VALCINIR ALOISIO SCALLA VULCANI

**MATRIZES DE COLÁGENO PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE PROGESTERONA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2004

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais Valcinir e Ivani, que além da vida, me deram apoio e orientação. Renunciaram, muitas vezes, de seus sonhos, em favor dos meus e permitiram que cada etapa da vida se transformasse em conquista.

Ao meu irmão Alessandro, à minha cunhada Renata e ao meu sobrinho Gabriel, por serem testemunhas e incentivadores dos meus projetos.

À minha querida Ana Paula, pelo companheirismo e paciência pelas vezes que não estive presente, ocupado com meus afazeres.

Ao meu amigo Daniel, pela força e lealdade.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Ana Maria de Guzzi Plepis, pela orientação, incentivo, oportunidade e conhecimentos profissionais transmitidos.

À Virginia, ao Ézer e ao Glauco pelos serviços, favores, ensinamentos e companheirismo durante os trabalhos no laboratório.

Aos companheiros do laboratório: Cristien, Márcio, Fátima, Adriana, Fernando.

Ao Prof. Sérgio e ao Gimaldo pelo auxílio no término do trabalho.

Aos funcionários da seção de alunos da Bioengenharia: Janete, Nelson e a aos Professores, pelos serviços e ensinamentos.

Aos funcionários da biblioteca do IQSC e da EESC.

Aos meus amigos Gilberto, Mário, Guilherme, Celso, Fred e Marquinho. Apesar da distância são amigos que continuam incentivando meus trabalhos e conquistas

À Capes pela bolsa concedida.

“A ciência não é uma ilusão; ilusão seria buscar em outro lugar o que ela nos proporciona”.

S. Freud

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I-INTRODUÇÃO.....	1
I.1- Biomateriais.....	1
I.2- Colágeno.....	2
I.3- Liberação controlada de fármacos.....	6
I.4- Hormônios Esteróides.....	11
I.4.1 - Progesterona.....	11
I.5- Ciclo estral.....	13
I.6- Materiais e métodos para a sincronização do ciclo estral.....	15
II- OBJETIVOS.....	19
III- PARTE EXPERIMENTAL.....	20
III.1 - Obtenção de colágeno aniônico.....	20
III.2 - Caracterização do colágeno.....	21
III.2.1- Determinação da concentração de colágeno por liofilização.....	21
III.2.2- Determinação das massas moleculares por eletroforese.....	21
III.2.3- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	24
III.3 - Preparação das matrizes de colágeno.....	24
III.3.1- Preparação das matrizes de colágeno contendo progesterona.....	25
III.4- Caracterização das matrizes de colágeno	25

III.4.1- Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	25
III.4.2- Estabilidade térmica.....	25
III.4.3- Hidratação das matrizes de colágeno por tampão PBS.....	26
III.4.4- Microscopia eletrônica de varredura.....	27
III.4.5- Estabilidade biológica (degradação por collagenase)	27
III.4.6- Determinação da quantidade de progesterona nas matrizes de colágeno.....	28
III.4.7- Ensaios de liberação de progesterona <i>in vitro</i>	29
IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
IV.1 - Caracterização do colágeno	30
IV.1.1- Determinação da concentração do colágeno por liofilização.....	30
IV.1.2- Determinação das massas molares por eletroforese.....	30
IV.1.3- Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	33
IV.2- Caracterização das matrizes de colágeno	35
IV.2.1- Aspecto macroscópico das matrizes.....	35
IV.2.2- Estabilidade térmica.....	36
IV.2.3- Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	39
IV.2.4- Estabilidade biológica.....	40
IV.2.5- Hidratação das matrizes de colágeno por tampão PBS.....	42
IV.2.6- Microscopia eletrônica de varredura.....	43
IV.2.7- Determinação da quantidade de progesterona nas matrizes de colágeno.....	48
IV.2.8- Ensaios de liberação de progesterona <i>in vitro</i>	49
V- CONCLUSÕES.....	55
VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colgênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.....	3
FIGURA 2.	Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos convencionais de multidosagem (a) e sistemas de liberação controlada (b) ⁴³ . A = administração do fármaco.....	8
FIGURA 3.	Estrutura molecular da progesterona e de seus análogo sintéticos.....	12
FIGURA 4.	Representação esquemática da produção e regulação hormonal durante o ciclo estral.....	14
FIGURA 5.	Prostaglandina sintética injetável para sincronização do ciclo estral.....	17
FIGURA 6.	Pesário para liberação intravaginal de progesterona PRID®.....	17
FIGURA 7.	Representação esquemática de veículos não degradáveis para a liberação intravaginal de progesterona.....	18
FIGURA 8.	Aplicação subcutânea de progesterona em matriz de silicone na orelha de fêmea bovina.....	18
FIGURA 9.	Esquema representativo da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas	21
FIGURA 10.	Curva de calibração de progesterona em etanol.....	29
FIGURA 11.	Curva de calibração de progesterona em tampão PBS.....	30
FIGURA 12.	Gel de eletroforese em poliacrilamida/SDS (10%). (a) gel das proteínas utilizadas como padrão: (1)- β -galactosidase, (2)-fosforilase, (3)-albumina bovina; (4)-ovoalbumina e (b) amostra de colágeno (pH 3,5).....	32
FIGURA 13.	Curva de calibração para determinação da massa molar dos constituintes do colágeno.....	32

FIGURA 14.	Curva densitométrica para o colágeno (pH 3,5), em gel de poliacrilamida/SDS 7%, corados com Coomassie Brilhante Azul R-250.....	33
FIGURA 15.	Espectro de absorção no infravermelho para membrana de colágeno (24h).....	34
FIGURA 16.	Fotografia digital da matriz de colágeno e colágeno contendo 10% de progesterona.....	35
FIGURA 17.	Curvas termogravimétricas para colágeno, progesterona, colágeno contendo 5% de progesterona e colágeno contendo 10% de progesterona em N ₂ , (vazão: 90mL min ⁻¹), β=10°Cmin ⁻¹	36
FIGURA 18.	Curvas DSC para Colágeno 24h, progesterona, colágeno contendo 5% de progesterona e colágeno contendo 10% de progesterona em N ₂ (vazão: 90mL min ⁻¹), β = 10°C min ⁻¹	39
FIGURA 19.	Espectro de absorção no infravermelho para membrana de colágeno, colágeno contendo 10% de progesterona e progesterona.....	40
FIGURA 20.	Perda de massa das matrizes de colágeno, colágeno contendo 5% e 10% de progesterona, sob ação de hidrólise enzimática por colagenase à temperatura de 37oC.....	41
FIGURA 21.	Fotomicrografia da matriz de colágeno em aumento de 100 vezes.....	44
FIGURA 22.	Fotomicrografia da matriz de colágeno em aumento de 500 vezes.....	44
FIGURA 23.	Fotomicrografia da matriz de colágeno contendo 5% de progesterona em aumento de 100 vezes.....	46
FIGURA 24.	Fotomicrografia da matriz de colágeno contendo 5% de progesterona em aumento de 500 vezes. Setas apontando cristais de progesterona.....	46

FIGURA 25.	Fotomicrografia da matriz de colágeno contendo 10% de progesterona em aumento de 100 vezes.....	57
FIGURA 26.	Fotomicrografia da matriz de colágeno contendo 10% de progesterona em aumento de 500 vezes. Setas apontando cristais de progesterona.....	47
FIGURA 27.	Liberação cumulativa (mg) <i>in vitro</i> de progesterona suportada em matrizes de colágeno, nas proporções de 5% e 10%.....	49
FIGURA 28.	Liberação cumulativa (%) <i>in vitro</i> de progesterona suportada em matrizes de colágeno, nas proporções de 5% e 10%.....	50
FIGURA 29.	Sistema Matriz de liberação por difusão de fármaco.....	51
FIGURA 30.	Liberação cumulativa (%) <i>in vitro</i> de progesterona suportada em matrizes de colágeno, nas proporções de 5% e 10%.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Aplicações biomédicas do colágeno.....	6
TABELA 2. Preparação dos géis utilizados na eletroforese.....	22
TABELA 3. Perda de massa das amostras Co, CP5 e CP10, sob ação de hidrólise enzimática por collagenase à temperatura de 37°C (N = 3).....	41
TABELA 4. Porcentagem de hidratação por PBS das amostras Co, CP5 e CP10.....	43
TABELA 5. Eficiência de incorporação de progesterona nas matrizes de colágeno.....	48
TABELA 6. Extrapolação da quantidade de progesterona liberada diariamente pelas amostras CP5 e CP10 em 24000mL de tampão fosfato salino (pH 7,4).....	53

RESUMO

VULCANI, V. A. S. (2003). *Matrizes de Colágeno para Liberação Controlada de Progesterona*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

O hormônio progesterona é utilizado para tratamento de infertilidade, anticoncepção e problemas ovarianos. Na medicina veterinária, além dessas aplicações, a progesterona é utilizada para a sincronização do ciclo estral das fêmeas economicamente exploráveis, otimizando as técnicas de reprodução, como a inseminação artificial e a transferência de embriões. Devido à sua baixa capacidade imunogênica, atoxicidade e abundância na natureza, o colágeno é um biopolímero que têm sido amplamente empregado para fins biomédicos. Neste trabalho obteve-se matrizes de colágeno e colágeno contendo progesterona nas proporções de 5% e 10% sobre a massa de colágeno (m/m), estudou-se a interação entre o hormônio e o biopolímero e a liberação de progesterona. Analisou-se, também, nas matrizes: estabilidade térmica, por TG e DSC; capacidade de hidratação por tampão PBS; morfologia, por microscopia eletrônica de varredura e estabilidade biológica, por ensaios *in vitro* de hidrólise enzimática do colágeno por collagenase. Observou-se que a presença de progesterona nas matrizes de colágeno não alterou a capacidade de hidratação por tampão, aumentou a resistência frente à degradação enzimática e diminuiu a temperatura de degradação do colágeno. A incorporação manual do hormônio apresentou cerca de 88% de eficiência e os ensaios de liberação mostraram que a incorporação a 5% (m/m) libera mais rapidamente que a incorporação a 10%, sugerindo a dispersão do hormônio nas matrizes colagênicas. Os dados obtidos apontam a possibilidade da construção de um sistema de liberação usando colágeno aniônico para liberar a quantidade necessária de progesterona por períodos de até 10 dias, tempo necessário para a sincronização do ciclo estral em fêmeas bovinas.

Palavras-chave: Colágeno; Progesterona; Liberação controlada; Sincronização; Ciclo estral.

ABSTRACT

VULCANI, V. A. S. (2003). *Collagen matrices for Controlled Release of Progesterone*. M.Sc.Dissertation – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

Progesterone is an hormone used for treatment of infertility, contraception and to control ovarian problems in some species. In veterinary medicine, beyond these applications, progesterone is also used for estral cycle synchronization, and to optimizing reproduction techniques, like artificial insemination and embryos transfer in the economically explored species. Due to its low immunogenic capacity, low toxicity and abundance in the nature, collagen is a biopolymer that have been widely used for biomedical purposes. In this work collagen matrices with progesterone loadings of 5% and 10% (w/w) were prepared and characterized by thermal stability (TG and DSC), hydration capacity (PBS buffer), morphology by electronic microscopy, biological stability by *in vitro* hydrolysis of collagen by collagenase, and *in vitro* progesterone release assays. It was observed that the progesterone did not modify the hydrate capacity, increased the resistance to enzymatic degradation and diminished degradation temperature of the collagen. Manual incorporation of the hormone presented about 88% of efficiency and the release assays had showed that 5% (w/w) loading matrix liberates more quickly the hormone than 10% loading matrix, suggesting the dispersion of the hormone in the collagen. Obtained results pointed to the possibility of using anionic collagen in the development of a release system that could potencialy be used to deliver progesterone over an extend period of about 10 days, an ideal period for estral cycle synchronization in calves.

Keywords: collagen; progesterone; controled release; synchronization; estral cycle

I. INTRODUÇÃO

I.1. – Biomaterial

O termo biomaterial compreende qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada ou incorporada por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter a sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido¹.

