

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

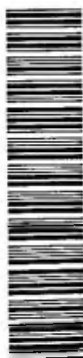
**"Modificação do colágeno pela reação de Maillard e  
avaliação de formulações na forma gel desenvolvidas a  
partir do material modificado"**

**Juliana Cordeiro Cardoso**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas para  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e  
Medicamentos**

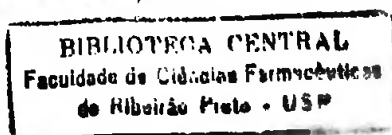
**Orientador: Prof. Dr. Newton Lindolfo Pereira**

DEDALUS - Acervo - FCFRP



10600007287

**Ribeirão Preto  
2005**



05103105

## FICHA CATALOGRÁFICA

Cardoso, Juliana Cordeiro

Modificação do colágeno pela Reação de Maillard e avaliação de formulações na forma gel desenvolvidas a partir do material modificado. Ribeirão Preto, 2005.

152 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Pereira, Newton Lindolfo.

1. Colágeno. 2. Sistema de liberação prolongada. 3. Biomateriais. 4. Reação de Maillard.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Cordeiro Cardoso

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

01/03/05

**Dedico esse trabalho a minha filha  
Isadora, a qual é responsável  
pela alegria dos meus dias, e  
aos meus pais Déscio e Suely,  
os quais foram sempre meus  
anjos da guarda.**

**"A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade"**

**(Carlos Drummond de Andrade)**

## *Agradecimentos*

*Ao Prof. Dr. Newton Lindolfo Pereira pela orientação a amizade.*

*Valeu chefe!*

*Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas pela cooperação e atenção dispensada.*

*Ao Paulo Sérgio Carvalho pela constante ajuda e atenção.*

*Aos amigos da pós-graduação, em especial a amiga Rogéria de Souza Nunes.*

*Ao amigo Adriano Antunes S. Araújo pela cooperação nos tratamentos estatístico deste trabalho.*

*A Universidade Federal de Sergipe pelo acolhimento e cooperação.*

*Aos demais docentes, técnicos e laboratórios da FCFRP-USP, os quais sempre estiveram abertos para dúvidas e experimentações.*

*A Coordenação de Pós-Graduação e seus funcionários.*

*Aos meus irmãos Daniel e Camila. Amo vocês!!!*

*A Antero e sua família pelo apoio e amor.*

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho se tornasse realidade,*

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....                 | 16 |
| 1.1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....                | 18 |
| 1.2. POLÍMEROS.....  | 20 |
| 1.3. COLÁGENO.....   | 23 |
| 1.4. A MODIFICAÇÃO DA MOLÉCULA.....                        | 30 |
| 1.4.1. REAÇÃO DE MAILLARD.....                             | 30 |
| 1.4.2. CARACTERÍSTICAS DOS PRODUTOS DE MAILLARD.....       | 36 |
| 1.5. CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO..... | 39 |
| 1.5.1. DETERMINAÇÃO DE HIDROXIPROLINA.....                 | 39 |
| 1.5.2. FLUORESCÊNCIA.....                                  | 40 |
| 1.5.3. ANÁLISE TÉRMICA.....                                | 42 |
| 1.5.4. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE LIGAÇÃO.....                | 43 |
| 1.5.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....                | 44 |
| 1.6. AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO.....              | 45 |
| 1.6.1. COMPORTAMENTO REOLÓGICO.....                        | 46 |
| 1.6.2. ENSAIO DE LIBERAÇÃO.....                            | 50 |
| 2. OBJETIVOS.....  | 51 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                 | 52 |
| 3.1. MATERIAL .....  | 52 |
| 3.2. MÉTODOS .....   | 53 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO COLÁGENO.....  | 53 |
| 3.2.1.1. PRÉ-TRATAMENTO DO TENDÃO BOVINO.....   | 53 |
| 3.2.1.2. PREPARAÇÃO DO COLÁGENO POBRE EM<br>TELOPEPTÍDEO.....   | 55 |
| 3.2.2. MODIFICAÇÃO DO POLÍMERO – REAÇÃO DE MAILLARD.....  | 55 |
| 3.2.3. AVALIAÇÃO DO COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO PELA<br>REAÇÃO DE MAILLARD.....                                    | 58 |
| 3.2.3.1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....   | 58 |
| 3.2.3.2. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE HIDROXIPROLINA   | 62 |
| 3.2.3.3. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE LIGAÇÃO DO<br>AÇÚCAR REDUTOR NO COLÁGENO.....  | 66 |
| 3.2.3.4. DETERMINAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DAS AMOSTRAS<br>DE COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO PELA REAÇÃO DE MAILLARD..... | 68 |
| 3.2.3.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....   | 68 |
| 3.2.3.6. ANÁLISE TÉRMICA DO COLÁGENO E COLÁGENO<br>MODIFICADO.....  | 69 |
| 3.2.3.7. ENSAIO REOLÓGICO DOS GÉIS DE COLÁGENO E<br>COLÁGENO MODIFICADO.....  | 69 |
| 3.2.3.8. ENSAIOS DE LIBERAÇÃO.....  | 71 |
| 3.2.3.8.1. PREPARAÇÃO DOS GÉIS.....   | 71 |
| 3.2.3.8.2. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS.....  | 72 |
| 3.2.3.8.3. MONTAGEM DA CÉLULA DE DIFUSÃO E SISTEMA<br>PARA O ENSAIO DE LIBERAÇÃO.....                                 | 72 |
| 3.2.3.8.4. ENSAIO DE LIBERAÇÃO REALIZADO EM<br>APARELHO DE DISSOLUÇÃO.....  | 77 |
| 4. RESULTADOS .....   | 79 |
| 4.1. CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DO COLÁGENO MODIFICADO<br>PELA REAÇÃO DE MAILLARD.....                               | 79 |



|   |     |
|---|-----|
| 4.1.1. AMOSTRAS SUBMETIDAS À REAÇÃO ANTES DA EXTRAÇÃO DO COLÁGENO (ANT).....                                | 80  |
| 4.1.2. AMOSTRAS SUBMETIDAS À REAÇÃO APÓS EXTRAÇÃO DO COLÁGENO (POST).....                                   | 81  |
| 4.2. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE LIGAÇÃO DO AÇÚCAR REDUTOR NA MOLÉCULA DE COLÁGENO.....                         | 82  |
| 4.3. ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA DO COLÁGENO E DO COLÁGENO MODIFICADO.....              | 84  |
| 4.4. AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO DO COLÁGENO FLUORESCÊNCIA.....  | 87  |
| 4.5. ANÁLISE DO COLÁGENO E DO COLÁGENO MODIFICADO POR ESPECTROSCÓPIA DE INFRAVERMELHO.....                  | 89  |
| 4.6. ANÁLISE TÉRMICA DO COLÁGENO E DO COLÁGENO MODIFICADO...  | 93  |
| 4.7. ENSAIO REOLÓGICO DAS DISPERSÕES COLOIDAIS DO COLÁGENO E DO COLÁGENO MODIFICADO.....                    | 99  |
| 4.8. PERFIL DE LIBERAÇÃO DO PARACETAMOL DO GÉIS DO COLÁGENO (COL) E DO COLÁGENO MODIFICADO (TAPOST720)..... | 105 |
| 5. DISCUSSÃO.....   | 110 |
| 6. CONCLUSÃO.....   | 132 |
| REFERÊNCIAS .....   | 134 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1. DESENHO ESQUEMÁTICO DA MOLÉCULA DE COLÁGENO.....   | 25 |
| FIGURA 2. ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE MAILLARD.....   | 35 |
| FIGURA 3. COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE MATERIAIS.....  | 49 |
| FIGURA 4. FLUXOGRAMA PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO COLÁGENO.....  | 54 |
| FIGURA 5. CURVA PADRÃO DE HIDROXIPROLINA.....  | 65 |
| FIGURA 6. CÉLULA DE DIFUSÃO DE FLUXO CONTÍNUO.....   | 73 |
| FIGURA 7. DIMENSÕES DA CÉLULA DE DIFUSÃO DE FLUXO CONTÍNUO.....  | 74 |
| FIGURA 8. SISTEMA PARA O ENSAIO DE LIBERAÇÃO.....  | 75 |
| FIGURA 9. CURVA PADRÃO DO PARACETAMOL.....   | 76 |
| FIGURA 10. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 7,5 COM SDS DAS AMOSTRAS DE COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO.....   | 85 |
| FIGURA 11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 4-15 COM SDS DAS AMOSTRAS DE COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO.....  | 86 |
| FIGURA 12. FLUORESCÊNCIA DE AMOSTRAS COLETADAS DURANTE EXPERIMENTOS 90ANT8 E 90ANT8-5.....   | 89 |
| FIGURA 13. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DE COLÁGENO EXTRAÍDO DE TENDÃO BOVINO LIOFILIZADO E COLÁGENO AMOSTRA CONTROLE, SUBMETIDA A AQUECIMENTO..... | 90 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 14. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS 90ANT8, 50ANT72 E 90CPROT8.....  | 91  |
| FIGURA 15. AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS 90ANT8, 50ANT72 E 90CPROT8.....                                | 92  |
| FIGURA 16. CURVA DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA AMOSTRA COL.....   | 94  |
| FIGURA 17. CURVA DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA AMOSTRA 90CPROT8.....  | 95  |
| FIGURA 18. CURVA DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA AMOSTRA 90ANT8.....  | 96  |
| FIGURA 19. CURVA DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA AMOSTRA 50ANT72.....   | 96  |
| FIGURA 20. CURVA DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA AMOSTRA 50POST72.....  | 98  |
| FIGURA 21. CURVA DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA AMOSTRA TAPOST720.....   | 98  |
| FIGURA 22. REOGRAMA DAS AMOSTRAS COL E TA720POST NA TEMPERATURA DE ENSAIO DE 25°C.....  | 100 |
| FIGURA 23. REOGRAMA DAS AMOSTRAS COL E TA720POST NA TEMPERATURA DE ENSAIO DE 37°C.....  | 101 |
| FIGURA 24. VISCOSIDADE APARENTE DO GEL DE COLÁGENO A 1% (P/V) EM FUNÇÃO DO GRADIENTE DE CISLHAMENTO NA TEMPERATURA DE 25°C..... | 102 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 25. VISCOSIDADE APARENTE DO GEL DE COLÁGENO MODIFICADO A 1% (P/V) EM FUNÇÃO DO GRADIENTE DE CISLHAMENTO NA TEMPERATURA DE 25°C.....  | 102 |
| FIGURA 26. VISCOSIDADE APARENTE DO GEL DE COLÁGENO A 1% (P/V) EM FUNÇÃO DO GRADIENTE DE CISLHAMENTO NA TEMPERATURA DE 37°C.....             | 103 |
| FIGURA 27. VISCOSIDADE APARENTE DO GEL DE COLÁGENO MODIFICADO A 1% (P/V) EM FUNÇÃO DO GRADIENTE DE CISLHAMENTO NA TEMPERATURA DE 37°C.....  | 104 |
| FIGURA 28. PERFIL DE LIBERAÇÃO DE PARACETAMOL A PARTIR DE GÉIS DE COLÁGENO NÃO MODIFICADO EM CÉLULA DE DIFUSÃO.....                         | 106 |
| FIGURA 29. PERFIL DE LIBERAÇÃO DE PARACETAMOL A PARTIR DE GÉIS A 2% (P/V) DE COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO EM CÉLULA DE DIFUSÃO.....       | 107 |
| FIGURA 30. PERFIL DE LIBERAÇÃO DE PARACETAMOL A PARTIR DE GÉIS A 1% (P/V) DE COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO NO APARELHO DE DISSOLUÇÃO.....  | 108 |
| FIGURA 31. PERFIL DE LIBERAÇÃO DE PARACETAMOL A PARTIR DE GÉIS DE COLÁGENO A 1% (P/V) NO APARELHO DE DISSOLUÇÃO E NA CÉLULA DE DIFUSÃO..... | 109 |

#### LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS UTILIZANDO COLÁGENO COMO BIOMATERIAL..... | 28 |
| TABELA 2. RESUMO DOS EXPERIMENTOS DA REAÇÃO DE MAILLARD.....                          | 57 |

|  |     |
|--|-----|
| TABELA 3. ANÁLISE MACROSCÓPICA DAS AMOSTRAS DO COLÁGENO MODIFICADO QUIMICAMENTE PELA REAÇÃO DE MAILLARD.....               | 79  |
| TABELA 4. GRAU DE LIGAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR ÀS AMOSTRAS DE COLÁGENO EM TENDÃO BOVINO E APÓS SEREM EXTRAÍDAS DO TENDÃO..... | 82  |
| TABELA 5. FLUORESCÊNCIA DAS AMOSTRAS COLETADAS APÓS PERÍODO REACIONAL.....   | 89  |
| TABELA 6. PERDA DE MASSA (%) EM DIFERENTES FAIXAS DE TEMPERATURA DAS AMOSTRAS DE COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO.....       | 97  |
| TABELA 7. PARÂMETROS REOLÓGICOS DOS GÉIS A 1% (P/V) DE COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO.....                                 | 104 |
| TABELA 8. LIBERAÇÃO DO PARACETAMOL (%) ATÉ 60 E 240 MINUTOS DE EXPERIMENTO.....  | 106 |

#### **LISTA DAS EQUAÇÕES**

|   |    |
|---|----|
| EQUAÇÃO 1. EQUAÇÃO DA RETA DA CURVA PADRÃO DE HIDROXIPROLINA....                    | 65 |
| EQUAÇÃO 2. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE LIGAÇÃO.....                                     | 67 |
| EQUAÇÃO 3. DETERMINAÇÃO DA TENSÃO DE CISLHAMENTO.....                               | 70 |
| EQUAÇÃO 4. DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE APARENTE.....                                | 71 |
| EQUAÇÃO 5. EQUAÇÃO DA RETA DA CURVA PADRÃO DE PARACETAMOL.....                      | 76 |
| EQUAÇÃO 6. DETERMINAÇÃO DA % DE PARACETAMOL LIBERADO (CÉLULA DE DIFUSÃO) .....      | 76 |
| EQUAÇÃO 7. DETERMINAÇÃO DA % DE PARACETAMOL LIBERADO (APARELHO DE DISSOLUÇÃO) ..... | 77 |

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a padronização da metodologia de extração e purificação do colágeno e a possível modificação da molécula através de uma reação conhecida como reação de Maillard. Esta reação ocorre entre proteína e açúcares redutores. A molécula de colágeno obtida da extração e o produto da reação foram caracterizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida, análise térmica, grau de ligação, espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de infravermelho. O colágeno modificado e não modificado foram avaliados na forma de gel nas concentrações de 1 e 2%. Os sistemas de liberação na forma gel foram caracterizados através de seu comportamento reológico e o perfil de liberação de fármacos foi avaliado. Os resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida mostraram que a extração e purificação foram eficientes. Resultados relacionados à espectroscopia de infravermelho e fluorescência sugeriram que a modificação ocorreu nas diversas condições reacionais propostas. Os materiais modificados em condições reacionais as quais não permitiram a reorganização do material na forma gel, ou seja, que contribuíram para a desnaturação irreversível do polímero não foram testados como biomateriais para sistemas de liberação. Apenas o polímero modificado em temperatura ambiente foi utilizado para tais ensaios. Os ensaios reológicos apontaram uma maior viscosidade do gel formado a partir da molécula de colágeno modificado com aumento no valor de cedência na temperatura de 25°C. Em relação à liberação, os resultados sugeriram que o aumento da concentração do colágeno no gel promoveria um maior tempo de retenção do paracetamol no sistema. Já para o polímero modificado, os resultados sugeriram que o aumento da concentração pode desorganizar a microestrutura do sistema tornando a molécula do fármaco mais livre para ser liberada. Outro ponto observado foi a possível interação fármaco-colágeno, a qual não foi observada na molécula modificada. Apesar da diferença da razão de liberação do paracetamol nos dois polímeros estudados, ambos não foram capazes de reter o fármaco por tempo prolongado.

Palavras-chave: colágeno; sistema de liberação prolongada; biomateriais; reação de Maillard

## SUMMARY

The present work have studied the extraction and purification of collagen and the possibility of molecule modification by Maillard's reaction. This reaction occurs between proteins and reducing sugars. The purified collagen and modified collagen were characterized by SDS-PAGE, cross-linking degree, thermal analysis, fluorescence spectroscopy and FTIR spectroscopy. The modified collagen and the original molecule were also evaluated in gels form at 1 and 2%(w/V) of polymer. The drug delivery systems were characterized by rheological analyses and "in vitro" release studies were carried out. The SDS-PAGE results showed that the extraction and purification method were efficient. The FTIR and fluorescence spectroscopy results showed that the reaction occurred at proposed reaction conditions. The better reaction temperature to present work was environment temperature since the collagen denature irreversibly at higher temperatures and its impossible to get a gel form. To drug delivery tests, only this modified polymer was used. The gels rheological studies showed that the modified protein has higher viscosity than the original molecules gels. The gel obtained from modified collagen presented higher yield value than collagen gel at 25°C. Concerning to drug delivery, the results suggested that the increase of collagen concentration in system could increase the retention time of acetaminophen. It was not observed in modified collagen gels. The increase of polymer concentration presented a higher drug delivery rate, probably due the system microstructure disorganization. The acetaminophen slower release from collagen gel could be also because the possible interaction drug-collagen, that could not be observed in modified molecule. Both gels were not able to prolong the drug release.

**Keywords:** collagen; drug delivery system; biomaterials; Maillard's reaction.

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Um dos objetivos dentro da tecnologia farmacêutica é buscar estratégias para otimizar formulações já existentes, ou desenvolver sistemas novos que possam melhorar a biodisponibilidade do fármaco ou reduzir efeitos colaterais causados pelos mesmos.

Uma subárea de grande interesse dentro da tecnologia farmacêutica é o desenvolvimento de novos materiais, os quais devem ter propriedades especiais para o desenvolvimento de formulações com características específicas, diferenciando-as das formulações convencionais.

Dentre os materiais utilizados para este fim destacam-se os polímeros, cada qual com suas propriedades específicas, tais como, capacidade de retardar a liberação do fármaco (MANDAOGADE et al., 2002), de liberá-lo somente em um sítio específico, como por exemplo, sistemas de liberação colônica (VAN DEN MOOTER et al., 1994; WAKERLY et al., 1997; KAKOULIDES et al., 1998; GLIKO-KABIR et al., 1998) ou de serem gastro-resistentes.

Os materiais utilizados na maioria das formulações existentes atualmente no mercado são polímeros acrílicos (WATTS et al., 1994; DAS e DAS, 1998; GONDALIYA e PUNDARIKAKSHUDU, 2003), celulósicos



(TIWARI et al., 2003) entre outros. Tais polímeros muitas vezes requerem o uso de solventes orgânicos indesejáveis (BODMEIER e WANG, 1993; MANDAOGADE et al., 2002), podem não ser biocompatíveis e apresentar características imunogênicas, além de muitos não serem biodegradáveis.

Novos polímeros têm sido estudados a fim de se obter dispersões coloidais aquosas, tais como derivados de celulose (TIWARI et al., 2003); alginatos (LÓPEZ e BODMEIER, 1997) e quitosanas (EL-KAMEL, 2002); proteínas (SANTINHO et al., 1999); entre outros e superar os problemas acima relacionados.

O uso de polímeros hidrofílicos naturais ou biopolímeros, como também podem ser chamados, tem recebido considerável atenção, especialmente do ponto de vista do custo, poluição ambiental, segurança na manipulação e biocompatibilidade (LÓPEZ e BODMEIER, 1997). O desenvolvimento de novos compostos, em especial polímeros de origem natural, intactos ou quimicamente modificados, é uma promissora área dentro da tecnologia farmacêutica.

Algumas proteínas têm apresentado propriedades desejáveis na preparação de biomateriais, tais como habilidade em formar fibras ou redes, elasticidade e plasticidade (FRIESS, 1998; SANTINHO et

al., 1999). O colágeno já vem sendo utilizado na área médica devido suas inúmeras vantagens, e sua modificação química pode produzir moléculas com propriedades interessantes (FRIESS, 1998). Isto tem aumentado o interesse na aplicação destas proteínas para o uso comercial.

No presente trabalho propõe-se então o estudo da molécula de colágeno e do material colagenoso modificado quimicamente e sua possível utilização como material formador de sistemas de liberação de fármacos.

### **1.1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**

Os sistemas de liberação de fármacos usados convencionalmente liberam os fármacos neles contidos de maneira imediata. Assim, o fármaco é absorvido em função de suas próprias características físico-químicas. Para fármacos que não apresentam baixo índice terapêutico ou necessidade de administração crônica, tais formulações são eficientes. Porém muitas vezes, para que se atinja a concentração terapêutica necessária, dentro de um tempo adequado para o efetivo tratamento da patologia, sem que haja risco de toxicidade, tais sistemas tornam-se ineficazes (SOUSA, 1998; FREIBERG E ZHU, 2004).

A partir da década de 60, pesquisadores iniciaram o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos nos quais o fármaco era liberado em fluxo definido durante um período de tempo estabelecido. Nestes sistemas, a concentração do fármaco poderia ser atingida e mantida dentro da faixa terapêutica, evitando flutuações da concentração plasmática, bem como reduzindo o número de administração da forma farmacêutica (LANGER et al., 1990; HOFFMAN, 2002).

Estudos realizados na década de 80 visavam o desenvolvimento de sistemas de liberação com características físico-químicas modificadas e que seriam capazes de controlar a razão de liberação, sustentar a duração da atividade terapêutica e até liberar o fármaco em locais específicos do organismo (GÖPFERICH, 1997).

O termo liberação sustentada começou a ser introduzido na década de 70 para definir formas farmacêuticas com ação prolongada. Os benefícios obtidos por tais formulações seriam (GREGORIADIS, 1977; POZNANSKY E JULIANO, 1984; GÖPFERICH, 1997; KUMAR, 2000).

- A) possibilidade de minimizar flutuações existentes com a administração múltipla da forma farmacêutica convencional,

- mantendo a concentração dentro da faixa terapêutica por tempo maior;
- B) prever e reproduzir a liberação;
  - C) ampliar o tempo de duração de efeito terapêutico de fármacos com tempo de meia-vida curto;
  - D) diminuir os efeitos colaterais e a frequência de administração da forma farmacêutica;
  - E) otimizar a terapêutica e maior aderência do paciente ao tratamento.

Os estudos de sistemas de liberação de fármacos (SLS) ocorreram devido ao desenvolvimento da tecnologia de polímeros (LONSDALE, 1982).

## **1.2. POLÍMEROS**

Polímeros são moléculas de alta massa molecular que apresentam unidades monoméricas repetidas. Quando a molécula apresenta mais de um tipo de monômero é chamada de copolímero. Os polímeros podem apresentar cadeias lineares ou ramificadas. Estas cadeias são unidas por ligações cruzadas (reticulação), e quando apresentam alto grau de intercruzamento formam, na maioria das

vezes, uma rede polimérica tridimensional e insolúvel. O arranjo de tais cadeias no espaço define as propriedades e a reatividade polimérica (CANEVAROLO JR., 2002; FLORENCE E ATWOOD, 2003).

Estas macromoléculas são amplamente utilizadas na Indústria Farmacêutica e de Alimentos como agentes suspensores, emulsificantes, adesivos, material para desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (FLORENCE E ATWOOD, 2003) e como materiais de embalagem (PARRIS et al., 1995; SANCHEZ et al., 1998; TOMASULA et al., 1998).

Os polímeros utilizados em sistemas de liberação sustentada ou prolongada devem ter capacidade de influenciar a liberação do fármaco, ser biocompatíveis e de preferência devem ser biodegradáveis. Devem também ser caracterizados em relação às suas propriedades físico-químicas, pois devem ter comportamento físico-químico definido e reprodutível. Além disso, é importante dados sobre sua toxicidade (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 1986).

Essas moléculas podem ser classificadas como polímeros sintéticos ou naturais. Dentre os polímeros sintéticos mais utilizados pode-se citar os compostos acrílicos e seus derivados, tais como os copolímeros de Eudragit® (Röhm Pharma, Weiterstadt). Dentre os polímeros naturais mais utilizados estão a celulose e seus derivados

(Aquacoat®-FMC Corporation, Food & Pharmaceutical Products Division, Philadelphia, USA) além de proteínas e outros polissacarídeos (BODMEIER E PAERATAKUL, 1994).

Outros polímeros têm sido estudados com a finalidade de modificar a liberação de fármacos, diminuir problemas relacionados com solubilidade intrínseca do próprio polímero, melhorar sua biocompatibilidade, diminuir sua toxicidade e para atingir locais específicos do organismo (CHECK, 1984; CHEN et al., 1987; WILLMOTT et al., 1989; WILLMOTT et al., 1992). Formulações utilizando polímeros biodegradáveis como ácido poliláctico ou copolímero de ácido poli(láctico-co-glicólico) tem sido extensivamente estudadas para liberação de fármacos (FUJIOKA et al., 1998).

Polímeros de origem natural ou biopolímeros tem sido alvo da atenção de muitos pesquisadores, os quais almejam desenvolver produtos que tenham baixo impacto em relação à poluição ambiental, toxicidade aos manipuladores, baixo custo, maior segurança e melhor biocompatibilidade (LOPEZ E BODMEIER, 1997).

Algumas proteínas têm apresentado propriedades desejáveis na preparação de biomateriais, tais como, habilidade em formar fibras ou redes, elasticidade e plasticidade. Isto tem aumentado o interesse na aplicação destas proteínas para o uso comercial

(SANCHEZ et al.,1998). O uso de colágeno como carreador de fármacos peptídeos tem sido muito estudado (FUJIOKA et al., 1998).

### 1.3. COLÁGENO

O colágeno representa cerca de 30% da proteína existente no organismo de vertebrados (NIMNI et al., 1987). Está presente em tecidos que possuem função mecânica. Em tendões e ossos, 90% das proteínas extracelulares é colágeno e na pele cerca de 50% consiste da proteína em questão. Juntamente com sais de cálcio é responsável pela estrutura rígida dos ossos. Em combinação com outra proteína (a elastina) forma estruturas mais flexíveis, as quais são essenciais, por exemplo, para a aorta e os pulmões. Também é encontrado nos dentes e em cartilagens. (HO et al., 1997; FRIESS, 1998; VERAART et al., 1998; LEE et al., 2001).

Existem diferentes tipos de colágenos que fazem parte do tecido conectivo no organismo. Esta proteína compreende uma família de moléculas geneticamente distintas, as quais possuem uma única configuração tripla hélice de três subunidades polipeptídicas conhecidas como cadeias  $\alpha$  (HO et al., 1997; FRIESS, 1998; VERAART et al., 1998; LEE et. al., 2001).

No mínimo 19 tipos de colágenos já foram isolados e caracterizados quanto ao comprimento da hélice e à natureza e tamanho das porções não-helicoidais (HO et al., 1997; FRIESS, 1998; VERAART et al., 1998; LEE et al., 2001).

O colágeno tipo I é predominante em animais de grande porte, especialmente na pele, tendões e ossos onde forças extremas são transmitidas (FRIESS, 1998). As demais moléculas de colágeno podem ser encontradas, por exemplo, em cartilagens e humor vítreo (tipo II), vasos sangüíneos e trato gastrointestinal (tipo III) e membrana basal (tipo IV) (VIEIRA, 1997).

