natural ou sintética, projetados para interagir com sistemas biológicos, com o objetivo de diagnosticar, tratar ou restaurar funções biológicas. Esses materiais podem ser sólidos, líquidos ou semissólidos, e são frequentemente utilizados em dispositivos médicos como implantes, próteses e sistemas de liberação controlada de fármacos. A biocompatibilidade, ou seja, a capacidade de um material induzir uma resposta biológica apropriada e previsível, é um fator crucial na seleção e design de biomateriais. Exemplos incluem polímeros biodegradáveis, cerâmicas bioativas e tecidos biológicos de animais (11).

A história dos biomateriais se confunde com a história da medicina. Desde as primeiras civilizações, a humanidade utilizava substâncias naturais, como plantas e animais, para tratar ferimentos e confeccionar próteses. Um exemplo marcante é a sutura de ferimentos, praticada no antigo Egito há cerca de 3.500 anos, utilizando fios de linho e até mesmo ouro. Essa prática ancestral demonstra a busca constante da humanidade por materiais biocompatíveis para interagir com o corpo humano, um tema central na medicina moderna (12). A implantodontia possui raízes profundas na história. Descobertas arqueológicas da civilização Maia, que remontam a 600 a.C., revelam o uso inovador de implantes dentários confeccionados com nácar, uma substância biocompatível extraída de conchas. Essa prática, juntamente com o emprego de metais preciosos como ouro e ferro por outras civilizações, e a utilização de madeira na Idade Média para substituição óssea com sucesso, revela a busca incessante da humanidade por soluções para a reposição de dentes e ossos perdidos. (13).

A história da regeneração óssea cita como os primeiros biomateriais o titânio, aço inoxidável (entre os metais), polimetilmetacrilato e politetrafluoretileno (entre os polímeros) e alumina e zircônia (entre as cerâmicas). Estes eram classificados como bioinertes e comumente utilizados, uma vez que apresentavam baixa reatividade biológica (14).

Quando comparados com biomateriais cerâmicos ou metálicos, os biomateriais poliméricos são mais interessantes devido a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios, dentre outros), ao processamento

secundário, custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físico-químicas desejadas para aplicações específicas (15). Eles estão dentre os biomateriais mais utilizados na área médica (16). Dentre eles, destacam-se polímeros biodegradáveis naturais, como colágeno, alginato, fibrina, quitosana, ácido hialurônico; e polímeros biodegradáveis sintéticos, como poli (ácido D,L-lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímero poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL) (14).

A formulação de blendas poliméricas permite a criação de materiais com propriedades personalizadas, combinando as características de diferentes polímeros para atender a requisitos específicos de diversas aplicações. (17).

Para selecionar um material polimérico, é importante considerar alguns critérios, pois cada polímero apresenta propriedades específicas que irão direcioná-lo para um determinado tipo de aplicação (18). Neste sentido, as formas que as cadeias podem assumir, a disposição das unidades monoméricas, a presença ou não de grupos funcionais, a rigidez estrutural, a polaridade da cadeia e a massa molar do polímero resultam em subclasses de compostos que podem apresentar comportamentos distintos e com potencial de aplicação visando diferentes finalidades (16).

### **1.3 - Blendas Poliméricas**

Blendas poliméricas são materiais compostos por uma mistura física de dois ou mais polímeros, permitindo a obtenção de propriedades personalizadas através da combinação das características de cada componente (19). A busca pelo desenvolvimento de blendas é bastante atraente devido às melhorias das propriedades físicas, físico-químicas e de processamento destes materiais, comparadas às propriedades dos polímeros puros (20). Em resumo, as blendas podem melhorar e controlar as propriedades mecânicas e biológicas através da interação entre as suas estruturas químicas. Além das propriedades aprimoradas, a formulação de blendas poliméricas oferece a vantagem de ser mais econômica, uma vez que evita o alto custo do desenvolvimento de novos polímeros (21).

A miscibilidade é essencial na criação das blendas e influenciará diretamente as suas propriedades e o seu desempenho. A força das interações entre as moléculas dos polímeros, como por exemplo, as ligações de hidrogênio, determina se a blenda será uniforme (miscível) ou se separará em diferentes fases (imiscível ou parcialmente miscível). As blendas miscíveis, onde os polímeros se misturam completamente, são menos comuns e apresentam propriedades únicas (22).

A blenda miscível segue a relação de energia livre de Gibbs, conforme equação:

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T \cdot \Delta S_m < 0$$

Equação 1

que é aplicável sob condições isotérmicas e isobáricas.  $\Delta G_m$ ,  $\Delta H_m$  e  $\Delta S_m$  correspondem, respectivamente, à variação da energia de Gibbs, entalpia e entropia da mistura (m). Uma energia de Gibbs negativa é indicativo de blenda miscível (23).

Uma evidência de miscibilidade das blendas, é a propriedade de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Em blendas miscíveis, observa-se uma única  $T_g$ , indicando a formação de uma fase homogênea. Por outro lado, em blendas parcialmente miscíveis, a presença de duas  $T_g$ s intermediárias evidencia a coexistência de fases distintas, com diferentes graus de mobilidade molecular. Já em blendas imiscíveis, as  $T_g$ s dos polímeros puros são mantidas, indicando a completa separação de fases. Essa relação entre a  $T_g$  e a miscibilidade conferem um papel fundamental nas propriedades finais da blenda (24).

A maioria das blendas poliméricas é imiscível. Neste caso, as propriedades e morfologia são fortemente influenciadas pela uniformidade da dispersão de fases. As misturas podem apresentar caráter dispersivo ou distributivo (25). As técnicas de processamento influenciam diretamente na forma como as fases se distribuem no interior da blenda e conferem a complexidade no controle de processo (25, 26).

Diante da complexidade do processo das blendas poliméricas imiscíveis, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar suas propriedades. Uma abordagem eficaz é o emprego de agentes compatibilizantes, capazes de promover a

interação entre as fases imiscíveis, reduzindo a tensão interfacial e aumentando a adesão entre os polímeros. Esses agentes podem ser incorporados através de processos reativos, como a extrusão reativa, ou pelo acréscimo de copolímeros de bloco, que possuem segmentos com afinidade por cada um dos polímeros da blenda. A compatibilização resulta em uma melhoria significativa das propriedades mecânicas, térmicas e de barreira das blendas, além de promover uma morfologia mais controlada (27).

Estudos mostram que blendas poliméricas em formas de membranas e hidrogéis, a base de colágeno e quitosana podem ser utilizadas como biomateriais em variadas aplicações, como veículo de liberação de drogas, bandagens, géis injetáveis, membranas periodontais, entre outras (28).

Diante do exposto, o desenvolvimento de novas composições de blendas representa uma atividade promissora para obtenção de biomateriais para diversas aplicações médicas. Entre os candidatos de interesse, o colágeno e gelatina, por sua origem biológica, e o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), vêm sendo intensivamente estudados para aplicações finalísticas.

### **1.3.1 - Colágeno**

O colágeno, uma proteína fibrosa abundante em tecidos conjuntivos, desempenha um papel fundamental na estrutura e função de diversos órgãos e sistemas do corpo humano. A biocompatibilidade e biodegradabilidade do colágeno, aliadas à sua capacidade de interagir com células e biomoléculas, o tornam um biomaterial promissor para diversas aplicações biomédicas, como engenharia de tecidos, cicatrização de feridas e liberação controlada de fármacos (29). O colágeno tem sido alvo de crescente interesse em pesquisas visando o aproveitamento de subprodutos da indústria de processamento de alimentos, como ossos, pele, escamas e carcaças de peixes e animais terrestres. A exploração desse recurso natural abundante busca otimizar a utilização de matérias-primas e desenvolver novos materiais com propriedades biocompatíveis e biodegradáveis (30, 31).

A diversidade de isoformas que o colágeno apresenta, cada qual adaptada às especificidades funcionais do tecido onde se encontra, confere a sua

complexidade estrutural. Entretanto, a organização molecular do colágeno se inicia no tropocolágeno, uma tripla hélice formada por três cadeias polipeptídicas entrelaçadas. Essa estrutura única, rica em glicina, prolina e hidroxiprolina, confere ao colágeno suas propriedades mecânicas excepcionais, como resistência e flexibilidade, essenciais para diversas funções biológicas. (32, 33).

As propriedades intrínsecas do colágeno podem ser otimizadas por meio de processos de reticulação ou pela combinação com outros polímeros em formulações de blendas. Essa estratégia permite a obtenção de biomateriais com características personalizadas, adequados para o desenvolvimento de implantes, curativos e regeneradores teciduais (34, 35).

### **1.3.2 - Gelatina**

A gelatina, um biopolímero obtido pela hidrólise parcial do colágeno, tem se destacado como um biomaterial de grande interesse devido às suas propriedades únicas. Sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de formar géis tridimensionais a tornam um material promissor para diversas aplicações biomédicas e farmacêuticas. A gelatina é comumente extraída de fontes animais como pele de porco (46%), couro bovino (29%) e ossos de bovinos e suínos (23%), sendo a pele de porco a fonte mais utilizada (36,37). A natureza hidrofílica da gelatina, com teor de umidade variando entre 8% e 13% e densidade relativa entre 1,3 e 1,4 g/mL, confere ao material propriedades de formação de gel que são fundamentais para suas aplicações (36).

A gelatina, em solução aquosa, demonstra caráter anfótero, atuando como ácido ou base em função do pH do meio. Essa propriedade é atribuída à presença de aminoácidos ionizáveis em sua estrutura. A gelatina bovina, em particular, apresenta um perfil de aminoácidos caracterizado por uma alta proporção de resíduos apolares (glicina, alanina, prolina, valina e leucina), conferindo-lhe características hidrofóbicas. Concomitantemente, a presença de aminoácidos carregados positivamente (lisina, arginina, histidina) e negativamente (aspartato e glutamato) permite sua ionização em diferentes condições de pH. É importante destacar a ausência de triptofano e a deficiência em isoleucina, treonina, metionina e aminoácidos sulfurados (cisteína e cistina) na composição da gelatina bovina, o que

influencia suas propriedades físico-químicas e aplicações. (38). A composição de aminoácidos da gelatina é altamente influenciada pela natureza da matéria-prima e pelas condições do processo de extração. O pré-tratamento alcalino, por exemplo, modifica a glutamina para ácido glutâmico e a asparagina para ácido aspártico. Conseqüentemente, a gelatina tipo B, obtida por meio de um pré-tratamento alcalino, apresenta um conteúdo significativamente maior desses aminoácidos em comparação à gelatina tipo A (37,38).

A associação de gelatina e colágeno em formulações de biomateriais tem demonstrado um grande potencial para a engenharia de tecidos. Essa combinação sinérgica confere aos biomateriais resultantes propriedades únicas, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de promover a adesão e proliferação celular, tornando-os candidatos promissores para diversas aplicações regenerativas.

### 1.3.3 - PLGA

O poli(ácido lático-co-ácido glicólico), usualmente PLGA, é um copolímero sintético proveniente dos polímeros Poli(ácido D,L-lático) (PLA) e do Poli(ácido glicólico) (PGA). Utilizou-se o PLGA 82/18, onde 82/18 é a razão molar lactídeo/glicolídeo (porcentagem em massa dos dois monômeros constituintes). A fórmula molecular é  $[(C_6H_8O_4)_x(C_4H_4O_4)_y]_n$ . Devido à sua biodegradabilidade controlável, biocompatibilidade e propriedades mecânicas ajustáveis, tem sido amplamente empregado na área biomédica. Sua aprovação pela *US Food and Drug Administration* o posiciona como um polímero de referência em diversas aplicações, como em suturas, sistema de liberação de fármacos, dispositivos de fixação ortopédica e como substituto ósseo. Todavia, o fato de não induzir a formação de apatitas em fluido corporal simulado e ter baixa osteocondutividade, restringem seu uso em aplicações que requerem interação ativa com o tecido ósseo. Para superar essa limitação, o PLGA é mais utilizado combinado com outros materiais bioativos, como cerâmicas e biovidros, objetivando acelerar a regeneração tecidual (39, 40).

Ao contrário dos polímeros naturais, os polímeros sintéticos não oferecem risco de transmissão de patógenos de origem animal e imunogenicidade. Apresentam também vantagens nas propriedades físicas e de degradação

controladas, bem como propriedades físicas e mecânicas reproduzíveis e produtos de degradação atóxicos (41, 39).

As propriedades físico-químicas e mecânicas do PLGA são fortemente influenciadas por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. A massa molar, a razão molar lactídeo/glicolídeo, o grau de cristalinidade e a pureza do polímero são características intrínsecas que determinam propriedades como temperatura de transição vítrea, módulo elástico e taxa de degradação. Adicionalmente, o processamento, que inclui as condições de moldagem e a morfologia da peça (tamanho, forma e porosidade), exerce um papel crucial na definição das propriedades finais do material.

A hidrofobicidade do PLGA é diretamente relacionada à proporção de ácido láctico e ácido glicólico na cadeia polimérica. A presença do grupo metil no ácido láctico confere maior caráter hidrofóbico ao polímero em comparação ao ácido glicólico. Conseqüentemente, copolímeros ricos em ácido láctico apresentam menor hidrofobicidade e taxas de degradação mais lentas. A solubilidade do PLGA em solventes orgânicos é também influenciada pela composição monomérica. Copolímeros com menor teor de ácido glicólico são mais solúveis em solventes clorados, como clorofórmio e diclorometano, além de outros solventes orgânicos como tetrahidrofurano, acetona, etil acetato e dioxano (42). Uma das grandes vantagens do uso do PLGA como biomaterial é o potencial de conformação, mesmo em baixas temperaturas, e suas boas propriedades mecânicas (39).

A degradação deste copolímero *in vivo* ocorre por uma reação de desesterificação, formando os ácidos láctico e glicólico, que são absorvidos durante o metabolismo do corpo. O ácido láctico forma lactato, que naturalmente é intermediário ou produto do metabolismo de carboidrato, é eliminado pelo ciclo do ácido tricarbóxico. O ácido glicólico forma glicolato e é convertido a metabólitos eliminados naturalmente (43, 42).

Diversos estudos têm investigado as propriedades e aplicações de blendas de PLGA e colágeno. Um estudo avaliou a influência da adição de colágeno em blendas de PLGA para aplicações oftálmicas. Esse estudo mostrou que a biocompatibilidade, absorvibilidade, 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 (44).

### 1.3.4 - Glutaraldeído

O glutaraldeído é um agente de reticulação amplamente utilizado em estudos de formação de blendas e compósitos, com o objetivo de melhorar a compatibilidade entre as diferentes fases desses materiais. Essa estratégia, em geral, resulta em um aumento significativo da resistência mecânica. O glutaraldeído é um dialdeído alifático de fórmula molecular  $C_5H_8O_2$  e estrutura  $CHO-(CH_2)_3-CHO$ , é apreciado por sua versatilidade e pela baixa toxicidade após reação. Sob condições normais, apresenta-se como um líquido oleoso incolor ou cristais, com baixa viscosidade e boa solubilidade em água e diversos solventes orgânicos. Devido à sua alta reatividade, o glutaraldeído é suscetível à polimerização em presença de água ou sob aquecimento, além de sofrer oxidação quando exposto ao ar. No entanto, é estável sob a ação da luz (45).

O glutaraldeído é muito reativo com diversos grupos funcionais, destacando-se sua forte interação com grupos amino ( $NH_2$ ). Interage também com os grupos hidroxila ( $OH$ ). Essa reatividade se deve à presença de dois grupos aldeído em sua estrutura, capazes de formar ligações cruzadas com os grupos amino livres de compostos, originando bases de Schiff ( $C=N$ ) ou  $\alpha$ -hidroxiaminas ( $HO-C-NH_2$ ). Além disso, o glutaraldeído interage em menor extensão, com grupos tiol (46). Ao interagir com proteínas em solução aquosa, o glutaraldeído promove a formação de duplas ligações etilênicas conjugadas, resultando em ligações cruzadas (47, 48). Este fato ganha apoio pela estabilidade desta interação, que é irreversível e resistente a variações de pH e temperatura, o que normalmente não é observado para interações que envolvem uma base de Schiff (48).

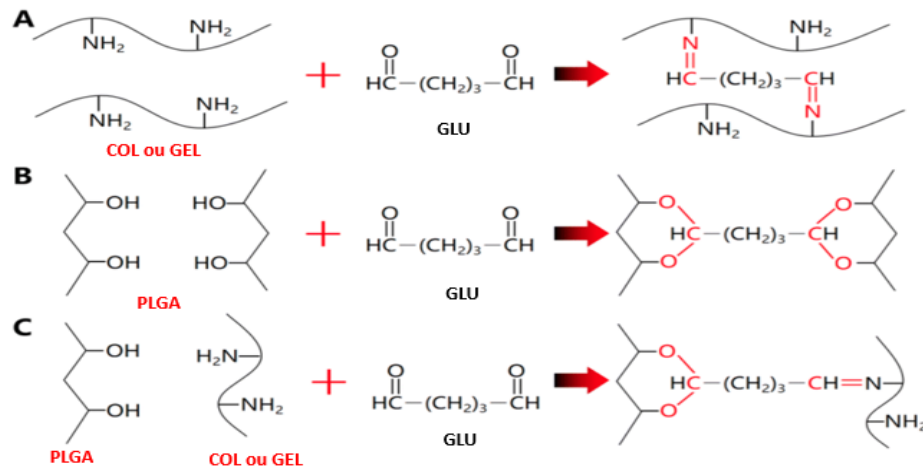


FIGURA 1.1: Possível Esquema de reticulação dos grupos amino do Colágeno e Gelatina e do grupo OH do PLGA com o Glutaraldeído. Adaptada de Han WH *et al* (49).

## 1.4 - Este trabalho

O desenvolvimento de materiais biocompatíveis, com propriedades adequadas para regeneração tecidual e potencial de bioabsorção, exige a consideração de diversos fatores, incluindo a disponibilidade de matéria-prima em grande escala e alta pureza. Nesse contexto, a proposta de um biomaterial a base de colágeno que visa a regeneração de tecidos cartilagosos, apresenta-se como uma alternativa promissora, alinhada às necessidades do mercado e ao direcionamento e capacidade produtiva do Departamento de Química da DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA.

Para este fim, foram desenvolvidas formulações como misturas e blendas com colágeno porcino, gelatina porcina e PLGA, e usou-se o glutaraldeído como agente reticulante. Esta escolha é um alicerce para a criação de um produto inovador para a empresa, que pode ser fabricado com o uso das infraestruturas já existentes, agregando valor à sua linha de atuação e atendendo à crescente demanda por biomateriais.