A utilização de biomateriais para o reparo de tecidos vivos tem aumentado consideravelmente nas últimas três décadas, graças ao desenvolvimento de novos materiais e a uma melhor compreensão dos mecanismos de sua interação com os organismos vivos¹.

Atualmente pretende-se produzir materiais não disponíveis para fins biomédicos, os quais sejam compatíveis, funcionais e duráveis, quando interagentes com sistemas biológicos^{1,2}.

Os biomateriais são classificados em³:

- biomateriais sintéticos: cerâmicas, metais, polímeros sintéticos;
- biomateriais naturais: colágeno, seda, queratina, polissacarídeos e tecidos naturais;
- biomateriais compósitos: compostos por mais de um tipo de material.

A aplicação dos biomateriais ocorre nos mais diversos campos da medicina, como por exemplo: próteses em ortopedia ou cirurgia cardiovasculares, órgãos artificiais, materiais para reparação de tecidos e sistemas de liberação de fármacos⁴.

Algumas características são fundamentais para se utilizar materiais em organismos vivos³:

- ser biocompatível, isto é, não induzir respostas teciduais ou imunológicas;
- não ser tóxico nem carcinogênico;
- ser quimicamente estável;

- ter estabilidade mecânica adequada;
- ter peso, densidade e forma adequados;
- ser relativamente barato, reprodutível e de fácil fabricação; e
- ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função para a qual foi projetado com o máximo de eficiência.

Dentre estas características, a biocompatibilidade é a mais importante, pois a biofuncionalidade do material só poderá se manifestar caso haja biocompatibilidade.

Quando um material estranho entra em contato com os fluídos biológicos, respostas de proteção são desencadeadas e se manifestam como processos inflamatórios ou imunológicos, visando a eliminação do corpo estranho. Portanto, o bom desempenho de um biomaterial pós-implante está associado a um equilíbrio entre biocompatibilidade e biofuncionalidade^{1,3}.

Segundo Hench⁵, biocompatibilidade não é apenas a ausência de rejeição, mas envolve também a interação entre o implante e o tecido adjacente. Portanto, pode-se distinguir termos como bioinércia, quando ocorre a formação de uma cápsula fibrosa não aderente ao redor do implante e bioatividade, quando o material interage com os tecidos adjacentes de forma semelhante à parte natural que eles substituem.

Dependendo da aplicação do biomaterial, a biodegradabilidade é também uma característica importante, como por exemplo em suporte de crescimento de tecidos e em sistemas de liberação de fármacos, nas quais a matrizes implantadas não são retiradas após término de sua função e sim degradadas pelo organismo⁶⁻⁸.

I.2. – Colágeno

Os organismos animais pluricelulares são abundantemente constituídos de colágeno, uma proteína cuja principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta resistência elástica⁹.

Além de seu papel estrutural nos tecidos, o colágeno apresenta também a função de orientar tecidos em desenvolvimento^{10, 11}, fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial.

Dentre os vários tipos de colágeno existentes, o colágeno do tipo I, o mais abundante, tem como unidade básica o tropocolágeno, uma macromolécula linear, semiflexível com cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. O tropocolágeno tem uma massa molecular média de 300.000 Da¹², formada por três cadeias polipeptídicas denominadas de cadeias α , duas iguais (α_1) e uma diferenciada (α_2), contendo cada uma 1055 e 1029 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A estrutura primária destas unidades é caracterizada pela repetição do triplete Glicina (Gly), com conteúdo de 33%, Prolina (Pro), 12% e Hidroxiprolina (Hypro) 11% . No conjunto, sua estrutura é helicoidal na forma de uma tripla hélice estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (Figura 1).

FIGURA 1. Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla⁹⁻¹².

Através das interações entre as moléculas de tropocolágeno, tem-se a formação de microfibrilas, a menor unidade estrutural do tecido conjuntivo que podem ser vistas em microscópio eletrônico de varredura como um filamento fino de 4 nm¹⁴.

Após a formação das microfibrilas, inicia-se o processo de agregação denominado fibrilogênese¹⁶ para formar fibrilas insolúveis. Este processo *in vitro*, mostrou-se ser dependente da temperatura, força iônica e acidez e as fibrilas reconstituídas possuem características estruturais idênticas daquelas formas *in vivo*¹⁵.

Como a formação das fibras no colágeno do tipo I ocorre a pH 6,4, tem-se neste valor a máxima interação eletrostática entre as moléculas de tropocolágeno, fazendo com que a resultante de cargas na molécula seja igual a zero¹⁶.

No entanto, através de reações de esterificação, pode-se modificar a resultante das cargas produzindo matrizes carregadas positivamente (matrizes catiônicas), utilizadas como suporte para crescimento celular¹⁷. Sua aplicação como biomaterial é restrita, já que é um material altamente trombogênico quando comparada com matrizes de carga nula (nativas)¹⁸.

A produção de matrizes carregadas negativamente (matrizes aniônicas) pode ser feita por succinilação, tratamento com glutaraldeído¹⁹, desaminação do grupo ε-amino da lisina²⁰, proteção dos grupos guanidínicos dos resíduos de arginina²¹ ou através da hidrólise seletiva dos grupos amida das cadeias laterais dos resíduos de asparaginas e glutamina da proteína²². As matrizes aniônicas são utilizadas como suporte para crescimento ósseo e em sistemas de liberação de fármacos²³.

Até a década de 1980 a utilização do colágeno como biomaterial era restrita à produção de fios cirúrgicos principalmente devido à dificuldade de sua obtenção. A partir de então, a introdução de novos processos de obtenção de colágeno associadas à novas potencialidades de aplicação tanto na medicina quanto na odontologia, aumentaram significativamente o uso desta proteína como biomaterial nas formas de membranas, tubos, pós, esponjas, soluções injetáveis, entre outras²⁴. Essas aplicações do colágeno devem-se principalmente a algumas de suas propriedades importantes no desenvolvimento de biomateriais, como²⁵⁻²⁸:

- baixa resposta imunológica mesmo quando extraído de fontes heterológicas;
- baixo índice de alergenidade (cerca de 2% para colágeno heterólogo) que pode

ser reduzido mais ainda pela remoção dos telopeptídeos **N** e **C**-terminais, tornando-o altamente biocompatível;

- biodegradabilidade (susceptível à ação de collagenases e outras substâncias celulares);
- habilidade em promover crescimento celular;
- propriedades hemostáticas (ativação do processo de coagulação);
- susceptível a modificações químicas que permitem o controle da biodegradabilidade e biocompatibilidade, propriedades reológicas, propriedades dielétricas e tensão superficial.

Recentemente seu uso vem aumentando consideravelmente como suporte biodegradável de crescimento celular na área da engenharia de tecidos, principalmente na forma de compósitos colágeno:elastina ou matrizes teciduais desvitalizadas^{29,30}. A extensão do seu uso nesta área está baseada no fato de que os polímeros naturais que formam a matriz extracelular, as proteoglicanas, colágeno e elastina, interagem com receptores específicos na superfície celular^{31,32}, participando ativamente dos processos que regulam a expressão fenotípica da célula e portanto, a manutenção não apenas da morfologia e função do tecido, mas também da sua remodelagem^{33,34}.

Colágeno solúvel é obtido por processos físico-químicos^{34,35} e pode ser utilizado na forma de filme, esponja ou gel na liberação controlada de fármacos²⁵. Sua combinação com fosfatos de cálcio tem sido relatada em estudos de liberação de antibióticos³⁶ e na melhora da estabilidade dos lipossomas³⁷. A Tabela 1 apresenta algumas das aplicações biomédicas do colágeno.

TABELA 1. – Algumas aplicações biomédicas do colágeno^{37,38}.

FORMA	APLICAÇÕES
Colágeno: cerâmicas fosfatadas	Reconstrução de tecidos (preenchimento de cavidades ósseas), reconstrução plástica.
Compósitos	Biocerâmicas do tipo fosfatos de cálcio:colágeno para reconstrução óssea.
Esponjas	Agentes hemostáticos
Gel de colágeno injetável	Preenchimento
Membranas, esponjas ou géis biodegradáveis	Sistemas de liberação de fármacos
Membranas protetoras e cicatrizantes	Atelocolágeno, colágeno:elastina, colágeno com propriedades fibrinolíticas, anticoagulantes e plaquetárias, associações colágeno:células (queratinócitos, fibroblastos, condrócitos), pele artificial.
Membranas	Membranas periodontais
Próteses	Confecção de válvulas cardíacas e vasos sanguíneos
Revestimento	Próteses vasculares

I.3. Liberação Controlada de Fármacos

A partir da década de 1950 iniciou-se estudos de processos de liberação controlada de substâncias biologicamente ativas, sendo que anteriormente não se conheciam materiais que pudessem liberar moléculas de massa molecular alta, tais como peptídeos e proteínas sem induzir inflamações³⁹. Dividiam-se os sistemas de liberação de fármacos implantáveis em duas classes principais⁴⁰:

- Implantes, nos quais se utilizavam vários tipos de polímeros e membranas poliméricas para o controle da cinética de liberação;
- Bombas implantáveis nas quais se utilizavam bombas mecânicas de infusão para controlar a liberação.

Atualmente define-se como sistemas de liberação controlada aqueles nos quais o agente ativo é liberado independentemente de fatores externos e com uma cinética bem estabelecida⁴¹.

Os sistemas de liberação controlada oferecem algumas vantagens sobre os métodos convencionais que liberam o agente ativo em um curto período de tempo⁴², como por exemplo:

- Manutenção de níveis constantes da substância no organismo, implicando em uma eficiência maior na utilização do agente, ou seja, é necessário menor quantidade do fármaco para produzir o mesmo efeito que os sistemas convencionais;
- Aplicação do agente diretamente no sítio de ação, produzindo altas concentrações localizadas e evitando efeitos colaterais sistêmicos;
- Menor frequência de administração do agente ativo, aumentando o conforto do paciente e a eficácia do tratamento.

A Figura 2 ilustra a comparação entre o método convencional de multidosagem e o sistema de liberação controlada.

O primeiro método está longe do ideal, proporcionando variações consideráveis na concentração do fármaco no plasma sanguíneo, podendo não haver efeito farmacológico ou ocasionar intoxicação, pois há uma faixa de concentração efetiva para a ação no organismo. Já o método de liberação controlada proporciona uma pequena variação na concentração do fármaco com o tempo, impossibilitando inefetividade ou toxicidade.

FIGURA 2. Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos convencionais de multidose (a) e sistemas de liberação controlada (b) A = administração do fármaco⁴³.

Mais recentemente, o tipo de mecanismo que controla a liberação do fármaco determina também a sua classificação, podendo ser: sistemas de difusão controlada; sistemas controlados quimicamente; sistemas controlados por embebição e sistemas de liberação programada⁴¹.

Os sistemas de difusão controlada podem ser divididos em: sistemas de reservatório, nos quais uma membrana envolve o fármaco, controlando sua difusão e sistemas monolíticos, nos quais o agente ativo está uniformemente dissolvido ou disperso⁴³.

Nos sistemas de reservatório a taxa de liberação é constante se houver uma concentração constante do fármaco no interior do reservatório. O mecanismo de liberação é governado pela Primeira Lei de Fick, que pode ser expressa pela equação⁴³:

$$j_i = -D \frac{dc_i}{dx} \quad (\text{equação 1})$$

sendo j e c_i são respectivamente o fluxo de massa e a concentração do soluto i , D é o coeficiente de difusão do soluto e dc_i/dx é o gradiente de concentração com relação à distância.

A fabricação do sistema reservatório é em geral mais cara e mais difícil que a do sistema monolítico. A razão de liberação depende da espessura, da área e da permeabilidade da membrana difusora, que devem ser cuidadosamente controlados durante o processo de confecção, encarecendo a manufatura.

