UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**PELE PORCINA COMO FONTE DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS
DE COLÁGENO**

Fabiana Tessari Rodrigues

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

Orientadora: Prof^ª. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2006

DEDICATÓRIA

À DEUS, por tudo de bom que aconteceu e tem acontecido na minha vida e por ter me dado força e coragem para enfrentar as dificuldades da vida

AOS MEUS PAIS

Por terem proporcionado meus estudos! Sem vocês eu não chegaria até aqui! Pela dedicação, apoio, incentivo, amor, carinho e compreensão durante todas as etapas da minha vida e, agora, na realização deste trabalho. MUITO OBRIGADO!

À minha irmã Fernanda que, apesar da distância, sempre me apoiou e me incentivou.

Às minhas grandes amigas Jú Barbie, Jú Pinga e Thelma. Pela amizade, apoio, incentivo e por sempre estarem dispostas a me ajudar nos momentos difíceis da vida.

Aos meus avós Acácio (in memorium), Durvalina, Alcides e Maria (in memorium). Pelo amor e compreensão nos momentos em que estive ausente.

AGRADECIMENTOS

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

À Virginia C. A. Martins pela amizade, incentivo e ajuda na elaboração deste trabalho.

Aos amigos Ézer Biazin e Glaucio D. Broch , pelo apoio e pela amizade.

À amiga Aparecida de Fátima Giglioti, pelo auxílio nas análises de estabilidade biológica e determinação do conteúdo de elastina.

Ao pessoal do Laboratório Patrícia, Márcio, Marília (Gaúcha), Daniela, Adriana, Fernando, Edgar, Klaus, Daniel, Alexandre, Aline, Maurício, Ana Vivian, Raquel, Sílvio, Tatiane, Sílvia, Rodrigo, Thaís, Talita e Vítor.

Às secretárias Cláudia e Veroneide pelos serviços prestados, gentileza e dedicação.

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

Aos amigos: Fábio, Felipe, Marcus, Rafael, Antônio (Césio), Priscila, Márcia, Marília, Ariane, Dani, Lidiane, Lilica, Eriqinha, Mel, Danizinha, Poliana pelo incentivo, paciência, apoio e amizade.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Oxetil Indústria e Comércio de Produtos Esterilizados Ltda.-EPP, Santo Anastácio- SP, pela esterilização das matrizes utilizadas nas análises de citotoxicidade in vitro.

À 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 Carlos Bento pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos amigos da Pós-graduação pela amizade e convivência no dia-a-dia.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

<i>1. INTRODUÇÃO</i>	<i>12</i>
1.1. Biomateriais	12
1.2. Pele porcina	16
1.3. Colágeno	19
1.3.1. Colágeno tipo I	21
1.4. Matrizes extracelulares de colágeno	23
<i>2. OBJETIVOS</i>	<i>30</i>
<i>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</i>	<i>31</i>
3.1. Preparação das matrizes	31
3.2. Reação de reticulação com glutaraldeído (GA)	32
3.2.1. Reticulação não-seqüencial - 15 minutos	32
3.2.2. Reticulação não-seqüencial - 45 minutos	33
3.2.3. Reticulação seqüencial - 45 minutos	34
3.3. Caracterização	36
3.3.1. Determinação do conteúdo de elastina	36
3.3.2. Estabilidade biológica (tripsina)	36
3.3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	37
3.3.4. Termogravimetria (TG/DTG)	37

3.3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
3.3.6. Avaliação preliminar do potencial de citotoxicidade <i>in vitro</i>	38
3.3.6.1 Cultura celular.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Determinação do conteúdo de elastina	43
4.2. Estabilidade biológica (tripsina).....	44
4.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	46
4.4. Termogravimetria (TG/DTG).....	49
4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
4.6. Avaliação preliminar do potencial de citotoxicidade <i>in vitro</i>	57
5. CONCLUSÃO.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema geral da estrutura do colágeno.....	20
Figura 2 - Esquema da estrutura do colágeno tipo I. (A) α hélice; (B) hélice tripla.....	22
Figura 3 - Esquema da formação da fibrila de colágeno.....	22
Figura 4 - Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln.....	24
Figura 5 - Reticulações inter e intramoleculares presentes naturalmente no tropocolágeno....	25
Figura 6 - Estrutura do 1,5-pentanodial (GA).....	26
Figura 7 - Reticulação do colágeno pela reação com GA.....	27
Figura 8 - Comportamento do GA em solução: formas monoméricas, hemiacetais poliméricos e polímeros α,β -insaturados.....	28
Figura 9 - Diagrama representativo da impermeabilização por GA de tecidos naturais destinados à confecção de biopróteses.....	29
Figura 10 - Esquema da Preparação das Matrizes Extracelulares.....	31
Figura 11 - Esquema da reação de reticulação não-sequencial -15 min.....	33
Figura 12 - Esquema da reação de reticulação não-sequencial -45min.....	34
Figura 13 - Esquema da reação de reticulação sequencial -45 min.....	35
Figura 14 - Matrizes de pele porcina. A) Sem hidrólise alcalina; B) Após hidrólise alcalina; C) Após hidrólise alcalina e reticulação com GA.....	42
Figura 15 - Desnaturação do colágeno.....	46
Figura 16 - Curvas DSC das matrizes de colágeno com e sem hidrólise alcalina de 96h e reticuladas com GA durante 15 min.....	47
Figura 17 - Curvas DSC das matrizes de colágeno com e sem hidrólise alcalina de 96h e reticuladas com GA durante 45 min.....	47
Figura 18 - Curva TG/DTG da matriz de pele porcina sem hidrólise alcalina.....	50

Figura 19 - Curva TG/DTG da matriz de pele porcina com 96 h de hidrólise alcalina.....	50
Figura 20 - Curva TG/DTG da matriz de pele porcina com 96 h de hidrólise alcalina e reticulada sequencialmente com GA 0,085% durante 45 min.....	51
Figura 21 - Fotomicrografias das matrizes de pele porcina após hidrólise alcalina por 96h e reticuladas com GA durante 15min nas seguintes concentrações: A) 0%; B) 0,01%; C) 0,05%.....	54
Figura 22 - Fotomicrografias das matrizes de pele porcina após hidrólise alcalina por 96h e reticuladas com GA nas seguintes concentrações e tempos de reação: C) 0,05%-15min; D) 0,05%-45min.....	55
Figura 23 - Fotomicrografias das matrizes de pele porcina após hidrólise alcalina por 96h e reticuladas com GA nas seguintes concentrações e tempos de reação: E) 0,085%-45min não-sequencial; F) 0,085%-45min sequencial.....	56
Figura 24 - Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> : A) Controle Negativo; B) Controle Positivo.....	58
Figura 25 - Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> das matrizes de pele porcina: A) 0GA45; B) 85GA45.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matrizes de pele porcina preparadas por hidrólise alcalina e reticulação com GA.....	35
Tabela 2 - Composição do meio EAGLE.....	39
Tabela 3 - Conteúdo de Elastina e Colágeno para as matrizes de pele porcina.....	43
Tabela 4 - Porcentagens de degradação enzimática das matrizes de pele porcina.....	44
Tabela 5 - Temperatura de desnaturação (Td) das matrizes de pele porcina obtidas através das curvas de DSC.....	48
Tabela 6 - Porcentagens de perda de massa das matrizes de pele porcina obtidas através de TG/DTG.....	51
Tabela 7 - Valores dos diâmetros dos halos das matrizes de pele porcina e dos controles.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Asn - Asparagina

Da - Dalton

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

Lys - Lisina

Hyl - Hidroxilisina

GA - Glutaraldeído

Gly - Glicina

Gln - Glutamina

MEC – Matriz Extracelular

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

TF - Tampão Fosfato

TGB - Tampão Glicina/Borato

Td - Temperatura de desnaturação

TG/DTG - Termogravimetria

RESUMO

As lesões cutâneas e queimaduras são considerados os principais causadores de danos e perdas dos tecidos moles. Em casos severos de trauma, os processos naturais de regeneração são insuficientes no reparo dos danos, resultando em lesões cutâneas crônicas. A desvitalização de matrizes homólogas ou heterólogas é uma alternativa para a produção de matrizes dérmicas. A pele porcina é bastante similar à pele humana, podendo ser utilizada como matriz de colágeno na regeneração de tecido mole. Além disso, ela tem como constituinte principal o colágeno tipo I, e, assim, pode ser utilizada em queimaduras de segundo grau. Este trabalho teve como objetivo a preparação e caracterização de matrizes extracelulares de colágeno tipo I por meio de hidrólise alcalina e reticulação com glutaraldeído (GA). As matrizes de colágeno foram obtidas a partir da hidrólise alcalina de pele porcina, com posterior reticulação com GA, em diferentes concentrações (0-0,1%) e tempos de reação (15 e 45 min). As matrizes foram caracterizadas através de determinação do conteúdo de elastina, estabilidade biológica (tripsina), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG/DTG), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliação preliminar da citotoxicidade *in vitro*. Através da determinação do conteúdo de elastina, foi possível determinar a massa média de colágeno presente nas matrizes, a qual foi de $95,2 \pm 0,2\%$ (m/m), e a massa média de elastina, que foi de $4,8 \pm 0,2\%$ (m/m), e também verificar que independente do tratamento, a elastina estava presente nas matrizes. O ensaio de estabilidade biológica mostrou que o tratamento com GA diminui a biodegradação do material; sendo obtidas porcentagens de degradação que variaram de $83,6\% \pm 1,1$ (0% GA) a $46,1\% \pm 0,7$ (0,085% - 45min), indicando, assim, que com o aumento da concentração de GA e do tempo de reação, há uma diminuição da porcentagem de degradação. Pela análise termogravimétrica, foi observado que o colágeno presente nas matrizes tornou-se mais estável termicamente em consequência do aumento do grau de reticulação e, portanto, mais resistentes à degradação térmica. Os resultados de DSC confirmam os de termogravimetria devido ao aumento nos valores das temperaturas de desnaturação das matrizes em função do aumento do tempo de reação e da concentração de GA. Pela análise das fotomicrografias, pôde ser observado que após a reticulação com GA, as fibras de colágeno tornam-se mais organizadas e definidas; e essa definição torna-se maior com o aumento da concentração de GA. Os resultados preliminares de citotoxicidade *in vitro* mostraram que as matrizes analisadas são citotóxicas possivelmente devido à gordura remanescente, sendo necessária a realização de um pré-tratamento. Assim, a preparação de matrizes derivadas de pele porcina com diferentes tempos de degradação, as quais podem ser utilizadas na reconstrução de tecidos moles, é viável.

