

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS ACELULARES DE
COLÁGENO DERIVADAS DE PERICÁRDIO PORCINO PARA USO
EM ENGENHARIA DE TECIDO**

Fabiana Tessari Rodrigues

**Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências (Química Analítica).**

Orientadora: Prof. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2011

DEDICATÓRIA

A DEUS, por ter me iluminado nos momentos difíceis da vida, principalmente na fase final deste trabalho.

Aos meus pais Luiz Fernando e Nely e à minha irmã Fernanda, pelo apoio, incentivo, amor, carinho e compreensão.

À minha sobrinha e afilhada Sofia, pelos momentos de descontração e por me lembrar de como é bom ser criança.

Ao meu grande amor Daniel, pelo companheirismo, amor, paciência, compreensão e por me fazer feliz.

Aos meus avós Durvalina e Alcides, pelo amor e compreensão nos momentos em que estive ausente.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis, pela orientação, incentivo e amizade durante a realização deste trabalho.

À Virginia C. A. Martins pelos momentos de descontração, amizade, incentivo, e auxílio na elaboração deste trabalho.

Às amigas Marília e Thelma pela amizade incondicional e por sempre estarem dispostas a me ajudar e escutar meus desabafos.

Ao amigo Ézer Biazin pelos momentos de descontração e pela amizade.

À amiga Daniella Lury Morgado, pelo auxílio nas análises de DMTA.

Aos amigos e colegas do Grupo de Bioquímica e Biomateriais e do Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais pelos momentos de conversa e descontração.

A todo pessoal da Biblioteca e da Seção de Alunos, em especial para Eliana, Lia, Solange, Sônia, Wilneide, Vitória, Bernadete, Sílvia e Andréia.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda., Campinas - SP, pela esterilização das membranas utilizadas nas análises de citotoxicidade in vitro.

Ao Sr. Luiz Antonio Potenza e à Prof.^a Dr. Ana Maria Minarelli Gaspar do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP pela realização da análise histológica.

Ao Dr. Márcio de Paula pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

À Dr. Cláudia Bernal e à Prof.^a Dr. Janice Rodrigues Perussi do Grupo de Cultura Celular e Fotossensibilizadores/IQSC/USP pelas análises de citotoxicidade in vitro.

Ao doutorando Luiz Antonio Ramos e à Prof.^a Dr. Elisabete Frollini do Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas/IQSC/USP pela realização das análises de DMTA e dos ensaios de tração.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. Biomateriais.....	18
3.1.1. Histórico.....	18
3.1.2. Biomateriais e a área de saúde.....	21
3.2. Engenharia de tecidos.....	24
3.3. Pericárdio porcino.....	26
3.4. Colágeno.....	30
3.5. Matrizes de colágeno derivadas de tecidos.....	34
3.6. Modificações químicas em matrizes de colágeno derivadas de tecidos.....	38
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
4.1. Preparação das membranas.....	40
4.2. Caracterização	42
4.2.1. Análise histológica.....	42
4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
4.2.3. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	43
4.2.3.1. Cultura celular.....	44

4.2.3.2. Método de difusão em ágar.....	46
4.2.4. Estabilidade biológica <i>in vitro</i> (colagenase).....	48
4.2.5. Titulação potenciométrica.....	48
4.2.6. Porcentagem de absorção de água	51
4.2.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	51
4.2.8. Termogravimetria (TG)	52
4.2.9. Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)	52
4.2.10. Ensaio de tração	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Análise histológica	57
5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	59
5.3. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	62
5.4. Estabilidade biológica <i>in vitro</i> (colagenase).....	64
5.5. Titulação potenciométrica	67
5.6. Porcentagem de absorção de água	68
5.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	70
5.8. Termogravimetria (TG)	73
5.9. Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)	75
5.10. Resistência à tração	80
6. CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
Anexo A – Preparação das lâminas histológicas	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fragmentos de mandíbulas: A) vista oclusal; B) vista lingual.....	19
Figura 2 – Pé com uma prótese de madeira no dedão.....	19
Figura 3 – Evolução dos biomateriais.....	20
Figura 4 - Pericárdio.....	27
Figura 5 – Pericárdio fibroso e pericárdio seroso parietal.....	27
Figura 6 - Membrana Remotis®	29
Figura 7 – Esquema da estrutura do colágeno. (a) Cadeia α da hélice tripla; (b) moléculas de tropocolágeno reunidas; (c) fibrila de colágeno; (d) fibrilas de colágeno agregadas formando uma fibra de colágeno.....	32
Figura 8 – Esquema da estrutura da hélice tripla do colágeno.....	32
Figura 9 – Submucosa de intestino delgado porcino.....	35
Figura 10 – Representação esquemática da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asparagina e Glutamina presentes no colágeno.....	39
Figura 11 – Esquema da preparação das membranas derivadas de pericárdio porcino.....	41
Figura 12 – Curva representativa da determinação de Td por DSC.....	52
Figura 13 – Garra utilizada para análise das membranas derivadas de pericárdio porcino no equipamento de DMTA.....	53
Figura 14 – Fotografia digital do pericárdio porcino fornecido pela Braile Biomédica S/A antes do tratamento.....	55
Figura 15 - Fotografias digitais das membranas: A) PPN; B) PP4; C) PP8; D) PP12; E) PP24.....	56

Figura 16 - Fotomicrografias das lâminas histológicas das membranas. A) PPN; B) PP4; C) PP8; D) PP12; E) PP24.....	58
Figura 17 – Fotomicrografias da superfície lisa das membranas. A) PPN; B) PP4; C) PP8; D) PP12; E) PP24.....	60
Figura 18 - Fotomicrografias da superfície fibrosa das membranas. A) PPN; B) PP4; C) PP8; D) PP12; E) PP24.....	61
Figura 19 – Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> : A) Controle Positivo; B) Controle Negativo.....	62
Figura 20 – Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> para a linhagem HEp-2: A) PPN; B) PP4; C) PP8; D) PP12; E) PP24.....	63
Figura 21 – Ilustração esquemática da degradação das membranas de colágeno.....	64
Figura 22 – Porcentagem de degradação enzimática por colagenase em função do tempo de hidrólise alcalina.....	66
Figura 23 – Número de grupos carboxílicos tituláveis por molécula de colágeno em função do tempo de hidrólise alcalina.....	68
Figura 24 – Número de grupos carboxílicos tituláveis por molécula de colágeno no pericárdio porcino em função da porcentagem de água absorvida.....	69
Figura 25 – Esquema da desnaturação do colágeno.....	70
Figura 26 – Curvas DSC das membranas derivadas de pericárdio porcino.....	71
Figura 27 – Temperatura de desnaturação (Td) em função do tempo de hidrólise alcalina....	72
Figura 28 – Curvas TG das membranas derivadas de pericárdio porcino.....	74
Figura 29 – Dependência dos módulos de armazenamento (E') e perda (E'') com a variação da temperatura para materiais poliméricos.....	76

Figura 30 – Módulo de armazenamento (E') em função da temperatura para as membranas derivadas de pericárdio porcino.....	78
Figura 31 – Módulo de perda (E'') em função da temperatura para as membranas derivadas de pericárdio porcino.....	78
Figura 32 – $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas derivadas de pericárdio porcino.....	79
Figura 33 – Curva tensão x deformação para enxerto derivado de pele de cadáver humano.....	81
Figura 34 – Resistência à tração em função da porcentagem de deformação das membranas derivadas de pericárdio porcino.....	82
Figura 35 – Representação gráfica dos valores da resistência à tração na ruptura das membranas derivadas de pericárdio porcino.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biomateriais em uso para engenharia de tecidos da pele.....	23
Tabela 2 - Polímeros naturais e sintéticos para aplicações em engenharia de tecidos.....	25
Tabela 3 - Distribuição, formas e tipos de colágeno.....	31
Tabela 4 - Aplicações médicas do colágeno.....	34
Tabela 5 - Enxertos heterólogos disponíveis comercialmente.....	36
Tabela 6 - Métodos de esterilização padrão e sua utilização em materiais à base de colágeno.....	44
Tabela 7 - Composição do meio ISCOVE'S.....	46
Tabela 8 - Descrição dos índices de zona.....	47
Tabela 9 - Espessura das membranas derivadas de pericárdio porcino em função do tempo de hidrólise alcalina.....	55
Tabela 10 - Porcentagens de degradação enzimática das membranas derivadas de pericárdio porcino.....	65
Tabela 11 - Número e incremento de grupos carboxílicos das membranas derivadas de pericárdio porcino.....	67
Tabela 12 - Porcentagem de água absorvida das membranas derivadas de pericárdio porcino.....	69
Tabela 13 - Temperatura de desnaturação (Td) das membranas derivadas de pericárdio porcino obtidas através das curvas de DSC.....	72
Tabela 14 - Porcentagens de perda de massa das membranas derivadas de pericárdio porcino obtidas através de dados termogravimétricos.....	75

Tabela 15 - Resistência à tração na ruptura e porcentagem de deformação das membranas derivadas de pericárdio porcino.....	81
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

Asn – Asparagina

ATCC – American Type Culture Collection

Da – Dalton

DMTA – Análise Térmica Dinâmico- Mecânica

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

E' - Módulo de Armazenamento

E'' – Módulo de Perda

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

GA - Glutaraldeído

Gln - Glutamina

Gly – Glicina

HE – Hematoxilina: Eosina

Hep -2 – linhagem celular de laringe humana

IZ – Índice de Zona

McCoy B – linhagem celular de fibroblastos de rato

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MPa - MegaPascal

PB – Pericárdio Bovino

PF – Pericárdio Fibroso

PP – Pericárdio Porcino

PPN – Membrana derivada de Pericárdio Porcino Nativo (sem hidrólise alcalina) e liofilizada

PP4 – Membrana derivada de Pericárdio Porcino com 4 h de Hidrólise Alcalina e liofilizada

PP8 – Membrana derivada de Pericárdio Porcino com 8 h de Hidrólise Alcalina e liofilizada

PP12 – Membrana derivada de Pericárdio Porcino com 12 h de Hidrólise Alcalina e liofilizada

PP24 - Membrana derivada de Pericárdio Porcino com 24 h de Hidrólise Alcalina e liofilizada

PSP – Pericárdio Seroso Parietal

SFB – Soro Fetal Bovino

SIF – Serviço de Inspeção Federal

SIS – Submucosa de Intestino Delgado

tan δ – Tangente de Perda

TF - Tampão Fosfato

Td - Temperatura de desnaturação

TG - Termogravimetria

RESUMO

A utilização e o desenvolvimento de biomateriais para a regeneração tecidual são de grande importância, principalmente para a área médica e odontológica. Matrizes de colágeno derivadas de tecidos de origem animal são utilizadas devido o colágeno apresentar características como biodegradabilidade e biocompatibilidade. Essas matrizes podem ser obtidas a partir de várias fontes, sendo uma delas o pericárdio porcino, que apresenta vantagens como grande disponibilidade, baixo custo, fácil obtenção e possibilidade de sofrer modificações químicas. Além disso, tecidos de origem suína são muito similares aos tecidos humanos, podendo ser utilizados para a produção de biomateriais para a regeneração de tecido mole. Este trabalho teve como objetivo a preparação de membranas acelulares derivadas de pericárdio porcino por hidrólise alcalina em diferentes tempos, para posterior utilização em engenharia de tecido. As membranas de colágeno foram obtidas por hidrólise alcalina de pericárdio porcino durante 4, 8, 12 e 24 h e caracterizadas por análise histológica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), avaliação da citotoxicidade *in vitro*, estabilidade biológica *in vitro* (colagenase), titulação potenciométrica, porcentagem de absorção de água, calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA) e ensaios de tração. A análise histológica mostrou que após 4h de hidrólise as células foram removidas das membranas. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* mostrou que as membranas preparadas neste trabalho não são citotóxicas. Os ensaios de estabilidade biológica *in vitro* por colagenase mostraram que as membranas hidrolisadas degradaram mais rapidamente que a não hidrolisada e, quando comparadas com matrizes derivadas de pericárdio bovino, as derivadas de pericárdio porcino foram mais resistentes à degradação por colagenase. A titulação potenciométrica possibilitou determinar o número de grupos carboxílicos das membranas e o incremento desses grupos por molécula de colágeno. Os resultados mostraram que houve um aumento no número de grupos carboxílicos tituláveis nas membranas hidrolisadas e, conseqüentemente, houve um aumento do número de cargas negativas incorporadas na molécula de colágeno. As membranas hidrolisadas apresentaram uma maior absorção de água, uma diminuição das temperaturas de desnaturação e menor estabilidade térmica em função do aumento do tempo de hidrólise. Os ensaios de tração mostraram que após a hidrólise alcalina as membranas apresentaram maiores valores de resistência à tração e que a deformação é dependente do tempo de hidrólise alcalina. Esses resultados mostraram que a preparação de membranas de colágeno derivadas de pericárdio porcino com diferentes tempos de hidrólise alcalina é um procedimento viável para ser utilizado na produção de biomateriais para engenharia de tecido.

ABSTRACT

The use and development of biomaterials for tissue regeneration are of great importance, especially for medical and dental care. Collagen matrices derived from animal tissues are widely used because collagen has characteristics such as biodegradability and biocompatibility. These matrices can be obtained from various sources, such as porcine pericardium, which is a tissue that can be used due its low cost, wide availability and because it can be chemically modified. Besides, porcine tissues are very similar to human tissue and can be used to produce biomaterials for soft tissue regeneration. The aim of this study was the preparation and characterization acellular membranes by alkaline hydrolysis of porcine pericardium. Membranes were characterized by histological analysis, scanning electron microscopy (SEM), *in vitro* cytotoxicity evaluation, *in vitro* biological stability (collagenase), potentiometric titration, water absorption percentage, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), dynamic mechanical thermal analysis (DMTA) and tensile tests. Histological analysis showed that after 4h of hydrolysis, cells were totally removed from matrices. *In vitro* cytotoxicity showed that all matrices prepared in this work are not cytotoxic. *In vitro* biological stability tests (collagenase) showed that the hydrolyzed membranes degraded more quickly than the non hydrolyzed matrix and more resistant to collagenase degradation when compared to matrices derived from bovine pericardium. The potentiometric titration allowed the determination carboxylic groups and the increase of these groups per collagen molecule. Hydrolyzed matrices had an increase in water absorption, a decrease in denaturation temperature and a small decrease in thermal stability with the increase of hydrolysis time. Tensile tests showed that after alkaline hydrolysis matrices showed higher tensile strength and the deformation was independent of the time of alkaline hydrolysis. These results showed that the preparation of collagen biological matrices derived from porcine pericardium with different times of alkaline hydrolysis is a viable procedure to be subsequently used in the production of biomaterials for tissue engineering.

1. INTRODUÇÃO

A utilização e o desenvolvimento de biomateriais para a regeneração tecidual são de grande importância, principalmente para a área médica e odontológica. Para a área médica, esses biomateriais podem ser utilizados, por exemplo, como substituintes de pele em queimaduras (PRADO, 2005), enquanto que para a área odontológica eles podem ser empregados como enxertos de gengiva em cirurgias estéticas ou devido à infecção da cavidade oral (MOIOLI et al., 2007).

Apesar do aumento da expectativa de vida, doenças como câncer, HIV, doenças cardiovasculares, falência de órgãos e lesões traumáticas causadas por acidentes ainda continuam a diminuir a qualidade de vida (KARP; LANGER, 2007). A perda de tecidos que ocorre devido a essas doenças ou complicações em pós-operatório e traumas torna-se um dos principais problemas na área da saúde. Por isso, tem-se o crescente interesse no desenvolvimento de biomateriais relacionados à regeneração de tecidos.

A área que abrange o desenvolvimento desses biomateriais é a engenharia de tecidos, que, além de ser uma área promissora, tem como objetivo substituir partes danificadas do corpo para manter ou melhorar a função dos tecidos como, por exemplo, ossos, cartilagem, sistema cardiovascular, pele, etc. (ÓREFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006; PATEL; FISHER, 2008). A reconstrução de tecidos moles, necessária devido a anomalias congênitas, doenças crônicas e traumas, representa um desafio para a medicina (STOSICH et al., 2009). A reconstrução desses tecidos pode ser feita utilizando-se matrizes, as quais devem ter propriedades mecânicas similares às dos tecidos substituídos, ou seja, a matriz deve ser relativamente macia, flexível e resistente (KOHN, 2004). Além disso, ela deve ser biocompatível, biodegradável e de fácil esterilização (SEUNARINE et al. 2006).

Essas matrizes podem ser obtidas a partir de vários materiais, sendo o colágeno um dos mais utilizados. O estudo das interações entre as matrizes e os tecidos que serão substituídos fornece novos rumos para o desenvolvimento de biomateriais a base de colágeno.

Os biomateriais em uso clínico, em sua grande maioria, são à base de colágeno (MACNEIL, 2008), devido ele orientar e definir a maioria dos tecidos (CEN et al., 2008), além de apresentar características como biodegradabilidade e biocompatibilidade, que favorecem a sua aplicação (MANDAL; PANIGRAHI; ZHANG, 2010).

O colágeno pode ser obtido a partir de várias fontes, sendo uma delas tecidos de origem animal. Um tecido que pode ser utilizado para a confecção de matrizes de colágeno é o pericárdio porcino (PP), que apresenta vantagens como grande disponibilidade, baixo custo, fácil obtenção e a possibilidade de sofrer modificações químicas, como, por exemplo, a hidrólise alcalina. Essa modificação gera materiais com boa biocompatibilidade e baixa resposta inflamatória (GOISSIS et al., 1999; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002; OTTOBONI, 2011) sendo, portanto um método que pode ser usado para a preparação de membranas de colágeno derivadas de pericárdio porcino.

2. OBJETIVOS

O desenvolvimento de biomateriais para a regeneração tecidual é de grande utilidade, principalmente para a área médica e odontológica. Tecidos de origem suína são similares aos tecidos humanos na sua estrutura anatômica. A preparação de membranas acelulares de colágeno tipo I utilizando pericárdio porcino, um tecido rico em colágeno, possibilita a obtenção de materiais com características diferenciadas com possibilidade de utilização na área odontológica como enxertos de gengiva ou barreira mecânica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi:

- Preparação de membranas acelulares derivadas de pericárdio porcino por hidrólise alcalina em diferentes tempos, para posterior utilização em engenharia de tecidos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biomateriais

3.1.1. Histórico

Os biomateriais começaram a ser utilizados há muito tempo. Segundo historiadores, suturas feitas de tendões de animais eram utilizadas no Egito antigo. Na Grécia e na Índia, os médicos utilizavam biomateriais naturais para a reparação de mutilações provenientes da guerra (COBURN; PANDIT, 2007).

Os biomateriais podem ser divididos em quatro gerações, sendo a primeira geração referente ao uso dos primeiros biomateriais, onde se usava o material disponível como ouro e marfim para a reposição de dentes (Figura 1), vidro para reposição do globo ocular, aço e madeira para a confecção de próteses de membros (Figura 2).

A Figura 1A mostra a vista oclusal de um fragmento de mandíbula, onde se observa um fio de ouro prendendo os dentes anteriores. A vista lingual (Figura 1B) mostra dois fios de ouro passando através de um buraco e prendendo o canino aos incisivos laterais esquerdo e direito. Esses fragmentos correspondem a restos mortais queimados de uma mulher adulta que foram encontrados numa escavação realizada em Roma no ano 2000 (MINOZZI et al., 2007).

Cornelium Celsum (25 AC-50 DC) foi o primeiro a descrever detalhadamente um caso de doença dental no livro *De Medicina*, além de mostrar como ligar e sustentar os dentes que sofreram algum tipo de acidente a um dente fixo usando um fio de ouro (MINOZZI et al., 2007).

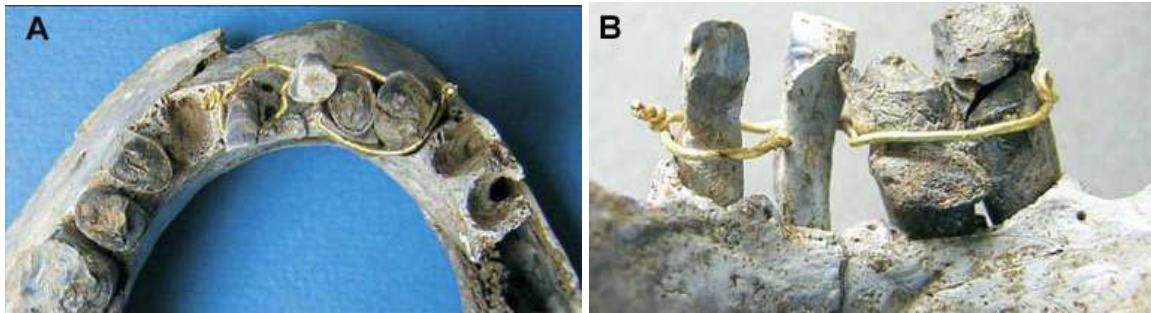


Figura 1 – Fragmentos de mandíbulas: **A)** Vista oclusal; **B)** Vista lingual (MINOZZI et al., 2007).

A Figura 2 mostra o pé de uma múmia de 3000 anos de idade descoberto por pesquisadores da Universidade Ludwig Maximilians. Há evidências de que um médico egípcio criou esta prótese de madeira para ajudar um paciente cujo dedo foi amputado em um acidente (NERLICH et al, 2000).



Figura 2 – Pé com uma prótese de madeira no dedo (NERLICH et al, 2000).

A segunda geração é composta pelos biomateriais à base de materiais estruturais, como, por exemplo, ligas de titânio na ortopedia, enquanto a terceira geração foi marcada pelo aprimoramento dos biomateriais, ou seja, o desenvolvimento de materiais com características específicas de acordo com a aplicação. A quarta geração se refere ao desenvolvimento dos biomateriais biomiméticos e voltados para a engenharia de tecidos. A Figura 3 mostra um esquema com a evolução dos biomateriais.

