**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

LÍVIA CONTINI MASSIMINO

***Scaffolds* de biopolímeros e resina de Jatobá para utilização em engenharia
tecidual**

São Carlos

2020

LÍVIA CONTINI MASSIMINO

***Scaffolds* de biopolímeros e resina de Jatobá para utilização em engenharia tecidual**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi
Plepis

São Carlos

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

M417s Massimino, Livia Contini
Scaffolds de biopolímeros e resina de Jatobá para utilização em engenharia tecidual / Livia Contini Massimino; orientadora Ana Maria de Guzzi Plepis. São Carlos, 2020.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2020.

1. Colágeno. 2. Quitosana. 3. Cartilagem auricular. 4. Fibroblasto. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Livia Contini Massimino

TÍTULO: " *Scaffolds* de biopolímeros e resina de jatobá para utilização em engenharia tecidual"

Data da defesa: 15/05/2020

Comissão Julgadora	Assinatura	Resultado
Prof(a). Dr(a). Ana Maria de Guzzi Plepis IQSC/USP	<u>Ana Maria Guzzi Plepis</u>	<u>Não votante</u>
Prof(a). Dr(a). Marília Marta Horn Universität Kassel	<u>p/ Ana Maria Guzzi Plepis</u>	<u>aprovada</u>
Prof(a). Dr(a). Hermene da Silva Barud UNIARA	<u>p/ Ana Maria Guzzi Plepis</u>	<u>aprovada</u>
Prof(a). Dr(a). Marcelo Rodrigues da Cunha FMJ	<u>p/ Ana Maria Guzzi Plepis</u>	<u>aprovada</u>
Prof(a). Dr(a). Valcinir Aloísio Scalla Vulcani UFG	<u>p/ Ana Maria Guzzi Plepis</u>	<u>aprovada</u>
Prof(a). Dr(a). Eliana Cristina da Silva Rigo FZEA	<u>p/ Ana Maria Guzzi Plepis</u>	<u>aprovada</u>

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Aparecido e Rosana, que me inspiraram e me incentivaram a buscar pelo conhecimento.

Aos meus irmãos, Ana Carolina, Rafael e Isadora, pelo apoio, incentivo e auxílio durante todo o meu percurso.

Aos meus companheiros e fiéis amigos, Shippou e Amintas, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho e contribuíram de alguma forma para que o caminho percorrido fosse trilhado da melhor forma.

Aos meus amados pais, Aparecido Giraldi Massimino e Rosana Contini Massimino, por todo o apoio e por compreenderem a importância deste projeto e os momentos em que estive ausente para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus queridos irmãos, Ana Carolina di Giovanni Massimino Bertoncello, Rafael Aparecido di Giovanni Massimino e Isadora Contini Massimino, pelo incentivo oferecido durante essa fase.

Ao meu amigo querido Bruno Henrique de Luca pelo carinho, companheirismo e auxílio nas horas difíceis, tornando o caminho mais leve e fácil de trilhar.

Aos meus queridos amigos Carlos Alberto Oliveira de Souza Junior e Daniel Alberto Ivo pelas risadas e conversas agradáveis que deixaram meus dias mais alegres.

À Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, pela oportunidade, orientação e aprendizado, possibilitando que os objetivos desse projeto fossem atingidos.

À Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins, pela amizade e por todo o apoio, indispensável para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani da Universidade Federal de Goiás, por ter gentilmente cedido a cartilagem auricular bovina e a resina de Jatobá.

Ao Prof. Dr. Tito José Bonagamba e os pesquisadores Dr. Éverton Lucas de Oliveira e Dra. Mariane Barsi Andreeta do Instituto de Física de São Carlos/USP pelo auxílio e utilização do equipamento de microtomografia computadorizada.

À Profa. Dra. Monica Beatriz Mathor e à Dra. Maria Fátima Guarizo Klingbeil do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, por toda ajuda e pelos testes de citotoxicidade, adesão e proliferação celular.

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes e auxílio do mestrando William Manuel Pereira Antunes Fortes da Universidade Federal de São Carlos pelo ensaio histológico.

Aos amigos queridos do laboratório de Bioquímica e Biomateriais pela amizade, discussões científicas e companhia.

Ao graduando Lucas do Amaral Rasquini pela ajuda na obtenção da quitosana.

Ao pessoal do serviço do Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia por todo o auxílio durante esse período, em especial a Sra. Marcia Maria Hyppolito Geromini.

Ao pessoal do CAQI/IQSC pelas análises realizadas, em especial ao Dr. Márcio de Paula pelas microscopias eletrônicas de varredura.

Ao grupo do CETER irradiador multipropósito do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares pelas esterilizações dos *scaffolds*.

À CAPES pela bolsa concedida, me apoiando financeiramente durante a elaboração desta pesquisa.

RESUMO

MASSIMINO, L. C. *Scaffolds de biopolímeros e resina de Jatobá para utilização em engenharia tecidual*. 2020. 127 f. Tese – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