ABSTRACT

Cutaneous lesions and burns are considered the main causes of damage of soft tissues. In severe cases of trauma, the natural processes of regeneration are insufficient in the repair of the damage, resulting in chronic cutaneous lesions. Desvitalization of homologous or heterologous matrices is an alternative for the production of dermal matrices. The porcine skin is quite similar to the human skin and can be used as collagen matrix in soft tissue regeneration. Besides, it contains type I collagen as the main constituent and thus, it can be used in second degree burns. The objective of this work was the preparation and characterization of type I collagen extracellular matrices with alkaline hydrolysis and glutaraldehyde (GA) crosslinking. The collagen matrices were obtained from the alkaline hydrolysis of porcine skin, with subsequent GA crosslinking, in different concentrations (0 - 0,1%) and reaction time (15 and 45 min). Matrices were characterized by determination of the elastin content, biological stability (trypsin), differential scanning calorimetry (DSC), termogravimetry (TG/DTG), scanning electron microscopy (SEM) and a preliminar assay of *in vitro* cytotoxicity. Elastin and collagen content were $4,8 \pm 0,2\%$ (m/m) and $95,2 \pm 0,2\%$ (m/m), respectively. Biological stability results showed that GA crosslinking reduces matrix biodegradation; as degradation varied from $83,6\% \pm 1,1$ (0% GA) to $46,1\% \pm 0,7$ (0,085% - 45min), demonstrating, thus, that with the increase of GA concentration and reaction time, there was a decrease of degradation. For termogravimetric analysis it was observed that the collagen present in the matrices become termically more resistant as a consequence of the increasing crosslink degree and, therefore, more resistant to thermal degradation. DSC results, similar to termogravimetric ones, showed an increase in denaturation temperatures as a function of increasing reaction time and GA concentration. SEM analysis showed that after the GA crosslinking, collagen fibers become more organized and defined; and that definition improved with increasing GA concentration. Preliminar assay of *in vitro* cytotoxicity showed that treated matrices are cytotoxic possibly due to remaining fat, being necessary the accomplishment of a pre-treatment. Therefore, porcine skin matrices preparation with different degradation times, which can be used in the soft tissue reconstruction, are viable.

1. INTRODUÇÃO

Lesões cutâneas, doenças, queimaduras podem ser considerados os principais causadores de danos e perdas dos tecidos moles, tais como a pele. Além da perda da função do tecido, isso gera transtornos sociais e psicológicos.

A reconstrução ou a substituição desses tecidos danificados é um dos objetivos da engenharia de tecidos (CURTIS; RIEHLE, 2001), especialmente no caso de queimaduras e lesões cutâneas crônicas, pois os tratamentos atuais são insuficientes para curar estas lesões e evitar a formação de cicatrizes (MIDDELKOOP et al., 2004). Além disso, a perda tecidual pode ser extensa e o processo de cicatrização pode não ser suficiente para que ocorra a cura, devendo-se considerar, então, o tratamento com enxertos (HOYAMA et al., 2005).

Com o crescimento da expectativa de vida e o desenvolvimento da engenharia de tecidos, há um aumento no interesse de desenvolver materiais biodegradáveis e biocompatíveis para regeneração de tecidos (ANGELE et al., 2004).

1.1. Biomateriais

Um biomaterial pode ser definido como qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que pode ser utilizado por um período de tempo para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente, tecidos ou órgãos (PARK, 1984).

Quanto ao tipo de material, os biomateriais podem ser sintéticos (polímeros, metais, cerâmicas) ou naturais (colágeno, elastina, queratina); que são manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos, sobretudo naqueles que são temporária ou permanentemente implantados no corpo humano (PARK, 1984). Os

biomateriais à base de colágeno podem ser encontrados sob diversas formas, tais como: géis, esponjas, membranas, matrizes (RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000).

O critério de seleção de biomateriais é baseado principalmente na aplicação a que se destinam. Por exemplo, para dispositivos de aplicações em tecidos moles, os materiais se propõe a aumentar ou redefinir o tecido.

A seguir, temos as principais características de um biomaterial (PARK, 1984):

- Ser atóxico;
- Ser não-carcinogênico;
- Ter resistência mecânica adequada para a sua utilização;
- Ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função para a qual foi projetado com o máximo de eficiência;
- Ter peso e densidade adequados;
- Ser reprodutível e de baixo custo;
- Ser biocompatível, ou seja, não induzir respostas teciduais ou imunológicas.

Os biomateriais podem ser usados em diferentes aplicações como: enxertos vasculares, suturas, dispositivos ortopédicos, válvulas cardíacas, implantes ósseos, reconstrução de tecidos moles, implantes odontológicos, placas para fraturas, entre outras (SILVER; DOILLON, 1989); eles não devem ter apenas a função de preenchimento de espaço e sim conter na sua estrutura elementos que possam estimular uma resposta biológica específica (RATNER, 1993; 2004).

As pesquisas na área de biomateriais vêm crescendo gradativamente, e o campo da ciência responsável por essas pesquisas é a engenharia de tecido, que é um campo multidisciplinar (ATALA; NYBERG, 2000) que engloba as áreas da biologia, química, física, engenharia, medicina, bioquímica, entre outras. A engenharia de tecido aplica os princípios da

engenharia e das ciências biológicas para um maior conhecimento das interações biomateriais: tecido: células, (GRIFFITH; NAUGHTON, 2002) e tem como objetivo principal melhorar ou substituir a função de um órgão ou tecido danificado (LANGER; VACANTI, 1993).

Em função disto, matrizes extracelulares (MECs) para a área de engenharia de tecido vêm sendo preparadas para atuar como sítios para ancoragem de células, servir como um suporte tridimensional para crescimento do novo tecido e direcionar o desenvolvimento do novo tecido.

As MECs para a engenharia de tecido podem ser de origem natural ou sintética, e devem apresentar as seguintes características (RADHIKA; BABU; SEHGAL, 1999; KIM; MOONEY, 1998):

- Biocompatibilidade;
- Capacidade de sustentação celular;
- Propriedades mecânicas condizentes em relação ao tecido a ser reconstruído;
- Velocidade de degradação compatível com aquela de crescimento do tecido para o qual serve como suporte;
- Permitir a associação destas matrizes tridimensionais com fatores de crescimento celular específicos para indução de respostas celulares mais rápidas.

As MECs podem ser feitas a partir de polímeros sintéticos como o ácido poli(lático-co-glicólico) (JARMAN-SMITH; MCFETRIDGE; CHAUDHURI, 2002) e poliuretanas (GRADA et al., 2003). A vantagem destes materiais é que suas propriedades físicas e mecânicas são reprodutíveis e previsíveis e podem ser manufaturados com grande precisão. Entretanto, materiais sintéticos tendem a desencadear respostas inflamatórias que podem afetar sua biocompatibilidade (RUSZCZAK, 2003).

As MECs obtidas através de materiais de origem natural podem ser feitas a partir de polímeros naturais como o colágeno (VATS et al., 2003; SONG et al., 2006; JARMAN-SMITH; MCFETRIDGE; CHAUDHURI, 2002) e a quitosana (VATS et al., 2003). MECs à base de colágeno são muito utilizadas como substituintes de pele, ossos, válvulas cardíacas (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001); devido suas propriedades mecânicas, biológicas e químicas serem muito similares às do tecido humano (JARMAN-SMITH; MCFETRIDGE; CHAUDHURI, 2002) e também devido sua excelente biocompatibilidade (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001).

Burke et al. (1981) deram o primeiro passo para a utilização de matriz de regeneração dérmica extracelular, destinada a substituir os defeitos provocados por queimaduras e desta forma dar uma esperança àqueles que apresentam seqüelas extensas provocadas por elas (BURKE et al., 1981; SCHULZ; TOMPKINS; BURKE, 2000).

As MECs de origem natural podem ser obtidas a partir de matrizes autólogas (mesmo indivíduo) e da desvitalização de matrizes homólogas (mesma espécie) ou heterólogas (espécie diferente), onde células e outros componentes responsáveis por respostas biológicas não desejáveis tenham sido removidos (VALENTE et al., 1998).

As matrizes autólogas são produzidas a partir de tecido do próprio paciente de uma área não danificada, e tem a desvantagem de sua disponibilidade ser limitada (RUSZCZAK, 2003) e de causar uma nova lesão no sítio doador, aumentando o risco de infecção (RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000). Teoricamente, essas matrizes são o material ideal para substituição de tecido danificado devido evitarem reações alérgicas e a rejeição (SARAY, 2003). Se o ferimento atingir mais que 50% da superfície do corpo, pode-se considerar impossível a utilização da matriz autóloga devido não existir quantidade suficiente disponível da matriz para a substituição do tecido danificado (SHERIDAN, 2001).

As matrizes homólogas são produzidas a partir de pele de cadáver humano, a qual passa por um processo controlado que remove a epiderme e as células da derme sem alterar a estrutura da matriz extracelular (RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000).

Como se sabe, o tratamento de queimaduras com enxertos de pele homólogos ainda é considerado um tratamento padrão em muitos centros de tratamentos de queimados devido diminuir a dor e ter um tempo de cicatrização curto (FENG et al., 2006). Mas o alto custo aliado à dificuldade de se obter tecido humano, tem restringido seu uso. Outra desvantagem é o risco de contaminação por doenças como o HIV.

Tecidos de origem animal começaram a ser utilizados há milhares de ano como substituintes de pele humana. Uma das vantagens em se utilizar matrizes heterólogas é a sua disponibilidade ilimitada (RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000).

O material heterólogo ideal para a utilização em substituição de tecido deve ter as seguintes propriedades: ser hemostático e cobrir completamente a superfície do ferimento sem deixar nenhum espaço; aderir imediatamente às bordas do ferimento; cobrir toda a área machucada, reduzindo ou eliminando a dor e protegendo-a contra agentes infecciosos e contra a perda de água e fluídos de tecido (RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000).

Dentre as várias matrizes heterólogas em estudo tem-se a pele porcina, principalmente devido a sua similaridade com a pele humana e por ter como constituinte principal o colágeno tipo I, que é o mais comum no tecido conjuntivo humano.

1.2. Pele porcina

A pele porcina começou a ser utilizada na década de 60 no tratamento de queimaduras (BECKER, 1998), e atualmente é a mais utilizada em enxertos heterólogos (CHIU; BURD, 2005); e tem sido investigada como fonte de tecido rico em colágeno com potencial para ser usado como biomaterial devido à sua inerente biocompatibilidade,

resistência mecânica e baixa antigenicidade (ADEDEJI; BAILEY; VARMA, 2002; BECKER, 1998; MATOUKOVÁL; STEHLÍEK; VESELYL, 2002; JARMAN-SMITH; MCFETRIDGE; CHAUDHURI, 2002). Estudos realizados com esta matriz sugerem sua utilização em queimaduras de segundo grau, promovendo a cura sem deixar cicatriz, em um tempo aproximado de 10 dias (RUSZCZAK, 2003).