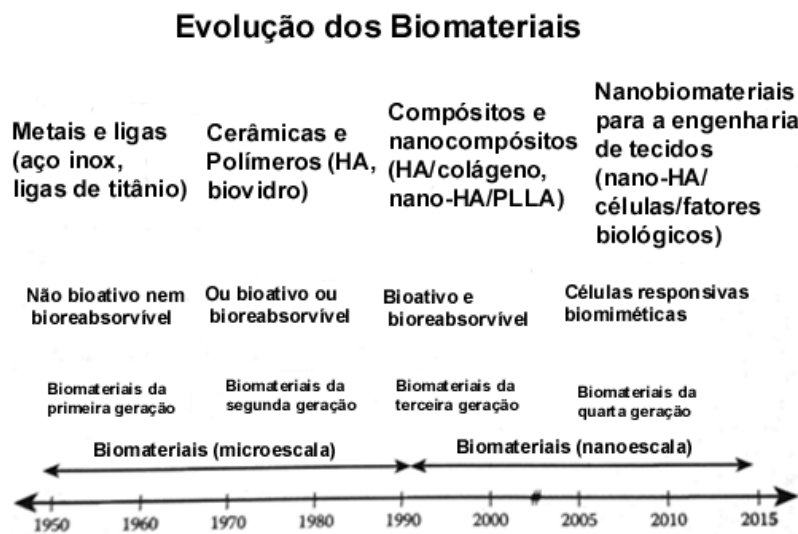


Figura 3 – Evolução dos biomateriais.

O primeiro caso documentado da utilização de biomateriais foi relatado por Sushruta em uma enciclopédia médica, onde os médicos criaram uma prótese de nariz utilizando enxerto de pele da bochecha do paciente para moldar a prótese (ZIMMERMAN; VEITH, 1993).

Em meados de 1460, foi realizada uma rinoplastia utilizando a pele do braço como enxerto (ZIMMERMAN; VEITH, 1993). Próximo a 1660, JJ van Meekeren realizou em Amsterdã o reparo de um defeito craniano usando um pedaço adaptado de crânio de um cão recém-falecido (SANAN; HAINES, 1997).

Os implantes dentários foram desenvolvidos durante o século XIX, com a utilização de implantes de ouro e platina (SLAVKIN, 1998). Em 1923, o cirurgião ortopédico M. N. Smith-Petersen construiu o primeiro molde de vidro para ser utilizado na artroplastia (SMITH-PETERSEN, 1948).

Em 1936, Arthur Bowen descreveu a utilização de submucosa de intestino delgado suíno como biomaterial pela primeira vez. Devido sua grande disponibilidade, tecidos

suínos e bovinos foram os primeiros materiais heterólogos a serem utilizados como biomaterial natural (COBURN; PANDIT, 2007).

Na década de 1970, ocorreu a publicação das primeiras patentes sobre a utilização de implantes de biomateriais de origem suína, liofilizados ou fixados com glutaraldeído (ANGELL; YOON, 1976; LIOTTA et al.; 1978). Na década de 80, vários métodos de decelularização de materiais heterólogos foram desenvolvidos e os biomateriais naturais começaram a ser muito utilizados. Desde então houve um aumento no desenvolvimento e utilização de biomateriais.

3.1.2. Biomateriais e a área da saúde

Os biomateriais são todos os materiais ou sistemas utilizados em aplicações clínicas para substituir parte de um sistema vivo ou para atuar em contato íntimo com tecidos vivos (CEN et al., 2008). Eles são essenciais para a área médica e o seu sucesso depende de três fatores principais: a biocompatibilidade do implante; a condição de saúde do paciente e a competência do cirurgião que irá implantar e monitorar o progresso do paciente (PARK; LAKES, 2007). A seleção do biomaterial irá influenciar a tolerância ao transplante ou pelo menos minimizar a rejeição (JONES, 2008).

Os biomateriais podem ser utilizados em diversas aplicações como (KARP; LANGER, 2007; ÓREFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006; LU et al., 2009; BRÁS et al., 2010):

- Implantes cardiovasculares (válvulas cardíacas, *stents*, enxertos vasculares, marca passo);
- Implantes para cirurgia plástica e reconstrutiva (reconstrução de mamas, reconstrução maxilofacial);

- Próteses ortopédicas (prótese de joelho e quadril, fixação de fratura);
- Dispositivos oftalmológicos (lentes de contato, lentes intraoculares, prótese de córnea);
- Dispositivos odontológicos (implantes, restaurações);
- Dispositivos para liberação controlada de fármacos (implantes, sistemas transdérmicos, microcápsulas).
- Dispositivos para reconstrução de tecido mole (pele artificial, matriz).

Na literatura encontram-se muitos trabalhos que descrevem a utilização dos biomateriais em diferentes áreas da saúde.

Ben-Moshe e Amiel (2008) realizaram um estudo sobre biomateriais para a substituição de bexiga.

Patel e Fisher (2008) fizeram uma revisão sobre biomateriais para a engenharia de tecidos pediátrica, destacando-se liberação de fármacos, tecido ósseo, pele e área cardiovascular.

MacNeil (2008) realizou uma pesquisa sobre a utilização de biomateriais como substituintes dérmicos e resumiu alguns biomateriais atualmente em uso na área de engenharia de tecidos da pele. Esses biomateriais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Biomateriais em uso para engenharia de tecidos da pele (adaptado de MACNEIL, 2008).

Objetivo	Função	Exemplos
Cobertura epidérmica	Libera queratinócitos cultivados de modo que eles ocupam a ferida e formam uma nova camada epidérmica	Epicell [®] (folhas epidérmicas cultivadas) Epidex [®] (folhas epidérmicas cultivadas a partir de folículos pilosos arrancados)
Substituição dérmica	Fornece um substituinte dérmico que promova a cicatrização do ferimento ou	Permacol [®] Integra [®]
Substituição dérmica/epidérmica	Age com uma alternativa ao enxerto cutâneo	Permaderm [®] Apligraf [®]

Lloyd, Faragher e Denyer (2001) fizeram uma pesquisa sobre a grande variedade de biomateriais que são utilizados no desenvolvimento de dispositivos oftalmológicos como lentes de contato, lentes intraoculares, implantes de glaucoma, entre outros e também sobre o desafio de melhorar a compatibilidade e longevidade de dispositivos oftalmológicos, além da necessidade de melhorar as propriedades físico-químicas e mecânicas dos biomateriais existentes.

Greca et al. (2005) utilizaram submucosa de intestino delgado porcino e pericárdio bovino como enxerto para reparar lesões induzidas na veia cava inferior de cães e verificaram que os dois tecidos são ótimos substratos para a regeneração vascular.

Parizek et al. (1989) realizaram a reconstrução de dura-máter de crianças utilizando pericárdio bovino, e os resultados obtidos mostraram que ele foi um bom substituto dural.

Assim, nos últimos anos vem ocorrendo um aumento das pesquisas de biomateriais para a área médica e odontológica no que se refere à reconstrução tecidual, envolvendo diretamente a engenharia de tecidos.

3.2. Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é um campo emergente e interdisciplinar que une os princípios das ciências da vida e da medicina com os princípios da engenharia (GEORGE; ONODERA; MIYATA, 2008). Um dos seus objetivos é a substituição das próteses por matrizes teciduais biodegradáveis que auxiliem a regeneração de tecidos perdidos ou danificados (KOHN, 2004). A vantagem em se utilizar matrizes tridimensionais na engenharia de tecido é que, além da substituição de tecidos perdidos ou danificados, há a possibilidade de controlar o formato, tamanho e composição do enxerto *in vitro*. Além disso, as matrizes tridimensionais podem ser utilizadas na regeneração *in vivo* de tecidos saudáveis remanescentes, recuperando a estrutura e função dos tecidos através do restabelecimento dos tecidos próximos (LEOR; COHEN, 2004).

Essas matrizes podem ser de origem sintética ou natural. As matrizes de origem natural podem ser obtidas a partir de tecidos autólogos (mesmo indivíduo), homólogos (mesma espécie) ou heterólogos (espécie diferente).

Vários polímeros naturais e sintéticos são utilizados para a confecção de matrizes para a engenharia de tecidos. A Tabela 2 lista alguns desses polímeros e suas aplicações clínicas.

Tabela 2 – Polímeros naturais e sintéticos para aplicações em engenharia de tecidos
(adaptado de KE, 2006).

Polímero	Material	Aplicação Clínica
Naturais	Colágeno	Cartilagem, ossos, pele, músculo, nervos, fígado, vasos sanguíneos, liberação de fármacos.
	Fibrina	
	Quitosana	
	Alginato	
Sintéticos	Poli (ácido L-láctico) (PLLA) Poli (ácido glicólico) (PGA)	Cartilagem, ossos, pele, músculo, nervos, fígado, vasos sanguíneos, válvulas, bexiga, tecidos cardíacos.
	Poli (metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA)	Nervos, lentes de contato.

Um exemplo da utilização de polímeros naturais na engenharia de tecidos é o trabalho realizado por George, Onodera e Miyata (2008), onde foi utilizada uma matriz de colágeno derivado de derme bovina e com formato de favo para a proliferação de fibroblastos da pele humana e os resultados mostraram que ele é um material eficiente e adequado para a adesão celular e proliferação de fibroblastos da pele humana. Além disso, é um material mecanicamente estável, biocompatível e biodegradável para a utilização na engenharia de tecidos da pele.

Derham et al. (2006) utilizaram matriz de ureter porcino acelular na engenharia de tecidos de enxertos vasculares de diâmetro pequeno e verificaram que a decelularização foi completa e, quando comparado com o ureter a fresco, não houve mudança significativa na

resistência à tração, também verificaram que a matriz é biocompatível e viável para utilização como enxerto vascular.

Daamen et al. (2003) prepararam matrizes à base de colágeno, elastina e glicosaminoglicanas com diferentes proporções de colágeno e elastina, e obtiveram matrizes com características bioquímicas, biomecânicas e morfológicas bem definidas, podendo ser utilizadas na engenharia de tecidos de órgãos.

Assim, o desenvolvimento de matrizes e membranas para a área de engenharia de tecido é de grande utilidade, sendo muito utilizadas como um suporte tridimensional para crescimento do novo tecido. As matrizes heterólogas têm como vantagem sua disponibilidade ilimitada e baixo custo. Além disso, elas podem ser obtidas a partir de vários tecidos como pericárdio bovino ou porcino, derme porcina, submucosa de intestino delgado, tendão bovino entre outros.

3.3. Pericárdio porcino

O pericárdio é uma membrana fibro-elástica que envolve o coração (Figura 4), e é formado pelo pericárdio fibroso e pelo pericárdio seroso. O pericárdio fibroso é a superfície externa do pericárdio, que é fibrosa, áspera, opaca e reforçada por fibras de colágeno, enquanto o pericárdio seroso é a superfície interna, a qual é lisa e brilhante (RIZZOLO; MADEIRA, 2004). O pericárdio seroso reveste a face interna do pericárdio fibroso onde juntos formam o pericárdio seroso parietal (VILELA, 2006). A camada fibrosa do pericárdio porcino é mais uniforme nas suas diferentes regiões, com espessura intermediária entre a do humano e bovino (VILELA, 2006). Além disso, a camada fibrosa do pericárdio porcino apresenta fibras de colágeno orientadas em várias direções que ajudam a estabilizar o pericárdio durante os movimentos diastólicos (VILELA et al., 2008).

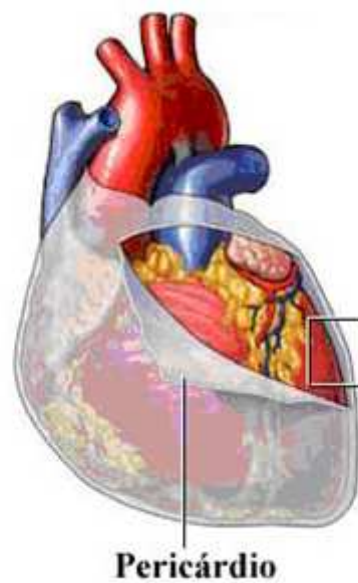


Figura 4 - Pericárdio (PORTAL SÃO FRANCISCO).

A Figura 5 mostra a localização do pericárdio fibroso (PF) e do pericárdio seroso parietal (PSP).

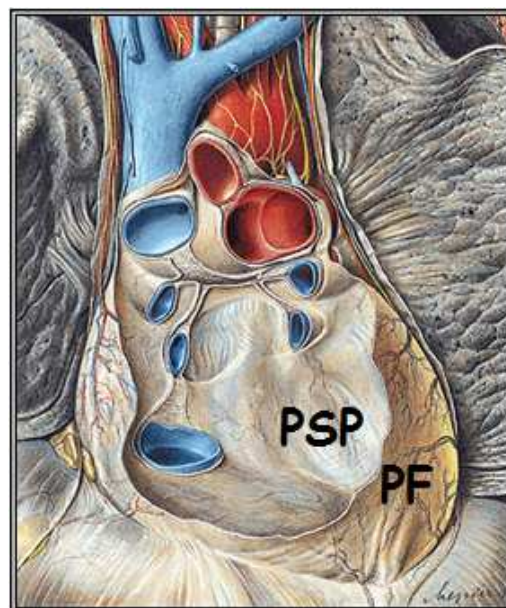


Figura 5 - Pericárdio fibroso e pericárdio seroso parietal (PUTZ; PABST, 2004).

Um estudo realizado por Vilela (2006) verificou que o pericárdio porcino é constituído por 47 % de colágeno e que as fibras de colágeno estão dispostas em camadas

orientadas em várias direções. Além disso, foi observado que as fibras elásticas estão entrelaçadas nas fibras de colágeno.

Segundo Prado (2005) o pericárdio porcino acelular e liofilizado é um biomaterial rico em colágeno, e apresenta características que o tornam adequado para ser utilizado como substituto de pele.

Tedder et al. (2009) observaram que pericárdio porcino acelular apresenta propriedades mecânicas adequadas, baixa toxicidade, excelente potencial para crescimento celular e tendência para remodelamento da matriz, quando utilizados na engenharia de tecidos valvular.

García Páez et al. (2001) utilizaram um simulador de stress hidráulico para estudar as propriedades mecânicas do pericárdio porcino e compararam com as do pericárdio bovino para utilização como bioprótese cardíaca. A partir dos resultados obtidos, eles concluíram que o comportamento mecânico do pericárdio porcino é semelhante ao do pericárdio bovino em todos os aspectos estudados.

Jastrzebska et al. (2008) compararam a estrutura supramolecular de válvula aórtica humana normal e do pericárdio porcino estabilizado com glutaraldeído (GA) utilizando microscopia de força atômica. Eles observaram que o colágeno do pericárdio porcino não é tão compacto quanto o da válvula aórtica humana e que os dois tecidos apresentaram regiões com grande quantidade de fibrilas de colágeno multidirecionadas.

Kim et al. (2008) realizaram um estudo com biopróteses de pericárdio porcino tratadas com GA, etanol e dodecilsulfato de sódio e verificaram que o tratamento com essas três substâncias forneceu um material com maior espessura e resistência à tração.

Pinto et al. (2008) avaliaram a resposta inflamatória do pericárdio porcino processado quando implantados em olhos de coelhos e relataram que o pericárdio porcino

apresentou uma resposta inflamatória significativa. Os autores também afirmaram que são necessários outros estudos para avaliar a resposta inflamatória a longo prazo.

Loke et al. (1996) utilizou pericárdio porcino e oligômeros de poliuretana para produzir biomateriais híbridos e verificaram a possibilidade de eles serem utilizados para produzir válvulas cardíacas.

O pericárdio porcino pode ser utilizado em várias aplicações como, por exemplo, bioprótese fixada com glutaraldeído, *stents*, material de biopróteses valvares, reparo de defeitos em tecidos moles, sendo utilizado devido suas propriedades mecânicas e formato convenientes (SEIF-NARAGHI et al., 2010). Segundo Güven (2006) o colágeno de origem porcina geralmente produz uma resposta imune moderada.

Pode-se observar que a maioria dos trabalhos citados utiliza o pericárdio porcino para a construção de biopróteses cardiovasculares. Dentre os trabalhos citados, somente o realizado por Pinto et al. (2008) utiliza pericárdio porcino para a regeneração de tecidos.

Existe disponível no mercado a membrana Remotis[®] (Figura 6), fabricada pela Thommen Medical AG, com sede na Suíça.



Figura 6 – Membrana Remotis[®].

Ela é uma membrana de colágeno feita a partir de pericárdio porcino e que pode ser utilizada em implantodontia, periodontia, cirurgia crânio-maxilo-facial e oral. Essa

membrana apresenta boa biocompatibilidade, proliferação celular excelente e vascularização rápida, além de ser rapidamente hidratada e apresentar boa adesão óssea.

3.4. Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante nos vertebrados e tem a função de proteger os órgãos e o corpo, manter a integridade estrutural do tecido e conferir resistência mecânica (VIJAYARAGHAVAN et al., 2010). Ele apresenta a vantagem de fornecer um substrato para o crescimento e adesão celular, estimulando, assim, a cicatrização de ferimentos (BEL et al., 2010; TSAI et al., 2010), além de ser um material versátil com propriedades biológicas que o tornam útil para a fabricação de dispositivos para a medicina e odontologia. Além disso, ele apresenta algumas propriedades bioquímicas e biofísicas como: solubilidade, resistência, estabilidade controlada, entre outras (PATINO et al., 2002).

De acordo com Parenteau-Bareil, Gauvin e Berthod (2010) existem 29 tipos de colágeno, sendo os colágenos tipo I, II, III, V e XI conhecidos por formar fibras de colágeno. Ainda segundo esses autores, existem aproximadamente 25 conformações de cadeias α diferentes, cada uma produzida por um gene único. As combinações dessas cadeias, em séries de três, se reúnem para formar os 29 tipos diferentes de colágeno conhecidos. A maioria dos colágenos consiste de duas cadeias α -1 e uma cadeia α -2 (PATINO et al. 2002). Os tipos de colágeno mais comuns estão descritos na Tabela 3.

Os colágenos do tipo I, II, III e V são os principais tipos que formam a parte essencial de colágeno nos ossos, cartilagem, tendão, pele e músculos (CEN et al., 2008). Apesar de muitos tipos de colágeno terem sido descritos, só alguns tipos são usados para produzir biomateriais à base de colágeno (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

Tabela 3 – Distribuição, formas e tipos de colágeno (adaptado de PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

	Tipo	Fórmula Molecular	Forma polimerizada	Distribuição nos tecidos
Formação de fibrilas (fibrilar)	I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	fibrila	Ossos, pele, tendões, ligamentos, córnea (representa 90% do colágeno total do corpo humano)
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	fibrila	Cartilagem, disco intervertebral, humor vítreo
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	fibrila	Pele, vasos sanguíneos
	V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ e $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	Fibrila (agrega com o tipo I)	<i>Idem</i> tipo I
	XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	Fibrila (agrega com o tipo II)	<i>Idem</i> tipo II
Associado a fibrilas	IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Associação lateral com fibrila tipo II	cartilagem
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Associação lateral com fibrila tipo I	Tendões, ligamentos
Formação de cadeias	IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	Cadeias tipo folha	Membrana basal
	VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Fixação de fibrilas	Membrana amniótica

O colágeno tipo I é um dos mais utilizados para a preparação de biomateriais. Ele é composto por um filamento semiflexível de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, sua estrutura básica é chamada de tropocolágeno, que é caracterizado por uma massa molecular média de 280.000 Da (NIMNI, 1988; PATINO et al., 2002; TSAI et al, 2010). Além disso, ele é a proteína estrutural mais abundante nos vertebrados (PATINO et al., 2002; TSAI et al, 2010). As Figuras 7 e 8 mostram o esquema da estrutura do colágeno.

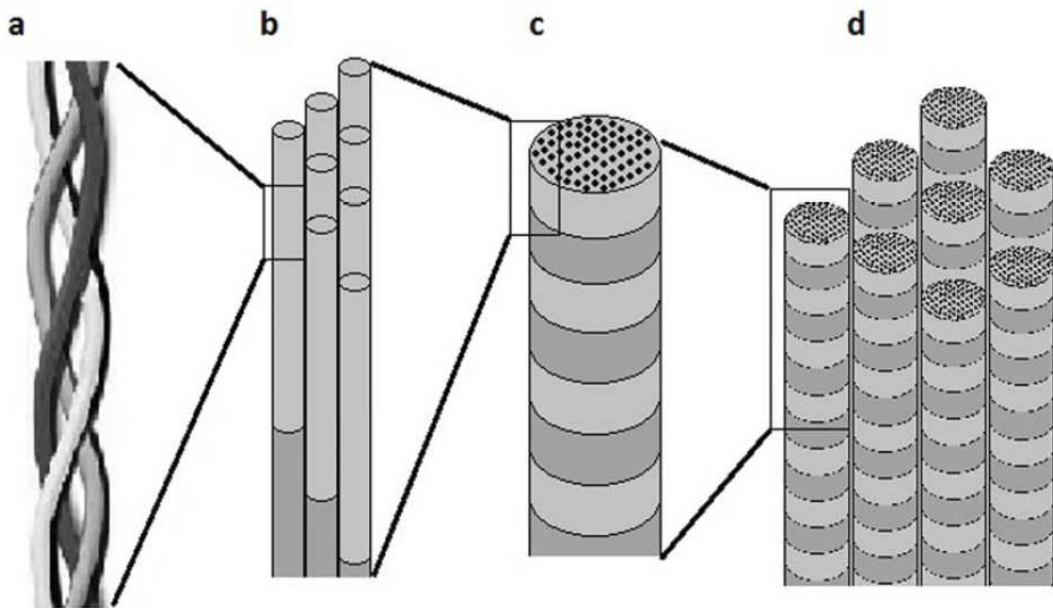


Figura 7 - Esquema da estrutura do colágeno. **(a)** Cadeia α da hélice tripla; **(b)** moléculas de tropocolágeno reunidas; **(c)** fibrila de colágeno; **(d)** fibrilas de colágeno agregadas formando uma fibra de colágeno (adaptado de PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).



Figura 8 - Esquema da estrutura da hélice tripla do colágeno (STRYER, 1996).