A molécula básica de colágeno tipo I contém três cadeias  $\alpha$  polipeptídicas: 2 cadeias idênticas chamadas de  $\alpha_1$  e uma cadeia chamada  $\alpha_2$ , cada uma contendo mais de 1000 resíduos de aminoácidos com massa molecular total em torno de 100.000 daltons (HO et al., 1997, FUJIOKA et al., 1998). O resíduo de hidroxiprolina representa de 10-14% na composição de aminoácidos no colágeno e oferece meios para quantificar a molécula ou seus produtos de degradação na presença de outras proteínas (WOESSNER, 1961). A figura 1 ilustra a molécula de colágeno tipo I.

Outro aminoácido não usual presente nesta proteína é a hidroxilisina, a qual é formada a partir da lisina no retículo



endoplasmático pela lisil hidroxilase. A formação de resíduos de hidroxilisil permite uma ligação específica com açúcares, um requisito indispensável para a molécula de colágeno formar a estrutura tripla hélice. "In vivo" as moléculas de colágeno tipo I estão dispostas em fibras ligadas por dois tipos de reticulações covalentes: intramoleculares e intermoleculares. As reticulações intermoleculares são essenciais para a estabilidade da fibra e responsáveis por várias propriedades físico-químicas da mesma (HO et al., 1997).

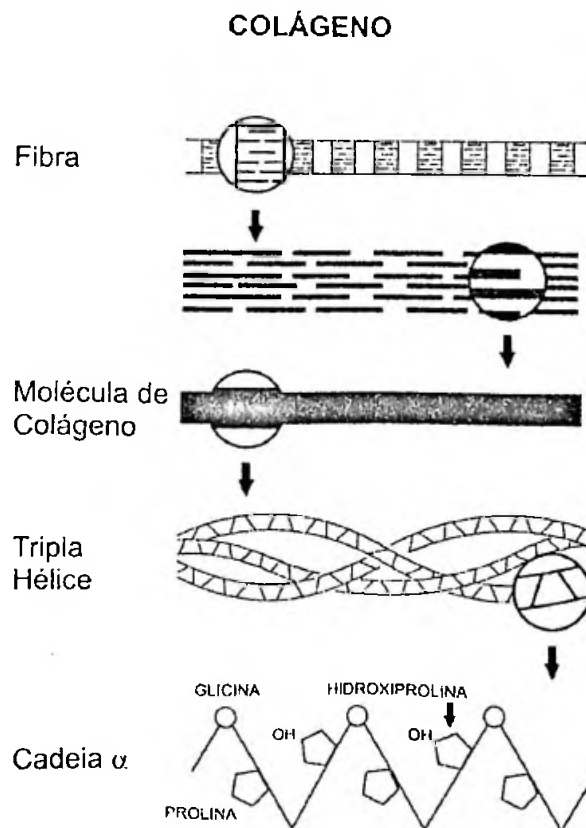


Figura 1. Desenho esquemático da molécula de colágeno.

O colágeno tipo I é uma glicoproteína com menos de 1% em carboidratos. Os componentes de açúcar são unidades de galactose ou dissacarídeos de galactose e glicose (FRIESS, 1998). Em geral, o telopeptídeo do colágeno tipo I é o provável causador da resposta imunogênica quando este é introduzido em hospedeiros xenogênicos. Para eliminar este problema, o material colagenoso deve ser tratado com pepsina para remover os telopeptídeos (HO et al., 1997).

Esta proteína pode ser utilizada como biomaterial pela sua excelente biocompatibilidade, devido suas características de baixa toxicidade e imunogenicidade (STEFFEN et al., 1968; ELLINGSWORTH et al., 1986; DELUSTRO et al., 1986; MEADE E SILVER, 1990; FRIESS E LEE, 1996; HO et al., 1997; LEE et al., 2001). Outra vantagem dela como biomaterial é que este polímero possui estrutura, propriedades físicas, químicas e imunológicas bem elucidadas. Também pode ser rapidamente isolada e purificada em grandes quantidades (HO et al., 1997).

O colágeno pode ser processado em inúmeras formas tais como, tubos, filmes, esponjas, pós, soluções injetáveis e dispersões (SRIVASTAVA et al., 1990). Nestas formas acima citadas podem formar sistemas de liberação de fármacos.

Segundo GIRAUD-GUILLE et al. (2000), o colágeno assume espontaneamente organização de cristais líquidos em altas concentrações. O grau de organização obtido em dispersões de colágeno está intimamente ligado a altas concentrações do polímero, evaporação lenta de solvente e configuração molecular assimétrica.

A tabela 1 ilustra as diversas áreas onde tais sistemas têm sido utilizados com relativo sucesso.

Entretanto, algumas desvantagens têm sido reportadas por alguns pesquisadores, tais como, dificuldade de garantir fornecimento adequado do material e pobre força mecânica. Essas desvantagens podem ser contornadas melhorando as propriedades físicas e químicas da molécula. Como estratégia de melhora para garantir o uso do colágeno na liberação de fármacos é comum utilizar sistemas com outras proteínas, tais como, elastina, fibronectina ou glicosaminoglicanas. A combinação de colágeno com outros sistemas ou substâncias, tais como, colágeno/lipossoma e colágeno/silicone tem sido proposta para conseguir a estabilidade do perfil de liberação dos compostos incorporados no sistema (LEE et al., 2001).

Tabela 1. Sistemas de liberação de fármacos utilizando colágeno como biomaterial

| Área  | Forma  |
|---|--|
| Odontologia                                     | gel (VIEIRA, 1997); membrana (SOUSA, 1998).  |
| Oftalmologia                                    | lente contendo fármacos (UNTERMAN et al., 1988; PHINNEY et al., 1988).   |
| Dermatologia e cirurgias plástica               | injetável (McPHERSON et al., 1986).  |
| Tratamento de queimaduras e feridas             | esponjas contendo fármacos (GORHAM, 1991).   |
| Liberação de peptídeos e proteínas terapêuticas | mini-grânulos e comprimidos (FUJIOKA et al., 1995; FUJIWARA et al., 1998), matrizes de uso parenteral (GILBERT & KIM, 1990; FUJIOKA et al., 1995). |
| Imunologia (Vacinas)                            | mini-grânulos contendo antígeno (LOFTHOUSE et al., 2001).  |
| Geneterapia                                     | nanopartículas (FRIESS, 1998; LEE et al., 2001).   |

A modificação química do colágeno vem sendo realizada para diminuir tais desvantagens. Alguns pesquisadores estudam a reticulação do colágeno com glutaraldeído a fim de alterar características tais como solubilidade e aumentar a resistência proteolítica (McPHERSON et al., 1986; FRIESS E LEE, 1996; LEE et al., 2001).

O colágeno reticulado com 0,1-3% de glutaraldeído tem várias aplicações clínicas em humanos: válvulas cardíacas, próteses vasculares e pele. GRATZER et al. (1996) estudaram modificação do colágeno por glutaraldeído e o efeito do meio reacional na modulação das propriedades mecânicas obtidas pela reticulação. FRIESS & LEE (1996) afirmaram que a utilização de glutaraldeído pode não ser muito vantajosa, pois a degradabilidade do colágeno é fortemente reduzida, além de outros autores discutirem sobre problemas relacionados a biocompatibilidade e efeitos adversos. Foi observado que altas concentrações do glutaraldeído resultam em citotoxicidade ("in vitro") e inflamação ("in vivo") (McPHERSON et al., 1986).

A eliminação da utilização de compostos tóxicos para a reticulação de polímeros e a obtenção de compostos biocompatíveis tem sido o objetivo de alguns grupos de pesquisa (SUNG et al., 1996a; HERNANDES et al., 1998; SANTINHO et al., 1999).

Outra modificação sugerida por SUNG et al. (1996a) foi a introdução de radicais epoxi como agentes reticuladores. Os autores estudaram as características de reticulação do tendão de Aquiles de origem suína avaliando a temperatura de desnaturação da molécula por calorimetria exploratória diferencial (DSC), o teor de umidade e o

índice de reticulação. Em trabalho posterior, SUNG et al. (1996b) estudaram estes epoxi-tendões reticulados em diferentes pHs, temperaturas e concentração de reticuladores.

#### **1.4. A MODIFICAÇÃO DA MOLÉCULA**

Vários trabalhos mostraram que a modificação química de proteínas pode alterar suas características físico-químicas e conseqüentemente alterar a liberação do fármaco, caso esta proteína seja utilizada para formar um sistema de liberação. Estas modificações podem ser induzidas de várias maneiras, entre elas pela inclusão grupamentos acila, como descrevem DE CARVALHO et al. (1995) e HERNANDES et al. (1998). Além da introdução de radicais acil, estudou-se também a introdução de polissacarídeos na molécula de proteínas (CARDOSO, 1999). Outros grupos utilizaram desta reação para melhorar a capacidade emulsificante do polímero (KATO et al., 1992). McGOOKIN E AUGUSTIN (1991) estudaram o aumento da atividade antioxidante de uma proteína, introduzindo açúcares na sua estrutura.

##### **1.4.1. REAÇÃO DE MAILLARD**

A modificação de proteínas pode ocorrer através de uma reação com moléculas de açúcar, sendo que estas se ligam a

aminoácidos susceptíveis da molécula protéica. Esta reação recebe o nome de reação de Maillard (FINOT E MAURON, 1969; FRANGNE E ADRIAN, 1972; FURNISS et al., 1989; MALIK E MEEK, 1996; MARTINS et al., 2001).

A reação de Maillard ou escurecimento não enzimático, como também é conhecida, se dá entre grupamentos amino e açúcares redutores. Grupamentos amino aparecem principalmente em resíduos de lisina e hidroxilisina do colágeno. A reação requer baixa energia de ativação (BALTES, 1982; MALIK E MEEK, 1996; MARTINS et al., 2001).

O interesse na reação de Maillard tem se concentrado principalmente em implicações nutricionais e no desenvolvimento de cor, sabor e odor, pois tais transformações formam compostos voláteis responsáveis por odor característico (BALTES, 1982; BOBBIO E BOBBIO, 1992; MARTINS et al., 2001). Essas reações usualmente ocorrem durante o processo de estocagem de alimentos que contém açúcares redutores e grupamentos amino.

A extensão da reação está relacionada a muitos fatores que devem ser considerados como variáveis, tais como, natureza do carboidrato e da proteína, a combinação temperatura-tempo usada durante o aquecimento, o pH e atividade da água, a presença de

oxigênio e metais, e a presença de qualquer agente inibidor da reação, por exemplo,  $\text{SO}_2$ . Em geral, o escurecimento máximo ocorre para atividade da água entre 0,6 e 0,85 e a taxa de escurecimento aumenta com o aumento do pH (MORALES E VAN BOEKEL, 1997; AMES, 1998; MARTINS et al., 2001). BOBBIO E BOBBIO (1992) indicaram que em pH próximo a neutralidade tem-se a velocidade máxima da reação. Segundo estes autores, em pH alcalino há rápida degradação dos carboidratos independente da presença do aminoácido. Em meio ácido, o grupo reativo  $-\text{NH}_2$  encontra-se protonado perdendo sua nucleofilicidade, retardando a reação com as carbonilas do açúcar.

A ligação de proteína com o açúcar promove a polimerização das moléculas de proteína por ligação covalente, diminuindo a solubilidade do polímero resultante desta ligação. A formação da ligação covalente ocorre durante o aquecimento com queda de pH para 5,5 e perda de prótons do  $\epsilon$ -aminogruppo. Há uma melhora na capacidade de retenção de água, principalmente devido ao aumento da densidade de cargas na molécula de proteína. Como a geleificação é uma consequência da formação de ligações covalentes e não-covalentes entre proteínas, sugere-se que seria possível o uso da reação de Maillard para produzir material capaz de formar gel. Os géis de Maillard possuem baixa solubilidade em



solventes que destroem pontes dissulfeto, interações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio. Novas ligações covalentes são formadas durante a reação. A presença de açúcar no polímero poderá aumentar o grau de intumescimento, formando um gel e, conseqüentemente, poderá haver mudança na liberação de um fármaco (MITCHELL E HILL, 1995). A reação de Maillard é uma rede complexa de reações químicas (MORALES E VAN BOEKEL, 1997; AMES, 1998; MARTINS et al., 2001). HODGE (1953) publicou um esquema, o qual resume as reações químicas desta reação e se mantém até hoje. Neste esquema, é colocado que açúcares redutores se condensam com compostos que contenham grupamentos aminos livres, gerando produtos de condensação. Na seqüência, uma gama de reações ocorre, incluindo ciclização, desidratação, retroaldolização, rearranjos, isomerizações e condensações, as quais levam a formação de polímeros nitrogenados marrons e co-polímeros conhecidos como melanoidinas (AMES, 1998).

Apesar do esquema de HODGE (1953) ser muito útil, existem algumas falhas. Segundo AMES (1998), o esquema é um resumo de reações que ocorrem e em trabalhos mais recentes muito autores estabelecem a existência outras vias importantes, não descritas por HODGE.

Os passos gerais da reação de Maillard segundo MARTINS et al. (2001) estão esquematizados na figura 2.

Pode-se considerar três estágios na reação de Maillard: inicial, avançado e final. No estágio inicial são formados compostos de Amadori, os quais não são coloridos, não possuem fluorescência ou absorvância em UV-próximo. Esses compostos sofrem rearranjo e desidratação sobre aquecimento prolongado, gerando tanto compostos redutores incolores quanto substâncias fluorescentes, algumas das quais podem ser pigmentadas (MALIK E MEEK, 1996).

Neste ponto, um aumento na quantidade de compostos carbonil insaturados é observado. Tanto a fluorescência quanto as propriedades de absorção de luz do sistema aumentam devido a formação de moléculas maiores. Aldeídos formados pela degradação de aminoácidos (degradação de Strecker) são também a origem do escurecimento, já que estes podem se condensar com fragmentos de açúcar, com furfurais ou com outros produtos de desidratação para formar pigmentos marrons. Entretanto, a via de Strecker não é via de maior produção de cor e é conhecida pela origem de compostos inodoros associados ao escurecimento de Maillard.

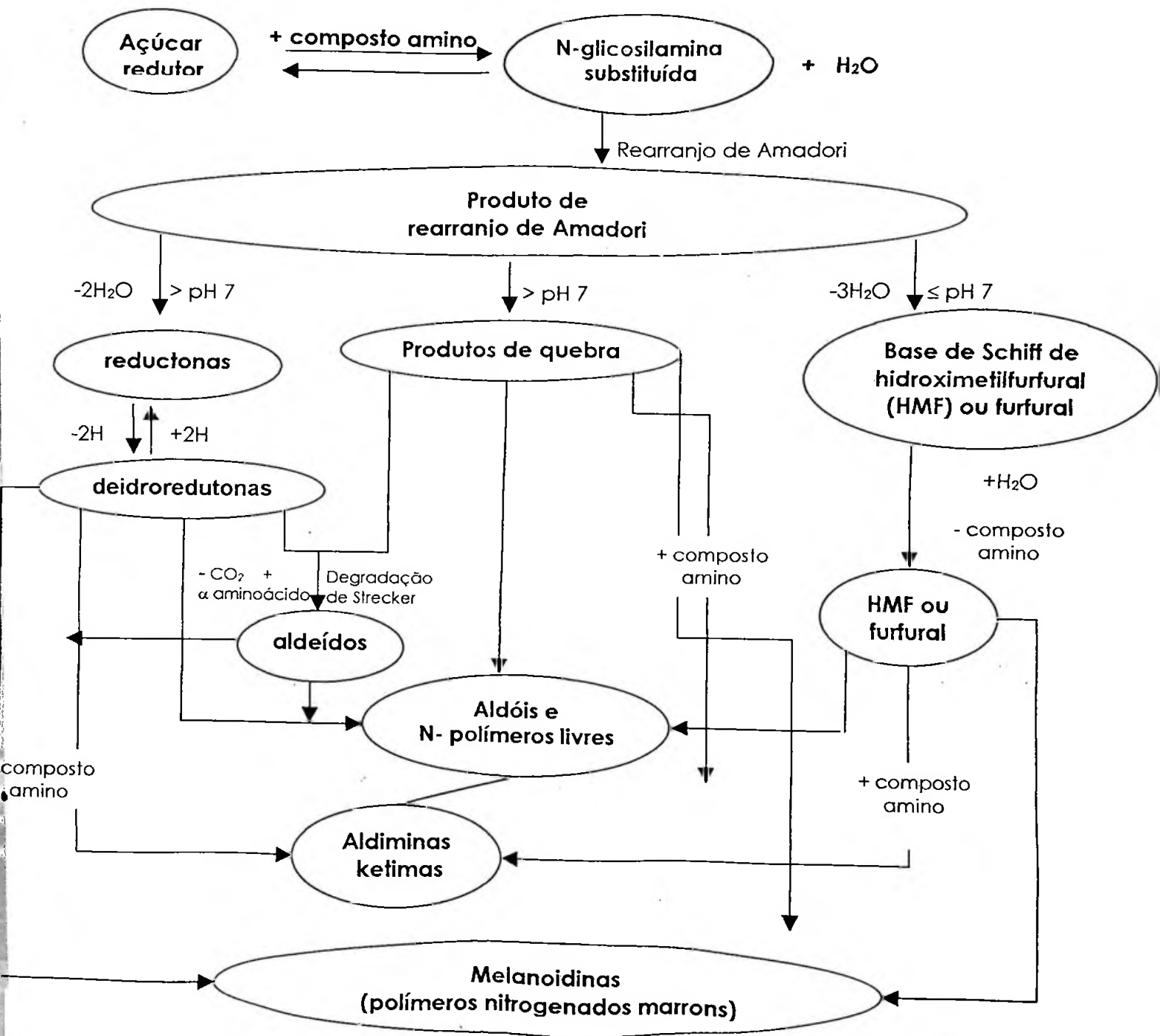


Figura 2. Esquema geral da reação de Maillard

No estágio final de reação é produzido composto de cor escura. Este estágio é caracterizado pela formação de polímeros e copolímeros nitrogenados marrons insaturados ("advanced glycation end products - AGEs"), apesar de polímeros livres de nitrogênio também serem formados pela condensação de furfural ou deidroredutonas (MORALES E VAN BOEKEL, 1997).

#### **1.4.2. CARACTERÍSTICAS DOS PRODUTOS DE MAILLARD**

Como consequência da reação de Maillard, pode ocorrer, segundo VAN BOEKEL (1998) e MARTINS et al. (2001):

- ✓ Perda do valor nutritivo com bloqueio dos resíduos lisina, os quais não estarão mais disponíveis para digestão, reduzindo a degradação e inibindo ataque enzimático;

- ✓ Formação de compostos com propriedades aromatizantes;

- ✓ Formação de compostos antioxidantes;

- ✓ Formação de compostos antimutagênicos e anticarcinogênicos;

- ✓ Formação de compostos antibacterianos, etc.

Outra vantagem na formação destes compostos é que estudos sobre a conjugação proteína-polissacarídeo demonstraram não ser tóxica para administração oral em ratos (KATO et al., 1992). BAXTER (1995) apresentou resultados indicando que a reação de Maillard tem diminuído a digestibilidade das proteínas, devido a formação de inibidores de enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal, o que seria interessante para sistemas de liberação prolongada por via oral.

Outras áreas que se interessam pelo estudo desta reação pesquisam sobre a ocorrência da mesma "in vivo". Particularmente com o colágeno, vários trabalhos tem relacionado a reação com o envelhecimento, escurecimento dentário, problemas relacionados a diabetes etc. A reação entre açúcar e proteína tem sido apontada como a causa da descoloração da dentina. Esta descoloração é um indicador de cárie e mais especificamente um estágio do processo da cárie. Uma mancha levemente escura (marrom) reflete a cárie, ao passo que uma mancha fortemente escura (preta) caracteriza a lesão instalada (KLETER et al., 1998).

Poucos produtos desta reação sobre condições fisiológicas foram caracterizados. Muitos **produtos finais de glicosilação avançada** (conhecidos como AGEs) têm sido utilizados como marcadores para os estágios avançados desta reação. No caso da

cárie, a reação tem sido apontada como a causa para o aumento da resistência do colágeno da dentina contra a quebra colagenolítica (KLETER et al., 1998).

Tanto nos homens como em animais, a diabetes leva a alterações na estrutura do colágeno, modificações estas que estão relacionadas com o envelhecimento precoce. Isso tem sugerido que esse efeito da diabetes representa uma aceleração no processo de envelhecimento normal. O colágeno é um importante constituinte da maioria dos tecidos que são afetados durante a diabetes e modificações desta proteína podem ter um papel crítico na etiologia em complicações na diabetes. Modificações pós-sintéticas do colágeno de diabéticos são atribuídas principalmente a Reação de Maillard. O colágeno incubado com glicose torna-se progressivamente menos solúvel e mais reticulado e adquire cromóforos e fluoróforos com propriedades espectroscópicas similares ao colágeno envelhecido. Radicais oxigênicos formados durante oxidação da glicose e oxidação da proteína glicosilada podem estar envolvidos diretamente no processo de acumulação de AGEs e reticulação do colágeno (ELGAWISH et al., 1996; MALIK E MEEK, 1996; SAJITHLAL et al., 1998; STEFEK et al., 2000).

## **1.5. CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO**

Em relação à caracterização de proteínas e do próprio colágeno, várias metodologias tem sido desenvolvidas e utilizadas no decorrer dos últimos anos. Métodos de eletromigração, tais como, eletroforese em gel de poliacrilamida (DEYL E MIKSÍK, 2000), procedimentos cromatográficos, inclusive cromatografia líquida de alta eficiência (DEYL & MIKSÍK, 2000), análise térmica (ROCHDI et al., 1999), ressonância magnética nuclear (ROCHDI et al., 1999), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (BYLER E SUSI, 1986; DONG et al., 1990; LEVY et al., 1991; DONG et al., 1995; KAMINSKA E SIONKOWSKA, 1996) entre outros tem sido utilizados para separar, elucidar a estrutura primária e tridimensional da molécula, além de estabelecer relações entre a molécula e o meio que a circunda. Técnicas para estudar os produtos de colágeno também são úteis para a caracterização da molécula, como por exemplo o estudo da reologia de géis de colágeno (GILSENAN E ROSS-MURPHY, 2001).

### **1.5.1. DETERMINAÇÃO DE HIDROXIPROLINA**

Muitas técnicas analíticas têm sido publicadas para determinar a concentração de colágeno dos tecidos, quantificando a liberação de hidroxiprolina em tecidos hidrolisados. A hidroxiprolina é

primeiramente oxidada por cloramina T e então reage com reagente de Ehrlich para formar um cromóforo tipo-pirrol com  $\lambda_{\max}$  em 560nm.

Esta metodologia também pode ser utilizada para quantificar o colágeno modificado pela Reação de Maillard. O colágeno extraído de tecidos envelhecidos apresenta substância(s) que reage(m) com p-dimetilaminobenzaldeído em solução ácida (reagente de Ehrlich) dando uma coloração cereja-rosea. A pirrolização da proteína tem sido observada em processos de glicosilação não-enzimática tanto em sistemas modelos proteína-açúcar em condições "in vitro" quanto "in vivo" em diabetes experimental e em pacientes diabéticos (STEFEK et al., 2000).

### 1.5.2. FLUORESCÊNCIA

A relação entre escurecimento e fluorescência durante a reação ainda não está completamente compreendida. Geralmente, um período de indução tem sido identificado antes do escurecimento e fluorescência, sendo este período menor para fluorescência. Durante este período de indução, alterações químicas significantes ocorrem, nas quais intermediários não coloridos deveriam ser formados em quantidades suficientes antes da produção dos pigmentos. Geralmente, a formação tanto dos



pigmentos marrons quanto da fluorescência podem ser descritos como uma reação de ordem zero, após o período de indução inicial, como encontrado em sistemas modelos ou no leite (MORALES E VAN BOEKEL, 1997). Alguns pesquisadores têm calculado equações teóricas para prever a extensão de pigmentos marrons ou acúmulo de fluorescência em função do tempo, mas eles não podem resolver devido a algumas variáveis, constantes de reações intermediárias que ainda são desconhecidas. Compostos fluorescentes ainda não foram totalmente caracterizados e a fluorescência não pode ser colocada em base molar. Devido a complexidade da química da reação de Maillard, a maioria dos estudos descritos na literatura tem sido confinada a sistemas modelos. A fluorescência pode ser utilizada como um marcador para o estágio avançado da reação de Maillard. Esta metodologia tem sido freqüentemente usada em estudos desta reação em condições fisiológicas em relação a glicosilação de proteínas no corpo humano. As características de fluorescência dos então chamados produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) tem sido amplamente utilizada como um indicador do nível de proteínas modificadas e alguns produtos das reações de fluorescência foram identificados.

MORALES E VAN BOEKEL (1997) estudaram a evolução da fluorescência em um sistema proteína/açúcar em várias temperaturas.

KLETER (1998) estudou a molécula de colágeno extraído de dentina com cárie por fluorescência e relacionou seus resultados com a reação de Maillard. SIONKOWSKA (1999) observou a alteração do colágeno pela radiação UV por esta mesma metodologia.

### **1.5.3. ANÁLISE TÉRMICA**

A análise termogravimétrica (TGA) é um processo contínuo que envolve a medida das alterações de massa de uma amostra em função da temperatura ou tempo. Estes dados são detectados por uma termobalança. A termogravimetria possui várias aplicações, dentre as quais pode-se citar, decomposição térmica de polímeros e determinação de umidade. Polímeros quando submetidos a tratamento térmico podem apresentar mudanças estruturais caracterizadas por ruptura de ligações químicas de cadeias principais e laterais. A resistência térmica dos materiais poliméricos é influenciada por diversos fatores, tais como, interações tipo van der Waals, pontos de hidrogênio, simetria molecular, rigidez estrutural intramolecular, grau de ligações cruzadas e ramificações, pureza, cristalinidade, etc. (MA E HARWALKAR, 1996).

#### 1.5.4. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE LIGAÇÃO

A determinação do grau de ligação de proteínas vem sendo estudada por métodos colorimétricos, utilizando, por exemplo, reagentes para os grupos amina como a ninidrina e o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) (HABEEB, 1966; SPADARO et al. 1979; SUNG et al., 1996a; SUNG et al., 1996b).

A determinação é realizada de maneira indireta, ou seja, quantifica-se o número de  $\epsilon$ -amino grupos livres que são encontrados na proteína antes e após a reticulação da molécula, já que este grupamento é o principal sítio reativo. O TNBS possui alta especificidade com amino grupos primários e liga-se a eles formando, sob condições específicas, derivados de trinitrofenil (TNP). Estes então são quantificados através de leitura em espectrofotômetro UV em comprimento de onda específico (HABEEB, 1966; KAKADE E LIENER, 1969).

FRIESS & LEE (1996) utilizaram o TNBS para determinar o grau de ligação do colágeno utilizando glutaraldeído como agente reticulador.

### 1.5.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho constitui uma metodologia experimental que estima a estrutura secundária de polipeptídeos e proteínas e a mobilidade conformacional de cadeias polipeptídicas (BYLER E SUSI, 1986; DONG et al., 1990; KAMINSKA E SIONKOWSKA, 1996).

Pela espectroscopia de infravermelho pode-se observar nove bandas vibracionais características, as quais resultam na banda amida I de proteínas. Esta banda revela praticamente toda a vibração de estiramento C-O das ligações peptídicas que constituem a proteína. Cada tipo de estrutura secundária dá origem a diferentes freqüências de estiramento C-O na região da banda amida I do espectro (BYLER E SUSI, 1986; DONG et al., 1990).