Os bons resultados obtidos com a utilização da matriz dérmica extracelular porcina assim como sua fácil obtenção, aplicação, grande disponibilidade e baixo custo, faz com que esta matriz substitua a utilização da pele de cadáver como substituinte de tecidos danificados (FENG et al., 2006).

Enxertos heterólogos de pele porcina vem sendo muito utilizados no tratamento de vários ferimentos de pele. Queimaduras e áreas com grande perda tecidual são alguns exemplos (DAVIS; ARPEY, 2000).

Existem muitos trabalhos que relatam a utilização de pele porcina como substituintes de tecidos danificados. Becker (1998) relatou a utilização de pele porcina no tratamento de queimaduras, onde nenhuma delas apresentou infecções severas (BECKER, 1998).

Adejei, Bailey e Varma (2002) utilizaram um enxerto de colágeno dérmico porcino na reconstrução de uma parede abdominal. O enxerto não foi rejeitado, e após um ano a paciente permanecia bem (ADEDEJI; BAILEY; VARMA, 2002).

Um estudo realizado por Hoyama et al. (2005) mostrou a incorporação de tecido dérmico extracelular porcino ao tecido dérmico do rato, com resposta inflamatória do hospedeiro leve a moderada (HOYAMA et al., 2005).

Estudos realizados utilizando matriz dérmica extracelular porcina em queimaduras de segundo grau severas, mostraram que a dor começou a diminuir após a aplicação da matriz dérmica extracelular porcina e desapareceu no dia seguinte. Após 12 dias, todas as feridas

estavam curadas. Um ano depois, as extremidades inferiores estavam com pequenas cicatrizes, mas as funções das extremidades não estavam limitadas e houve crescimento normal de pelos (FENG et al., 2006).

Revestimentos biológicos derivados de pele porcina podem ser utilizados no tratamento de vários ferimentos, sendo utilizados como (CHIU; BURD, 2005):

- Substituintes temporários enquanto ocorre a cicatrização espontânea do tecido, muito utilizado em queimaduras;
- Substituintes temporários enquanto o substituinte definitivo não é implantado, utilizado quando a pele do doador disponível é insuficiente.

Além disso, a pele porcina apresenta as seguintes propriedades quando utilizada em ferimentos (CHIU; BURD, 2005):

- Adere firmemente nos ferimentos limpos sem a necessidade de suturas;
- Foi relatado que há uma redução na dor, facilitando, assim, a mobilização do paciente no caso de queimaduras;

Estas duas propriedades torna a utilização de pele porcina muito importante no tratamento de pequenas queimaduras em crianças.

- Reduz a perda de eletrólitos, proteínas, fluídos e calor;
- Fornece uma proteção física do ferimento e também diminui o ressecamento do ferimento.

Assim, nota-se que a pele porcina vem sendo muito utilizada no desenvolvimento de biomateriais, pois é de fácil obtenção, tem baixo custo e tem como constituinte principal o colágeno.

1.3. Colágeno

O colágeno é uma proteína fibrosa encontrada em grande quantidade no tecido conjuntivo e tem a função de manter a integridade estrutural do tecido e conferir resistência mecânica. As diferentes propriedades destes tecidos são em parte devido ao resultado de diferentes organizações das fibras de colágeno. Sua principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta força elástica. Além de seu papel estrutural nos tecidos, o colágeno possui também outras características, tais como a função de orientar tecidos em desenvolvimento (VIIDIK; VUUST, 1980; MAYNE; BURGESSON, 1987).

Ele está presente em vários tecidos, tais como pele, tendão, cartilagem, osso, córnea (PARK, 1984), representando cerca de 25% das proteínas presentes nos mamíferos. Aproximadamente metade do colágeno presente no corpo humano está na pele (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001).

As principais vantagens de se utilizar o colágeno como biomaterial são: (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001)

- Grande disponibilidade;
- Baixa antigenicidade;
- Atóxico;
- Biocompatível;
- Sua biodegradabilidade pode ser controlada utilizando-se agentes de reticulação;
- Pode ser utilizado sob várias formas (gel, esponjas, matrizes);
- É facilmente absorvido pelo corpo humano.

Entre os anos 70 e 80, pesquisadores começaram a utilizar o colágeno como um biomaterial para várias aplicações devido sua excelente biocompatibilidade, baixa antigenicidade, alta biodegradabilidade e boas propriedades mecânicas. O uso do colágeno em

aplicações bioquímicas tem crescido rapidamente e se expandido em vários campos da bioengenharia, como na fabricação de matrizes (SONG et al., 2006). Assim, o colágeno tem sido muito utilizado em aplicações médicas (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001), na forma de matrizes extracelulares artificiais para aplicações em engenharia de tecido (SONG et al., 2006), reconstrução de tecidos moles, revestimento de queimaduras e outras lesões, suporte para crescimento de nervos periféricos (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001).

Figura 1 - Esquema geral da estrutura do colágeno.

Atualmente, são conhecidos 27 tipos de colágeno (BOOT-HANDFORD et al., 2003) quimicamente distintos que estão presentes em vários tecidos, tais como: pele, ossos, tendão, vasos sanguíneos, cartilagem, córnea. Todas as moléculas de colágeno contém 3 cadeias α que apresentam a sequência Gly-X-Y se repetindo ao longo das cadeias (Fig. 1). Em alguns tipos de colágeno, todas as cadeias α são idênticas, enquanto que em outros há duas ou três cadeias α diferentes formando a hélice tripla.

Os colágenos do tipo I, II, III, V e XI são formados por 3 cadeias em hélice tripla contínua, enquanto os do tipo IX, XI, XII e XIV têm cadeias pequenas e contém alguns domínios não helicoidais (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001).

1.3.1. Colágeno tipo I

O colágeno tipo I é o mais abundante no tecido conjuntivo humano, constituindo mais de 90% do total de colágeno presente nos mamíferos (CHAPMAN et al., 1990). Além disso, possui propriedades biológicas e físicas únicas (PACHENCE, 1996).

A macromolécula de colágeno tipo I é 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) e é formado por três cadeias polipeptídicas denominadas α , das quais duas são idênticas ($\alpha 1$), cada uma possuindo cerca de 1055 resíduos de aminoácidos, e uma diferente ($\alpha 2$), que possui cerca de 1029 resíduos; em sua maior parte são entrelaçadas na forma de uma longa hélice tripla (GALLOP; BLUMENFELD; SEIFTER, 1967), com exceção das regiões terminais onde são encontrados os telopeptídeos que contém no N e C-terminal 16 e 26 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A Figura 2 mostra a estrutura do colágeno tipo I:

Figura 2 - Esquema da estrutura do colágeno. (A) α hélice; (B) hélice tripla (ALBERTS et al., 1994).

Os fatores essenciais para a estabilidade desta hélice tripla são: a presença de um resíduo de glicina a cada terceiro resíduo (GALLOP; BLUMENFELD; SEIFTER, 1967), ligações de hidrogênio, a periodicidade de distribuição de resíduos de aminoácidos polares carregados e hidrofóbicos nas subunidades α que são responsáveis pela formação de aglomerados de interações eletrostáticas e hidrofóbicas (CHAPMAN et al., 1990). Estas forças também são importantes para a interação entre as moléculas do tropocolágeno para formar a microfibrila, que é a menor unidade estrutural do tecido conjuntivo. As microfibrilas se agregam formando as fibrilas que posteriormente também se unem para formar as fibras que compõem a matriz colagênica dos tecidos (Fig.3).

Figura 3 - Esquema da formação da fibrila de colágeno.

1.4. Matrizes extracelulares de colágeno

Dispositivos médicos feitos de colágeno tem um grande impacto no campo de reparo de tecido mole. Isto não é surpreendente por que os materiais à base de colágeno tem sido utilizados desde o século XIX na forma de suturas, pele de cadáver humano e pele porcina (PACHENCE, 1996).

As MEC compostas de colágeno podem ser utilizadas em diversas aplicações tais como: reconstrução de tecidos moles (MATSUI, 1996), revestimento de queimaduras e outras lesões (SAKIEL, 1995), suporte para crescimento de nervos periféricos (BLACKSHAW et al, 1997) e como agente hemostático (ANTISZKO et al., 1995). Uma grande vantagem nestas MEC é a facilidade de obtenção do colágeno, pois este pode ser obtido a partir de diversas fontes como: pele porcina, tendões bovino, serosa, pericárdio, entre outras.

Estudos realizados com um implante de matriz colagênica em um ferimento extenso demonstrou que 5 dias após ter sido implantada, a matriz estava bem aderida ao ferimento (PACHENCE, 1996).

Essas MEC compostas de colágeno, além de sua alta biocompatibilidade, podem sofrer modificações químicas, devido possuir uma grande quantidade de grupos reativos, tais como aminas (NH_2), ácidos carboxílicos (COOH) e hidroxilas alcoólicas (OH) (KHOR, 1997); permitindo a implementação de diferentes propriedades físico-químicas, mecânicas e estruturais, possibilitando assim, novas aplicações na área de biomateriais.

Uma modificação química interessante, é a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias α do tropocolágeno (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998), conforme ilustra a Figura 4:

Figura 4- Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln.

Esta modificação produz uma matriz carregada negativamente a pH 7,4, com um aumento total de até 125 cargas negativas por unidade de tropocolágeno. Este método desenvolve biomateriais com bom desempenho biológico, embora introduza algumas alterações na estrutura básica da molécula de colágeno (RADHIKA; BABU; SEHGAL, 1999). Matrizes colagênicas obtidas de pericárdio bovino através de hidrólise alcalina não apenas se mostram altamente biocompatíveis (GOISSIS et al., 1999), mas o mais importante, em experimentos em subcutâneo (GOISSIS; SUZIGAN; PEREIRA, 2000) e tíbia de rato (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002), o material se integrou a esses tecidos com ausência quase completa de resposta inflamatória crônica.

A adição de cargas sobre estas matrizes modifica sua energia de superfície, suas propriedades estruturais, que estão intimamente relacionadas com a adsorção de proteínas, fatores de crescimento, fatores de coagulação, com a adesão celular e, portanto, com a hemocompatibilidade e biocompatibilidade.

Além disso, uma propriedade importante para as MECs é a biodegradabilidade, a qual deve ocorrer com a formação do novo tecido, para tanto um controle do tempo de degradação das matrizes é interessante e pode ser obtido através de reações de reticulação. As reticulações existem naturalmente no tecido (Fig. 5), tanto para a formação de estrutura de tropocolágeno (reticulações intramoleculares), quanto para a formação das fibras (reticulações

intermoleculares). Contudo, pode-se obter materiais mais reticulados através de algumas reações de reticulação.