A biocompatibilidade do colágeno e sua possível degradação pela colagenase humana são responsáveis pelo seu uso em muitas aplicações biomédicas (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010) e, conseqüentemente, ele é muito utilizado em pesquisas na área de biomateriais, como pode ser observado a seguir.

Sionkowska, Skopinska-Wisniewska e Wisniewski (2009) estudaram as interações entre o colágeno e alguns polímeros sintéticos e verificaram que as blendas de colágeno e os polímeros sintéticos são menos biocompatíveis que o colágeno puro.

Shaikh et al. (2007) utilizaram um implante de colágeno de derme porcina acelular na reconstrução de defeitos da parede abdominal, e concluíram que ele tem potencial para ser utilizado na reconstrução de defeitos agudos e crônicos da parede abdominal.

Um estudo realizado por Lu et al.(2009) demonstrou que *patches* derivados de colágeno tipo I podem ser utilizados cirurgicamente como biomaterial.

Zeugolis, Paul e Attenburrow (2009) investigaram a influência de diferentes métodos de reticulação nas fibras de colágeno extrusadas, e verificaram que, além de apresentarem propriedades iguais aos do tecido nativo, elas podem ser utilizadas para produzir matrizes tridimensionais de colágeno *in vitro*.

O colágeno tem sido muito utilizado em aplicações médicas sendo, portanto, cada vez mais importante para a área de biomateriais (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010). A Tabela 4 mostra algumas dessas aplicações.

Além das aplicações listadas na Tabela 4, o colágeno também pode ser utilizado como revestimento de queimaduras e outras lesões, suporte para crescimento de nervos periféricos (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001), cremes cosméticos, material de implante para substituição de tecidos (STACHEL et al., 2010; PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

Tabela 4 – Aplicações médicas do colágeno (adaptado de METZMACHER, 2005; MANDAL; PANIGRAHI; ZHANG, 2010).

Especialidade médica	Aplicação
Dermatologia	Aumento de tecido mole
Odontologia	Feridas orais
Ortopedia	Reparo de osso, tendão e ligamento Reconstrução de ligamento
Tratamento de câncer	Liberação de fármacos
Cardiologia	Válvulas cardíacas Reparo arterial
Odontologia	Regeneração tecidual guiada
Cirurgia	Pele artificial Sutura Reparo e revestimento de feridas
Oftalmologia	Lentes de contato Enxertos de córnea
Urologia	Membrana de diálise
Vascular	Enxerto vascular Substituição de vasos Angioplastia
Outras	Cultura celular Substituição de órgãos

3.5. Matrizes de colágeno derivadas de tecidos

Materiais de origem natural vêm sendo utilizados como biomaterial. Dentre esses biomateriais estão os *patches* biológicos obtidos a partir de tecidos acelulares que fornecem uma matriz tecidual regenerativa.

O desenvolvimento desses *patches* para a área de regeneração tecidual é essencial e têm duas funções: reforçar os tecidos moles durante o processo de cicatrização e fornecer uma matriz de colágeno para o crescimento celular (RUBIN; SCHWEITZER, 2005). Os *patches* ou matrizes são muito utilizados porque além do colágeno ser a principal proteína estrutural encontrada em muitos tecidos e apresentar propriedades como baixa antigenicidade, atoxicidade e biocompatibilidade (HATTORI et al., 2006; LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001), ele pode ser extraído de várias fontes (LU et al., 2009; PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010), como, por exemplo, pericárdio bovino (PB), tecido de cadáver humano adulto, submucosa de intestino delgado de porco (SIS – Figura 9), derme de feto bovino (RUBIN; SCHWEITZER, 2005) entre outros. A Tabela 5 mostra alguns produtos derivados de tecidos disponíveis comercialmente.

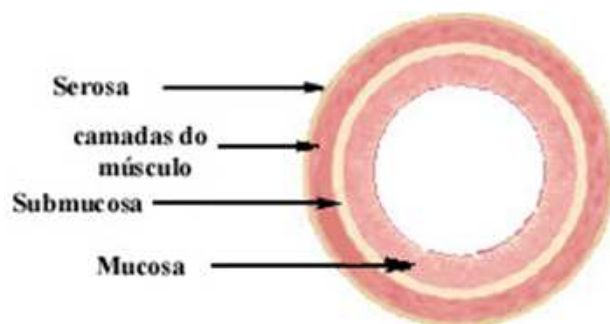


Figura 9 – Submucosa de intestino delgado porcino (BATISTA, 2008).

Tabela 5 – Enxertos heterólogos disponíveis comercialmente (adaptado de AURORA, 2010; BRENNAN, 2009; TRABUCO; KLINGELE; GEBHART, 2007)

Fabricante	Produto	Fonte do tecido
Bard	Pelvicol [®] Pelvisoft [®] CollaMend [®]	Derme porcina
Cook	Durasis [®] Surgisis [®] Stratasis [®]	Submucosa de intestino delgado porcino
Depuy Orthopaedics	Restore [™]	Submucosa de intestino delgado porcino
Healthpoint	Oasis [®]	Submucosa de intestino delgado porcino
Kensey Nash	Bio-Blanket [®]	Derme bovina
Lifecell	Alloderm [®]	Pele humana
Musculoskeletal Transplant Foundation	AlloPatch HD [™]	Pele humana
Organogenesis	CuffPatch [™]	Submucosa de intestino delgado porcino
Pegasus Biologics	OrthADAPT [™] Bioimplant	Pericárdio equino
Synovis	Dura-Guard [®] Peri-Guard [®] Vascu-Guard [®] Veritas [®]	Pericárdio bovino
TEI Biosciences	Durepair [®] PriMatrix [™] SurgiMend [™] TissueMend [®] Xenform [™]	Pele de feto bovino
Tissue Science Laboratories	Zimmer [®] Collagen Patch	Derme porcina
Tissue Science Laboratories	Permacol [™]	Pele porcina
Tornier	Conexa [™]	Derme porcina
Wright Medical Technology	GraftJacket [®]	Pele humana

A utilização de matrizes ou *patches* como enxertos de tecido mole para a correção de deficiências de mucosas orais são de grande utilidade, uma vez que enxertos autólogos têm desvantagens como a criação de um sítio cirúrgico adicional, o qual está associado à dor, morbidade e, às vezes, a uma quantidade limitada de enxerto de baixa qualidade (HERFORD et al., 2010). Essas desvantagens têm motivado os pesquisadores a desenvolverem novos biomateriais, principalmente de origem natural. Como exemplo temos o trabalho realizado por Herford et al. (2010), no qual enxertos de matrizes de colágeno porcino mostraram-se biocompatíveis quando utilizados na cavidade oral, evitando assim a realização de uma cirurgia adicional para obtenção de enxertos autólogos de outra área de cavidade oral.

Existem muitos trabalhos que relatam a utilização de *patches* e matrizes de colágeno na área de biomateriais. Xie et al. (2006) utilizaram *patches* de colágeno derivados de SIS na reconstrução uretral de coelhos e verificaram que, além de eles serem biocompatíveis, apresentam uma regeneração tecidual excelente.

Mitchell et al. (2008) verificaram que *patches* a base de colágeno são uma alternativa segura em comparação aos *patches* sintéticos e que são materiais promissores para serem utilizados como enxerto biológico para o reparo de hérnias diafragmáticas congênitas.

Mirsadraee et al. (2006) realizaram a decelularização de pericárdio humano, e obtiveram uma matriz biocompatível com as propriedades do tecido nativo e com possibilidade de ser utilizada como um *patch* cirúrgico.

Stavropoulos et al. (2010) utilizou uma membrana de colágeno de pericárdio bovino e osso bovino granulado em defeitos intraósseos tratados com regeneração tecidual guiada e os resultados mostraram que houve regeneração do ligamento periodontal mas não houve formação óssea.

Haslik et al.(2007) avaliaram uma matriz de colágeno e elastina para o tratamento de queimaduras graves nas mãos, e observaram que esta matriz é um substituo dérmico adequado para o tratamento de queimaduras nas mãos.

3.6. Modificações químicas em matrizes de colágeno derivadas de tecidos

Matrizes de colágeno são muito utilizadas em aplicações biomédicas, pois apresentam grande disponibilidade, baixo custo e são passíveis de modificações químicas que podem melhorar suas propriedades mecânicas e fisiológicas (CUNHA, 2006).

Uma modificação química que pode ser realizada com o colágeno presente em tecidos é a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias α do tropocolágeno (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001), conforme ilustra a Figura 10. Este método permite a obtenção de matrizes de colágeno carregadas negativamente a pH 7,4 e com boa biocompatibilidade (GOISSIS et al., 1999), embora introduza algumas alterações na estrutura básica da molécula de colágeno (FORTI; GOISSIS; PLEPIS, 2006).

Essa modificação conduz a um aumento de até 134 cargas negativas por unidade de tropocolágeno após a hidrólise alcalina (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). As caracterizações físico-químicas por espectroscopia na região do infravermelho e por calorimetria exploratória diferencial sugeriram que a estrutura em hélice tripla do tropocolágeno foi preservada durante a hidrólise (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998).

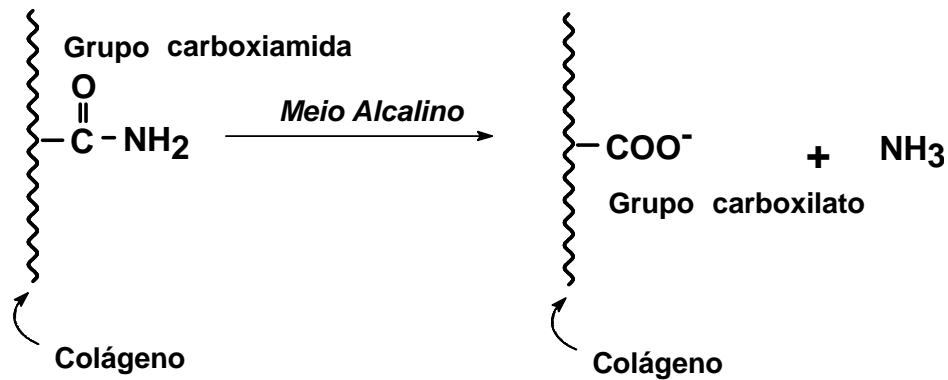


Figura 10 – Representação esquemática da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asparagina e Glutamina presentes no colágeno (BET, 2000).

Matrizes colagênicas obtidas a partir da hidrólise alcalina de pericárdio bovino não apenas se mostraram altamente biocompatíveis (GOISSIS et al., 1999), mas o mais importante, em experimentos em subcutâneo (GOISSIS; SUZIGAN; PEREIRA, 2000) e tibia de rato (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002), o material se integrou a esses tecidos com ausência quase completa de resposta inflamatória crônica.

Membranas derivadas de pericárdio porcino hidrolisadas durante 12 e 24 h e preparadas neste trabalho foram utilizadas simultaneamente no desenvolvimento do mestrado de Flávia Correia Fuso Ottoboni, onde as membranas foram implantadas durante 7, 14, 21, 28 e 35 dias em subcutâneo de rato, mostrando boa biocompatibilidade e baixa resposta inflamatória (OTTOBONI, 2011).

Diante do exposto, a preparação e caracterização de membranas de colágeno tipo I a partir da hidrólise alcalina de pericárdio porcino em diferentes tempos é útil, visto que na literatura não se encontram relatos sobre a obtenção desse material por meio da hidrólise alcalina.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Preparação das Membranas

O pericárdio porcino utilizado para a preparação das membranas foi fornecido pela Braile Biomédica S/A de São José do Rio Preto – SP, que emprega este material no desenvolvimento de válvulas cardíacas (BRAILE, 1990). Os pericárdios foram obtidos em frigorífico, imediatamente após o abate dos animais, sendo estes previamente examinados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). Inicialmente, as peças de pericárdio porcino foram limpas mecanicamente e lavadas alternadamente com água destilada (30 min) e NaCl 0,9% (1 h), à temperatura ambiente. Para a hidrólise alcalina, as peças foram colocadas em uma solução alcalina contendo hidróxidos, sulfatos e cloretos de potássio, sódio e cálcio, a 25°C, por um período de 4 (PP4), 8 (PP8), 12 (PP12) e 24 h (PP24). Após esse período, o material foi equilibrado em uma solução aquosa de cloretos e sulfatos de potássio, sódio e cálcio, por 6 h, seguido de lavagens com ácido bórico 3%, EDTA 0,3% a pH 11. As peças foram então lavadas com água desionizada até pH constante e equilibradas em tampão fosfato 0,13 mol L⁻¹ (TF), pH 7,4 (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). A hidrólise alcalina é um procedimento de rotina no laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) para a preparação de matrizes acelulares derivadas de tecidos biológicos como pericárdio bovino, pele porcina, serosa porcina entre outras matrizes (GIGLIOTI, 2005; RODRIGUES, 2006; BATISTA, 2008; RODRIGUES; MARTINS; PLEPIS, 2010). Após a preparação as membranas foram congeladas, liofilizadas em um equipamento da Edwards modelo Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International, West Sussex, UK) e armazenadas em sacos plásticos selados.

Procedimento Experimental

As membranas obtidas foram denominadas de:

PPN = membrana derivada de pericárdio porcino sem hidrólise alcalina e liofilizada;

PP4 = membrana derivada de pericárdio porcino com 4 h de hidrólise alcalina e liofilizada;

PP8 = membrana derivada de pericárdio porcino com 8 h de hidrólise alcalina e liofilizada;

PP12 = membrana derivada de pericárdio porcino com 12 h de hidrólise alcalina e liofilizada;

PP24 = membrana derivada de pericárdio porcino com 24 h de hidrólise alcalina e liofilizada.

O esquema mostrado na Figura 11 resume a preparação das membranas:

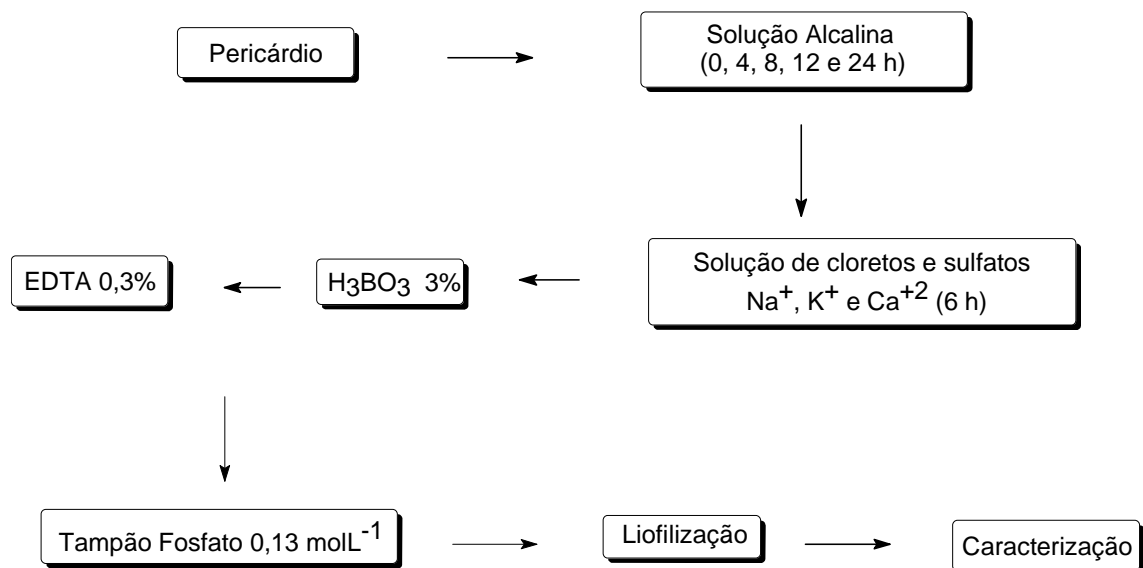


Figura 11 - Esquema da preparação das membranas derivadas de pericárdio porcino.

4.2. Caracterização

O material obtido foi caracterizado por análise histológica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície e da seção transversal, avaliação da citotoxicidade *in vitro*, estabilidade biológica *in vitro* (colagenase), titulação potenciométrica, porcentagem de absorção de água, calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA) e ensaios de tração.

4.2.1. Análise histológica

Esta análise foi realizada com o objetivo de verificar a presença de células e a distribuição das fibras de colágeno nas membranas antes e depois da hidrólise alcalina, por meio da coloração com hematoxilina: eosina (HE).

As lâminas histológicas foram processadas pelo técnico Luiz Antonio Potenza e analisadas pela Prof^a. Dr. Ana Maria Minarelli Gaspar do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

A análise e a fotografia das lâminas foram feitas em um microscópio Olympus BX51 acoplado à câmera digital Olympus DP71 – 12,5 megapixels.

4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises por MEV da superfície das membranas foram feitas em um equipamento LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltda.), operando com feixe de elétrons de 20 keV. As amostras foram fixadas em porta-amostras de alumínio com fita adesiva de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro (20 nm) em um metalizador Balsers modelo SDC 050.

4.2.3. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Esta análise foi realizada pela Dr. Cláudia Bernal no Laboratório de Cultura Celular do Grupo de Fotossensibilizadores – DQFM - IQSC/USP, coordenado da Prof^a. Dr. Janice Rodrigues Perussi.

Antes da realização dos testes, as membranas foram esterilizadas com óxido de etileno pela Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda., Campinas – SP. O objetivo dos processos de esterilização é inativar os contaminantes microbianos presentes no material.

Os métodos de esterilização incluem o uso de óxido de etileno gasoso, radiação γ , autoclave e esterilização por calor. A esterilização com óxido de etileno necessita que o produto seja poroso e seco para permitir a passagem do gás. A radiação γ não necessita que seja seco, mas pode causar reticulações ou desnaturação do material. A esterilização por calor ou autoclave não foi utilizada neste trabalho, pois pode causar danos térmicos no colágeno devido às altas temperaturas (WIEGAND et al., 2009). Assim, neste trabalho optou-se pelo uso do óxido de etileno.

A Tabela 6 mostra os principais métodos de esterilização utilizados em biomateriais à base de colágeno.

Tabela 6 – Métodos de esterilização padrão e sua utilização em materiais à base colágeno
(adaptado de WIEGAND et al., 2009).

Esterilização	Método	Vantagens	Desvantagens
Térmica	Esterilização por vapor (pressão de vapor alta, 120-135°C) Esterilização por calor seco (160-190°C)	Sem resíduos tóxicos	Desnaturação da proteína hidratada
Física	Radiação γ (alta penetração) Radiação β	Efeito rápido, não deixa resíduos	Reticulação e/ou quebra da cadeia
Química	Óxido de etileno	Não há aumento de temperatura	Resíduos tóxicos, necessário processo de aeração

Previamente à realização dos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, foi feita a cultura das linhagens celulares, a qual está descrita a seguir.

4.2.3.1. Cultura celular

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi realizada com as seguintes linhagens celulares:

- linhagem celular de laringe humana (HEp-2), depositada no ATCC (American Type Culture Collection) sob o código CCL-23, a qual é obtida a partir de um carcinoma de laringe humana, de morfologia epitelial e crescimento aderente a um substrato sólido;
- linhagem celular de fibroblastos de rato (McCoy B), depositada no ATCC (American Type Culture Collection) sob o código CRL-1696.

Procedimento Experimental

As linhagens foram cultivadas separadamente em meio ISCOVE'S (Tabela 7), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), ampicilina, estreptomicina. Todas as manipulações com as células foram realizadas em capela de fluxo laminar. Este ensaio está de acordo com a norma ASTM F895-84 (2006). Foram feitos subcultivos das células a cada três dias e as células foram mantidas em estufa de cultura a 37°C, sob uma atmosfera de 5 % de CO₂ e 95 % de ar (CARVALHO, 2001; RODRIGUES; BARBOSA JUNIOR; PERUSSI, 2004).

Para o repique, removeu-se o meio de cultura por aspiração e em seguida, adicionou-se uma solução de tripsina – EDTA 0,02 % e aguardou-se cerca de cinco minutos para que as ligações entre as células e a superfície tratada do frasco rompessem e as células se soltassem. Após este período, transferiu-se o conteúdo do frasco para um tubo cônico, centrifugou-se a 1000 rpm durante 40 segundos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em meio de cultura. Após homogeneização, retirou-se uma alíquota para a contagem do número de células. Em seguida, diluiu-se a suspensão de células com meio ISCOVE'S com 10% de soro fetal bovino e as células foram plaqueadas novamente em frascos apropriados. Para a determinação da viabilidade celular utilizou-se o método da contagem em câmara de Neubauer e o teste da exclusão do corante (CARVALHO, 2001; RODRIGUES; BARBOSA JUNIOR; PERUSSI, 2004).

Tabela 7 - Composição do meio ISCOVE'S.

Componentes	g L⁻¹	Componentes	g L⁻¹
CaCl ₂ (anidro)	0,16500	L-Fenilalanina	0,06600
MgSO ₄ (anidro)	0,09770	L-Prolina	0,04000
KCl	0,33000	L-Serina	0,04200
KNO ₃	0,000076	L-Treonina	0,09500
NaHCO ₃	1,50000	L-Triptofano	0,01600
NaCl	4,50500	L-Tirosina.2Na.2H ₂ O	0,10379
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,12500	L-Valina	0,09400
Na ₂ SeO ₃ (anidro)	0,0000173	D-Biotina	0,000013
L-Alanina	0,2500	Cloreto de Colina	0,00400
L-Arginina.HCl	0,8400	Ácido Fólico	0,00400
L-Asparagina.H ₂ O	0,02840	Mio-Inositol	0,00720
L-Ácido Aspártico	0,03000	Nicotinamida	0,00400
L-Cisteína.2HCl	0,09124	Ácido D-Pantotenico (hemicálcio)	0,00400
L-Ácido Glutâmico	0,07500	Piridoxina.HCl	0,00400
L-Glutamina	0,58400	Riboflavina	0,000400
Glicina (Gly)	0,03000	Tiamina.HCl	0,00400
L-Histidina.HCl.H ₂ O	0,04200	Vitamina B-12	0,000013
L-Isoleucina	0,10500	D-Glucose	4,50000
L-Leucina	0,10500	Sal de Sódio de Vermelho de Fenol	0,01500
L-Lisina.HCl	0,14600	Piruvato de Sódio	0,11000
L-Metionina	0,03000	HEPES	5,95800

Fonte: AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC).