O objetivo desse estudo foi obter *scaffolds* a partir de biopolímeros com ou sem adição de resina de Jatobá para aplicação na regeneração tecidual. Para isso, o colágeno foi extraído do tendão e a elastina e o pericôndrio da cartilagem auricular de bovinos, ambos por hidrólise alcalina por 72 h em temperatura ambiente e 24 h a 45 °C, respectivamente. A quitosana foi obtida de gládios de lula por desacetilação da quitina. A resina de Jatobá foi purificada e solubilizada em solução etanólica (160 mg mL⁻¹). Foram preparados *scaffolds* a partir de: gel de colágeno (C), e das misturas de colágeno com cartilagem elástica (CI), pericôndrio (CE) e quitosana em pó (CQp), em duas concentrações (1:1 e 3:1) por congelamento em nitrogênio líquido e posterior liofilização. Foram ainda obtidos *scaffolds* a partir de gel de colágeno com gel de quitosana (CQg), em três proporções (1:3, 1:1 e 3:1) pelo mesmo processo. Todas as composições tiveram a adição de resina de Jatobá (J). Os *scaffolds* foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microtomografia computadorizada (micro-CT), cinética de absorção em PBS e estabilidade biológica *in vitro* (colagenase). Também foram testados métodos de esterilização e feitos testes biológicos *in vitro* de citotoxicidade, adesão, proliferação celular e análise histológica para verificar a biocompatibilidade. As curvas DSC mostraram que J diminui discretamente a temperatura de desnaturação (Td) do colágeno presente nos *scaffolds*. A cartilagem elástica e o gel de quitosana na concentração 1:1 geram aumento na Td. Os espectros FTIR mostraram as bandas características dos materiais utilizados na obtenção dos *scaffolds*, indicando que não ocorreram modificações na estrutura química dos compostos. As fotomicrografias por MEV mostraram *scaffolds* porosos, exceto aqueles obtidos com cartilagem auricular na proporção de 1:1, mesmo com adição de resina. As imagens obtidas por micro-CT mostraram poros interconectados e porosidade acima de 60 %, além de indicar que J diminui o tamanho de poro para C e CI e aumenta para as demais amostras. Nos ensaios de cinética de absorção, valores entre 2344 e 4899 % foram encontrados, sendo que CQg3J mostrou o menor valor e C o maior. No teste de degradação foi observado que J aumenta a porcentagem de degradação enquanto que a presença da quitosana diminuiu essa taxa. Foi possível esterilizar os *scaffolds* por meio de radiação gama (15 kGy), sem ter mudanças significativas na estrutura das amostras. Todas as amostras obtidas com J se mostraram citotóxicas para células NIH 3T3. Os *scaffolds* de colágeno, colágeno/cartilagem e colágeno/quitosana apresentaram uma boa taxa de adesão e proliferação celular, sendo que os obtidos pela mistura de colágeno/quitosana (pó ou gel) se destacaram. A análise histológica mostrou que CQg3 é capaz de permitir a adesão de fibroblastos e sustentar o crescimento dessas células. Assim, foi possível obter *scaffolds* com características adequadas para uso na regeneração dérmica, pois apresentaram morfologia adequada e alta capacidade de absorção, não foram citotóxicos e permitiram a adesão, proliferação e crescimento de fibroblastos.

Palavras-chave: Colágeno. Quitosana. Cartilagem auricular. Fibroblasto.

ABSTRACT

MASSIMINO, L. C. **Biopolymers scaffolds and Jatobá resin for use in tissue engineering**. 2020. 127 f. Tese – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

This study aims at obtaining scaffolds from biopolymers with or without Jatobá resin for application in tissue regeneration. Therefore, we extracted the collagen from bovine tendon, and both elastin and perichondrium from bovine auricular cartilage by alkaline hydrolysis applied in two settings: 72 h at room temperature, and 24 h at 45 °C, respectively. Chitosan was obtained from squid pens by the deacetylation of chitin. The Jatobá resin was purified and solubilized in an ethanolic solution (160 mg mL⁻¹). The scaffolds were prepared from collagen gel (C); and mixing with elastic cartilage - internal part (CI); with perichondrium - external part (CE); and with chitosan powder (CQp) in two concentrations (1:1 and 3:1) by freezing in liquid nitrogen and subsequent lyophilization. We also obtained the scaffolds from collagen gel with chitosan gel (CQg) in three proportions (1:3, 1:1, and 3:1) following the same procedure. All the compositions contain Jatobá resin (J) addition. The scaffolds were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), computerized microtomography (micro-CT), kinetics of absorption in PBS and *in vitro* biological stability (collagenase). Sterilization methods were evaluated, and *in vitro* biological tests for cytotoxicity; cell adhesion, and cell proliferation, as well as histological analysis, were performed to verify the biocompatibility of the samples. The DSC curves showed that the J leads to a small decrease in the denaturation temperature (Td) of the collagen in the scaffolds. The elastic cartilage and the chitosan gel at 1:1 concentration lead to an increase in Td. The FTIR spectra show the characteristic bands of the starting materials, indicating no changes in the chemical structure of the scaffolds. SEM evidenced porous pattern structure, except those scaffolds obtained with auricular cartilage in a 1:1 ratio, even after resin addition. Micro-CT analysis showed interconnected pores and porosity values above 60 % and that the J reduces the pore size for C and CI and increases for the other samples. In the absorption kinetics experiments, values ranging from 2344 % (for CQg3J) and 4899 % (for C) were found, indicating the influence of J in absorption. In the degradation assay test, J increased the percentage of degradation while the presence of chitosan reduced this rate. It was possible to sterilize the scaffolds by gamma radiation (15 kGy), without significant changes in the structure of the samples. In the cytotoxicity test, all scaffolds containing the J were toxic to NIH/3T3 cells. Even the collagen, collagen/auricular cartilage, and collagen/chitosan scaffolds showed a significant rate of cell adhesion and proliferation, the performance of collagen/chitosan (powder or gel) mixtures displayed an enhancement in that characteristic. Histological analysis showed that CQg3 allowed the adhesion of fibroblasts and sustained the growth process of these cells. Thus, it was possible to obtain scaffolds suitable for use in dermal regeneration, with adequate morphology and high absorption capacity because they were not cytotoxic and allowed the adhesion, proliferation, and growth of fibroblasts.