Nos sistemas monolíticos em que o fármaco é solúvel na matriz, a liberação depende da concentração do agente, da natureza dos componentes e da geometria do dispositivo. A cinética de liberação pode ser dividida em duas fases: a primeira, correspondente de 0 a 60% da liberação, a taxa de liberação é proporcional a $t^{-1/2}$:

$$\frac{M_t}{M_0} = 4 \left(\frac{D_t}{pl^2} \right)^{1/2} \quad \text{para } 0 \leq \frac{M_t}{M_0} \leq 0,6 \quad (\text{equação 2})$$

Já na segunda fase, correspondente de 60 a 100%, a liberação segue uma cinética de primeira ordem:

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - \frac{8}{p^2} \exp \left(-\frac{p^2 Dt}{l^2} \right) \quad \text{para } 0,6 \leq \frac{M_t}{M_0} \leq 1,0, \quad (\text{equação 3})$$

sendo M_0 é a quantidade total de fármaco dissolvido, M_t é a quantidade liberada no tempo t , l é a espessura do sistema, e D é o coeficiente de difusão da matriz.

Em geral, a razão de liberação em qualquer tempo é de maior interesse do que a quantidade acumulada da liberação. A razão é obtida derivando as equações 1 e 2, resultando em

$$\frac{dM_t}{dt} = 2M_0 \left(\frac{D_t}{pl^2 t} \right)^{1/2} \quad \text{para } 0 \leq \frac{M_t}{M_0} \leq 0,6 \quad (\text{equação 4})$$

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{8DM}{l^2} \exp \left(-\frac{p^2 Dt}{l^2} \right) \quad \text{para } 0,6 \leq \frac{M_t}{M_0} \leq 1,0 \quad (\text{equação 5})$$

A razão de liberação decai numa razão de $t^{-1/2}$ até que 60% do agente tenha sido liberado e após, decai exponencialmente.

No caso do fármaco estar disperso na matriz polimérica, com uma solubilidade limitada na matriz, a liberação é governada por um mecanismo baseado no modelo de liberação de Higuchi⁴⁴, cuja cinética de liberação pode ser descrita pela equação:

$$M_t = A(DtC_s[2C_0 - C_s])^{1/2} \quad (\text{equação 6})$$

e a liberação a qualquer tempo é dada por:

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{A}{2} \left(\frac{DC_s[2C_0 - C_s]}{t} \right)^{1/2} \quad (\text{equação 7})$$

sendo: A – área, C_0 – concentração total do fármaco, C_s – solubilidade do fármaco na matriz.

Este modelo assume que o fármaco na camada superficial do sistema dissolve-se na matriz polimérica e difunde-se para fora do sistema. Quando o teor na superfície se esgota, a próxima camada começa a exaurir, não mantendo a cinética de liberação $t^{-1/2}$ até a exaustão do sistema.

Deve se destacar, também, que para agentes dissolvidos na matriz, a fração liberada em um determinado período de tempo é independente da concentração inicial incorporada, enquanto que para agentes dispersos na matriz, a fração liberada em determinado período de tempo diminui com o aumento da quantidade incorporada, e a relação entre a taxa de liberação e a quantidade incorporada depende da geometria do dispositivo⁴⁴.

Nos sistemas de liberação controlada por embebição ocorre absorção do solvente do meio, modificando a cinética de liberação, estando, portanto, a liberação em função da taxa de absorção do solvente e da taxa de difusão do fármaco^{44, 45}.

Os sistemas de liberação programada podem ser caracterizados pela liberação da substância em um sítio específico a uma taxa determinada ou em resposta a um estímulo, tanto externo quanto interno ao organismo.

Nos sistemas controlados quimicamente, o fármaco pode estar distribuído uniformemente como nos sistemas monolíticos, nos quais o fármaco está imobilizado na matriz e a liberação ocorrerá pela erosão da matriz polimérica. Quando ocorrem ligações covalentes entre a droga e o polímero, a liberação ocorrerá por meio das cisões das ligações formadas, através de reações químicas, geralmente enzimáticas, hidrolíticas ou pela biodegradação da matriz⁴⁴⁻⁴⁶.

1.4. Hormônios Esteróides

Hormônios são substâncias químicas produzidas por tecidos específicos e transportadas pelo sistema vascular sanguíneo para afetar outros tecidos em baixas concentrações. As principais classes de hormônios incluem proteínas como: hormônio do crescimento, insulina e hormônio adrecorticotrópico; peptídeos, como ocitocina e vasopressina; e esteróides, como o cortisol, estrógeno e a progesterona⁴⁷.

Os hormônios esteróides são sintetizados a partir do colesterol e ao contrário dos hormônios protéicos, são lipofílicos e não ficam armazenados, sendo liberados conforme são sintetizados⁴⁸.

Pode-se enquadrar os hormônios esteróides em duas categorias: hormônios adrenocorticais (glicocorticóides, mineralocorticóides) e hormônios sexuais (estrógenos, progesterona, andrógenos). Todos possuem uma estrutura comum de quatro anéis de 17 carbonos, derivada do colesterol⁴⁹.

O tipo de hormônio esteróide eventualmente sintetizado depende da presença de enzimas específicas na célula em particular. O padrão de biossíntese de esteróide sexual diz respeito à modificação da pregnenolona numa sequência que envolve progesterona, andrógenos e por fim, estrógenos.

A metabolização dos esteróides ocorre no fígado, onde são conjugados com sulfatos e glicuronídeos, tornando-os hidrossolúveis para serem eliminados pela urina^{47, 48}.

1.4.1. Progesterona

Dentre os hormônios esteróides, a progesterona têm despertado grande interesse para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. Trata-se de um hormônio muito utilizado nos casos de infertilidade humana e animal e regularização do ciclo estral das fêmeas de espécies economicamente exploráveis, pois ocorre nos organismos em altas concentrações e seus análogos não são tóxicos^{48, 49}. A Figura 3 ilustra a fórmula estrutural da progesterona e seus análogos sintéticos.

FIGURA 3. Fórmula estrutural da progesterona e de seus análogos sintéticos

I.5. Ciclo Estral

A atividade do ciclo estral é regulada, basicamente pelo eixo hipotálamo – hipófise (adeno) – ovários⁵⁰.

O hipotálamo produz e libera o hormônio de liberação das gonadotrofinas (GnRH), que, ao atingir a adeno-hipófise, estimula a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH).

Ambos os hormônios adeno-hipofisários atingem os ovários, os quais, em resposta ao FSH, terminam por formar o folículo. O folículo, por sua vez, passa a produzir estrógenos, inibindo, por retroalimentação negativa, a produção de GnRH pelo hipotálamo⁵¹.

O LH promove no ovário a formação do corpo lúteo, iniciando a liberação de progesterona que na ausência de fertilização de um ovócito, promove no útero a liberação de prostaglandina.

O modo de ação da prostaglandina não é bem esclarecido, mas sabe-se que ela é responsável pela lise do corpo lúteo e conseqüentemente pela inibição da produção de progesterona. A ausência de progesterona é o estímulo para a produção do GnRH pelo hipotálamo, para reiniciar o ciclo, como se observa na Figura 4.

A sincronização do ciclo estral é uma forma eficiente de controle reprodutivo proporcionando diminuição dos períodos improdutivos, aumento da prolificidade e incremento do progresso genético, desde que corretamente utilizada⁵⁰.

Estas biotécnicas de sincronização baseiam-se, fundamentalmente, nos conhecimentos de fisiologia e nas particularidades de cada espécie, podendo ser englobadas genericamente em duas categorias: luteolíticos e progestágenos, que podem ser utilizados separadamente ou em combinação⁵³.

FIGURA 4. Representação esquemática da produção e regulação hormonal durante o ciclo estral (Adaptado de SPINOSA, H. S. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária⁵²).

Como citado anteriormente, a prostaglandina produzida pelo útero é capaz de lisar o corpo lúteo, inativando-o. Sem o corpo lúteo, não ocorre a produção de progesterona que é o fator desencadeador da produção de GnRH pelo hipotálamo, iniciando um novo ciclo.

Portanto, um agente luteolítico é um derivado da prostaglandina, administrado ao animal durante a fase luteínica, capaz de lisar o corpo lúteo prematuramente, reduzindo os níveis de progesterona, provocando o início de um novo ciclo (fase folicular)⁵⁴.

Os progestágenos utilizados são substâncias desenvolvidas a partir do hormônio esteróide progesterona, ou a própria progesterona sintetizada pelo corpo lúteo e placenta. Seu modo de ação baseia-se em criar uma fase luteínica artificial, a qual será seguida de ovulação após a retirada da progesterona^{54,55}.

I.6. – Materiais e Métodos Para a Sincronização do Ciclo Estral

Segundo Hansel⁵⁶, o desenvolvimento de métodos de sincronização do ciclo estral pode ser dividido em quatro fases:

Fase 1, teve início por volta de 1960 com a administração de progestágenos exógenos, mimetizando a lise natural do corpo lúteo. Vários métodos foram desenvolvidos, incluindo via oral, aplicações subcutâneas e aplicações tópicas vaginais.

A fase II foi caracterizada pela combinação de progestágenos com estrógenos e gonadotropinas.

Após a observação de que a prostaglandina (PGF2 α) possuía efeitos luteolíticos, iniciou-se, por volta de 1972, a fase III. Vários protocolos com prostaglandinas e análogos foram criados para sincronizar ciclo das espécies economicamente exploráveis (Figura 5).

Em seguida, começou-se a combinar progestágenos com prostaglandina e GnRH, iniciando a fase IV, a mais recente, na qual os índices de sincronização e fertilidade alcançaram valores importantes para os sistemas produtivos.

Durante estas quatro fases, o desenvolvimento e uso de materiais para inserção vaginal têm sido o alvo dos pesquisadores, devido à facilidade de aplicação e melhores resultados de fertilidade.

Durante a década de 1960, foram desenvolvidas esponjas de poliuretano impregnadas com progesterona, mas que não eram muito viáveis para uso comercial, pois a taxa de retenção era muito variável entre as fêmeas. Robinson⁵⁷ cita, ainda, a possibilidade de infecções, que apesar de não interferirem na fertilidade, necessitavam do uso de antibióticos.

Na década de 1970, Mauer⁵⁸ desenvolveu um pesário intravaginal, denominado PRID® (Progesterone Releasing Intravaginal Device), (Figura 6), Abbott Laboratories, North Chicago, que consistia em um espiral de aço inoxidável envolto por silicone impregnada com progesterona. Uma corda de nylon era presa ao final do espiral para facilitar a retirada da vagina.

Mais recentemente foi desenvolvido o CIDR® (Controlled internal drug dispenser), com o mesmo material siliconado, mas em forma de “T”, com vários tamanhos para serem utilizados em vacas, cabras, ovelhas e éguas⁵⁹, mostrado na Figura 7.

Atualmente existe um sistema de alta tecnologia de liberação controlada eletronicamente, denominado IBD (Intelligent breeding device), desenvolvido para a sincronização do ciclo estral de vacas. É um sistema eletrônico que libera progesterona, estradiol e prostaglandina em períodos pré-determinados⁵⁴.

Para uso subcutâneo na pele da orelha utiliza-se progesterona e seus análogos sintéticos em matrizes de polietileno glicol ou silicone⁵⁴ (Figura 8).

A utilização dos métodos de sincronização do ciclo estral é considerada baixa, afetando os índices de reprodução dos animais e encarecendo as técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões^{50, 51}.

As principais causas da não adoção desses métodos de sincronização pelos criadores de rebanhos são: a necessidade de manipular o animal para colocação e retirada dos pesários, a baixa taxa de retenção vaginal dos pesários, a possibilidade de infecção e a falta de informação sobre as vantagens da sincronização dos ciclos⁵⁴.

Manipular excessivamente o animal ocasiona redução de peso e produção, assim como as infecções vaginais e uterinas. Para diminuir esses impasses seria necessário que não houvesse a necessidade de retirar o material inserido no canal vaginal e fossem abolidas as cordas de nylon presa aos produtos que atravessam toda a vagina e ficam expostas ao ambiente, atuando como porta de entrada para microrganismos.

A biodegradabilidade é a característica desejável nesses veículos de esteróides para a resolução das questões negativas do uso dos produtos disponíveis.