Figura 5 - Reticulações inter e intramoleculares presentes naturalmente no tropocolágeno.

Vários métodos de reticulação tem sido usados para alterar (geralmente diminuir) a taxa de degradação *in vivo* ou para alterar as propriedades mecânicas do colágeno (JARMAN-SMITH et al., 2004). A reticulação química pode resultar em materiais permanentemente reticulados, e a velocidade de degradação *in vivo* destes materiais pode ser controlada através do seu grau de reticulação (LIANG et al., 2004). Isto pode ser uma vantagem para o tratamento de queimados, onde a formação de cicatrizes e a contração do tecido podem ser minimizadas (JARMAN-SMITH et al., 2004). Portanto, o grau de reticulação determina a velocidade de degradação de tecidos extracelulares reticulados (LIANG et al., 2004).

As reticulações químicas podem ser feitas através de vários métodos como, por exemplo, éteres glicidílicos (XI et al., 1992), azida (PETITE et al., 1990), diisocianatos (NAIRMARK et al., 1995), glutaraldeído (GA) (CHEUNG et al., 1992). Essas modificações químicas utilizam tipicamente agentes químicos bifuncionais, que interagem com a matriz colagênica por meio de seus grupos funcionais reativos.

A reticulação com éteres glicidílicos utiliza epóxidos que, em função da sua alta reatividade química, reagem com todos os grupos reativos do colágeno, tendo assim uma baixa seletividade química, quando comparados com outros agentes reticulantes (XI et al., 1992).

A reticulação via azida pode induzir alterações estruturais sobre a matriz, devido a possíveis reações de transesterificação das ligações tipo éster presentes nas cadeias α do tropocolágeno. Outro problema com a metodologia convencional para a reticulação via azida, é a baixa eficiência da reação global, principalmente pelo fato de ser um processo em três etapas (PETITE et al., 1990).

Outro reagente utilizado na reticulação do colágeno é o hexametenodiisocianato, onde seu grupo isocianato terminal se liga covalentemente aos resíduos de ϵ -amino grupo de lisina (Lys) e hidroxilisina (Hyl), tanto intra quanto intercadeia, formando ligações do tipo uréia devido à reação entre os grupos isocianato e amina. Este processo é realizado sob condições anidras usando isopropanol, pois na presença de água a função isocianato tem uma alta reatividade, podendo ser destruída antes da sua reação com a matriz colagênica. A desvantagem é que as reticulações formadas não são tão estáveis quanto as reticulações formadas pelo GA (NAIRMARK et al., 1995).

O agente reticulante mais utilizado é o GA ou 1,5 – pentanodial (Fig. 6), o qual reage com ϵ -amino grupos de Lys e Hyl da matriz colagênica para formar ligações químicas do tipo base de Schiff ($-\text{CH}=\text{N}-$) (CHEUNG et al., 1982).

Figura 6 - Estrutura do 1,5-pentanodial (GA).

O GA também é muito utilizado na preparação de biopróteses como, por exemplo, válvulas cardíacas e pele artificial (JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996).

Por ser uma molécula bifuncional, ele une duas moléculas diferentes da matriz, gerando, assim, uma ligação cruzada ou de reticulação (CHEUNG et al., 1982). Outros

aldeídos são menos eficientes que o GA, pois este produz reticulações mais estáveis quimicamente, biologicamente e termicamente (NIMNI et al., 1987).

O GA é um reagente de fácil acesso, de baixo custo e em soluções aquosas pode reticular o tecido conforme ilustrado na Figura 7:

Figura 7 - Reticulação do colágeno pela reação com GA.

A única reação desejável do GA com a matriz colagênica é aquela onde há a formação das ligações cruzadas do tipo base de Schiff (Fig. 7). Entretanto, em soluções aquosas o GA forma uma mistura complexa em equilíbrio contendo GA livre nas formas mono e diidratadas, hemiacetais cíclicos e polímeros α,β -insaturados (RUIJGROK; WIJN; BOON, 1994) (Fig. 8). Deste modo, em função desse comportamento do GA em solução, as reações entre a matriz colagênica e o GA não são homogêneas.

O equilíbrio destas formas em solução depende da temperatura, concentração e pH do meio. Soluções concentradas de GA são relativamente estáveis a baixas temperaturas enquanto mantidas em meio aquoso, mas perdem rapidamente suas qualidades, deslocando o equilíbrio no sentido da formação de GA livre, quando em soluções tamponadas perto da neutralidade (GIGLIOTI, 2000), situação empregada no processo de reticulação realizado nesse trabalho.

a) Formas monoméricas

b) Hemiacetais poliméricos

c) Polímeros α e β -insaturados

Figura 8 - Comportamento do GA em solução: formas monoméricas, hemiacetais poliméricos e polímeros α,β -insaturados (GIGLIOTI, 2000).

O único critério utilizado para verificar o “grau de pureza” das soluções de GA empregadas na confecção de biopróteses é a determinação da relação das absorbâncias em 280 e 235nm, indicativa das concentrações relativas de GA livre e formas poliméricas. São consideradas soluções aceitáveis para uso, aquelas cujos índices estão entre 1,5 e 2,5, que são dependentes da procedência comercial do GA e do método de purificação (GIGLIOTI, 2000).

Outro problema relacionado com o GA, é que a sua reação com a matriz colagênica é relativamente rápida e, assim, a matriz apresenta regiões internas não reticuladas. Isto também acontece quando a matriz é tratada com uma solução concentrada de GA. Neste caso, a alta concentração de GA promove uma rápida reticulação da superfície do tecido, gerando uma barreira que impede ou evita a difusão do GA para o interior do tecido. Isto ocorre devido a impermeabilização das partes externas do tecido. (CHEUNG et al., 1985). A

Figura 9 mostra o efeito de impermeabilização do tecido quando reticulado com altas concentrações de GA :

Figura 9 - Diagrama representativo da impermeabilização por GA de tecidos naturais destinados à confecção de biopróteses (GIGLIOTI, 2000).

A citotoxicidade do GA residual em enxertos biológicos é motivo de preocupação, pois este pode ser liberado pós-implante, mas pode ser eliminado através do tratamento em solução de aminoácidos (JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996), os quais são capazes de reagir com a função aldeídica (GRIMM et al., 1992) e, assim, eliminam o GA residual.

Portanto, de acordo com o que foi descrito, os problemas relacionados à utilização de GA podem ser minimizados e até eliminados.

Substituintes de tecido mole à base de colágeno vem sendo muito pesquisados (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y, 2001; JARMAN-SMITH; MCFETRIDGE; CHAUDHURI, 2002; RUSZCZAK, 2003; PACHENCE, 1996), principalmente para substituir tecidos em queimados. Matrizes heterólogas provenientes de pele porcina são muito utilizadas (CHIU; BURD, 2005) devido a sua similaridade com a pele humana e por ter como constituinte principal o colágeno tipo I, que é o mais comum no tecido conjuntivo humano.

2. OBJETIVOS

Matrizes para reconstrução de tecidos têm sido de grande interesse. A preparação de matrizes extracelulares de colágeno porcino reticuladas com diferentes concentrações e tempos de reação com GA pode abrir novas perspectivas para a área de reconstrução de tecido mole.

Portanto, os objetivos deste trabalho são:

- Preparação de matrizes extracelulares de colágeno, por meio de hidrólise alcalina e reticulação com GA, utilizando pele porcina;
- Estudar as melhores condições para a reação de reticulação com GA como: tempo de reação, concentração de GA, método de reticulação (seqüencial ou não-seqüencial); de acordo com a aplicação desejada.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Preparação das matrizes

A pele retirada da parede abdominal porcina, obtida em açougues, foi previamente selecionada e limpa e, em seguida, foi lavada alternadamente com água destilada (30 min) e NaCl 0,9% (1 h), à temperatura ambiente, até que sua coloração fosse creme ou branca. A seguir, a pele limpa foi removida da solução e passou por uma hidrólise com solução alcalina contendo hidróxidos, sulfatos e cloretos de K^+ , Na^+ e Ca^{+2} , a $25^{\circ}C$, por um período de 96h. Em seguida, a matriz foi equilibrada com cloretos e sulfatos de K^+ , Na^+ e Ca^{+2} , por 6h, seguido de lavagens com ácido bórico 3%, EDTA 0,3% a pH 11 e água desionizada até pH constante, e equilibradas em tampão fosfato 0,13 mol.L⁻¹ (TF).

O esquema a seguir resume a preparação das matrizes:

Figura 10 - Esquema da preparação das matrizes extracelulares

3.2. Reação de reticulação com glutaraldeído (GA)

Após a hidrólise alcalina, a matriz de colágeno obtida a partir da pele porcina (0GA), passou por um tratamento químico com GA. Para isso foram utilizadas soluções com concentrações que variaram de 0,01 a 0,1% de GA, as quais foram preparadas a partir da diluição de uma solução de GA concentrada em TF pH 7,4.

A matriz 0GA foi dividida em várias partes, sendo que cada parte passou por um tratamento diferente, variando-se o tempo de reação, a concentração de GA e o tipo de reticulação (seqüencial e não-seqüencial) como descrito a seguir.

3.2.1. Reticulação não-seqüencial – 15 min

Nesta reticulação, a matriz 0GA foi dividida em quatro partes, sendo que uma parte foi colocada em uma solução de GA 0,1% (01GA15), outra em solução de GA 0,05% (05GA15), outra em uma solução de GA 0,01% (001GA15) e a última em TF 0,13 mol.L⁻¹ (0GA15), todas durante 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, as matrizes foram colocadas em tampão glicina: borato ($2,5 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹ glicina: 5×10^{-2} mol.L⁻¹ borato – TGB, pH 9,2) durante 1 h, lavadas com TF e água desionizada e, então, foram congeladas e liofilizadas para posterior caracterização. O tratamento com TGB é necessário para eliminar o glutaraldeído residual através da reação da glicina com o aldeído (GRIMM et al., 1992), enquanto utiliza-se TF para remover o TGB e água para eliminar qualquer resíduo salino. O esquema a seguir resume a reação de reticulação das matrizes não-seqüenciais – 15 min:

Figura 11 - Esquema da reação de reticulação não-sequencial - 15 min.

3.2.2. Reticulação não-sequencial – 45min

Nesta reticulação, a matriz 0GA foi dividida em três partes, sendo que uma parte foi colocada em uma solução de GA 0,085% (85GA45), outra em solução de GA 0,05% (05GA45) e a última em TF 0,13 mol.L⁻¹ (0GA45), todas durante 45 min à temperatura ambiente. Em seguida, as matrizes foram colocadas em TGB durante 1 h, lavadas com TF e água desionizada e, então, foram congeladas e liofilizadas para posterior caracterização. O esquema a seguir resume a reação de reticulação das matrizes não-sequenciais – 45 min:

Figura 12 - Esquema da reação de reticulação não-sequencial – 45 min.