A posição das bandas é alterada em função da conformação da molécula. O formato da banda, bem como sua área e posição dependem da composição de aminoácidos, seqüência de resíduos, estado de agregação dos compostos, umidade, etc. (KAMINSKA & SIONKOWSKA, 1996).

A molécula de colágeno possui aminoácidos característicos e uma alta proporção de iminoácidos. A banda amida A do colágeno

está associada a freqüência de estiramento NH- e é encontrada em 3325-3330  $\text{cm}^{-1}$ . Quando o grupo NH- de um peptídeo está envolvido em uma ponte de hidrogênio, esta posição é deslocada para freqüências menores próximas à 3300  $\text{cm}^{-1}$ . A banda amida B do colágeno é encontrada em 3080  $\text{cm}^{-1}$ . A banda amida I geralmente é encontrada em 1650-1665  $\text{cm}^{-1}$ . Todo colágeno apresenta assimetria desta banda freqüentemente incluindo uma banda fraca próxima à 1635  $\text{cm}^{-1}$  (KAMINSKA E SIONKOWSKA, 1996).

A banda amida II do colágeno está centrada na faixa de 1530-1550  $\text{cm}^{-1}$  e muitas vezes apresenta bandas menores em freqüências mais baixas. Esta banda tem natureza complexa com sua origem vibracional relacionada à deformações NH e estiramento CN (KAMINSKA E SIONKOWSKA, 1996).

## **1.6. AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO**

Os polímeros são moléculas capazes de se agruparem de maneira a formar barreiras, as quais podem segurar o fármaco, evitando que o mesmo seja liberado da forma farmacêutica de modo imediato. A partir de materiais poliméricos pode-se propor vários tipos de sistemas de liberação diferentes, tais como, comprimidos matriciais, microcápsulas, hidrogéis, sistemas transdérmicos. Após a obtenção dos sistemas de liberação, o mesmo

deve ser caracterizado para que as suas propriedades de liberação sejam conhecidas. Os sistemas de liberação de fármacos podem ser avaliados de acordo com as propriedades físicas e físico-químicas da formulação, bem como pela análise da liberação de um fármaco modelo contido no sistema.

### **1.6.1. Comportamento reológico**

Os estudos relacionados ao comportamento reológico de um material tratam da deformação (gradiente de cisalhamento) dos sistemas líquidos, sólidos e semi-sólidos em função de uma força aplicada (tensão de cisalhamento). A viscosidade é a medida da resistência ao fluxo de sistemas líquidos e semi-sólidos (NETZ E ORTEGA, 2002).

O reômetro opera de tal modo que o gradiente de cisalhamento é gradualmente aumentado de maneira controlada e os dados referentes a deformação são coletados simultaneamente (GLATHOR E SCHWEIZER, 1994).

Dependendo do tipo de comportamento do material, a viscosidade aparente (razão entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de cisalhamento) aumentará e então diminuirá dramaticamente uma vez que a estrutura do material é destruída e o

mesmo flui. A tensão de cedência é definida como a tensão de cisalhamento na viscosidade aparente máxima (NETZ E ORTEGA, 2002).

Em sistemas de liberação de fármacos utilizando como material polimérico substância com alto grau de intumescimento, a avaliação reológica é de extrema importância, já que a alteração da viscosidade do sistema irá interferir diretamente no perfil de liberação do fármaco.

Pode-se classificar o comportamento reológico em dois grandes grupos: Sistemas Newtonianos e não Newtonianos.

Nos materiais que apresentam comportamento Newtoniano, a deformação do material é proporcional a força aplicada sobre o mesmo (figura 3). Exemplos de fluidos Newtonianos incluem a água, leite, soluções de açúcares e óleos minerais. A viscosidade de um fluido Newtoniano é constante em determinada temperatura, mas não é dependente do gradiente de cisalhamento e do tempo (NETZ E ORTEGA, 2002).

Nos materiais que apresentam comportamento não Newtoniano, a viscosidade apresenta relação linear entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de cisalhamento. Estes materiais são

classificados como independentes do tempo e dependentes do tempo (GLATHOR E SCHWEIZER, 1994; LACHMAN, 2001).

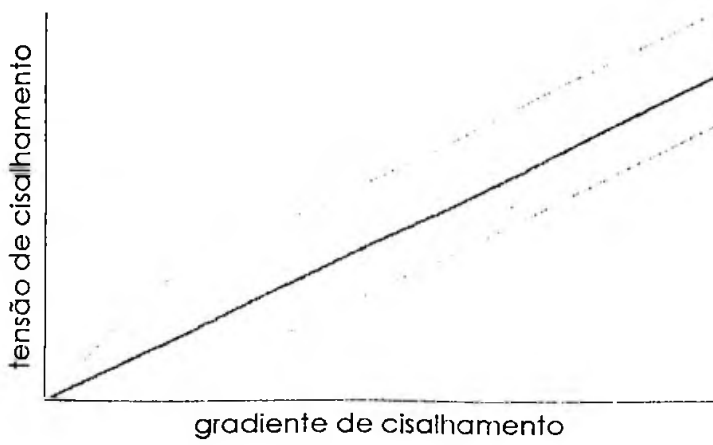
Fluidos não Newtonianos independentes do tempo apresentam uma viscosidade constante em um dado gradiente de cisalhamento e esta não varia com o tempo. São divididos em pseudoplásticos, plásticos e dilatantes (figura 3).

Nos materiais pseudoplásticos a viscosidade diminui com o aumento do gradiente de cisalhamento. Neste caso, deve-se calcular a viscosidade aparente do material para cada gradiente de cisalhamento.

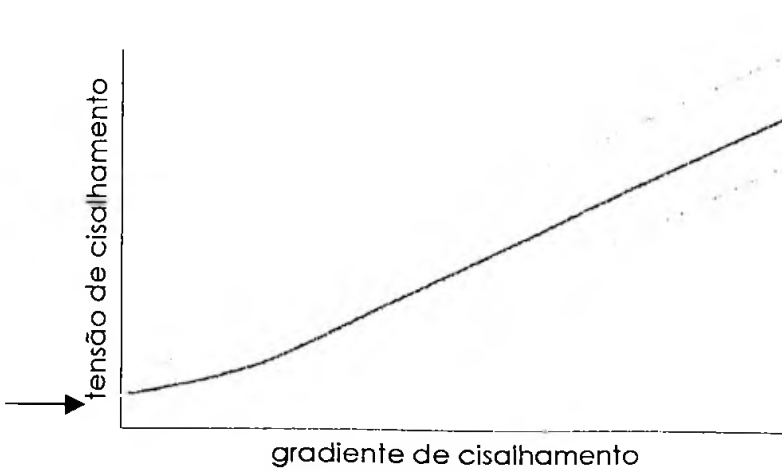
Os materiais dilatantes apresentam comportamento inverso aos materiais pseudoplásticos, ou seja, a viscosidade aumenta com o aumento do gradiente de cisalhamento.

Já os materiais plásticos permanecem inalterados até que em uma determinada tensão de cisalhamento crítica (chamado de valor de cedência) seja alcançado. Neste valor de cedência o material começa a fluir. Como o gradiente de cisalhamento continua a aumentar, o fluido pode exibir características Newtonianas, dilatantes ou pseudoplásticas (figura 3b).





(a)



(b)

Figura 3. Comportamento reológico de materiais. (a) ——— Newtoniano  
 pseudoplástico dilatante; (b) plásticos  
 ——— valor de cedência; ——— Newtoniano pseudoplástico dilatante.

Os fluidos dependentes do tempo possuem viscosidade em uma dada tensão de cisalhamento que varia com o tempo. Eles podem ser tixotrópicos ou reopéticos. Fluidos tixotrópicos perdem viscosidade no tempo em um gradiente de cisalhamento constante.

Os fluidos reopéticos exibem aumento na viscosidade no tempo em uma dado gradiente de cisalhamento.

### **1.6.2. Ensaio de liberação**

Os estudos de liberação de formas farmacêuticas sólidas geralmente são realizados em aparelhos de dissolução de fármacos e o perfil de liberação é traçado em função do tempo. Geralmente, o experimento ocorre mimetizando características do sistema fisiológico, tais como temperatura (37°C), meio dissolutor (suco gástrico artificial, suco entérico artificial) etc (USP 24, 2000). Em sistemas líquidos e semi-sólidos utiliza-se na maioria das vezes célula de difusão, a qual possui compartimento de doação (onde é colocada a amostra) e compartimento de recepção (onde um líquido receptor é colocado para se efetuar o doseamento do fármaco liberado pelo sistema) (Farmacopéia Portuguesa VI, 2001). Em ambos experimentos, a concentração de fármaco que é liberada da forma farmacêutica avaliada pode ser mensurada.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo do biomaterial obtido após a modificação da molécula de colágeno pela Reação de Maillard e a comparação do perfil de liberação de fármaco a partir de géis de colágeno e colágeno modificado.

Para tanto foram realizadas a extração e purificação do colágeno a partir de tendão bovino, a modificação da molécula extraída e a caracterização preliminar das moléculas (colágeno e materiais modificados).

Foi realizada também a padronização das condições reacionais da modificação da molécula para obtenção de um material com características adequadas a liberação de fármacos.

Por fim, uma avaliação preliminar foi realizada para os géis de colágeno e colágeno modificado quanto as suas propriedades reológicas e o perfil de liberação de fármacos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

Os materiais utilizados nos experimentos foram os seguintes: tendão calcâneo bovino, acetona (Synth), NaCl (Synth), citrato de sódio (Synth), ácido cítrico (Nuclear), ácido acético (Analyticals Carlo Erba Reagent), pepsina (Mallinckrodt Chemical OR<sup>®</sup>), fosfato de sódio monobásico (Reagen), fosfato de sódio dibásico (Synth), maltodextrina (MOR-REX<sup>®</sup> 1920 – Com Prod), hidroxiprolina (Vetec), p-toluenosulfocloramida de sódio (cloramina T - Vetec), acetato de sódio trihidratado (Analyticals Carlo Erba Reagent), hidróxido de sódio (Synth), etilenoglicol monometil éter (Vetec), p-dimetilaminobenzaldeído (Vetec), vermelho de metila, HCl (Synth), ácido perclórico (Synth), PhastGel™ Homogêneo 7,5 lote nº TD212604, PhastGel™ Gradiente lote nº TC212544, uréia, 3-(3-(cloraminopropil)-dimetilamônio-1-propanosulfonato) (chaps) (lote K29529682137-Pharmacia-Biotech), PhastGel Blue, metanol (VETEC), glicerina (VETEC), azul de bromofenol, ditioneitol (DTT), solução de tampão tris, dodecilsulfato de sódio (SDS), EDTA(Na<sub>2</sub>), ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (SERVA 37075, Feinbiochemica-Heidelberg), bicarbonato de sódio (Merck), éter etílico, paracetamol.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO COLÁGENO**

A metodologia utilizada para extração e purificação do colágeno a partir de tendão calcanear bovino foi de acordo com HO et al. (1997) e encontra-se ilustrada na figura 4.

#### **3.2.1.1. PRÉ-TRATAMENTO DO TENDÃO BOVINO**

O tendão calcanear bovino proveniente de animal recém sacrificado foi cortado em pequenos fragmentos e tratado com acetona para remoção do material gorduroso. Os fragmentos do tecido foram lavados com água destilada e estocados em freezer até o momento do pré-tratamento.

Pré-tratamento: Foram pesados 5g do material e este foi colocado em solução de NaCl 10% (m/V) durante 24h a 4°C. Após este período, o tecido foi lavado com água destilada e colocado em contato com solução de tampão citrato 0,02mol/L pH 4,3 durante 48h em temperatura ambiente, para o intumescimento do tecido.

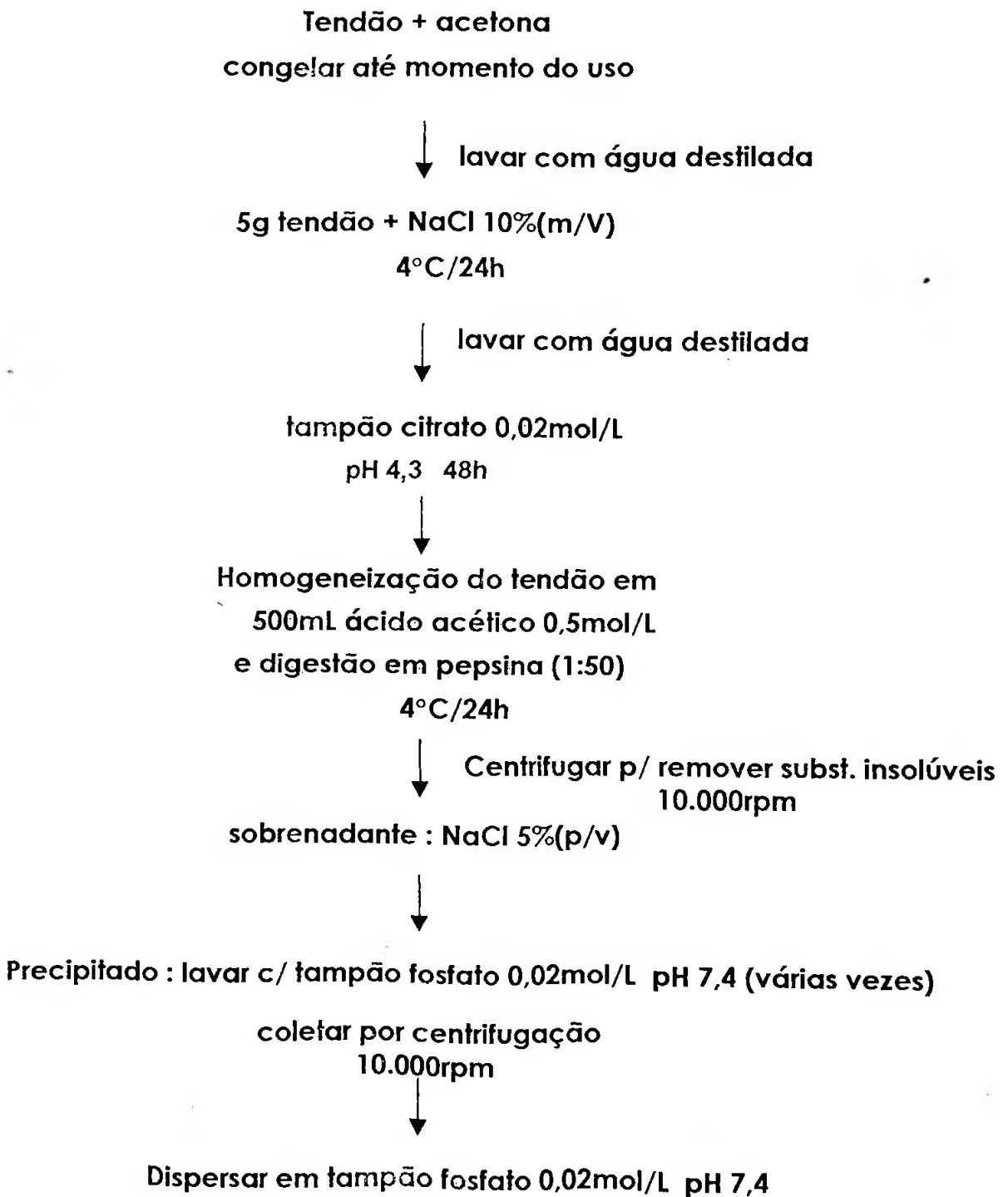


Figura 4. Fluxograma para extração e purificação do colágeno

### 3.2.1.2. PREPARAÇÃO DO COLÁGENO POBRE EM TELOPEPTÍDEO

O tecido intumescido foi homogeneizado em 500mL de ácido acético 0,5mol/L utilizando um aparelho *DiAx 600 Heidolph*. Este homogenato foi digerido com pepsina na proporção de 1:50 (m:m) em relação à massa seca do tecido durante 24h em temperatura de 4°C. A dispersão viscosa obtida foi centrifugada (10.000rpm) a fim de remover substâncias insolúveis e tratada com NaCl 5% (m/V) para o "salting-out" do colágeno pobre em telopeptídeo. Os resíduos foram lavados repetidas vezes com tampão fosfato 0,02mol/L pH 7,4 e coletados por centrifugação (10.000rpm). O colágeno resultante foi disperso em tampão fosfato 0,02mol/L pH 7,4 e liofilizado.

### 3.2.2. MODIFICAÇÃO DO POLÍMERO - REAÇÃO DE MAILLARD

Alguns testes preliminares foram realizados a fim de se obter as melhores condições reacionais para o objetivo do trabalho. Os parâmetros reacionais, tais como temperatura, pH, tempo de reação, concentração dos reagentes foram escolhidos segundo os trabalhos de vários autores já citados na revisão bibliográfica.

Foram realizadas variações de pH reacional (5,0 e 7,0), temperatura (90°C, 50°C e temperatura ambiente), tempo de reação (8h, 72, 96h, 7dias e 30dias), concentração do açúcar redutor (2mg/mL, 10mg/mL, 25mg/mL e 60mg/mL). Foram realizadas duas

variações em relação à molécula de colágeno. Em alguns experimentos foi utilizado o próprio tendão bovino e em outros o colágeno já extraído. Durante o decorrer de alguns destes experimentos, foram coletadas alíquotas em tempos determinados para realização de testes posteriores.

Pode-se separar os experimentos em dois grupos:

A) reação realizada antes da extração do colágeno, ou seja, com o colágeno intacto no tendão, sem passar por nenhum tratamento para extração e purificação (as amostras destes experimentos foram designadas "ant").

B) reação realizada após procedimento de extração e purificação do colágeno descrito na figura 3 (as amostras destes experimentos foram designadas "post").

Para os experimentos de modificação realizados antes da extração e purificação do colágeno ("ant") foram pesados 5g do tendão bovino armazenado após tratamento com acetona e este material foi colocado na presença de 250mL de solução de maltodextrina (açúcar redutor), nas condições descritas na Tabela 2. Após término do tempo de reação duas frações foram obtidas: a fração líquida, designada por "L" e a fração sólida, "S". Parte da fração líquida foi congelada e a outra foi liofilizada para testes



posteriores. A fração sólida foi submetida ao processo de extração descrito nos itens 3.2.1.1. e 3.2.1.2.

Para a obtenção das amostras "post", o colágeno foi extraído e purificado do tendão bovino como descrito nos itens 3.2.1.1. e 3.2.1.2. O colágeno purificado foi colocado para reagir com 250mL de solução de maltodextrina, nas condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo dos experimentos da reação de Maillard

| Denominação da amostra | [ ] açúcar (mg/mL) | pH  | temperatura (°C) | Tempo reacional (h) | Reação em relação à extração |
|------------------------|--------------------|-----|------------------|---------------------|------------------------------|
| 90ant8                 | 25                 | 7,0 | 90               | 8                   | anterior                     |
| 90ant8-5               | 10                 | 5,0 | 90               | 8                   | anterior                     |
| 50ant72                | 10                 | 7,0 | 50               | 72                  | anterior                     |
| 50post96               | 10                 | 7,0 | 50               | 96                  | posterior                    |
| 50post72               | 25                 | 7,0 | 50               | 72                  | posterior                    |
| 50post168              | 60                 | 7,0 | 50               | 168                 | posterior                    |
| TApost720              | 60                 | 7,0 | TA               | 720                 | posterior                    |
| 90Cprot8               | 0                  | 7,0 | 90               | 8                   | aquecimento do tendão        |
| 90Ccarb8               | 2                  | 7,0 | 90               | 8                   | aquecimento do açúcar        |

A nomenclatura para cada amostra foi padronizada colocando-se primeiramente a temperatura reacional, seguida do período em que a reação ocorreu (antes "ant" ou depois "post" da extração do material colagenoso) e por fim o tempo reacional. Na amostra 90ant8-5 foi alterado o pH reacional para 5,0, portanto foi colocado mais um item na sua nomenclatura. As demais amostras reagiram em pH neutro.

Foram realizados dois experimentos controle: um apenas com o tendão (designada amostra "90Cprot") e outro apenas com o açúcar redutor (designada amostra "90Ccarb").

Após o término da reação ou extração, as amostras foram congeladas ou liofilizadas para posterior avaliação. Das amostras relativas aos experimentos "ant" foram selecionadas apenas aquelas referentes às frações líquidas para as análises abaixo descritas.

### **3.2.3. AVALIAÇÃO DO COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO PELA REAÇÃO DE MAILLARD**

#### **3.2.3.1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA**

A eletroforese em gel de poliacrilamida em meio desnaturante (SDS e DTT) foi realizada em sistema Phast (Pharmacia-LKB, 1990) de

acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados dois tipos de gel:

a) gel homogêneo 7,5 com  $T=7,5\%$  e  $C=2\%$  onde T refere-se à somatória de massas em gramas de acrilamida e bis-acrilamida com relação a 100g de solução e C refere-se à razão entre massa de bis-acrilamida e à somatória das massas de acrilamida e bis-acrilamida.

b) gel gradiente 4-15 com  $T= 5-15\%$  e  $C=1-2\%$ , sendo que C e T seguem definições citadas acima.

Os géis utilizados nestes experimentos foram géis pré-fabricados (comprimento 13mm para a região de empilhamento, 32mm para a região de resolução e espessura de 0,45mm) com solução de acetato de sódio 0,112mol/L e solução de tris-HCl 0,112mol/L e apresentavam pH 6,5.

O contato com os eletrodos foi realizado por fitas de agarose geleificadas e tamponadas apresentando pH 8,1 e contendo 0,2mol/L em tricina, 0,2mol/L em tris-HCl e 0,55% em SDS.

A eletroforese foi realizada em cerca de 30 minutos a  $15^{\circ}\text{C}$  seguindo as condições determinadas pelo fabricante com corrente máxima de 10,0 mA, diferença de potencial máxima de 250,0 V e potência máxima de 1,0 W.

A detecção das bandas protéicas foi feita por coloração com solução de azul brilhante de Coomassie R-250 a 0,1% em água, metanol e ácido acético na proporção 6:3:1 (V/V). A descoloração foi realizada em três etapas por uma mistura de água, metanol e ácido acético na mesma proporção da mistura anterior. O gel foi posteriormente embebido em solução aquosa contendo ácido acético 10% (V/V) e glicerol 5% (V/V) para conservação.

Preparação dos padrões e das amostras:

**Padrões:**

Foi utilizado um kit da Pharmacia de padrões de baixa massa molecular, contendo as seguintes proteínas padrões: fosforilase b ( $M_R$  94.000), albumina sérica bovina ( $M_R$  67.000), ovoalbumina ( $M_R$  43.000), anidrase carbônica ( $M_R$  30.000), inibidor de tripsina de soja ( $M_R$  20.100) e  $\alpha$ -lactoglobulina ( $M_R$  14.400) para aplicação no gel homogêneo 7,5.

No gel gradiente 4-15 foi utilizado padrões de alta massa molecular sendo estes: miosina ( $M_R$  205.000),  $\beta$ -galactosidase ( $M_R$  116.000), fosforilase ( $M_R$  97.400), albumina sérica bovina ( $M_R$  66.000), ovoalbumina ( $M_R$  45.000), anidrase carbônica ( $M_R$  29.000).

Os padrões (1  $\mu$ L) foram dissolvidos em 15  $\mu$ L de solução tampão diluente de amostra (pH 8,0) contendo tris-HCl 10mmol/L, EDTA

1mmol/L, azul de bromofenol 0,01%, ditiotreitól 1% (p/V) e SDS 2,5% (p/V).

### **Amostras:**

Foram selecionadas as seguintes amostras para a aplicação no gel homogêneo 7,5%: amostra liofilizada de colágeno extraído do tendão bovino (designada de "COL"), amostras 90ant8, 50ant72 e TApóst720.

A amostra "COL", que em experimentos testes apresentou dificuldades na solubilização, juntamente com as demais amostras foi tratada como descrito abaixo.

Cerca de 1mg das amostras liofilizadas ou secas em estufa e dessecador foi pesado e dissolvido em 50 $\mu$ L de uma solução de uréia 8mol/L e 3-(3-(cloraminopropil)-dimetilamônio-1-propanosulfonato) a 2% (chaps). A solução de uréia-chaps foi utilizada como agente solubilizante da amostra. Após cerca de 5 minutos, cada amostra foi diluída em 200 $\mu$ L da mesma solução tampão diluente utilizada para preparação dos padrões.

Um teste com a amostra COL preparada de maneira convencional (1mg de amostra + 200 $\mu$ L de solução tampão diluente) foi realizado com a finalidade de comparar os resultados com a

mesma amostra previamente tratada com agente solubilizante. Esta amostra foi designada "COL-F".

Para aplicação no gel gradiente 4-15 foram utilizadas as mesmas amostras descritas acima, exceto a amostra "COL-F". Neste gel foi aplicada uma amostra de colágeno sigma designado neste experimento "COL-S". Esta amostra também foi tratada utilizando 50 $\mu$ L de uréia-chaps.

A amostra designada no experimento "COL-F" e os padrões foram aquecidos durante 5 minutos a 100°C. As amostras contendo uréia não podem ser aquecidas. Por esse motivo, as demais amostras não passaram por esta etapa.

A concentração final teórica de cada amostra foi em torno de 4 mg/mL.

Alíquotas de 4 $\mu$ L das amostras e padrão foram aplicadas no gel de eletroforese.

### **3.2.3.2. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE HIDROXIPROLINA**

Os experimentos foram realizados segundo técnica descrita por WOESSNER Jr. (1961) conforme segue abaixo:

Reagentes:

Padrão hidroxiprolina: uma solução estoque foi preparada dissolvendo 25mg de hidroxiprolina em 250mL de HCL 0,001mol/L. Os padrões foram preparados no momento do experimento pela diluição da solução estoque em água destilada para obter concentrações de 0,5-2,5 $\mu$ g/mL.

Tampão citrato-acetato: 50g de ácido cítrico, 12mL de ácido acético glacial, 120g de acetato de sódio trihidratado e 34g de hidróxido de sódio foram misturados e água destilada foi adicionada para completar um volume igual a 1L. O pH foi ajustado para 6,0 e o tampão estocado em refrigerador .

Cloramina T (p-toluenosulfocloramida de sódio): foi preparada uma solução 0,05mol/L no momento do experimento dissolvendo 1,41g de cloramina T em 20mL de água destilada. Foi adicionado 30mL de etilenoglicol monometil éter e 50mL de tampão. A solução foi mantida em frasco de vidro tampado.

Ácido perclórico: foi preparada uma solução de ácido perclórico 3,15mol/L diluindo 27mL de ácido perclórico a 70% para 100mL de água destilada.

p-dimetilaminobenzaldeído: foi preparada uma solução 20% momentos antes do uso pela adição de 20g deste reagente em

etilenoglicol monometil éter completando o volume para 100mL. Para facilitar solubilização foi necessário aquecer em banho a 60°C.

#### Preparação das amostras:

Foram utilizados 500 $\mu$ L de amostras 90ant8 e 50post96. As amostras foram secas em SpeedVac.

Para a amostra 50post72 já liofilizada foram utilizadas 5 $\mu$ g.