Keywords: Collagen. Chitosan. Auricular cartilage. Fibroblast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Abordagens da engenharia tecidual.	34
Figura 2. Esquema representativo das cadeias do colágeno, hélice tripla e fibras colagênicas.	37
Figura 3. Fotografia digital da cartilagem auricular bovina liofilizada (acima). Imagem da cartilagem e suas camadas externa (pericôndrio) e interna (elastina). Microscópio Digital U500X (abaixo).	39
Figura 4. Imagem da estrutura química da quitina e quitosana.	41
Figura 5. Imagem da resina de Jatobá. Microscópio digital U500X.	42
Figura 6. Imagem digital: (A) tendão calcâneo bovino e (B) gel de colágeno 1%.	63
Figura 7. Imagem digital: (A) cartilagem auricular bovina, (B) parte interna e (C) parte externa.	63
Figura 8. Imagem digital: (A) gládio de lula, (B) quitosana em pó e (C) gel de quitosana 1%.	63
Figura 9. Imagem digital: (A) resina de Jatobá e (B) solução etanólica de resina de Jatobá. ..	63
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H para a quitosana em D ₂ O/DCl.	64
Figura 11. Curva de viscosidade reduzida versus concentração da amostra de quitosana.	65
Figura 12. Fotografia digital dos <i>scaffolds</i> : (A) C, (B) CJ, (C) CE, (D) CEJ, (E) C3E, (F) C3EJ, (G) CI, (H) CIJ, (I) C3I, (J) C3IJ, (K) CQp, (L) CQpJ, (M) C3Qp, (N) C3QpJ, (O) CQg, (P) CQgJ, (Q) C3Qg, (R) C3QgJ, (S) CQg3, (T) CQg3J, (U) Qg e (V) QgJ.	66
Figura 13. Espectro na região do Infravermelho para: (A) C, (B) resina de Jatobá e (C) CJ. .	69
Figura 14. Espectro na região do Infravermelho para: (A) C, (B) CI e (C) CE.	70
Figura 15. Espectro na região do Infravermelho para: (A) Resina de Jatobá, (B) Qg e (C) QgJ.	71
Figura 16. Espectro na região do Infravermelho para: (A) CQp e (B) CQpJ.	71
Figura 17. Tipos de poros presentes em <i>scaffolds</i> : a) poros abertos ou poros da superfície; b) poros fechados ou internos; c) poros interconectados; d) superfície rugosa; e) superfície compacta ou lisa.	72
Figura 18. Fotomicrografias por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> : (A) C e (B) CJ.	73
Figura 19. Fotomicrografias por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de colágeno com parte interna da cartilagem auricular: (A) CI, (B) CIJ, (C) C3I e (D) C3IJ.	73
Figura 20. Fotomicrografias por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de colágeno com parte externa da cartilagem auricular: (A) CE, (B) CEJ, (C) C3E e (D) C3EJ.	74
Figura 21. Fotomicrografias por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de colágeno/quitosana em pó: (A) CQp, (B) CQpJ, (C) C3Qp e (D) C3QpJ.	75
Figura 22. Fotomicrografias por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de gel de quitosana: (A) Qg e (B) QgJ.	76
Figura 23. Fotomicrografias por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de gel de colágeno/gel de quitosana: (A) CQg, (B) CQgJ, (C) C3Qg, (D) C3QgJ, (E) CQg3 e (F) CQg3J.	77

Figura 24. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos <i>scaffolds</i> : (A) C e (B) CJ. Aumento de 200 X.	79
Figura 25. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos <i>scaffolds</i> de colágeno com parte interna da cartilagem auricular: (A) CI, (B) CIJ, (C) C3I e (D) C3IJ. Aumento de 200 X.	79
Figura 26. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos <i>scaffolds</i> de colágeno com parte externa da cartilagem auricular: (A) CE, (B) CEJ, (C) C3E e (D) C3EJ. Aumento de 200 X.	80
Figura 27. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos <i>scaffolds</i> de colágeno/quitosana em pó: (A) CQp, (B) CQpJ, (C) C3Qp e (D) C3QpJ. Aumento de 200 X.	81
Figura 28. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos <i>scaffolds</i> de gel de quitosana: (A) Qg e (B) QgJ. Aumento de 500X.	81
Figura 29. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos <i>scaffolds</i> de gel de colágeno/gel de quitosana: (A) CQg, (B) CQgJ, (C) C3Qg, (D) C3QgJ, (E) CQg3 e (F) CQg3J. Aumento de 200 X.	82
Figura 30. Imagem de micro-CT da amostra C seção 2D adquirida com uma resolução de pixel de 6 µm, com tempo de digitalização de 4 horas.	84
Figura 31. Imagem de micro-CT da amostra C seção 3D adquirida com uma resolução de pixel de 6 µm, com tempo de digitalização de 4 horas.	84
Figura 32. Imagem por micro-CT da amostra C: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 µm, com tempo de digitalização de 4 horas.	85
Figura 33. Imagem de micro-CT da amostra CJ: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 µm, com tempo de digitalização de 4 horas.	85
Figura 34. Imagem de micro-CT da amostra C3I: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 µm, com tempo de digitalização de 4 horas.	85
Figura 35. Imagem de micro-CT da amostra C3IJ: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 µm, com tempo de digitalização de 4 horas.	86
Figura 36. Imagem de micro-CT da amostra C3E: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 µm, com tempo de digitalização de 4 horas.	86
Figura 37. Imagem de micro-CT da amostra C3EJ: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 µm, com tempo de digitalização de 4 horas.	86
Figura 38. Imagem de micro-CT da amostra C3Qp: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 µm, com tempo de digitalização de 4 horas.	87
Figura 39. Imagem de micro-CT da amostra C3QpJ: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 µm, com tempo de digitalização de 4 horas.	87