Em estudos com copolímeros biodegradáveis de lactato e caprolactona para a liberação controlada de progesterona e estradiol, verificou-se a eficácia desses materiais para liberações a longo prazo. Os ensaios *in vitro* demonstraram que a liberação perdurou por quarenta dias e houve variação na quantidade liberada em função das proporções dos materiais na preparação do veículo⁶⁰.

Alguns trabalhos com microesferas de quitosana para a liberação de progesterona mostraram ser um material promissor devido à baixa toxicidade e à facilidade de controle da degradação e liberação⁴⁹.

Rathbone e colaboradores desenvolveram um dispositivo biodegradável de caprolactona para a liberação de progesterona para ser utilizado em fêmeas bovinas e

conseguiram níveis plasmáticos do hormônio semelhantes aos obtidos com produtos comerciais. O tempo de degradação médio desse material foi de cerca de 6 meses⁶⁰.

A tendência atual é a procura por um material biodegradável de liberação controlada, que possa liberar a progesterona ou uma combinação de análogos e/ou outras substâncias a níveis esperados, reduzindo a toxicidade, os resíduos em carne e leite e otimizando as técnicas reprodutivas e a produção animal.

FIGURA 5. Prostaglandina sintética injetável para sincronização do ciclo estral⁵³.

FIGURA 6. Pesário para liberação intravaginal de progesterona PRID® (Adaptado de Rhoten-Weinhold⁵⁹).

FIGURA 7. Representação esquemática de veículos não degradáveis para a liberação intravaginal de progesterona (Adaptado de Rhoten-Weinhold⁵⁹).

FIGURA 8. Aplicação subcutânea de progesterona em matriz de silicone na orelha de fêmea bovina⁵³.

II. OBJETIVOS

- Preparar e caracterizar matrizes de colágeno aniônico.
- Preparar e caracterizar matrizes de colágeno aniônico contendo progesterona nas proporções de 5% e 10% (m/m).
- Estudar a cinética de liberação *in vitro* do hormônio.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Obtenção de Colágeno Aniônico

Utilizou-se, como matéria prima, serosa intestinal porcina de aproximadamente 5 anos de idade, em forma de fitas, purificada como para a extração de fio de sutura "cut-gut", que foi mantida congelada por volta de -5°C até a sua utilização. Após o descongelamento, o excesso de água da serosa foi removido com o auxílio de papel de filtro e em seguida picotada em pedaços de aproximadamente 1 cm de comprimento.

Esse material foi submetido a tratamento em solução aquosa alcalina de dimetilsulfóxido (6%), contendo cloretos e sulfatos de Sódio, Potássio e Cálcio em pH próximo de 13 por um período de 24h. Posteriormente removeu-se os sais residuais, por lavagens sucessivas com solução de H_3BO_3 (3%) e EDTA (3%). Em seguida extraiu-se o colágeno com solução de ácido acético (pH 3,5), de tal forma que a concentração final de colágeno ficasse em torno de 1%. Essa solução foi desaerada e estocada em frascos escuros à temperatura de 4°C ³⁵.

O tratamento com uma solução fortemente alcalina provoca a hidrólise de grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln presentes na estrutura primária do tropocolágeno, segundo a reação mostrada na Figura 9. O grupo de Bioquímica e Biomateriais tem preparado este tipo de material em vários tempos de tratamento (12- 144h) e o tempo de 24h foi escolhido por ser um dos que apresentam a melhor resposta biológica²³.

FIGURA 9. Esquema representativo da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas.

III.2 Caracterização do Colágeno

III.2.1 Determinação da Concentração de Colágeno por Liofilização

A concentração da solução de colágeno foi determinada por liofilização de uma amostra de 2,0 gramas previamente congelada em nitrogênio líquido e liofilizada até a obtenção de massa constante. O resultado representou a média de três liofilizações independentes em um liofilizador modelo DRYER modulyo (EDWARDS).

III.2.2 Determinação das Massas Moleculares por Eletroforese

As massas moleculares dos constituintes da amostra de colágeno foram determinadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS, como descrito por Laemmli⁶¹. Após terem sido corados com Coomassie Brilhante Azul R-250, os géis foram submetidos à medidas densitométricas com auxílio de um equipamento NONIUS, Delft-Holanda, com λ igual a 543 nm.

A - Preparação das soluções dos géis:

- Tampão para o gel de resolução: tris-HCl 2 mol L⁻¹ pH 8,8: foi adicionado 12,2 g de tris(hidroximetil)aminometano em 50 mL de água desionizada. Ajustou-se o pH com HCl 3 mol L⁻¹.

- Tampão para o gel de empilhamento: tris-HCl 2 mol L⁻¹ pH 6,8: mesmo procedimento anterior.

- Acrilamida:bis-acrilamida (30:0,8%): Foi dissolvido 30 g de acrilamida e 0,8 g de bis-acrilamida em 100 mL de água desionizada.

- Persulfato de amônio ((NH₄)₆S₂O₈) 10%

- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, sal disódico-2-hidrato) 0,2 mol L⁻¹

- SDS (n-dodecilsulfato, sal sódico) 10%

- Polimerizante TEMED (N, N, N', N'-tetra-metil-etilendiamino)

A quantidade de cada solução para a preparação dos géis está mostrada na Tabela 2:

TABELA 2. Preparação dos géis utilizados na eletroforese.

Solução	Gel de empilhamento	Gel de resolução
Tris-HCl 2 mol L ⁻¹ pH 6,8	0,5 mL	-
Tris-HCl 2 mol L ⁻¹ pH 8,8	-	3 mL
Acrilamida:bis-acrilamida (30:0,8%)	1,2 mL	3,75 mL
SDS 10%	80 µL	160 µL
EDTA 0,2 mol L ⁻¹	80 µL	160 µL
Água deionizada	6,1 mL	8,85 mL
(NH ₄) ₆ S ₂ O ₈	60 µL	100 µL
TEMED	10 µL	20 µL

B - Colocação dos géis

Os géis foram colocados entre placas de vidro de dimensões 12,0 x 10,5 cm e 11,0 x 10,5 cm, com espessura de 1,9 mm, usando espaçadores de Teflon com 0,6 mm selados com vaselina. A concentração de polimerização do gel de resolução foi de 7% e o de empilhamento foi de 5%⁶¹.

C - Preparação das amostras

As amostras foram preparadas a partir da solução de colágeno pH 3,5, por diluição com água seguido de aquecimento em banho-maria.

A concentração final da solução foi de aproximadamente 3,0 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Uma alíquota da solução estoque foi dissolvida no tampão da amostra formado por 2,4 mL de tris-HCl 2 mol L⁻¹ pH 6,8, 7,5 mL de SDS 20%, 0,75 mL de EDTA 0,2 mol L⁻¹, 7,5 mL de glicerol, 0,5 mL de azul de bromofenol 0,5% e 112,2 mL de água desionizada, seguido de aquecimento em banho-maria por 3 minutos. A massa total aplicada no gel de poliacrilamida ficou entre 10 e 30 μg .

D - Tampão utilizado nos eletrodos a pH 8,3

Superior: foi dissolvido 3,03 g de tris(hidroximetil)aminometano, 14,4 g de glicina, 1g de SDS, 0,725 g de EDTA em 100 mL de água desionizada. Acertou-se o pH com NaOH 3 mol L⁻¹.

Inferior: a solução foi a mesma do tampão superior sem a glicina.

E - Padrões

As amostras padrões (Sigma) foram aplicadas nas concentrações de 1 a 2 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e correspondentes a β -galactosidase, fosforilase, albumina bovina e ovoalbumina com massas molares de 116.000, 97.400, 66.000, 45.000 Da respectivamente.

F - Migração das proteínas no gel

A corrente inicialmente aplicada foi de 20 mA e uma voltagem de 50 V, até que as amostras migrassem para o gel de resolução, aumentando-se, então, para 30 mA e 125 V. Após o término da eletroforese, o gel foi fixado com solução de metanol:água:ácido acético nas proporções 5:4:1, e as zonas correspondentes às proteínas foram reveladas com Coomassie Brilhante Azul R-250 (0,1% na solução fixadora). Em seguida, o excesso de corante foi removido com solução de ácido acético 7% e o gel deixado secar entre duas folhas de celofane contendo uma solução de metanol:glicerol:água (30:3:67) durante 4 horas. As massas molares foram calculadas em função dos valores dos fatores de Retenção (R_f) dos padrões que é dado por:

$$R_f = \frac{\text{Distância migrada pela proteína}}{\text{Distância migrada pelo corante}}$$

III.2.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram registrados a partir de filmes transparentes de colágeno de aproximadamente 2mg/ml, preparadas por secagem do solvente em capela de fluxo laminar. Foi utilizado um espectrofotômetro Bomem ND-120 (FTIR) na região de 400 à 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

III.3. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES DE COLÁGENO

Para a preparação das matrizes foi utilizado gel de colágeno obtido pelo processo anteriormente descrito, a partir de serosa intestinal porcina.

Pesou-se 60g da massa do gel de colágeno (1,13%), tendo-se portanto 0,678g de colágeno na amostra e distribuiu-se uniformemente em um molde de poliestireno com três poços quadrados de 5cm de lado e profundidade 0,5cm. Depois de preenchido, o molde foi colocado em um recipiente fechado e submetido ao congelamento gradativo, ou seja, no refrigerador (-2,5°C) por 10 horas e no freezer (-15°C) por 14 horas. Em seguida o gel congelado foi submetido à liofilização, obtendo-se a amostra denominada Co.

Posteriormente as matrizes liofilizadas foram retiradas do molde, com auxílio de uma espátula, acondicionadas em embalagens plásticas e guardadas em dessecador.

III.3.1. Preparação das Matrizes de Colágeno Contendo Progesterona

Foi utilizado, nesta preparação, gel de colágeno (1,13%) e nele incorporado progesterona nas proporções 5% e 10% sobre a quantidade de colágeno (m/m), obtendo-se assim, as amostras denominadas CP5 e CP10 respectivamente. Utilizou-se progesterona micronizada (99% de pureza), de procedência chinesa, importada por Viafarma Importadora Ltda, lote 030109.

A incorporação foi feita manualmente, colocando-se a progesterona em meio ao gel de colágeno, misturando-se com bastão em um becker, até a obtenção de uma massa homogênea.

Posteriormente distribuiu-se a mistura em um molde de poliestireno com três poços quadrados de 5cm de lado e profundidade 0,5cm e submeteu-se a congelamento gradativo, liofilização e acondicionamento como anteriormente descrito.

III.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES DE COLÁGENO

III.4.1. Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram registrados a partir de membranas transparentes de colágeno e colágeno contendo progesterona de aproximadamente 2mg/ml, preparadas por secagem do solvente em capela de fluxo laminar.

III.4.2. Estabilidade Térmica

Para os estudos de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) utilizou-se 10 mg das amostras Co, CP5 e CP10, que foram colocadas em porta amostra de alumínio não

hermético e submetidas à razão de aquecimento de $10^{\circ} \text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (90 mL.min^{-1}), numa faixa de 25 a 250°C . Essas medidas determinaram a temperatura de desnaturação do colágeno e foram realizadas em um equipamento DSC 2010 da TA INSTRUMENTS.

Nos estudos de Termogravimetria (TG) utilizou-se, também, 10 mg das amostras Co, CP5 e CP10, que foram submetidas à uma razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ numa atmosfera dinâmica de nitrogênio (90 mL.min^{-1}), numa faixa de 25 a 900°C . As análises foram feitas em um equipamento TGA 2050 da TA INSTRUMENTS e permitiram obter uma medida quantitativa das variações da massa da amostra em função das alterações de temperatura.

III.4.3. Hidratação das Matrizes de Colágeno por Tampão PBS

Utilizando-se amostras Co, CP5 e CP10, determinou-se a quantidade de tampão absorvido pelas matrizes em função do tempo.

Amostras das matrizes com massa variando entre 20,9 e 29,9mg foram colocadas em tampão fosfato (pH 7,4), submetidas a vácuo por 10 minutos, permanecendo imersas por períodos de tempo predeterminados (de 15 min. A 24 h) e novamente pesadas.