4.2.3.2. Método de difusão em ágar

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi realizada pelo método de difusão em ágar, utilizando-se o corante vermelho neutro (ROGERO et al., 2003). Neste método, a linhagem celular foi colocada em placas de petri e incubada durante 48 h a 37°C e em atmosfera de ar com 5 % de CO₂. Depois que a monocamada de células foi formada, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se um meio de cobertura sólido composto de 50 % do

Procedimento Experimental

meio ISCOVE'S (Sigma) e 50 % de ágar (Sigma) a 1,8 % contendo 0,01 % de vermelho neutro (JT Baker). No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado na mesma proporção com o meio, a uma temperatura de aproximadamente 44°C. Fragmentos dos materiais com cerca de 0,5 cm² de área foram colocados sobre o ágar antes de sua solidificação completa. As placas foram incubadas novamente em estufa com 5 % de CO₂ a 37°C durante 24 h.

Fragmentos de látex estéreis foram utilizados como controle positivo e fragmentos de papel de filtro de natureza atóxica (previamente autoclavados) como controle negativo. As placas foram analisadas macroscopicamente quanto à presença de halo ao redor da amostra (ROGERO et al., 2003). Esse halo está associado à zona clara onde as células não foram coradas pelo corante vermelho neutro e denomina-se índice de zona (IZ), descrito na Tabela 8 (ÓREFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

Tabela 8 – Descrição dos índices de zona (ÓREFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

IZ	Descrição	Classificação
0	Nenhuma zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
1	Zona limitada sob a amostra	Leve
2	Zona inferior a 0,5 cm ao redor da amostra	Suave
3	Zona limitada entre 0,5-1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona superior a 1 cm ao redor da amostra, porém sem envolver toda a placa	Severa
5	Zona que envolve toda a placa	Severa

As membranas foram avaliadas em triplicata para cada uma das duas linhagens celulares utilizadas.

4.2.4. Estabilidade biológica *in vitro* (colagenase)

Para a determinação da estabilidade biológica *in vitro* foi preparada uma solução de colagenase em tampão tris-HCl 10 mmol L⁻¹ a pH 7,4 contendo 25 mmol L⁻¹ de CaCl₂. Após as amostras serem congeladas e liofilizadas até peso constante, foram cortados três discos de 1 cm de diâmetro para cada amostra. A solução de colagenase (10 U mg⁻¹ de colágeno) em tampão tris-HCl pH 7,4, com uma atividade de 30 U mL⁻¹ (unidades enzimáticas/mL de tampão) foi adicionada às amostras que, em seguida, foram colocadas em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C durante 2 h. Após este período, as amostras foram lavadas com água desionizada, congeladas, liofilizadas até peso constante e pesadas.

A porcentagem de massa de colágeno degradada (%*degradação*) foi determinada pela diferença de massa de colágeno antes ($m_{inicial}$) e depois da degradação enzimática (m_{final}), através da Equação 1:

$$\% \text{degradação} = \frac{m_{inicial} - m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Os resultados obtidos foram uma média de três determinações independentes.

4.2.5. Titulação potenciométrica

A hidrólise alcalina provoca alterações no número de grupos carboxílicos. Assim, a titulação potenciométrica possibilitou verificar essa alteração sofrida pelas membranas em função do tempo de hidrólise alcalina, por meio da determinação do número total de grupos carboxílicos.

Inicialmente, amostras de aproximadamente 100 mg previamente equilibradas a pH 7,4 e liofilizadas, foram expandidas em solução de ácido acético 1,0 mol L⁻¹ por um

Procedimento Experimental

período de 24 h e extensivamente lavadas com água desionizada até condutividade constante. A seguir, foram liofilizadas e equilibradas em solução de ácido trifluoracético 0,5 mol L⁻¹ por um período de 24 h, novamente liofilizadas e colocadas sob vácuo até peso constante na presença de KOH sólido. Para cada amostra foram adicionados 30 mL de água desionizada e o conjunto (amostra + água) foi desaerado para completa embebição das membranas. O pH da solução foi ajustado para 2,0 e as amostras foram tituladas com uma solução padrão de NaOH 0,0203 mol L⁻¹ no intervalo de pH de 2,0 a 7,0 (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). O resultado das titulações é uma média de três determinações independentes.

Para a determinação do número de grupos carboxílicos das membranas calculou-se, primeiramente, o número de mols de colágeno por meio das seguintes equações:

$$n_{\text{NaOH}} = M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \quad (2)$$

$$n_{\text{NaOH}} = n_{\text{colágeno}} \quad (3)$$

sendo:

n_{NaOH} o número de mols de NaOH;

$n_{\text{colágeno}}$ o número de mols de colágeno;

M_{NaOH} a molaridade da solução de NaOH, cujo valor é de 0,0203 mol L⁻¹;

V_{NaOH} o volume de NaOH necessário para neutralizar os grupos carboxílicos da molécula de colágeno.

O número de mols de colágeno por grama de colágeno é calculado com a equação 4:

$$n_{\text{colágeno}}/g_{\text{colágeno}} = n_{\text{colágeno}}/m_{\text{colágeno}}(\text{g}) \quad (4)$$

sendo:

$n_{\text{colágeno}}/g_{\text{colágeno}}$ o número de mols de colágeno por grama de colágeno;

$m_{\text{colágeno}}$ a massa de colágeno.

O número total de grupos carboxílicos titulados por molécula de tropocolágeno foi calculado por meio da equação 5:

$$K = M_{\text{colágeno}} \times n_{\text{colágeno}}/g_{\text{colágeno}} \quad (5)$$

sendo:

K o número total de grupos carboxílicos titulados por molécula de tropocolágeno;

$M_{\text{colágeno}}$ a massa molecular do tropocolágeno, cujo valor é de 280000 Da (RAMACHANDRAN, 1967).

O número total de grupos carboxílicos titulados inclui também os grupos α carboxílicos (C-terminais) e os grupos imidazólicos dos resíduos de histidina (NIMNI, 1988). Por isso, deve-se fazer uma correção subtraindo-se esses grupos para obtenção do número de grupos carboxílicos referentes somente aos resíduos de Asn e Gln (Equação 6):

$$GC = K - R \quad (6)$$

sendo:

GC o número de grupos carboxílicos dos resíduos de Asn e Gln.

R o número de grupos carboxílicos (C-terminais) e imidazólicos dos resíduos de histidina, cujo valor é 18.

4.2.6. Porcentagem de absorção de água

Amostras circulares (0,8 cm de diâmetro) das membranas foram pesadas ($m_{inicial}$) e imersas em água miliq (5 mL) por 1 h para determinação da quantidade de água absorvida. Após esse período, as membranas foram retiradas para pesagem, removendo-se o excesso de água superficial com papel de filtro (m_{final}). A porcentagem de água absorvida foi determinada pela relação entre m_{final} e $m_{inicial}$ usando-se a Equação 7. Este ensaio foi realizado com uma média de cinco determinações independentes.

$$\% \text{ água absorvida} = \frac{m_{final} - m_{inicial}}{m_{final}} \times 100 \quad (7)$$

4.2.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A temperatura de desnaturação (Td) das membranas foi determinada utilizando-se um equipamento da TA Instruments modelo DSC – 2010, calibrado com padrão de índio. As amostras foram equilibradas em tampão fosfato 0,13 mol L⁻¹, pH 7,4 por 24 h e as medidas foram realizadas em suportes herméticos de alumínio em atmosfera de ar sintético (80 mL min⁻¹), com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ e em um intervalo de temperatura de 5 a 120°C. As massas das amostras foram de aproximadamente 10 mg e os valores de Td foram obtidos através do ponto de inflexão das curvas DSC (Figura 12).

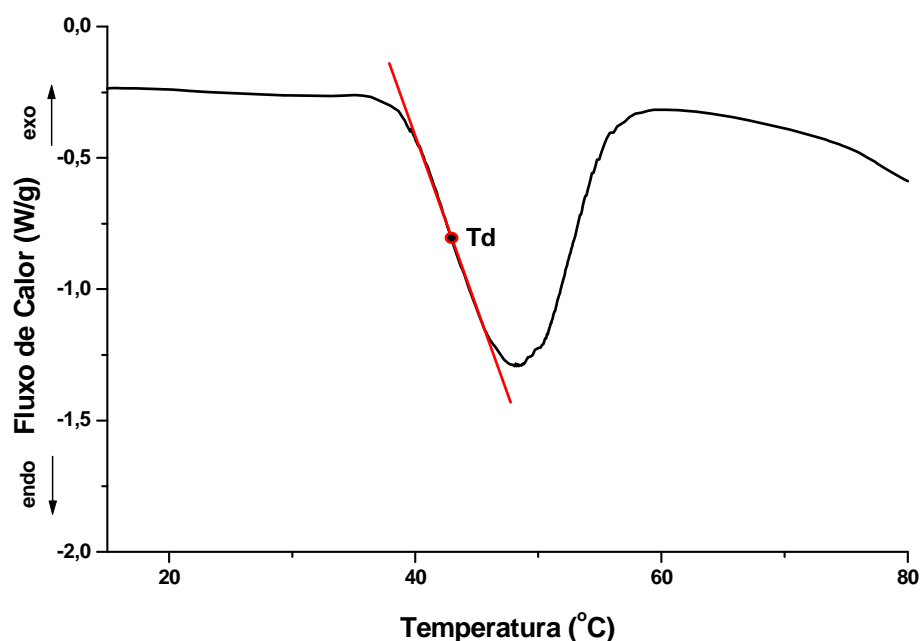


Figura 12 – Curva representativa da determinação de Td por DSC.

4.2.8. Termogravimetria (TG)

Essa técnica foi utilizada para verificar a estabilidade térmica das membranas, através de uma medida quantitativa das variações de massa da amostra associada às variações de temperatura. O equipamento utilizado foi o TGA 2050 da TA Instruments, em atmosfera de ar sintético, com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e com variação de temperatura de 25 a 800°C . As massas de amostras utilizadas foram de aproximadamente 10 mg.

4.2.9. Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)

As medidas de DMTA foram realizadas pelo doutorando Luiz Antonio Ramos do Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas – DFQ - IQSC/USP, coordenado pela Prof^{ta}. Dr. Elisabete Frollini.

Procedimento Experimental

Esta análise foi realizada com o objetivo de verificar o comportamento das membranas quando submetidas a uma solicitação dinâmica. O estudo das propriedades dinâmico-mecânicas das membranas é necessário, uma vez que elas podem ser submetidas a tensões na forma dinâmica durante a sua aplicação.

As análises foram feitas em um equipamento DMA 2980 da TA Instruments, acoplado a um termo-analisador. As garras utilizadas foram do tipo tension film (Figura 13), com as seguintes dimensões das amostras: 10/ 6,3/ 0,1 mm (comprimento/ largura/ espessura), sendo a frequência de 1 Hz, amplitude de oscilação de 4 μm , pré-carga de 0,15 N, razão de aquecimento de $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera estática de ar. As medidas foram feitas com o material liofilizado e a faixa de temperatura de trabalho não excedeu 250°C pois as amostras começam a se decompor.



Figura 13 – Garra utilizada para análise das membranas derivadas de pericárdio porcino no equipamento de DMTA.

Os resultados obtidos foram uma média de três determinações independentes.

4.2.10. Ensaio de tração

Os ensaios de tração foram realizados pelo doutorando Luiz Antonio Ramos do Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas – DFQ - IQSC/USP, coordenado pela Prof^{ta}. Dr. Elisabete Frollini.

As medidas foram realizadas em um equipamento DMTA da marca TA Instruments, modelo 2980, no módulo de tração, utilizando-se pré-carga de 0,01 N, intervalo de força de 0,5 N min⁻¹ até 18 N, temperatura de 30°C, comprimento efetivo de análise (distância entre as garras): ~10 mm e garra do tipo tension film (Figura 13). Esta garra é utilizada para ensaios com filmes e fibras. As dimensões das amostras foram: 10/ 6,3/ 0,1 mm (comprimento/ largura/ espessura)

Esta análise é uma maneira rápida e simples de avaliar as propriedades mecânicas dos materiais através do tracionamento de um corpo de prova até a sua ruptura. Utilizou-se o equipamento DMA devido ao fato dele ser mais adequado para o ensaio de tração de materiais finos, já que em dispositivos convencionais de testes físicos a tensão aplicada por eles provoca a ruptura do material antes de avaliar seu desempenho tornando, assim, duvidosa a precisão dos resultados (ALMEIDA, 2009).

Os ensaios de tração fornecem dados como resistência à tração na ruptura, porcentagem de deformação e alongamento, os quais estão associados à resistência e elasticidade do material quando submetidos a uma força de tração (BORGOGNONI, 2009). Estas informações são essenciais pois irão definir a aplicação em que o material poderá ser utilizado.

Os resultados obtidos foram uma média de quatro determinações independentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes de ser tratado e liofilizado, o pericárdio porcino se apresentava mole, flexível, com coloração branca e transparente em algumas regiões (Figura 14).



Figura 14 – Fotografia digital do pericárdio porcino fornecido pela Braile Biomédica S/A antes do tratamento.

Após a hidrólise alcalina as membranas, em todos os casos, apresentaram coloração branca, aspecto de frágeis e finas. A espessura foi medida utilizando-se um micrômetro Mitutoyo. Os valores obtidos (Tabela 9) mostraram que após a hidrólise alcalina não houve alteração significativa da espessura das membranas.

Tabela 9 - Espessura das membranas derivadas de pericárdio porcino em função do tempo de hidrólise alcalina.

Membrana	Espessura (mm)
PPN	0,19±0,07
PP4	0,21±0,04
PP8	0,18±0,07
PP12	0,21±0,07
PP24	0,23±0,11

Resultados e Discussão

As pequenas diferenças observadas na espessura das membranas podem ser atribuídas à heterogeneidade do tecido e também à hidrólise alcalina, que deve tornar o material um pouco mais entumecido do que o nativo. Esses valores estão próximos do valor obtido por Morales; Casado e Hosman (1996), que foi $0,17 \pm 0,04$.

A Figura 15 mostra o aspecto macroscópico das membranas derivadas de pericárdio porcino, onde não é possível observar diferenças significativas entre elas, todas apresentando o mesmo aspecto.

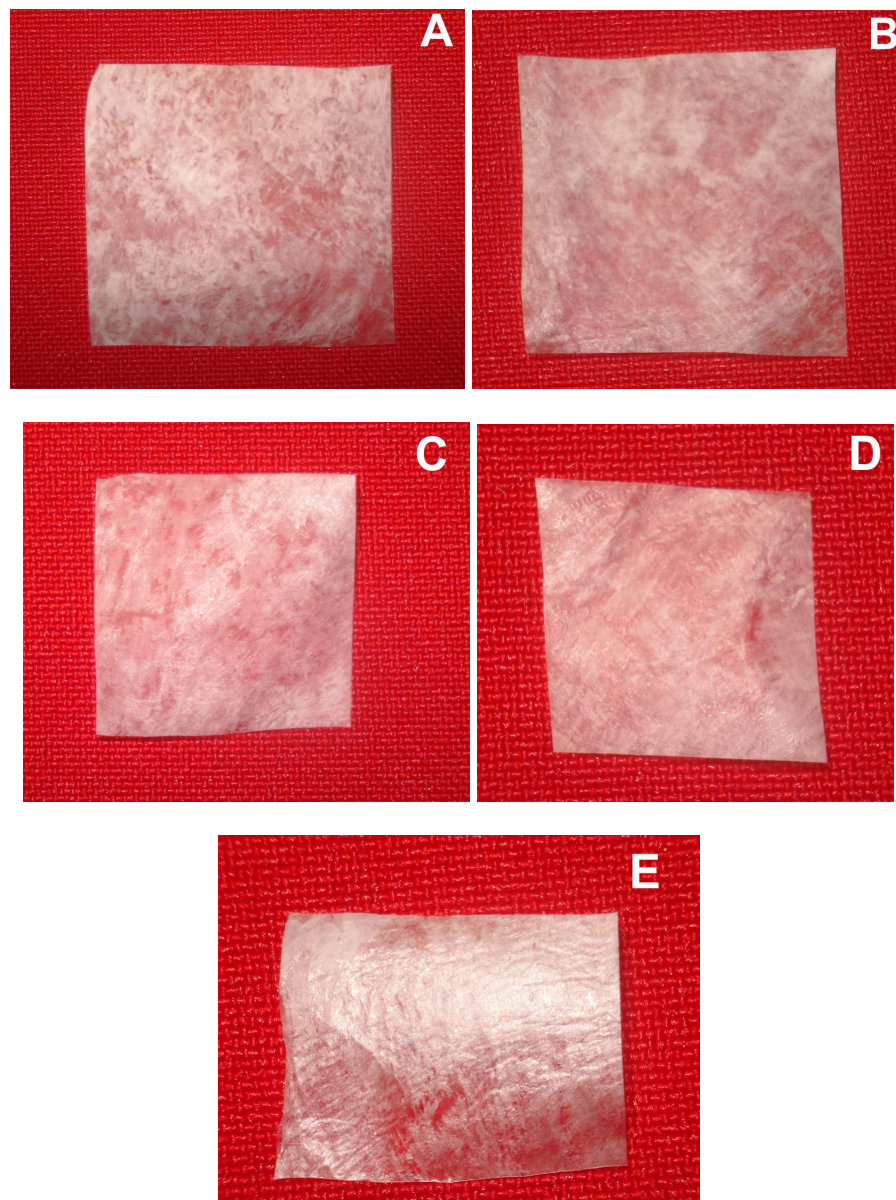


Figura 15 – Fotografias digitais das membranas: **A)** PPN; **B)** PP4; **C)** PP8; **D)** PP12; **E)** PP24.

Portanto, macroscopicamente, não foi possível observar diferença entre elas, independente do tempo de hidrólise.

5.1. Análise histológica

A avaliação microscópica do material foi feita por amostragem aleatória em fragmentos de pericárdio, com o objetivo de estabelecer o padrão histológico presente no material em estudo e demonstrar a efetividade da decelularização. Além disso, foi possível verificar a presença ou não de células e fibras de colágeno antes e após a hidrólise alcalina por meio da coloração com hematoxilina e eosina (HE). A hematoxilina cora em azul os núcleos celulares, enquanto a eosina cora as fibras de colágeno de rosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

As fotomicrografias das lâminas histológicas podem ser vistas na Figura 16.

Os espaços (partes brancas) presentes em algumas fotomicrografias podem ser atribuídos aos processos de desidratação em álcool, diafanização com xilol e inclusão em parafina. Esses processos podem fazer com que ocorra uma separação no material e, assim, a presença de espaços nas lâminas.

Para a membrana PPN (Figura 16A) observou-se a presença de células e a ondulação natural das fibras de colágeno. Após 4 h de hidrólise (Figura 16B), observou-se a ausência de células, e a preservação da ondulação das fibras de colágeno. Após 12 h de hidrólise (Figura 16D), as fibras de colágeno ainda estavam presentes, porém perderam sua ondulação natural. Isso ocorre provavelmente devido ao rompimento das ligações de reticulação naturais entre as fibras de colágeno em função da hidrólise alcalina. Esse mesmo comportamento foi observado para a membrana PP24. Resultados semelhantes foram obtidos

Resultados e Discussão

por Giglioti (2005) para matrizes de PB, porém as células só foram removidas das matrizes após 12 h de hidrólise.

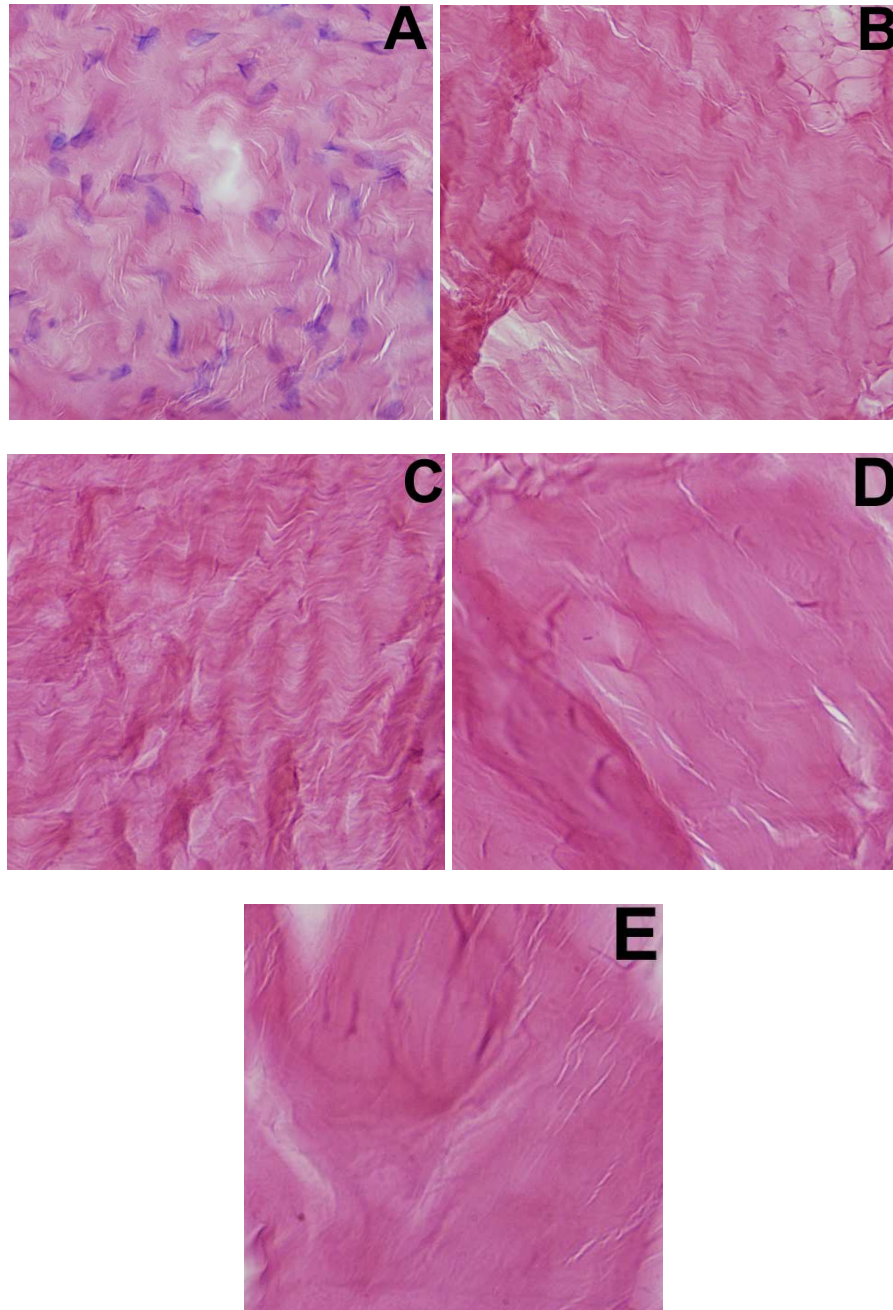


Figura 16 - Fotomicrografias das lâminas histológicas das membranas. **A)** PPN; **B)** PP4; **C)** PP8; **D)** PP12; **E)** PP24. (HE, 40X).