## 2 - Objetivos:

Este trabalho apresenta dois objetivos centrais:

1. Desenvolver uma formulação potencialmente biocompatível com incremento da resistência mecânica, a partir de colágeno, para suporte ao desenvolvimento de um produto destinado à regeneração de tecidos cartilagosos.
2. Realizar, em caráter preliminar, a projeção de custos de operação, produção e comercialização do material como produto para o mercado médico-odontológico.

Objetivos específicos:

- a. Selecionar matérias-primas e materiais de embalagem regularizados na ANVISA para uso em dispositivos médicos;
- b. Estabelecer método de fabricação e processamento com a infraestrutura oferecida pela empresa;
- c. Realizar a caracterização físico-química e ensaio de compressão dos materiais obtidos;
- d. Realizar ensaio de citotoxicidade *in vitro*.
- e. Obter um banco de dados iniciais como embasamento para o futuro desenvolvimento de um produto possível de registro na ANVISA.

### **3 - Metodologia:**

#### **3.1 - Matérias-primas utilizadas**

Para o preparo das formulações foram utilizadas as seguintes matérias-primas:

- Colágeno Porcino, tipo I, da Bonding Chemical;
- Gelatina Porcina, tipo 1, da Sigma Aldrich;
- PLGA 82/18, da Purasorb.
- Glutaraldeído, da Sigma Aldrich (agente reticulante).

### **3.2 - Preparo das misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído**

Foram elaboradas 12 formulações com diferentes porcentagens de colágeno e gelatina dissolvidos em tampão fosfato (pH=7,2) para fazer um estudo comparativo. Estas formulações foram feitas com e sem glutaraldeído. Foi utilizado o glutaraldeído em duas concentrações diferentes para estudo comparativo.

As formulações ficaram seguinte maneira:

- Amostra A 17: Colágeno 100%: 10g de colágeno + 25mL de tampão fosfato.
- Amostra A18: Colágeno 100% + 0,5% de glutaraldeído: 10g de colágeno + 25 mL de tampão fosfato + 0,2 mL de glutaraldeído (solução 25%).
- Amostra A19: Colágeno 100% + 1% de glutaraldeído: 10g de colágeno + 25 mL de tampão fosfato + 0,4 mL de Glutaraldeído (solução 25%).
- Amostra 1: Colágeno 75% + Gelatina 25%: 7,5g de colágeno + 2,5g de Gelatina + 25 mL de tampão fosfato.
- Amostra 4: Colágeno 75% + Gelatina 25% + 0,5% de glutaraldeído: + 7,5g de colágeno + 2,5g de Gelatina + 0,2 mL de glutaraldeído (solução 25%) + 25 mL de tampão fosfato.
- Amostra A15: Colágeno 75% + Gelatina 25% + 1% de glutaraldeído: 7,5g de colágeno + 2,5g de gelatina + 0,4 mL de Glutaraldeído (solução 25%) + 25 mL de tampão fosfato.
- Amostra 3: Colágeno 50% + Gelatina 50%: 5g de colágeno + 5g de gelatina + 25 mL de tampão fosfato.
- Amostra 5: Colágeno 50% + Gelatina 50% + 0,5% de glutaraldeído: 5,0g de colágeno + 5,0g de gelatina + 0,2 mL de glutaraldeído (solução 25%) + 25 mL de tampão fosfato.
- Amostra 6: Colágeno 50% + Gelatina 50% + 1% de glutaraldeído: 5g de colágeno + 5g de gelatina + 0,4 mL de Glutaraldeído (solução 25%) + 25 mL de tampão fosfato.
- Amostra 2: Gelatina 100% em tampão fosfato: 10g de gelatina + 25mL de tampão fosfato.

- Amostra A14: Gelatina 100% + 0,5% de glutaraldeído: 10g de gelatina + 25 mL de tampão fosfato + 0,2 mL de glutaraldeído (solução 25%).

- Amostra A16: Gelatina 100% + 1% de glutaraldeído: 10g de gelatina + 25 mL de tampão fosfato + 0,4 mL de Glutaraldeído (solução 25%).

Para a caracterização, as amostras foram divididas em grupos com a finalidade de realizar uma avaliação eficaz dos resultados. Como ponto de partida, foram caracterizadas as matérias-primas para comparação com as amostras.

Os grupos das misturas e blendas foram divididos conforme as figuras abaixo.

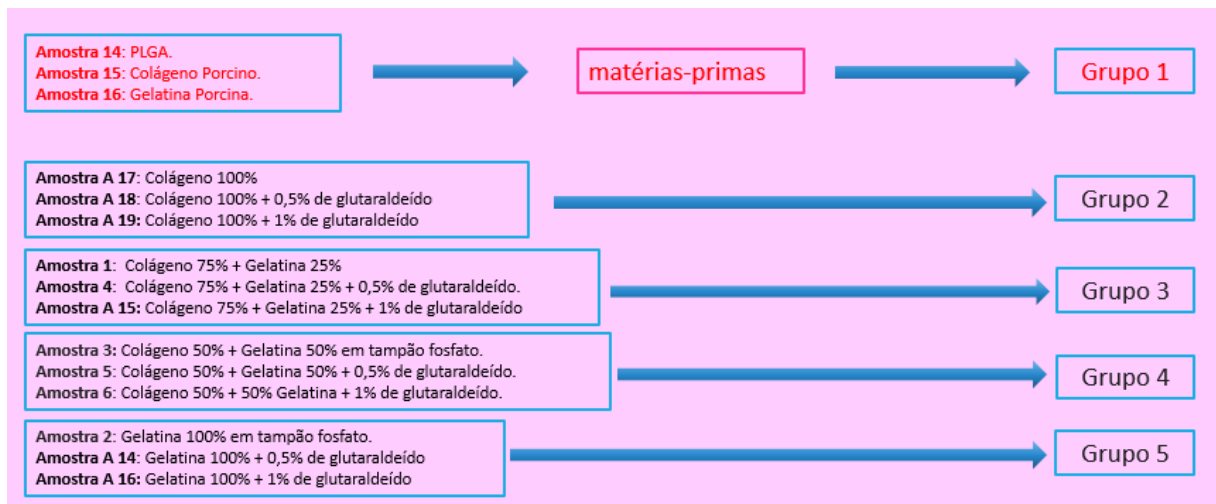


FIGURA 3.1: Separação por grupo de amostras das misturas de Colágeno e Gelatina, sem glutaraldeído e com glutaraldeído, partindo das matérias-primas utilizadas.

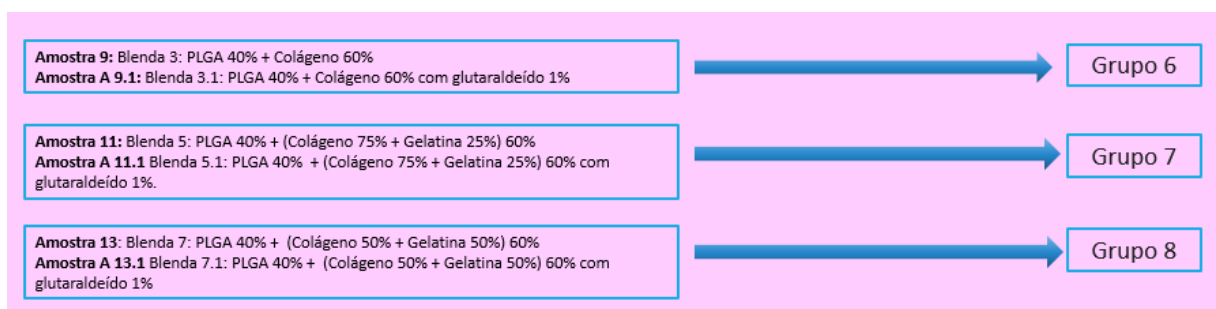


FIGURA 3.2: Separação por grupo de amostras das blendas de PLGA/colágeno e PLGA/colágeno e gelatina, sem glutaraldeído e com glutaraldeído.

A identificação das amostras não obedeceu a uma ordem numérica sequencial devido à separação por grupos e porque optou-se por manter a identificação inicial dos testes preliminares, nos quais havia um número maior de amostras (não descritas aqui).

A fragilidade das formulações colágeno 100%, com e sem glutaraldeído, dificultou bastante a conformação destas amostras. Já no grupo das blends, houve dificuldade na conformação das amostras com a adição do glutaraldeído devido à alta rigidez que estas amostras apresentaram.

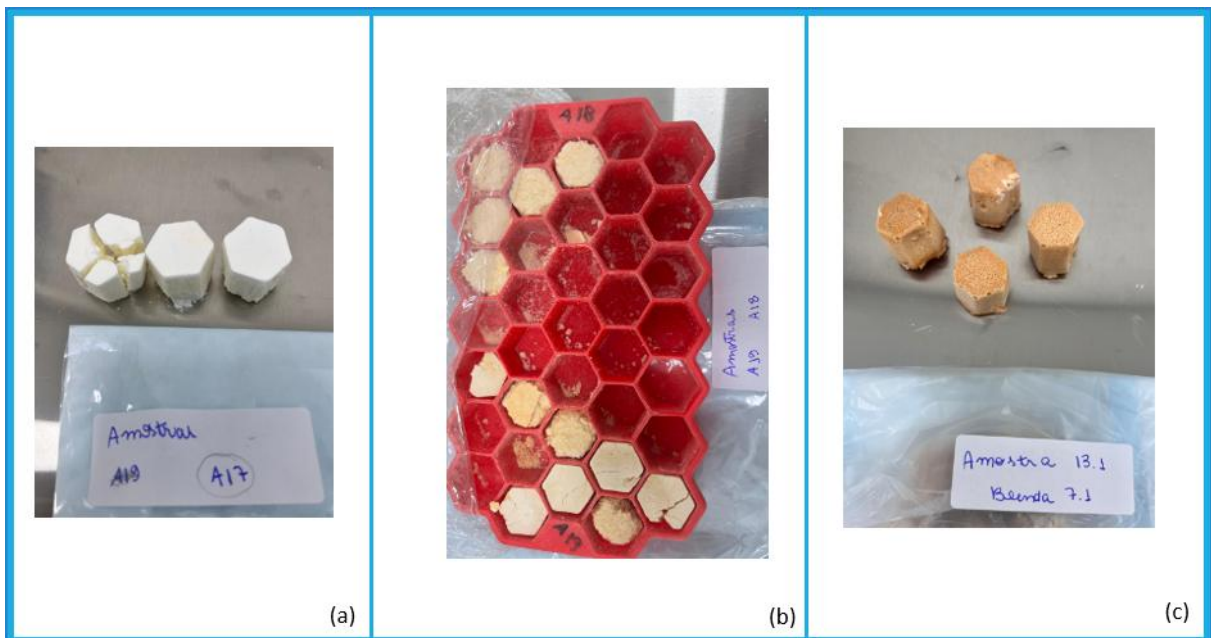


FIGURA 3.3: (a) Amostra Colágeno 100%, (b) Amostra Colágeno 100% com 0,5% de Glutaraldeído, (c) Amostra Colágeno 100% com 1% de Glutaraldeído

Não foi possível avaliar as amostras Gelatina 100% + 0,5% de Glutaraldeído e Gelatina 100% + 1% de Glutaraldeído. A adição do glutaraldeído deixou as amostras extremamente enrijecidas, impossibilitando a conformação e posterior análise.

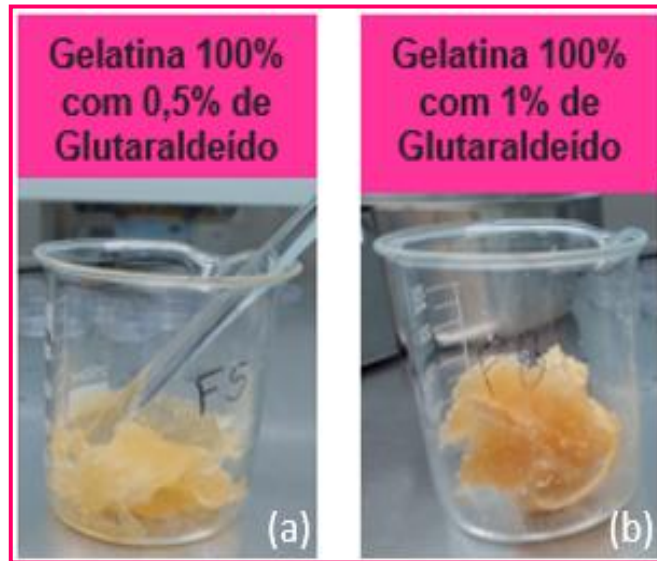


FIGURA 3.4: (a) Amostra Gelatina 100% + 0,5% de glutaraldeído, (b) Gelatina 100% + 1% de glutaraldeído.

### 3.2.1 - Preparo da solução de Tampão Fosfato (pH=7,2)

Para 500 mL de solução:

- 3,4 g de Fosfato de Potássio Monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ );
- 0,524 g de Hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ );
- 0,9 g de Metilparabeno ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ) (hidratado em almofariz e pistilo com 10 mL de água para injetáveis); e,
- Água para injetáveis até completar 500 mL.

### 3.2.2 - Modo de preparo das formulações das misturas

- a. Após a pesagem, os pós foram misturados e solubilizados com o tampão fosfato, à  $40 \pm 3$  °C em banho maria, sob agitação manual com bastão de vidro, por  $20 \pm 3$  minutos.
- b. Adicionou-se o glutaraldeído (nas formulações correspondentes) e agitou-se com bastão de vidro por  $2 \pm 0,5$  minutos.
- c. Finalizado o tempo de banho-maria, foi distribuída nas formas metálicas, pesando-as, conforme descrito no processo de liofilização (item 3.2.3).

- d. Foi realizado o processo de liofilização.

### 3.2.3 - Processo de Liofilização

O processo de liofilização foi realizado com base no protocolo interno da empresa para produtos de uso médico em esponjas (liofilização), que pode ser visualizado no Sistema SE Suite (Softexpert) - Módulo de Documentos (50). Conforme descrição abaixo:

- a. As amostras foram adicionadas em formas metálicas na balança, tarando-a e foi adicionado de  $20,0 \pm 0,3$  gramas do produto em cada uma. A forma com o produto foi adicionada no suporte metálico (Figura 3.5 A);
- b. Repetiu-se o processo até envasar todas as formas (Figura 3.5 B). Em seguida, cobriu-se as formas com a manta de silicone (Figura 3.5 C) e na sequência, a placa metálica (Figura 3.5 D);
- c. Foram inseridas as porcas tipo borboleta na rosca da placa metálica (Figura 3.6 A) e fechadas com o auxílio de um torquímetro (Figura 3.6 B) (acoplado ao bit GLIM-0027) em 100 cN.m e realizado o aperto de forma cruzada (diagonais opostas) (Figura 3.6 C);
- d. A placa montada foi levada para o congelamento no ultrafreezer por  $48 \pm 0,5$  horas a  $-38 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ;
- e. Finalizado o processo de congelamento, a placa montada foi retirada do freezer e com o auxílio de uma chave inglesa, desrosqueou-se as porcas borboleta, retirou-se a placa metálica e a manta de silicone;
- f. As formas com o material congelado foram transferidas para uma bandeja metálica e inseridas no liofilizador;
- g. Iniciou-se o processo de liofilização, com os patamares previamente programados, seguindo as instruções de programação do liofilizador.

Finalizado o processo de liofilização, o produto foi retirado dos suportes e moídas em moinho de facas para a caracterização físico-química.

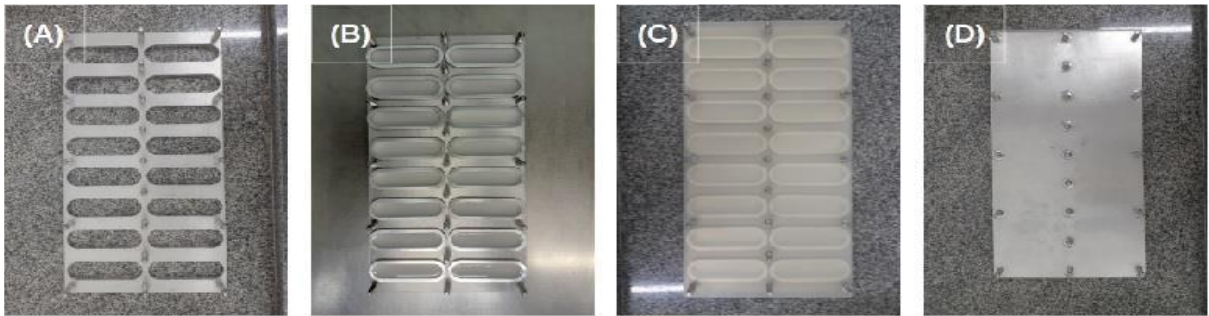


FIGURA 3.5: Sequência de montagem no suporte para envase. (A) Suporte metálico; (B) Disposição das formas metálicas envasadas no suporte metálico; (C) Encaixar da manta de silicone sobre o suporte das formas metálicas e (D) Inserção da placa metálica por cima da manta de silicone.



FIGURA 3.6: Sequência de fechamento das porcas borboletas para a etapa de congelamento. (A) Suporte com as porcas borboletas posicionadas; (B) torquímetro regulado e (C) Fechamento das porcas borboletas.

### 3.3 - Preparo das blendas

Foram elaboradas 6 formulações com 40% de PLGA e diferentes porcentagens de colágeno e gelatina, dissolvidos em diclorometano, para fazer um estudo comparativo. As formulações foram as seguintes:

- Amostra 9: Blenda 3: PLGA 40% + Colágeno 60%: 35g de PLGA + 102,5g de Colágeno + 295g de Diclorometano.

- Amostra 9.1: Blenda 3.1: PLGA 40% + Colágeno 60% com glutaraldeído 1%: 33,6g de PLGA + 102,5g de Colágeno + 5,48g da solução de Glutaraldeído a 25%.

- Amostra 11: Blenda 5: PLGA 40% + (Colágeno 75% + Gelatina 25%) 60%: 35g de PLGA + 77g de Colágeno + 25g de Gelatina + 295g de Diclorometano.

- Amostra 11.1: Blenda 5.1: PLGA 40% + (Colágeno 75% + Gelatina 25%) 60% com glutaraldeído 1%. 33,6g de PLGA + 77g de Colágeno + 25,5g de Gelatina + 295g da solução de Glutaraldeído a 25%.

- Amostra 13: Blenda 7: PLGA 40% + (Colágeno 50% + Gelatina 50%) 60%: 35g de PLGA + 51,25g de Colágeno + 51,25g de Gelatina + 395g de Diclorometano.

- Amostra 13.1: Blenda 7.1: PLGA 40% + (Colágeno 50% + Gelatina 50%) 60% com glutaraldeído 1%: 35g de PLGA + 51,25g de Colágeno + 51,25g de Gelatina + 295g de Diclorometano + 5,48g de solução de Glutaraldeído a 25%.