O tampão fosfato salino (PBS) foi preparado adicionando-se 0,67 mL de H_3PO_4 , 7,02g de NaCl e 0,20g de KCl em 800mL de água destilada. Em seguida ajustou-se o pH desta solução para 7,4 com solução de NaOH e completou-se o volume para 1 litro, com água destilada, sendo a solução armazenada sob refrigeração (5°C).

Após serem retiradas do tampão, as amostras foram colocadas entre duas folhas de papel filtro e mantidas sob o peso de um objeto de 60g, durante 3 minutos, a fim de se retirar o excesso de água superficial estabelecer um padrão para a coleta de dados.

A quantidade de tampão absorvida foi calculada pela equação a seguir:

$$\% \text{ água} = \frac{(m_u - m_s)}{m_u} \times 100 \quad (\text{equação 8})$$

na qual m_u e m_s são as massas das matrizes úmidas e secas respectivamente.

Os resultados representam a média de três determinações independentes.

III.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para se observar a morfologia das matrizes de colágeno, retirou-se um fragmento quadrado de 0,5cm de lado de cada amostra.

Essas amostras foram fixadas com fita adesiva de carbono em suporte próprio para MEV e submetidas à metalização em ouro, necessária por se tratar de um material biológico, que consiste recobrir as amostras com uma camada de aproximadamente 20 nm de ouro.

Utilizando-se um equipamento LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltd, Cambrige, Inglaterra), com um detector Oxford (Oxford Instruments, Inc., Concord, EUA), operando com um feixe de elétrons de 20 KeV, obteve-se fotomicrografias das matrizes, nos aumentos de 100 e 500X.

III.4.5 Estabilidade Biológica – Degradação por Colagenase

Os ensaios de degradação enzimática por colagenase foram realizados com amostras Co, CP5 e CP10, cujas massas variaram de 9,3mg a 11mg.

A hidrólise enzimática ocorreu à temperatura de 37°C com colagenase de origem bacteriana (Sigma tipo V - 435 unidades mg^{-1}), cuja solução foi preparada com tampão tris-HCl 100mmol L^{-1} , pH 7,4, contendo 25 mmol L^{-1} de cloreto de cálcio.

Obteve-se o tampão pela dissolução de 0,605g de tris(hidroximetil)aminometano e 1,835g de cloreto de cálcio em 500 mL de água desionizada, ajustando-se o pH para 7,4 com solução de HCl (3N).

Pesou-se 1mg de colagenase e diluiu-se em 100mL de tampão tris, obtendo-se 4,35UI de enzima para cada 1mL de tampão. Dessa solução retirou-se 25mL e adicionou-se tampão tris até completar o volume de 500mL, obtendo-se uma solução com 0,217 UI/mL

As amostras foram colocadas em tubos de ensaio e imersas na solução contendo colagenase com volume individual que contivesse 0,2UI de enzima para cada 1mg de colágeno da amostra. Os tubos foram tampados e colocados dentro de estufa bacteriológica (FANEN modelo 216) à 37°C por períodos de tempo predeterminados, variando entre 0 e 72h.

Após serem retirados da estufa, os tubos de ensaio contendo as amostras foram imediatamente submersos em água a 50°C para a inativação da collagenase e conseqüente término da hidrólise.

Posteriormente a solução da enzima foi retirada e adicionou-se água desionizada nos tubos para retirada de resíduos da enzima e de sais da amostra e da parede dos tubos, repetindo-se esse procedimento cinco vezes. As amostras que foram danificadas e fragmentaram foram centrifugadas e lavadas cinco vezes.

A extensão da digestão enzimática foi determinada pela diferença de massa das amostras antes e depois do tratamento enzimático e os resultados representam a média de três determinações independentes.

III.4.6 Determinação da Quantidade de Progesterona nas Matrizes de Colágeno

As matrizes de colágeno incorporadas com progesterona foram submetidas à verificação da quantidade de progesterona proposta inicialmente.

Para isso, retirou-se três fragmentos de cada matriz: CP5 e CP10, que foram pesadas para o cálculo da quantidade esperada de progesterona e submersos em 25 mL de etanol PA para a solubilização da progesterona presente nas amostras.

A determinação da concentração de progesterona liberada na solução foi feita por Espectroscopia no Ultravioleta (UV), em 247 nm. A quantidade de progesterona foi determinada pela curva de calibração de progesterona em etanol mostrada na Figura 10. Obteve-se a equação da reta: $y = 0,00347 + 0,04085X$, $R = 0,9999$, para $N = 6$.

Comparou-se, em seguida os valores reais da quantidade de progesterona com os valores estimados após a pesagem da amostra.

FIGURA 10. Curva de calibração de progesterona em etanol

III.4.7 Ensaios de Liberação de Progesterona *in vitro*

Utilizou-se para os estudos de liberação uma câmara acrílica transparente contendo 200mL de tampão fosfato salino e 2mL etanol PA, para solubilização da progesterona. As amostras CP5 e CP10 foram inseridas em um compartimento plástico com poros, mantido submerso por pérolas de vidro e sob agitação constante a 37°C inicialmente. Devido à dificuldade em manter essa temperatura, optou-se em realizar os ensaios em temperatura ambiente (cerca de 25°C).

Posteriormente, alíquotas de 2mL foram retiradas em períodos de tempo pré-determinados e o volume removido foi imediatamente repostado com tampão contendo 1% (v/v) de álcool etílico.

A determinação da concentração de progesterona liberada na solução foi feita por Espectroscopia no Ultravioleta (UV), em 247 nm. A quantidade de progesterona liberada foi determinada pela curva de calibração de progesterona em tampão fosfato salino (PBS) mostrada na Figura 11. Obteve-se a equação da reta: $y = 0,01693 + 0,04693X$, $R = 0,9983$, para $N = 7$.

Os ensaios de liberação pelas amostras CP5 e CP10 foram feitos em duplicata para a maioria dos dados.

FIGURA 11. Curva de calibração de progesterona em tampão PBS.

IV.- RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Caracterização do Colágeno

IV.1.1 Determinação da Concentração de Colágeno por Liofilização

Determinou-se, através do processo de liofilização, a concentração da solução de colágeno e obteve-se $1,13 \pm 0,05\%$ (m/m), resultado normalmente encontrado no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos para este tipo de matéria prima.

IV.1.2. Determinação das Massas Moleculares por Eletroforese

As massas moleculares dos constituintes do colágeno foram determinadas por eletroforese em gel de policrilamida/SDS a 10%.

O gel contendo a amostra de colágeno e as proteínas utilizadas como padrões estão mostrados na Figura 12. A curva de calibração obtida a partir dos valores de R_f dos padrões é mostrada na Figura 13. A partir dos dados da regressão linear obteve-se a equação $\text{Log}M = 5,2338 - 0,84842R_f$, $R = 0,99948$, para $N = 4$. O perfil densitométrico do gel está mostrado na Figura 14.

FIGURA 12. Gel de eletroforese em poliacrilamida/SDS (10%). (a) gel das proteínas utilizadas como padrão: (1)- β -galactosidase, (2)-fosforilase, (3)-albumina bovina; (4)-ovoalbumina e (b) amostra de colágeno (pH 3,5).

FIGURA 13. Curva de calibração para determinação das massas moleculares dos constituintes do colágeno.

FIGURA 14. Curva densitométrica para o colágeno (pH 3,5), em gel de poliacrilamida/SDS 10%, corados com Coomassie Brilhante Azul R- 250.

O perfil densitométrico mostra que o gel apresenta as bandas correspondentes às cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ numa razão de 2:1, típica do colágeno do tipo I²³.

As massas molares obtidas por interpolação na curva de calibração mostraram que o colágeno obtido se caracteriza pela presença de bandas correspondentes a proteínas com massas molares de 112.000 Da e 106.000 Da, valores próximos aos descritos para as cadeias de $\alpha 1$ e $\alpha 2$, típicas do colágeno do tipo I, predominante na matéria prima empregada, ou seja, serosa intestinal porcina²³.

IV.1.3. Espectroscopia na região do Infravermelho

Quase todas as moléculas apresentam vibração ou rotação, associadas com ligações covalentes, que resultam em absorção de radiação na região do infravermelho (4000-450 cm^{-1}), devido à variação do momento dipolar da molécula. Os dados de absorção coletados nessa região são expressos em um gráfico de ordenada em porcentagem de transmitância ou absorbância e abscissa em número de onda (cm^{-1}), que revelam características moleculares utilizadas para a identificação de compostos orgânicos e elucidação de estruturas moleculares desconhecidas⁶².

A Figura 15 mostra o espectro do colágeno com picos típicos para a amida I em $1654,8\text{ cm}^{-1}$ devido ao estiramento da carbonila e amida II, em $1552,5\text{ cm}^{-1}$ devido às vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-N⁶².

A região entre 600 e 800 cm^{-1} mostra uma vibração de intensidade média, devido à deformação angular fora do plano da ligação N-H, que é tipicamente encontrada em proteínas. Pode-se demonstrar a integridade da tripla hélice do colágeno, calculando-se a razão entre as absorvâncias dos picos em $1235,0$ e $1450,0\text{ cm}^{-1}$. Estes picos correspondem às vibrações no plano do tipo amida III, resultantes do estiramento C-N, da vibração N-H. A banda de amida III é muito sensível à presença da estrutura secundária do tropocolágeno, enquanto a banda 1450 cm^{-1} serve como padrão interno já que se mostra invariável em relação à ocorrência de desnaturação⁶².

A análise do espectro de absorção no infravermelho mostrou que a razão dos valores de absorvância em 1235 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} , está próxima de 1, sugerindo que a preparação mantém sua estrutura helicoidal (hélice tripla) íntegra. Isto implica em colágeno com baixo teor de gelatina, ou seja, com elevado conteúdo helicoidal, indicando que o processo de solubilização não desnatura o colágeno, pois membranas de gelatina nas mesmas condições apresentam uma relação de $0,59$ ⁶³.

FIGURA 15. Espectro de absorção no infravermelho para membrana de colágeno (24h)

IV.2. Caracterização das matrizes de Colágeno

IV.2.1. Aspecto Macroscópico das Matrizes

Observou-se que a incorporação de progesterona a 5% ou 10% (m/m) não alterou o aspecto da matriz colagênica, não sendo possível distinguir entre matrizes contendo ou não o hormônio, cuja coloração varia de branco a levemente amarelada.

Durante o acondicionamento das matrizes, pôde-se notar que ficaram com aspecto de esponja e, quando comprimidas manualmente retornavam ao seu formato original.

Essas características, observadas por inspeção visual, aparentaram homogeneidade em todas as peças, sendo compatíveis com as matrizes de colágeno normalmente obtidas no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos.

As primeiras matrizes confeccionadas foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e armazenadas em dessecador. Em novas inspeções, feitas durante um ano e meio, as matrizes de colágeno e colágeno contendo progesterona demonstraram estabilidade quanto à coloração e ao aspecto de esponja observados inicialmente. A Figura 16 é uma fotografia digital de matrizes de colágeno e de colágeno contendo 10% progesterona.

FIGURA 16. Fotografia digital das matrizes de colágeno (a) e colágeno contendo 10% de progesterona (b).

IV.2.2. Estabilidade Térmica

O teste de estabilidade térmica é importante para se conhecer a temperatura máxima de trabalho com o material, principalmente quando houver necessidade de esterilização para implante.

Define-se como análise térmica o conjunto de técnicas em que as propriedades físicas de uma substância e/ou seus produtos de reação são avaliados em função da temperatura em que a substância é submetida, em um programa controlado de temperatura⁶⁴.

Utilizou-se nesse trabalho a Termogravimetria (TG) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para avaliar a estabilidade térmica das matrizes de colágeno e das matrizes de colágeno contendo progesterona.

Na análise termogravimétrica a variação de massa de uma amostra, em atmosfera controlada, é continuamente acompanhada em função da temperatura e do tempo, quando a temperatura em que se submete a amostra é aumentada linearmente com o tempo. Denomina-se curva termogravimétrica o gráfico obtido pela perda de massa ou porcentagem de massa em função do tempo ou da temperatura⁶⁴.