Em cada amostra, acondicionada em tubo Pyrex® com tampa rosqueável, foram adicionados 600 $\mu$ L de HCl 6mol/L. por 4 horas a 110°C. Os tubos foram então abertos e as amostras transferidas para frascos volumétricos. Os tubos foram lavados com água destilada e a água de lavagem adicionada com o hidrolisado no balão volumétrico. Este hidrolisado foi neutralizado com solução de NaOH 2,5mol/L utilizando como indicador vermelho de metila. O volume foi ajustado para 10mL.

#### Curva de calibração:

Soluções de hidroxiprolina padrão de 0,5-2,5 $\mu$ g/mL foram tratadas como as amostras de acordo com o procedimento descrito a seguir. Uma curva padrão com relação linear adequada entre concentração de hidroxiprolina e absorvância em 557nm foi construída e analisada por método de regressão linear para



obtenção da equação da reta e o coeficiente de correlação linear (R)(figura 5 e equação 1).

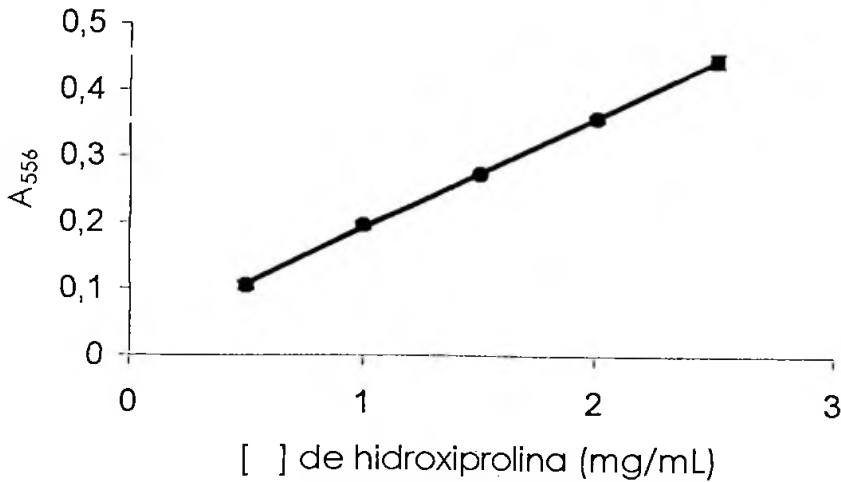


Figura 5. Curva padrão de hidroxiprolina

Equação 1:

$$y = 0,1668x + 0,0226$$

$$R = 0,9998$$

#### Oxidação da hidroxiprolina:

Foi adicionado 1mL de cloramina T em 2,0 mL de amostra. Os tubos contendo esta mistura foram agitados e deixados em repouso por 20 minutos a temperatura ambiente. A cloramina T foi destruída pela adição de 1mL de ácido perclórico em cada tubo. Os tubos

foram novamente agitados e deixados em repouso por mais 5 minutos.

#### Formação do cromóforo:

Após o período de 5 minutos, 1mL de solução de p-dimetilaminobenzaldeído foi adicionado e os tubos foram novamente agitados e colocados em banho-maria a 60°C por mais 20 minutos para o desenvolvimento de cor. A seguir, os tubos resfriados em água corrente durante 5 minutos e a absorvância lida em 557nm, em espectrofotômetro Beckman Coulter DU640.

O cálculo da concentração da hidroxiprolina das amostras foi feito diretamente da leitura de absorvância, utilizando a equação da reta obtida da curva padrão das amostras de hidroxiprolina padrão (figura 5 e equação 1).

#### **3.2.3.3. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE LIGAÇÃO DO AÇÚCAR REDUTOR NO COLÁGENO**

O grau de ligação foi obtido pela metodologia descrita por FRIESS & LEE (1996). Os  $\epsilon$ -aminogrupos livres da lisina e hidroxilisina (que não reagiram com a maltodextrina) reagiram com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico originando  $\epsilon$ -trinitrofenil-lisina e hidroxilisina.

Estes compostos absorvem no comprimento de onda de 345nm, quantificando assim os prováveis sítios de reacionais ainda livres.

Alíquotas de 50mg das dispersões a 1% das amostras 90ant8, 90ant8-5, 50ant72, 90Cprot, 50post96, 50post72, 50post168 e TApost720 em solução aquosa de ácido acético 0,5mol/L foram misturadas a 500µL de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico a 0,25% p/v em solução de bicarbonato de sódio a 4%p/v (n=4). Após 2h a 40°C, 750µL de HCl 12mol/L foram adicionados e aquecidos a 60°C por 1h. A seguir, 800µL de cada uma das amostras foram diluídos com 1mL de água destilada e lavados por 4 vezes com éter etílico para remover o excesso de reagente e produtos de reação n-terminal. A fase aquosa contendo ε-trinitrofenil-lisina e hidroxilisina foi aquecida a 60°C por 1min e a absorção medida em 345nm. O grau de ligação foi calculado segundo a equação 2.

Equação 2:

$$\text{Grau de ligação} = \frac{1 - (A_{\text{mod}}/m_{\text{mod}})}{A_{\text{orig}}/m_{\text{orig}}}$$

Na qual:

$A_{\text{orig}}$  e  $A_{\text{mod}}$  se referem à absorvância do colágeno antes e após a reação de Maillard.

$m_{\text{orig}}$  e  $m_{\text{mod}}$  se referem à massa do colágeno antes e após a reação de Maillard.

### **3.2.3.4. DETERMINAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DAS AMOSTRAS DE COLÁGENO**

#### **MODIFICADO PELA REAÇÃO DE MAILLARD**

Foram determinadas as fluorescências das amostras 90ant8, 90ant8-5, 90Cprot8 e 90Ccarb8 coletadas durante a reação e ao final da mesma. Além destas amostras foi determinada a fluorescência de 50post96 e 50post72. Foi utilizado para a determinação da fluorescência um espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500. Os parâmetros utilizados foram de acordo com a literatura (ELGAWISH, et al., 1996; MALIK & MEEK, 1996; SAJITHLAL et al., 1998; KLETER et al., 1998) , onde o comprimento de onda de excitação foi 370nm e o de emissão foi 440nm. A abertura de fenda utilizada (ex/em) foi 5,0nm/5,0nm e a voltagem foi 700V.

### **3.2.3.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO**

Os espectros de infravermelho foram obtidos em aparelho FT-IR Nicolet (Protege) 460 utilizando amostras de colágeno: COL e 90Cprot e amostras de colágeno modificado liofilizados: 90ant8 e 50ant72. Quantidades apropriadas das amostras foram comprimidas com KBr e colocadas entre janelas transparentes do aparelho. Os espectros serão obtidos no intervalo de 600 a 4000cm<sup>-1</sup>.

### **3.2.3.6. ANÁLISE TÉRMICA DO COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO**

O polímero foi caracterizado por análise termogravimétrica (TGA). Cerca de 5mg de amostra foram colocadas em recipientes de platina para os ensaios em TGA. A razão de aquecimento aplicada foi de 5°C/min até 400°C em atmosfera de nitrogênio. O equipamento utilizado foi um TGA-50 Shimadzu. Foram analisadas as amostras COL, 90Cprot, 90ant8, 50ant72, 50post72 e TApóst720.

### **3.2.3.7. ENSAIO REOLÓGICO DOS GÉIS DE COLÁGENO E COLÁGENO MODIFICADO**

A avaliação das características reológicas dos géis obtidos a partir das amostras COL e TApóst720 foi realizada utilizando reômetro RHEOTEST 2.1 com cilindros coaxiais. O equipamento possui banho termostaticado e um conjunto de cilindros com diferentes dimensões, indicados para faixas específicas de viscosidade. Para realização dos experimentos foram utilizadas as temperaturas de 25°C(±1°C) e 37°C(±1°C). A associação de cilindros definida em função da viscosidade dos géis testados foi AIDN. Os géis foram preparados em solução de ácido acético 0,5mol/L e tinham concentração igual a 1%(p/V).

As amostras foram submetidas a velocidades crescentes de rotação (construção da curva ascendente do reograma) e a velocidades decrescentes (construção da curva de retorno do reograma). O aparelho possui uma escala de 12 velocidades.

Os valores de gradiente de cisalhamento possuem valores fixos para cada velocidade de rotação do cilindro. Para cada valor de gradiente de cisalhamento, o equipamento gerou uma leitura "a". A tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) é calculada a partir de "a" para cada velocidade. Essa tensão é o produto entre os valores de "a" e uma constante "Z". "Z" é definida em função da associação de cilindros escolhidos. "Z" para este experimento foi 3,14, já que o conjunto escolhido foi o AIDN.

Tem-se então a equação 3 para o cálculo da tensão de cisalhamento:

Equação 3:

$$\tau = a \cdot Z$$

Os valores de viscosidade ( $\mu$ ), em cP, foram obtidos através da equação 4.

Equação 4:

$$\mu = (\tau/\gamma) \cdot 100$$

na qual:  $\gamma$  é o gradiente de cisalhamento ou taxa de deformação.

Os reogramas foram construídos plotando-se os valores de gradiente de cisalhamento ( $\gamma$ ) em função da tensão de cisalhamento obtida ( $\tau$ ). O comportamento reológico dos materiais foi avaliado pelas curvas de viscosidade em função do gradiente de cisalhamento.

### **3.2.3.8. ENSAIOS DE LIBERAÇÃO**

Os ensaios de liberação do fármaco foram realizados utilizando dois tipos de sistema. Foram utilizados uma célula de difusão e o aparelho de dissolução.

#### **3.2.3.8.1. Preparação dos géis**

Foram preparados géis contendo 1% ou 2% (p/V) de polímero (COL ou TApóst720) em ácido acético 0,5mol/L. Foram incorporados nos géis 0,5mg/mL de paracetamol para os experimentos de liberação na célula de difusão. Nos experimentos realizados em

aparelho de dissolução os géis a 1%(p/V) tinham concentração igual a 1,5g/mL de paracetamol. As concentrações acima citadas foram escolhidas em função da melhor concentração para as leituras no espectrofotômetro de ultravioleta com a finalidade de se evitar diluições. Um controle utilizando uma solução de mesma concentração dos fármacos acima citados e um branco utilizando apenas os géis sem adição de fármacos foram executados.

#### **3.2.3.8.2. Preparação das membranas**

Neste experimento foi utilizada membrana de acetato de celulose (cut-off 8.000) como membrana de permeação do fármaco. Para a preparação da membrana de acetato de celulose foi cortada área referente à superfície de separação entre os dois compartimentos da célula de difusão (figura 6) ou tamanho suficiente para conter 3mL de gel. Depois de cortada, a membrana foi então colocada em água destilada em ebulição durante 15 minutos. Esta operação foi realizada três vezes.

#### **3.2.3.8.3. Montagem da célula de difusão e sistema para o ensaio de liberação**

Para o ensaio de liberação foi utilizada uma célula de difusão (figura 6), a qual possui um compartimento doador (1) e um compartimento receptor (2).



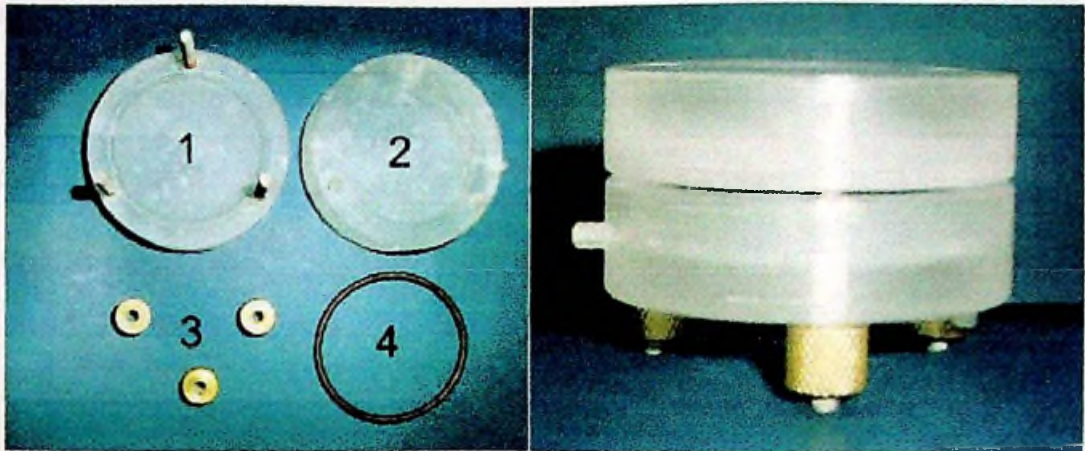


Figura 6: Célula de Difusão de fluxo contínuo. (1) Compartimento doador; (2) Compartimento receptor; (3) Presilhas vedantes; (4) Sistema vedante.

O volume de 2mL de gel ou da solução do fármaco foi colocado de maneira uniforme no compartimento doador do sistema (1). Este compartimento foi separado do compartimento receptor (2) pela membrana de acetato de celulose.

As dimensões da célula de difusão estão apresentadas na figura 7. A área total da célula de difusão é 19,62cm<sup>2</sup>.

A figura 8 apresenta todo o sistema montado. Uma solução de tampão fosfato 0,2mol/L pH 7,4 foi utilizada como solução receptora e o volume utilizado foi 100mL. Esta solução foi acondicionada em recipiente de parede dupla (2) com a finalidade de ser mantida aquecida a 37°C ± 1°C, utilizando para tanto banho termostatizado

(1). A solução foi mantida sob agitação e bombeada continuamente numa vazão de 10mL/min por uma bomba peristáltica (4) para o compartimento receptor da célula de difusão (3). Após passar pelo compartimento receptor, a solução volta para o recipiente de parede dupla(2).

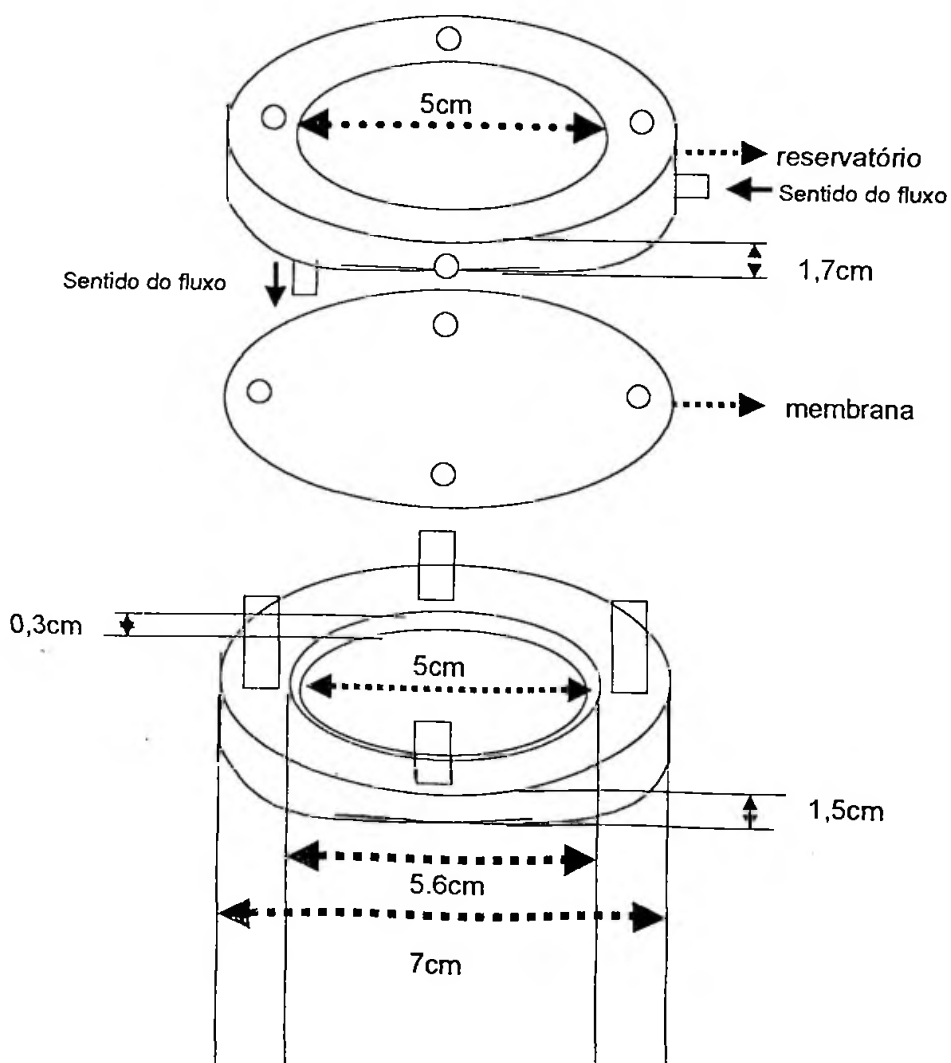


Figura 7. Dimensões da célula de difusão de fluxo contínuo.

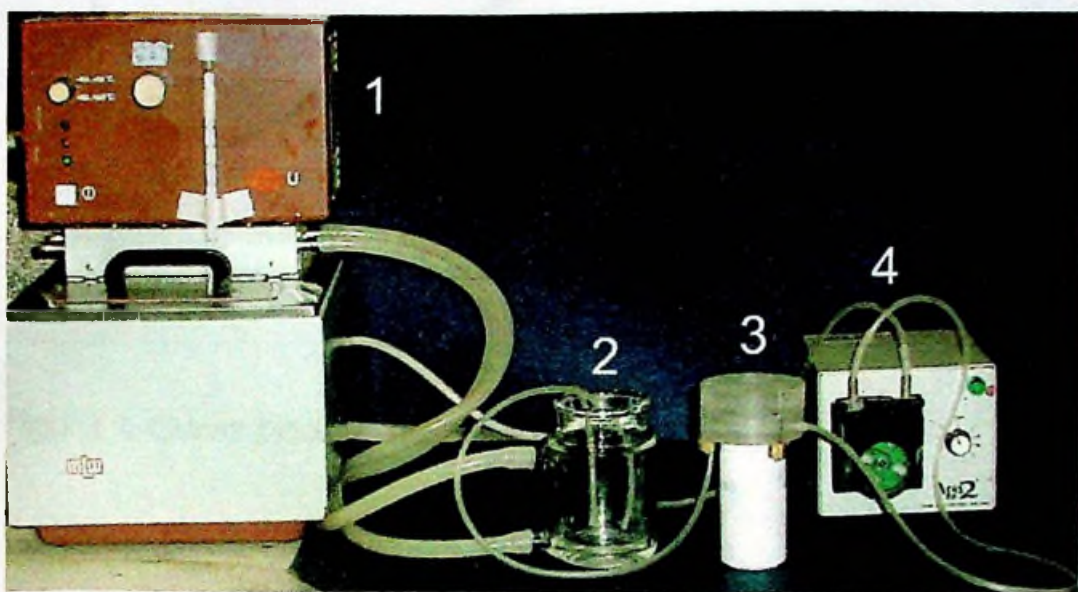


Figura 8. Sistema para o ensaio de liberação. (1) banho termostatizado; (2) recipiente de parede dupla com solução receptora; (3) célula de difusão; (4) bomba peristáltica.

Em tempos pré-definidos, alíquotas de 5mL foram retiradas da solução receptora e o mesmo volume de tampão fosfato foi repostado.

A determinação da concentração do fármaco na solução receptora foi feita por espectrofotometria na região do ultravioleta em 243nm. O valor de absorvância foi substituído na equação da reta (equação 5) obtida da curva padrão do paracetamol para o cálculo da concentração (figura 9).

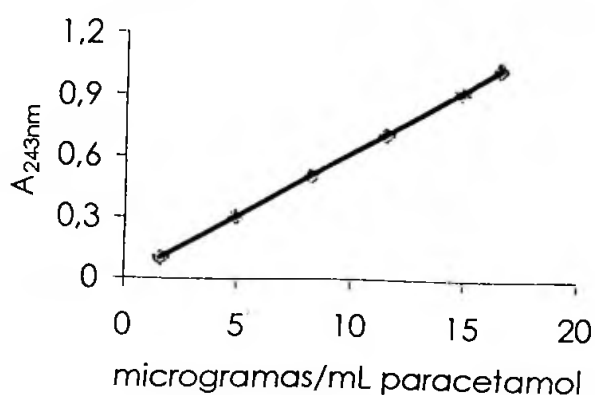


Figura 9. Curva padrão do paracetamol

Equação 5:

$$y = 0,0627x + 0,0016$$

$$R = 0,9999$$

A porcentagem liberada foi calculada através da equação 6.

Equação 6:

$$\%lib = (m_{lib} \times 100) / m_{tot} \times 19,62$$

na qual: %lib = porcentagem liberada

$m_{lib}$  = massa liberada

$m_{tot}$  = massa total na amostra inicial

#### 3.2.3.8.4. Ensaio de liberação realizado em aparelho de dissolução

Foi realizado o teste de liberação do paracetamol a partir de géis de colágeno e colágeno modificado a 1% (p/V) utilizando o aparelho de dissolução. Os géis (3mL) foram acondicionados em saquinhos de acetato de celulose devidamente fechados e então colocados no aparelho com cesto do equipamento. Foram utilizados 900mL de tampão fosfato pH 7,4 como meio de dissolução. A rotação foi ajustada para 50 rpm e a temperatura mantida em  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Em tempos pré-determinados, 5mL do meio de dissolução foram coletados e o mesmo volume de tampão foi devolvido para o equipamento. A determinação da concentração de paracetamol foi realizada por espectrofotometria na região do ultravioleta como no ensaio de liberação da célula de difusão (equação 5). Os resultados foram expressos em % liberada de paracetamol (equação 7).

Equação 7:

$$\%lib = (m_{lib} \times 100) / m_{tot}$$

na qual: %lib = porcentagem liberada

$m_{lib}$  = massa liberada

$m_{tot}$  = massa total na amostra inicial

Os resultados dos ensaios de liberação receberam tratamento estatístico pelo método de distribuição de Student e Análise de Variância (ANOVA).

A distribuição de Student ou teste "t" foi realizado pela comparação entre duas médias independentes. O teste foi aplicado para todas as amostras submetidas ao ensaio de liberação nos tempos 60, 120 e 240 minutos. As amostras foram comparadas duas a duas e foi efetuada a decisão sobre as médias, onde o nível de significância ou intervalo de confiança determina se existe ou não diferença significativa entre duas médias. A análise de variância foi realizada pela comparação entre duas ou três médias com as mesmas amostras descritas anteriormente. Foi utilizado intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DO COLÁGENO MODIFICADO PELA REAÇÃO DE MAILLARD

A tabela 3 apresenta os resultados da análise macroscópica (desenvolvimento de cor) das frações líquidas dos experimentos "ant" e das amostras "post" após a modificação química nas condições estabelecidas.

Tabela 3. Análise macroscópica das amostras de colágeno modificado quimicamente pela reação de Maillard.

| Amostra             | Desenvolvimento de cor<br>(análise macroscópica) |
|---------------------|--|
| 90ant8              | +++ (amarelo-marrom)                             |
| 90ant8-5            | + (amarelo)                                      |
| 50ant72             | ++ (marrom-preto)                                |
| 50post96            | + (amarelo)                                      |
| 50post72            | ++ (amarelo-marrom)                              |
| 50post168           | + (amarelo)                                      |
| TApost720           | + (amarelo)                                      |
| 90Cprot8 (controle) | -  |
| 90Ccarb8(controle)  | -  |

Os sinais representam uma escala relativa a cor da amostra após o período reacional, onde +++ foi a amostra que mais escureceu, ++ a que apresentou escurecimento intermediário, + a que obteve leve escurecimento e - aquela que permaneceu com a mesma coloração.

As amostras dos experimentos 90Cprot8 e 90Ccarb8 não apresentaram escurecimento, resultados estes já esperados, pois foram experimentos controle.

#### **4.1.1. AMOSTRAS SUBMETIDAS À REAÇÃO DE MAILLARD ANTES DA EXTRAÇÃO DO COLÁGENO (ANT)**

A amostra 90ant8 apresentou maior escurecimento (+++) com tonalidade amarela. A amostra 50ant72 também apresentou escurecimento (++) , mas com tonalidade marrom-preto. A amostra 90ant8-5 foi a que obteve menor grau de escurecimento (+) dentre a amostras "ant",

A etapa de extração do colágeno nas amostras "ant" foi realizada a partir do material sólido. Porém na etapa de homogeneização do material em ácido acético, as frações sólidas das amostras 90ant8, 90ant8-5 e 90Cprot8, não formaram gel e conseqüentemente, não houve recuperação da proteína após



adição de NaCl no meio. Com a fração sólida da amostra 50ant72 houve formação de gel e recuperação de parte do material.

A partir destes resultados, apenas as frações líquidas foram avaliadas.

#### **4.1.2. AMOSTRAS SUBMETIDAS À REAÇÃO DE MAILLARD APÓS EXTRAÇÃO DO COLÁGENO (POST)**

Em relação ao escurecimento das amostras, apenas a amostra 50post72 apresentou um escurecimento maior (++). As demais amostras "post" apresentaram leve escurecimento (+).

Após aquecimento juntamente com o açúcar, as amostras 50post96, 50post72 e 50post168 apresentaram-se solúveis no meio reacional, exceto amostra TApóst720, a qual não foi submetida ao tratamento térmico.

A amostra TApóst720 durante a reação foi intumescendo gradativamente, mas não se dispersou no meio como as demais amostras as quais se solubilizaram totalmente. O experimento TApóst720 foi realizado em outra etapa do trabalho, onde se percebeu a necessidade de se realizar experimentos em temperaturas mais brandas. Em temperaturas reacionais iguais ou

maiores que 50°C ocorreu solubilização do material, não obtendo assim o gel, o qual foi o objeto deste trabalho.

#### 4.2. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE LIGAÇÃO DO AÇÚCAR REDUTOR NA MOLÉCULA DE COLÁGENO

A tabela 4 apresenta o grau de ligação do açúcar redutor ao colágeno modificado em relação ao colágeno extraído do tendão bovino.

Tabela 4. Grau de ligação de açúcar redutor às amostras de colágeno em tendão bovino e após serem extraídas do tendão.

| Amostra   | [ ] maltodextrina<br>(mg/mL) | Grau de ligação |
|-----------|------------------------------|-----------------|
| 90ant8    | 25                           | 0,29            |
| 90ant8-5  | 10                           | 0,16            |
| 50ant72   | 10                           | 0,48            |
| 50post72  | 25                           | 0,27            |
| 50post96  | 10                           | 0,25            |
| 50post168 | 60                           | 0,22            |
| TApost720 | 60                           | 0,20            |
| 90Cprot8  | 0                            | 0               |

O experimento controle (90Cprot8) apresentou grau de ligação nulo, o que era esperado já que não houve presença de açúcar no meio reacional.

Observando-se os resultados obtidos para as amostras 90ant8 e 90ant8-5, tem-se um maior grau de ligação do açúcar redutor em pH 7,0 do que quando a reação ocorre em pH 5,0.

A amostra 50ant72 apresentou um alto grau de ligação em comparação com as demais amostras, apesar da reação ter sido realizada em temperatura mais branda e concentração mais baixa de maltodextrina em comparação com a amostra 90ant8.

Em relação aos resultados obtidos dos experimentos onde a reação foi realizada posteriormente à extração, as diferentes amostras não apresentaram muita variação no grau de ligação. Na amostra TApost720 observou-se que o grau de ligação foi pouco menor que os resultados das demais amostras "post" mesmo prolongando-se o tempo de reação.

Pode-se observar que a amostra 50post72 apesar de ter sido obtida utilizando-se concentração de açúcar maior que a amostra 50ant72, apresentou menor grau de ligação.