### **3.3.1 - Modo de preparo das formulações das blendas**

As formulações foram preparadas da seguinte maneira:

- a. Pesou-se separadamente o PLGA e diclorometano e foram transferidos para um béquer;
- b. Em uma capela de exaustão, solubilizou-se o PLGA com o diclorometano, sob agitação mecânica lenta (1000 rpm, modo torque), a  $25 \pm 2$  °C, por  $3 \pm 0,5$  horas;
- c. Adicionou-se o colágeno ou colágeno e gelatina, vagarosamente, mantendo-se a agitação mecânica lenta, por  $1 \pm 0,2$  horas;
- d. Adicionou-se o glutaraldeído (nas amostras correspondentes), mantendo-se a agitação por  $2 \pm 0,5$  minutos;
- e. As amostras foram acondicionadas em refratário de vidro, formando uma fina camada e deixadas na capela por  $24 \pm 0,5$  horas para secar;
- f. Depois, o material foi cortado em pedaços pequenos de 1x1 cm e seco em estufa a  $40 \pm 2$  °C por  $3 \pm 0,2$  dias;
- g. Logo, as amostras foram moídas em moinho de facas (IKA);
- h. Por último, as amostras foram transferidas para os microtubos para a caracterização físico-química.

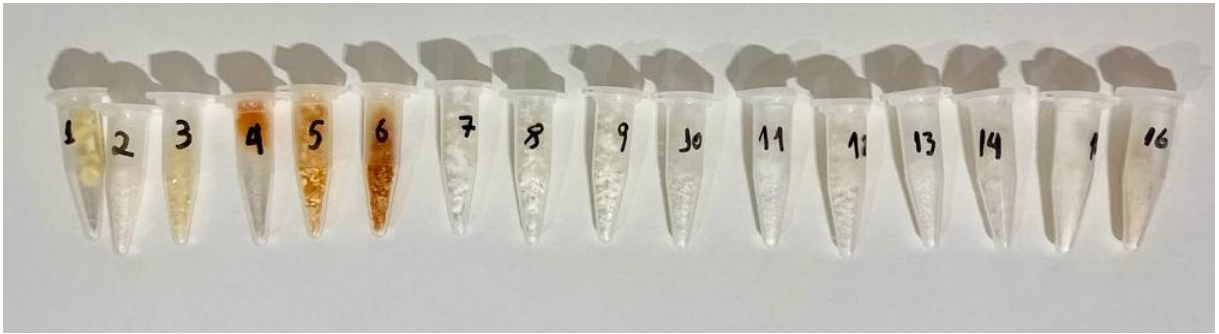


FIGURA 3.7: Amostras acondicionadas e identificadas nos microcubos para caracterização físico-química.

### 3.4 - Caracterização físico-química

A caracterização das amostras obtidas foi feita por difração de raios X, espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva, análise termogravimétrica com calorimetria exploratória diferencial. Também foram realizados ensaios mecânicos de resistência compressão normal e diametral, ensaio de intumescimento e ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

#### 3.4.1 - Difração de raios X (DRX)

O difratômetro de raios X utilizado foi um equipamento Shimadzu XRD-6000 com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1.45$  nm). A difração de raios X mede o grau de cristalinidade da amostra. Quanto maior é o grau de cristalinidade, mais estreito e definido é o pico. As amostras foram colocadas sobre uma placa de vidro e medidas com ângulo  $2\theta$  em relação à superfície da amostra, em um intervalo de 10 a 70°, com variação de  $1^\circ/\text{min}^{-1}$ , empregando-se 30 kV e 30 mA. Esta análise permite o estudo da estrutura cristalina do material (51,52).

### **3.4.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros de infravermelho foram obtidos em Espectrômetro de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier, modelo Vertex 70, marca Bruker (Germany), na faixa de número de onda entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ . Foi utilizado o acessório para medida da Reflectância Total Atenuada (ATR - Attenuated Total Reflectance), com cristal de diamante. Estas medidas foram realizadas para verificar qualitativamente os grupos funcionais dos materiais (53).

### **3.4.3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)**

Foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura JSM- 6510/JEOL. As amostras moídas foram colocadas em suportes metálicos (*stub*), o material foi fixado no suporte com fitas dupla-face de carbono. Foi utilizado o detector de EDS 6742A/*Thermo Scientific* acoplado ao Microscópio Eletrônico de Varredura para realização de análises pontuais nas amostras (54).

### **3.4.4 - Análises térmicas (TGA com DTG; DSC)**

A análise por termogravimetria (TGA) foi realizada a uma razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , de aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$  até  $700^{\circ}\text{C}$ , em cadinho de platina não selado e atmosfera de ar sintético a uma vazão de  $60 \text{ mL min}^{-1}$ . O equipamento empregado foi o Analisador Termogravimétrico TGA Q500, TA Instruments. Esse equipamento também fornece os dados das derivadas das massas para melhor acompanhamento de perda ou ganho de massa (DTG).

Análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio a uma vazão de  $50 \text{ mL.min}^{-1}$ , em cadinho de alumínio selado, utilizando calorímetro Diferencial de Varredura DSC Q100, *TA Instruments*. As análises dos DSC foram realizadas seguindo três etapas: a primeira de aquecimento de  $-30$  a  $100^{\circ}\text{C}$  à taxa de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , seguida pelo resfriamento de  $100^{\circ}\text{C}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$ , à taxa de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , e por último, foi aquecido novamente  $-30$  a  $100^{\circ}\text{C}$  à taxa de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (51,52).

Os parâmetros de processo das análises térmicas foram escolhidos em função dos seguintes fatores:

1. Conhecer o comportamento das amostras em condições de trabalho, como o processo de aquecimento em banho maria a 40°C e liofilização, no qual as amostras passam por congelamento em ultrafreezer a - 40°C e;
2. Um requisito interno do departamento de garantia da qualidade é o conhecimento de possíveis alterações de condições de temperaturas em transporte e armazenamento, ou seja, é importante ter conhecimento prévio do comportamento do produto, caso não haja temperatura controlada.

### 3.4.5 - Ensaios de resistência mecânica

As amostras foram caracterizadas por meio dos ensaios mecânicos de resistência à compressão normal e diametral. Foi utilizada a máquina de ensaio mecânico universal (EMIC DL 3000- Instron Corp., Canton, MA) com célula de carga de 3000 kgf. Os cálculos deste ensaio foram baseados na norma ASTM D638-14 (55) e fornecem a tensão de ruptura ( $\sigma$ , MPa), conforme a Equação 2:

$$\sigma = \frac{F}{A_0},$$

Equação 2

Onde F (N) é a carga instantânea aplicada em direção perpendicular à seção reta da amostra e  $A_0$  representa a área da seção reta original antes da aplicação da carga ( $m^2$ ) (55). A deformação de engenharia  $\varepsilon$  (MPa) pode ser calculada através da Equação 3:

$$\varepsilon = \frac{l_i - l_o}{l_o} = \frac{\Delta l}{l_o}$$

Equação 3

No qual,  $l_i$  = comprimento instantâneo e  $l_o$  = comprimento inicial.

### 3.4.5.1 - Preparo dos corpos de prova

Para a conformação dos corpos de prova, as amostras foram moldadas em forma de silicone hexagonal, com medidas de 20mm de altura e 20 mm de largura.



FIGURA 3.8: a) Forma de silicone hexagonal usada para conformação dos corpos de prova, b) amostra de mistura de colágeno e gelatina, c) e d) tomadas de medida das amostras.

### 3.4.6 - Índice de Intumescimento (Ii%) (56)

A determinação do índice de intumescimento das amostras foi realizada da seguinte maneira:

1. Pesou-se as amostras em balança analítica.
2. Imergiu-se em recipientes contendo soro fisiológico e manteve-se por diferentes intervalos de tempo à temperatura ambiente. 1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos de imersão.
3. Cumpridos os intervalos de tempo, as amostras foram removidas dos meios com auxílio de pinça e enxugadas cuidadosamente entre duas folhas de papel de filtro.

Para o cálculo do índice de intumescimento ( $li\%$ ), utilizou-se a equação 4:

$$li\% = \left( \frac{\text{Peso final} - \text{peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \right) \times 100$$

Equação 4

### **3.4.7 - Ensaio de Citotoxicidade *in vitro***

Conforme as ISO 13485 (Medical Devices) e NBR ISO 10993-1 de 05/2022 (Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 1: Avaliação e ensaios dentro de um processo de gerenciamento de risco), os ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados no Instituto NUPEN, seguindo o Teste de Reatividade Biológica *in vitro* – Método de difusão em ágar, conforme Farmacopeia Brasileira, 5ª ed., 2010. O experimento consiste em semear células de tecido conjuntivo de camundongo (CCIAL 020) em placas de Petri e incubá-las por 48 horas para formação de monocamada celular. O meio de cultura líquido é substituído pelo meio de cobertura sólido e fragmentos das amostras são colocadas sobre este meio e as placas novamente incubadas por 24 horas para observação macro e microscopicamente o índice de Grau de Reatividade Biológica. As amostras foram testadas em triplicatas em placas separadas.

### **3.4.8 - Análise preliminar de custos de produção**

Nesta etapa foi feita, a critério preliminar, a análise de custos de produção em bancada do material e em estimativas paramétricas de produção piloto. Foi contabilizada formalmente cada etapa de processamento, levantando-se em conta

custos das matérias-primas, de processo, de mão-de-obra, de impostos aplicáveis e estimou-se o preço final.

Esta etapa é crucial em uma empresa, uma vez que é necessário considerar desde as etapas de pesquisa e desenvolvimento, tecnologias envolvidas, custos de registro, certificações, marketing e vendas, até os custos da fabricação, como, matérias-primas, processamentos, equipamentos, impostos e mão de obra.

## **4 - Resultados e discussão**

### **4.1 - Difração de raios x**

A figura 4.1 mostra os difratogramas das amostras colágeno 100% e gelatina 100%. Conforme a legenda, tem-se (a) Matéria-prima Colágeno Porcino; (b) Formulação de Colágeno 100% em Tampão Fosfato; (c) Formulação de Colágeno 100% em Tampão Fosfato com 0,5% de Glutaraldeído; (d) Formulação de Colágeno 100% em Tampão Fosfato com 1% de Glutaraldeído; (e) Matéria-Prima Gelatina Porcina e (f) Formulação de Gelatina 100% em Tampão Fosfato. Observa-se que todos os padrões têm o mesmo comportamento, com bandas largas devido às amostras serem amorfas.

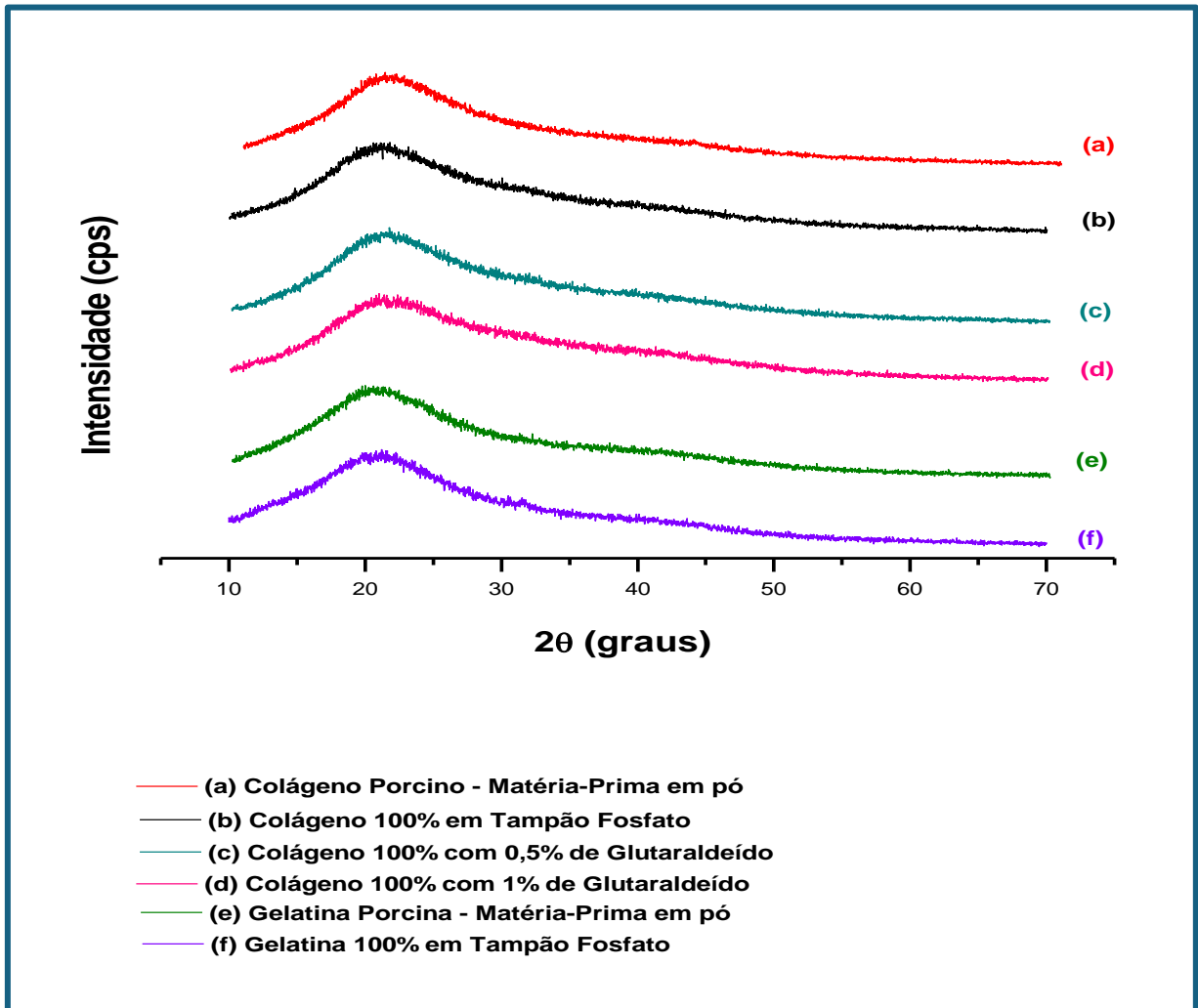


FIGURA 4.1: Difração de Raios x do grupo Colágeno 100% e Gelatina 100%, com e sem glutaraldeído, com a legenda.

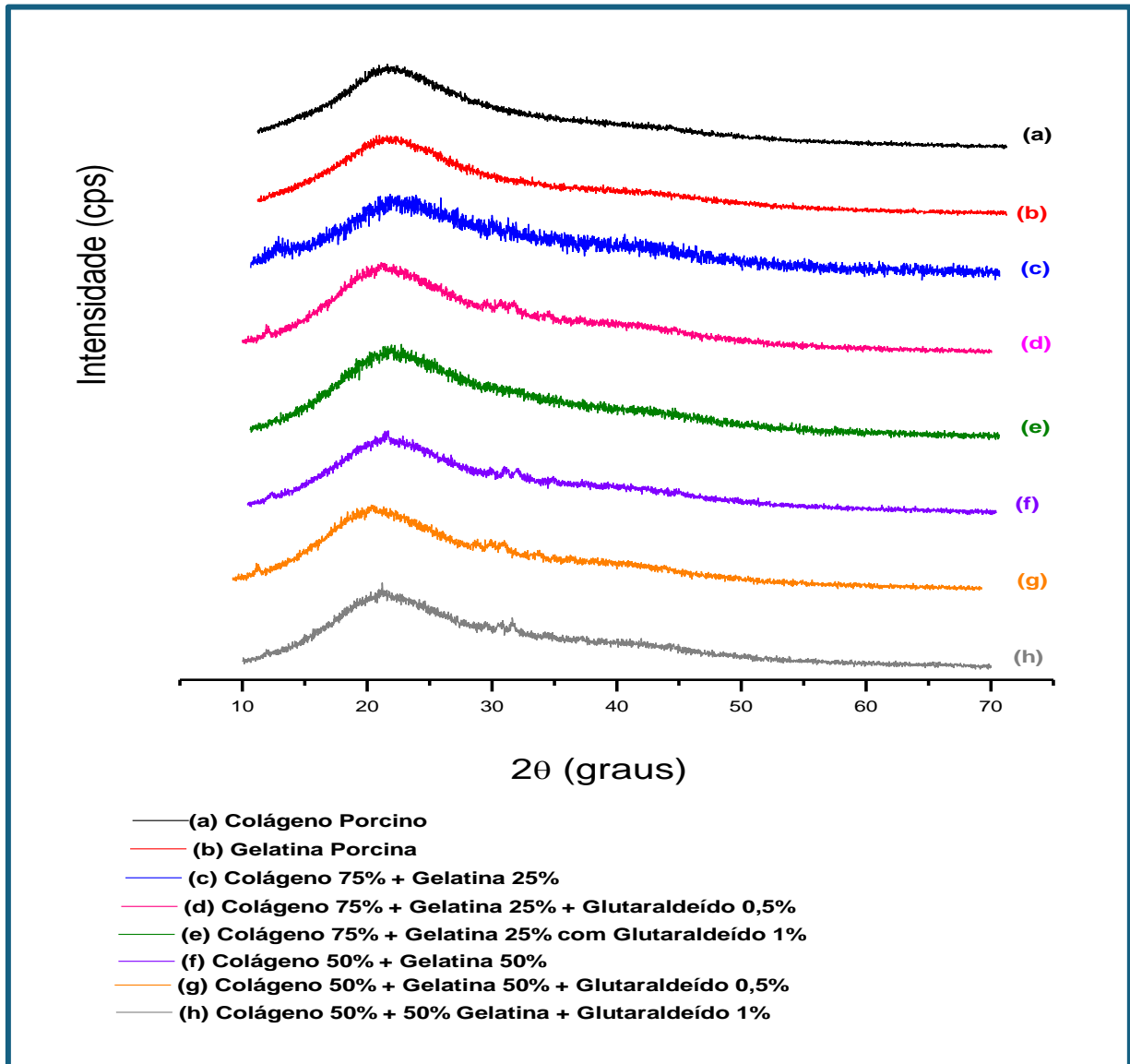


FIGURA 4.2: Difração de Raios X do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda.

Neste grupo (FIGURA 4.2), tem-se novamente as matérias-primas Colágeno e Gelatina para comparação com as misturas Colágeno – Gelatina, com e sem glutaraldeído. Observa-se que todos os padrões têm comportamento muito parecidos, com bandas largas devidas à característica amorfa.

No grupo das blendas (FIGURA 4.3), a amostra (a) é a matéria-prima PLGA, que apresenta alguns picos de cristalinidade, porém, não são bem definidos. As amostras (b) e (c), que são as matérias-primas Colágeno Porcino e Gelatina Porcina, não apresentam picos pois são amorfas. As amostras (d) e (e); (f) e (g); e, (h)

e (i), são blendas sem e com glutaraldeído, nas quais podem ser observados a presença de ruídos, porém todos amorfos.