As curvas termogravimétricas são características de um dado composto, devido ao caráter específico da seqüência de reações físico-químicas ou mudanças de estado que ocorrem ao longo de uma faixa definida de temperaturas, a velocidades que são uma função da estrutura molecular. As variações de massa resultam da ruptura e/ou formação de diferentes ligações físicas, químicas e mudanças de estado, os quais conduzem à liberação de produtos voláteis ou à formação de produtos de maior massa⁶⁴.

A calorimetria exploratória diferencial é um método analítico termodiferencial no qual a ordenada, em qualquer tempo ou temperatura é diretamente proporcional ao fluxo diferencial de calor entre a amostra e a referência. Os eventos térmicos registrados em ensaio de DSC são função da composição e estrutura do material, aparecendo como desvios da linha de base na direção endo ou exotérmica⁶⁵.

Dentre os inúmeros eventos térmicos observados por DSC, encontra-se a desnaturação de proteínas, que é geralmente acompanhada de transições térmicas induzidas (fenômeno de encolhimento). As medidas de DSC realizadas com colágeno foram baseadas na transição endotérmica característica da mudança estrutural da tripla-hélice do colágeno.

Com o aumento da temperatura acima de um nível crítico, ocorre uma quebra desta estrutura cristalina, dando lugar a uma estrutura amorfa formada por cadeias polipeptídicas⁶⁵:

a₃** (**a**-tripla hélice) ® cadeias **a*b** e **g** de polipeptídios (gelatina)*

As curvas termogravimétricas dos materiais em estudo estão mostrados na Figura 17. A curva relativa à progesterona mostra apenas uma etapa de decomposição, com início em torno de 200⁰C. As curvas relativas ao colágeno e colágeno contendo progesterona nas proporções de 5% e 10% mostram uma perda de massa em dois estágios. O primeiro estágio (da temperatura ambiente até cerca 200⁰C) é atribuído a perda de água adsorvida e estrutural contida nos materiais e o segundo estágio inicia-se próximo de 200⁰C e vai até 500⁰C, relativo à degradação dos biopolímeros.

Observa-se também que a presença de progesterona no colágeno diminui a temperatura de degradação das matrizes. O colágeno contendo 10% de progesterona foi totalmente degradado, por volta de 750^o C, enquanto há colágeno contendo 5% por volta dos 800⁰C. A progesterona inicia sua decomposição em torno de 200⁰C e em torno de 350⁰C sua decomposição é total.

O colágeno isento de progesterona ultrapassa os 900⁰C com aproximadamente 20% da massa inicial, o que de certa forma confirma a presença de progesterona incorporada no material.

FIGURA 17. Curvas termogravimétricas para colágeno (—), progesterona (—), colágeno contendo 5% de progesterona (—) e colágeno contendo 10% de progesterona (—) em N₂ (vazão: 90 mL min⁻¹), $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

As curvas DSC obtidas para a matriz de colágeno e matriz de colágeno contendo progesterona as proporções de 5% e 10% estão mostradas na Figura 18. Na curva da progesterona pode-se ver o pico de fusão por volta de 130⁰C e o pico de decomposição em torno de 330⁰C, como já observado por TG. Para as curvas relativas ao colágeno e colágeno contendo progesterona observa-se um deslocamento do pico relativo à perda de água no material (85-110⁰C). A presença de progesterona no material pode ser confirmada pelo aparecimento do pico (por volta de 130⁰C), como mostrado na região expandida da figura para colágeno contendo 5% e 10% de progesterona.

FIGURA 18. Curvas DSC para Colágeno 24h (34), progesterona (34), colágeno contendo 5% de progesterona (34) e colágeno contendo 10% de progesterona (34) em N₂ (vazão: 90mL min⁻¹), $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

IV.2.3. Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho

A Figura 19 mostra a comparação entre os espectros no infravermelho do colágeno, da progesterona e do colágeno contendo 10% de progesterona.

Observa-se no espectro da progesterona, que os picos característicos estão compreendidas entre 1200 cm⁻¹ e 1700cm⁻¹, valores muito próximos aos que aparecem no espectro do colágeno.

No espectro do colágeno contendo 10% de progesterona, notam-se os picos característicos do colágeno, assim como a preservação da estrutura em tripla hélice, caracterizada pela razão de 0,851 entre as bandas 1235,0cm⁻¹ e 1450,0 cm⁻¹. o pico em torno de 1650cm⁻¹ parece estar sobreposto com valores próximos e característicos dos valores do espectro da progesterona. A deformação desse pico, com o aparecimento de valores variando de 1630cm⁻¹ a 1670cm⁻¹ sugere a presença de progesterona na matriz de colágeno.

FIGURA 19. Espectro de absorção no infravermelho para membrana de colágeno(³/₄), colágeno contendo 10% de progesterona (³/₄) e progesterona (³/₄).

IV.2.4. Estabilidade Biológica

Os organismos vivos são munidos de um sistema de defesa contra corpos estranhos que inclui enzimas, células especializadas, barreiras naturais entre outros, que reagem contra os materiais neles implantados. Por isso um biomaterial é um material compatível biologicamente que ocasiona o mínimo de reação e que não provoque a perda da homeostase orgânica¹. No entanto, outra característica fundamental é a biodegradabilidade do biomaterial quando em contato com alguns fatores do sistema natural de proteção. Alguns materiais são susceptíveis ao ataque de uma enzima ou célula específica e podem ou não ser implantado em uma determinada região do organismo.

A enzima específica para a degradação do colágeno, denominada collagenase foi utilizada nos ensaios de estabilidade biológica na proporção de 0,2 UI para cada 1mg de colágeno das matrizes. Os resultados estão mostrados na Tabela 3 e na Figura 20.

TABELA 3. Perda de massa das amostras Co, CP5 e CP10, sob ação de hidrólise enzimática por collagenase à temperatura de 37°C (N = 3)

Perda de massa (%)			
Tempo de exposição (h)	Co	CP5	CP10
2	17,10 ± 3,62	14,00 ± 3,64	12,83 ± 6,70
4	16,04 ± 3,41	22,40 ± 5,55	14,59 ± 2,92
6	21,19 ± 2,76	21,56 ± 5,77	22,12 ± 4,84
12	53,79 ± 8,20	26,50 ± 1,79	28,06 ± 2,87
24	69,73 ± 5,30	33,42 ± 0,4 3	48,80 ± 9,73
48	81,43 ± 0,88	69,06 ± 2,76	68,93 ± 5,55
72	82,00 ± 1,45	69,36 ± 1,72	70,40 ± 5,08

FIGURA 20. Perda de massa das amostras Co ( ), CP5 ( ) e CP10 ( ), sob ação de hidrólise enzimática por collagenase à temperatura de 37°C.

Observa-se nas primeiras 6h de degradação biológica que as matrizes apresentaram perdas de massa semelhante. A partir de 12h, as matrizes de colágeno começaram a apresentar uma perda de massa cerca de 50% maior que a perda das matrizes de colágeno contendo progesterona. Não ocorreu diferença significativa na perda de massa entre as matrizes contendo 5 e 10% de progesterona.

Após 48 horas de exposição, observa-se a tendência ao equilíbrio e a diferença entre as matrizes de colágeno e as matrizes de colágeno contendo progesterona começou a diminuir para cerca de 10% (m/m). Ao final do ensaio (72h) nota-se que as matrizes de colágeno tiveram uma perda de aproximadamente 80% da sua massa, enquanto que as matrizes colagênicas contendo progesterona tiveram uma perda de aproximadamente 70% de massa, não havendo diferença significativa na degradação das matrizes contendo 5 e 10% de progesterona.

IV.2.5. Hidratação das Matrizes de Colágeno por Tampão PBS

A hidratação das matrizes pode afetar a taxa de liberação de substâncias, pois há um aumento da área superficial da matriz, resultando em diferentes cinéticas de liberação. Utilizou-se para a experimentação *in vitro* da hidratação das matrizes, o tampão PBS, por se tratar de uma solução que melhor mimetiza o meio fisiológico.

A Tabela 4 mostra a capacidade de hidratação por tampão PBS pelas amostras Co, CP5 e CP10. Pode-se observar que, a partir de 15 minutos de exposição, nas amostras, contendo ou não progesterona, a porcentagem de hidratação já ultrapassava pouco mais de 80%. As amostras Co e CP10 ficaram submersas até 24h de experimento enquanto que as amostras CP5 foram submersas até 60h, cujos resultados mostraram não haver mudança na hidratação. Optou-se, portanto, em comparar apenas as amostras Co e CP10 até o final do experimento.

No entanto foi possível perceber que a incorporação de progesterona a 5% e 10% (m/m) não alterou a capacidade de hidratação das matrizes colagênicas

TABELA 4. Porcentagem de hidratação por PBS das amostras Co, CP5 e CP10

Hidratação (%)			
Tempo (min)	Co	CP5	CP10
15	82,09 ± 0,70	83,06 ± 1,70	84,90 ± 2,58
30	81,33 ± 0,32	81,00 ± 0,98	82,99 ± 0,84
45	81,19 ± 0,47	83,49 ± 2,68	82,84 ± 0,57
60	81,61 ± 0,76	82,86 ± 0,84	82,03 ± 0,53
120	82,06 ± 0,43		83,83 ± 1,65
180	82,18 ± 0,24		82,67 ± 0,61
1440	81,44 ± 0,59		82,32 ± 0,49

IV.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

Com o propósito de avaliar a morfologia das matrizes de colágeno, contendo ou não progesterona, estas foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Na Figura 21, que corresponde ao aumento de 100 vezes da matriz de colágeno, observa-se uma superfície compacta, diferente da estrutura colagênica típica que se caracteriza pela presença abundante de fibras e poros. Com melhor resolução, observa-se na Figura 22, detalhe das fibras colagênicas e dos poros, raramente presentes no material.

Para materiais de colágeno preparados em pH 3,5 é esperada uma estrutura amorfa, devido a repulsão eletrostática das moléculas de tropocolágeno, em função da protonação dos grupos carboxilato. Assim, o tratamento alcalino utilizado para a preparação do colágeno 24 horas, com a conseqüente introdução de cargas negativas, impede o tropocolágeno de organizar-se em microfibrilas. As fotomicrografias mostram uma estrutura amorfa, similar à do colágeno intumescido, ou seja, destituído de qualquer tipo de estrutura fibrilada. Esse tipo de comportamento foi observado em outros materiais como pericárdio bovino, que passaram pelo mesmo tempo de tratamento²³.

Embora o tratamento alcalino promova mudanças no estado de agregação das fibras de colágeno, os resultados de estabilidade térmica mostram que a estrutura secundária da tripla hélice foi conservada, pela presença de transição térmica no intervalo de temperatura

estudado, uma vez que para materiais de colágeno desnaturado (gelatina) não se observa nenhuma transição nesse intervalo⁶³.

FIGURA 21. Fotomicrografia da matriz de colágeno em aumento de 100 vezes.

FIGURA 22. Fotomicrografia da matriz de colágeno em aumento de 500 vezes.

As fotomicrografias das matrizes contendo 5% de progesterona estão representadas nas Figuras 23 e 24 em aumentos de 100 e 500 vezes respectivamente. Observa-se na Figura 23 que a presença de progesterona não alterou a característica compacta e desfibrilada da superfície do colágeno. Em maior resolução (Figura 24), evidencia-se a característica amorfa sem fibras do colágeno.

Na Figura 25, correspondente à superfície da matriz de colágeno contendo 10% de progesterona em aumento de 100 vezes, observa-se a mesma característica desfibrilada e pouco porosa do colágeno e cristais de progesterona por toda a extensão da fotomicrografia. Em aumento de 500 vezes dessa matriz, destaca-se a presença dos cristais de progesterona, indicados pelas setas e algumas poucas fibras na superfície (Figura 26).

FIGURA 23. Fotomicrografia da matriz de colágeno contendo 5% de progesterona em aumento de 100 vezes.