### 4.3. ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA DO COLÁGENO E DO COLÁGENO MODIFICADO

A figura 10 mostra o perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida 7,5 em condição dissociante, das amostras de colágeno e de colágeno modificado pela reação de Maillard, em diferentes condições reacionais.

O colágeno extraído do tendão bovino, sem tratamento com os agentes solubilizantes uréia-chaps (COL) e o tratado com solubilizantes (COL-F), mostraram os mesmos perfis eletroforéticos, sendo possível a visualização das bandas protéicas  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , a  $\beta$  (dímero reticulado das cadeias  $\alpha$ ), e a banda  $\gamma$  (trímero reticulado das cadeias  $\alpha$ ), todas com massas moleculares superiores aos dos padrões protéicos aplicados no gel.

A amostra de colágeno extraído do tendão e modificado pela reação de Maillard, a temperatura ambiente, pH 7,0 e tempo reacional de 720 horas (TApost720), mostrou as bandas protéicas  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , mas não as bandas  $\beta$  e  $\gamma$ . Nas amostras de colágeno modificado, sem a extração prévia da molécula, não foram detectadas bandas protéicas.

As amostras de colágeno modificado e não modificado, assim como o colágeno padrão, foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 4-15% com SDS (figura 11).

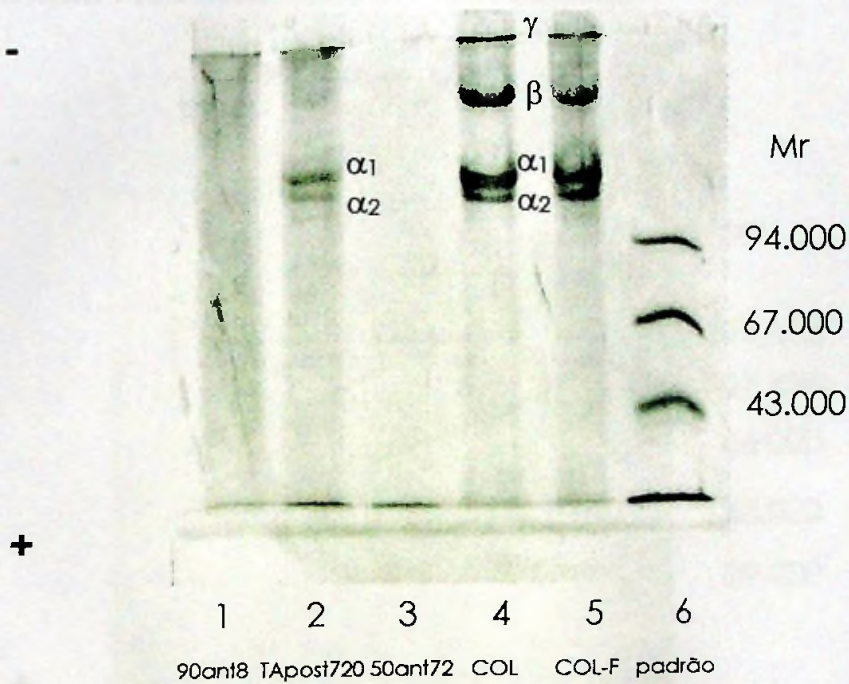


Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5 com SDS das amostras de colágeno e colágeno modificado pela reação de Maillard.

Legenda: Linha 1: colágeno modificado antes do processo de extração nas condições reacionais 90°C/pH7,0/8horas (90ant8); linha 2: colágeno modificado nas condições reacionais temperatura ambiente/720horas/pH7,0 (TApst720); linha 3: colágeno modificado antes do processo de extração nas condições reacionais 50°C/pH7,0/72horas (50ant72); linha 4: colágeno sem tratamento de solubilização com uréia-chaps (COL); linha 5: colágeno solubilizado com uréia-chaps (COL-F); linha 6: padrões de massas moleculares conhecidos: fosforilase b (94.000 daltons), albumina bovina (67.000 daltons) e ovoalbumina (43.000 daltons).

O perfil eletroforético do colágeno solúvel padrão não mostrou nenhuma banda protéica. As bandas  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  foram detectadas somente na amostra de colágeno extraído e modificado (TApost720), com mobilidade eletroforética semelhante a  $\beta$ -galactosidase de massa molecular igual a 116.000 daltons.

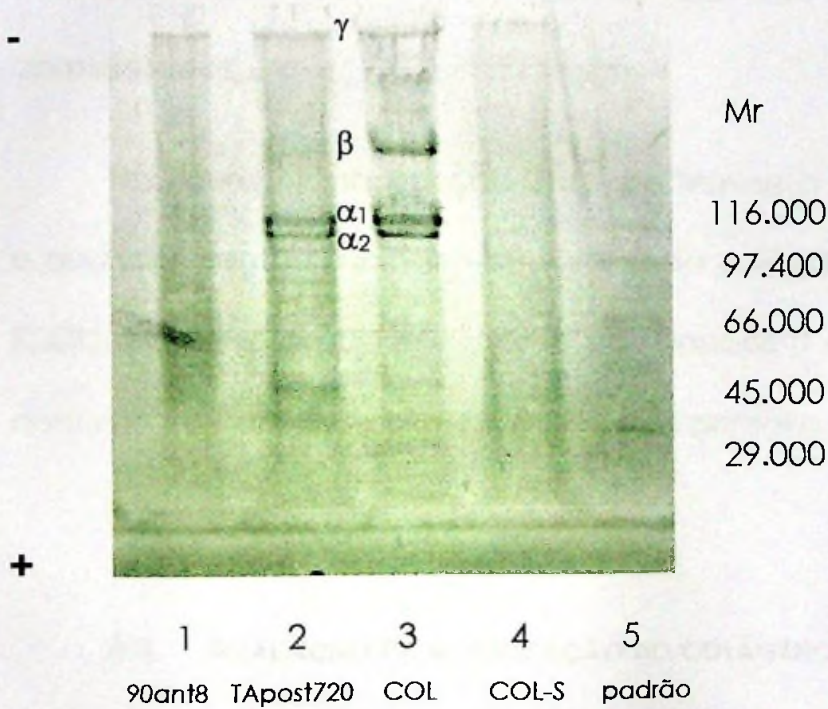


Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida 4-15 com SDS das amostras de colágeno e colágeno modificado pela reação de Maillard.

Legenda: Linha 1: colágeno modificado antes do processo de extração nas condições reacionais 90°C/pH7,0/8horas (90ant8); linha 2: colágeno modificado nas condições reacionais temperatura ambiente/720horas/pH7,0 (TApost720); linha 3: colágeno sem tratamento de solubilização com uréia-chaps (COL); linha 4: padrão de colágeno sigma (COL-S); linha 5: padrões de massas moleculares conhecidos: miosina (205.000 daltons),  $\beta$ -galactosidase (116.000 daltons), fosforilase (97.400 daltons), albumina sérica bovina (66.000 daltons), ovoalbumina (45.000 daltons), anidrase carbônica (29.000 daltons).

Na linha 1 do gel homogêneo 7,5 e nesta mesma posição do gel gradiente 4-15 referentes a amostra 90ant8, observou-se o aparecimento de uma faixa homogênea contínua (figuras 10 e 11).

A amostra 50ant72 aplicada na linha 3 do gel homogêneo 7,5 não foi revelada (figura 10). Um aumento na concentração desta amostra foi realizado sem alteração do resultado anterior (dados não apresentados).

Na figura 11, na posição 2 do gel tem-se a amostra TApóst720, a qual apresentou bandas  $\alpha$  similares à do colágeno não modificado (COL). Houve o desaparecimento das bandas  $\beta$  e  $\gamma$ . Estes resultados concordam com os resultados obtidos no primeiro gel (figura 10).

#### **4.4. AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO DO COLÁGENO DURANTE A REAÇÃO DE MAILLARD POR MEDIDA DA FLUORESCÊNCIA**

Durante o experimento 90Cprot8 (controle com ausência de maltodextrina e presença de tendão) e 90Ccarb8 (controle com ausência de tendão e presença de maltodextrina), alíquotas foram coletadas e as fluorescências de 61,51 e 153,3 determinadas para os tempos de reação 3,5 e 5,7h respectivamente (90Cprot8) e de 0,843

para o tempo de 8 horas (90Ccarb8). Os valores obtidos foram considerados a fluorescência basal.

A fluorescência das amostras coletadas durante a reação entre o açúcar redutor e o colágeno presente em tendões, nas condições experimentais 90ant8 (90°C, pH7,0 e 8 horas de reação) e 90ant8-5 (90°C, pH5,0 e 8 horas de reação) foi aumentando com o tempo de reação (figura 12). A amostra 90ant8 apresentou um aumento da fluorescência nas três primeiras horas de reação, seguida de uma diminuição na velocidade de produção de compostos fluorescentes, com posterior aumento de fluorescência. Já a amostra 90ant8-5 teve um aumento linear da fluorescência.

A fluorescência determinada para amostra 90ant-8, em 8 horas de reação, foi cerca de 4 vezes superior ao da amostra 90ant8-5, no mesmo tempo reacional. Esta maior fluorescência poderia ser atribuída ao pH 7,0 empregado e não 5,0 (90ant8-5) e a concentração do açúcar redutor, 2,5 vezes superior a empregada para 90ant8-5.

Observando-se os resultados de fluorescência das amostras 50post96 e 50post72, foi verificado que o tempo reacional contribuiu para o aumento dos compostos fluorescentes, mesmo em menor concentração do açúcar (tabela 5).



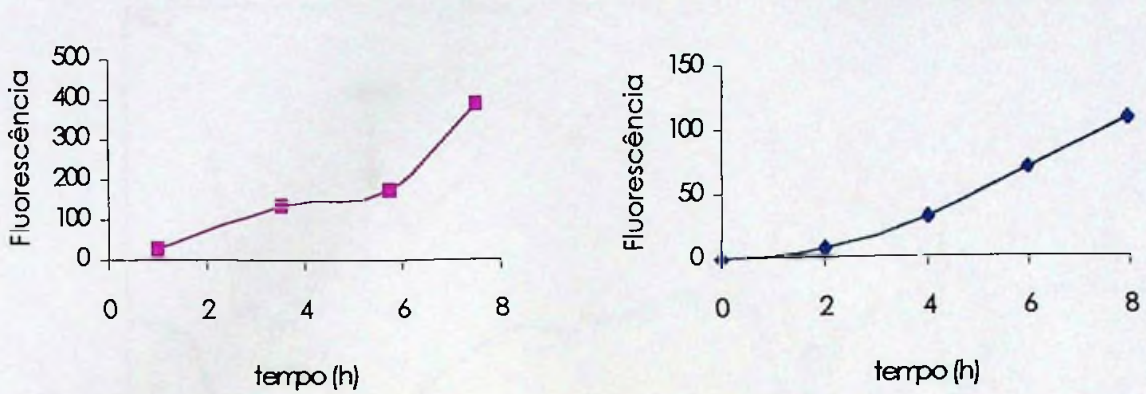


Figura 12. Fluorescência de amostras coletadas durante experimento

-----90ant8 e -----90ant8-5.

Tabela 5. Fluorescência das amostras coletadas após período reacional.

| Amostra  | [ ] maltodextrina<br>(mg/mL) | Fluorescência/ $\mu$ g de<br>hidroxiprolina |
|----------|------------------------------|---|
| 90ant8   | 25                           | 709,573                                     |
| 50post96 | 10                           | 18,996                                      |
| 50post72 | 25                           | 14,491                                      |

#### 4.5. ANÁLISE DO COLÁGENO E DO COLÁGENO MODIFICADO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A figura 13 apresenta os espectros de infravermelho do colágeno extraído do tendão bovino e posteriormente liofilizado (COL) e da amostra controle (90Cprot8), a qual passou por tratamento térmico.

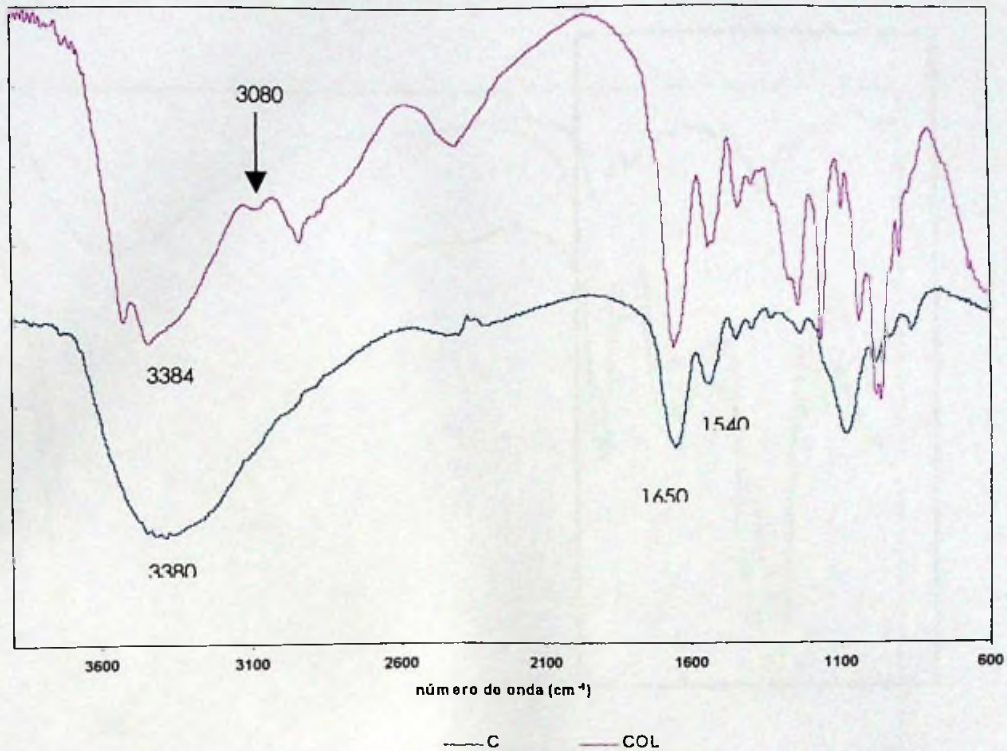


Figura 13. Espectros de Infravermelho das amostras: Colágeno extraído do tendão bovino liofilizado (----COL); Colágeno amostra controle, submetida a aquecimento (----90Cprot8).

As duas amostras apresentaram as bandas características da molécula de colágeno, sendo estas, as bandas amida A, I e II, as quais estão localizadas nas frequências 3380, 1650 e 1540cm<sup>-1</sup> respectivamente. Já a amostra controle não apresentou a banda amida B, também característica da molécula em questão com frequência na região de 3080 cm<sup>-1</sup>.

As amostras dos experimentos 'ant' foram comparadas na figura 12.

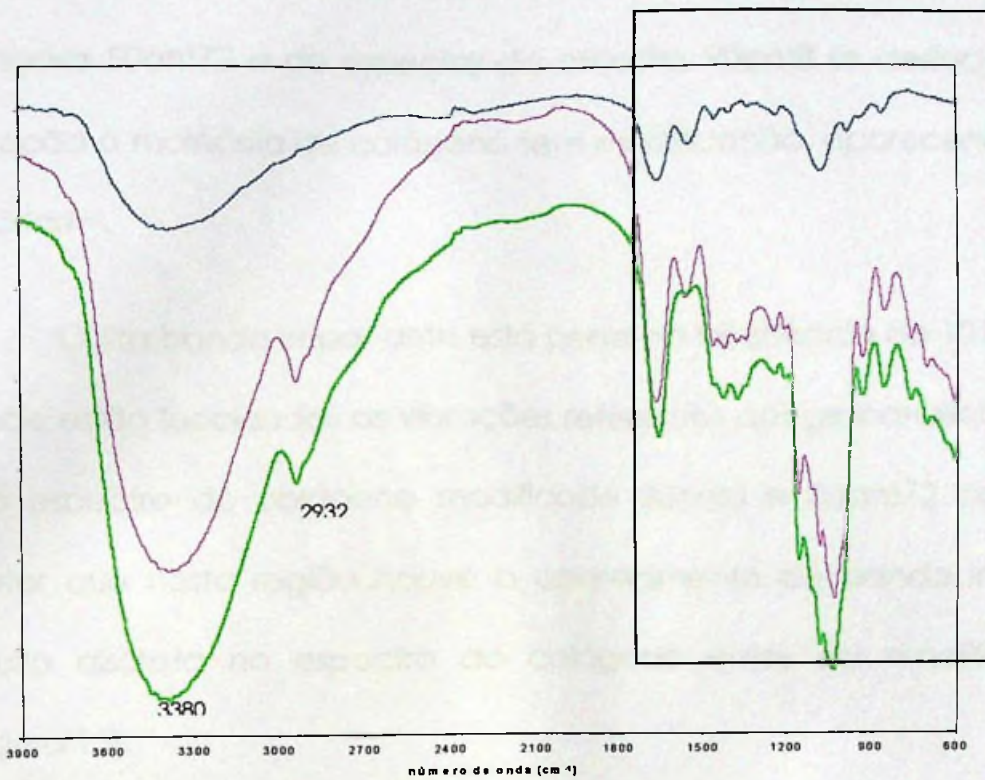


Figura 14. Espectros de Infravermelho das amostras: \_\_\_90ant8 \_\_\_50ant72 e \_\_\_90Cprot8 (controle). Área demarcada ampliada na figura 15.

Os três espectros apresentaram a banda amida A com freqüências próximas a  $3382\text{cm}^{-1}$  e o desaparecimento da banda amida B. As amostras 90ant8 e 50ant72 apresentaram uma banda em  $2932\text{cm}^{-1}$ , que está ausente no espectro da molécula de colágeno não modificado.

Em relação a banda amida I a amostra 50ant72 apresentou leve deslocamento (figura 13), absorvendo na região de  $1645\text{cm}^{-1}$ , enquanto as amostras 90ant8 e 90Cprot8 absorveram em  $1652\text{cm}^{-1}$ .

A banda amida II praticamente desapareceu no espectro da amostra 50ant72 e no espectro da amostra 90ant8 se deslocou em relação à molécula de colágeno sem modificação, aparecendo em  $1553\text{cm}^{-1}$ .

Outra banda importante está perto da frequência de  $1015\text{cm}^{-1}$ , onde estão localizadas as vibrações referentes aos grupamentos OH. No espectro do colágeno modificado 90ant8 e 50ant72 pode-se notar que nesta região houve o aparecimento de banda intensa, muito discreta no espectro do colágeno antes da modificação (figura 15).

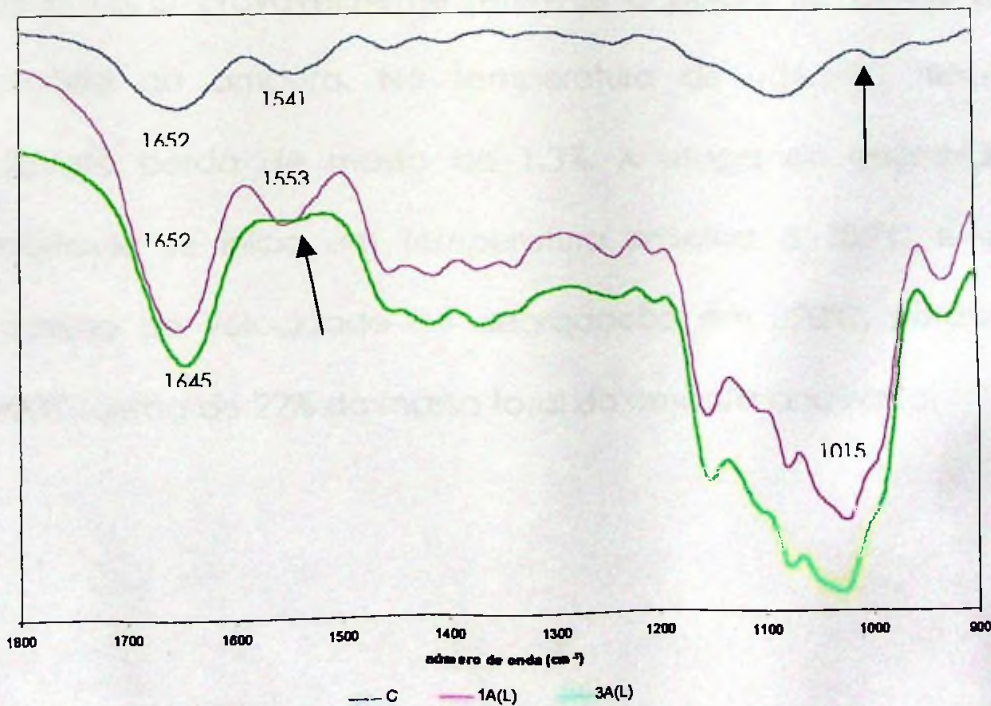


Figura 15. Ampliação dos espectros de Infravermelho da figura 14.

Amostras: 90ant8, 50ant72 e 90Cprot8 (controle).

#### 4.6. ANÁLISE TÉRMICA DO COLÁGENO E DO COLÁGENO MODIFICADO

As figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21 apresentam as curvas termogravimétricas (TG) das amostras analisadas. A DrTGA representa a derivada da curva da análise termogravimétrica e diz respeito a velocidade de perda de massa em função da temperatura. As temperaturas que foram demarcadas nos picos ( $T_{max}$ ) representam a temperatura na qual a velocidade de perda de massa foi máxima e cada pico representa uma etapa de perda de massa.

A figura 16 apresenta a curva TG da amostra de colágeno extraído de tendão bovino após liofilização. O primeiro evento entre 25 e 160°C provavelmente refere-se à perda de massa de água contida na amostra. Na temperatura de 186,34°C tem-se uma discreta perda de massa de 1,3%. A etapa de degradação da molécula se inicia em temperatura próxima a 280°C e atinge o máximo de velocidade de degradação em 320°C, perdendo até 400°C cerca de 22% da massa total da amostra analisada.

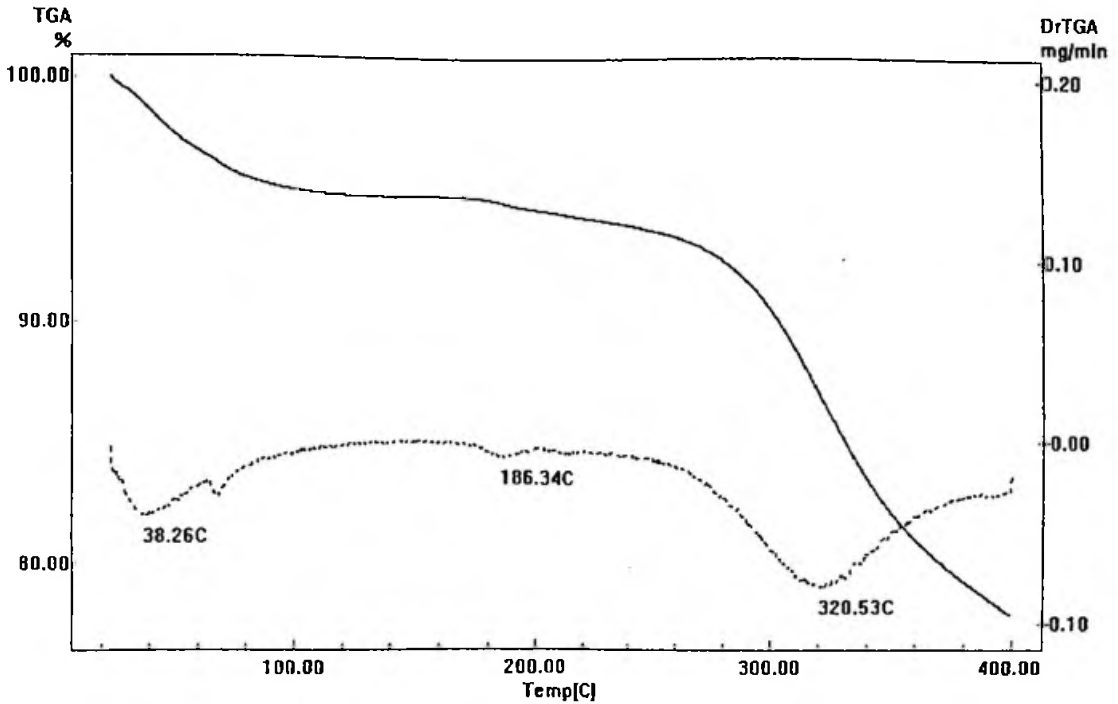


Figura 16. Curva da análise termogravimétrica da amostra de colágeno extraído do tendão bovino sem modificação (COL) — TGA(%) - - - - DrTGA

A figura 17 apresenta a curva TG da amostra controle (90Cprot8), onde o colágeno foi aquecido a 90°C por 8 horas na ausência do açúcar. A curva apresentou-se muito semelhante a do colágeno pobre em telopeptídeo (COL). O primeiro evento também refere-se a perda de água da amostra, porém a velocidade máxima de perda ocorre em 50,26°C, temperatura superior a da amostra COL. O segundo e terceiro evento também se deslocaram para temperaturas maiores em relação à amostra COL, com aumento da % de perda de massa (tabela 5). A % perda de massa total até 400°C da amostra controle foi cerca de 45%.

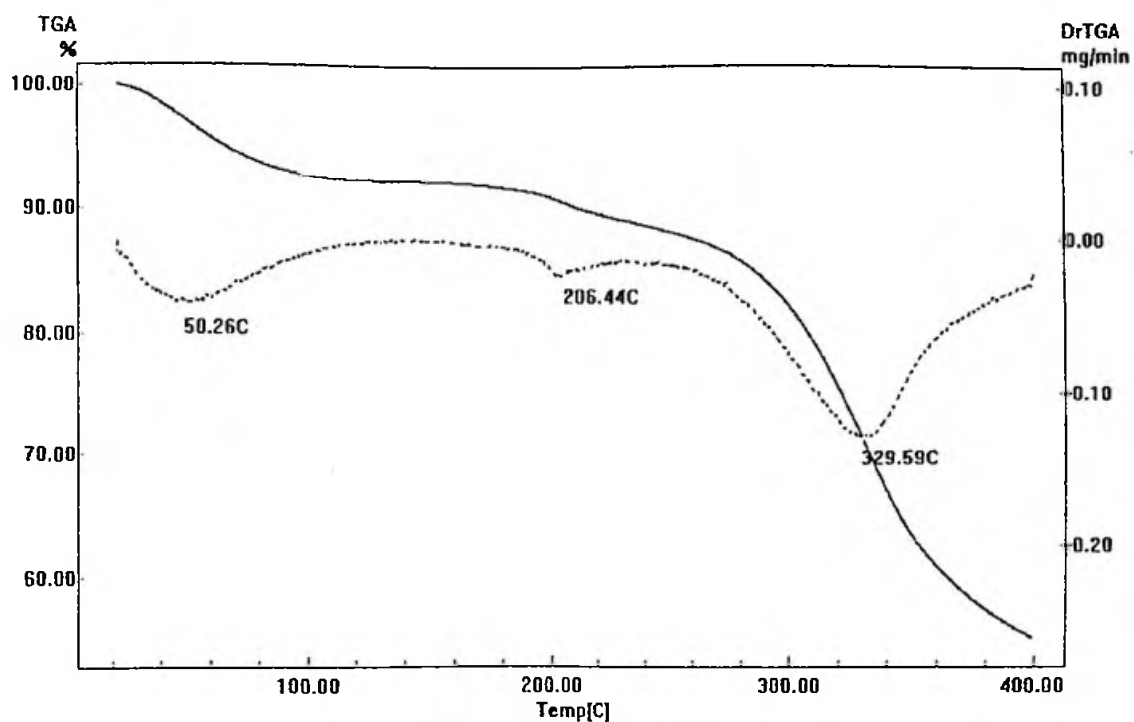


Figura 17. Curva da análise termogravimétrica do colágeno extraído do tendão e aquecido a 90°C por 8 horas (90Cprot8) —TGA(%) ---- DrTGA.