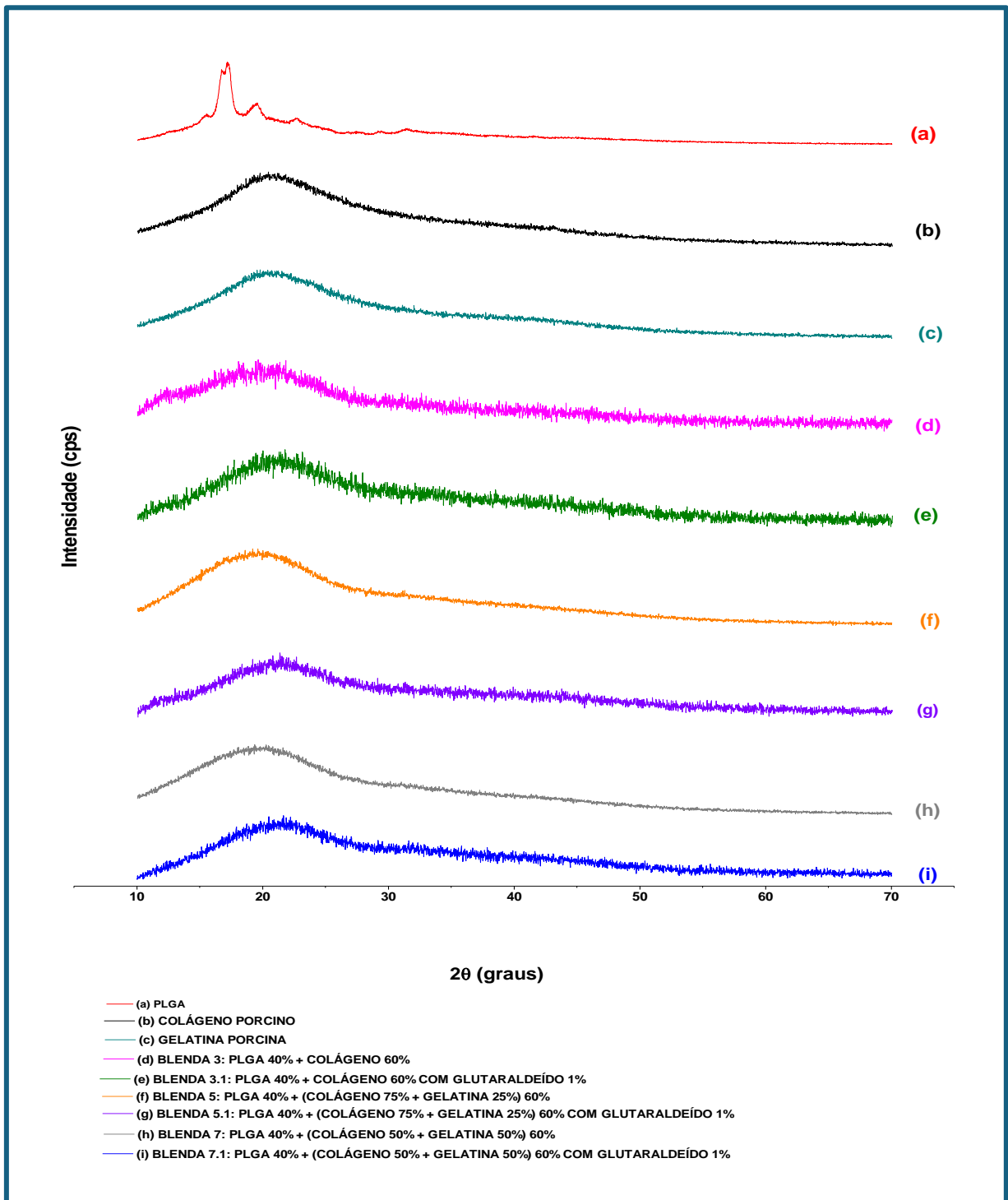


FIGURA 4.3: Difração de Raios X do grupo das blendas, com e sem glutaraldeído, com a legenda.

## 4.2 - DSC: Caloria Diferencial de Varredura

No grupo das amostras colágeno 100% e gelatina 100% (FIGURA 4.4), observa-se o comportamento das amostras de Colágeno Porcino, Colágeno 100% em tampão fosfato, Colágeno 100% + glutaraldeído 0,5%, Colágeno 100% + glutaraldeído 1%, Gelatina Porcina e Gelatina 100% em tampão fosfato. Na primeira rampa de -30 a 100°C (em preto), nota-se uma transição que provavelmente refere-se à desnaturação do colágeno, que ocorre por volta de 58°C (21), mas que após o congelamento, como mostrado na 2ª rampa (em vermelho) e reaquecimento na 3ª rampa (em verde), não se observa mais.

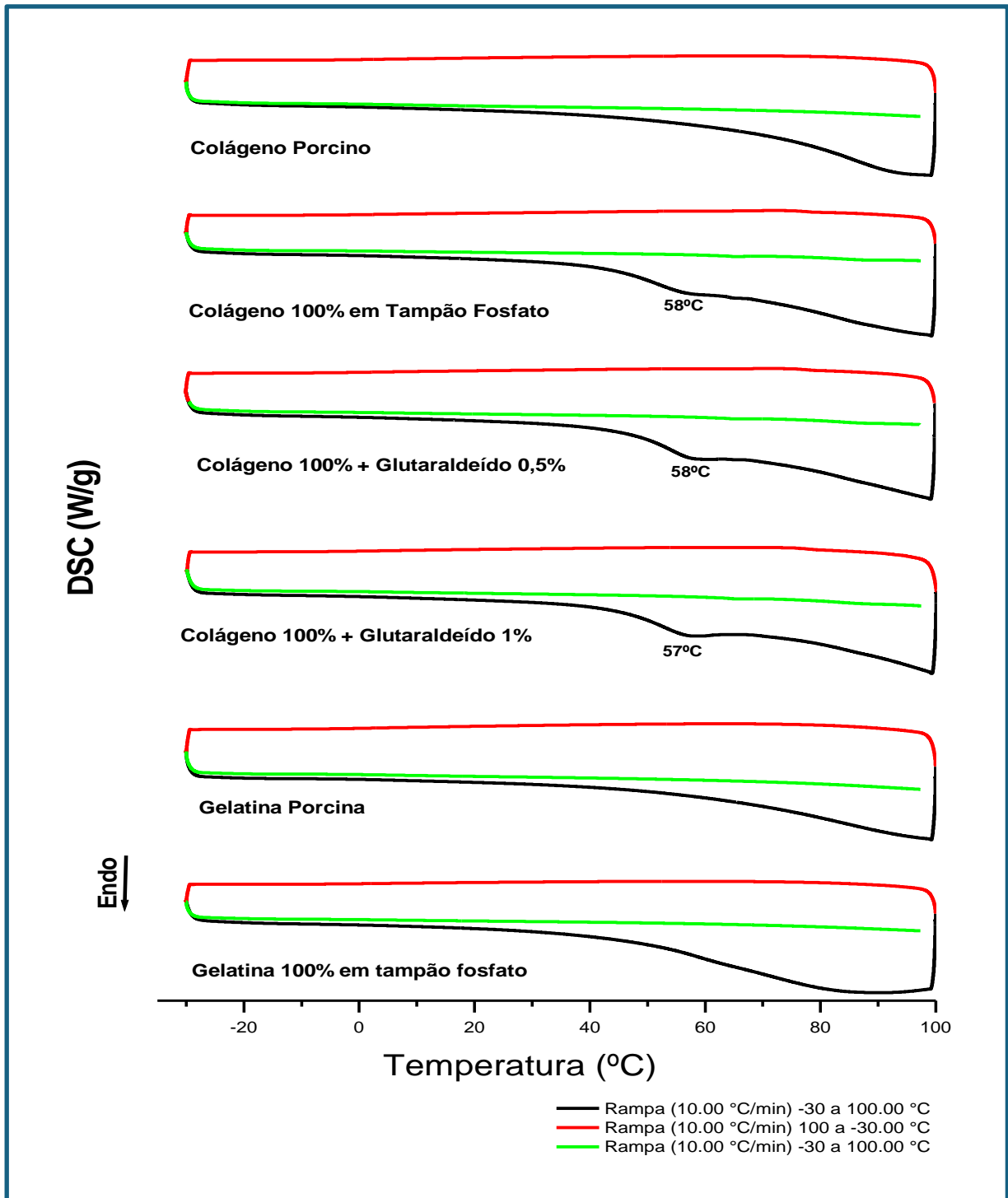


FIGURA 4.4: Curvas de DSC do grupo do grupo Colágeno 100% e Gelatina 100%, com e sem glutaraldeído, com legenda.

No grupo das misturas de Colágeno e Gelatina (FIGURA 4.5) tem-se novamente as matérias-primas Colágeno e Gelatina para comparação com as misturas, com e sem glutaraldeído. Novamente observa-se uma transição, sem o

ponto de inflexão da curva, em aproximadamente 50°C (desnaturação do colágeno) (21), que não é observada após o congelamento e reaquecimento (em verde). O comportamento de todas as amostras foi bastante parecido, mesmo com a presença do glutaraldeído.

O grupo das blendas (FIGURA 4.6), no caso do PLGA, na 1ª rampa de -30 a 100°C (em preto) se observa um pico de temperatura de transição vítrea em 62,3°C. Após o congelamento, na rampa 2, e reaquecimento até 100°C, na rampa 3, não se observa o mesmo comportamento. O PLGA apresenta temperatura de transição vítrea entre 40 e 60°C (57) e o ponto de fusão é em torno de 140°C (58). As curvas de estabilidade térmica obtidas para o colágeno e gelatina porcinos indicam desnaturação da molécula em aproximadamente 50°C (21). No resfriamento e reaquecimento, não se observa o mesmo comportamento, pois demonstra que a molécula perdeu sua configuração original e suas propriedades.

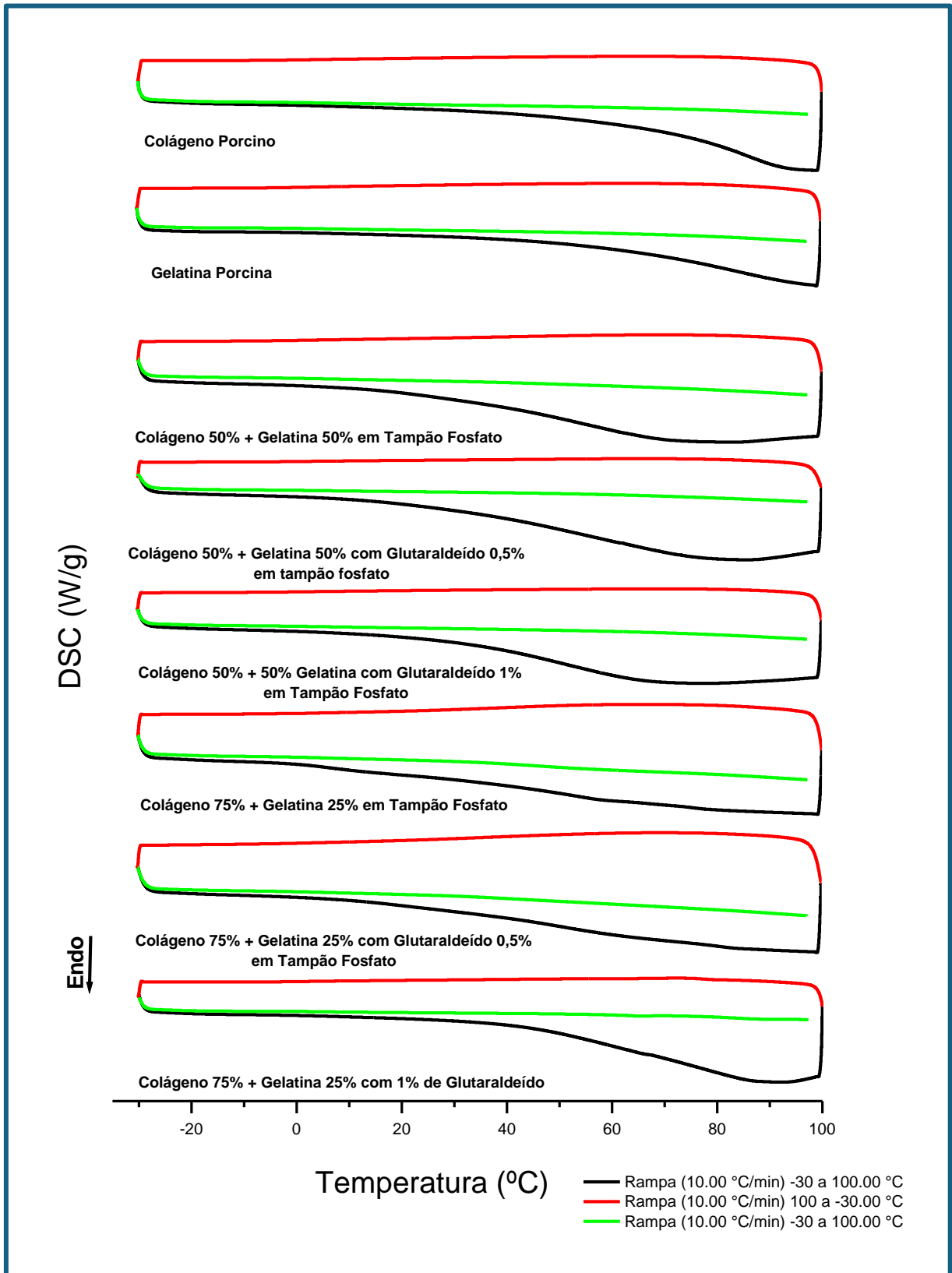


FIGURA 4.5: Curvas de DSC do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda.

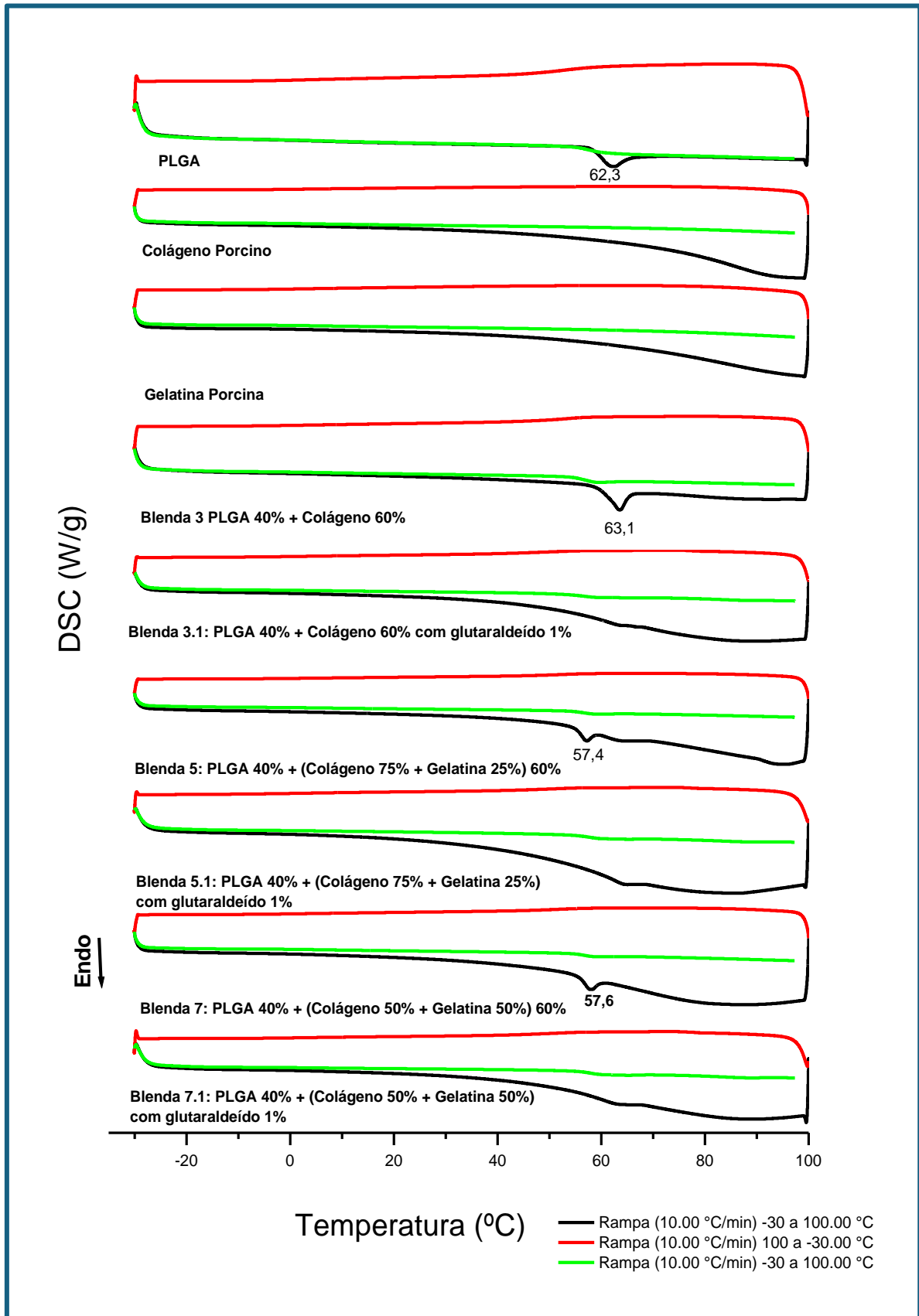


FIGURA 4.6: Curvas de DSC do grupo das blendas, com e sem glutaraldeído, com legenda.

As curvas de estabilidade térmica obtidas para as blendas indicam transições que possam ser de transição vítrea nas amostras sem o glutaraldeído. Destas, a blenda somente com o PLGA e Colágeno apresentou uma temperatura de transição vítrea em 63,1°C, ao passo que, as amostras com a mistura de colágeno e gelatina, houve uma diminuição na temperatura de transição vítrea: 57,4 e 57,6 °C. As blendas com glutaraldeído não apresentaram esse pico bem caracterizado.

### 4.3 – Análise Termogravimétrica (TGA) com DTG

Para a análise termogravimétrica foi utilizada uma rampa de 25 a 700°C com velocidade de aquecimento a 10°C/min. A FIGURA 4.7 mostra as curvas termogravimétricas que indicam a perda de massa e o pico da Derivada da massa (DTG) das amostras de Colágeno Porcino, Colágeno 100% em tampão fosfato, Colágeno 100% + glutaraldeído 0,5%, Colágeno 100% + glutaraldeído 1%, Gelatina Porcina e Gelatina 100% em tampão fosfato. Elas mostram os picos de DTG entre 298 e 330°C, que são atribuídos à degradação dos polímeros (21).