FIGURA 24. Fotomicrografia da matriz de colágeno contendo 5% de progesterona em aumento de 500 vezes. Setas apontando cristais de progesterona

FIGURA 25. Fotomicrografia da matriz de colágeno contendo 10% de progesterona em aumento de 100 vezes

FIGURA 26. Fotomicrografia da matriz de colágeno contendo 10% de progesterona em aumento de 500 vezes. Setas apontando cristais de progesterona.

IV.2.7. Determinação da Quantidade de Progesterona nas Matrizes de Colágeno

O hormônio progesterona foi incorporado manualmente ao gel de colágeno, nas proporções de 5 e 10% sobre a quantidade de colágeno (m/m) e distribuído em moldes de polistireno para ser congelado, liofilizado e dar origem às matrizes.

Foram utilizados três fragmentos de cada matriz (com 5% e 10% de progesterona) para a verificação da quantidade de progesterona incorporada para comparação com a quantidade proposta inicialmente. A Tabela 8 compara a quantidade (mg) esperada nas matrizes com o valor encontrado e a eficiência da incorporação.

TABELA 8. Eficiência de incorporação de progesterona nas matrizes de colágeno.

Progesterona incorporada à matriz (%)	Valor teórico médio de progesterona (mg)	Valor real (mg)	Eficiência de incorporação (%)
5%	0,543 ± 0,041	0,479 ± 0,059	88,21 ± 4,14
10%	1,196 ± 0,069	1,029 ± 0,034	86,03 ± 2,410

IV.2.8. Ensaios de Liberação *in vitro* de Progesterona

Entre os esteróides, a progesterona é o composto mais atrativo para regular a fertilidade e para o tratamento da infertilidade, pois ocorre em altas concentrações no organismo e não apresenta problemas de toxicidade, como geralmente ocorre com os progestágenos sintéticos. Entretanto, a progesterona não é oralmente ativa, exceto em altas doses e tem meia vida biológica bastante curta. Desta forma, é um candidato ideal para o encapsulamento e para liberação controlada⁶⁰.

A liberação cumulativa *in vitro* de progesterona suportada em matriz de colágeno aniônico é mostrada nas Figuras 27 e 28. A liberação de progesterona das matrizes com maior concentração (10%) foi mais lenta em comparação à liberação das matrizes contendo

5% do hormônio. Em 10 dias de liberação, cerca de 90% da progesterona foi liberada pelas amostras CP5, enquanto cerca de 50% foi liberada pelas amostras CP10 no mesmo período.

Um comportamento similar foi observado em trabalho publicado por Cornette e Duncan (Cornette apud Baker)*, no qual se estudou a liberação de estradiol em implantes de geometria cilíndrica com várias concentrações do esteróide disperso. Tratava-se de um sistema monolítico simples e chegou-se à conclusão de que, para um agente dissolvido, a quantidade liberada em um determinado tempo é independente da quantia inicial incorporada, enquanto que para um agente disperso, a quantia liberada em dado tempo diminui com o aumento da quantia incorporada.

Assim, os resultados sugerem que a progesterona não está dissolvida no colágeno, mas dispersa, como mostrados nas fotomicrografias das matrizes contendo progesterona (Figuras 23 a 26).

FIGURA 27. Liberação cumulativa (mg) *in vitro* de progesterona suportada em matrizes de colágeno, nas proporções de 5% (■) e 10% (●).

---

* CORNETTE, J. C. & DUNCAN, G. W – Contraceptive v.1(5) p. 339 1970. Apud Baker, R., - Controlled Release of Biologically active agents. NY, Willey – Interscience Pub. 1987

FIGURA 28. Liberação cumulativa (%) *in vitro* de progesterona suportada em matrizes de colágeno, nas proporções de 5% ( ) e 10% ( ). Linearidade em 60% da liberação (—).

Na Figura 28, observa-se que a curva para a liberação das amostras contendo 5% de progesterona demonstra linearidade no início da curva, sugerindo se tratar de um sistema de liberação de primeira ordem.

Há 3 mecanismos primários pelos quais agentes ativos podem ser liberados de um sistema de liberação: degradação; difusão e hidratação (intumescimento) seguido de difusão. Qualquer um, ou mesmo todos, podem ocorrer para um dado sistema⁴¹. Na degradação, ocorre desintegração da matriz, proporcionando a liberação do agente para o meio. Nos ensaios de liberação com as amostras CP5 e CP10, verificou-se que as matrizes se mantiveram íntegras, não sofrendo degradação, mas apenas hidratação e conseqüentemente intumescimento.

A difusão ocorre quando o fármaco ou outro agente ativo passa através do polímero de suporte, podendo ser em escala macroscópica (através dos poros da matriz polimérica), ou em escala molecular (passando entre as cadeias poliméricas). Um exemplo de liberação por difusão é mostrado na Figura 29.

O polímero e o agente ativo foram misturados para formar um sistema homogêneo, também denominado de “Sistema Matriz”. A difusão ocorre quando o agente passa do polímero para o ambiente externo. Nesse tipo de sistema, a taxa de liberação diminui com o tempo, pois o agente ativo tem, progressivamente, uma maior distância a percorrer, requerendo maior tempo de difusão para ser liberado.

FIGURA 29. Sistema Matriz de liberação por difusão de fármaco (adaptado de Peppas⁶⁶).

Nesse trabalho a cinética de liberação foi determinada por meio da equação^{67, 68}:

$$M_t/M_0 = kt^n \quad (\text{equação 9})$$

sendo: M_t/M_0 = massa liberada no tempo t

K = constante de liberação característica do sistema

T = tempo

n = expoente que caracteriza o mecanismo cinético de liberação por difusão

Através dos valores de n , pode-se determinar qual o modelo cinético de liberação o sistema está seguindo. Quando $n = 0,5$, trata-se de um sistema de difusão Fickiana normal. Para $n = 1,0$, o sistema libera segundo uma cinética de Caso II, também denominada de

não-Fickiana. E para $0,5 < n > 1,0$, considera-se que seja um caso de difusão anômala, ou seja, uma mistura da difusão Fickiana e da difusão não Fickiana.

A Figura 31 mostra as curvas $\ln M_t/M_0$ *versus* $\ln$ Tempo de liberação de progesterona suportada em colágeno aniônico, para concentrações iniciais de hormônio de 5% e 10% (m/m).

FIGURA 31. Liberação cumulativa (%) *in vitro* de progesterona suportada em matrizes de colágeno, nas proporções de 5% ( ) e 10% ( ).

Utilizando-se da equação 9 para verificar o perfil de liberação de progesterona a partir das matrizes de colágeno aniônico, obteve-se os valores de n , correspondentes à porção inicial das curvas ($M_t/M_0 = 60\%$). Os valores obtidos para CP5 e CP10 foram, respectivamente, 0,65 e 0,83, indicando que o sistema segue cinética de liberação de primeira ordem e o perfil de difusão anômala anteriormente descrita.

Os coeficientes de correlação foram 0,9954 e 0,9913 para as liberações de 5% e 10% respectivamente, confirmando a linearidade dos dados. Os valores obtidos para as constantes de liberação foram 11,75 para a liberação de 5% e 5,61 para a liberação de 10%.

A liberação de progesterona para a sincronização do ciclo estral das fêmeas economicamente exploráveis não deve resultar em concentrações plasmáticas semelhantes

à do meio da fase luteínica, que em fêmeas bovinas corresponde de 6 a 8ng/mL de plasma sanguíneo. Sincronizações efetivas são obtidas quando são administradas dosagens que geram concentrações em torno de 2 a 3 ng/mL de plasma ou acima de 8ng/mL de plasma⁶⁰.

Utilizando caprolactone para a liberação de progesterona, Rathbone⁶⁰ e colaboradores obtiveram níveis plasmáticos entre 2 e 3 ng/mL de plasma em fêmeas bovinas, semelhantes aos obtidos pelos produtos comerciais CIDR®. A adição de hidroxipropil β-ciclodextrina aos pesários de caprolactona elevou os níveis plasmáticos para variações entre 8 e 14 ng/mL de plasma sanguíneo.

Os resultados obtidos pela liberação *in vitro* das amostras CP5 e CP10 mostram que as matrizes colagênicas são promissoras para a liberação de progesterona para sincronização de ciclo estral. Extrapolando-se essas quantidades de progesterona, liberadas diariamente, em 200mL de tampão para 24000mL de tampão, valor correspondente ao volume de plasma sanguíneo de uma fêmea bovina de 500Kg de massa corporal, nota-se que são valores superiores aos desejáveis para a sincronização estral (Tabela 6).

TABELA 6. Extrapolação da quantidade de progesterona liberada diariamente pelas amostras CP5 e CP10 em 24000mL de tampão fosfato salino (pH 7,4).

Quantidade média de progesterona liberada (ng/mL)		
Dia	CP5	CP10
1	41,60 ± 0,16	20,80 ± 0,47
2	33,69 ± 0,74	08,32 ± 0,51
3	34,53 ± 0,68	32,82 ± 0,35
4	29,54 ± 0,41	37,90 ± 0,86
5	06,24 ± 0,28	--
6	29,12 ± 0,16	35,78 *
7	16,64 ± 0,18	19,14 ± 0,24
8	--	27,04 *
9	09,98 ± 0,45	02,91 ± 0,39
10	02,08 *	16,64 ± 0,72

* medida única

A extrapolação desses resultados mostram que o aproveitamento sistêmico de 50% da progesterona em liberações *in vivo*, os valores plasmáticos obtidos estariam em torno de 10ng/mL, valores superiores aos níveis médios (7ng/mL) para a sincronização do ciclo estral de fêmeas bovinas. Perdas de até 90%, manteriam níveis plasmáticos em torno de 2 a 3 ng/mL, semelhantes aos obtidos pelos produtos comerciais disponíveis e pelos resultados encontrados em liberações por caprolactona.

V-CONCLUSÕES

A incorporação da progesterona nas matrizes foi feita manualmente, obtendo-se em torno de 88% de eficiência. A presença do hormônio foi confirmada pelos resultados de espectroscopia no infravermelho, termogravimetria, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de varredura.

Observou-se, também, que o processo de obtenção de colágeno aniônico e a incorporação da progesterona não alteraram a estrutura em tripla hélice do colágeno, como demonstram a espectroscopia de infravermelho e calorimetria exploratória diferencial. O aspecto macroscópico das matrizes, coloração e formato também são preservados quando o hormônio está incorporado nas proporções de 5% e 10%. A presença da progesterona nas matrizes não alterou a capacidade de hidratação (cerca de 80%), mas aumentou a resistência frente à degradação por collagenase.

Os estudos de liberação demonstraram que as matrizes com 5% de progesterona liberam mais rapidamente que as incorporadas com 10%, sugerindo a dispersão do hormônio nas matrizes, como se observou nas fotomicrografias das mesmas. A cinética de liberação demonstrou que se trata de um tipo de difusão anômala, na qual existe dependência da concentração do agente a ser liberado e do tempo de liberação.

Embora o presente sistema de liberação não esteja completamente otimizado para liberar a concentração ideal de esteróide pelo período desejado de 10 dias, os dados obtidos *in vitro* mostram a possibilidade de construir tal sistema utilizando colágeno aniônico. Períodos mais prolongados de liberação poderão ser obtidos aumentando-se a concentração do hormônio incorporado, aumentando-se a quantidade de material usado ou reticulando-se o colágeno com glutaraldeído.

A extrapolação dos dados obtidos na liberação diária de progesterona mostram que as matrizes colagênicas são promissoras para liberações do hormônio para sincronização do

ciclo estral, pois aproveitamentos sistêmicos de até 10% das quantidades obtidas *in vitro*, são suficientes para iniciar um novo ciclo.