Nas figuras 18 e 19, as quais ilustram as análises termogravimétricas das amostras 90ant8 e 50ant72 respectivamente, pode-se notar um aumento na  $T_{max}$  do primeiro evento em relação a amostra controle C (tabela 5), porém a velocidade de degradação de ambas aumentou razoavelmente na 2ª etapa de perda de massa (temperaturas entre 160 e 250°C). Enquanto a molécula controle perdeu cerca de 3,9% no segundo evento, estas amostras perderam 15% e 18,7% respectivamente. A perda de massa total das referidas amostras foi bastante próxima (amostra 90ant8 - 52,8%, amostra 50ant72 - 53,3%).

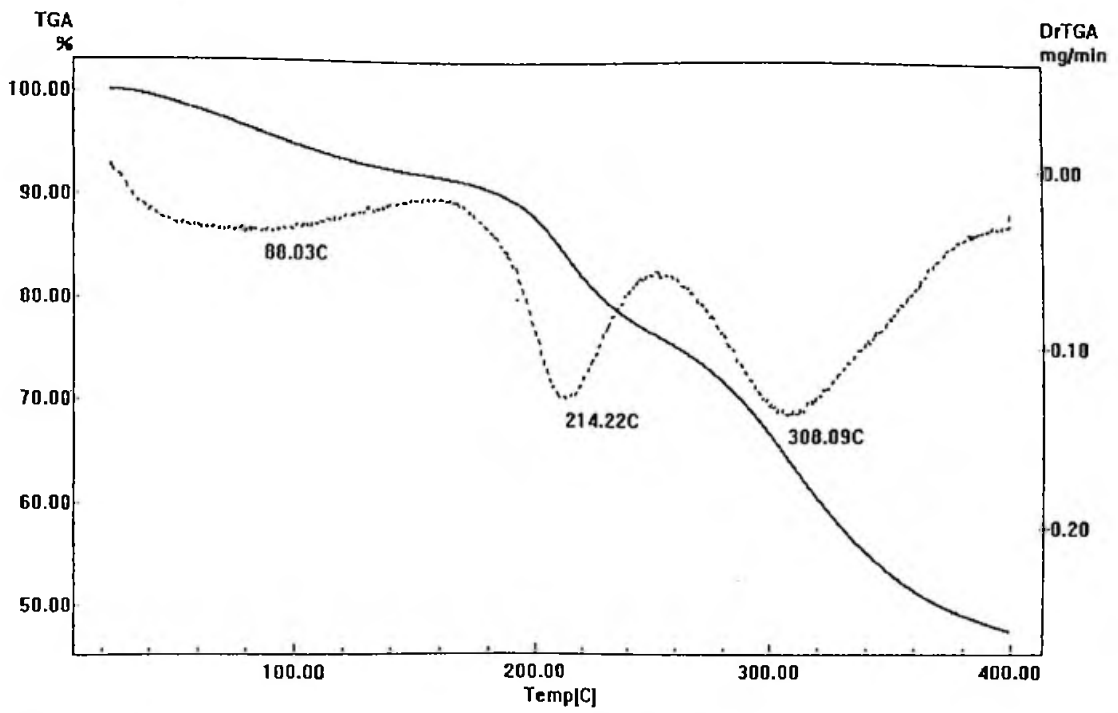


Figura 18. Curva da análise termogravimétrica da amostra 90ant8  
 — TGA(%) - - - - DrTGA

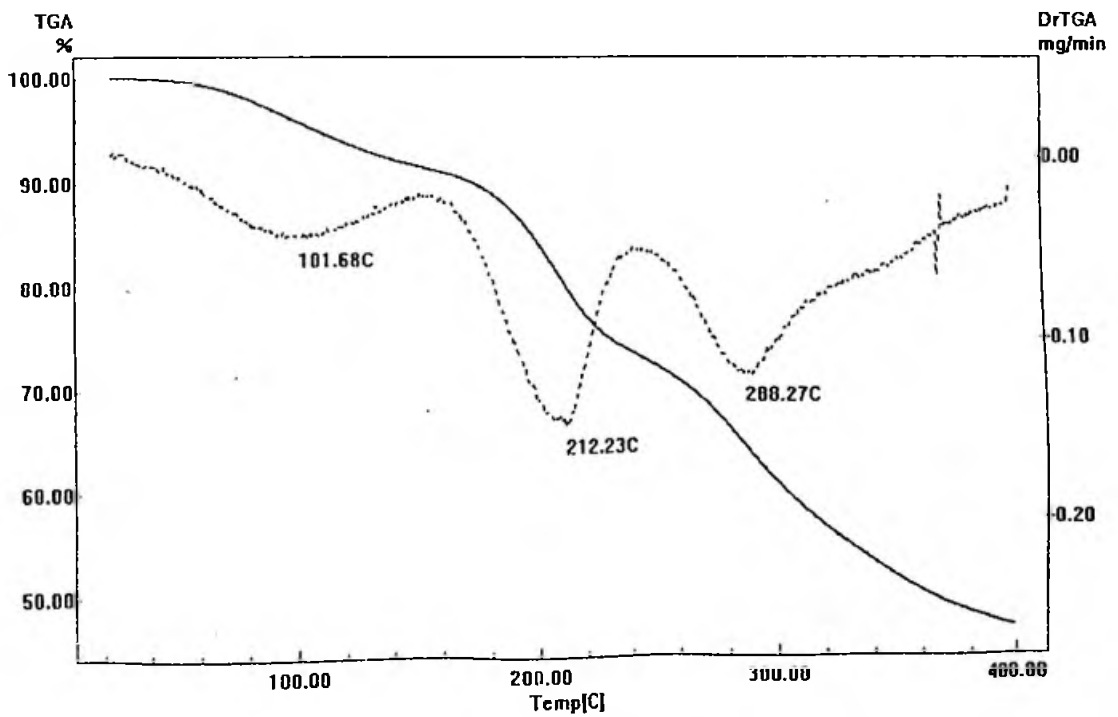


Figura 19. Curva da análise termogravimétrica da amostra 50ant72  
 — TGA(%) - - - - DrTGA



Tabela 6. Perda de massa (%) em diferentes faixas de temperatura das amostras de colágeno e colágeno modificado

| Faixa de temperatura | 20-160°C              |                 | 160-250°C             |                 | 250-400°C             |                 | Até 400°C             |
|----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| Amostra              | T <sub>max</sub> (°C) | perda massa (%) | T <sub>max</sub> (°C) | perda massa (%) | T <sub>max</sub> (°C) | perda massa (%) | perda massa total (%) |
| COL                  | 38,3                  | 4,7             | 186,3                 | 1,3             | 320,5                 | 16,1            | 22,1                  |
| 90Cprot8             | 50,3                  | 7,7             | 206,4                 | 3,9             | 329,6                 | 33,4            | 45,0                  |
| 90ant8               | 88,0                  | 8,3             | 214,2                 | 15,0            | 308,1                 | 29,5            | 52,8                  |
| 50ant72              | 101,7                 | 9,0             | 212,2                 | 18,7            | 288,3                 | 25,6            | 53,3                  |
| 50post72             | 88,8                  | 8,8             | 218,3                 | 9,9             | 284,4                 | 29,5            | 48,2                  |
| TApost720            | 49,1                  | 6,9             | 243,4                 | 4,2             | 303,1                 | 47,2            | 58,3                  |

As figuras 20 e 21 apresentam as curvas termogravimétricas das amostras 50post72 e TApost720. A curva da amostra 50post72 também deslocou a T<sub>max</sub> do primeiro evento para temperaturas mais altas (88, 75°C) em relação à amostra controle (50,26°C). Já a amostra TApost720, que não sofreu tratamento térmico durante a reação apresentou um deslocamento menor (49,1°C) em relação à amostra COL (a qual também não sofreu tratamento térmico) (tabela 6).

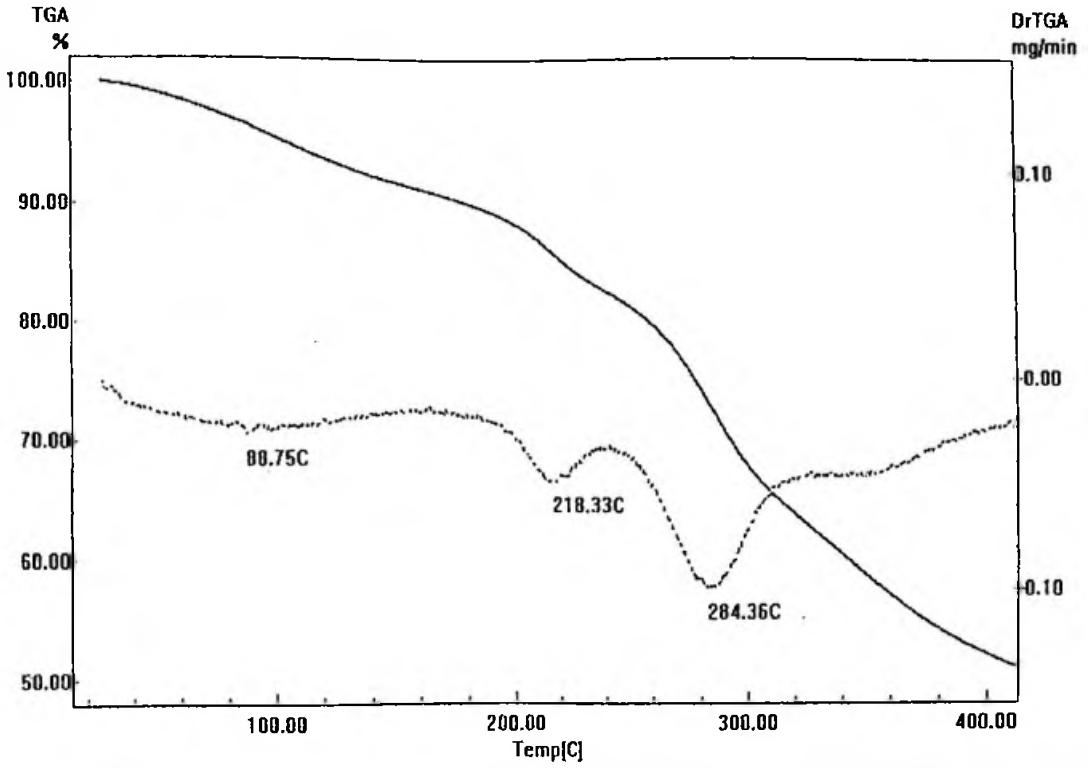


Figura 20. Curva da análise termogravimétrica da amostra 50post72  
 — TGA(%) - - - - DrTGA

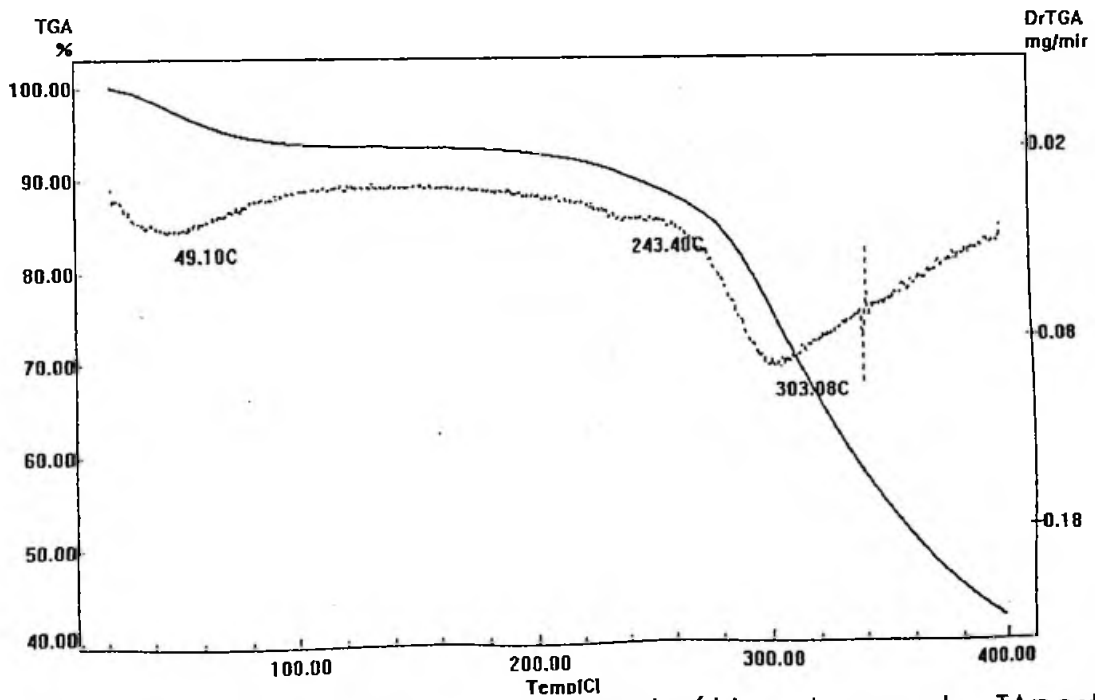


Figura 21. Curva da análise termogravimétrica da amostra TAp0st720  
 — TGA(%) - - - - DrTGA

No segundo evento, as amostras "post" apresentaram % de perda de massa menor do que as amostras "ant" (amostras "post" menores que 10% e amostras "ant" maiores que 15%).

Em relação a  $T_{max}$ , a amostra TApóst720 apresentou velocidade de degradação a uma temperatura mais elevada (243,4°C) que da amostra 50post72 (218,33°C). A perda de massa total das amostras 50post72 e TApóst720 foram respectivamente 48,2% e 58,3%. Apesar da amostra TApóst720 ter apresentado maior perda de massa no terceiro evento que a amostra 50post72, o início do evento de degradação ocorreu em temperatura maior.

#### **4.7. ENSAIO REOLÓGICO DAS DISPERSÕES COLOIDAIS DO COLÁGENO E DO COLÁGENO MODIFICADO**

As figuras 22 e 23 demonstraram o comportamento reológico das dispersões coloidais a 1% das amostras COL e TApóst720 nas temperaturas de ensaio de 25°C e 37°C respectivamente.

Na temperatura de 25°C (figura 22) pode-se perceber o aumento da resistência ao fluxo do polímero modificado em relação à molécula original. Ambas amostras demonstraram comportamento não Newtoniano com área de histerese mínima.

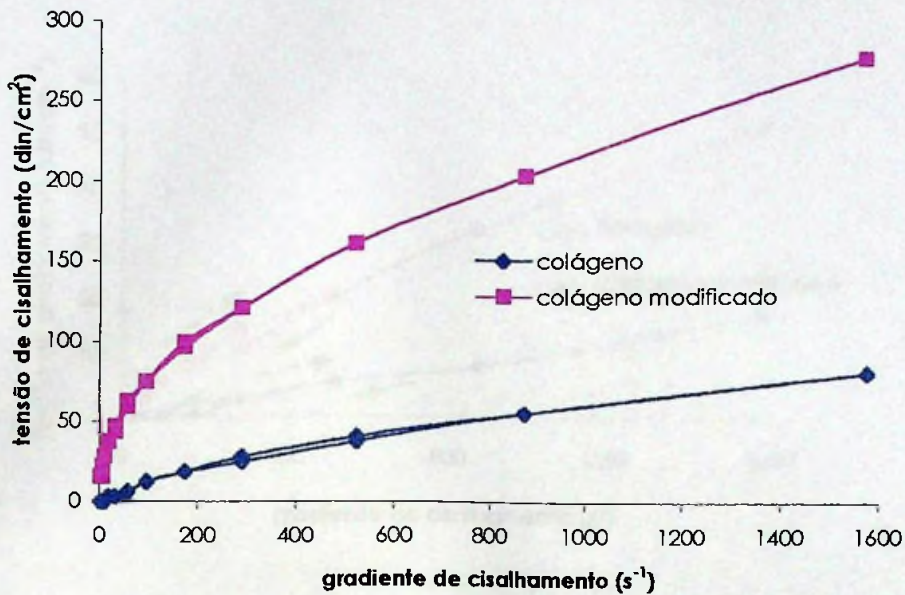


Figura 22. Reograma das amostras de colágeno (COL) e colágeno modificado (TA720post) na temperatura de ensaio 25°C.

Na figura 23, na qual a temperatura do ensaio foi 37°C, houve diminuição da viscosidade das duas amostras, como já era esperado. Ainda assim, o material modificado apresentou uma maior viscosidade que o colágeno antes da modificação. Nesta temperatura os géis apresentaram pequenas áreas de histerese, sugerindo um comportamento tixotrópico, ou seja, dependente do tempo.

As figuras 24 a 27 apresentaram a relação entre viscosidade aparente em função do gradiente de cisalhamento.

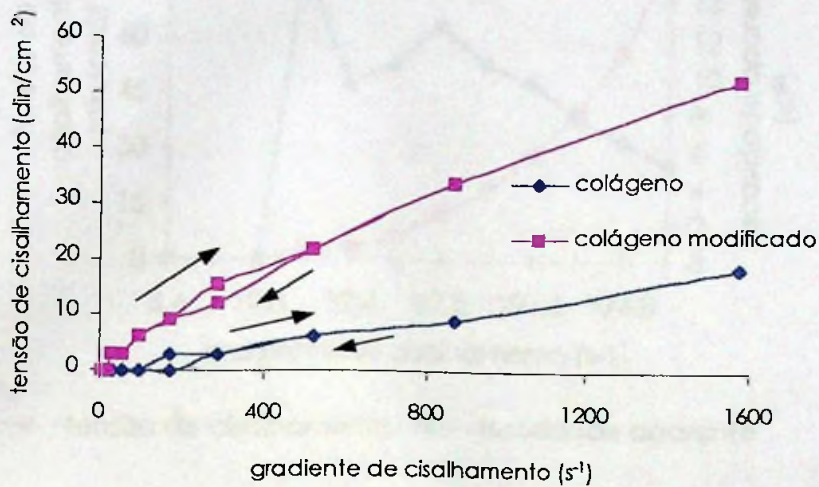


Figura 23. Reograma das amostras colágeno (COL) e colágeno modificado (TA720post) na temperatura de ensaio  $37^\circ\text{C}$ .

As figuras 24 e 26 dizem respeito ao gel de colágeno nas temperaturas  $25$  e  $37^\circ\text{C}$  respectivamente. O gel de colágeno apresentou nítida diminuição na viscosidade em função da temperatura, porém os perfis reológicos apresentaram-se semelhantes.

As figuras 25 e 27 demonstram que os géis de colágeno modificado apresentaram comportamentos diferentes nas duas temperaturas estudadas. Na temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , o gel de colágeno modificado apresentou comportamento plástico com valor de cedência muito maior que o gel de colágeno na mesma temperatura experimental (tabela 7).

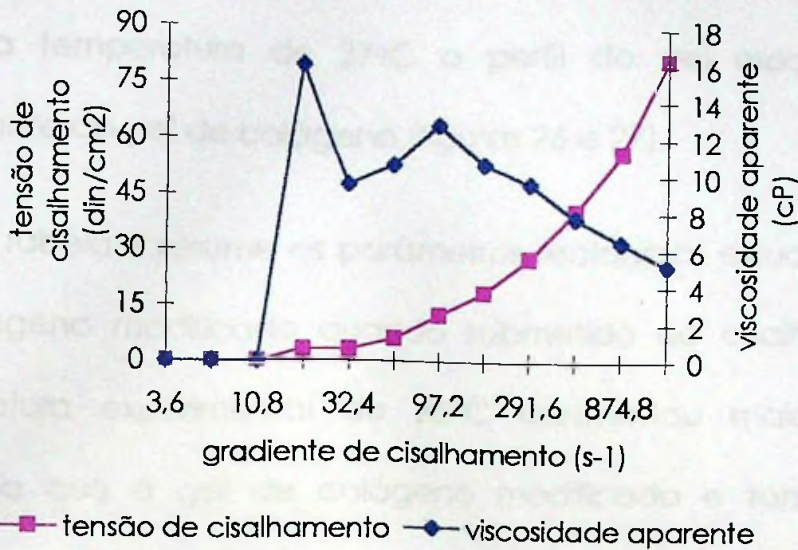


Figura 24. Viscosidade aparente do gel de colágeno (COL) a 1% (p/V) em função do gradiente de cisalhamento na temperatura de 25°C.

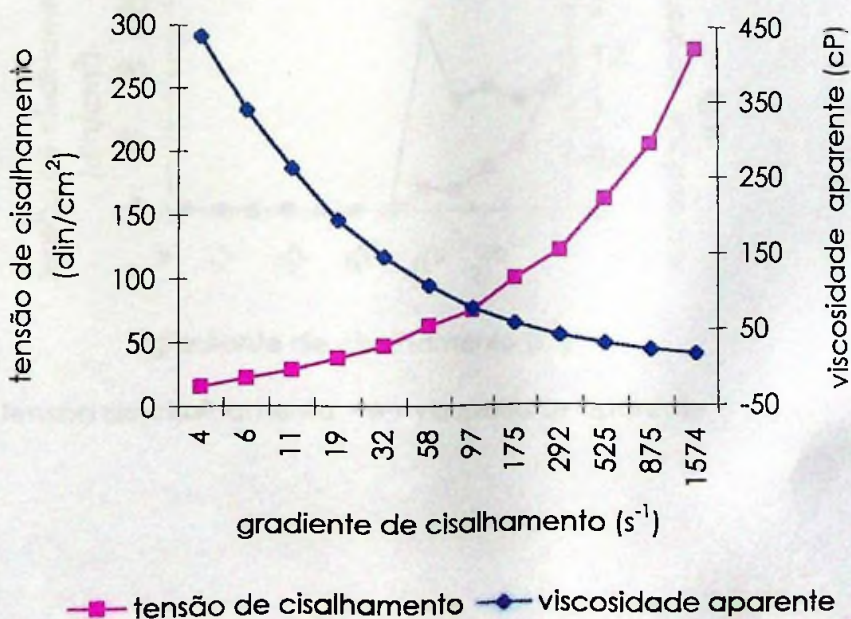


Figura 25. Viscosidade aparente do gel de colágeno modificado (TApost720) a 1% (p/V) em função do gradiente de cisalhamento na temperatura de 25°C.

Na temperatura de 37°C o perfil do gel modificado fica semelhante ao gel de colágeno (figuras 26 e 27).

A tabela 7 resume os parâmetros reológicos estudados. O gel de colágeno modificado quando submetido ao cisalhamento na temperatura experimental de 25°C apresentou maior valor de cedência que o gel de colágeno modificado e também maior viscosidade. Na temperatura de 37°C, as duas formulações apresentaram o mesmo valor de cedência, alterando somente a viscosidade do material.

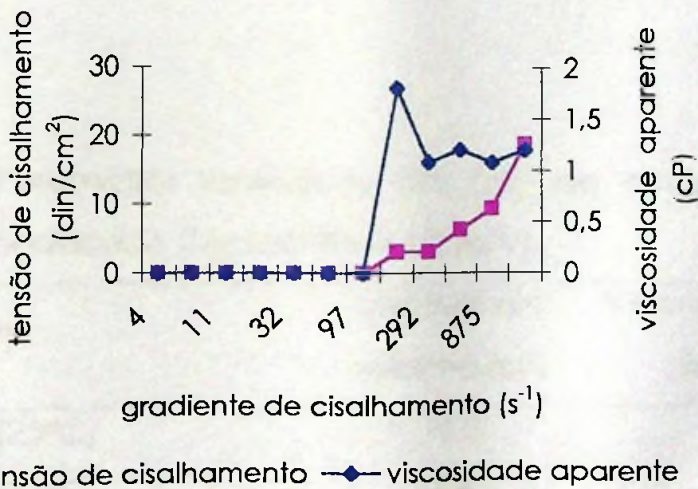


Figura 26. Viscosidade aparente do gel de colágeno (COL) a 1% (p/V) em função do gradiente de cisalhamento na temperatura de 37°C.

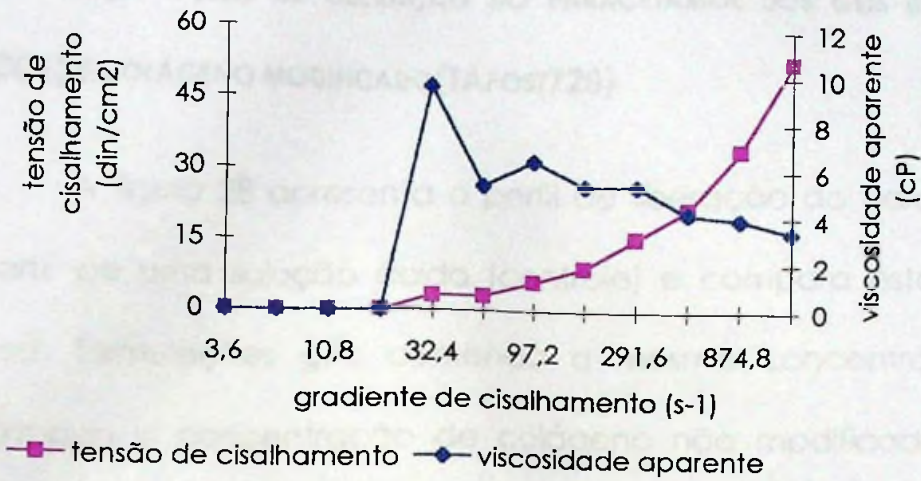


Figura 27. Viscosidade aparente do gel de colágeno modificado (TApost720) a 1% (p/V) em função do gradiente de cisalhamento na temperatura de 37°C.

Tabela 7. Parâmetros reológicos dos géis de colágeno (COL) e colágeno modificado (TApost720) a 1% (p/V).

| Gel 1%(p/V)                | Viscosidade máxima (cP) | Valor de cedência (din/cm <sup>2</sup> ) |
|----------------------------|-------------------------|--|
| Colágeno (25°C)            | 16,2                    | 3,14                                     |
| Colágeno (37°C)            | 1,8                     | 3,14                                     |
| Colágeno Modificado (25°C) | 433,1                   | 15,70                                    |
| Colágeno Modificado (37°C) | 9,7                     | 3,14                                     |



#### 4.8. PERFIL DE LIBERAÇÃO DO PARACETAMOL DOS GÉIS DE COLÁGENO (COL) E COLÁGENO MODIFICADO(TAPOST720)

A figura 28 apresenta o perfil de liberação do paracetamol a partir de uma solução ácida (controle) e compara esta liberação com formulações géis contendo a mesma concentração deste fármaco e concentração de colágeno não modificado de 1% e 2%(p/V) nos experimentos utilizando célula de difusão. Nestes experimentos foi observado que a porcentagem de paracetamol liberado foi de 99,18%, 93,48% e 91,10% para o controle, gel de colágeno a 1% e a 2% respectivamente, até quatro horas de ensaio (tabela 8). Não houve diferença significativa entre as três médias quando comparados neste ponto específico (240 minutos). Porém, os experimentos demonstraram que existe diferença significativa entre a liberação do paracetamol a partir de gel a 2% de colágeno e a solução controle nos tempos 60 e 120 minutos. Houve uma maior retenção do fármaco nos sistemas de gel a 2% quando comparados com a solução controle.