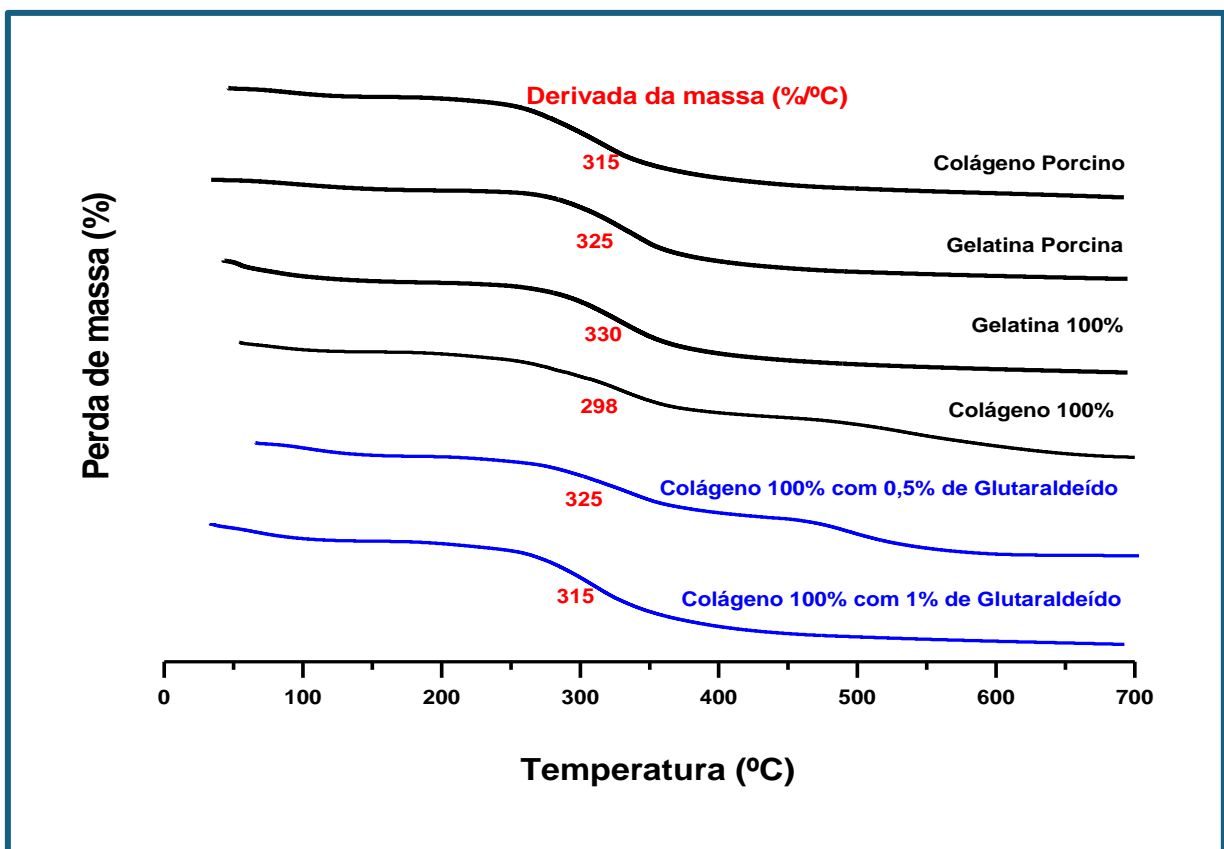


FIGURA 4.7: Curvas de TGA do grupo do grupo Colágeno 100% e Gelatina 100%, com e sem glutaraldeído, com legenda.

A FIGURA 4.8 mostra as curvas termogravimétricas das matérias-primas Colágeno e Gelatina para comparação com as misturas Colágeno – Gelatina, com e sem glutaraldeído. Elas mostram os picos de DTG entre 305 e 320°C, que são atribuídos à degradação dos polímeros (21).

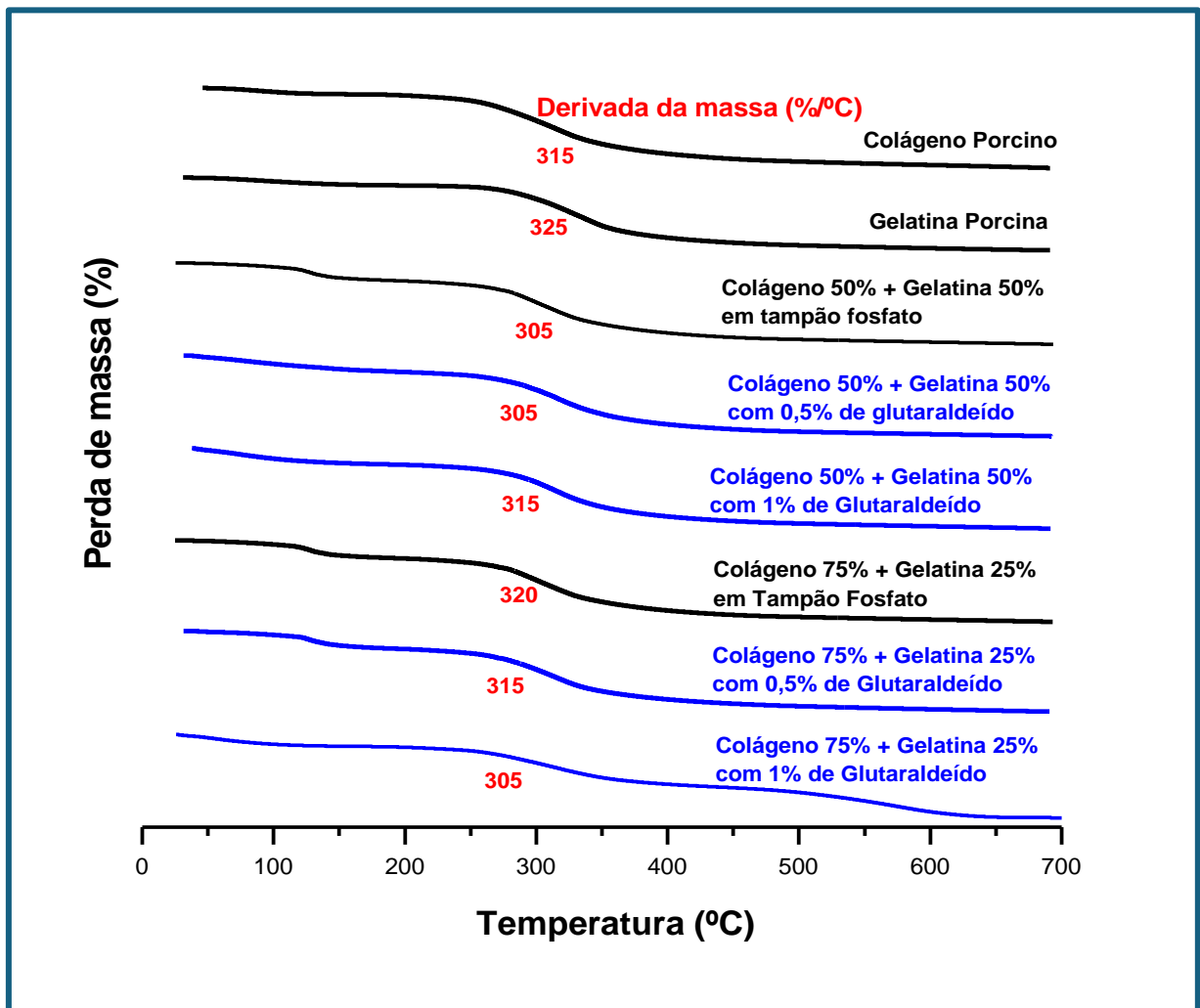


FIGURA 4.8: Curvas de TGA do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda.

A FIGURA 4.9 mostra as curvas termogravimétricas das matérias-primas Colágeno e Gelatina para comparação com as blendas, com e sem glutaraldeído. O PLGA começa a degradar acima de 300°C, tendo o pico do DTG em 368°C, corroborando com a literatura (58). A matéria-prima Colágeno Porcino, teve seu pico de DTG em 315°C e a Gelatina Porcina, em 325°C. Nas blendas sem glutaraldeído o pico de DTG ficou em 310°C e com glutaraldeído, em 289°C, 303°C e 305°C, respectivamente.

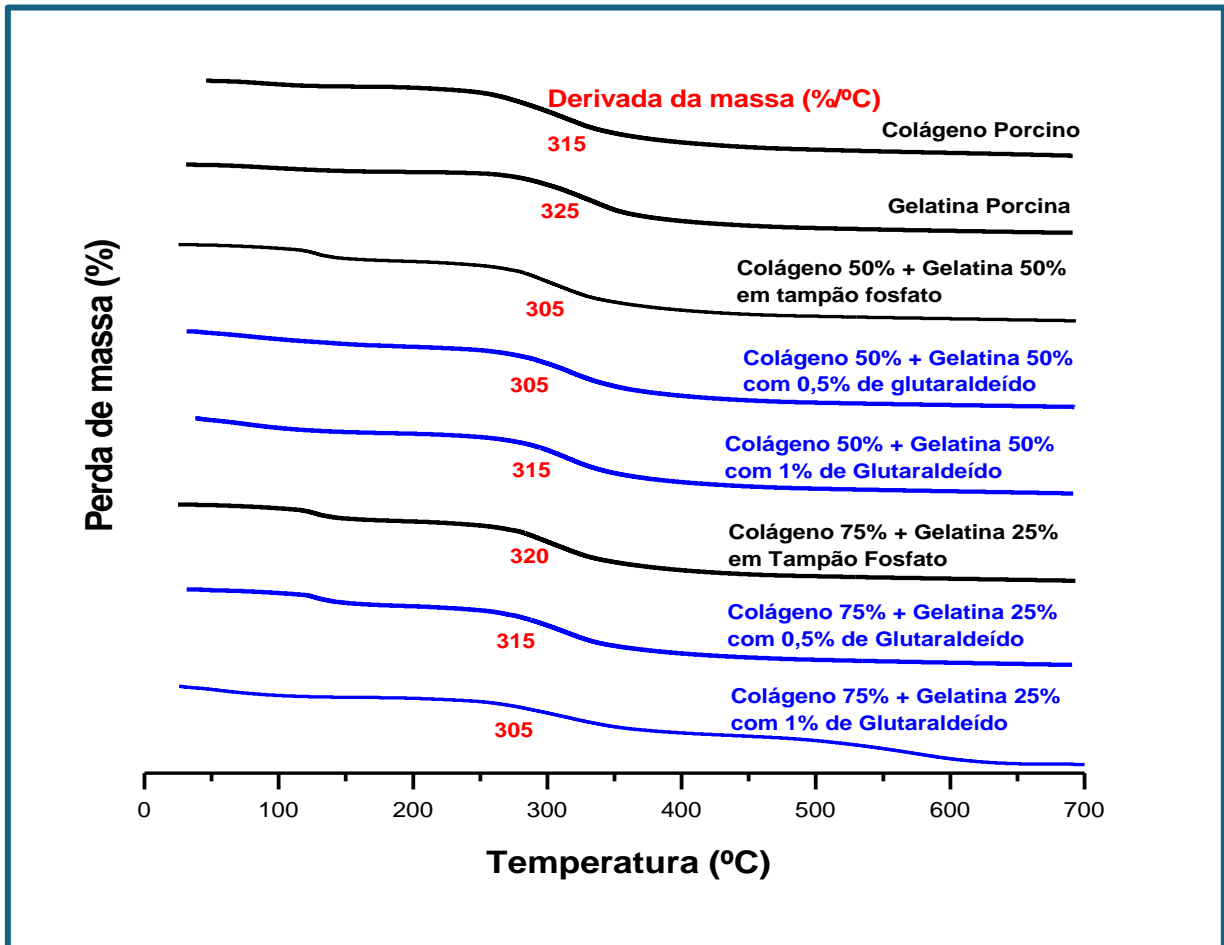


FIGURA 4.9: Curvas de TGA do grupo das blendas, com e sem glutaraldeído, com legenda.

#### 4.4 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)

A FIGURA 4.10 mostra os gráficos do grupo colágeno e gelatina 100%. Os espectros da gelatina e do colágeno (a e b) são muito parecidos entre si. Segundo a literatura (59), a banda  $1634\text{ cm}^{-1}$  refere-se a Amida 1<sup>a</sup>, a banda  $1522\text{ cm}^{-1}$  refere-se a Amida 2<sup>a</sup> e a banda  $1241\text{ cm}^{-1}$  refere-se à Amida 3<sup>a</sup>. A diferença entre colágeno e gelatina é que o colágeno possui uma cadeia longa, sendo a gelatina um colágeno que sofreu hidrólise levando a cadeias menores. Não houve mudanças significativas nos espectros das amostras feitas com glutaraldeído 0,5 e 1%.

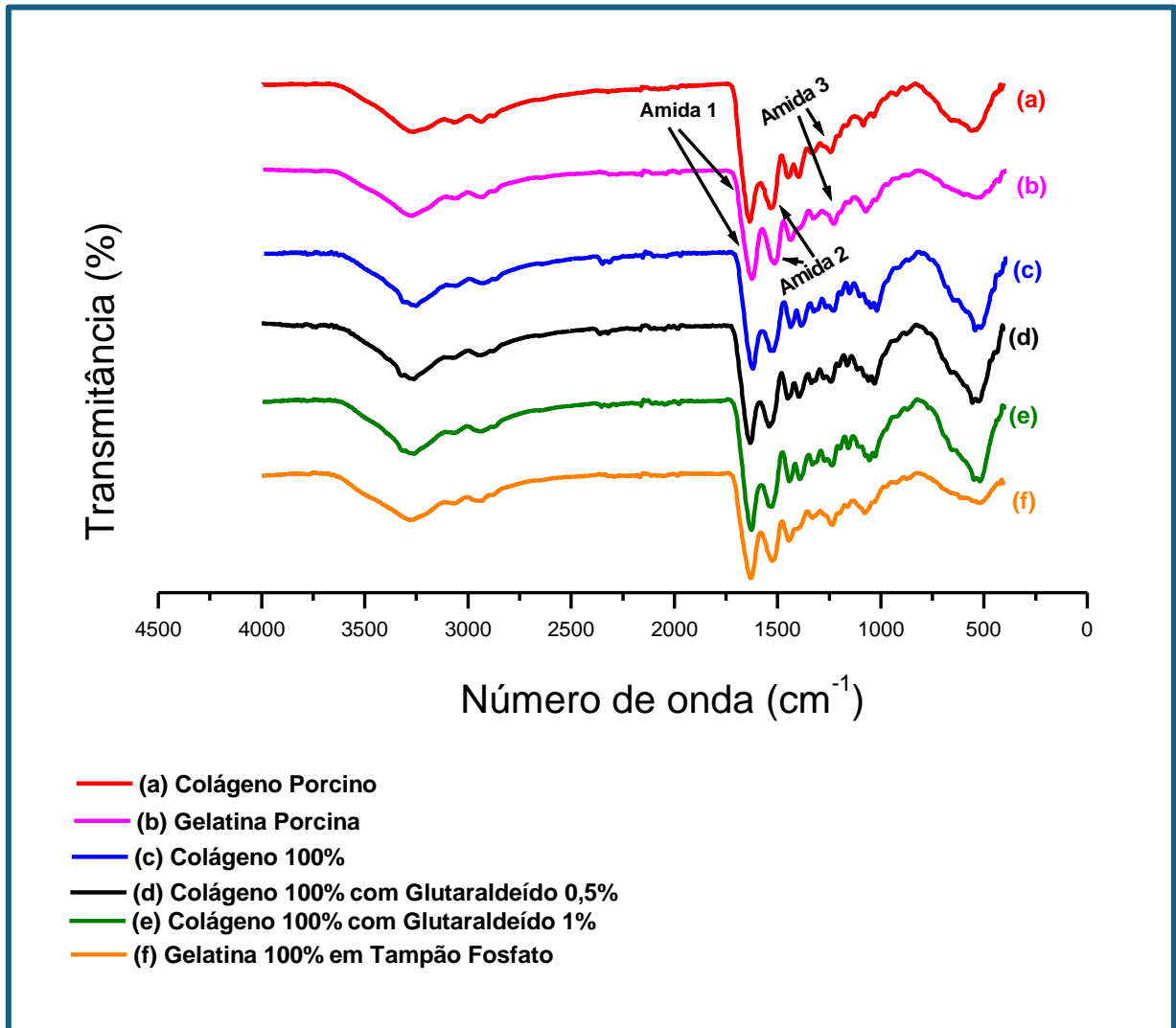


FIGURA 4.10: FTIR do grupo do grupo Colágeno 100% e Gelatina 100%, com e sem glutaraldeído, com legenda.

Os espectros obtidos nas amostras das misturas do colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, mesmo em diferentes proporções, não indicaram mudanças significativas.