A decelularização envolve a remoção da maioria dos componentes celulares imunogênicos, incluindo as membranas lipídicas e proteínas solúveis, mantendo a integridade das proteínas que fazem parte da matriz extracelular.

Os resultados da análise histológica mostraram que as membranas hidrolisadas apresentaram-se acelulares a partir de 4 h de hidrólise, mostrando que a hidrólise alcalina remove as células com tempo de tratamento menor para membranas derivadas de pericárdio porcino do que para matrizes de pericárdio bovino.

5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu avaliar a morfologia das membranas liofilizadas antes e após a hidrólise alcalina. As análises por MEV da superfície possibilitaram a identificação dos pericárdios fibroso (superfície fibrosa) e seroso (superfície lisa). Como mencionado anteriormente, o pericárdio apresenta uma superfície fibrosa (superfície externa) e outra lisa (superfície interna). Assim, foram feitas fotomicrografias dos dois lados do pericárdio. As Figuras 17e 18 mostram, respectivamente, as fotomicrografias da superfície lisa e da superfície fibrosa das membranas.

A superfície lisa das membranas liofilizadas é mostrada na Figura 17. Todas elas apresentaram uma estrutura fibrilar, e foi possível observar que após a hidólise a estrutura das membranas ficaram com aspecto de entumecidas (Figuras 17B-E).

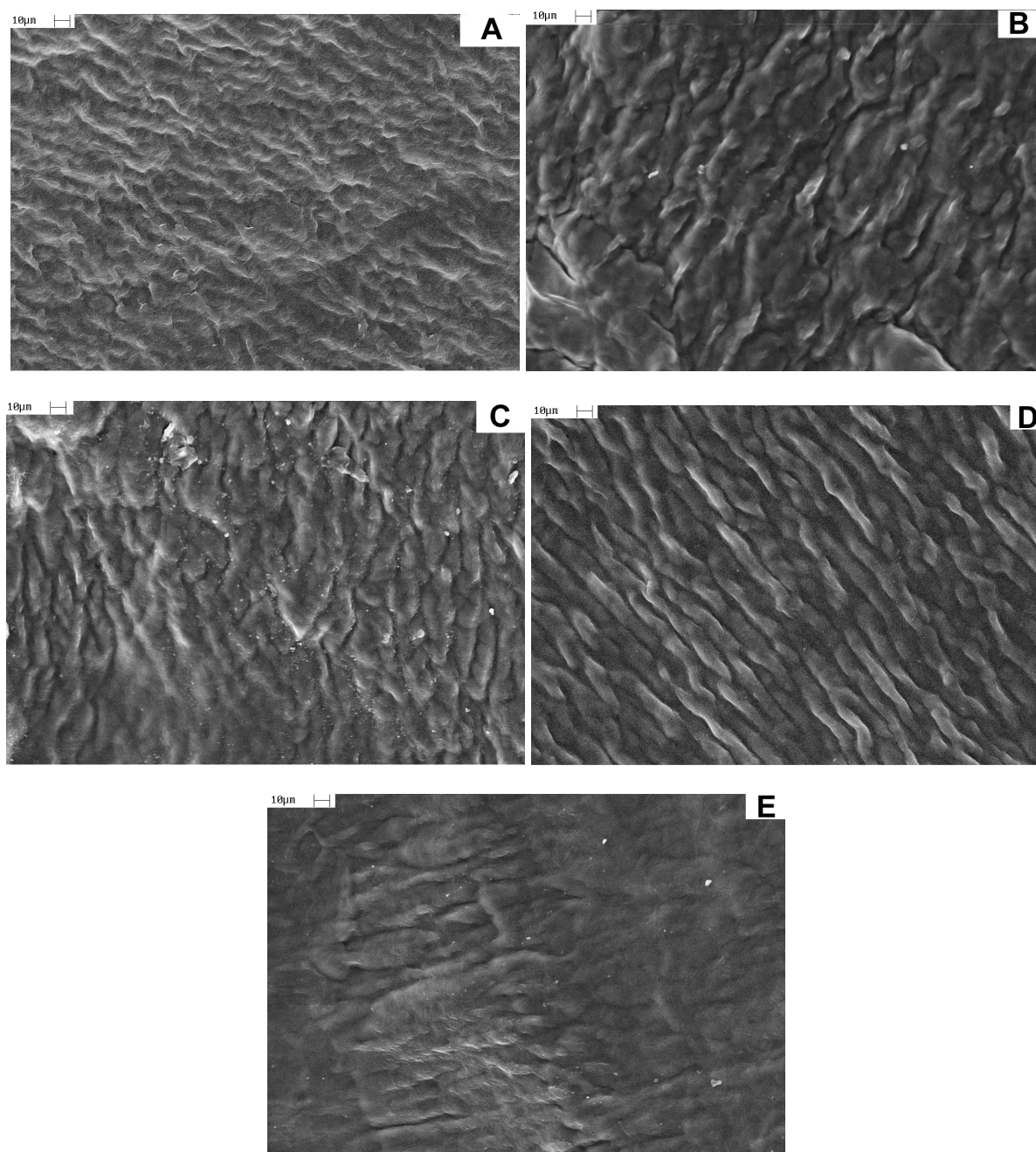


Figura 17 - Fotomicrografias da superfície lisa das membranas. **A)** PPN; **B)** PP4; **C)** PP8; **D)** PP12; **E)** PP24. Aumento de 1000X.

A Figura 18A mostra a estrutura da superfície fibrosa (externa) da membrana PPN, com as fibras de colágeno numa orientação randômica com interstícios de tamanhos e formas variadas. A morfologia e as dimensões tiveram pequenas alterações após a hidrólise

Resultados e Discussão

alcalina (Figuras 18B-E), mostrando que o tempo de hidrólise pouco afetou a morfologia da superfície fibrosa das membranas.

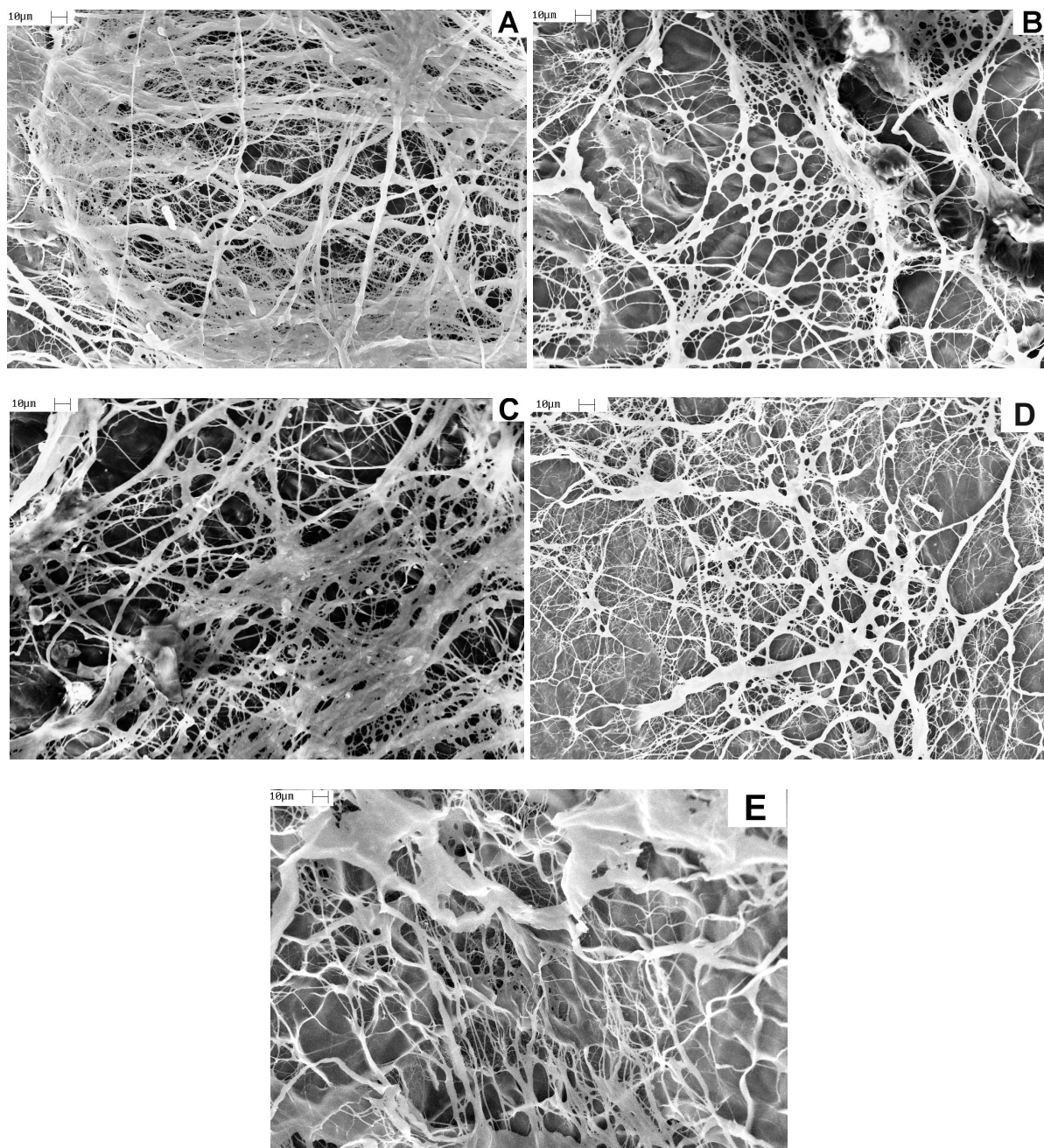


Figura 18 - Fotomicrografias da superfície fibrosa das membranas. A) PPN; B) PP4; C) PP8; D) PP12; E) PP24. Aumento de 1000X.

5.3. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi realizada pelo método de difusão em ágar. Este método utiliza uma monocamada de células com uma cobertura semi-sólida de ágar onde o material testado é colocado. O ensaio é baseado na migração ou difusão, através do ágar, de substâncias tóxicas do material testado para a monocamada celular. A difusão lenta de substâncias tóxicas através do ágar resulta em uma zona de células mortas ao redor do material testado (NORTHUP; CAMMACK, 1999).

A citotoxicidade foi avaliada através da medida do diâmetro do halo formado usando uma régua milimétrica. Este halo é observado quando há morte de células, liberando o corante vermelho neutro incorporado nelas, dando um aspecto transparente ao local. O controle positivo (látex estéril) apresentou um halo de 12,0 mm (Figura 19A), enquanto o controle negativo (papel de filtro de natureza atóxica) não apresentou halo (Figura 19B).

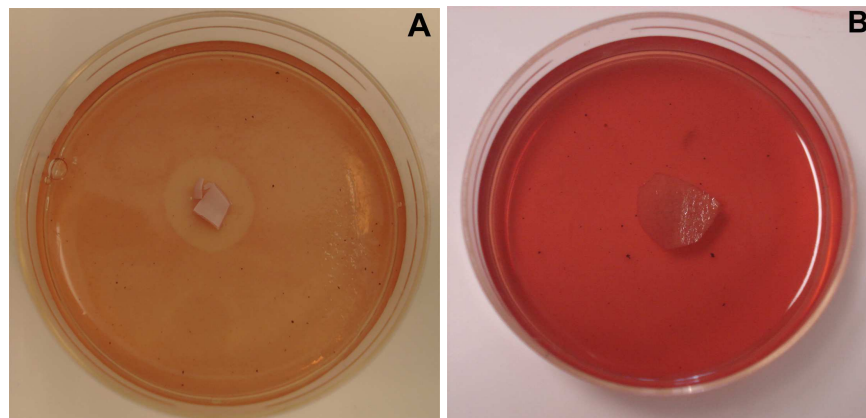


Figura 19 - Avaliação da citotoxicidade *in vitro*: **A)** Controle Positivo; **B)** Controle Negativo.

A Figura 20 mostra os resultados de citotoxicidade *in vitro* para as membranas derivadas de pericárdio porcino, onde se pode ver que nenhuma das membranas apresentou halo que indicaria morte celular.

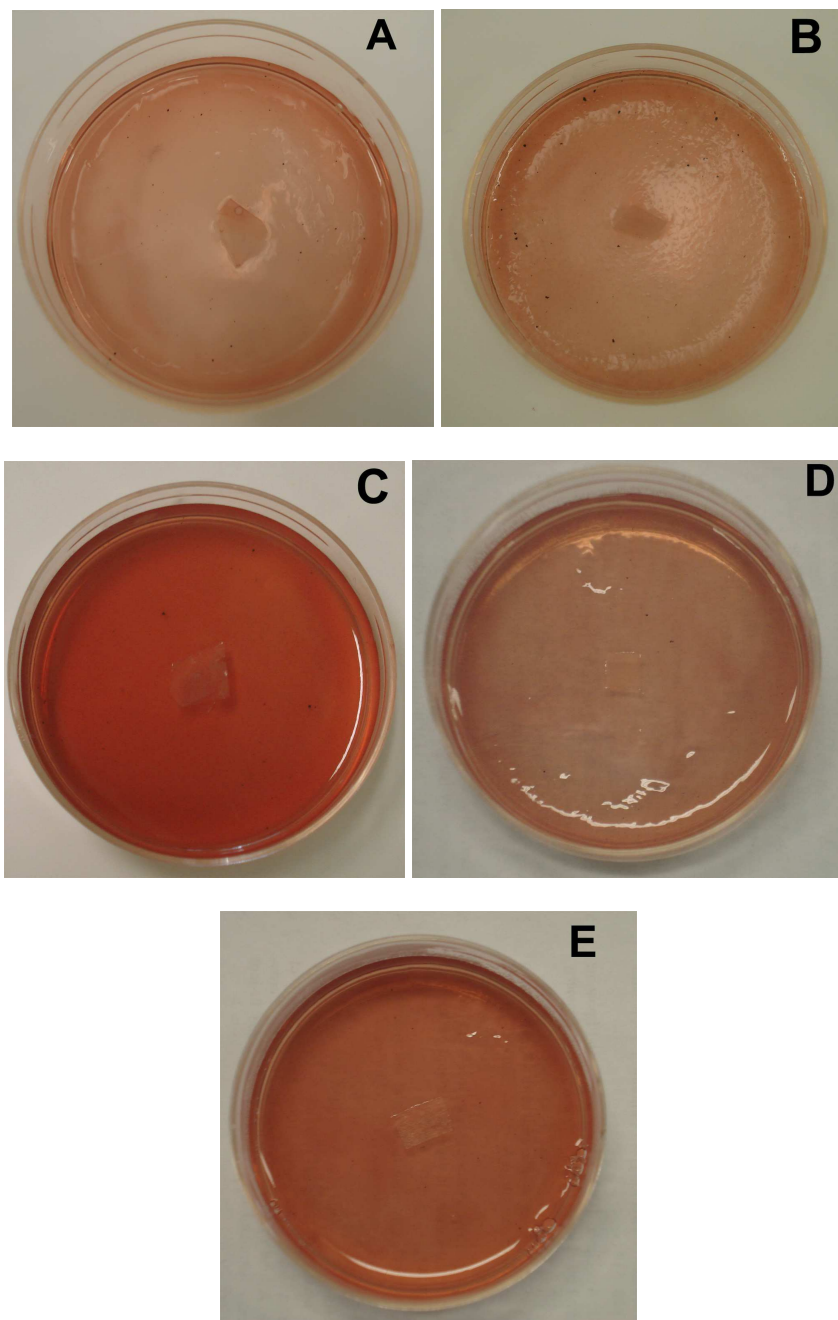


Figura 20 - Avaliação da citotoxicidade *in vitro* para a linhagem HEp-2: A) PPN; B) PP4; C) PP8; D) PP12; E) PP24.

Os resultados obtidos através da avaliação da citotoxicidade *in vitro* mostraram que todas as membranas deste trabalho não apresentaram halo, indicando que elas não são citotóxicas, tanto para a linhagem celular HEp-2, como para a McCoy B.

5.4. Estabilidade biológica *in vitro* (colagenase)

Os ensaios de estabilidade biológica por colagenase foram feitos por ser uma indicação relativa da biodegradabilidade do material pós-implante. A degradação *in vitro* do colágeno pela colagenase ocorre em três etapas (Figura 21): após a difusão da colagenase para o substrato de colágeno, a enzima tem que adsorver sobre a superfície do colágeno e, posteriormente, a degradação ocorre (METZMACHER, 2005). As porcentagens de degradação enzimática estão descritas na Tabela 10.

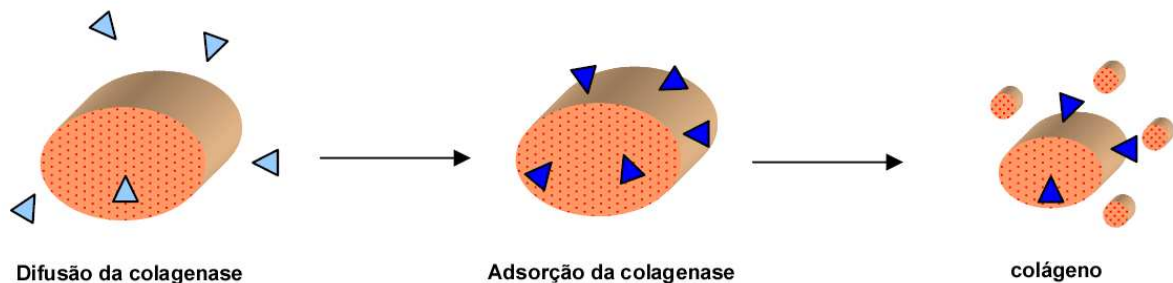


Figura 21 – Ilustração esquemática da degradação das membranas de colágeno.
 ▲ colagenase livre; ▲ colagenase adsorvida (adaptado de METZMACHER, 2005).

Os ensaios de estabilidade biológica por colagenase mostraram que após a hidrólise alcalina houve um aumento da degradação enzimática, a qual foi maior com o aumento do tempo de hidrólise. Isso ocorre porque após a hidrólise alcalina as membranas tornam-se mais susceptíveis à degradação enzimática (RADHIKA; SEHGAL, 1997) devido o aumento do número de cargas negativas na molécula de colágeno em função do tempo de hidrólise, o qual gera uma alteração na distribuição de cargas e, conseqüentemente, uma repulsão eletrostática nas membranas. Assim, as membranas hidrolisadas são degradadas mais rapidamente do que a membrana PPN. Esse comportamento também foi observado em trabalhos realizados anteriormente no grupo com matrizes derivadas de pericárdio bovino (GIGLIOTI, 2005). As condições de degradação enzimática utilizadas para o PB foram as

Resultados e Discussão

mesmas das membranas derivadas de PP, com exceção do tempo de exposição à colagenase, que foi de 1 h para o PB e 2 h para as membranas derivadas de PP, ou seja, as membranas derivadas de PP ficaram expostas à colagenase o dobro do tempo. Sendo assim, esperava-se que as matrizes derivadas de PB degradassem menos que as membranas de PP, no entanto, isso não foi observado.

Tabela 10 - Porcentagens de degradação enzimática das membranas derivadas de pericárdio porcino.

Membrana	% degradação enzimática*
PPN	22,1±1,1
PP4	27,8±0,4
PP8	32,5±0,9
PP12	41,4±0,8
PP24	69,7±1,2

* valores médios de três determinações

A Figura 22 mostra a porcentagem de degradação enzimática por colagenase em função do tempo de hidrólise alcalina. Comparando-se as membranas desenvolvidas neste trabalho e as matrizes de pericárdio bovino (GIGLIOTI, 2005), observou-se que elas apresentaram valores bem próximos de porcentagem de degradação até 12 h de hidrólise. Após 12 h de hidrólise alcalina observa-se que a matriz derivada de pericárdio bovino degrada mais que a membrana derivada de pericárdio porcino. No entanto, o tempo de hidrólise enzimática usado para o PB foi metade do tempo utilizado para as membranas derivadas de PP, ou seja, as matrizes de PB degradam mais que as membranas derivadas de PP e em um tempo menor de exposição à enzima. Visualmente, observou-se ao final dos ensaios de degradação *in vitro* para as membranas derivadas de PP que as soluções de colagenase

Resultados e Discussão

estavam turvas, e quanto maior o tempo de hidrólise alcalina, mais turva a solução estava, sugerindo que o colágeno presente nas membranas foi degradado.