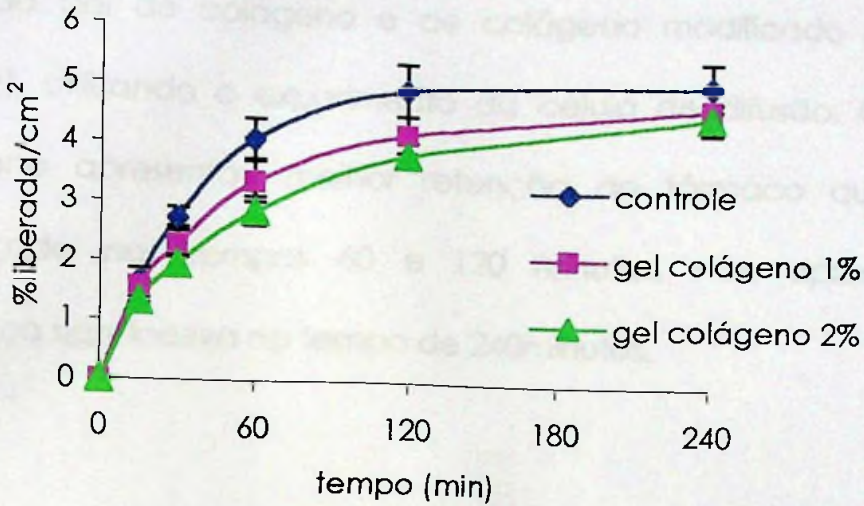


Figura 28. Perfil de liberação de paracetamol a partir de géis de colágeno não modificados em célula de difusão.

Tabela 8. Liberação do paracetamol (%) até 60 e 240 minutos de experimento.

| AMOSTRA  | % polímero no gel | % experimento | % paracetamol até 60min | % paracetamol até 240 min |
|----------|-------------------|---------------|-------------------------|---------------------------|
| CONTROLE | 0                 | CD            | 80,82                   | 99,18                     |
| COL      | 1                 | CD            | 66,53                   | 93,48                     |
| COL      | 2                 | CD            | 56,55                   | 91,10                     |
| COLMOD   | 2                 | CD            | 72,26                   | 100,43                    |
| COL      | 1                 | AD            | 75,31                   | 91,71                     |
| COLMOD   | 1                 | AD            | 51,72                   | 104,71                    |

COL: gel de colágeno não modificado

COLMOD: gel de colágeno modificado (TApost720)

CD: célula de difusão

AD: aparelho de dissolução

A figura 29 compara o perfil de liberação do paracetamol a partir do gel de colágeno e de colágeno modificado ambos a 2%(p/V), utilizando o experimento da célula de difusão. O gel de colágeno apresentou melhor retenção do fármaco que o gel modificado nos tempos 60 e 120 minutos, não apresentando diferença significativa no tempo de 240 minutos.

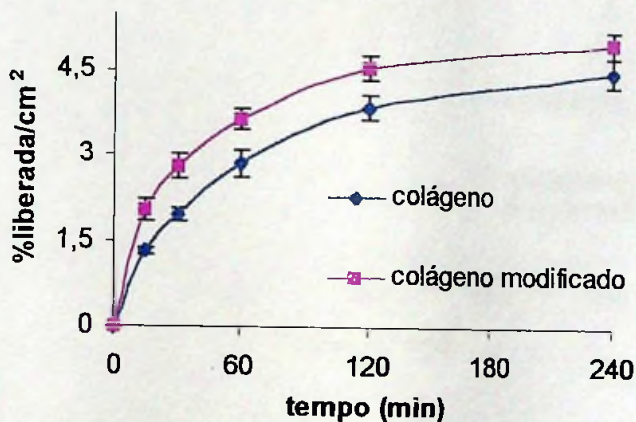


Figura 29. Perfil de liberação de paracetamol a partir de géis a 2% (p/V) de colágeno e colágeno modificado em célula de difusão.

Nos experimentos realizados no aparelho de dissolução, o gel obtido do colágeno modificado inicialmente reteve mais o fármaco que o gel de colágeno, mostrando diferença significativa para as amostras coletadas nos tempos 60 e 120 minutos. Porém, após cerca

de 180 minutos, a velocidade de liberação inverteu (figura 30). No tempo de 240 minutos, observou-se que apesar da amostra de gel de colágeno modificado reter menos paracetamol que a amostra de gel do colágeno não modificado, os resultados apresentaram diferenças não significativas para este ponto.

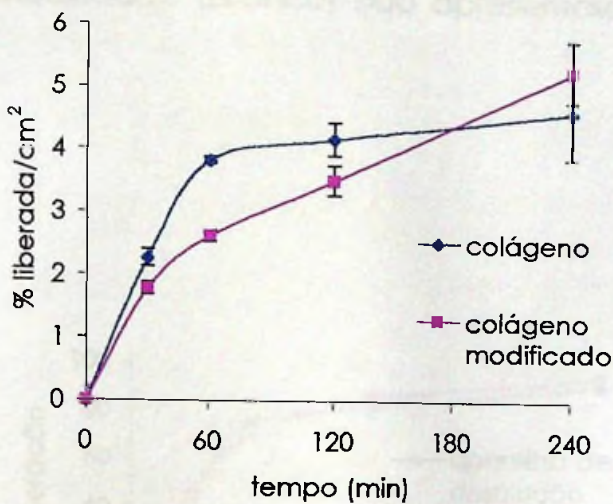


Figura 30. Perfil de liberação do paracetamol a partir de géis a 1% (p/V) de colágeno e colágeno modificado no aparelho de dissolução.

A figura 31 apresenta a comparação entre a liberação do paracetamol na célula de difusão e no aparelho de dissolução a partir de gel de colágeno a 1%. Pode-se observar que no tempo de 60, 120 e 240 minutos as amostras coletadas dos experimentos em célula de difusão e aparelho de dissolução não apresentaram % de

liberação de paracetamol com diferença significativa. Não houve diferença em relação à metodologia empregada, obtendo os mesmos valores para os dois tipos de experimentos, nos pontos analisados.

Os experimentos realizados apenas com o gel de colágeno e colágeno modificado (branco) não apresentaram absorvância em 243nm.

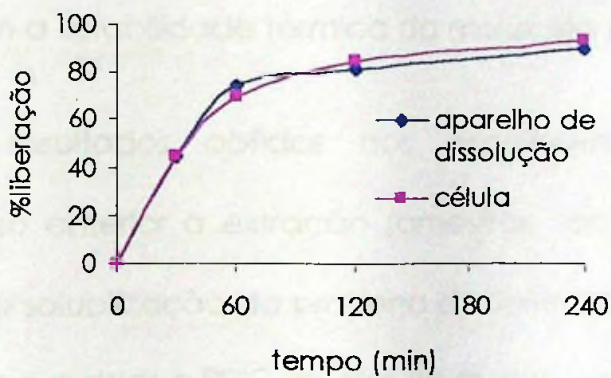


Figura 31. Perfil de liberação do paracetamol a partir de géis de colágeno a 1% (p/V) no aparelho de dissolução e na célula de difusão.

## 5. DISCUSSÃO

McPHERSON et al. (1986) demonstraram que a solubilidade de material colagenoso pode ser avaliada deixando amostras em tampão fosfato e aquecendo a uma temperatura de 45°C durante 30 minutos.

Quando o colágeno é aquecido, o rompimento de pontes de hidrogênio intramoleculares induz o encolhimento da fibra de colágeno, seguido de solubilização. As reticulações covalentes são responsáveis pela continuidade entre moléculas de colágeno e aumentam a estabilidade térmica da molécula (KOPP et al., 1989).

Os resultados obtidos nos experimentos realizados com glicosilação anterior a extração (amostras "ant"), pode-se observar que houve solubilização da proteína durante o período reacional das amostras aquecidas a 90°C, já que na etapa de homogeneização da fração sólida do material em ácido acético não foi possível se obter o gel.

Outro ponto a ser considerado foi que a amostra controle (90Cprot8), a qual foi incubada na ausência de açúcar, também não apresentou recuperação da proteína na fração sólida após o tempo de incubação, descartando portanto a hipótese que a ligação colágeno-açúcar tenha aumentado a solubilidade da molécula.

Pode-se citar outros indicativos da ocorrência da solubilização da proteína: 1) o escurecimento ocorreu na fração líquida do produto em reação; 2) os espectros de infravermelho obtidos das frações líquidas das amostras "ant" revelou as bandas características de proteína em questão.

A amostra aquecida na temperatura de 50°C (50ant72), apesar de ter sido submetida a um período reacional maior, apresentou solubilização parcial. Foi possível neste caso, se obter o gel a partir da fração sólida. Porém, para a caracterização da molécula modificada pela reação de Maillard, optou-se por analisar apenas as frações líquidas dos experimentos.

As amostras obtidas da reação de Maillard a partir do colágeno já extraído ("post") submetidas à temperatura de 50°C também se mostraram totalmente solúveis. É importante lembrar que as frações líquidas obtidas nos experimentos "ant" não foram tratadas com pepsina, portanto ainda possuem o telopeptídeo. Estes resultados podem sugerir que o colágeno com o telopeptídeo parece ser relativamente menos solúvel a 50°C que o colágeno pobre em telopeptídeo.

A molécula de colágeno em pHs próximos a neutralidade apresenta-se na forma de fibra insolúvel. A temperatura de

desnaturação da molécula pode ser modificada por alterações químicas. Segundo HSIU-O et al. (1997) os açúcares presentes no telopeptídeo são requisitos para a molécula de colágeno formar a estrutura tripla hélice, responsável pela organização da molécula na forma de fibra. Essas reticulações intermoleculares são importantes para a estabilidade da fibra.

Testes realizados com as amostras que se apresentaram solúveis durante a reação demonstraram que tais materiais não são mais capazes de se estruturarem na forma gel em pHs mais baixos, como a molécula do colágeno antes de ser solubilizada.

Com base nestes resultados optou-se em realizar os últimos experimentos em temperaturas mais brandas durante um maior período reacional e realizar a reação após extração do colágeno para evitar perda do material em duas frações.

No último experimento realizado (TApost720) não houve solubilização da amostra, apenas o intumescimento da fibra. Este material em pH ácido forma gel.

Os materiais obtidos pelas reações em temperaturas mais altas não formaram gel provavelmente devido a dois fatores:



a) desnaturação irreversível das moléculas aquecidas à temperatura de 90°C e conseqüentemente a perda da capacidade de estruturação tridimensional para a formação do gel.

b) a ligação da molécula de açúcar no  $\epsilon$ -amino grupo da lisina pode ter deixado as cadeias  $\alpha$  mais distantes, devido o impedimento estéreo imposto pela molécula do açúcar, não formando mais a estrutura de rede para estruturação do gel.

O opção a) pode ser comprovada, uma vez que o controle (experimento realizado sem o açúcar) também não formou gel.

A reação de Maillard é responsável pelo desenvolvimento de coloração marrom em proteínas submetidas a tratamento térmico na presença de açúcar redutor (HOFMANN, 1998).

O escurecimento causado na solução sugeriu a formação de compostos gerados pela reação entre o açúcar e a proteína, já que as amostras controles (90Cprot8 e 90Ccarb8), onde não existiam a proteína e o açúcar não apresentaram desenvolvimento de coloração.

Em relação à escolha do pH reacional, os resultados indicaram que o pH mais próximo da neutralidade aumenta a velocidade da reação. A amostra 90ant8 foi a que obteve escurecimento mais

acentuado, devido às condições drásticas de temperatura e o pH mais próximo da neutralidade. A amostra 90ant8-5 apesar de ter sido obtida em temperatura alta, o leve escurecimento sugeriu que o pH não favoreceu a reação, como já relatado por BOBBIO e BOBBIO (1992).

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida foi proposta para se avaliar o produto obtido após extração do colágeno do tendão bovino e o produto obtido da reação. Porém nas condições propostas inicialmente não houve revelação das bandas (resultados não apresentados). Com isso propôs-se que: 1º) ou a concentração da proteína aplicada foi muito baixa; 2º) ou a molécula formada possui massa molecular muito elevada para a malha utilizada nos ensaios, impossibilitando a entrada da molécula no gel; 3º) ou o material não estava sendo solúvel no pH e solventes necessários para a realização da técnica. Todas as hipóteses podem ter ocorrido concomitantemente.

Baseando-se nestas hipóteses, utilizou-se um agente solubilizante do material protéico (uréia-chaps) e aplicou-se uma concentração teórica de proteína maior. Os resultados sugeriram que a concentração aplicada anteriormente foi baixa, já que a amostra tratada sem o agente solubilizante apresentou-se tão nítida quanto a mesma amostra tratada com uréia-chaps.

A molécula de colágeno foi revelada, e suas bandas características foram apresentadas, demonstrando assim que a extração e purificação da molécula foi efetiva. Porém, na concentração de agente solubilizante colocada nestas amostras, não houve total solubilização da amostra TApóst720.

Os dados da literatura sugerem que os produtos resultantes da Reação de Maillard apresentam alta massa molecular e são insolúveis em solventes que destroem pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio (MITCHELL & HILL, 1995). Esta informação juntamente com a difícil solubilidade do material obtido (amostra TApóst720) durante preparação da amostra para aplicação no gel sugeriu que o material de alta massa molecular formado pode não estar sendo aplicado no gel. Apesar da solubilização parcial da amostra TApóst720, esta revelou as bandas  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . Outra observação é que as bandas  $\beta$  (as quais representam dímeros das cadeias  $\alpha$ ) e  $\gamma$  (as quais representam trímeros das cadeias  $\alpha$ ) desapareceram na amostra TApóst720. Este resultado pode sugerir que os resíduos de lisina presentes nestas cadeias polipeptídicas podem estar reagindo com o açúcar e possivelmente afastando as cadeias umas das outras.

Na posição 1 do gel homogêneo 7,5 observou-se formação de uma cauda, onde possivelmente tem-se várias bandas de cadeias

polipeptídicas de massas moleculares diversas, de difícil separação pela metodologia. Uma tentativa de otimização na separação destas possíveis bandas foi realizada utilizando o gel gradiente 4-15 (Figura 9, posição 1), sem qualquer melhora na resolução. Outra hipótese para o aparecimento desta cauda, seria açúcar residual da reação. É importante ressaltar que esta amostra (90ant8) foi aquecida a 90°C, temperatura esta que acelera a reação, formando, portanto produtos com diferentes pesos moleculares (MORALES & VAN BOEKEL, 1997).

A amostra 50ant72 não foi revelada no gel homogêneo 7,5 e mesmo depois com o aumento da concentração não houve aparecimento das bandas proteicas. Como no experimento 50ant72, a fração protéica não foi totalmente solubilizada, tem-se uma concentração protéica muito menor na fração líquida deste experimento, comparada com as demais amostras. Esta amostra apresentou-se diferente das demais em vários aspectos. Entre as frações líquidas analisadas apresentou o maior grau de ligação do açúcar e foi a única com coloração marrom-preto. Estes resultados sugerem que o material obtido nesta amostra pode representar a etapa final da reação. Outra característica que foi encontrada somente nesta amostra foi o desaparecimento da banda amida II no espectro de infravermelho.

Apesar das condições reacionais para obtenção da amostra 50ant72 ter apresentado maior grau de ligação, este material do ponto de vista tecnológico para obtenção de géis de liberação não parece ser interessante. O presente trabalho tem o objetivo de estudar a forma farmacêutica gel e após a reação nas condições estabelecidas para a amostra 50ant72, este material perdeu a capacidade de formar gel, tornando-se assim inviável ao estudo.

As demais amostras obtiveram grau de ligação com pouca variação. Porém, a importância deste teste foi para se comprovar a ligação do açúcar ao  $\epsilon$ -amino grupo da lisina. Não necessariamente a reação total será o melhor produto para o fim desejado. Materiais com características diferentes foram obtidos, porém é importante que o material permaneça com sua capacidade formadora de gel para que o sistema de liberação seja obtido. A amostra que foi obtida em condições mais amenas apresentou grau de ligação não muito alto, já que a velocidade reacional é dependente da temperatura. Porém, a amostra 1Apost720, a qual foi obtida em temperatura ambiente, apresentou grau de ligação similar a amostras obtidas em temperaturas maiores, tais como, a 50post72, 50post96 e 50post168. Esta amostra não perdeu sua capacidade formadora de gel.

Os resultados obtidos pela quantificação da hidroxiprolina serviram para expressar os resultados de fluorescência, já que estes devem ser expressos em fluorescência/massa de hidroxiprolina. A determinação da concentração do colágeno via hidroxiprolina também pode ser realizada para o material modificado.

STEFEK et al. (2000) demonstraram que o colágeno digerido por pepsina extraído de ratos diabéticos reagiram com p-dimetilaminobenzaldeído em condições ácidas produzindo um derivado colorido. O espectro do produto colorido teve absorção máxima em 572nm característico dos adutos de Ehrlich de p-dimetilaminobenzaldeído com pirróis e os valores aumentaram com o passar do tempo, sugerindo que com a idade há um aumento destes compostos. O envelhecimento do colágeno em ratos diabéticos está relacionado com o acontecimento "in vivo" da reação de Maillard.

KLETER et al. (1998) demonstraram a relação entre o aumento da fluorescência e a formação de compostos de Maillard em amostras de dentina com o processo de cárie. MALIK & MEEK (1996) estudaram a reação de Maillard entre o colágeno existente na córnea e a glicose pela espectroscopia de fluorescência.

Estudos realizados por SAJITHLAL et al. (1998) demonstraram o aumento da intensidade de fluorescência em colágeno incubado com glicose.

Observando os resultados, pode-se notar que a fluorescência vai aumentando durante o período reacional. Em pH neutro (amostra 90ant8) tem-se o aumento da produção de compostos fluorescentes até 3 horas de reação, com posterior aumento destes compostos após 6 horas de reação. Em pH mais baixo (5,0 – amostra 90ant8-5), o aumento da fluorescência é contínuo, porém menor que o da reação em pH neutro. Estes resultados sugerem que a velocidade da reação é maior em pH neutro e as amostras coletadas durante o experimento 90ant8 podem caracterizar as etapas da reação: indução e produção de compostos coloridos (no caso desta amostra após 6 horas de reação) (MORALES & VAN BOEKEL, 1997). Aparentemente o experimento realizado em pH 5,0 não ultrapassou a etapa de indução.

A concentração do açúcar livre possivelmente não interferiu nestes resultados, já que a fluorescência do açúcar é extremamente baixa em relação à da proteína (amostra 90Ccarb8).

Os resultados de fluorescência das amostras coletadas nos experimentos 50post96 e 50post72 (Tabela 5), onde o tempo

reacional e a concentração do açúcar foram diferentes, tem-se um discreto aumento da fluorescência na amostra 50post96, sugerindo que o tempo de reação foi importante para a produção de compostos fluorescentes. Outro ponto é a atividade da água. Segundo MORALES & VAN BOEKEL (1997) a velocidade máxima da reação ocorre em atividade da água entre 0,6 e 0,85. Concentrações mais altas de açúcar podem levar a um valor de atividade da água menor dificultando a reação, já que a atividade da água é um fator importante na velocidade da reação de Maillard.

Em relação aos espectros de infravermelho, KAMINSKA & SIONKOWSKA, (1996) afirmaram que as freqüências das bandas amida dependem da conformação do colágeno e quanto menor a ordem estrutural da proteína, menor a freqüência destas bandas amida. Segundo FRIESS & LEE (1996), a destruição da tripla hélice pode ser comprovada por infravermelho. A posição da banda amida II aparece em números de onda mais baixos quando a organização é aleatória ("random coil") se comparada com a bandas amida II de moléculas com estrutura em  $\alpha$ -hélice.

A Figura 11 mostrou que as bandas amida II do colágeno submetido a aquecimento não foi deslocada em relação ao colágeno sem tratamento térmico. O espectro do colágeno (Figura



11) mostrou as mesmas características de espectros de colágeno descritos pelos autores acima citados.

Como descrito nos resultados, a banda amida II do espectro da amostra 50ant72 desapareceu, sugerindo perda de vibração de torções -NH. A banda amida I deslocou-se para uma frequência menor sugerindo uma maior desorganização do sistema protéico. Como já foi mencionado anteriormente, esta amostra apresentou características diferentes das demais amostras de colágeno modificado.

A modificação da molécula pode ser caracterizada no aumento da intensidade na região de  $1015\text{cm}^{-1}$ , região esta onde açúcares possuem banda intensa (Figura 13).

Em relação aos resultados de análise termogravimétrica, pode-se sugerir que a temperatura altera a interação da molécula de água com a proteína. A amostra controle apresentou velocidade máxima na primeira etapa de perda de massa a uma temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$ .

Novamente a amostra 50ant72 demonstrou que sua modificação foi mais efetiva que as demais, sendo que sua velocidade máxima de perda de massa (provavelmente referente à desidratação) ultrapassou os  $100^{\circ}\text{C}$ , enquanto que as amostras 90ant8 e 50post72 apresentaram temperatura igual a  $88^{\circ}\text{C}$ . Estes

resultados sugerem que o colágeno modificado pela Reação de Maillard possui maior interação com a água. Mesmo a amostra TApost720, que nas demais metodologias apresentou-se com uma modificação menos intensa, mostrou um aumento na  $T_{max}$  do evento de desidratação da molécula. Em relação a estabilidade térmica, os resultados sugerem que as amostras COL, 90Cprot8 e TApost720 apresentaram maior estabilidade, já que a perda de massa no segundo evento foi bem menor nestas amostras do que nas amostras com um maior grau de ligação.

Os resultados de termogravimetria podem ser discutidos em relação ao comportamento reológico do gel de colágeno modificado (TApost720). O gel obtido da molécula modificada através da introdução do açúcar apresentou uma viscosidade maior quando comparada ao colágeno original.

Em dispersões poliméricas é comum o comportamento pseudoplástico e as interações com a água ou entre cadeias podem ocorrer, alterando o perfil reológico do material. A organização tridimensional das moléculas poliméricas fazem com que o material possa interagir e estabelecer pontes de hidrogênio ou ligações intramoleculares e reticulações (FLORENCE E ATWOOD, 2003). Quando a dispersão encontra-se em repouso (estado isotrópico) a microestrutura do sistema encontra-se sem orientação (as moléculas

se arranjam de maneira aleatória). A medida que o sistema começa a fluir torna-se anisotrópico, ou seja, as moléculas passam a ter uma orientação preferencial.

A organização dos elementos estruturais determina o modo que o material flui. A aplicação contínua de cisalhamento destrói interações e conseqüentemente a viscosidade aparente diminui com o aumento da tensão de cisalhamento.

Geralmente a anisotropia é aumentada com a razão de fluxo e acompanha aumento da tensão de cisalhamento. Os géis de colágeno apresentam comportamento viscoelástico, ou seja, quando estão em repouso comportam-se como semi-sólidos, mas quando submetidos a pressão possuem bom fluxo (WALLACE & ROSENBLATT, 2003).

Partículas anisotrópicas (ou macromoléculas) em um líquido podem formar um grupo anisotrópico maior, mas de modo geral se suas orientações são aleatórias, o líquido permanece isotrópico. O colágeno é um exemplo de partícula anisotrópica.

Quando se diminui a tensão aplicada sobre a estrutura, esta pode ou não se reorganizar imediatamente. A energia recuperada pode ser associada com a formação da estrutura a qual está identificada com a elasticidade do material e a energia dissipada na

formação do fluxo ou deformação está associada a viscosidade. A tensão de cisalhamento, devido ao fluxo, causa uma reorganização anisotrópica da microestrutura do sistema. Se a recuperação for imediata, as curvas ascendente e descendentes do reograma coincidem, sobrepondo-se. Porém, se a estrutura não se recupera instantaneamente, apresentará valores de tensão inferiores para cada valor de gradiente de cisalhamento em relação a curva ascendente (LACHMAN et al., 2001).

Na temperatura de 25°C, os géis apresentaram comportamento independente do tempo, sugerindo que as interações moleculares são rapidamente reorganizadas na temperatura em questão quando diminui a tensão aplicada (figura 20). A figura 21 mostra o perfil reológico para os materiais testados a 37°C, na qual os resultados sugerem que nesta temperatura as interações existentes em ambos os materiais não se recuperam imediatamente após a diminuição da tensão, gerando a tixotropia do sistema. Este fato provavelmente se deve a energia térmica dada ao sistema que contribui com a desorganização do mesmo e conseqüentemente dificulta sua reorganização.

A aplicação de uma tensão de cisalhamento a sistemas poliméricos causa uma deformação com uma determinada dificuldade, mas, uma vez iniciada a deformação, torna-se

progressivamente mais fácil o fluxo com o aumento de tensão aplicada. A natureza das interações, bem como a quantidade das mesmas tem influência sobre a tensão necessária para a desorganização do sistema (deformação). Com isso, o valor de cedência traz informações relativas a tensão necessária para desorganizar este sistema, levando a indícios da quantidade relativa e natureza de interações existentes no sistema estudado (LACHMAN et al. , 2001).

É possível perceber que as interações no colágeno modificado foram maiores que na molécula original, já que o valor de cedência na temperatura de 25°C foi muito maior que o da molécula original, ou seja, nesta temperatura a organização da molécula de colágeno modificado possui maior número de interações ou interações mais resistentes a tensões em relação a molécula original. HO et al. (2001) demonstraram que existe uma correlação entre o grau de reticulação do colágeno tratado com glutaraldeído e a viscosidade do gel formado.

Já na temperatura de 37°C, essas interações possivelmente são alteradas pela própria temperatura, proporcionando um valor de cedência idêntico ao colágeno não modificado.

O aumento da viscosidade do polímero modificado é um ponto importante para a formação de um sistema de liberação de fármacos eficiente, já que um dos mecanismos de liberação de fármacos é por intumescimento do material polimérico. Quanto maior a viscosidade do sistema intumescido, maior o tempo de retenção do fármaco no sistema. Como era esperado, a introdução do polissacarídeo na molécula de colágeno aumentou a viscosidade do gel, mesmo na temperatura de 37°C.

Os géis obtidos do colágeno original e do modificado não apresentaram retenção do fármaco por tempo prolongado. Todas as amostras ensaiadas apresentaram até 240 minutos liberação superior a 90%.

A escolha do paracetamol como fármaco modelo foi devido a sua solubilidade em ampla faixa de pH e por ser uma molécula de massa molecular pequena. Apesar do paracetamol não ser uma molécula do ponto de vista farmacológico interessante para sistemas de liberação, muitos autores optam em utilizá-la como modelo, pois sua quantificação é simples, e como já mencionado anteriormente, representa um fármaco pequeno com solubilidade adequada.

Os sistemas foram obtidos através do intumescimento prévio do gel com posterior adição do paracetamol. Como o intumescimento

se deu anteriormente a incorporação do fármaco, este provavelmente deve estar dissolvido no solvente utilizado para intumescer o polímero, facilitando assim a sua liberação.

MAEDA et al. (1999) estudaram a liberação de soro albumina humana de três diferentes sistemas colagenosos demonstrando que o tipo de sistema interfere diretamente na liberação do fármaco. Filmes e esponjas de colágeno liberam a macromolécula em tempo curto, ao passo que minigrânulos de colágeno conseguem reter a metade da proteína por um período superior a 24 horas. A liberação gradual de minigrânulos ocorreu pela estrutura densa da matriz que é mantida após intumescimento, já que nesta apresentação as fibras de colágeno apresentaram-se mais empacotadas e exibiram menor intumescimento que esponjas e filmes. A liberação inicial foi relativamente pequena devido a menor velocidade de intumescimento e a área superficial ser menor que nas duas outras formulações.