Figura 40. Imagem de micro-CT da amostra CQg3: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.	87
Figura 41. Imagem de micro-CT da amostra CQg3J: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.	88
Figura 42. Imagem de micro-CT da amostra Qg: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.	88
Figura 43. Imagem de micro-CT da amostra QgJ: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.	88
Figura 44. Curvas de absorção (%) para: (■) C e (□) CJ.....	91
Figura 45. Curvas de absorção (%) para: (●) C3I, (○) C3IJ, (■) C3E e (□) C3EJ.....	92
Figura 46. Curvas de absorção (%) para: (■) C3Qp e (□) C3QpJ.....	92
Figura 47. Curvas de absorção (%) para: (■) CQg3, (□) CQg3J, (●) Qg e (○) QgJ.	93
Figura 48. Fotomicrografias por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de colágeno: (A) óxido de etileno, (B) radiação ultravioleta, (C) radiação gama 15 kGy e (D) radiação gama 25 kGy. ..	96
Figura 49. Fotomicrografias por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de colágeno com resina de Jatobá: (A) óxido de etileno, (B) radiação ultravioleta, (C) radiação gama 15 kGy e (D) radiação gama 25 kGy.	97
Figura 50. Fotomicrografias por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de gel de quitosana: (A) óxido de etileno, (B) radiação ultravioleta, (C) radiação gama 15 kGy e (D) radiação gama 25 kGy.	98
Figura 51. Fotomicrografias por MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de gel de quitosana com resina de Jatobá: (A) óxido de etileno, (B) radiação ultravioleta, (C) radiação gama 15 kGy e (D) radiação gama 25 kGy.....	99
Figura 52. Viabilidade celular na linhagem NIH/3T3 para os <i>scaffolds</i> , em (■) 24 e (///) 48 h.	102
Figura 53. Porcentagem de células NIH/3T3 aderidas nos <i>scaffolds</i> após 24 h.....	104
Figura 54. Proliferação de células NIH/3T3 nos <i>scaffolds</i> no período de 24, 72, 168 e 192 h. (■) C, (●) C3I, (▲) C3E, (▼) C3Qp, (◆) CQg3 e (◀) C EVA.....	105
Figura 55. Imagem de corte histológico de: (A) C3Qp e (B) CQg3, após 24 h sem a presença de células. Tamanho de 50 μm	108
Figura 56. Imagem de corte histológico C3Qp: (A) 24 h 50 μm , (A') 24 h 20 μm , (B) 168 h 50 μm e (B') 168 h 20 μm	109
Figura 57. Imagem de corte histológico CQg3: (A) 24 h 50 μm , (A') 24 h 20 μm , (B) 168 h 50 μm e (B') 168 h 20 μm	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Scaffolds</i> de colágeno, cartilagem auricular e/ou quitosana em pó, com ou sem resina de Jatobá.....	51
Tabela 2. <i>Scaffolds</i> de colágeno e de gel de quitosana com ou sem resina de Jatobá.....	52
Tabela 3. Temperatura de desnaturação (Td, °C) dos <i>scaffolds</i> de colágeno.....	67
Tabela 4. Tamanho de poro (µm) dos <i>scaffolds</i> de colágeno, elastina e/ou quitosana em pó, com ou sem resina de Jatobá.	78
Tabela 5. Porosidade (%) e tamanho de poro (µm) dos <i>scaffolds</i> de colágeno, cartilagem e/ou quitosana, com ou sem resina de Jatobá.	89
Tabela 6. Absorção em PBS (%) dos <i>scaffolds</i> de colágeno, cartilagem auricular, quitosana em pó e/ou e de gel de quitosana com ou sem resina de Jatobá.	93
Tabela 7. Degradação (%) dos <i>scaffolds</i> contendo colágeno após 2 h.	94
Tabela 8. Tamanho de poro (µm) dos <i>scaffolds</i> de colágeno, elastina e/ou quitosana em pó, com ou sem resina de Jatobá.	99
Tabela 9. Temperatura de desnaturação (Td, °C) dos <i>scaffolds</i> de colágeno antes e depois dos procedimentos de esterilização.	100
Tabela 10. Valores de adesão e proliferação celular no tempo de 192 h para as amostras analisadas e controle de células.	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D - formato tridimensional

ATCC - American Type Culture Collection

BMPs - proteínas morfogenéticas ósseas

C - gel de colágeno

C EVA - colágeno da Eva Scientific

C3E - scaffold de gel de colágeno e parte externa da cartilagem auricular bovina (3:1)

C3EJ - scaffold de gel de colágeno e parte externa da cartilagem auricular bovina (3:1) com adição de resina de Jatobá

C3Gg - scaffold de gel de colágeno e gel de quitosana (3:1)

C3I - scaffold de gel de colágeno e parte interna da cartilagem auricular bovina (3:1)

C3IJ - scaffold de gel de colágeno e parte interna da cartilagem auricular bovina (3:1) com adição de resina de Jatobá

C3QgJ - scaffold de gel de colágeno e gel de quitosana (3:1) com adição de resina de Jatobá

C3Qp - scaffold de gel de colágeno e quitosana em pó (3:1)

C3QpJ - scaffold de gel de colágeno e quitosana em pó (3:1) com adição de resina de Jatobá

Ca²⁺ - cálcio

CaCl₂ - cloreto de cálcio

CAQI - Central de Análises Químicas Instrumentais

CE - scaffold de gel de colágeno e parte externa da cartilagem auricular bovina (1:1)

CEBIO - Centro de Biotecnologia

CEJ - scaffold de gel de colágeno e parte externa da cartilagem auricular bovina (1:1) com adição de resina de Jatobá

CI - scaffold de gel de colágeno e parte interna da cartilagem auricular bovina (1:1)

CIJ - scaffold de gel de colágeno e parte interna da cartilagem auricular bovina (1:1) com adição de resina de Jatobá

CJ - scaffold de gel de colágeno e resina de Jatobá

CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear

CQg - scaffold de gel de colágeno e gel de quitosana (1:1)