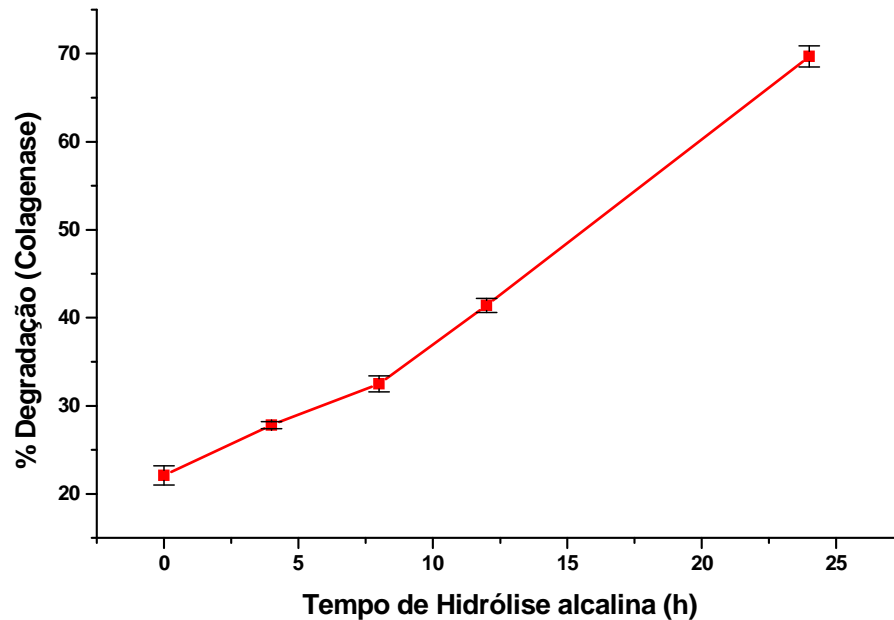


Figura 22 – Porcentagem de degradação enzimática por colagenase em função do tempo de hidrólise alcalina.

As membranas PP12 e PP24 preparadas neste trabalho mostraram a mesma tendência quando implantadas em subcutâneo de ratos, ou seja, a membrana com 24 h de hidrólise degradou mais do que a membrana com 12 h de hidrólise. A biodegradabilidade *in vivo* em subcutâneo de rato mostrou que após 35 dias as membranas PP12 e PP24 estavam totalmente degradadas e apresentavam baixa resposta inflamatória, mostrando que elas são biocompatíveis e sugerindo sua utilização como matriz para crescimento tecidual (OTTOBONI, 2011).

Materiais com diferentes porcentagens de degradação são fundamentais para a área de reconstrução de tecidos, pois podem ser utilizados em aplicações que necessitem de tempos diferenciados de regeneração tecidual.

5.5. Titulação potenciométrica

As titulações potenciométricas permitiram determinar a extensão da hidrólise dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln a grupos carboxílicos nas membranas derivadas de pericárdio porcino que passaram pela hidrólise alcalina.

Assim, determinou-se o número de grupos carboxílicos das membranas e o incremento desses grupos por molécula de colágeno tendo como referência (zero) a membrana de PPN, mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Número e incremento de grupos carboxílicos das membranas derivadas de pericárdio porcino.

Membrana	Nº de grupos carboxílicos*	Incremento
PPN	237±2	0
PP4	258±1	21±1
PP8	264±2	27±2
PP12	269±1	32±1
PP24	283±2	46±2

* valores médios de três determinações

Observou-se através da titulação potenciométrica que houve um aumento no número de grupos carboxílicos tituláveis nas membranas hidrolisadas, o qual variou de 237±2 para a membrana de PPN até 283±2 para a membrana de PP24 (Tabela 11). Após 24 h de hidrólise houve um incremento de 46±2 cargas negativas por unidade de tropocolágeno. Observou-se também que quanto maior o tempo de hidrólise, maior foi o número de grupos carboxílicos tituláveis e, conseqüentemente, maior o incremento de cargas negativas

incorporadas na molécula de colágeno, sendo proporcionais ao tempo de hidrólise. Esse comportamento também foi observado para matrizes derivadas de PB (GIGLIOTI, 2005).

A Figura 23 mostra que as membranas derivadas de pericárdio porcino e pericárdio bovino tem número de grupo carboxílicos bem próximos, indicando que, independente do tipo de tecido (PP ou PB), a hidrólise alcalina gerou um aumento similar do número de cargas negativas em função do tempo de hidrólise.

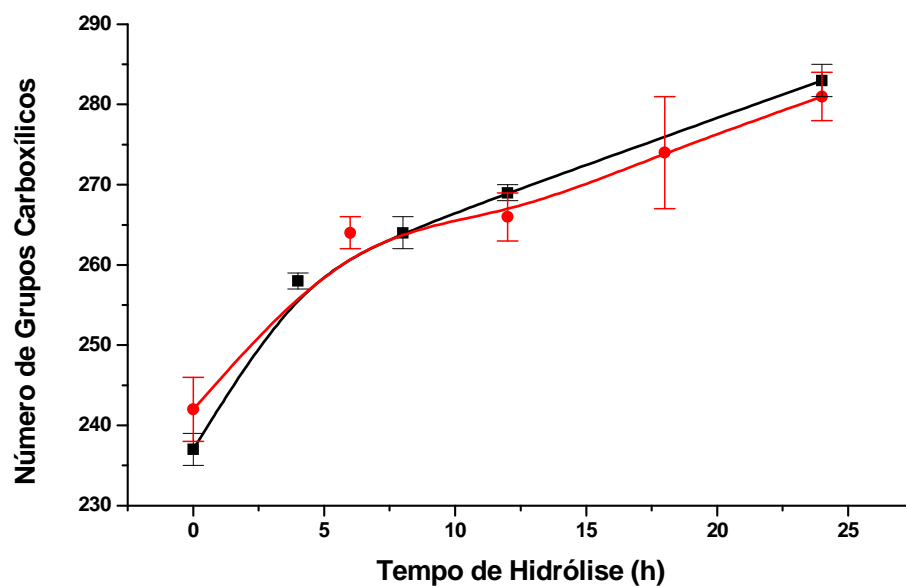


Figura 23 – Número de grupos carboxílicos tituláveis por molécula de colágeno em função do tempo de hidrólise alcalina.
— PP; — PB (GIGLIOTI, 2005).

5.6. Porcentagem de Absorção de Água

A porcentagem de absorção de água é um dado útil, pois materiais que absorvem mais fluídos auxiliam no crescimento celular. Os resultados de porcentagem de água absorvida (Tabela 12) mostram que as membranas hidrolisadas apresentaram uma maior absorção de água quando se aumenta o tempo de hidrólise alcalina. Esse aumento ocorre devido à formação de novos grupos carboxílicos através da hidrólise, comprovado pelos

Resultados e Discussão

resultados dos ensaios de titulação potenciométrica, que mostraram um aumento na quantidade de grupos carboxílicos quando se aumenta o tempo de hidrólise. Assim, ocorre uma alteração na quantidade de cargas na molécula de colágeno, influenciando a quantidade de água absorvida pelas membranas hidrolisadas.

Tabela 12 - Porcentagem de água absorvida das membranas derivadas de pericárdio porcino.

Membrana	% água absorvida*
PPN	42,9±1,2
PP4	47,3±1,1
PP8	48,1±1,4
PP12	48,3±1,0
PP24	52,2±1,2

* valores médios de cinco determinações

O incremento de grupos carboxílicos em função da porcentagem de água absorvida pode ser visto na Figura 24.

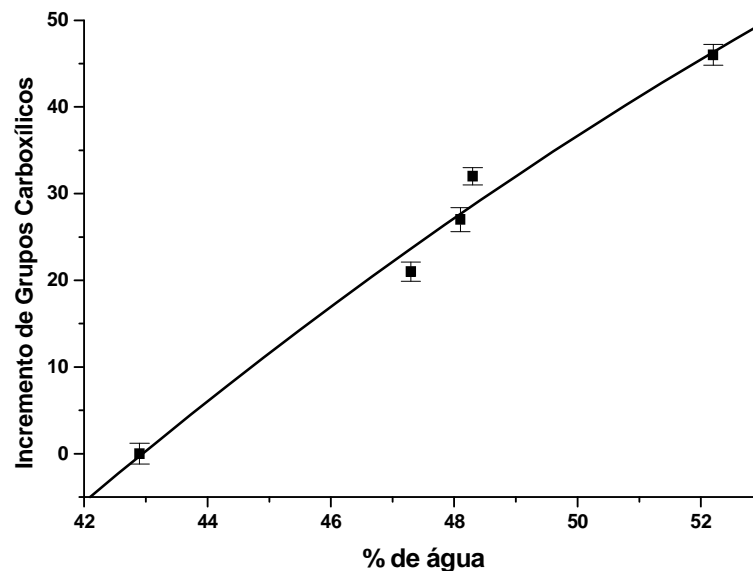


Figura 24 – Número de grupos carboxílicos tituláveis por molécula de colágeno no pericárdio porcino em função da porcentagem de água absorvida.

Estes resultados sugerem que é possível preparar materiais com diferentes graus de absorção de água, podendo ser utilizados em diferentes aplicações na área de biomateriais.

5.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise por DSC permitiu determinar a temperatura de desnaturação (T_d) das membranas, a qual está relacionada à transição do colágeno→gelatina (Figura 25), ou seja, a transição de uma estrutura altamente organizada, para uma estrutura com distribuição desordenada, com a dissociação das três cadeias (BADEA et al., 2008; BADI; HOWELL, 2003). Assim, comprovou-se que o colágeno não foi desnaturado durante a hidrólise alcalina, pois a gelatina não apresenta transição térmica na faixa de temperatura estudada (FLANDIN; BUFFEVANT; HERBAGE, 1984).

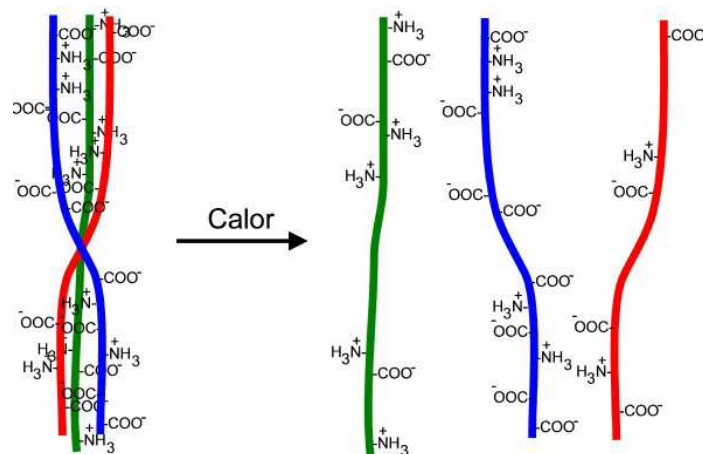


Figura 25 – Esquema da desnaturação do colágeno.

Nas curvas DSC essa transição aparece como uma descontinuidade na linha de base, que é proporcional a diferença na capacidade de calor antes e após a desnaturação, o que permite o uso da técnica para determinar T_d .

As curvas DSC das diferentes membranas acelulares estão mostradas na Figura 26, onde foi possível observar que os valores de T_d diminuíram em função do aumento do

tempo de hidrólise alcalina, podendo estar associado ao rompimento das ligações cruzadas do tecido, ao aumento do número de cargas negativas na membrana de colágeno e à desorganização da estrutura fibrilar da matriz colagênica (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001).

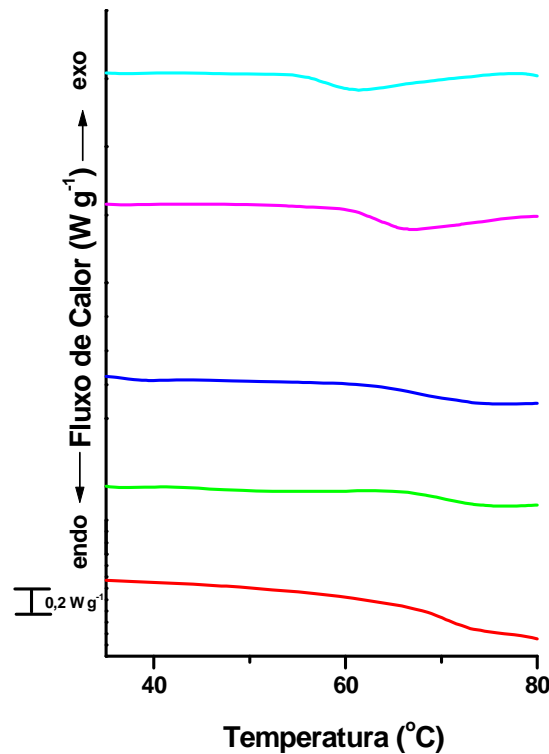


Figura 26 – Curvas DSC das membranas derivadas de pericárdio porcino.

— PPN; — PP4; — PP8; — PP12; — PP24

Essa desorganização ocorre porque após a hidrólise há uma alteração na distribuição de cargas da membrana (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998), a qual causa uma diminuição de Td. O aumento no conteúdo de cargas foi comprovado pelos resultados de titulação potenciométrica. Esse comportamento tem sido sistematicamente observado em outros trabalhos do grupo com matrizes biológicas de diferentes origens como pericárdio bovino, pele porcina, serosa porcina, tendão bovino e de avestruz (GIGLIOTI, 2005; RODRIGUES, 2006; RODRIGUES; MARTINS; PLEPIS, 2010; BATISTA, 2008; KIRSCHBAUER, 2009).

A Tabela 13 mostra os valores de Td obtidas após diferentes tempos de hidrólise alcalina das membranas derivadas de pericárdio porcino.

Tabela 13 - Temperatura de desnaturação (Td) das membranas derivadas de pericárdio porcino obtidas através das curvas de DSC.

Membrana	Td (°C)
PPN	71,2
PP4	70,9
PP8	67,2
PP12	63,5
PP24	58,5

A temperatura de desnaturação em função do tempo de hidrólise alcalina pode ser vista na Figura 27 e observa-se que após 4 h de hidrólise o valor de Td diminui pouco quando comparada com a membrana PPN. A partir de 8 h de hidrólise pode-se observar uma considerável diminuição de Td, ou seja, o valor da temperatura de desnaturação diminui gradativamente com o aumento do tempo de hidrólise.

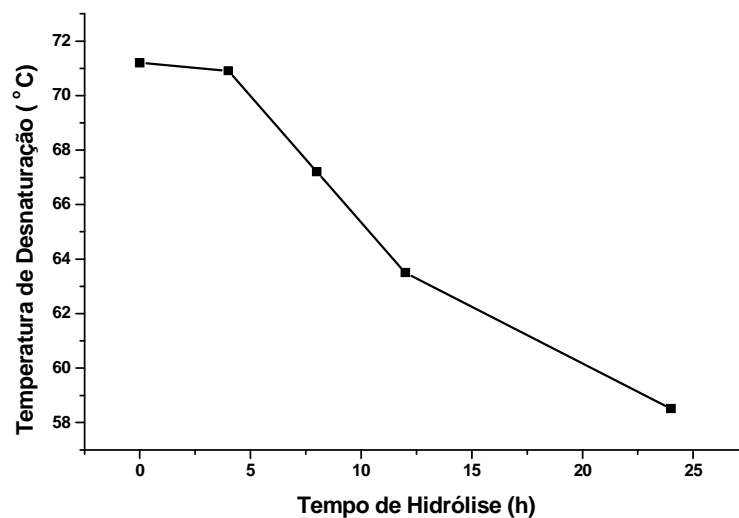


Figura 27 – Temperatura de desnaturação (Td) em função do tempo de hidrólise alcalina.

Comparando-se os resultados obtidos por DSC com os obtidos por estabilidade biológica *in vitro* (colagenase), verifica-se que quanto menor Td, maior a porcentagem de degradação enzimática, indicando que após a hidrólise alcalina houve o rompimento de ligações cruzadas do tecido juntamente com o aumento do número de cargas negativas e, conseqüentemente, ocorre uma repulsão entre as moléculas de colágeno, tornando a membrana mais susceptível à degradação e à desnaturação. Portanto, os resultados obtidos através de DSC estão de acordo com os obtidos através da degradação enzimática.

Além disso, esses resultados corroboram com os obtidos por porcentagem de absorção de água, pois com o aumento da quantidade de cargas negativas nas membranas observou-se uma diminuição nos valores de Td e um aumento na quantidade de água absorvida.

5.8. Termogravimetria (TG)

Através da termogravimetria, foi possível verificar a degradação térmica das membranas e observar as mudanças que ocorreram ou não nessa degradação após a hidrólise alcalina. As curvas termogravimétricas são mostradas na Figura 28 e pode-se observar que elas apresentam comportamento similar, com decomposição em três etapas: a primeira corresponde à perda de água entre 25-200°C; a segunda, entre 200-450°C, relacionada à decomposição da proteína; enquanto a terceira, entre 450-800°C, mostra a carbonização dos materiais residuais (BATISTA, 2008).

Na primeira etapa da decomposição (25-200°C), observou-se que as perdas de massa variaram de 10,5 a 11,8 %, sendo que a membrana PPN apresentou a menor quantidade de água (10,5 %) e a membrana PP4 a maior (11,8 %). Esses resultados nos mostram que após a hidrólise não houve uma variação significativa da quantidade de água das membranas. Esse

Resultados e Discussão

comportamento não era esperado, uma vez que quanto maior a quantidade de cargas negativas, maior deveria ser a quantidade de água retida pelas membranas, como já foi observado em outros trabalhos realizados no grupo (RODRIGUES, 2006; BATISTA, 2008).

A decomposição da matéria orgânica ocorreu na segunda etapa (200-450°C), e observou-se que as perdas de massa variaram de 47,7 % para a membrana PP24 a 57,6 % para a membrana PP8, ou seja, não houve relação entre o tempo de hidrólise alcalina e a decomposição da proteína. Quando essa região é ampliada (detalhe da Figura 28), é possível observar que a decomposição da membrana PPN ocorre em temperaturas maiores do que as membranas hidrolisadas. Após a hidrólise, a temperatura de decomposição foi menor, mas não houve relação entre o tempo de hidrólise alcalina e a temperatura de decomposição da proteína. As membranas apresentaram resíduos baixos, em torno de 0,7%, com exceção da membrana PP8, que não apresentou resíduo.

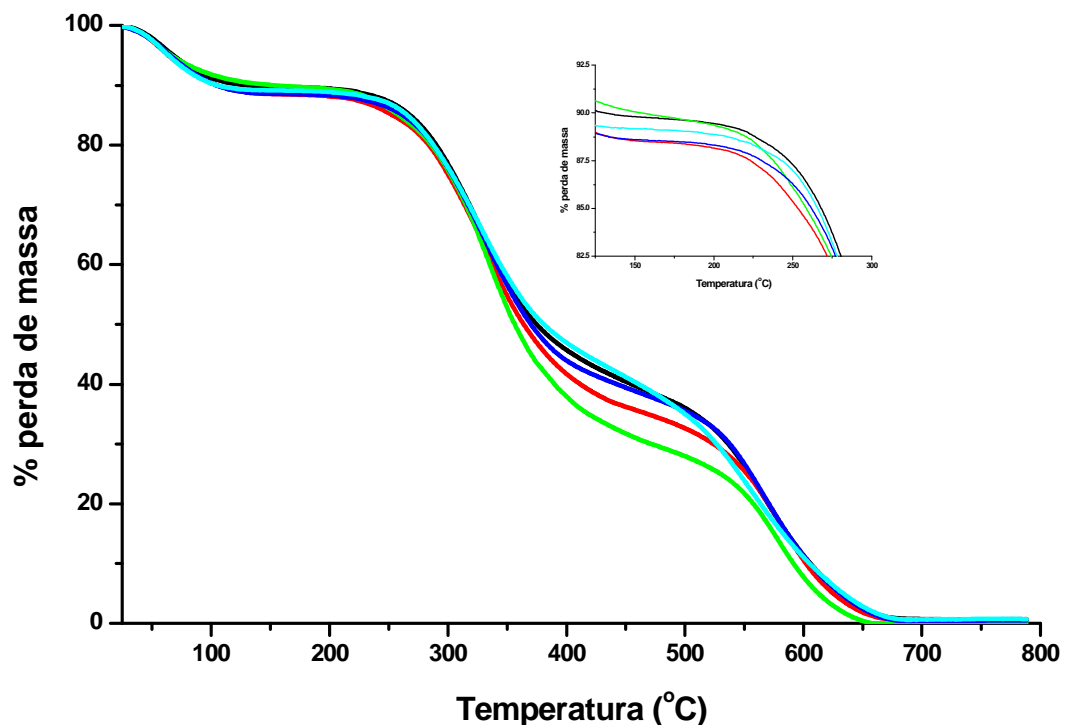


Figura 28 – Curvas TG das membranas derivadas de pericárdio porcino.
— PPN; — PP4; — PP8; — PP12; — PP24.

A Tabela 14 mostra as porcentagens de perda de massa das membranas derivadas de pericárdio porcino.

Tabela 14 - Porcentagens de perda de massa das membranas derivadas de pericárdio porcino obtidas através de dados termogravimétricos.

Membrana	% Perda de massa			Resíduo em 800°C (%)
	25-200°C	200-450°C	450-800°C	
PPN	10,5	49,1	39,7	0,7
PP4	11,8	52,0	35,5	0,7
PP8	10,6	57,5	31,9	0
PP12	11,5	48,9	38,9	0,7
PP24	11,1	47,7	40,5	0,7

Através das curvas TG, foi possível observar que todas as membranas apresentaram suas curvas com comportamento similares, sugerindo que a hidrólise alcalina não afetou a degradação térmica do colágeno.