A proposta de sistemas de liberação que apresentem menor taxa de intumescimento e estruturas mais densas parece ser o caminho para obtenção de liberação sustentada de fármacos.

Segundo WALLACE & ROSENBLATT (2003) as soluções ácidas de colágeno, quando submetidas a condições fisiológicas (pH, força

iônica e temperatura) por um período de uma hora formam um gel de colágeno translúcido, firme, mas friável em condições de estresse.

Em temperaturas maiores que 20°C, as fibrilas de colágeno começam a se organizar dependendo do meio em que se encontram. As fibrilas apresentam formação similar a que ocorre no sistema biológico. Estas mudanças conformacionais da molécula são dependentes de pH, força iônica e temperatura e são direcionadas por forças hidrofóbicas e eletrostáticas. A estruturação da fibrila é um processo entropia-dirigido que diz respeito a perda da interação colágeno-solvente (SILVA et al., 2001).

Nos experimentos realizados no presente trabalho, após 240 minutos de ensaio, os géis de colágeno e colágeno modificado apresentaram-se homogêneos, firmes e opacos. Sob a temperatura e pH experimental pode ter ocorrido um rearranjo das fibras dos polímeros e géis isentos de fluidez foram formados. É importante ressaltar que durante o período do experimento, provavelmente houve a mudança gradativa do pH do compartimento doador (ácido inicialmente), que lentamente foi neutralizado pelo sistema tampão fosfato pH 7,4.

Nos experimentos realizados, os primeiros 60 minutos dos ensaios, foi obtido uma maior velocidade de liberação do



paracetamol, diminuindo a velocidade após este período, ou seja, o fármaco foi liberado do sistema antes do gel adquirir consistência (antes da reorganização do sistema). Com isso, pode-se propor um novo sistema de liberação, no qual a reorganização estrutural poderá ocorrer antes do experimento de liberação, isto é, durante o preparo da amostra. Neste caso, o material poderá ser potencialmente um sistema de maior retenção do fármaco em relação ao sistema anterior.

Em relação a concentração do colágeno no sistema de liberação, percebeu-se que com o aumento da concentração do polímero, houve um retardo na liberação do paracetamol, sugerindo que concentrações maiores poderiam apresentar resultados mais eficientes no controle da liberação.

Nos experimentos realizados em aparelho de dissolução, pode-se observar que o gel contendo 1% de colágeno modificado apresentou maior poder de retenção do fármaco que o gel do colágeno sem modificação na mesma concentração. Este resultado foi invertido nos géis a 2%(p/V). Estes resultados sugerem que concentrações maiores do polímero modificado podem dificultar o arranjo tridimensional do mesmo, diminuindo seu potencial de retenção do fármaco. Já para os géis de colágeno, o aumento da

concentração polimérica mostrou-se interessante, pois houve aumento no poder de retenção do fármaco em géis a 2% (p/V).

Uma possível explicação para tal fenômeno seria que as fibras de colágeno devem se acomodar de maneira mais eficiente e o paracetamol poderá ficar retido por mais tempo. A molécula de colágeno modificado, em dispersões mais concentradas, pode apresentar uma estrutura menos organizada e isso pode dificultar a estruturação do sistema, deixando o paracetamol mais livre para ser liberado. Em outros trabalhos onde o colágeno também se mostrou ineficiente para a retenção dos fármacos por tempo prolongado, os pesquisadores relatam que isso ocorreu provavelmente devido ao rápido intumescimento da amostra e/ou a facilidade de difusão do fármaco através do sistema por causa da porosidade do sistema (WACHOL-DREWEK et al., 1996; OGAWA E PEPLIS, 2002).

Outra proposta para elucidar a liberação do fármaco utilizado como modelo (paracetamol), é que este pode interagir com a molécula de colágeno. Nos géis com concentração de 2%(p/V), as formulações com colágeno apresentaram maior porcentagem de retenção que o colágeno modificado. Provavelmente, a inclusão do polissacarídeo na molécula de colágeno pode ter formado um gel com interações mais fracas ou indisponibilizado sítios de interação do

polímero com o fármaco, deixando o fármaco mais livre e facilitando a liberação do mesmo. A medida que se aumenta a concentração do polímero, o paracetamol terá mais sítios para se ligar ao colágeno, invertendo o poder de retenção dos polímeros. Segundo MAEDA et al. (1999), a afinidade de fármaco com o colágeno pode influenciar o perfil de liberação do mesmo. Os resultados sugerem que o paracetamol possui uma interação maior com o colágeno quando comparado com o colágeno modificado.

Outro ponto a ser discutido em relação aos trabalhos já publicados é que alguns ensaios de liberação de fármacos de sistemas colagenosos que apresentaram tempo de liberação prolongado foram realizados em temperaturas diferentes da temperatura corporal. FUJIOKA et al. (1995) estudaram a liberação da molécula de interferon a partir de minigrânulos de colágeno à temperatura ambiente. SINGH et al. (1995) também realizaram os estudos de liberação de polilisina a partir de matrizes de colágeno a 25°C. Como já discutido neste trabalho, a temperatura influencia diretamente o arranjo das moléculas e conseqüentemente altera a retenção do fármaco. Além disso, temperaturas diferentes de 37°C não mimetizam sistemas biológicos e descredenciam o sistema para o objetivo da liberação do fármaco.

## 6. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Em temperaturas reacionais maiores que 50°C ocorre solubilização da molécula de colágeno pobre em telopeptídeo.
2. A amostra que obteve maior grau de modificação foi a amostra 50ant72. Porém, para o objetivo deste trabalho, a modificação intensa da molécula parece não ser adequada, devido a perda da estrutura tridimensional formadora de gel que a molécula de colágeno apresenta.
3. Portanto, as condições experimentais definidas para obtenção do material formador de gel foram:
  - a. pH 7,4
  - b. temperatura 30°C
  - c. reação posterior a extração e purificação da proteína.
4. Os resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida e a espectroscopia de infravermelho sugerem que a molécula do colágeno foi extraída e purificada de forma adequada.
5. Através dos espectros de infravermelho, da espectroscopia de fluorescência, dos resultados de determinação do grau de

ligação da molécula e da análise termogravimétrica pode-se sugerir que a reação ocorreu.

6. O perfil reológico do material modificado mostrou mais resistente a tensão do que o material original a 25°C.
7. A forma farmacêutica gel não se mostrou eficiente para a retenção de fármacos por períodos maiores que 240 minutos nas condições propostas de produção e ensaio (temperatura 37°C e pH 7,4).

## REFERÊNCIAS

AMES, J. M. Applications of Maillard reaction in the food industry. **Food Chem.**, v. 62 (4), p. 431-439, 1998.

BALTES, W. Chemical changes in food by the Maillard reaction. **Food Chem.**, v. 9, p. 59-73, 1982.

BAXTER, J.H. Free amino acid stability in reducing sugar systems. **J. Food Sci.**, v.60, n.2, p.405-408, 1995.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos** 2.ed. São Paulo: Unicamp, 1992.

BODMEIER, R. & PAERATAKUL, O. Mechanical properties of dry and wet cellulosic and acrylic films prepared from aqueous colloidal polymer dispersions used in the coating of solid dosage forms. **Pharm. Res.**, v. 11 (6), p. 882-888, 1994.

BODMEIER, R.; WANG, J. Microencapsulation of drugs with aqueous colloidal polymer dispersions. **J. Pharm. Sci.**, v.82, p. 191-194, 1993.

BYLER, D. M.; SUSI, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. **Biopolymers**. v. 25, p. 469-487, 1986.

CANEVAROLO JR., S.V. **Ciência dos Polímeros**. São Paulo: Ed. Artliber, 2002, 183p.

CARDOSO; J.C. **Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação Físico-Química de Filmes de Caseína Modificada através da Reação de Maillard**. 1999. 76p. Dissertação de Mestrado apresentada - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

CHECK, W. A. New drugs and drug delivery systems in the year 2000. **Am. J. Hosp. Pharm.** v.41, p.1536-1547, 1984.

CHEN, Y.; WILLMOTT, N.; ANDERSON, J. & FLORENCE, T., J. Comparison of albumin and casein microspheres as a carrier for doxorubicin. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 39, p. 978, 1987.

DAS, S.K.; DAS, N.G. Preparation and in vitro dissolution profile of dual polymer (Eudragit™ RS 100 and RL 100) microparticles of diltiazem hydrochloride. **J. Microencapsulation**, v.15, p.445-452, 1998.

DE CARVALHO, J.S.; DE FREITAS, O.; PEREIRA, N.L.; COLLETT, J.H. The potential use of casein as a film coating material. **Pharm. Res.**, v. 12, n. 9, p. S214, 1995.

DeLUSTRO, F; CONDELL, R.A.; NGUYEN, M.A.; McPHERSON, J.M. A Comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. **J. Biomed. Mater. Res.** v. 20, p. 109-120, 1986.

DEYL, Z.; MIKSÍK, I. Advanced separation methods for collagen parent  $\alpha$ -chains, their polymers and fragments. **J. Chromatography B.** v. 739, p. 3-31, 2000.

DONG, A.; HUANG, P.; CAUGHEY, W. S. Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. **Biochemistry.** v. 29, p. 3303-3308, 1990.

DONG, A.; PRESTRELSKI, S. J.; ALLISON, S. D.; CARPENTER, J. F. Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation. **J. Pharm. Sci.** v. 84, n. 4, p. 415-424, 1995.





EL-KAMEL, A.; SOKAR, M.; NAGGAR, V.; AL GAMAL, S. Chitosan and Sodium Alginate-Based Bioadhesive Vaginal Tablets.

**AAPS PharmSci.**, v. 4 (4): artigo 44 , p.1-7, 2002.

ELGAWISH, A.; GLOMB, M.; FRIEDLANDER, M.; MONNIER, V.M. Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose *in vitro* and *in vivo*. **Glycobiology**, v. 271 (22), p. 12964-12971, 1996.

ELLINGSWORTH, L.R.; DeLUSTRO, F.; BRENNAN, J.E.; SAWAMURA, S.; McPHERSON, J.M. The human response to reconstituted bovine collagen. **J. Immunol.** v. 136, p. 877-882, 1986.

FARMACOPEIA PORTUGUESA, 7ed. Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, Lisboa, 2000.

FINOT, P.A.; MAURON, J. Le blocage de la lysine par la réaction de Maillard I. Synthèse de N-(désoxy-1-D-fructosyl-1)-et N- (désoxy-1-D-lactulosyl-1)- L-lysines. **Helv. Chim. Acta** ,v. 52, n. 6, p. 1488-1494, 1969.

FLORENCE, A.T.; ATWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia.** São Paulo, EDUSP, 2003, p.413-424.

FRANGNE, R.; ADRIAN, J. La réaction de Maillard 6. Réactivité de diverses protéines purifiées. **Ann. Nutr. Alim.**, v. 26, p. 97-106, 1972.

FREIBERG, S.; ZHU X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. **Int. J. Pharm.**, v. 282, p. 1-18, 2004.

FRIESS, W. Collagen - biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 113-136, 1998.

FRIESS, W.; LEE, G. Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices. **Biomaterials**, v. 17, p. 2289-2294, 1996.

FUJIOKA, K.; TAKADA, Y; SATO, S.; MIYATA, T. Novel delivery system for proteins using collagen as a carrier material: the minipellet. **J. Contr. Rel.** v. 33, p. 307-315, 1995.

FUJIWARA, K.; MAEDA, M.; HOJO, T.; SANO, A. Protein release from collagen matrices. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** v. 31, p. 247-266, 1998.

FURNISS, D. E. The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat. **British Journal of Nutrition**, v. 62, p. 739-749, 1989.

GILBERT, D. L.; KIM, S. W. Macromolecular release from collagen monolithic devices. **J. Biomed. Mater. Res.** v. 24, p. 1221-1239, 1990.

GILSENAN, P. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Shear creep of gelatin gels from mammalian and piscine collagens. **Int. J. Biological Macromolecules**, v. 29, p. 53-61, 2001.

GIRAUD-GUILLE, M-M.; BESSEAU, L.; CHOPIN, C.; DURAND, P.; HERBAGE, D. Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. **Biomaterials**, v. 21, p. 899-906, 2000.

GLATTHOR, A.; SCHWEIZER, D. Rheological lab testing of building formulations. **Contruction Chemistry (ConChem Conference)**, 1994.

GLIKO-KABIR, I.; YAGEN, B.; PENHASI, A.; RUBINSTEIN, A. Low swelling, crosslinked guar and its potential use as colon-specific drug carrier. **Pharm. Res.**, v. 15 (7), p. 1019-1025, 1998.

GONDALIYA, D.; PUNDARIKAKSHUDU, K. Studies in formulation and pharmacotechnical evaluation of controlled release transdermal delivery system of bupropion. **AAPS PharmSci Tech**, v.4 (1), article 3, 2003

GÖPFERICH, A. Bioerodible implants with programmable drug release. **J. Contr. Release**, v.44, p.271-281, 1997.

GORHAM, S. D. Collagen. In: Byrom, D. **Biomaterials**. New York: Stockton Press, 1991. p. 55-122.

GRATZER, P. F.; PEREIRA, C. A.; LEE, J. M. Solvent environment modulates effects of glutaraldehyde crosslinking on tissue-derived biomaterials. **J. Biomedical Mat. Res.** v. 31, p.533-543, 1996.

GREGORIADIS G. Targeting of Drugs., **Nature**, v. 265 (3), p. 407-411, 1977.

HABEEB, A. F. S. A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 14, p. 328-336, 1966.

**HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS**. The Pharmaceutical Society of Great Britain (Pub), London, England;p. 215, 1986.

HERNANDES, J.M.M.; De FREITAS, O.; PEREIRA, N.L. The potential use of casein and modified casein as matrix delivery systems. **Boll. Chim. Farm.**, v. 137, p. 362, 1998.

HODGE, J. E. Dehydrated foods: Chemistry of browning reactions in model systems. **J. Agric. Food Chem.** , v. 1, p. 928-943, 1953.

---

HOFFMAN, A.S. Hydrogels for medical applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.43, p.3-12, 2002.

HOFMANN, T. Studies on the relationship between molecular weight and color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose/amino acid and glucose/protein solutions by using ultracentrifugation and color dilution techniques. **J. Agric. Food. Chem.** v. 46(10), p. 3891-3895, 1998.

HO, H-O.; LIN, L-H.; SHEU, M-T. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as drug carrier. **J. Contr. Rel.** v. 44 (2-3), p. 103-112, 1997.

KAKADE, M. L., LIENER, I. E. Determination of available lysine in proteins. **Anal. Bioch.**, v. 27, p. 273-80, 1969.

KAKOULIDES, E.P.; SMART, J.D.; TSIBOUKLIS, J. Azocrosslinked poly(acrylic acid) for colonic delivery and adhesion specificity: in vitro degradation and preliminary ex vivo bioadhesion studies. **J. Contr. Rel.**, v.54, p.95-109., 1998.

KAMINSKA, A.; SIONKOWSKA, A. Effect of UV irradiation on the infrared spectra of collagen. **Polymer Degradation and Stability**, v. 51, p.19-26, 1996.

KATO, A.; MIFURU, R.; MATSUDOMI, N.; KOBAYASHI, K. Functional casein-polysaccharide conjugates prepared by controlled dry heating. **Biosci. Biotech. Biochem.** v. 56, p. 567-571, 1992.

KLETER, G.A.; DAMEN, J.J.M.; BUIJS, M.J.; TEN CATE, J.M. Modification of amino acid residues in carious dentin matrix. **J. Dent. Res.** v.77(3), p.488-495, 1998.

KOPP, J.; BONNET, M.; RENO, J. P. Effect of collagen crosslinking on collagen-water interactions (a DSC investigation). **Matrix**, v. 9, p. 443-450, 1989.

KUMAR, M.N.V.R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** v.3(2), p. 234-258, 2000.

LACHMAN, L.; LIEDERMAN, H.A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian v.1., p. 211-253, 2001.

LANGER, R.; CIMA, L.G. ; TAMADA, J.A.; WINTERMANTEL, E. Future directions in biomaterials. **Biomaterials**, v. 11, p. 738-745, 1990.

LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **Int. J. Pharm.** v.221, p.1-22, 2001.

LEVY, M-C.; LEFEBVRE, S.; RAHMOUNI, M.; ANDRY, M-C.; MANFAIT, M. Fourier transform infrared spectroscopic studies of human serum albumin microcapsules prepared by interfacial cross-linking with terephthaloylchloride: influence of polycondensation pH on spectra and relation with microcapsule morphology and size. **J. Pharmac. Sci.** v. 80, n. 6, p. 578-585, 1991.

LOFTHOUSE, S.; NAGAHARA, S.; SEDGMEN, B.; BARCHAM, G.; BRANDON, M.; SANO, A. The application of biodegradable collagen minipellets as vaccine delivery vehicles in mice and sheep. **Vaccine**, v. 19, p. 4318-4327, 2001.

LONSDALE, H.K., Review: The Growth of Membrane Technology., **J. Memb. Sci.**, v. 10, p. 81-181, 1982.

LÓPEZ, C.R.; BODMEIER, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. **J. Contr. Release**, v. 44, p. 215-225, 1997.

MA, C.-Y.; HARWALKAR, V. R. Effects of medium and chemical modification on thermal characteristics of  $\beta$ -lactoglobulin. **J. Thermal Analysis**, v.47, p. 1513-1525, 1996.

MAEDA, M., TANI, S., SANO, A.; FUJIOKA, K. Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. **J. Controlled Release**, v. 62, p. 313-324, 1999.

MALIK, N.S.; MEEK, K.M. Vitamins and analgesics in the prevention of collagen ageing. **Age and Ageing**.v. 25, p. 279-284, 1996.

MANDAOGADE, P.M.; SATTURWAR, P.M.; FULZELE, S.V.; GOGTE, B.B.; DORLE, A.K. Rosin derivatives: novel film forming materials for controlled drug delivery. **Reactive & Functional Polymers**, v. 50, p. 233-242, 2002.



MARTINS, S.I.F.S.; JONGEN, W.M.F.; van BOEKEL, M.A.J.S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 11, p. 364-373, 2001.

McGOOKIN, B. J.; AUGUSTIN, M-A. Antioxidant activity of casein and Maillard reaction products from casein-sugar mixtures. **J. Dairy Res.** V. 58, p. 313-320, 1991.

McPHERSON, J.M.; LEDGER, P.W.; SAWAMURA, S.; CONTI, A.; WADE, S.; REIHANIAN, H.; WALLACE, D.G. The preparation and physicochemical characterization of an injectable form of reconstituted, glutaraldehyde cross-linked, bovine corium collagen. **J. Biomedical Mat. Res.** V. 20, p. 79-92, 1986.

MEADE, K.R.; SILVER, F.H. Immunogenicity of collagenous implants. **Biomaterials**, v.11, p.176-180, 1990.

MITCHELL, J. R.; HILL, S. E. The use and control of chemical reactions to enhance the functionality of macromolecules in heat-processed foods. **Trends Food Sci. Tech.**, v.6, p.219-224, 1995.

MORALES, F. J.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: fluorescence accumulation. **Int. Dairy J.** V. 7 (11), p. 675-683, 1997.

OGAWA, C.A.; PEPLIS, A.M.G. Liberação *In Vitro* de Cloridrato de Ciprofloxacina em Compósitos Hidroxiapatita:Colágeno. **Polímeros**, v.12(2), p.115-122, 2002.

NETZ, P.A; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de Físico-Química**. Porto Alegre : Editora Artmed, 2002.

PARRIS, N.; COFFIN, D. R.; JOUBRAN,R. F.; PESSEN, H. Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films. **J. Agric. Food Chem.**, 43, p. 1432-1435, 1995.

PHINNEY, R. B.; SCHWARTZ, S. D., LEE, D. A.; MONDINO, B. J. Collagen-shield delivery of gentamicin and vancomycin. **Arch. Ophthalmol.** V. 106, p.1599-1604, 1988.

POZNANSKY M.J., JULIANO R.L., Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs: a Critical Review, v. 36 (4), p. 277-236, 1984.

ROCHDI, A.; FOUCAT, L.; RENO, J. P. Effect of thermal denaturation on water-collagen interactions: NMR relaxation and differential scanning calorimetry analysis. **Biopolymers**, v. 50 (7), p. 690-696, 1999.

SAARINEN-SAVOLAINEN, P.; JÄRVINEN, T.; TAIPALE, H.; URTI, A. Method for evaluating drug release from liposomes in sink conditions. **Int. J. Pharm.** V.159, p.27-33, 1997.

SÁNCHEZ, A. C.; POPINEAU, Y.; MANGAVEL, C.; LARRÉ, C.; GUÉGUEN, J., Effect of different plasticizers on the mechanical and surface properties of wheat gliadin films. **J. Agric. Food Chem.** V.46, p. 4539-4544, 1998.

SANTINHO, A.J.P.; PEREIRA, N.L.; FREITAS, O.; COLLETT, J.H. Influence of formulation on physicochemical properties of casein microparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 186, p. 191-198, 1999.

SAJITHLAL, G.B.; CHITHRA, P.; CHANDRAKASAN, G. Advanced glycation end products induced crosslinking of collagen in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1407, p.215-224, 1998.

SILVA, C.C.; PINHEIRO, A.G.; THOMAZINI, D.; GÓES, J.C.; FIGUEIRÓ, S.D.; PAIVA, J.A.C.; SOMBRA, A.S.B. Effect of the pH on the piezoelectric properties of collagen films. **Mat. Sci. Eng.**, v.B83, p. 165-172, 2001.

Singh, 1995

SIONKOWSKA, A. Photochemical transformations in collagen in the presence of melanin. **J. Photochemistry nad Photobiology A : Chemistry**, v. 124, p. 91-94, 1999.

SOUSA, M. H. **Estudos de incorporação e liberação de antibióticos em membranas de colágeno**. 1998. 63p. Dissertação de Mestrado apresentada – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

SPADARO, A.C.C., DRAGHETTA, W., DEL LAMA, S., CAMARGO, A.C.M., GREENE, L.J. A convenient manual trinitrobenzenesulfonic acid method for monitoring amino acids and peptides in chromatographic column effluents. **Anal. Biochem.**, v.96, p. 317-321, 1979.

SRIVASTAVA, S.; GORHAM, S. D.; FRENCH, D. A.; SHIVAS, A. A.; COURTNEY, J. M. In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite

films and sponges as candidate biomaterials. **Biomaterials**. v. 11, p. 155-161, 1990.

STEFEK, M.; GAJDOSIK, A.; GADJOSIKOVA, A.; KRIZANOVA, L. p-dimethylaminobenzaldehyde-reactive substances in tail tendon collagen of streptozotocin-diabetic rats: temporal relation to biomechanical properties and advanced glycation endproduct (AGE)-related fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1502, p. 398-404, 2000.

STEFFEN, C.; TIMPL, R.; WOLFF, I. Immunogenity and specificity of collagen. V. Demonstration of three different antigenic determinants on calf collagen. **Immunology**, v.15, p.135-144, 1968.

SUNG, H-W.; SHIH, J-S; HSU, C-S. Crosslinking characteristics of porcine tendons: Effects of fixation with glutaraldehyde or epoxy. **J. Biomedical Mat. Res.** v. 30, p. 361-367, 1996a.

SUNG, H-S.; HSU, C-S.; LEE, Y-S.; LIN, D-S. Crosslinking characteristics of an epoxy-fixed porcine tendon: Effects of pH, temperature, and fixative concentration. **J. Biomedical Mat. Res.** v. 31, p. 511-518, 1996b.

- TIWARI, S.B.; MURTHY, T.K.; PAI, M.R.; MEHTA, P.R.; CHOWDARY, P.B. Controlled release formulation of tramadol hydrochloride using hydrophilic and hydrophobic matrix system. **AAPS PharmSci Tech**, v. 4 (3), article 31, p.1-9, 2003.
- TOMASULA, P.M.; PARRIS, N.; YEE, W.; COFFIN, D. Properties of films made from CO<sub>2</sub>-precipitated casein. **J. Agric. Food Chem.** v.46, p.4470-4474, 1998.
- UNTERMAN, S. R.; ROOTMAN, D. S.; HILL, J.M., PARELMAN, J. J.; THOMPSON, H. W.; KAUFMAN, H. E. Collagen shield drug delivery: therapeutic concentrations of tobramycin in the rabbit cornea and aqueous humour. **J. Cataract Refract Surg.** v. 14, p. 500-504, 1998.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA – USP. 24 ed. Rockville: US Pharmacopeial Convention, 2000.
- VAN BOEKEL, M. A. J. S. Effect of heating on Maillard reactions in milk. **Food Chem.**, v.62, n.4, p. 403-414, 1998.
- VAN DEN MOOTER, G.; SAMYN, C.; KINGET, R. Characterization of colon-specific azo polymers: A study of the swelling properties and the

permeability of isolated polymer films. *Int. J. Pharm.*, v. 111, p.127-136, 1994.

VERAART, J.R.; KOK, S.J.; te KOPPELE, J.M.; GOOIJER, C.; LINGEMAN, H.; VELTHORST, N.H.; BRINKMAN, U.A.Th. Capillary electrophoresis of the collagen crosslinking HP and LP utilizing absorbance, wavelength-resolved laser-induced fluorescence and conventional fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**, v.12, p.226-231, 1998.

VIEIRA, D. C. **Estudos da liberação da rolitetraciclina suportada em gel injetável de colágeno aniônico : ransana** 1997. 61p. Dissertação de Mestrado apresentada – Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

WACHOL-DREWEK, Z; PFEIFFER, M.; SCHOLL, E. Comparative investigation of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin. **Biomaterials**, v.17, p. 1733-1738, 1996.

WAKERLY , Z.; FELL, J.T.; ATTWOOD, D.; PARKINS, D. Studies on drug release from pectin/ ethycellulose film-coated tablets: a potential colonic delivery system. *Int. J. Pharm.*, v.153, p. 219-224, 1997.

WALLACE, D.G.; ROSENBLATT, J. Collagen gel system for sustained delivery and tissue engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.55, p.1631-1649, 2003.

WATTS, A.; WILSON, C.G.; DAVIES, M.C.; MELIA, C.D. Radiolabelling of polymer microspheres for scintigraphic investigations by neutron activation. 4 A pharmacoscintigraphic study of colon-targeted Eudragit RS-sulphapyridine microspheres in human volunteers. **Int. J. Pharm.**, v.102, p. 101-108, 1994.

WILLMOTT, N.; MAGEE, G.A.; CUMMINGS, J.; HALBERT, G.W & SMYTH, J.F. Doxorubicin - Loaded casein microspheres: Protean Nature of Drug Incorporation. **J. Pharm. Pharmacol.** v.44, p.427, 1992.

WILLMOTT, N.; CHEN, Y.; GOLDBERG, J.; MCARDLE, C. & FLORENCE, A.T. Biodegradation Rate of Ebozized Protein Microspheres in Lung, Liver and Kidney of rats. **J. Pharm. Pharmacol.** v.41, p. 433, 1989.

WOESSNER Jr., J.F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportion of this imino acid. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.93, p.440-447, 1961.