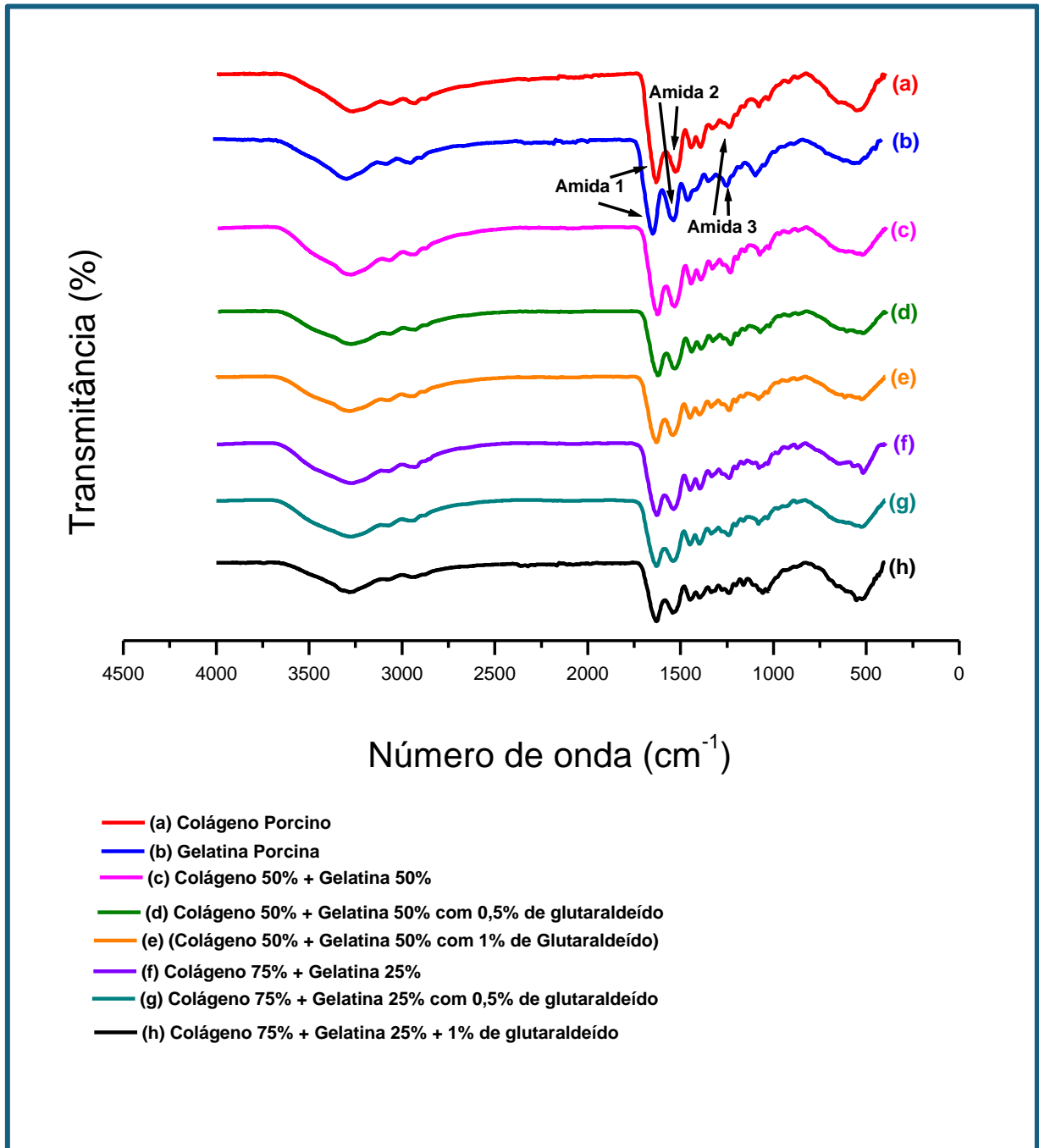


FIGURA 4.11: FTIR do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda.

Na FIGURA 4.12 estão novamente os espectros da gelatina e do colágeno (a e b) e o espectro do PLGA (c) para comparação com as outras misturas das blends PLGA, Colágeno, Gelatina e com quantidades de glutaraldeído e 1%. O espectro do PLGA (c) mostra as bandas  $1753 \text{ cm}^{-1}$ , que se referem ao C=O (estiramento),  $1462$  e  $1370 \text{ cm}^{-1}$  a  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  respectivamente (deformação angular

simétrica); na faixa 1183 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  a  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}$  (deformação angular assimétrica) e 1089  $\text{cm}^{-1}$  a  $\text{C-O}$  (estiramento) (58).

Na blenda 3 (d), é possível inferir que estão presentes todos os picos característicos das 2 matérias-primas, com diminuição do tamanho do pico  $\text{C=O}$  (estiramento), banda 1753  $\text{cm}^{-1}$ , característico do PLGA e sobreposição dos demais picos.

Comparando as blendas formuladas sem glutaraldeído (d, f, h) e as blendas formuladas com glutaraldeído (e, g, i), observa-se que a banda 1753  $\text{cm}^{-1}$ , referida ao  $\text{C=O}$  (estiramento) do PLGA está diminuindo, mais acentuadamente, nas blendas com glutaraldeído.

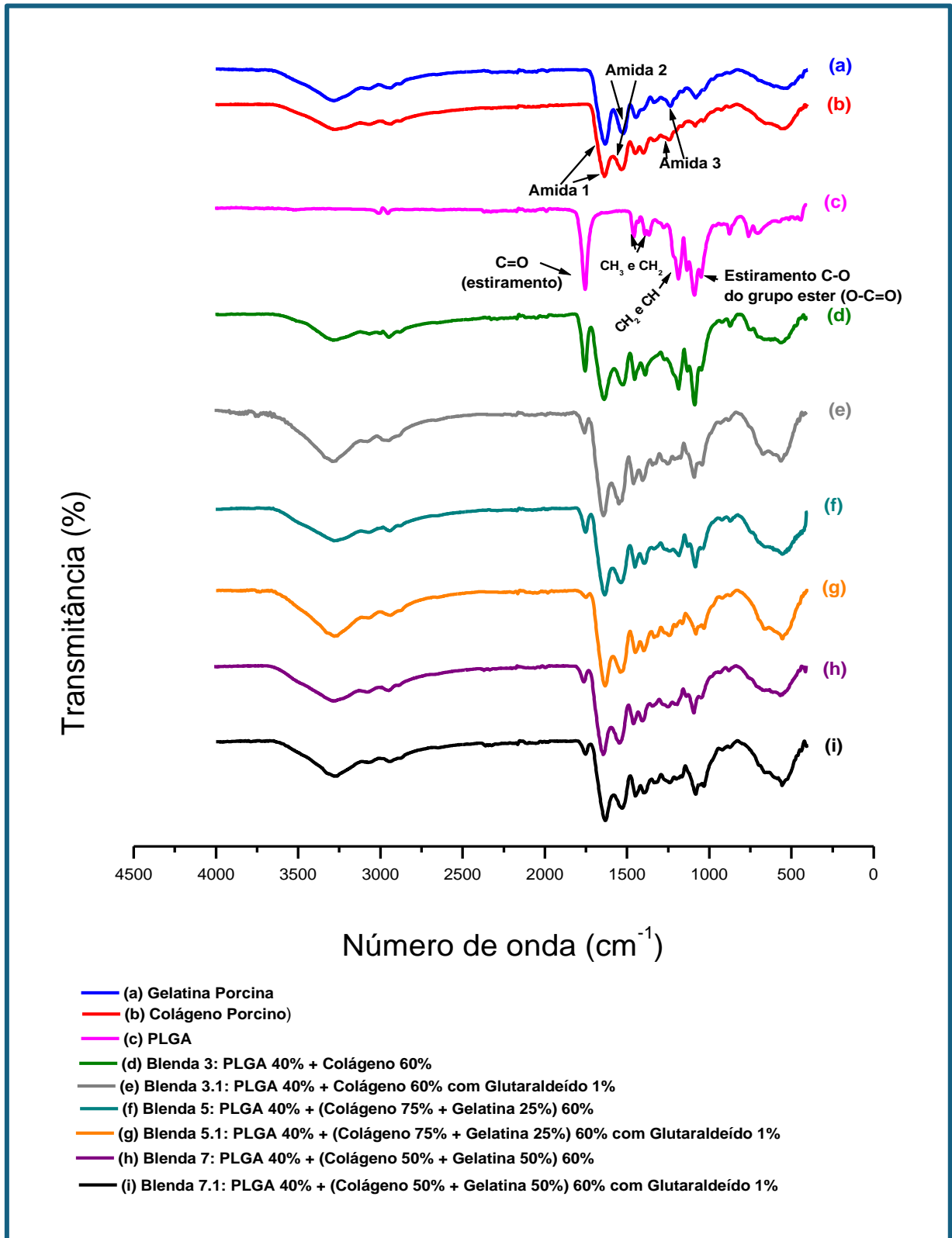


FIGURA 4.12: FTIR do grupo das blendas, com e sem glutaraldeído, com legenda.

## 4.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As imagens de microscopia eletrônica das amostras, com as respectivas análises por EDS, são vistas nas Figuras 4.13 a 4.18. O método utilizado para o preparo das amostras indicou que as amostras não possuem um padrão de microestrutura definido, tanto para as matérias-primas isoladas, como para as misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, e, as blendas, com e sem glutaraldeído. Resumidamente, as amostras não apresentaram homogeneidade em suas formas e tamanhos.

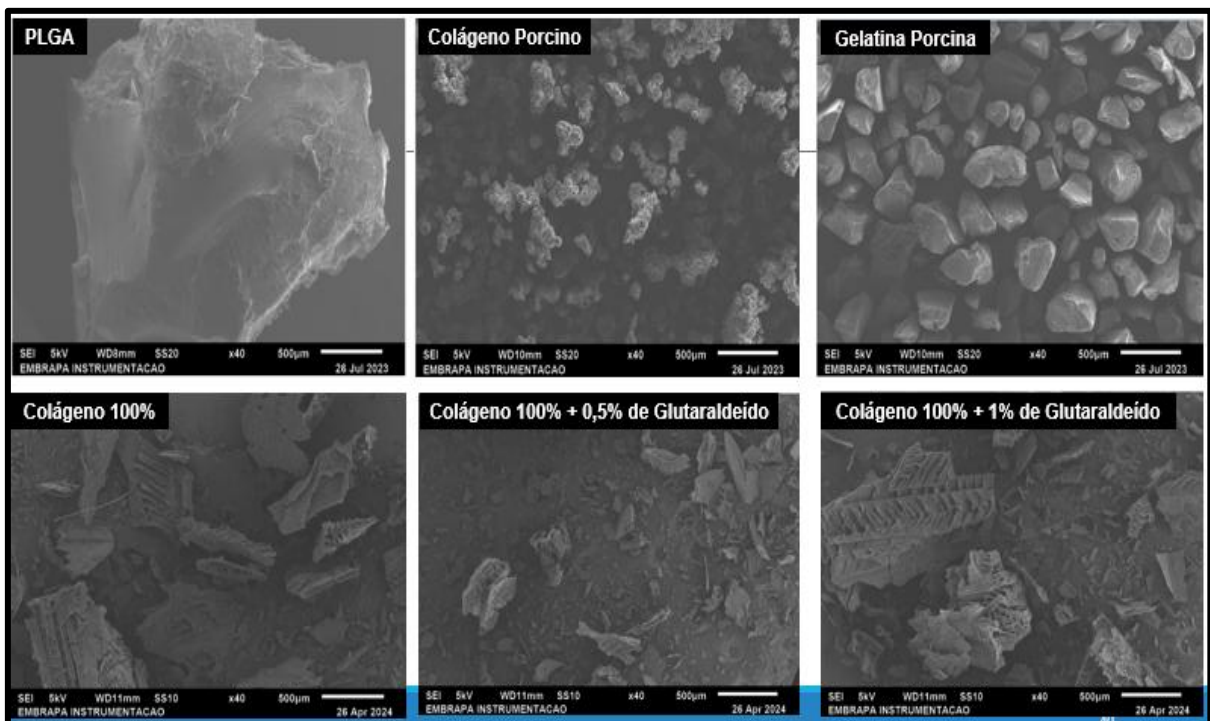


FIGURA 4.13: MEV das matérias-primas e o grupo Colágeno 100%, com legenda.

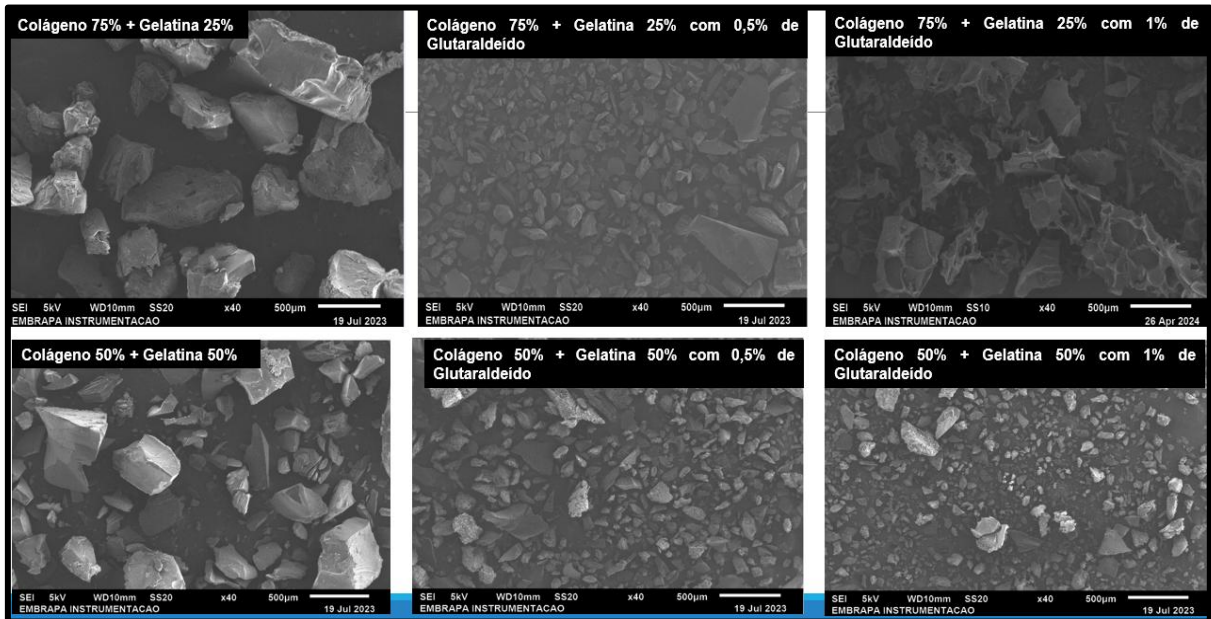


FIGURA 4.14: MEV do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda.

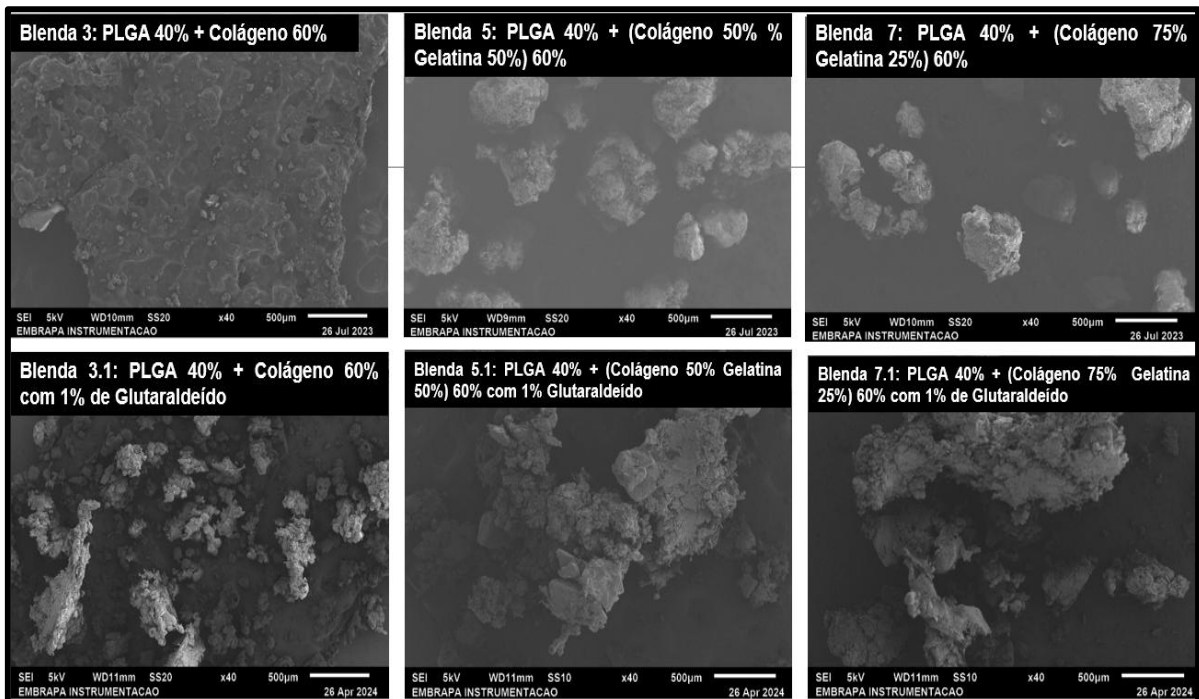


FIGURA 4.15: MEV do grupo das Blendas, com legenda.

Os EDSs indicam os elementos químicos das amostras (microanálise qualitativa), nos quais se observam os picos de carbono, nitrogênio e oxigênio, que são comuns para estas amostras. Em alguns casos, aparecem picos de alumínio,

zinc e cobre, todavia, trata-se da composição do porta-amostra utilizado, e portanto, são irrelevantes.

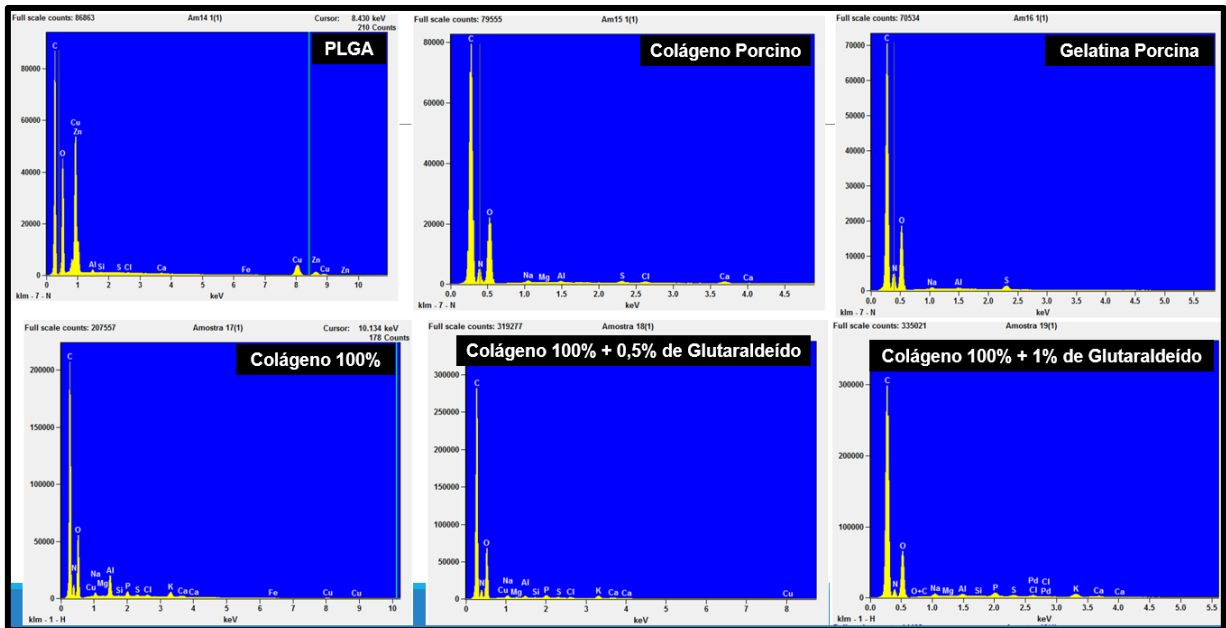


FIGURA 4.16: EDS das matérias-primas e o grupo Colágeno 100%, com legenda.