CQg3 - scaffold de gel de colágeno e gel de quitosana (1:3)

CQg3J - scaffold de gel de colágeno e gel de quitosana (1:3) com adição de resina de Jatobá

CQgJ - scaffold de gel de colágeno e gel de quitosana (1:1) com adição de resina de Jatobá

CQp - scaffold de gel de colágeno e quitosana em pó (1:1)

CQpJ - scaffold de gel de colágeno e quitosana em pó (1:1) com adição de resina de Jatobá

CTR - Centro de Tecnologia das Radiações

D₂O - água deuterada
DCl - cloreto de deutério
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC - calorimetria exploratória diferencial
DTH - tratamento desidrotérmico
E - parte que recobre a cartilagem auricular bovina – pericôndrio
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática
FDA - Food and Drug Administration
FTIR - espectroscopia na região do infravermelho
GA - grau de acetilação
Gly - glicina
GTA - glutaraldeído
HCl - ácido clorídrico
HEMA - metacrilato de 2-hidroxietil
HLC - colágeno tipo humano
I - parte interna da cartilagem auricular bovina – cartilagem elástica
IFSC - Instituto de Física de São Carlos
Ipen - Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares
IQSC - Instituto de Química de São Carlos
ISO - International Organization for Standardization
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
K⁺ - potássio
LEAR - Laboratório de Espectroscopia de Alta Resolução em Ressonância Magnética Nuclear
LZBC - Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa
MEC - matriz extracelular
MEV - microscopia eletrônica de varredura
micro-CT - microtomografia computadorizada
MTS - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)
N₂ - nitrogênio
Na⁺ - sódio
NaCl - cloreto de sódio
NaOH - hidróxido de sódio
NIH/3T3 - linhagem celular de fibroblasto de rato Suíço

NSF - National Science Foundation

PBS - tampão fosfato salino

pH - potencial hidrogeniônico

pKa - constante de acidez

Ppm - parte por milhão

Qg - gel de quitosana

QgJ - scaffold de gel de quitosana com adição de resina de Jatobá

Qp - quitosana em pó

RMN ^1H - espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

ROI - região de interesse

Rpm - rotação por minuto

SAOS-2 - linhagem celular derivada de osteossarcoma primário humano

Td - temperatura de desnaturação

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

USP - Universidade de São Paulo

UV - ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos gerais.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
4.1 Engenharia tecidual	33
4.1.1 <i>Scaffolds</i>	34
4.2 Colágeno	36
4.3 Cartilagem auricular	39
4.4 Quitosana.....	40
4.5 Resina de Jatobá.....	42
4.6 Estudos na área de engenharia tecidual desenvolvidos com colágeno, elastina e/ou quitosana...	43
5. MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.1 Materiais.....	49
5.1.1 Obtenção do gel de colágeno.....	49
5.1.2 Tratamento da cartilagem auricular.....	49
5.1.3 Obtenção da quitosana	49
5.1.4 Resina de Jatobá.....	50
5.2 Preparação dos scaffolds	50
5.3 Caracterização	52
5.3.1 Determinação do GA da quitosana por RMN ¹ H	52
5.3.2 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana.....	53
5.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	53
5.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	53
5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	54
5.3.6 Microtomografia computadorizada (micro-CT).....	54
5.3.7 Cinética de absorção de tampão fosfato salino (PBS).....	55
5.3.8 Estabilidade biológica <i>in vitro</i> via collagenase	55
5.4 Esterilização	56
5.5 Ensaios biológicos.....	56

5.5.1 Linhagem celular	57
5.5.2 Preparo das placas de cultura.....	57
5.5.3 Preparo do extrato das amostras	58
5.5.4 Ensaio de citotoxicidade.....	58
5.5.5 Ensaio de adesão celular.....	58
5.5.6 Ensaio de proliferação celular	59
5.6 Ensaio histológico	60
5.7 Análise estatística	61
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
6.1 Caracterização quitosana	64
6.1.1 Determinação do GA da quitosana por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	64
6.1.2 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana	65
6.2 Obtenção dos scaffolds.....	66
6.3 Caracterização dos scaffolds	67
6.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	67
6.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	68
6.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	71
6.3.4 Microtomografia computadorizada (micro-CT)	83
6.3.5 Ensaio de absorção de tampão fosfato salino (PBS)	90
6.3.6 Estabilidade biológica <i>in vitro</i> via collagenase.....	94
6.4 Esterilização	95
6.4.1 MEV	96
6.4.2 DSC	100
6.5 Ensaio de citotoxicidade.....	101
6.6 Adesão e proliferação celular	104
6.7 Ensaio histológico	108
7. CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS	115

1. INTRODUÇÃO

A engenharia tecidual emergiu no século XX e visa o desenvolvimento de matrizes que restaurem, mantenham ou melhorem a função de um tecido ou órgão lesionado por meio do emprego de conceitos das áreas das ciências biológicas e da engenharia (KAUL; VENTIKOS, 2015). Essas matrizes, denominadas *scaffolds*, têm como função promover uma estrutura temporária no qual células possam aderir, migrar, proliferar e se diferenciar (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019). Para isso, devem apresentar características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, adequada superfície para adesão celular e boa integridade mecânica (DASKALOVA et al., 2014; GROVER; CAMERON; BEST, 2012). Assim, diferentes tipos de biomateriais podem ser empregados, entre eles os poliméricos, como o colágeno, a elastina e a quitosana.