5.9. Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)

A análise térmica dinâmico-mecânica dá informações sobre os módulos de armazenamento (E'), de perda (E'') e amortecimento mecânico ou atrito interno ($\tan \delta = E''/E'$) de um material medindo-se a deformação sofrida por ele sob variação de temperatura quando sujeito a uma solicitação dinâmica (CANEVAROLO, 2004; BORGOGNONI, 2009). O módulo de armazenamento (E') é a resposta elástica do material e está relacionado à habilidade em armazenar energia, sendo correspondente à energia completamente recuperável, enquanto o módulo de perda é a resposta viscosa, relacionado à habilidade do

Resultados e Discussão

material em dissipar energia, correspondendo à energia perdida na forma de calor. O amortecimento mecânico ou atrito interno ($\tan \delta = E''/E'$), também conhecido como tangente de perda é a razão entre o módulo de perda e o módulo de armazenamento e apresenta valores menores para materiais mais rígidos, enquanto materiais mais flexíveis irão apresentar valores de $\tan \delta$ maiores (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Esses três parâmetros (E' , E'' e $\tan \delta$) são obtidos em função da temperatura ou frequência e estão correlacionados com propriedades como tenacidade, resistência ao impacto, tempo de vida sob fadiga, rigidez, entre outras propriedades (CANEVAROLO, 2004). A Figura 29 mostra a dependência do módulo de armazenamento e do módulo de perda com a temperatura para materiais poliméricos

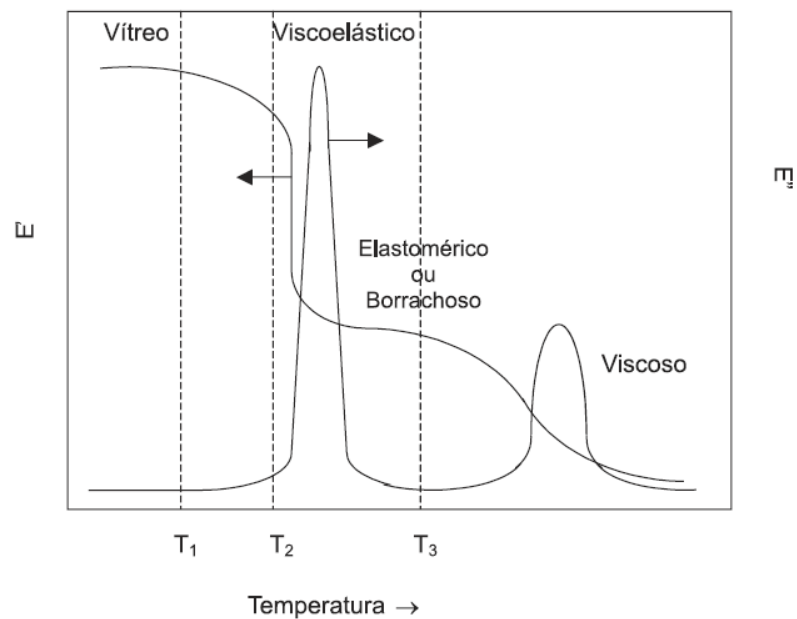


Figura 29 – Dependência dos módulos de armazenamento (E') e perda (E'') com a variação da temperatura para materiais poliméricos. $T_1 < T_2 < T_3$ (CASSU; FELISBERTI, 2005).

A curva ilustrada na Figura 29 mostra que a baixas temperaturas o polímero comporta-se como um material vítreo (rígido) e o módulo de armazenamento é alto e o módulo de perda é baixo, enquanto que a altas temperaturas o polímero comporta-se como um

material viscoso e tanto o módulo de armazenamento como o módulo de perda são baixos; já quando o material apresenta comportamento viscoelástico, o módulo de armazenamento diminui com o aumento da temperatura e o módulo de perda tem um máximo devido a frequência do experimento ser comparável à frequência dos movimentos internos do material na temperatura na qual é feita a média (CASSU; FELISBERTI, 2005).

As Figuras 30 e 31 mostram, respectivamente, as curvas do módulo de armazenamento (E') e do módulo de perda (E'') em função da temperatura para as membranas derivadas de pericárdio porcino. A curva de E' para o material que não passou por tratamento alcalino (PPN) tem as seguintes características: um valor inicial de 315 MPa a 30°C, aumentando ligeiramente até 405 MPa em 120°C e em seguida decresce continuamente até cerca de 220°C, com uma queda brusca chegando ao valor de 0,5 MPa. O pequeno aumento no módulo corresponde à perda de água naturalmente absorvida pelo material (cerca de 11 %), como mostrado pela curva termogravimétrica. Isso corresponde a um ligeiro aumento da rigidez da amostra, como já observado anteriormente por Nguyen, Vu e Wilkes (1974) em uma amostra de colágeno reconstituído obtido de tendão bovino.

Para as demais amostras se pode observar que, com exceção da membrana PP24, após a hidrólise alcalina as membranas apresentaram maiores valores de E' e, quanto maior o tempo de hidrólise, maior o aumento, ou seja, houve um aumento da elasticidade ou da capacidade de armazenar energia.

As curvas de E'' (Figura 31) mostraram que todas as membranas (exceto a PP24) apresentaram maiores valores de E'' após a hidrólise alcalina, ou seja, ocorreu um aumento da capacidade de dissipar energia até 12 h de hidrólise.

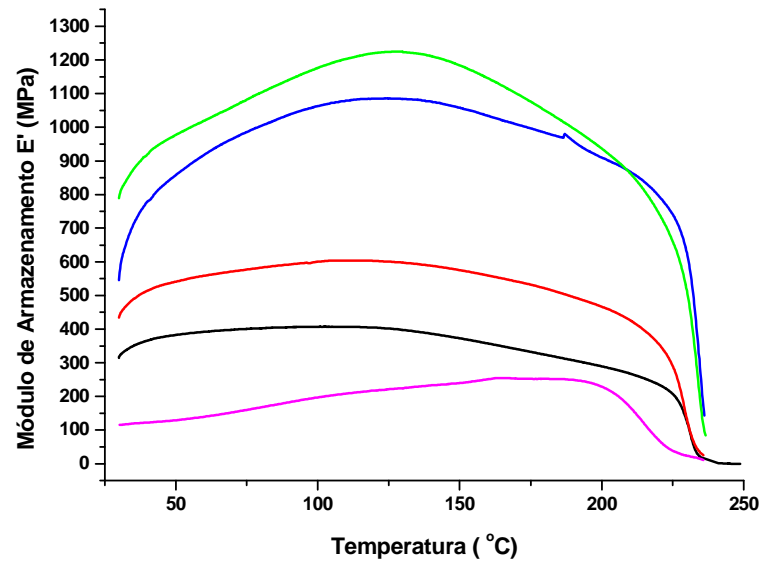


Figura 30 – Módulo de armazenamento (E') em função da temperatura para as membranas derivadas de pericárdio porcino.
 — PPN; — PP4; — PP8; — PP12; — PP24.

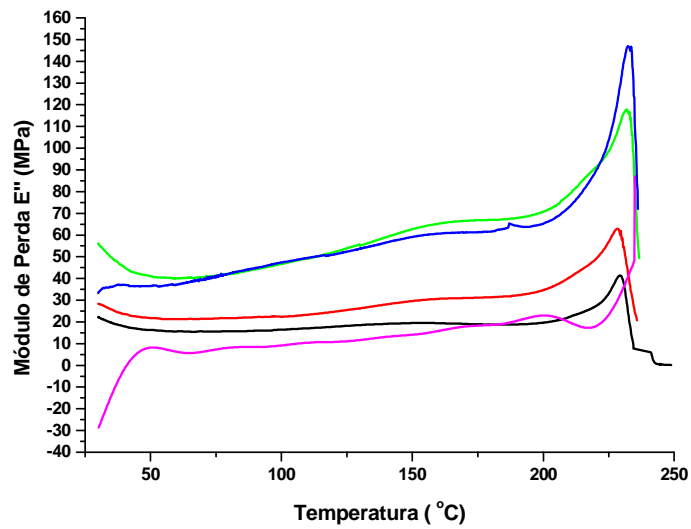


Figura 31 – Módulo de perda (E'') em função da temperatura para as membranas derivadas de pericárdio porcino.
 — PPN; — PP4; — PP8; — PP12; — PP24.

Resultados e Discussão

A Figura 32 mostra as curvas de $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas derivadas de pericárdio porcino. As membranas PPN, PP4, PP8, PP12 e PP24 apresentaram picos de decomposição com início em 225, 210, 210, 215 e 200°C respectivamente, sendo estes picos referentes à decomposição térmica do colágeno, como já visto nas curvas termogravimétricas, onde a decomposição do colágeno tem início aproximadamente em 200°C. Com exceção da membrana PP24, após a hidrólise as membranas começaram a se decompor em temperaturas menores, ou seja, a hidrólise alcalina diminuiu a estabilidade do material influenciando, assim, as propriedades viscoelásticas do colágeno presente no pericárdio porcino.

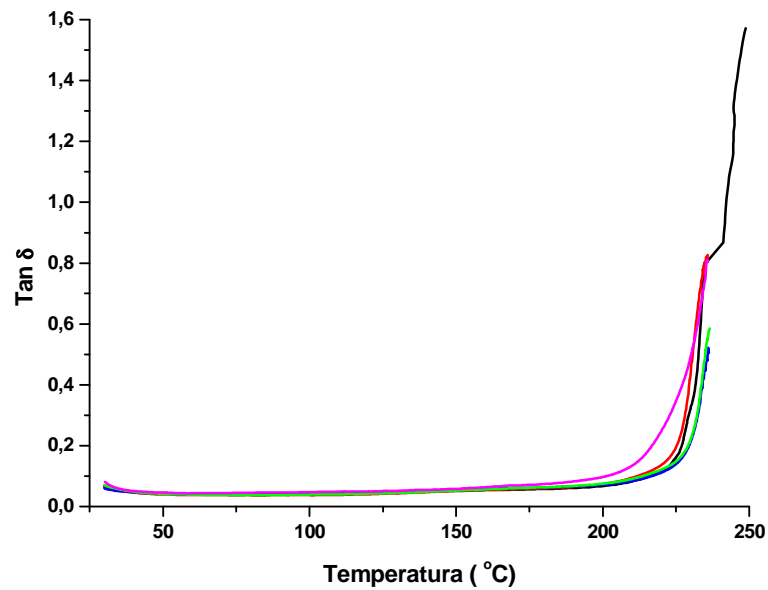


Figura 32 – $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas derivadas de pericárdio porcino.

— PPN; — PP4; — PP8; — PP12; — PP24.

5.10. Resistência à tração

Para um biomaterial ser implantado, ele precisa apresentar alguns requisitos mecânicos que sejam adequados ao local de implante, devendo ser forte o suficiente para suportar as forças diárias aplicadas a ele. As características mecânicas de um material devem incluir todas as respostas mecânicas do material a estímulos exteriores, incluindo a resposta tensão/deformação às cargas fisiológicas relevantes e força de ruptura. Vários testes estão disponíveis para caracterizar mecanicamente um material natural, sendo um deles a resistência à tração.

No ensaio de resistência à tração verifica-se qual a tensão máxima que as membranas suportam até que ocorra sua ruptura, ou seja, a capacidade das membranas em absorver as cargas impostas, sendo essa informação essencial para o caso das membranas serem utilizadas como matrizes na área de regeneração tecidual, onde estão sujeitas à carga.

A tração é produzida no material quando duas forças são aplicadas em sentidos opostos na mesma linha de aplicação com o objetivo de alongar o material, e a resistência à tração provém das forças moleculares atrativas que tendem a dificultar a separação do material (HOLANDA, 1999).

A Figura 33 mostra uma curva de tensão x deformação, para um enxerto derivado de pele de cadáver humano, onde é possível observar que, inicialmente, ele foi esticado com uma resistência mínima. Neste ponto, o material deforma somente enquanto a carga é aplicada, retornando ao tamanho original quando a carga é removida. Quando a tensão foi aumentada, as propriedades viscosas começaram a oferecer resistência. Na região de rigidez, as fibras de colágeno presentes no enxerto foram esticadas até a ruptura na tensão máxima (KLEINER, 2005).

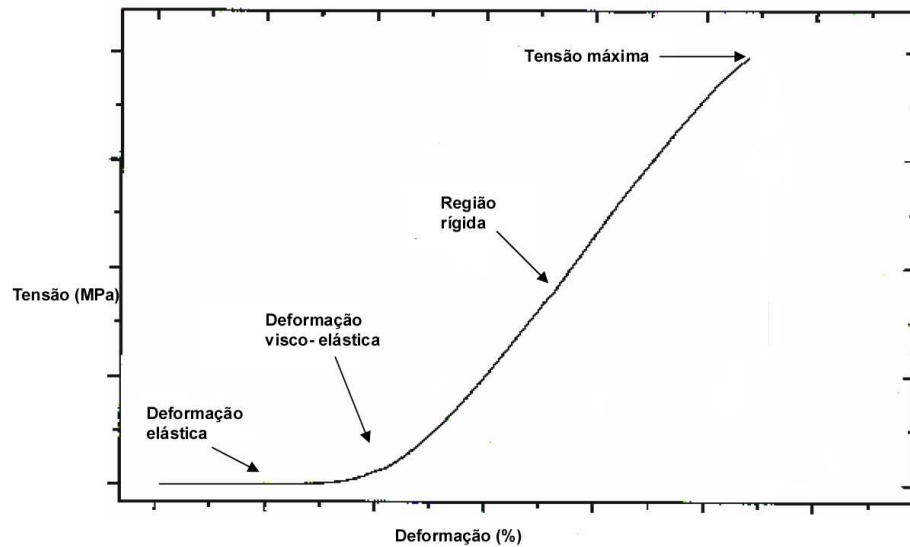


Figura 33 – Curva tensão x deformação para enxerto derivado de pele de cadáver humano (adaptado de KLEINER, 2005).

A Tabela 15 mostra os resultados de resistência à tração e a porcentagem de deformação das membranas preparadas neste trabalho. Observou-se que após a hidrólise alcalina as membranas apresentaram maiores valores de resistência à tração e que a deformação é independente do tempo de hidrólise alcalina. Todas as membranas apresentaram valores de porcentagem de deformação próximos, variando de 9,2% para a membrana PP4 até 16,8% para a membrana PP12 enquanto os valores de resistência à tração variaram de 5,4 MPa para a membrana PPN até 39,3 MPa para a membrana PP24.

Tabela 15 - Resistência à tração na ruptura e porcentagem de deformação das membranas derivadas de pericárdio porcino.

Membrana	Resistência à tração (MPa) *	Deformação (%)
PPN	5,4±1,7	10,6±2,0
PP4	19,8±2,0	11,8±2,4
PP8	21,3±2,5	9,4±1,4
PP12	25,7±3,9	16,8±3,4
PP24	39,3±1,4	16,4±2,1

* valores médios de quatro determinações

A Figura 34 mostra o gráfico de resistência à tração em função da porcentagem de deformação das membranas derivadas de pericárdio porcino, onde se pode observar que as membranas PP4 e PP8 apresentaram um comportamento similar. A partir de 8 h de hidrólise, as membranas apresentaram uma maior deformação no ponto de ruptura. Em relação à resistência a tração houve um aumento dependente do tratamento alcalino, ou seja, quanto maior o tempo de tratamento, maior a resistência.

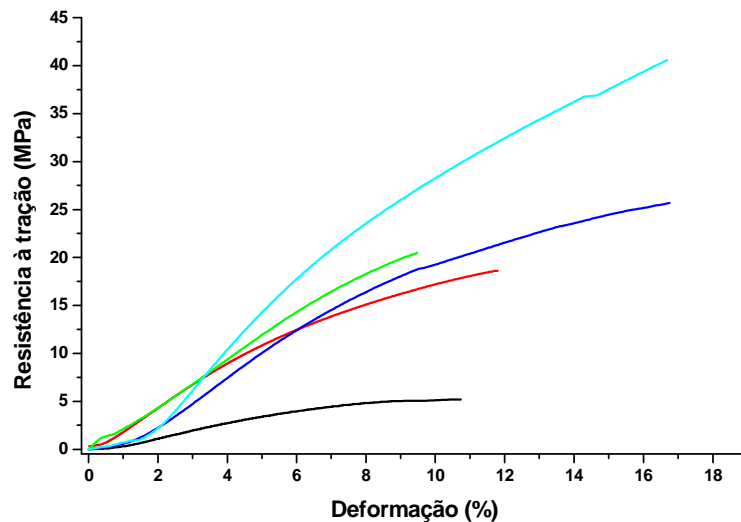


Figura 34 – Resistência à tração em função da porcentagem de deformação das membranas derivadas de pericárdio porcino.

— PPN; — PP4; — PP8; — PP12; — PP24.

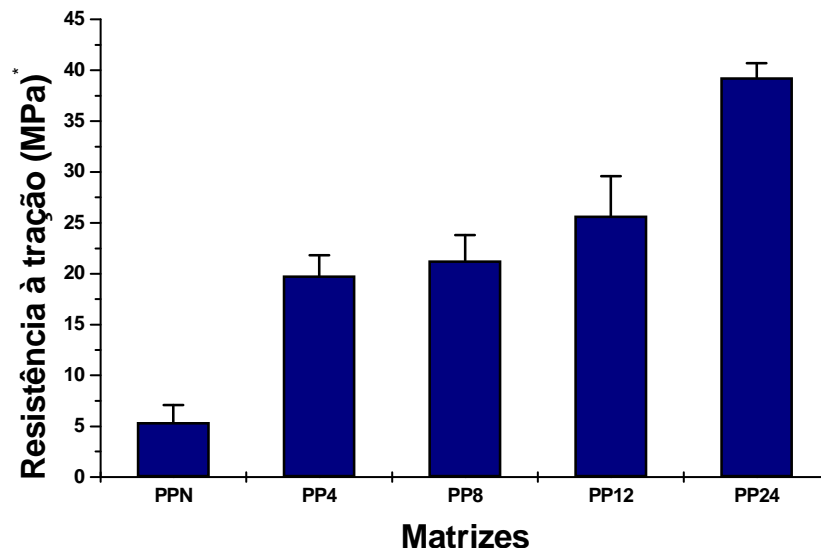
Esse gráfico fornece informações relativas à elasticidade, plasticidade, rigidez, ruptura e energia que um tecido é capaz de absorver antes da sua ruptura (AQUINO; VIANA; FONSECA, 2005). A região linear da curva corresponde à fase elástica, onde a deformação aumenta linearmente com a força aplicada, e o material deformará somente enquanto a carga está sendo aplicada a ele, retornando ao seu tamanho original quando a carga é removida (HOLANDA, 1999). A região não linear corresponde à fase plástica das membranas, sendo o final correspondente à ruptura das membranas, ou seja, o tecido torna-se permanentemente

Resultados e Discussão

deformado e não é capaz de recuperar o seu comprimento inicial após a remoção da força externa, havendo a falha tecidual (AQUINO; VIANA; FONSECA, 2005).

Na região elástica, a membrana PP24 é a que deforma mais e que apresenta maior resistência à tração no limite da elasticidade. Já na região plástica, a membrana PP24 é a que deforma mais e que apresentou maior resistência à tração. Assim, a membrana PP24 deve suportar maiores tensões antes da ruptura do que as outras membranas.

A Figura 35 mostra a resistência à tração das membranas e sua variação com o aumento do tempo de hidrólise.



* valores médios de quatro determinações

Figura 35 - Representação gráfica dos valores da resistência à tração na ruptura das membranas derivadas de pericárdio porcino.

Esse aumento da resistência à tração ocorre, como já mencionado em outros resultados, devido à hidrólise alcalina dos grupos carboxâmidos dos resíduos de Asn e Gln e, assim, há um aumento do número de cargas negativas fazendo com que aumente o efeito de solvatação do colágeno e, portanto, a quantidade de água presente nas membranas. A presença de água está relacionada com a viscoelasticidade do tecido, pois a água contribui na

Resultados e Discussão

manutenção do espaçamento entre as fibras de colágeno e, assim, facilitando o deslizamento entre elas (AQUINO; VIANA; FONSECA, 2005). Portanto, quanto maior a quantidade de água, maior a elasticidade do tecido e, conseqüentemente, maior a resistência à deformação.

6. CONCLUSÃO

A hidrólise alcalina não provocou a desnaturação do colágeno e removeu as células presentes no pericárdio porcino após 4 h de hidrólise.

As membranas se mostraram mais resistentes à tração após a hidrólise alcalina. Houve um aumento da elasticidade das membranas com até 12 h de hidrólise.

Após a hidrólise, as membranas apresentaram uma diminuição da temperatura de desnaturação e um aumento da porcentagem de degradação enzimática, mostrando que é possível preparar membranas com diferentes tempos de degradação.

As membranas hidrolisadas apresentaram um aumento do número de grupos carboxílicos proporcional ao tempo de hidrólise, acarretando em uma maior absorção de água.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* mostraram que todas as membranas derivadas de pericárdio porcino não são citotóxicas para as duas linhagens celulares utilizadas.

Esses resultados sugerem a possibilidade de preparação de membranas acelulares com características diferenciadas para provável utilização como enxerto gengival ou barreira mecânica na área de odontologia, fornecendo novos biomateriais para a regeneração tecidual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. V. R. **Valorização da celulose de sisal: uso na preparação de acetatos e de filmes de acetatos de celulose/celulose e quitosana/celulose**. 2009. 158 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC): Media, 2009. Disponível em: <<https://www.atcc.org/Portals/1/Formula30-2005c.pdf>>; < <http://www.atcc.org>> Acesso em: 7 ago. 2009.

ANGELL, W. W.; YOON, D. L. **Heart valve stent**. US 3983581, 17 nov. 1975, 5 out. 1976.

AQUINO, C. N.; VIANA, S. O.; FONSECA, S. T. Comportamento biomecânico e resposta dos tecidos biológicos as estresse e à imobilização. **Fisioterapia em Movimento**, v.18, n. 2, p. 35-43, 2005.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity**. Philadelphia: ASTM, 2006. v. 13.01.

AURORA, A. **Design, development and biomechanical analysis of scaffolds for augmentation of rotator cuff repairs**. 2010.244 f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica Aplicada) - Department of Chemical and Biomedical Engineering, Cleveland State University, Cleveland.

BADEA, E.; MIU, L.; BUDRUGEAC, P.; GIURGINCA, M.; MASIC, A.; BADEA, N.; GATTA, G. D. Study of deterioration of historical parchments by various thermal analysis techniques complemented by SEM, FTIR, UV-VIS-NIR and unilateral RMN investigations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, n. 1, p. 17-27, 2008.