Seguindo a tendência atual de procura por um material biocompatível e biodegradável de liberação controlada, que possa liberar a progesterona em níveis esperados, reduzindo a toxicidade, os resíduos em carne e leite e otimizando as técnicas reprodutivas e a produção animal, o colágeno mostrou-se promissor, pois pode ser alterado quimicamente para liberações mais lentas ou mais rápidas além de poder ser moldado em vários formatos, de acordo com a necessidade de utilização.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS^{*}

- 1- WILLIAM, D. F. **Definitions in Biomaterials**, New York, Elsever, 1987. p. 9-29.
- 2- PARK, J. **Biomaterials Science and Engineering**, New York, Plenum Press, 1984.p.171-192.
- 3- SILVER, F.; DOILLON, C. **Biocompatibility, interations and implantable materials**, New York, VCH, v.1. p.1-76, 1989.
- 4- KMANN, J. **Biomaterials**, v.11, p.615-618, 1990.
- 5- HENCH, L. L.; DOILLON, C. **An introduction to bioceramics**. London, Singapore World Scientific, 1993. 386 p.
- 6- SZYCHER, M. ed. **Biocompatible polymers, metals and composites**, Lancaster, Technomic, 1983.
- 7- GRAHAM, N. B.; WOOD, D. A. **Macromolecular Biomaterias**, New York, RC Press, 1984.
- 8- SHIGEMASA,Y.; MINAMI, S. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.13, p. 383-420, 1995.

---

^{*} ABNT (NBR 6023/2003)

- 9- VIIDIK, A; VUUST, J. **Biology of collagen**. London, Academic Press, v.1, p.313-24, 1980.
- 10- MAYNE, R.; BURGESSON, R. E. **Structure and function of collagen types**. London, Academic Press, 317p., 1987.
- 11- LEE, C. H.; SINGLA, A; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **Int. j. Pharm.**, v.221, p.1-22, 2001.
- 12- EASTOE, J. E. Composition of collagen and allied proteins. In: RAMACHANDRAN, G. N., ed. **Treatise on collagen** London, Academic Press, 1967. v.1, p.1-67.
- 13- FIETZEK, P. P.; KUHN, K. Information contained in the amino acid sequence of the "alpha" 1 – chain of collagen and its consequences upon the formation of the triple helix, of fibrils and crosslinks. **Mol. Cell. Biochem.**, v.8, p. 141- 5, 1975.
- 14- NIMNI, M. E. **Collagen**. Boca raton, CRC, v.1, p.3-23, 1998.
- 15- AUBERTFOUCHER, E.; FONT, B.; EICHENBERGER, D.; GOLDSCHIMDT, D.; LETHIAS, C.; VANDERREST, M. Purification and characterization of native type-XIV collagen. **J.Biol. Chem**, v265, n.22, p.15759, 1992.
- 16- PIEZ, K. A; Structure and assembly of the native collagen fibril. **Connect.Tissue Res.**, v.10, p.25-.36, 1982
- 17- REID, G. G.; GORHAM, S. D.; LACKIE, J. M. The attachment, spreading, and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-composite substrata. **J. Mat. Sci. Mat. Med.**, v.4, p.201-9, 1993.

- 18- KASAI, S. Enhanced effect of chemically modified collagen substratum on attachment and growth of fibroblasts in serum-free medium. **Biomed. Res.**, v.2, p.147-57, 1983.
- 19- SINGH, M. P.; STEFKO, J.; LUMPIKIN, J. A; ROSENBLATT, J. The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. **Pharm. Res.**, v.12, p.1205-10, 1995.
- 20- JAYAKRISHNAM, A; JAMELA, S. R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. **Biomaterials**, v.17, p.471-84, 1996.
- 21- HOFFMAN, A; S. Intelligent polymers in medicine and biotechnology, **Artif. Organs**, v.19, p.458-67, 1995.
- 22- LACERDA, C.; PLEPIS, A. M.; G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de Asparagina e Glutamina em colágeno: Preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Quim. Nova**, v.21, n.3, p.267-71, 1998
- 23- BET, MARCOS ROBERTO. **Colágeno aniônico: propriedades físico-químicas, estruturais e comportamento biológico**. São Carlos, 2000. 107p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- 24- FRIES, W. Collagen biomaterial for drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.48, p.113-139, 1998.
- 25- GOISSIS, G.; MARCANTÔNIO JÚNIOR, E.; MARCANTÔNIO, R.A.C.; LIA, R.C.C.; CANCIAN, D.C.J.; CARVALHO, W.M. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. **Biomaterials**, v.20, p.27-34, 1999.
- 26- GOISSIS, G.; PICCIRILLI, A.; GOES, J.C.; PLEPIS, A.M.G.; DAS-GUPTA, D.K. Anionic collagen: Polymer composites with improved dielectric and rheological properties. **Int. J. Artif. Organs**, v.2, p.215-221, 1998.

- 27- PLEPIS, A.M.G.; GOISSIS, G.; DAS -GUPTA D.K. Dielectric and pyzoelectric characterization of anionic and native collagen. **Pol. Eng. Sci.**, v.36, p.2932- 2938, 1996.

- 28- GOISSIS, G.; LACERDA, C.; BARBOSA, M.P.; PINATTI, A. Surface tension controll of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. **Rev. Brasil. de Eng. Biom.**, v.15, p.55-61, 1999.

- 29- PROBST, M.; DAHIYA, R.; CARRIER, S.; TANAGHO, E.A. Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement. **J. Urol.**, v.79, p.505-155, 1997.

- 30- ACHAUER, B. M.; VANDERKAM, V.M.; CELIKOZ, B.; JACOBSON, D.G. Augmentation of facial soft-tissue defects with Alloderm dermal graft. **Ann. Plast. Surg.**, v.41, p.503-507, 1998.

- 31- FARRELLY, N.; LEE,Y. J.; OLIVER, J.; DIVE, C.; STREULI, C. H. Extracellular Matrix Regulates Apoptosis in Mammary Epithelium through a Control on Insulin Signaling. **J. Cell. Biol.**, v.144, p.1337-1348, 1999.

- 32- GRINNELL, F.; HO, C. H.; LIN, Y. C.; SKUTA, G. Differences in the regulation of fibroblast contraction of floating versus stressed collagen matrices. **J Biol. Chem.**, v.274, p.918-923, 1999.

- 33- TROJANOWSKA, M.; LEROY, E. C.; ECKES, B.; KRIEG, T. Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin. **J. Mol. Med.**, v.76, p.266-274, 1998.

- 34- KATO, T. **Collagen fibers for use in medical treatments.** US 4.420339. December 13, 1983.

- 35- GOISSIS, G.; PLEPIS, A. M. G.; ROCHA, J. L. **Processo de extração de colágeno em tecidos animais com auxílio de solvente orgânico em meio alcalino.** BR. PI 9.405.043-0, 1994.
- 36- OGAWA, CLAUDIA AKEMI – **Compósitos hidroxiapatita:colágeno. Preparação, caracterização e estudos em liberação controlada com ciprofloxacina.** – São Carlos, 2002. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.
- 37- PAJEAN, M.; HUC, A; HERBAGE, D. Stabilization of liposomes with collagen. **Int. J. Pharm.**, v.77, n.1, p.31-40, 1991.
- 38- FERREIRA, J. C. G.; **Géis injetáveis de colágeno:ramsana.** Caracterização e aplicações. São Carlos, 1996. 113p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- 39- FOLKMANN, J. How the field of the controlled release technology began, and its central controlled role in the development of a angiogeneses research. **Biomaterials**, v.11, p.615-18, 1990.
- 40- DANCKWERTS, M.; FASSIHI, A; Implantable controlled release drug delivery systems – a review. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.17, p.1465-502, 1991.
- 41- BAKER, R. **Controlled release of biologically active agents.** New York, Willey-Interscience, 1987, 279p.
- 42- GRAHAM, N. B. **Br. Poly. J.**, v.10, p.260-6, 1978 **apud** DASH, A; K.; CUDWORTH II, G. C. **J. Pharmacol. Toxicol. Met.**, v.40, p.1-12, 1998.

- 43- THACHARODI, D.; RAO, K. P. Rate-controlling biopolymer membranes as transdermal delivery system for nifedine: development and *in vitro* evaluations. **Biomaterials**, v.17, n.13, p.1307-11, 1996.
- 44- HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment base containing drug suspension. **J. Pharm. Sci.**, v.59, n.3, p.353, 1970.
- 45- SHEU, M. T.; LIU, C. H.; SOKOLOSKI, T. D. Prolongation of drug delivery by covalent bonding of drugs to serum albumin microbeads. **Drug Des. Delivery**, v.7, n.4, p.251-7, 1991.
- 46- MARTINS, V. C. A; GOISSIS, G.; RIBEIRO, A; C.; MARCANTÔNIO JUNIOR., E.; BET,M. The controlled release of a antibiotic by hydroxyapatite:anionic collagen composites. **Artif. Organs**, v.22, n.3, p. 215-21, 1998.
- 47- CUNNINGHAM, J.G.; **Tratado de fisiologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 5, p. 132-136, 1996.
- 48- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M., **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: SARVIER, cap. 20, 1995.
- 49- JAMEELA, S.R.; KUMARY, T.V.; LAL, A V.; JAYAKRISHNAN– Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. **J. of Controlled Release**, v.52 , p.17-24, 1998.
- 50- RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 50 p. 277-320. 2001

- 51- STANBENFELDT, G. H. O Sistema Endócrino In.: CUNNINGHAN J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**, 2 Ed. Guanabara Koogan, p. 259-272, 1993.
- 52- NOGUEIRA, G. P., Farmacologia do eixo Hipotálamo-Hipófise. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M., **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, 1ed., Editora Guanabara Koogan S.A., p. 275-288, 1996.
- 53- DO VALLE, E. R. O ciclo estral dos bovinos e métodos de controle. **Embrapa Publicações**. Campo Grande, MS. N.48, 1991.
- 54- BENITES, N. R., Medicamentos empregados para sincronização do ciclo estral e transferência de embriões. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M., **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, 1ed., Editora Guanabara Koogan S.A., p. 263-274. 1996.
- 55- BRITT, J. H., ROCHE, J. F. Indução e sincronização da ovulação. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.) **Reprodução animal**. 4 ed. São Paulo, Manole, .p.632-648. 1992.
- 56- HANSEL, W.; BEAL, W. E. Ovulation control in cattle, in: HAWK, H. W. (Ed.), Montclair, ALLANHEAD, N. J., O. and co. Beltsville Symposia in Agricultural Research, III, **Animal Reproduction**, p.91, 1979.
- 57- ROBINSON, T.J. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep. **Nature**, v.206, n.4979, p.39-41, 1965.
- 58- MAUER, R. E.; WEBEL, S. K. BROWN, M. D.; Ovulation control in cattle with progesterone intravaginal device (PRID) and gonadotrophin releasing hormone (GnRH), **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.** n.15, p.291-296, 1975.

- 59- RHOTEN-WEINHOLD;A. DHAN, M.; .GURNY, R. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. **J. of Controlled Release**, v. 3, n.7, p.222-231, 2000.
- 60- RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Development of an injection molded poly (ϵ -caprolactone) intravaginal insert for delivery of progesterone to cattle. **J. of Controlled Release** v. 85 p. 61-71. 2002.
- 61- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- 62- PAYNE, K.J.; VEIS, A. FTIRS of collagen and gelatin solutions: deconvolutions of the amide I band for conformational studies. **Biopolymers**, v.27, p.1749-1760, 1988.
- 63- GEORGE, A. VEIS, A. FTIRS in H₂O demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. **Biochemistry**, v.30, p.2372-2377, 1991.
- 64- WENDLAND, W.W.M. **Thermal Analysis**. 3ed. New York, John Wiley, p1-86, 1986.
- 65- PRIVALOV, P.I.; TIKTOPULO, E. I. Thermal conformational transformatoin of tropocollagen. I. Calorimetric Study. **Biopolymers**, v.9, p.127-139, 1970.
- 66- PEPPAS, L. B. Polymers in controlled Drug Delivery. **Biomaterials**, v.21, n.18, p.1401-5, 1997.
- 67- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for descrition of solute release. I. Fickian and non Fickian release from non-swelable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or disks. **J. of Controlled Release**, v. 5, p.23-26, 1987.

- 68- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **J. of Controlled Release**, v. 5, p.37-42, 1987.