O colágeno é a principal proteína estrutural encontrada na matriz extracelular de tecidos conectivos e pode ser utilizado na sua forma nativa ou reconstituída (DASKALOVA et al., 2014). As suas propriedades mecânicas e biocompatibilidade podem ser alteradas e uma matriz colagênica carregada positiva ou negativamente pode ser gerada através de processos químicos, físico-químicos ou enzimáticos (BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2009; ZHANG; LI; SHI, 2005). Esse polímero normalmente dá ao *scaffold* força e resistência mecânica, sendo capaz de oferecer uma estrutura de suporte e de atuar como guia e ainda estimular a formação de tecidos (GROVER; CAMERON; BEST, 2012). Além disso, é biodegradável, bioabsorvível e biocompatível, não apresenta citotoxicidade e antigenicidade (NAIR et al., 2010).

A cartilagem auricular é formada por cartilagem elástica e recoberta pelo pericôndrio, o qual consiste em uma membrana de colágeno tipo I (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). A elastina é uma proteína estrutural encontrada principalmente em tecidos que necessitam de maior elasticidade, como cartilagem, vasos sanguíneos, pulmão e pele (DASKALOVA et al., 2014; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). O seu uso em *scaffolds* promove elasticidade e armazenamento de energia de tensão elástica, além de apresentar propriedades interessantes como biocompatibilidade, estabilidade e diversos efeitos biológicos (GROVER; CAMERON; BEST, 2012). Também permite o desenvolvimento de *scaffolds* altamente definidos, uma vez que influencia na sinalização, quimiotaxia e proliferação celular (LEE; YEO; WEISS, 2017).

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, a qual está presente nas carapaças de crustáceos, insetos e moluscos (VIGILATO et al., 2015).

Este biopolímero é utilizado em diversas aplicações, tais como liberação de fármacos, fios cirúrgicos e materiais para cicatrização de lesões, devido às suas propriedades hemostáticas e regeneração de tecidos moles e duros (SIONKOWSKA et al., 2006; TIWARI; PATIL; BAHADUR, 2019). Além disso, apresenta características interessantes para o seu uso em *scaffolds*, como ser atóxica, estimular a proliferação celular, reduzir o tempo de cicatrização e possuir atividade antimicrobiana (SANDRI et al., 2019).

Pesquisas empregando compostos bioativos que modificam as características dos materiais estão sendo feitas visando a obtenção de *scaffolds* com porosidade e tamanho de poros específicos para regeneração celular. Um exemplo de composto bioativo é a resina de Jatobá, um exsudato produzido pelas árvores do gênero *Hymenaea* (SILVA; LEITE; SABA, 2012). É composta principalmente por diterpenos labdânicos e sesquiterpenos (RODRIGUES, 2017), os quais tem cargas negativas e, através da interação com as cargas dos materiais, auxiliariam na obtenção de *scaffolds* com morfologia diferenciada. A resina também pode conter flavonoides, lipídios, taninos, procianidinas e óleos essenciais (VALE et al., 2013). Os lábdanos presente na sua composição apresentaram atividades antibacteriana, anti-inflamatória e antitumoral (GIRÓN et al., 2008), já os flavonoides mostraram efeito citotóxico para células tumorais, efeito antigenotóxico na medula óssea e atividade antioxidante (SPERA et al., 2019). O ácido copálico, um ácido resinoso, demonstrou ser atóxico para células normais e ter atividade anti-inflamatória (VARGAS et al., 2015). Assim, o desenvolvimento de *scaffolds* empregando polímeros naturais associados a um composto bioativo é de grande valia, uma vez que a regeneração tecidual está diretamente relacionada com a morfologia (tamanho dos poros e porosidade) do biomaterial (DASKALOVA et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais*

Obter *scaffolds* de colágeno/cartilagem auricular e colágeno/quitosana com ou sem resina de Jatobá, visando aplicação na regeneração tecidual.

2.2 *Objetivos específicos*

- Obter *scaffolds* a partir da mistura de colágeno/cartilagem auricular e colágeno/quitosana em diferentes proporções, com adição ou não de resina de Jatobá através de congelamento em nitrogênio líquido e posterior liofilização;
- Caracterizar os *scaffolds* por FTIR, DSC, MEV, micro-CT, cinética de absorção em tampão fosfato salino (PBS) e estabilidade biológica *in vitro* (colagenase);
- Definir o melhor procedimento de esterilização;
- Fazer testes *in vitro* de citotoxicidade, adesão e proliferação celular com a linhagem de fibroblastos de camundongo NIH/3T3;
- Fazer análise histológica.

3. JUSTIFICATIVA

A engenharia tecidual engloba conceitos dos campos das ciências da vida e da engenharia e visa auxiliar na regeneração do organismo lesionado. Esta área surge como uma solução para as limitações das terapias tradicionais, uma vez que a perda de tecido ou órgãos é abordada através da utilização de *scaffolds* cultivados com células específicas, obtidas a partir do paciente ou doador e depois reimplantadas no paciente.

O *scaffold* é uma estrutura de suporte temporário para crescimento de células e tecidos. As células devem ser ancoradas nessa matriz para posterior proliferação, migração e diferenciação em três dimensões, que, eventualmente, conduz à formação de um tecido específico com funções adequadas, como seria encontrado no corpo humano. Para tanto o *scaffold* deve possuir algumas características básicas como ser biocompatível, biodegradável, atóxico, ter porosidade e poros interconectados, ter uma grande área de superfície para adesão celular, ter boa integridade mecânica e ainda ser esterilizável.

Diferentes tipos de materiais são utilizados para a obtenção de *scaffolds*, entre eles os polímeros. Os materiais poliméricos, quando empregados para o desenvolvimento dessas matrizes são comparativamente menos resistentes e maleáveis em relação aos materiais cerâmicos, como a hidroxiapatita. Entretanto, *scaffolds* poliméricos promovem maior flexibilidade e maleabilidade, além disso, os polímeros naturais usualmente contêm domínios moleculares específicos, que podem estimular as células em diferentes estágios do seu desenvolvimento (SAKATA; IWAKURA; REDDI, 2015). Uma tendência é a utilização de polímeros presentes na matriz extracelular (MEC) para obtenção de *scaffolds* para regeneração tecidual, pois apresentam as características necessárias, sendo biocompatíveis e influenciando na atividade celular. Como exemplos de polímeros presentes na MEC, temos o colágeno e a elastina.