BADII, F.; HOWELL, N. K. Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1440-1446, 2003.

BATISTA, T. M. **Mineralização *in vitro* de matrizes de colágeno aniônico derivadas de tecidos biológicos**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

BEL, A.; KACHATRYAN, L.; BRUNEVALL, P.; PEYRARD, S.; GAGNIEU, C.; FABIANI, J.-N.; MENASCHÉ, P. A new absorbable collagen membrane to reduce adhesions in cardiac surgery. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, v. 10, n. 2, p. 213-216, 2010.

BEN-MOSHE, Y.; AMIEL, G. E. Biocompatible materials for bladder substitution. **British Journal of Urology International**, v. 102, n. 9b, p. 1334-1338, 2008.

BET, M. R. **Colágeno aniônico: propriedades físico-químicas, estruturais e comportamento biológico**. 2000. 107 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines e glutamine carboxamide side chains. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1074-1079, 2001.

BORGOGNONI, C. F. **Otimização da liofilização do pericárdio bovino com o auxílio de ferramentas matemáticas**. 2009. 99 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BRAILE, D. M. **Prótese valvular de pericárdio bovino: desenvolvimento e aplicação clínica em posição mitral**. 1990. 110 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Cardiovascular) – Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

BRÁS, L. E. C.; PROFFITT, J. L.; BLOOR, S.; SIBBONS, P. D. Effect of crosslinking on the performance of a collagen-derived biomaterial as an implant for soft tissue repair: a rodent model. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 95, n. 2, p. 239- 249, 2010.

BRENNAN, E. P. **Recruitment of progenitor cell populations by chemoattractant degradation products of extracellular matrix scaffolds**. 2009. 132 f. Tese (Doutorado em Filosofia da Bioengenharia) – Swanson School of Engineering, University of Pittsburgh, Pittsburgh, 2009.

CANEVAROLO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. 448p.

CARVALHO, V. C. M. **Estudos dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer**. 2001. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 255-263, 2005.

CEN, L.; LIU, W.; CUI, L.; ZHANG, W.; CAO, Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. **Pediatric Research**, v. 63, n. 5, p. 492-496, 2008.

COBURN, J. C.; PANDIT, A. Development of naturally-derived biomaterials and optimization of their biomechanical properties. In: ASHAMMAKHI, N.; REIS, R.; CHIPELLINI, E. (Eds.). **Topics in tissue engineering**. Expertissues e-book, 2007. V. 3, p. 1-32.

CUNHA, M. R. **Implantes tridimensionais de colágeno polianiónico em falhas ósseas produzidas no fêmur de ratas ovariectomizadas**. 2006. 126 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

DAAMEN, W. F.; VAN MOERKERK, H. TH. B.; HAFMANS, T.; BUTTAFOCO, L.; POOT, A. A.; VEERKAMP, J. H.; VAN KUPPEVELT, T. H. Preparation and evaluation of molecularly-defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 22, p. 4001-4009, 2003.

DERHAM, C.; INGRAM, J.; FISHER, J.; HOMER-VANNIASINKAM, S.; INGHAM, E. Characterization of a decellularised xenogeneic scaffold for tissue engineering of small diameter vessels. **European Cells and Materials**, v. 11, p. 46, 2006. Supplement 3.

FLANDIN, F.; BUFFEVANT, C.; HERBAGE, D. Differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 791, n. 2, p. 205-211, 1984.

FORTI, F. L.; GOISSIS, G.; PLEPIS, A. M. G. Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 20, n. 3, p. 267-285, 2006.

GARCÍA PÁEZ, J. M.; CARRERA, A.; JORGE HERRERO, E.; MILLÁN, I.; ROCHA, A.; CORDON, A.; SAINZ, N.; MENDEZ, J.; CASTILLO-OLIVARES, J.L. Influence of the selection of the suture material on the mechanical behaviour of a biomaterial to be employed in the construction of implants. Part 2: porcine pericardium. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 16, n. 1, p. 68-90, 2001.

GEORGE, J.; ONODERA, J.; MIYATA, T. Biodegradable honeycomb collagen scaffold for dermal tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 87A, n. 4, p. 1103- 1111, 2008.

GIGLIOTI, A. F. Matrizes acelulares de colágeno: elastina a partir da desvitalização do pericárdio bovino: caracterização química, físico-química e estrutural. 2005. 80 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

GOISSIS, G.; MARCANTONIO JR., E.; MARCANTÔNIO, R. A. C.; LIA, R. C. C.; CANCIAN, D. C. J.; CARVALHO, W. M. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. **Biomaterials**, v. 20, n. 1, p. 27-34, 1999.

GOISSIS, G.; SUZIGAN, S.; PEREIRA, D. R. Matrizes tridimensionais acelularizadas de colágeno:elastina a partir de tecidos: preparação, caracterização e biocompatibilidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 14, 2000, Florianópolis. **Livro de resumos...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica, 2000. p. 242-247.

GRECA, F. H.; NORONHA, L.; COSTA, F. D. A.; SOUZA FILHO, Z. A.; SOCCOL, A. T.; FERES, A. N.; DUDA, J. R.; ADAMS, E. Estudo comparativo da biocompatibilidade da submucosa intestinal porcina e pericárdio bovino usados como enxertos na veia cava de cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 317-322, 2005.

GÜVEN, S. **Integrated biomimetic scaffolds for soft tissue engineering**. 2006.71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Department of Biotechnology, Middle East Technical University, Ankara, 2006.

HASLIK, W.; KAMOLZ, L.-P.; NATHSCHLÄGER, G.; ANDEL, H.; MEISSL, G.; FREY, M. First experiences with the collagen-elastin matrix Matriderm[®] as a dermal substitute in severe burn injuries of the hand. **Burns**, v. 33, n. 3, p. 364-368, 2007.

HATTORI, K.; JORAKU, A.; MIYAGAWA, T.; KAWAI, K.; OYASU, R.; AKAZA, H. Bladder reconstruction using a collagen patch prefabricated within the omentum. **International Journal of Urology**, v. 13, n. 5, p. 529-537, 2006.

HERFORD, A. S.; AKIN, L.; CICCIOU, M.; MAIORANA, C.; BOYNE, P. J. Use of a porcine collagen matrix as an alternative to autogenous tissue for grafting oral soft tissue defects. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 68, n. 7, p. 1463-1470, 2010.

HOLANDA, A. J. **Estudos dos efeitos da orientação das fibras de colágeno nas propriedades mecânicas de flexão e de impacto dos ossos**. 1999. 55 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

JASTRZEBSKA, M.; MRÓZ, I.; BARWINSKI, B.; ZALEWSKA-REJDAK, J.; TUREK, A.; CWALINA, B. Supramolecular structure of human aortic valve and pericardial xenograft material: atomic force microscopy study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 1, p. 249-256, 2008.

JONES, K. S. Assays on the influence of biomaterials on allogeneic rejection in tissue engineering. **Tissue Engineering: Part B**, v. 14, n. 4, p. 407-417, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427 p.

KARP, J. M.; LANGER, R. Development and therapeutic applications of advanced biomaterials. **Current Opinion Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 454-459, 2007.

KE, H. D. **Investigation into the dispensing-based fabrication process for tissue scaffolds**. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Department of Mechanical Engineering, University of Saskatchewan, Saskatoon, 2006.

KIM, K. C.; LEE, C.; CHOI, C. H.; LEE, C.-H.; OH, S.-S.; PARK, S.-S.; KIM, K.-H.; KIM, W.-H.; Kim, Y. J. Development of porcine pericardial heterograft for clinical application (tensile strength-thickness). **Korean Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 41, n. 2, p. 170-176, 2008.

KIRSCHBAUER, K. G. **Mineralização *in vitro* de matrizes colagênicas derivadas de tendões calcâneos bovinos e de avestruz**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

KLEINER, M. C. **Correlation between tensile strength and collagen content in cultured skin substitutes**. 2005. 56 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Department of Chemistry, University of Cincinnati, Cincinnati, 2005.

KOHN, J. New approaches to biomaterials design. **Nature Materials**, v. 3, n. 11, p. 745-747, 2004.

LACERDA, C. ; PLEPIS, A. M. G. ; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de Asparagina e Glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**. V. 21, n. 3, p. 267-271, 1998.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1, p. 1–22, 2001.

LEOR, J. COHEN, S. Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1015, p. 312-319, 2004.

LIOTTA, D. S.; FERRARI, H. M.; PISANU, A. J.; DONATO, F. O. **Low profile glutaraldehyde-fixed porcine aortic prosthetic device**. US 4079468, 26 out. 1976, 21 mar. 1978.

LLOYD, A. W.; FARAGHER, R. G. A.; DENYER, S. P. Ocular biomaterials and implants. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 769-785, 2001.

LOKE, W. K.; KHOR, E.; WEE, A.; TEOH, S. H.; CHIAN, K. S. Hybrid biomaterials based on the interaction of polyurethane oligomers with porcine pericardium. **Biomaterials**, v. 17, n. 22, p. 2163-2172, 1996.

LU, H.; CHEN, W.-J.; XING, Y.; YING, D.-J. Design and preparation of an electrospun biomaterial surgical patch. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 24, n. 1 Suppl, p. 158-168, 2009.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001. 366p.

MACNEIL, S. Biomaterials for tissue engineering of skin. **Materials Today**, v. 11, n.5, p.26-35, 2008.

MANDAL, A.; PANIGRAHI, S.; ZHANG, C. Collagen as biomaterial for medical application – drug delivery and scaffolds for tissue regeneration: a review. **Biological Engineering**, v. 2, n.2, p.63-88, 2010.

METZMACHER, I. **Enzymatic degradation and drug release behavior of dense collagen implants**. 2005. 228 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Ludwig-MaximiliansUniversity, Munique, 2005.

MINOZZI, S.; FORNACIARI, G.; MUSCO, S.; CATALANO, P. A gold dental prosthesis of roman imperial age. **American Journal of Medicine**, v. 120, n. 5, p. e1-e2, 2007.

MIRSADRAEE, S.; WILCOX, H. E.; KOROSSIS, S. A.; KEARNEY, J. N.; WATTERSON, K. G.; FISHER, J.; INGHAM, E. Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 4, p. 763-773, 2006.

MITCHELL, I. C.; GARCIA, N. M.; BARBER, R.; AHMAD, N.; HICKS, B. A.; FISCHER, A. C. Permacol: a potential biologic patch alternative in congenital diaphragmatic hernia repair. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 43, n. 12, p. 2161-2164, 2008.

MOIOLI, E. K.; CLARK, P. A.; XIN, X.; LAL, S.; MAO, J. J. Matrices and scaffolds for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 4-5, p. 308-324, 2007.

MORALES, L. F. H.; CASADO, J. E. A.; HOSMAN, J. M. A. Pericárdio heterólogo como material protésico em cirurgia. **Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular**, v. 10, n. 1, 1996. Disponível em: <http://bvs.sld.cu/revistas/car/vol_10_1_96/car05196.htm>. Acesso em: 24 set. 2010.

NERLICH, A. G.; ZINK, A.; SZEIMIES, U.; HAGEDORN, H. G. Ancient Egyptian prosthesis of the big toe. **Lancet**, v. 356, n. 9248, p. 2176-2179, 2000.

NGUYEN, A. L.; VU, B. T.; WILKES, G.L. The dynamic mechanical, dielectric, and melting behavior of reconstituted collagen. **Biopolymers**, v. 13, n. 5, p. 1023-1037, 1974.

NIMNI, M. E. **Collagen**. Flórida: CRC, 1988. v. 1. 299 p.

NORTHUP, S. J.; CAMMACK, J. N. **Handbook of biomaterials evaluation: scientific, technical, and clinical testing of implant materials**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1999. 915 p.

ÓREFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538 p.

OTTOBONI, F. C. F. **Estudo comparativo da biocompatibilidade *in vivo* de matrizes acelulares de pericárdio bovino e porcino**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen –based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1863- 1887, 2010.

PARIZEK, J.; MERICKA, P.; SPACEK, J.; NEMECEK, S.; ELIAS, P.; SERCL, M. Xenogeneic pericardium as a dural substitute in reconstruction of suboccipital dura mater in children. **Journal of Neurosurgery**, v.70, n. 6, p. 905-909, 1989.

PARK, J.B.; LAKES, R.S. **Biomaterials an introduction**. New York: Springer, 2007. 561 p.

PATEL, M.; FISHER, J. P. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. **Pediatric Research**, v. 63, n. 5, p. 497-501, 2008.

PATINO, M. G.; NEIDERS, M. E.; ANDREANA, S.; NOBLE, B.; COHEN, R. E. Collagen: an overview. **Implant Dentistry**, v. 11, n. 3, p. 280-285, 2002.

PINTO, L. M.; REGATIERI, C. V. S.; TAVARES, I. M.; RIGUEIRO, M. P. Porcine Pericardium as glaucoma implant tube coverage – an experimental study. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 71, n. 5, p. 623-628, 2008.

PORTAL SÃO FRANCISCO. Disponível em: < <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-sistema-cardiovascular/pericardio.php>>. Acesso em: 2 mar. 2011.

PRADO, R. O. **Cultura de queratinócitos humanos sobre pericárdio suíno e derme alógena**. 2005. 107 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

PUTZ, R.; PABST, R. **Sobotta, atlas de anatomia humana**. Madri: Médica Panamericana, 2004. 1 CD-ROOM.

RADHIKA, M.; SEHGAL, P. K. Studies on the desamination of bovine collagen. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 35, n. 4, p. 497-503, 1997.

RAMACHANDRAN, G. N. **Treatise on collagen**. London: Academic Press, 1967. v.1, 556 p.

RIZZOLO, R. J. C.; MADEIRA, M. C. **Anatomia facial com fundamentos de anatomia sistêmica geral**. São Paulo: Sarvier, 2004. 350p.

ROCHA, L. B., GOISSIS, G., ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 449–456, 2002.

RODRIGUES, F. T. **Pele porcina como fonte de matrizes tridimensionais de colágeno**. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

RODRIGUES, F. T.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M.G. Porcine skin as a source of biodegradable matrices: alkaline treatment and glutaraldehyde crosslinking. **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 92-97, 2010.

RODRIGUES, M.; BARBOSA JUNIOR, F.; PERUSSI, J. R. Dipyridamole increases the cytotoxicity of cisplatin in human larynx cancer cells *in vitro*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 591-599, 2004.

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

RUBIN, L.; SCHWEITZER, S. The use of acellular biologic tissue patches in foot and ankle surgery. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 22, n. 4, p. 533-552, 2005.

SANAN, A.; HAINES, S. J. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. **Neurosurgery**, v. 40, n. 3, p. 588-603, 1997.

SEIF-NARAGHI, S. B.; SALVATORE, M. A.; SCHUP-MAGOFFIN, P. J.; HU, D. P.; CHRISTMAN, K. L. Design and characterization of an injectable pericardial matrix gel: a potentially autologous scaffold for cardiac tissue engineering. **Tissue Engineering: Part A**, v. 16, n. 6, p. 2017-2027, 2010.

SEUNARINE, K.; GADEGAARD, N.; TORMEN, M.; MEREDITH, D. O.; RIEHLE, M. O.; WILKINSON, C. D. W. 3D polymer scaffolds for tissue engineering. **Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 281-296, 2006.

SHAIKH, F. M.; GIRI, S. K.; DURRANI, S.; WALDRON, D.; GRACE, P. A. Experience with porcine acellular dermal collagen implant in one-stage tension-free reconstruction of acute and chronic abdominal wall defects. **World Journal of Surgery**, v. 31, n. 10, p. 1966-1972, 2007.

SIONKOWSKA, A.; SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J.; WISNIEWSKI, M. Collagen-synthetic polymer interactions in solution and in thin films. **Journal of Molecular Liquids**, v. 145, n. 3, p. 135-138, 2009.

SLAVKIN, H. C. Biomimicry, dental implants and clinical trials. **Journal of the American Dental Association**, v. 129, n. 2, p. 226-230, 1998.

SMITH-PETERSEN, M. N. Evolution of mould arthroplasty of the hip joint. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.30B, n. 1, p. 59-75, 1948.

STACHEL, I.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T.; MEYER, M. Cross-linking of type I collagen with microbial transglutaminase: identification of cross-linking sites. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 3, p. 698-705, 2010.

STAVROPOULOS, A.; CHIANTELLA, G.; COSTA, D.; STEIGMANN, M.; WINDISCH, P.; SCULEAN, A. Clinical and histological evaluation of a granular bovine bone biomaterial used as an adjunct to guided tissue regeneration with a bioresorbable bovine pericardium collagen membrane in the treatment of intrabony periodontal defects. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 2, p. 325-334, 2010.

STOSICH, M. S.; MOIOLI, E. K.; WU, J. K.; LEE, C. H.; ROHDE, C.; YOURSEF, A. M.; ASCHERMAN, J.; DIRADDO, R.; MARION, N. W.; MAO, J. J. Bioengineering strategies to generate vascularized soft tissue grafts with sustained shape. **Methods**, v. 47, n. 2, p. 116-121, 2009.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000 p.

TEDDER, M. E.; LIAO, J.; WEED, B.; STABLER, C.; ZHANG, H.; SIMIONESCU, A.; SIMIONESCU, D. T. Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering. **Tissue Engineering: Part A**, v. 15, n. 6, p. 1257-1268, 2009.

TIMM, L. L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, Canoas, v. 2, n. 1, p. 231-239, 2005.

TRABUCO, E. C.; KLINGELE, C. J.; GEBHART, J. B. Xenograft use in reconstructive pelvic surgery: a review of the literature. **International Urogynecology Journal**, v. 18, n. 5, p. 555-563, 2007.

TSAI, S.-W.; CHENG, Y.-H.; CHANG, Y.; LIU, H.-L.; TSAI, W.-B. Type I collagen structure modulates the behavior of osteoblast-like cells. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 41, n. 3, p. 247-251, 2010.

VIJAYARAGHAVAN, R.; THOMPSON, B. C.; MACFARLANE, D. R.; KUMAR, R.; SURIANARAYANAN, M.; AISHWARYA, S.; SEHGAL, P. K. Biocompatibility of choline salts as crosslinking agents for collagen based biomaterials. **Chemical Communications**, v. 46, n. 2, p. 294-296, 2010.

VILELA, A. S. B. **Matriz extracelular de pericárdio fibroso porcino: estudo morfológico e bioquímico**. 2006. 148 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

VILELA, A. S. B.; PIMENTEL, E. R.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; VIDAL, B. C. Extracellular matrix of porcine pericardium: biochemistry and collagen architecture. **Journal of Membrane Biology**, v. 221, n. 1, p. 15-25, 2008.

WIEGAND, C.; ABEL, M.; RUTH, P.; WILHELMS, T.; SCHULZE, D.; NORGAUER, J.; HIPLER, U.-C. Effect of the sterilization method on the performance of collagen type I on chronic wound parameters *in vitro*. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 90B, n. 2, p. 710-719, 2009.

XIE, H.; CAMPBELL, C. E.; SHAFFER, B. S.; GREGORY, K. W. Different outcomes in urethral reconstruction using elastin and collagen patches and conduits in rabbits. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 81B, n. 1, p. 269-273, 2006.

ZEUGOLIS, D. I.; PAUL, G. R.; ATTENBURROW, G. Cross-linking of extruded collagen fibers – a biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 89A, n. 4, p. 895-908, 2009.

ZIMMERMAN, L. M.; VEITH, I. **Great ideas in the history of surgery**. New York: Norman Publishers, 1993. 587 p.

ANEXO A - Preparação das Lâminas Histológicas (TIMM, 2005)

Para a preparação das lâminas histológicas, inicialmente realiza-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool e, assim, ocorre a retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool. Essa etapa é necessária devido a parafina não ser miscível em água. Antes de serem desidratadas, as amostras de pericárdio porcino foram hidratadas durante 24 h em água destilada devido estarem liofilizadas.

A seguir realiza-se a diafanização com xilol, com a substituição do álcool presente nos tecidos por xilol. Finalmente, as amostras são incluídas em parafina e o xilol é substituído por parafina fundida a 60 °C em pequenos blocos.

Os cortes são obtidos a partir dos blocos de parafina com as peças incluídas, e são realizados em um micrótomo. Este aparelho é formado por uma lâmina (fixa ou descartável) de aço, afiada, e um braço ao qual se prende o bloco e que se desloca verticalmente.

A seguir, os cortes são transferidos para um banho-maria para serem distendidos. Nesta etapa, são retiradas as dobras e evitadas as bolhas abaixo dos cortes. Após a distensão, os cortes são separados utilizando-se lâminas de vidro previamente limpas e secas. Finalmente, os cortes devem ser colocados em uma estufa para secagem.

O próximo passo é realizar a coloração dos cortes. A coloração consiste em uma etapa fundamental para a visualização da estrutura dos tecidos.

Os corantes mais utilizados no procedimentos histológicos são a hematoxilina e a eosina (HE). A hematoxilina é uma base que cora, preferencialmente, os núcleos das células em um tom azulado escuro, enquanto a eosina cora as fibras de colágeno em rosa. Para corar as peças incluídas em parafina é necessária a retirada da parafina e a hidratação da peça. Este procedimento é realizado a partir de uma sequência de banhos em xilol, álcool e água.

Após desparafinar e hidratar os cortes, eles são corados com hematoxilina entre 5 e 15 min, lavados em água corrente por 10 min, corados com eosina entre 1 e 10 min, lavados

com água e desidratados em álcool 70% rapidamente, diafanizados e, finalmente, é realizada a montagem final da lâmina.

A montagem final da lâmina consiste em depositar uma gota de resina líquida sobre o corte que está aderido à lâmina de vidro e cobri-lo com uma lamínula. Nesta etapa deve-se evitar as bolhas de ar que se formam na resina durante a colocação da lamínula. Finalmente a lâmina está pronta para ser analisada e fotografada. A resina depois de seca garantirá uma lâmina permanente que poderá durar anos.