3.2.3. Reticulação sequencial – 45 min

A reticulação sequencial foi realizada para tentar obter-se uma matriz mais reticulada e mais estável (GIGLIOTI, 2000) e assim, fazer uma comparação com a reticulação não-sequencial. A matriz 0GA foi primeiramente colocada em uma solução de GA 0,01% durante 15 min, em seguida foi colocada em uma solução de GA 0,025% durante 15 min e por último em uma solução de GA 0,05% durante 15min. Em seguida, foi colocada em TGB durante 1 h, lavada com TF e água desionizada e, então, foi congelada e liofilizada, obtendo-se a matriz reticulada sequencialmente com uma concentração total de 0,085% de GA e com um tempo total de reação de 45 min (85GA45S).

Figura 13 - Esquema da reação de reticulação sequencial - 45 min.

A Tabela 1 mostra todas as matrizes preparadas:

Tabela 1 - Matrizes preparadas por hidrólise alcalina e reticulação com GA.

Matriz	Tratamento
0GA ^a	hidrólise alcalina
0GA15	hidrólise alcalina + 15min TF ^b
001GA15	hidrólise alcalina + 15min GA 0,01%
05GA15	hidrólise alcalina + 15min GA 0,05%
01GA15	hidrólise alcalina + 15min GA 0,1%
0GA45	hidrólise alcalina + 45min TF
05GA45	hidrólise alcalina + 45min GA 0,05%
85GA45	hidrólise alcalina + 45min GA 0,085%
85GA45S	hidrólise alcalina + 45min GA 0,085% sequencial

^a Glutaraldeído; ^b Tampão Fosfato 0,13mol.L⁻¹.

3.3. Caracterização

As amostras foram caracterizadas por determinação do conteúdo de elastina, estabilidade biológica (tripsina), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG/DTG), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliação preliminar do potencial de citotoxicidade *in vitro*.

3.3.1. Determinação do conteúdo de elastina

A determinação do conteúdo de elastina foi feita da seguinte maneira: amostras das matrizes de aproximadamente 50 mg previamente liofilizadas foram colocadas em frascos com tampa, seguido da adição de uma solução de NaOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$ na proporção de 100mL de solução de NaOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$ por grama de amostra. A seguir, as matrizes foram colocadas em uma mufla a 100°C por 50 min para realização da hidrólise (CROSS; SMITH; CARPENTER, 1973). Após este período, as amostras foram lavadas com água desionizada e centrifugadas por 5min a 3000rpm. Este processo de lavagem e centrifugação foi repetido mais uma vez e o resíduo sólido final foi congelado e liofilizado. Após a liofilização os resíduos foram pesados e a quantidade de elastina determinada em miligramas de elastina por grama da amostra inicial e corresponde a uma média de três determinações independentes.

3.3.2. Estabilidade biológica (tripsina)

Para a determinação da estabilidade biológica foi preparada uma solução de tripsina em tampão borato $0,2\text{mol.L}^{-1}$ a pH 7,6 contendo CaCl_2 $5 \times 10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$, com uma atividade total de $0,01\text{U.mg}^{-1}$ de amostra. Foram cortados 3 discos de 1 cm de diâmetro para cada amostra, os quais foram aquecidos por 5 minutos em banho-maria para que ocorresse a desnaturação do colágeno (a tripsina só age sobre o colágeno desnaturado) e, em seguida,

foram congelados e liofilizados até massa constante. A solução de tripsina foi adicionada às amostras que, em seguida, foram colocadas em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C por 2 h. Após este período, as amostras foram aquecidas em banho-maria por 3 min para inibir a ação da enzima e lavadas com água desionizada, sendo então congeladas, liofilizadas e pesadas para determinação da degradação (GOISSIS et al., 1998).

A porcentagem de degradação foi determinada pela relação entre a massa não degradada (M_r) e a massa inicial (M_t) das amostras, através da seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de Degradação} = \frac{M_t - M_r}{M_t} \times 100 \quad (1)$$

3.3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Através dessa técnica foi possível medir a temperatura de desnaturação (T_d) das matrizes. Foi utilizado um equipamento da TA Instruments, modelo DSC - 2010, calibrado com padrão de índio em atmosfera de N_2 , com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ e em um intervalo de 25 a 150°C . As amostras foram equilibradas em TF por 24h e colocadas em suportes de alumínio não herméticos. As massas das amostras foram de aproximadamente 10 mg.

3.3.4. Termogravimetria (TG/DTG)

Essa técnica foi utilizada para verificar a estabilidade térmica das matrizes 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 $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ e com variação de temperatura de 25 a 900°C . As massas de amostras utilizadas foram de aproximadamente 10mg.

3.3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias, que permitiram observar a morfologia das matrizes, foram obtidas em um equipamento LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltda.), operando com feixe de elétrons de 20 keV. Essas amostras foram fixadas em porta-amostras de alumínio com fita adesiva de Carbono, as bordas recobertas com tinta prata para melhor condução de corrente elétrica, sendo recobertas com 20nm de liga ouro-paládio em um metalizador Balsers modelo SDC 050.

3.3.6. Avaliação preliminar do potencial de citotoxicidade *in vitro*

Esta análise foi realizada por Cláudia Bernal no Grupo de Cultura Celular e Fotossensibilizadores – DQFM - IQSC/USP sob coordenação da Prof^a. Dr. Janice Rodrigues Perussi. Foi realizado um teste preliminar com as matrizes 0GA45 (amostra não reticulada) e 85GA45 (matriz com maior reticulação).

Primeiramente, as amostras das matrizes de pele porcina 0GA45 e 85GA45 foram esterilizadas com óxido de etileno pela Oxetil Indústria e Comércio de Produtos Esterilizados Ltda - EPP, Santo Anastácio - SP.

A avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro* foi realizada pelo método de difusão em ágar, utilizando-se o corante vermelho neutro (ROGERO et al., 2003) e duas 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 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2006);

- Linhagem celular de fibroblastos de rato (McCoy B), depositada no ATCC (American Type Culture Collection) sob o código CRL-1696 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2006).

Neste método, a linhagem celular é semeada em placas de Petri e incubada durante 48h em meio de cultura líquido numa temperatura de 37°C e em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Este meio é o meio mínimo essencial de EAGLES (MEM – EAGLES), de acordo com a norma ASTM F895-84 (substituída em 2001 pela norma ASTM F895-84 (2001) e 1). A composição do meio EAGLE é mostrada na Tabela 2:

Tabela 2 - Composição do meio EAGLE.

Componentes	g.L⁻¹	Componentes	g.L⁻¹
CaCl ₂ (anidro)	0,20000	L-Fenilalanina	0,03250
MgSO ₄ (anidro)	0,09767	L-Prolina	0,01150
KCl	0,40000	L-Serina	0,01050
NaHCO ₃	1,50000	L-Treonina	0,04760
NaCl	6,80000	L-Triptofano	0,01000
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,14000	L-Tirosina.2Na.2H ₂ O	0,05190
L-Alanina	0,00890	L-Valina	0,04680
L-Arginina.HCl	0,12640	Cloreto de Colina	0,00100
L-Asparagina.H ₂ O	0,01500	Ácido Fólico	0,00100
L-Ácido Aspártico	0,01330	Mio-Inositol	0,00200
L-Cisteína.2HCl	0,03120	Nicotinamida	0,00100
L-Ácido Glutâmico	0,01470	Ácido D-Pantotenico (hemicálcio)	0,00100
L-Glutamina	0,29200	Piridoxina.HCl	0,00100
Glicina	0,00750	Riboflavina	0,00010
L-Histidina.HCl.H ₂ O	0,04190	Tiamina.HCl	0,00100
L-Isoleucina	0,05250	D-Glucose	1,00000
L-Leucina	0,05250	Sal de Sódio de Vermelho de Fenol	0,01000
L-Lisina.HCl	0,07250	Piruvato de Sódio	0,11000
L-Metionina	0,01500		

Fonte: AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC).

Após 48h, o meio é descartado com pipeta estéril, lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e substituído por um meio de cobertura sólido composto de partes iguais de mínimo de EAGLE (MEM - Sigma) e ágar (Sigma) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro (JTBaker). No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado na mesma proporção com o MEM, ambos a uma temperatura de 44°C. Fragmentos com cerca de 1,0 cm² de área superficial dos biomateriais são colocados sobre o ágar antes de sua solidificação completa. As placas de Petri são incubadas novamente em estufas com 5% CO₂ a 37°C por 24h e analisadas macroscopicamente quanto a presença de halo ao redor da amostra (ROGERO et al., 2003).

Foram utilizados como controle positivo fragmentos de látex e como controle negativo discos de papel de filtro de natureza atóxica. As amostras das matrizes foram avaliadas em triplicata.

3.3.6.1. Cultura Celular

As células utilizadas foram cultivadas em meio EAGLE, com 10% de soro fetal bovino e os antibióticos ampicilina e estreptomicina. Todas as manipulações com as células foram realizadas em fluxo laminar. Foram feitos subcultivos das células a cada três dias e as células foram mantidas em estufa de cultura a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ (CARVALHO, 2001).

Removeu-se o meio de cultura por aspiração; a seguir adicionou-se solução de Versene (EDTA 0,02%), 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. Transferiu-se então o conteúdo do frasco para um tubo cônico, centrifugou-se a 1000 rpm durante 40 segundos, descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em meio de cultura. Após homogeneizar, retirou-se uma alíquota para a contagem do número de células. Em seguida, diluiu-se a suspensão de células com meio EAGLE com 10% de soro fetal bovino na densidade desejada e plaquearam-se as células 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)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após ser limpa e liofilizada, a matriz de pele porcina apresentava bastante gordura, coloração rósea e uma textura mais rígida (Fig. 14 A). Após a hidrólise alcalina, a matriz de pele porcina teve sua quantidade de gordura reduzida, a coloração tornou-se branca, a espessura diminuiu e a textura estava macia (Fig.14 B). Após a reticulação a matriz de pele porcina tornou-se mais rígida, não houve alteração da espessura e sua coloração tornou-se amarela (Fig. 14 C). As matrizes tornaram-se mais amarelas e rígidas conforme se aumentou a concentração de GA.

Figura 14 - Fotografias digitais das matrizes de pele porcina. **A)** sem hidrólise alcalina; **B)** após hidrólise alcalina; **C)** após hidrólise alcalina e reticulação com GA (85GA45).