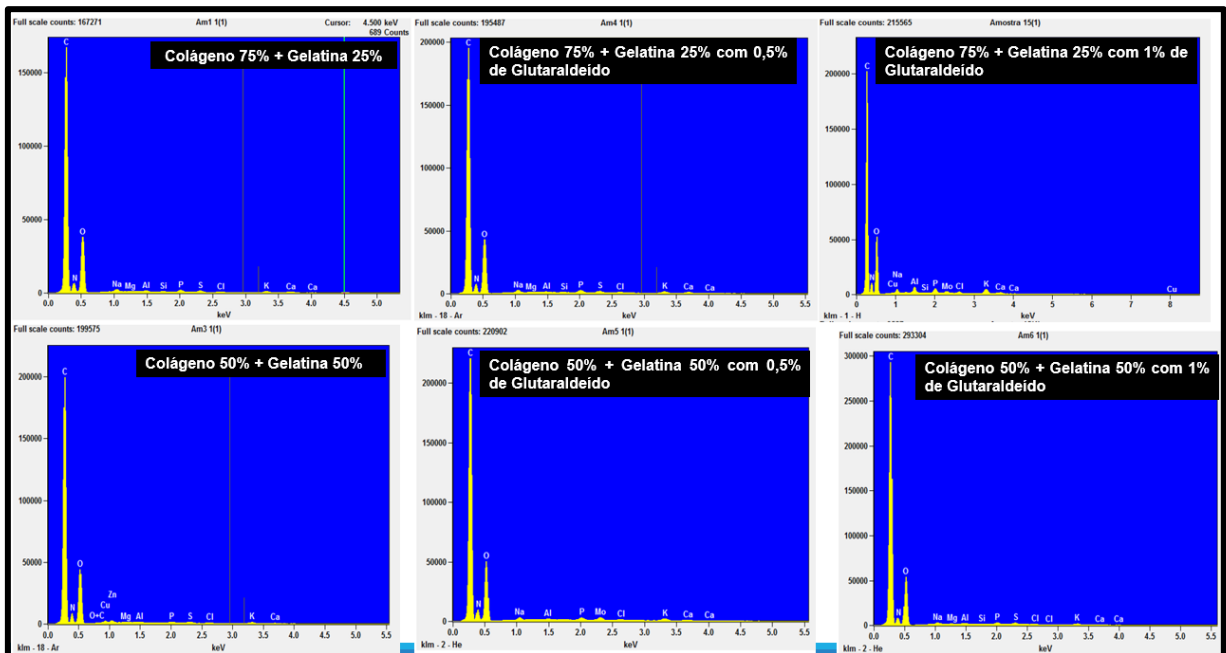


FIGURA 4.17: EDS do grupo de misturas de colágeno e gelatina, com e sem glutaraldeído, com a legenda.

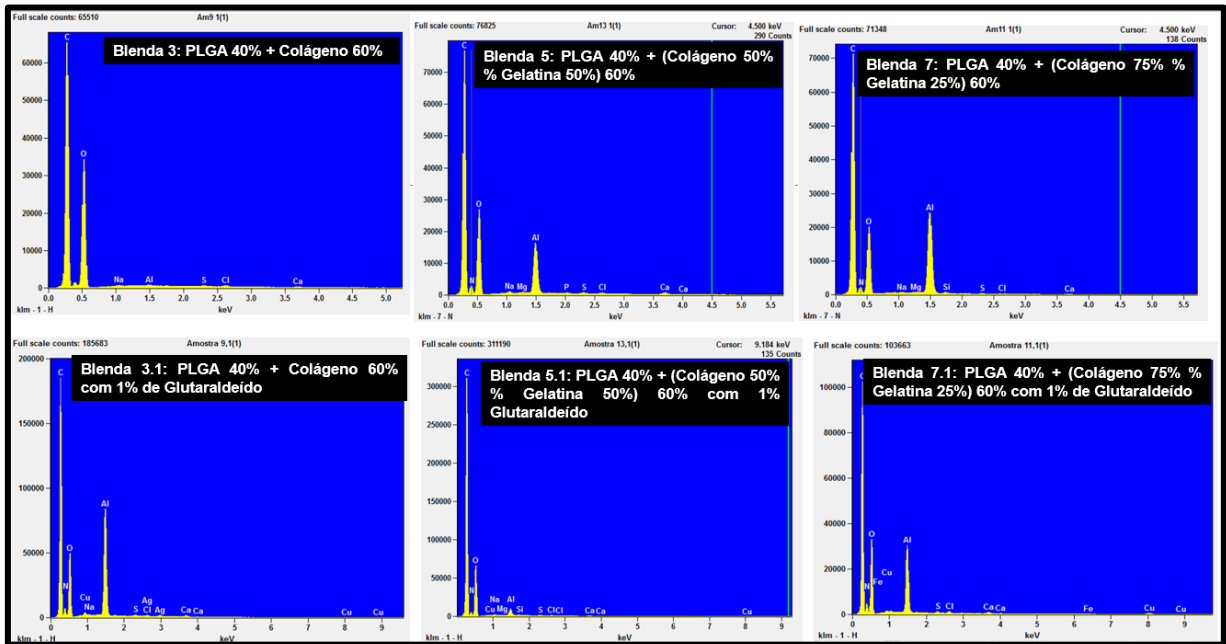


FIGURA 4.18: MEV do grupo das Blendas, com legenda.

#### 4.6 - Ensaios Mecânicos: Resistência a Compressão Normal e Diametral

As amostras foram analisadas em quintuplicatas. Para os cálculos de tensão máxima e deformação de engenharia, foi utilizado a área de 0,0003142 m<sup>2</sup> e o comprimento inicial  $l_0 = 20,00$  mm, que são dos corpos de prova das amostras.

TABELA 4.1: Resultados obtidos dos ensaios de compressão normal e diametral de todas as amostras de misturas de colágeno e gelatina.

AMOSTRAS	Força Máxima Média (N)	Desvio Padrão ( $\sigma$ ) Força máxima	Deformação Máxima Média - $\epsilon_1$ (mm)	Desvio Padrão ( $\sigma$ ) Deformação máxima	Tensão Máxima - $\delta$ (MPa)	Deformação de Engenharia - $\epsilon$ (%)
Amostra A 17: Colágeno 100% Normal	30,47	4,92	8,46	0,88	96,98	42,28
Diametral	7,61	2,14	3,75	1,54	24,21	18,76
Amostra A18: Colágeno 100% + 0,5% de Glutaraldeído Normal	28,45	4,00	6,65	1,04	90,55	33,24
Diametral	4,08	0,64	4,16	1,84	12,99	20,82
Amostra A 19: Colágeno 100% + 1% de Glutaraldeído Normal	13,48	2,11	5,74	0,54	42,90	28,70
Diametral	3,71	1,07	6,64	2,06	11,80	33,22
Amostra 2: Gelatina 100% Normal	1057,00	49,33	6,47	0,23	3364,10	32,34
Diametral	947,00	29,19	8,90	0,61	3014,00	44,48
Amostra 1: Colágeno 75% + Gelatina 25% Normal	84,34	6,72	0,47	0,10	268,42	2,33
Diametral	64,03	17,81	1,23	0,42	203,79	6,15
Amostra 4: Colágeno 75% + Gelatina 25% + 0,5% de Glutaraldeído Normal	454,40	37,42	7,21	0,81	1446,21	36,03
Diametral	130,24	12,42	1,62	0,14	414,50	8,10
Amostra A15: Colágeno 75% + Gelatina 25% + 1% de Glutaraldeído Normal	431,15	11,39	8,06	0,35	1372,22	40,32
Diametral	99,14	7,90	2,25	0,26	315,53	11,25
Amostra 3: Colágeno 50% + Gelatina 50% Normal	352,50	56,70	1,96	0,30	1121,90	9,81
Diametral	229,30	27,95	2,33	0,35	729,79	11,64
Amostra 5: Colágeno 50% + Gelatina 50% + 0,5% de glutaraldeído Normal	212,70	44,01	1,27	0,23	676,96	6,37
Diametral	181,80	30,10	1,40	0,40	578,61	6,97
Amostra 6: Colágeno 50% + 50% Gelatina + 1% de glutaraldeído Normal	249,90	32,16	6,39	1,59	795,35	31,93
Diametral	135,97	4,04	3,07	0,22	432,76	15,35

A força máxima é a carga máxima que o material suportou antes da falha. A deformação máxima é o quanto o material deformou antes da falha. A tensão máxima é a tensão que o material suporta sem sofrer deformação permanente. A deformação de engenharia é a porcentagem de deformação que o material sofreu em função da sua área, sem sofrer deformação permanente (deformação elástica).

No grupo das amostras de Colágeno 100%, a tensão máxima e a deformação de engenharia foram menores com a adição do glutaraldeído. Na gelatina, o valor da tensão máxima foi maior e a deformação de engenharia foi menor. A gelatina é bastante elástica, conforme aumenta a aplicação da força, sofre deformação, mas

suporta mais a quantidade de força aplicada. Já o colágeno, sofre a deformação permanente com menor aplicação de força. A amostra de gelatina com glutaraldeído apresentou rigidez excessiva, o que inviabilizou a realização das análises. Isso é um indicativo de ligação (*cross-linking*) entre a gelatina e o glutaraldeído (59).

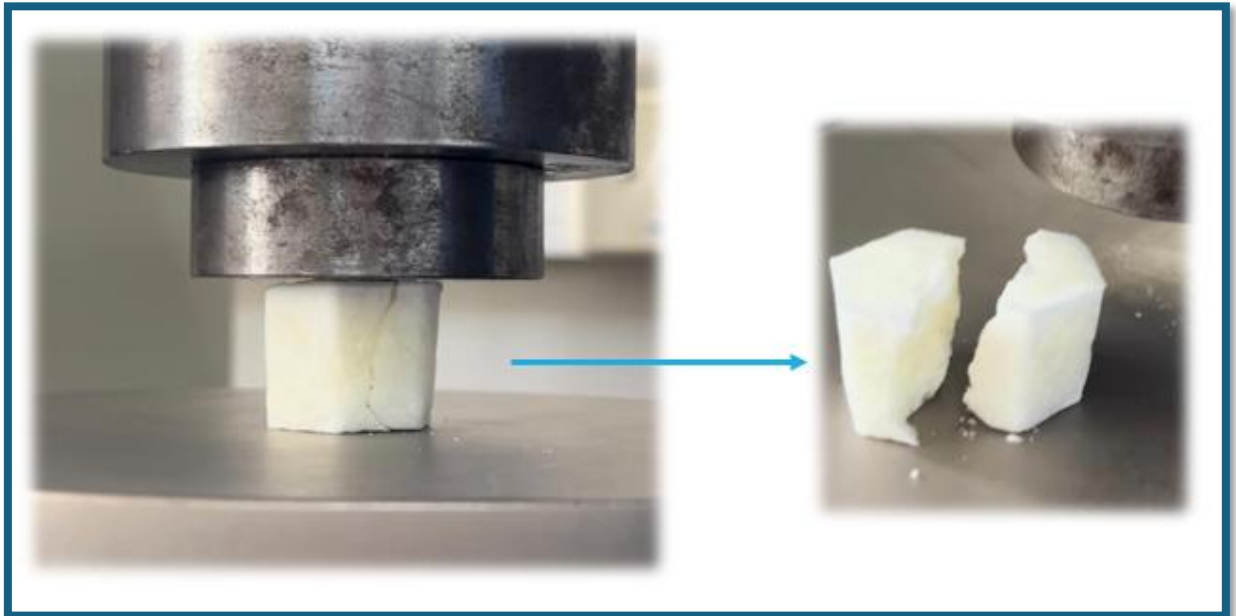


FIGURA 4.19: Ensaio de compressão normal no momento da ruptura da amostra 1.

No grupo colágeno 75% Gelatina 25%, o valor de tensão máxima foi consideravelmente maior com a adição do glutaraldeído quando comparado com a amostra sem glutaraldeído. As deformações de engenharia foram baixas. Não houve diferença significativa entre os valores encontrados quando comparadas as proporções de glutaraldeído 0,5% e 1% nestas amostras.

No grupo colágeno 50% Gelatina 50%, as amostras tiveram um comportamento diferente, pois a amostra sem glutaraldeído apresentou tensão máxima maior que as amostras com a adição do glutaraldeído e as deformações de engenharia foram baixas. Uma observação neste grupo, é que a amostra com a proporção Colágeno 50% e Gelatina 50%, no ponto de vista fabril, teve maior facilidade de elaboração e conformação. É uma amostra 100% factível dentro dos equipamentos e matérias dentro da produção da empresa.

Evidentemente, a amostra considerada ideal depende de onde será aplicada e qual função desempenhará (Scaffolds, curativos de pele, regeneração de

cartilagem, implantes diversos). Todavia, as questões de fabricação são indispensáveis para viabilizar o projeto dentro da empresa.

TABELA 4.2: Resultados obtidos dos ensaios de compressão normal e diametral de todas as amostras de blendas.

AMOSTRAS	Força Máxima Média (N)	Desvio Padrão ( $\sigma$ ) Força máxima	Deformação Máxima Média - l1 (mm)	Desvio Padrão ( $\sigma$ ) Deformação máxima	Tensão Máxima - $\delta$ (MPa)	Deformação de Engenharia - $\epsilon$ (%)
Amostra 9: Blenda 3: PLGA 40% + Colágeno 60% Normal	762,00	198,30	2,56	1,83	2425,21	12,78
Diametral	683,00	211,45	4,38	1,79	2173,77	21,89
Amostra 9.1: Blenda 3.1: PLGA 40% + Colágeno 60% com glutaraldeído 1% Normal	1356,00	136,75	2,39	0,72	4315,72	11,94
Diametral	1106,00	151,45	3,55	0,52	3520,05	17,74
Amostra 11: Blenda 5: PLGA 40% + (Colágeno 75% + Gelatina 25%) 60% Normal	1332,00	130,20	5,09	1,30	4239,34	25,46
Diametral	961,26	201,54	2,25	0,75	3059,38	11,25
Amostra 11.1: Blenda 5.1: PLGA 40% + (Colágeno 75% + Gelatina 25%) 60% com glutaraldeído 1% Normal	1738,00	125,75	1,67	0,21	5531,51	8,32
Diametral	1278,00	133,50	4,78	1,66	4067,47	23,89
Amostra 13: Blenda 7: PLGA 40% + (Colágeno 50% + Gelatina 50%) 60% Normal	1814,54	106,71	6,54	0,26	5775,11	32,70
Diametral	1043,00	58,35	1,10	0,17	3319,54	5,48
Amostra 13.1: Blenda 7.1: PLGA 40% + (Colágeno 50% + Gelatina 50%) 60% com glutaraldeído 1% Normal	1766,00	120,85	2,47	0,24	5620,62	12,37
Diametral	1397,00	112,65	5,39	1,04	4446,21	26,97

Para as blendas, fixou-se o PLGA em 40% para que houvesse tantas variáveis neste grupo e trabalhou-se nas proporções de colágeno e gelatina. Nas blendas em que foi adicionada a gelatina (Blendas 5, 5.1, 7 e 7.1) não se observou diferenças significativas nos valores de tensão máxima entre as amostras com glutaraldeído e sem glutaraldeído. Houve uma grande dificuldade durante a fabricação e moldagem das blendas que tiveram a adição do glutaraldeído devido a sua rigidez. Neste grupo, a formulação da blenda 5 PLGA 40% + (Colágeno 75% + Gelatina 25%)

60%, teve os valores intermediários em relação às demais, e foi a mais interessante do grupo nos pontos de vista fabril e sensorial.

#### **4.7 - Índice de Intumescimento (Ii%)**

A análise de intumescimento é fundamental para avaliar o comportamento desses materiais quando em contato com fluidos biológicos, como a água ou soluções salinas. Essa característica é de extrema importância, especialmente para biomateriais que serão utilizados em implantes, dispositivos médicos ou engenharia de tecidos. O intumescimento é a capacidade que um material tem de inchar quando entra em contato com um meio líquido (53).

Os resultados obtidos nos ensaios de intumescimento, conforme a TABELA 4.3, indicam que as amostras somente com colágeno, dissolvem rapidamente, mesmo com a presença de glutaraldeído. O grupo das misturas de colágeno e gelatina, a amostra 3: Colágeno 50% + Gelatina 50%, teve o maior índice de intumescimento do grupo, sem se deformar. O grau de intumescimento das blendas é baixo, provavelmente por causa do PLGA, que é insolúvel em solventes polares, como a água.

TABELA 4.3: Resultados do ensaio de intumescimento de todas as amostras.

Amostras	Tempo Inicial	1min.	5min.	10min.	20min.	30min.	60min.	Resultado	Desvio padrão
<b>Grupo Colágeno 100% e Gelatina 100%</b>	<b>Peso inicial Médio (g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>(li%) max. Medido</b>	<b>quando aplicável</b>
Amostra A 17: Colágeno 100%	1,54	Dissolveu	-	-	-	-	-	Totalmente Solúvel	N/A
Amostra A 18: Colágeno 100% + 0,5% de glutaraldeído	1,43	Dissolveu	-	-	-	-	-	Totalmente Solúvel	N/A
Amostra A 19: Colágeno 100% + 1% de glutaraldeído	1,24	Dissolveu	-	-	-	-	-	Totalmente Solúvel	N/A
Amostra 2: Gelatina 100%	1,24	1,47	1,82	2,3	2,75	3,37	3,81	207,26	29,61
<b>Grupo Misturas Colágeno e Gelatina</b>	<b>Peso inicial Médio (g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>(li%) max. Medido</b>	<b>Desvio padrão</b>
Amostra 1: Colágeno 75% + Gelatina 25%	1,81	5,04	5,1	rompeu	-	-	-	181,77	25,97
Amostra 4: Colágeno 75% + Gelatina 25% + 0,5% de glutaraldeído	1,63	3,76	4,15	5,37	4,53	4,78	4,95	203,68	29,10
Amostra A15: Colágeno 75% + Gelatina 25% + 1% de glutaraldeído	1,42	4,76	rompeu	-	-	-	-	235,21	33,60
Amostra 3: Colágeno 50% + Gelatina 50%	1,84	2,35	3,75	4,95	5,74	6,51	7,03	282,07	40,30
Amostra 5: Colágeno 50% + Gelatina 50% + 0,5% de glutaraldeído	1,64	2,12	2,43	2,73	3,02	3,42	4,09	149,39	21,34
Amostra 6: Colágeno 50% + 50% Gelatina + 1% de glutaraldeído	1,46	4,08	4,76	5,19	5,53	rompeu	-	73,60	10,51
<b>Grupo Blendas</b>	<b>Peso inicial Médio (g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>(li%) max. Medido</b>	<b>Desvio padrão</b>
Amostra 9: Blenda 3: PLGA 40% + Colágeno 60%	5,87	5,89	5,93	6,02	6,02	6,02	6,14	4,60	0,66
Amostra 9.1: Blenda 3.1: PLGA 40% + Colágeno 60% com glutaraldeído 1%	6,86	6,85	6,82	6,95	6,96	6,99	7,09	3,35	0,48
Amostra 11: Blenda 5: PLGA 40% + (Colágeno 75% + Gelatina 25%) 60%	6,41	6,45	6,54	6,78	6,73	6,87	6,97	8,74	1,25
Amostra 11.1: Blenda 5.1: PLGA 40% + (Colágeno 75% + Gelatina 25%) 60% com glutaraldeído 1%	6,95	7,07	7,18	7,18	7,34	7,44	7,54	8,49	1,21
Amostra 13: Blenda 7: PLGA 40% + (Colágeno 50% + Gelatina 50%) 60%	6,55	6,66	6,79	6,92	7,1	7,24	7,47	14,05	2,01
Amostra 13.1: Blenda 7.1: PLGA 40% + (Colágeno 50% + Gelatina 50%) 60% com glutaraldeído 1%	6,15	6,28	6,39	6,47	6,55	6,76	6,83	11,06	1,58

## 4.8 - Ensaio de Citotoxicidade

Os resultados mostraram que as amostras analisadas não apresentaram nenhum efeito tóxico para a linhagem celular NCTC Clone 929 (CCIAL 020), que são células de tecido conjuntivo de camundongo. Segundo a Farmacopeia Brasileira e a norma ISO 10993-5, se a amostra apresentar grau de reatividade até 2, não será considerada citotóxica. Um ensaio de extrema importância para biomateriais de classe 4, que está integrado nos ensaios de biocompatibilidade do produto, que é um dos fatores que indica a viabilidade do projeto.