O colágeno aniônico apresenta ótimas características para a obtenção de *scaffolds*, pois é biocompatível, biodegradável e biorreabsorvível (BUCHAIM et al., 2007; MUNHOZ et al., 2018). Além disso, por ser um colágeno aniônico, devido à modificação química por hidrólise alcalina, tem-se a possibilidade de alterar ligeiramente a porosidade e interconectividade de acordo com o tempo de reação (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). Esse controle da morfologia é essencial para o crescimento de células, pois é necessário um tamanho de poro ideal para a adesão, proliferação e diferenciação celular, e a interconectividade entre eles para vascularização e fornecimento adequado de nutrientes.

A elastina é proveniente da cartilagem auricular bovina e promove elasticidade e estabilidade biológica ao *scaffold* (GROVER; CAMERON; BEST, 2012). Essa proteína atua na atividade celular, auxiliando na proliferação e migração de células. Essa influência na atividade celular é essencial em um *scaffold* para a regeneração tecidual. Além da elastina, pode-se extrair da cartilagem auricular o pericôndrio, o qual consiste em tecido conjuntivo denso, cuja MEC contém colágeno tipo I capaz de estimular crescimento celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Biopolímeros que não estão presentes no organismo humano também podem ser utilizados para o desenvolvimento de *scaffolds*. O polissacarídeo quitosana empregado na confecção de alguns *scaffolds* pode ser obtido de gládios de lula da espécie *Loligo sp*, que é um resíduo da indústria pesqueira. A quitosana obtida desta fonte é derivada de β -quitina e possui propriedades como massa molar e viscosidade intrínseca maiores que a derivada de α -quitina (mais comum), que pode ser de interesse para a confecção de *scaffolds*. A quitosana pode gerar estruturas porosas em que células podem ser semeadas permitindo a proliferação, a migração celular e a troca de nutrientes, além de ser benéfica para a angiogênese (RODRIGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015). Além disso, apresenta semelhança estrutural com os glicosaminoglicanos, componente da matriz extracelular, e pode influenciar no processo de degradação, mantendo a estrutura física do *scaffold* por mais tempo.

Como é necessário que os *scaffolds* apresentem morfologia e propriedades estruturais e mecânicas adequadas uma estratégia empregada é o uso de compostos bioativos, como a resina de Jatobá. Esse composto natural apresenta na sua composição principalmente diterpenos labdânicos (RODRIGUES, 2017), dentre os quais, ácidos resinosos (como o copálico, eperuico, catívico, labdânico, entre outros) que podem auxiliar na formação, controle de tamanho e interconectividade dos poros devido à repulsão entre suas cargas negativas e aquelas presentes no colágeno. Isso permitiria a obtenção de diferentes tipos de *scaffolds*, como por exemplo, para a regeneração dérmica ou óssea, dependendo da interação entre a resina e o biopolímero utilizado. Além disso, a resina de Jatobá possui atividades antibacteriana, anti-inflamatória e anti-tumoral (GIRÓN et al., 2008; VALE et al., 2013). Assim, a confecção de *scaffolds* utilizando a mistura dos biopolímeros com adição de resina de Jatobá, que possuam as propriedades descritas seria de grande interesse, uma vez que em literatura não se tem registro de tais combinações.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Engenharia tecidual

O termo "engenharia tecidual" teve origem em 1988, em um *workshop* da *National Science Foundation* (NSF) em Granlibakken na Califórnia, e foi posteriormente reforçado por Langer e Vacanti em 1993 (LANGER; VACANTI, 1993). A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que engloba os princípios da engenharia e das ciências biológicas que visa fornecer alternativas mais eficazes para o tratamento de doenças que necessitam de transplante ou enxerto. Seu objetivo é restaurar, manter ou melhorar a função de um tecido ou órgão lesionado (KAUL; VENTIKOS, 2015). Pode ser aplicada no tratamento de diversos tecidos, como sistema nervoso central (AMADO et al., 2008; SADEGHI; MOZTARZADEH; MOHANDESI, 2019), para doença de Parkinson (HARRIS et al., 2020), na regeneração dérmica (IACOB et al., 2018; MITHIEUX; WEISS, 2017), dentária (BELLUCCI et al., 2019), na regeneração óssea e de cartilagem (KAZIMIERCZAK et al., 2019; STUCKENSEN et al., 2019; TOLOUE et al., 2019), pancreática (XU et al., 2019), do fígado (HOSSEINI et al., 2019), vasos sanguíneos e válvula cardíaca (COPEES et al., 2019), entre outros.

A engenharia tecidual foi subdividida em três abordagens principais (Figura 1) (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019; STACE et al., 2015):

- (a) implante isolado de células;
- (b) introdução de fator de crescimento celular para estimular o crescimento de células;
- (c) o implante de *scaffolds* que mimetizam a MEC.

A combinação do uso de *scaffolds* com a semeadura de células para criar uma estrutura capaz de funcionar como um suporte 3D e que promova a formação de uma nova MEC semelhante ao tecido nativo lesionado é a abordagem mais utilizada na engenharia tecidual (STACE et al., 2015). Nesta técnica as células são coletadas e semeadas em um *scaffold* poroso biodegradável, com o tamanho e a forma desejados e condicionados em um biorreator *in vitro* por várias semanas, onde esse *scaffold* é exposto a sinais bioquímicos e estimulação mecânica que servem para guiar a formação adequada do tipo de tecido a ser substituído (EBRAHIMI; ASIRI; MOHAMMAD, 2018).

Figura 1. Abordagens da engenharia tecidual.