4.1 Determinação do conteúdo de elastina

As matrizes foram caracterizadas pelo conteúdo de elastina presente no tecido com base na insolubilidade da elastina e sua resistência à hidrólise alcalina (CROSS; SMITH; CARPENTER, 1973). A hidrólise do tecido foi realizada com uma solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e temperatura de 100°C, e os valores do conteúdo de elastina determinados (Tabela 3).

Tabela 3 - Conteúdo de elastina e colágeno para as matrizes de pele porcina.

<i>matrizes</i>	<i>Ma</i>	% Elastina (m/m)	% Colágeno (m/m)
sem hidrólise		4,8±0,5	95,2±0,5
0GA15		5,1±0,4	94,9±0,4
0GA45		4,7±0,3	95,3±0,3
001GA15		5,0±0,5	95,0±0,5
05GA15		5,0±0,5	95,0±0,5
01GA15		4,6±0,2	95,4±0,2
05GA45		4,7±0,2	95,3±0,2
85GA45		5,0±0,3	95,0±0,3
85GA45S		4,7±0,5	95,3±0,5

*média de 3 determinações independentes

Pela análise dos resultados da Tabela 3, observou-se que, mesmo depois da hidrólise alcalina e reticulação com GA, as quantidades de elastina presentes nas matrizes não se alteram independente do tempo de reação e da concentração de GA. A hidrólise alcalina remove as células presentes no tecido além de outros componentes, resultando em uma matriz acelular composta de colágeno e elastina (FORTI, 1995). Com isso, foi possível também

determinar a massa média de colágeno presente nas matrizes, a qual foi de $95,2 \pm 0,2\%$ (m/m), e a massa média de elastina, que foi de $4,8 \pm 0,2\%$ (m/m).

Não foi encontrado na literatura valores de conteúdo de elastina e colágeno presentes na pele porcina, mas em trabalhos realizados no grupo (GIGLIOTI, 2005), foi determinada a quantidade de elastina para pericárdio bovino, e o valor obtido foi menor ($3,1 \pm 0,1\%$) do que o obtido para a matriz de pele porcina.

4.2 Estabilidade biológica (tripsina)

Para a estabilidade biológica, utilizou-se a enzima tripsina para avaliação da extensão de reticulação. A tripsina atua em ligações peptídicas (-CONH-) adjacentes aos aminoácidos básicos lisina e arginina e tem sua atividade restringida quando estes grupos estão bloqueados. No caso da reticulação de materiais colagênicos utilizando GA, a inibição ocorre nos resíduos de lisina em função da formação da base de Schiff (GIGLIOTI, 2000).

As porcentagens de degradação obtidas através dos ensaios de estabilidade biológica estão descritos na Tabela 4:

Tabela 4 - Porcentagens de degradação enzimática das matrizes de pele porcina

Matrizes	%degradação* (m/m)
0GA15	$85,6 \pm 0,4$
0GA45	$83,6 \pm 1,1$
001GA15	$67,1 \pm 1,1$
05GA15	$65,4 \pm 0,7$
01GA15	$57,0 \pm 0,5$
05GA45	$53,2 \pm 0,8$
85GA45	$46,1 \pm 0,7$
85GA45S	$57,1 \pm 1,1$

* valores médios de 3 determinações

Comparando-se os resultados obtidos através dos ensaios de estabilidade biológica para as matrizes reticuladas durante 15 min (001GA15, 05GA15 e 01GA15), observa-se que a degradação diminui com o aumento da concentração de GA. Isso também pode ser observado comparando-se as matrizes reticuladas durante 45 min (05GA45, 85GA45e 85GA45S).

Fazendo-se uma comparação das porcentagens de degradação das matrizes reticuladas com a mesma concentração de GA, mas com tempos de reação diferentes (matrizes 05GA15 e 05GA45), observa-se que a matriz 05GA45 degradou menos que a 05GA15, ou seja, com o aumento do tempo de reação com GA, há uma diminuição da porcentagem de degradação da matriz. Portanto, quanto maior o tempo de reação, mais reticulada fica a matriz.

A matriz reticulada sequencialmente (85GA45S) apresentou maior porcentagem de degradação do que as reticuladas não-sequencialmente 05GA45 e 85GA45. Além disso, ela apresentou porcentagem de degradação similar à da matriz 01GA15. Através desses resultados, pode-se dizer que a matriz 85GA45 apresentou-se mais resistente à degradação que as matrizes 05GA45 e 85GA45S. Essa maior resistência à degradação da matriz reticulada não-sequencialmente pode estar associada ao efeito de impermeabilização do material provocado pelo GA polimerizado na sua superfície (RUIJGROK; WIJN; BOON, 1994), que impede a penetração da enzima no interior do tecido; assim apenas os sítios não reticulados da superfície do material estariam expostos ao ataque enzimático.

Este efeito de impermeabilização ocorre quando a matriz é reticulada com uma solução concentrada de GA, o que promove uma rápida reticulação da superfície do tecido, gerando uma barreira que impede ou evita a difusão do GA para o interior do tecido (CHEUNG et al., 1985). Assim, as regiões internas da matriz colagênica podem estar sem qualquer tipo de reticulação. Esse comportamento foi observado em trabalhos realizados

anteriormente no grupo com matrizes derivadas de pericárdio bovino, onde foi determinado que o efeito de impermeabilização ocorre quando são utilizadas soluções com concentrações maiores que 0,05% de GA (GIGLIOTI, 2000).

Os resultados de estabilidade biológica para as matrizes 85GA45S e 85GA45 mostraram que a matriz 85GA45S reticulou menos que a matriz 85GA45. A obtenção de uma matriz bastante reticulada seria interessante na reconstrução de tecidos moles, pois em muitos casos necessita-se de tempos maiores para regeneração do tecido.

4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise calorimétrica por DSC permite a medida da estabilidade das estruturas helicoidais das moléculas de colágeno, relativas à transição colágeno→gelatina. A quebra da estrutura da hélice tripla dá lugar a uma estrutura amorfa formada por cadeias polipeptídicas:

A Figura 15 mostra a desnaturação do colágeno após seu aquecimento:

Figura 15 - 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.

As curvas DSC das matrizes estão mostradas nas Figuras 16 e 17.

Figura 16 - Curvas DSC das matrizes de colágeno com e sem hidrólise alcalina de 96h e reticuladas com GA durante 15 min.

Figura 17 - Curvas DSC das matrizes de colágeno com e sem hidrólise alcalina de 96h e reticuladas com GA durante 45 min.

A análise das curvas DSC (Figuras 16 e 17) permitiu a obtenção da temperatura de desnaturação (Td) das matrizes, indicando que o colágeno presente na pele porcina não foi desnaturado durante a hidrólise alcalina.

Observou-se também que as matrizes que passaram pelo tratamento com GA apresentaram temperaturas de desnaturação maiores do que a matriz sem tratamento com GA, sugerindo que ocorreram reticulações nas matrizes. A Tabela 5 mostra os valores de Td para as matrizes:

Tabela 5 - Temperatura de desnaturação (Td) das matrizes de pele porcina obtidas através das curvas de DSC.

<i>Matriz</i>	Td (°C)
<i>Sem</i>	
<i>hidrólise</i>	66,8
<i>0GA15</i>	40,8
001GA15	44,1
05GA15	49,0
01GA15	50,5
0GA45	42,7
05GA45	55,9
85GA45	56,2
85GA45S	53,2

Esta variação nas temperaturas de desnaturação é resultado do aumento no grau de reticulação do colágeno presente na pele porcina, proporcionalmente maior com o aumento da concentração de GA. A reticulação pode ser atribuída à formação de ligações cruzadas do tipo base de Schiff entre o GA e ϵ -amino grupos de lisina e hidroxilisina da matriz de colágeno (CHEUNG, 1982).

Comparando-se os valores de Td das matrizes 0GA15 e 0GA45 com o valor de Td da matriz sem hidrólise alcalina, observa-se que após esse tratamento o valor de Td diminui,

pois a hidrólise alcalina provoca uma diminuição de aproximadamente 26°C para a matriz 0GA15 e 24°C para a matriz 0GA45. Essa diminuição pode estar associada ao rompimento das ligações cruzadas do tecido, ao aumento do número de cargas negativas na matriz de colágeno e à desorganização da estrutura fibrilar da matriz colagênica (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). Este comportamento foi observado em outros tecidos como o pericárdio bovino (GIGLIOTI, 2005) e serosa porcina (FILHO et al., 2005).

Segundo a literatura, quanto menor Td maior é a degradação enzimática (GIGLIOTI, 2000). Assim, comparando-se os valores de Td com os valores das porcentagens de degradação enzimática, verifica-se que quanto menor Td, maior a porcentagem de degradação enzimática. Portanto, os resultados obtidos através de DSC estão de acordo com os obtidos pela degradação enzimática.

4.4 Termogravimetria (TG)

Através da termogravimetria, foi possível verificar a variação de massa das matrizes em função da temperatura e assim verificar a degradação térmica das matrizes e observar as mudanças que ocorreram nessa degradação após a hidrólise alcalina e após a reticulação com GA. As curvas termogravimétricas e respectivas primeiras derivadas das matrizes sem e com hidrólise alcalina e reticulada com GA (85GA45S) são mostradas nas Figuras 18, 19 e 20. As demais curvas termogravimétricas para as matrizes de pele porcina reticuladas apresentaram-se similares a apresentada na Figura 20.

Figura 18 - Curva TG /DTG da matriz de pele porcina sem hidrólise alcalina.
— TG; — DTG.

Figura 19 - Curva TG/DTG da matriz de pele porcina com 96 h de hidrólise alcalina.
— TG; — DTG.

Figura 20 - Curva TG/DTG da matriz de pele porcina com 96 h de hidrólise alcalina e reticulada sequencialmente com GA 0,085% durante 45 min.
— TG; — DTG.

A Tabela 6 mostra as porcentagens de perda de massa das matrizes de pele porcina:

Tabela 6 - Porcentagens de perda de massa das matrizes de pele porcina obtidas através de TG/DTG

<i>Matriz</i>	% Perda de massa		
	25-200°C	200-480°C	480-800°C
pele porcina	7,8%	68,4%	23,5%
0GA	10,3%	70%	18,5%
<i>001</i>			
<i>GA15</i>	14,5%	47,8%	29,7%
<i>05G</i>			
<i>A15</i>	14,8%	49,5%	31,5%
<i>01G</i>			
<i>A15</i>	14,8%	48,3%	32,8%
<i>05G</i>			
<i>A45</i>	14,6%	45,8%	29,6%
<i>85G</i>			
<i>A45</i>	10%	61,4%	24,9%

A45S	85G	13,3%	48,7%	27,8%
------	-----	-------	-------	-------

Pela análise dos resultados obtidos através das curvas TG/DTG, observa-se diferenças na perda de água para as matrizes entre 25 e 200°C, mostrando que após a hidrólise alcalina houve um aumento na quantidade de água absorvida. Esse aumento ocorre devido a hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln e, assim, há um aumento do número de cargas negativas (grupos carboxilas) (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998), fazendo com que aumente o efeito de solvatação do colágeno e, portanto, a quantidade de água absorvida. Após a reticulação, essa quantidade de água aumentou mais, pois houve um aumento na densidade de cargas negativas devido a reação do GA com ϵ -amino grupos Lys e Hyl da matriz colagênica para formar ligações químicas do tipo base de Schiff ($-\text{CH}=\text{N}$) (CHEUNG et al., 1982), aumentando a quantidade de água presente na matriz.