TABELA 4.4: Resultados dos ensaios de citotoxicidade realizados em 7 amostras.

Amostra 1: Colágeno 75% + Gelatina 25%			
Amostra	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Amostra 1	0	0	0
Controle positivo	4	4	4

Teste finalizado em 28/03/2023

Amostra 2: Gelatina 100%			
Amostra	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Amostra 2	0	0	0
Controle positivo	4	4	4

Teste finalizado em 04/04/2023

Amostra 3: Colágeno 50% + Gelatina 50%			
Amostra	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Amostra 3	1	1	1
Controle positivo	4	4	4

Teste finalizado em 28/03/2023

Amostra 4: Colágeno 75% + Gelatina 25% + 0,5% de glutaraldeído			
Amostra	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Amostra 4	0	0	0
Controle positivo	4	4	4

Teste finalizado em 31/03/2023

Amostra 6: Colágeno 50% + 50% Gelatina + 1% de glutaraldeído			
Amostra	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Amostra 6 6)	0	0	0
Controle positivo	4	4	4

Teste finalizado em 31/03/2023

Amostra A 17: Colágeno 100%			
Amostra	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Amostra A17	0	0	0
Controle positivo	4	4	4

Teste finalizado em 04/04/2023

Amostra 9: Blenda 3: PLGA 40% + Colágeno 60%			
Amostra	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Amostra 9	0	0	0
Controle positivo	4	4	4

Teste finalizado em 04/04/2023

## 4.9 - Projeção Preliminar de Custos de Produção

Com a finalidade de estimar um preço para o produto, considerou-se os cálculos das matérias-primas utilizadas, embalagens, gastos com energia elétrica, mão de obra e gastos com terceiros. Multiplicou-se o valor pelo fator de correção 2,35 que engloba os impostos por categoria de produto e o lucro de 50%. Esse fator de correção é calculado pelos setores responsáveis da empresa, que são: comercial, jurídica e diretoria. Também foi calculado o valor para um lucro de 200%.





FIGURA 4.20: (a) Produto Bio-Gide, da empresa Geistlich. (b) Produto Lumina Coat, da empresa Critéria.

## 5 - Conclusões

Pode-se concluir que a mistura de gelatina e colágeno para a formulação do biomaterial é mais promissora que o uso somente do colágeno, mesmo após a adição do glutaraldeído, devido a fragilidade apresentada nestas amostras. Os resultados obtidos nos ensaios de compressão indicaram que as formulações das blendas com PLGA aumentaram em mais de 10 vezes a resistência mecânica dos materiais, mantendo deformações da mesma ordem ou inferiores, quando comparados com as misturas de colágeno e gelatina. Nestas, não se observou diferenças significativas nos valores de força máxima e tensão máxima entre as amostras com glutaraldeído e sem glutaraldeído.

A determinação do índice de intumescimento inferiu que a amostra 3: Colágeno 50% + Gelatina 50%, teve o maior índice de intumescimento (282,07%), sem destruição da amostra.

Os difratogramas de raios x mostraram que as amostras possuem características amorfas. As curvas termogravimétricas indicaram os picos de DTG das misturas de colágeno e gelatina entre 300 e 330°, que são referentes à degradação dos polímeros. Por meio dos espectros de FTIR observou-se a presença das bandas dos grupos funcionais característicos para o PLGA, colágeno e gelatina e não se observou picos referentes a contaminação.

Os ensaios de citotoxicidade, realizados em 7 amostras aleatórias, mostraram que as amostras não são citotóxicas mesmo quando elas foram feitas com

glutaraldeído. Este é um resultado excelente, e é um dos principais indicativos de viabilidade do projeto.

A análise preliminar de custos de produção indicou que, apesar de o PLGA ser muito caro quando se comparado com as demais matérias-primas, ele não é o determinante para o valor final (projetado) do produto, mas sim as embalagens específicas para produtos médicos (ex. blísteres de grau médico).

Este estudo forneceu duas opções viáveis e factíveis de formulações, no ponto de vista fabril na DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA, as quais não apresentaram dificuldades de elaboração e conformação e tiveram bons resultados nos ensaios de compressão. São as amostras:

- Amostra 3: Colágeno 50% e Gelatina 50%; e,
- Amostra 11: Blenda 5: PLGA 40% + (Colágeno 75% + Gelatina 25%) 60%.

Embora este estudo não tenha fornecido o grau de reticulação das amostras em que o agente reticulante (glutaraldeído) foi adicionado, as amostras consideradas viáveis não possuem glutaraldeído na formulação.

Por oportuno, vale salientar que as amostras consideradas ideais dependem das suas aplicações, isto é, onde serão aplicadas e quais funções desempenharão, como: *scaffolds*, curativos de pele, regeneração de cartilagem, implantes em geral. Todavia, as questões de fabricação correspondem a mais um fator indispensável que indica viabilidade do projeto.

Este estudo representa o primeiro passo da empresa com a pesquisa de formulações de biomateriais a base de colágeno. Como sugestão para trabalhos futuros destacamos os próximos passos a seguir:

- ❖ Concluir a análise mercadológica, ou seja, contactar a área comercial da empresa, médicos e cirurgiões para definição da formulação ideal, relacionado ao uso pretendido do biomaterial, em comparação com produtos que já estejam no mercado e com novas tecnologias que ainda estão sendo desenvolvidas.
- ❖ Concluir o método de esterilização e realizar estudo de estabilidade e prateleira as amostras escolhidas.

- ❖ Avaliação do potencial de regeneração cartilaginosa a partir de ensaio da proliferação celular.
- ❖ Realizar todos os testes de biocompatibilidade, de acordo com a ISO 10993.
- ❖ Avaliar a possibilidade de trabalhar com colágeno sintético.

## 6 - Referências

- 1 PARK, H. et al. Alginate hydrogels modified with low molecular weight hyaluronate for cartilage regeneration. **Carbohydrate polymers**, v. 162, p. 100-107, 2017.
- 2 FISCHER, S.; KISSER, A. Single-step scaffold-based cartilage repair in the knee: A systematic review. **Journal of Orthopaedics**, v. 13, p. 246-253, 2016.
- 3 GOLDBERG, A. et al. The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v.12, p.39, 2017.
- 4 ZHU, D. et al. Elastin-like protein-hyaluronic acid (ELP-HA) hydrogels with decoupled mechanical and biochemical cues for cartilage regeneration. **Biomaterials**,v. 127, p.132-140, 2017.
- 5 CHEN, W. M. et al. Groove fibers based porous scaffold for cartilage tissue engineering application. **Materials Letters**, v.192, p. 44-7, 2017.
- 6 JEONG, E. S. et al. Three-Dimensional Duck's Feet Collagen/ PLGA ScaffoldforChondrification: Role of Pore Size and Porosity. **Journal of Biomaterials Science**, Polymer Edition, 2017.
- 7 CHANG, N. J. et al. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells in porous PLGA scaffolds create a microenvironment for the regeneration of hyaline cartilage in rabbits. **Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society**, v. 21, p.1613-1622, 2013.
- 8 ZHANG, X. et al. The effects of lactate and acid on articular chondrocytes function: Implications for polymeric cartilage scaffold design. **Acta biomaterialia**, v. 42, p. 329-340, 2016.
- 9 ZHAO, X. et al. Conditions for seeding and promoting neo-auricular cartilage formation in a fibrous collagen scaffold. **Journal of cranio-maxillo-facial surgery: official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, p. 382-389, 2015.
- 10 WANG, J. et al. Collagen/silk fibroin composite scaffold incorporated with PLGA microsphere for cartilage repair. **Materials science & engineering C, Materials for biological applications**, v. 61, p.705-711, 2016.
- 11 PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.
- 12 MEDEIROS, A. C.; FILHO, I. A.; CARVALHO, M. D. F. Fios de Sutura. **Journal of Surgical Clinical Research**, Natal- RN, v. 7, n. 2, p. 74-86, 2016.
- 13 RATNER, D. B. An introduction to Materials in Medicine. 1ª Ed. San Diego – USA, Elsevier, 1996.
- 14 LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. (Eds). Principles of Tissue Engineering. 5ª Ed. (S.I.): Elsevier, 2020.
- 15 WONG, J. Y.; BRONZINO, J. D. Biomaterials. Taylor & Francis Group: New York, 2007.

- 16 HEATH, D. E.; COOPER, S. L. Em *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E. Eds. Academic Press: Oxford, cap. 1.2.2. Polymers: Basic Principles, 2013.
- 17 LUNA, C. B. B.; et al. Desenvolvimento de Blendas Poliméricas Visando a Tenacificação dos Polímeros: Uma Revisão. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 31, n. 1, p. 67-68, 2015.
- 18 ANGELOVA, N.; HUNKELER, D.; Rationalizing the design of polymeric biomaterials. **Elsevier Science Ltd**, v. 17, p. 409, 1999.
- 19 COLEMAN, M. M.; GRAF, J. F.; PAINTER, P. C. Specific Interactions and Miscibility of Polymer Blends. **Technomic Publishing Company**. Lancaster, Pennsylvania, p. 1-10, 1991.
- 20 UTRACKI, L. A. *Polymer Blendas Handbook*, Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Cap. 7, p. 449-546, 2003.
- 21 TONHI, E.; PLEPIS, A. M. DE G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943–948, nov. 2002.
- 22 SILVA, R. N. Influência do Teor de Plastificante e da Argila Vermiculita Organolífica no Estudo da Degradação Hidrolítica da Matriz Polimérica de Polihidroxibutirato (PHB). Universidade Federal do Piauí – UFPI. 2017, 161 f. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Materiais.
- 23 PAOLI, M. A. Degradação e Estabilização de Polímeros 2ª Versão Online (Revisada), 2008. Pg. 109-111.
- 24 SANTOS, C. G. et al. Uso de Blendas Poliméricas em Nano e Microencapsulação. **Disciplinarum Scientia**. Série: Naturais e Tecnológicas, Santa Maria, v. 16, n. 2, p. 311-323, 2015. ISSN 2176-462X.
- 25 AMBRÓSIO, J. D. et al. Influência das condições de processamento na obtenção de blendas PBT/ABS. **Polímeros**, v. 20, n. 4, p. 315–321, 2010.
- 26 SUN, S. et al. Effect of ABS Grafting Degree and Compatibilization on the Properties of PBT/ABS Blends. **Polymer Composites**, p.484-492, 2007.
- 27 PORTO, A S. Modificação de Blendas de Polipropileno e Politereftalato de Etileno Reciclado com Argilas Organolíficas de diferentes Polaridades. Universidade Estadual de Campinas, 2018, 136 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.
- 28 CARPIO, K. C. R. et al.. Extraction and characterization of collagen from the skin of Amazonian freshwater fish pirarucu. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 56, p. e12564, 2023.
- 29 PRESTES, R C. Colágeno e seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, Vol.15, Nº 1, 65-74, 2013.
- 30 LEE, C H.; SINGLA, A; LEE, Y. Biomedical Applications of Collagen. **International journal of pharmaceutics**, Vol. 221, 1-22. 2001.
- 31 CRUSCA, J. S.; et al. Avaliação citotóxica de esponja de colágeno e quitosana. Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica. 2014.

- 32 CHEN, J.; et al., Release Kinetics of Tilapia Scale Collagen I Peptides During Tryptic hydrolysis, **Food Hydrocolloids**. 2017.
- 33 LEE, J E; et al. Effects of controlled released TGF-  $\beta$ 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen / chitosan / Glycosaminoglycan scaffold. **Biomaterials**, Vol. 25, 4163 - 4173. 2004.
- 34 PATIL, V. A., MASTERS, K. S. Engineered Collagen Matrices. **Bioengineering**, 2020.
- 35 ALINA, S. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: review, **Prog. Polym. Sci.**, v.36, p. 1254–1276, 2011.
- 36 GMIA Members. Gelatin Handbook: Gelatin Manufacturers Institute of America. GMIA, 2012.
- 37 DUCONSEILLE, A.; et.al. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*, v. 43, p. 360-376, 2015.
- 38 CRISTIANO, C. M. Z. Blendas formadas por caseína e gelatina: efeito da adição de plastificante e de agente reticulante e interações com copolímeros. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009. Tese de Doutorado em Química.
- 39 GENTILE, P. et al. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, p. 3640-3659, 2014.
- 40 GUO, T. et al. 3D Printing PLGA: A Quantitative Examination of the Effects of Polymer Composition and Printing Parameters on Print Resolution. **Biofabrication**, v. 9, n. 2, 2012.
- 41 POITOUT, D. G. (Ed.). Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics. 2<sup>a</sup> ed. [S.I.]: Springer, 2016.
- 42 AVGOUSTAKIS, K. Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA). In: Wnek, G. E.; Bowlin, G. L. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. 2. ed. [S.I.]: Taylor & Francis, v. 1, p. 2259 – 2268, 2008.
- 43 MAKADIA, H.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, p. 1377-1397, 2011.
- 44 FERREIRA, A. B.; SALES, AFR.; DA SILVA, SN., et.al. Influência do colágeno tipo I na propriedade físico-química, morfológica e biológica de blendas poliméricas de PLGA para aplicação oftálmica. **Revista Matéria**, v. 27, n. 1, p. 1-16, 2022.
- 45 JAYAKRISHNAN; S.R. JAMEELA. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and DRug delivery matrices. **Biomaterials**, v.17, p.471-484, 1996.
- 46 GONSALES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M.; SOARES, N.A.; GOULART, M.O.F.; ABREU, F.C., Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Quim. Nova*, v.34, p. 1215-1223, 2011.
- 47 WANG, T, et al Selected properties of pH-sensitive, biodegradable quitosana-poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v.53, p.911-918, 2004.

- 48 MONTEIRO JÚNIOR., O.A.C.; AIROLDI, C.; Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.26, p. 119-128, 1999
- 49 HAN WH, WANG QY, KANG YY, SHI LR, LONG Y, ZHOU X, HAO CC. Cross-linking electrospinning. *Nanoscale*. 2023 Oct 5;15(38):15513-15551. doi: 10.1039/d3nr03956k. PMID: 37740390.
- 50 Sistema SE Suite (Softexpert) - Módulo de Documentos.
- 51 P. W. ATKINS, T. L. OVERTON, J. P. ROURKE, M. T. WELLER, F. A. ARMSTRONG, Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry, W. H. Freeman and Company, 5ª edição, 2010.
- 52 L. E. SMART, E. A. MOORE, Solid State Chemistry, Taylor & Francis Group, 4ª edição, 2012.
- 53 D. L. PAVIA, G. M. LAMPMAN, G. S. KRIS, Introduction to Spectroscopy, 3ª edição. Thompson Learning, 2001.
- 54 B. A. DEDAVID, C. I. GOMES, G. MACHADO, Microscopia Eletrônica de Varredura, **EDIPUCRS**, 2007.
- 55 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D695 – 10. Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics, West Conshohocken, PA, USA, 2010.
- 56 CAVALCANTI, O. A.; VAN DEN MOOTER, G.; CARAMICO SOARES, I.; KINGET, R. Polysaccharides as excipients for colon-specific coating. Permeability and swelling properties of casted films. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v. 28, n. 2, p. 157 - 164, 2002.
- 57 ASTETE, C.E.; SABLIOV, C.M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. **J Biomater Sci Polym**, v. 17, p. 247-289, 2006.
- 58 SCHILDT, L.F.L., IMPRESSÃO 3D DE BLOCOS DE BIOMATERIAL COMPÓSITO DE PLGA E  $\beta$ -TCP VISANDO APLICAÇÕES MÉDICAS EM ENXERTOS E IMPLANTES. Programa de Pós-graduação em Química - UFSCar, 2020. Dissertação de Mestrado profissional.
- 59 YOU, y. et al. The Retention and Drainage Behavior of Cross-linked Gelatin with Glutaraldehyde in a Papermaking System. **BioResources**, v.11, n. 3, p. 6162-617, 2016.
- 60 <https://loja.criteria.com.br/produtos/lumina-coat/>. Acesso em 11 dezembro 2024.
- 61 [https://www.dentalvidafarma.com.br/membrana-reabsorvivel-bio-gide-25x25mm---geistlich-11234/p?idsku=7500&utm\\_source=google\\_search&utm\\_medium=criativos.novos&utm\\_campaign=pmax\\_venda\\_criativos.novos&utm\\_source=&utm\\_medium=&utm\\_campaign=&utm\\_content=&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAjeW6BhBAEiwAdKItMiO\\_EfNpIfMSrfagCkT40RieK52PxqGsX5hJqXvHj5LV2aVF9ZQX9BoCf90QAvD\\_BwE](https://www.dentalvidafarma.com.br/membrana-reabsorvivel-bio-gide-25x25mm---geistlich-11234/p?idsku=7500&utm_source=google_search&utm_medium=criativos.novos&utm_campaign=pmax_venda_criativos.novos&utm_source=&utm_medium=&utm_campaign=&utm_content=&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAjeW6BhBAEiwAdKItMiO_EfNpIfMSrfagCkT40RieK52PxqGsX5hJqXvHj5LV2aVF9ZQX9BoCf90QAvD_BwE). Acesso em 11 dezembro 2024.