Comparando-se as diferenças na perda de água entre as matrizes 85GA45 e 85GA45S, observa-se que a matriz reticulada não-seqüencialmente (85GA45) apresenta menos água que a matriz reticulada seqüencialmente (85GA45S), sugerindo que a matriz 85GA45 estava mais impermeabilizada. Este resultado aliado à diferença de estabilidade biológica encontrada para essas matrizes (46,1% para 85GA45 e 57,1% para 85GA45S) sugere que as mesmas podem ser aplicadas diferentemente na área de regeneração tecidual. Nos casos em que se necessite de tempos maiores para regeneração pode-se utilizar a matriz com maior reticulação e, para casos onde os tempos menores sejam necessários uma matriz com conteúdo maior de água poderia ser mais adequada.

Entre 200-480°C, observa-se a decomposição da matéria orgânica, ou seja, a decomposição de colágeno e elastina presentes nas matrizes hidrolisadas e reticuladas. Após a reticulação a porcentagem de perda de massa foi menor, pois o tratamento com GA faz com o colágeno presente nas matrizes torne-se mais estável termicamente (NIMNI et al., 1987) em

consequência do aumento do grau de reticulação e, portanto, mais resistentes à degradação térmica. Assim, uma parte do colágeno foi degradado neste intervalo de temperatura, o restante foi carbonizado.

A carbonização das matrizes ocorreu entre 480-800°C. Pode-se observar diferenças nos valores de perda de massa, pois as matrizes reticuladas com GA tem parte do colágeno carbonizado devido este estar mais resistente à degradação térmica. Assim, a porcentagem de perda de massa na carbonização aumenta para as matrizes reticuladas.

Estes resultados comprovaram que a reticulação com GA aumenta a estabilidade térmica da matriz, como também mostrado por DSC.

4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Através das fotomicrografias obtidas por MEV, pôde-se observar a superfície das matrizes e as mudanças que podem ter ocorrido após a reticulação com GA.

A Figura 21 mostra as fotomicrografias das matrizes de pele porcina após hidrólise alcalina (0GA – Fig.21 A) e após hidrólise alcalina e reticulação com GA 0,01 (001GA15) e 0,05% (05GA15) durante 15 min (Fig. B e C, respectivamente).

Fazendo-se uma comparação entre essas matrizes (Figuras 21 A, B e C), observa-se que com o aumento da concentração de GA, a presença de fibras tornam-se mais definidas, sugerindo que ocorreram reticulações na matriz. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por DSC e estabilidade biológica, pois com o aumento da concentração de GA, o grau de reticulação é maior e, portanto, o valor de Td aumenta e a porcentagem de degradação enzimática da matriz diminui.

Figura 21 - Fotomicrografias das matrizes de pele porcina após hidrólise alcalina por 96h e reticuladas com GA durante 15 min nas seguintes concentrações: **A)** 0%; **B)** 0,01%; **C)** 0,05%. Aumento de 200X.

A Figura 22 mostra as fotomicrografias das matrizes de pele porcina após hidrólise alcalina e reticulação com GA 0,05% durante 15 (05GA15) e 45 min (05GA45) (A e B respectivamente):

Figura 22 - Fotomicrografias das matrizes de pele porcina após hidrólise alcalina por 96h e reticuladas com GA nas seguintes concentrações e tempos de reação: **A)** 0,05% - 15min; **B)** 0,05% - 45min. Aumento de 200X.

Comparando-se as matrizes reticuladas com a mesma concentração de GA, mas com tempos de reação diferentes (Figuras 22 A e B), nota-se que a matriz reticulada durante 45min apresenta uma estrutura com fibras mais definidas. Assim, observa-se que os resultados de MEV com relação à variação de tempo de reticulação estão de acordo com os obtidos por DSC e estabilidade biológica, pois os valores de Td foram maiores e as

porcentagens de degradação enzimática menores quando os tempos de reação foram aumentados.

As Figuras 23 A e B mostram as fotomicrografias das matrizes reticuladas com mesma concentração de GA e mesmo tempo de reticulação, mas por processos diferentes (seqüencial e não seqüencial):

Figura 23 - Fotomicrografias das matrizes de pele porcina após hidrólise alcalina por 96h e reticuladas com GA nas seguintes concentrações e tempos de reação: **A)** 0,085% - 45min não-seqüencial; **B)** 0,085% - 45min seqüencial. Aumento de 500x.

Pela análise das fotomicrografias (Fig. 23), pôde-se observar que na matriz reticulada não seqüencialmente houve a presença de fibras mais definidas que a matriz reticulada seqüencialmente. Assim, para o caso da pele porcina, a presença de fibras é melhor

evidenciada para as matrizes reticuladas não-seqüencialmente confirmando, novamente, os resultados obtidos por DSC e estabilidade biológica, onde o valor de Td foi maior e a porcentagem de degradação enzimática menor para a matriz reticulada não-seqüencialmente.

4.6. Avaliação preliminar do potencial de citotoxicidade *in vitro*

As placas foram analisadas macroscopicamente quanto à presença de halo ao redor do biomaterial. Este halo é observado quando há morte de células, liberando o corante vermelho neutro incorporado nas células, dando um aspecto transparente ao local. A citotoxicidade foi avaliada pela medida do diâmetro deste halo claro formado, medido com uma régua milimétrica.(ROGERO et al., 2003). As matrizes 0GA45 e 85GA45 apresentaram citotoxicidade devido a presença de um halo claro ao redor do material. O controle positivo apresentou um halo de 26,0mm (Figura 24B), enquanto que o controle negativo não apresentou halo (Figura 24A). As matrizes 0GA45 e 85GA45 apresentaram halos de 28,7 e 21,0mm, respectivamente para as duas linhagens celulares utilizadas.(Figura 25A e B). A Tabela 7 mostra os valores dos diâmetros dos halos das matrizes e dos controles.

Tabela 7 - Valores dos diâmetros dos halos das matrizes de pele porcina e dos controles.

Amostra	Diâmetro do halo (mm)
Controle negativo	0,0±0,5
Controle positivo	26,0±0,5
0GA45	28,7±1,5
85GA45	21,0±1,5

Figura 24 - Teste de citotoxicidade *in vitro*: **A)** Controle Negativo; **B)** Controle Positivo.

Figura 25 - Teste de citotoxicidade *in vitro* das matrizes de pele porcina: **A)** 0GA45; **B)** 85GA45.

Os resultados indicam que ambas as matrizes de pele porcina apresentam citotoxicidade, que pode estar associada à presença de gordura não removida pela hidrólise

alcalina, já que a pela porcina é muito gordurosa quando comparada com outras fontes teciduais como o pericárdio bovino ou mesmo a serosa porcina, rotineiramente utilizadas pelo grupo de Biomateriais. A matriz 0GA45 (Figura 25A) apresentou um halo maior que a matriz 85GA45 (Figura 25B) para as duas linhagens utilizadas, ou seja, foi mais citotóxica. Após a reticulação com GA, a citotoxicidade foi menor, pois o processo de reticulação pode ter eliminado mais gordura.

Uma solução para esse problema seria a realização de um pré-tratamento da matriz de pele porcina para remoção de gordura, antes da realização da hidrólise. Além disso, estes resultados ainda são preliminares, novas linhagens de células estão sendo estudadas.

5. CONCLUSÃO

A hidrólise alcalina e a reticulação com GA não provocaram a desnaturação do colágeno presente nas matrizes.

A elastina permanece presente nas matrizes de pele porcina independente do tempo de reação e da concentração de GA e a degradação diminuiu com o aumento do tempo de reação e da concentração de GA.

As matrizes tratadas com GA apresentaram Td maiores com o aumento do tempo de reticulação e da concentração de GA. O colágeno presente nessas matrizes tornou-se termicamente mais estável e a quantidade de água aumentou após a reticulação não-sequencial com GA. Nas matrizes reticuladas notou-se uma maior presença de fibras, indicando que ocorreram as reações de reticulações.

A reticulação sequencial produziu uma matriz com maior quantidade de água e menor reticulação, podendo assim ser utilizada em aplicações onde se necessite de menores tempos para a regeneração tecidual. A reticulação não-sequencial produziu matrizes mais reticuladas e assim pode ser utilizada em casos onde tempo para a regeneração seja maior.

Os resultados preliminares de citotoxicidade *in vitro* mostraram que as matrizes de pele porcina são citotóxicas. Contudo, esse resultado pode ser um reflexo da gordura presente nessas matrizes mesmo após a hidrólise alcalina e a reticulação com GA.. É necessário a realização de um pré-tratamento na pele porcina antes da hidrólise alcalina.

Assim, há a possibilidade de preparação de matrizes com diferentes tempos de degradação, as quais podem ser utilizadas na reconstrução de tecidos moles.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEDEJI, O. A. ; BAILEY, C. A.; VARMA, J. S. Porcine dermal collagen graft in abdominal-wall reconstruction. **Br. J. Plast. Surg.**, v. 55, p. 85-86, 2002.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; KEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Publishing, 1994. 1294 p.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC): Cell Lines, 2006. Disponível em: <<http://www.atcc.org/common/documents/pdf/30-2003.pdf>>; < <http://www.atcc.org>> Acesso em: 17 março 2006.

ANGELE, P.; ABKE, J.; KUJAT, R.; FALTERMEIER, H.; SCHUMANN, D.; RUSZCZAK, Z.; MEHL, R.; NERLICH, M.; KINNER, R.; ENGLERT, C.; MUELLER, R. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. **Biomaterials**, v. 25, p. 2831-2841, 2004.

ANTISZKO, M.; BRACZKO, M.; GRZYBOWSKI, J.; JETHON, J. A comparative examination of the homeostatic properties of xenogenic collagenic biomaterials. **Pol. Med.**, v. 25, p. 37-45, 1995.

ASTM F895-84 (2001)e1 - Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity. In: ASTM. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: ASTM, 2001. v. 13.01.

ATALA, A.; NYBERG, L. M. Tissue engineering. **World J. Urol.**, v. 18, p. 1, 2000.

BECKER, D. Temporary wound dressing of burns with fresh, sterile, frozen porcine skin. **Annals of burn and fire disasters**, v. 11, p. 171-175, 1998.

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, p. 1074-1079, 2001.

BLACKSHAW, S. E.; ARKISON, S.; CAMERON, C.; DAVIES, J. A. Promotion of regeneration and axon growth following injury in an invertebrate nervous system by the use of three-dimensional collagen gels. **Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 264, p. 657-661, 1997.

BOOT – HANDFORD, R. P.; TUCKWELL, D. S.; PLUMB, D. A.; ROCK, C. F.; POULSOM, R. A novel and highly conserved collagen (pro α 1(XVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 31067-31077, 2003.

BURKE, J. F.; YANNAS, J. V.; QUINBY, W. C.; BONDOC, C. C.; JUNG, W. K.

Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Ann. Surg.**, v. 194, p. 413-428, 1981.

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.

CHAPMAN, J. A.; TZAPHLIDOU, M.; MEEK, K. M.; KADLER, K. E. The collagen fibril – a model system studying the staining and fixation of a protein. **Electron. Microsc. Rev.**, v. 3, p. 143-182, 1990.

CHEUNG, D. T.; NATASHA, P.; KO, E. C.; NIMNI, M. E. Mechanism of cross-linking of proteins by glutaraldehyde. II: Reaction with collagen in tissue. **Connect. Tis. Res.**, v. 10, p. 201-206, 1982.

CHEUNG, D. T.; NATASHIA, P.; KO, E. C.; NIMNI, M. E. Mechanism of cross-linking of proteins by glutaraldehyde. III: Reaction with monomeric and polymeric collagen in tissue. **Connect Tis. Res.**, v. 13, p. 109-115, 1985.

CHIU, T.; BURD, A. “Xenograft” dressing in the treatment of burns. **Clin. Dermatol.**, v.23, p. 419–423, 2005.

CROSS, H. R.; SMITH, G. C.; CARPENTER, Z. L. Quantitative isolation and partial characterization of elastin in bovine muscle. **J. Agric. Food Chem.**, v. 21, n. 4, p. 716-721, 1973.

CURTIS, A.; RIEHLE, M. Tissue engineering: the biophysical background. **Phys. Med. Biol.**, v. 46, p. R47-R65, 2001.

DAVIS, D. A.; ARPEY, C. J. Porcine heterografts in dermatologic surgery and reconstruction. **Dermatol. Surgery**, v. 26, p. 76-80, 2000.

FENG, X. ; TAN, J.; PAN, Y.; WU, Q.; RUAN, S.; SHEN, R.; CHEN, X.; DU, Y. Control of hypertrophic scar from inception by using xenogenic (porcine) acellular dermal matrix (ADM) to cover deep second degree burn. **Burns**, 2006, No prelo.

FILHO, R. B. C. ; FILHO, S. R. F.; AMARO, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Comportamento térmico de matrizes derivadas de serosa porcina. In: II ENCONTRO REGIONAL DOS USUÁRIOS DE TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS; 2005, São Carlos. **Resumo...**, São Carlos, 2005. p. 43.

FORTI, F. L. **Comportamento Estrutural de matrizes colagênicas tratadas com dioxano: propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas.** 1995. 75 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

GALLOP, P. M.; BLUMENFELD, O. O.; SEIFTER, S. Subunits and special structural features of tropocollagen. In: RAMACHANDRAN, G. N. (Ed.). **Treatise of Collagen**. London: Academic Press, 1967. v. 3, p. 339.

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.

GIGLIOTI, A. F. **Um processo automático para a reticulação progressiva do pericárdio bovino por meio de gradiente de concentração linear do glutaraldeído**. 2000. 90 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

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, 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. **Resumo...**, Florianópolis: Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica, 2000. p. 242-247.

GOISSIS, G.; FIGUEIRÓ, S. D.; BRAILE, D. M.; ARAUJO, R. B.; RAMIREZ, V. D. A. Reticulação progressiva de pericárdio bovino com glutaraldeído para confecção de válvulas cardíacas. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 8, p. 46-54, 1998.

GRADA, S.; KUPCSIKA, L.; GORNAB, K.; GOGOLEWSKIB, S.; ALINIA, M. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. **Biomaterials**, v. 24, p. 5163–5171, 2003.

GRIFFITH, L. G.; NAUGHTON, G. Tissue Engineering – corrent challenges and expanding opportunities. **Science**, v. 295, p. 1009-1014, 2002.

GRIMM, M.; GRABENWOGER, M.; EYBL, E.; MORITZ, A.; BOCK, P.; MULLER, M. M.; WOLNER, E. Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L-glutamic acid treatment. **J. Card. Surg.**, v. 7, p. 58-64, 1992.

HOYAMA, E.; SCHELLINI, S. A.; PELLIZON, C. H.; MARQUES, M. E. A.; PADOVANI, C. R.; ROSSA, R. Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelular porcino com e sem cobertura impermeável. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, p. 369-374, 2005.

JARMAN-SMITH, M. L.; BODAMYALI, T.; STEVENS, C.;HOWELL, J. A.; HORROCKS, M.; CHAUDHURI, J. B. Porcine collagen crosslinking, degradation and its capability for fibroblast adhesion and proliferation. **J. Mat. Sci.: Mat. in Med.**, v. 15, p. 925-932, 2004.

JARMAN-SMITH, M.; MCFETRIDGE, P.; CHAUDHURI, J. B. Collagen-derived matrices for tissue engineering. **Eur. Cells and Mat.**, v. 4, p. 18, 2002.

JAYAKRISHNAN, A.; JAMEELA, S. R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprosthesis and drug delivery matrices. **Biomaterials**, v. 17, p. 471-484, 1996.

KHOR, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. **Biomaterials**, v. 18, p. 95-105, 1997.

KIM, B.; MOONEY, D. J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 224-230, 1998.

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. **Quím. Nova**, v. 21, p. 267-271, 1998.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, p. 920-925, 1993.

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

LIANG, H.-C.; CHANG, Y.; HSU, C.-K., LEE, M.-H.; SUNG, H. W. Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern. **Biomaterials**, v. 25, p. 3541-3552, 2004.

MATOUKOVÁL, E.; STEHLÍEK, P.; VESELYL, P. Acellular porcine xenodermis as a temporary wound cover and substratum for cultured keratinocytes. **Eur. Cells Mat.**, v.4, p. 83-85, 2002.

MATSUI, S. Histological evaluation of skin reconstruction using artificial dermis. **Biomaterials**, v. 10, p. 995-1000, 1996.

MAYNE, R.; BURGESSON, R. E. **Structure and Function of Collagen Types**. London: Academic Press, 1987. 317 p.

MIDDELKOOP, E.; VAN DEN BOGAERDT, A. J.; LAME, E. N.; HOEKSTRA, M. J.; BRANDSMA, K.; ULRICH, M. M. W. Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. **Biomaterials**, v. 25, p. 1559-1567, 2004.

NAIRMARK, W. A.; PEREIRA, C. A.; TSANG, K.; LEE, M. J. J. HMDC crosslinking of bovine pericardial tissues: a potential role of the solvent environment in the design of bioprosthetic materials. **Mat. Sci. Med.**, v. 6, p. 235-241, 1995.

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

- NIMNI, M. E.; CHEUNG, D.; STRATES, B.; KODAMA, M.; SHEIKH, K.. Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 21, p. 741-771, 1987.
- PACHENCE, J. M.; Collagen –based devices for soft tissue repair. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 33, p. 35- 40, 1996.
- PARK, J. B. **Biomaterials Science and Engineering**. New York: Plenum Press, 1984. 459 p.
- PETITE, H.; RAULT, I.; HUC, A.; MENASCHE, P.; HERBAGE, D. Use of acyl azida method for crosslinking collagen-rich tissue such as pericardium. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 24, p. 179-87, 1990.
- RADHIKA, M.; BABU, M.; SEHGAL, P. K. Cellular proliferation on desamidated collagen matrices. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 124, n. 2, p. 131-139, 1999.
- RATNER, B. D. New ideas in biomaterials science a path to engineered biomaterials. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 27, p. 837-850, 1993.
- RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 6, p. 41-75, 2004.
- ROCHA, L. B., GOISSIS, G., ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v. 23, p. 449–456, 2002.
- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- RUIJGROK, J. M.; WIJN, J. R.; BOON, M. E. Optimizing glutaraldehyde cross-linking effects of time, temperature and concentrations measured by shrinkage temperature. **J. Mat. Sci. Mat. Med.**, v. 5, p. 80-87, 1994.
- RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Adv. Drug. Del. Rev.**, v. 55, p. 1595-1611, 2003.
- RUSZCZAK, Z.; SCHWARTZ, R. A. Modern aspects of wound healing: An update. **Dermatol. Surg.**, v. 26, p. 219- 229, 2000.
- SAKIEL, S. Clinical application of new bovine collagen membrane as partial thickness burn wound dressing. **Pol. Med.**, v. 3. p. 19-24, 1995.
- SARAY, A. Porcine Dermal Collagen (Permacol) for Facial Contour Augmentation: Preliminary Report. **Aesth. Plast. Surg.**, v. 27, p. 368–375, 2003.

SCHULZ, III J. T.; TOMPKINS, R. G.; BURKE, J. F. Artificial Skin. **Ann. Rev. Med.**, v. 51, p. 231-244, 2000.

SHERIDAN, R.L. Comprehensive Treatment of Burns. **Curr. Prob. Surg.**, v. 38, p. 1-101, 2001.

SILVER, F.; DOILLON, C. **Biocompatibility, Interactions and implantable materials**. New York: VCH, 1989. v. 1.

SONG, E.; KIM, S. Y.; CHUN, T.; BYUN, H-J.; LEE, Y. M. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. **Biomaterials**, v. 27, p. 2951–2961, 2006.

VALENTE, M.; IUS, P; BORTOLOTTI, U.; TALENTI, E.; BOTTIO, T.; THIENE, G. Pathology of the Pericarbon bovine pericardial xenograft implanted in humans. **J. Heart Valve Dis.**, v. 7, p. 180-189, 1998.

VATS, A.; TOLLEY, N. S.; POLAK, J. M.; GOUGH, J. E. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. **Clin. Otolaryngol.**, v. 28, p. 165-172, 2003.

VIIDIK, A.; VUUST, J. **Biology of collagen**. London: Academic Press, 1980. v. 1, p. 313-324.

XI, T.; MA, J.; TIAN, W.; LEI, X.; LONG, S.; XI, B. Prevention of tissue calcification on bioprosthetic heart valve by using epoxy compounds: a study of calcification tests in vitro and in vivo. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 26, p. 1241-51, 1992.