Fonte: Adaptado de Abdulghani e Mitchell (2019).

As principais vantagens dessa abordagem são a possibilidade de utilizar uma grande variedade de biomateriais e a capacidade de produzir um *scaffold* poroso com propriedades adequadas (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019; KHADEMHOSEINI; LANGER, 2016). Também diminuiria o tempo de espera do paciente quando comparado ao tempo de espera para um transplante e diminuiria a chance de rejeição, uma vez que as células do próprio paciente podem ser utilizadas (URCIUOLO et al., 2019). No entanto, existem algumas limitações, como posicionar com precisão os diferentes tipos de células necessários para atingir a morfologia específica do tecido, como por exemplo queratinócitos na superfície e fibroblastos na base para gerar um *scaffold* para derme, e a dificuldade de vascularização do novo tecido a ser formado (CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014).

4.1.1 Scaffolds

O *scaffold* é definido como um biomaterial poroso 3D, projetado para as seguintes funções: (1) promover a interação biomaterial-célula, adesão celular e depósito de MEC; (2) permitir o transporte adequado de gases, nutrientes e fatores reguladores, permitindo a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células; (3) sofrer degradação em uma taxa controlada próxima a taxa de regeneração do tecido de interesse; e (4) não gerar inflamação ou gerar inflamação mínima (KHADEMHOSEINI; LANGER, 2016; PATEL; FISHER, 2008,

RATNER et al., 2004). Para desempenhar na engenharia tecidual as funções citadas os *scaffolds* devem atender a certos requisitos e/ou apresentar características, sendo eles:

Biocompatibilidade: o *scaffold* deve ser aceito pelo organismo e a sua presença não deve levar a mecanismos de rejeição (WITZLER et al., 2019);

Degradabilidade: o *scaffold* deve ter a capacidade de se tornar estruturalmente integrado com o tecido nativo, promovendo suporte durante o processo de regeneração e após exercer sua função deve sofrer degradação. A taxa de degradação do *scaffold* é vital para a regeneração bem-sucedida do tecido *in situ*. Essa taxa deve ser controlável e acompanhar a do crescimento do tecido (GROVER; CAMERON; BEST, 2012);

Atóxico: os produtos de degradação do *scaffold* não podem causar efeitos adversos locais ou sistêmicos no organismo (DASKALOVA, et al., 2014);

Ser quimicamente estável: durante o tempo programado para regenerar o tecido o *scaffold* não pode ter modificações químicas (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019);

Superfície quimicamente adequada: o *scaffold* deve ter uma superfície quimicamente adequada para promover a adesão, proliferação e diferenciação celular. A presença de moléculas ou regiões específicas atuam diretamente no processo de adesão e propagação celular, podendo facilitar e até mesmo melhorar sua bioatividade (WITZLER et al., 2019);

Propriedades mecânicas adequadas: o *scaffold* deve ter propriedades mecânicas equivalentes ao tecido nativo, a fim de oferecer suporte eficaz durante o processo de regeneração. A resistência, as características superficiais, o tempo de fadiga e o peso devem estar de acordo com as necessidades do tecido a ser substituído (HADISI; NOURMOHAMMADI; MOHAMMADI, 2015);

Design adequado: os *scaffolds* devem ter uma arquitetura apropriada para facilitar o fluxo de nutrientes e a formação de vasos sanguíneos capilares, regulando o crescimento e a infiltração das células, bem como o recrutamento celular para o local da lesão. Os *scaffolds* devem possuir tamanho ideal de poros, forma dos poros, porosidade, interconectividade e orientação da fibra de acordo com a sua aplicação, pois a microestrutura influencia diretamente na semeadura celular, no comportamento e na resposta celular (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019). O tamanho de poro indica qual tipo de célula pode ser semeada, promovendo espaço adequado para a adesão, crescimento e proliferação de células, sendo que poros com tamanho de 5 µm servem para neovascularização e aqueles de 100-350 µm para a regeneração óssea (DASKALOVA, et al., 2014). Poros interconectados aumentam a taxa de difusão no *scaffold*,

melhoram a oxigenação, o fornecimento de nutrientes e a eliminação das impurezas, além de facilitarem a vascularização (RATNER et al., 2004).

No desenvolvimento de *scaffolds* dois grupos de materiais são normalmente empregados: os polímeros naturais e os polímeros sintéticos, bem como suas combinações. Os polímeros sintéticos utilizados são degradáveis e são processados através de diferentes abordagens de montagem para obtenção dos *scaffolds*. As vantagens do uso de materiais sintéticos é a capacidade de produzir *scaffolds* com precisão e propriedades bem definidas. Seu processamento é mais fácil de controlar, sendo possível programar sua taxa de degradação, as propriedades mecânicas e a microestrutura (STOPPEL et al., 2015). Há menos preocupações de biossegurança, em particular com relação à resposta do tecido do paciente e à transferência de doenças em comparação com polímeros naturais (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019).

No entanto, os polímeros sintéticos têm desvantagens devido à falta de grupos funcionais, o que diminui sua afinidade celular (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019; STOPPEL et al., 2015). A degradação desses polímeros estimula o organismo a gerar uma resposta imunológica indesejada podendo levar a inflamação ou outras complicações (STOPPEL et al., 2015). Existe também um número limitado de polímeros sintéticos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para aplicações clínicas, como o poliácido láctico, a policaprolactona, poli(ácido glicólico), poli(metacrilato de 2-hidroxietil) e o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019).

Polímeros naturais, derivados de polissacarídeos e proteínas, possuem excelentes propriedades como biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de outras características que mimetizam a MEC, tornando-os uma ótima opção para aplicações na engenharia tecidual (LEE; YEO; WEISS, 2017; NAIR et al., 2010). Após processo de purificação os polímeros naturais não levam o organismo a ter respostas imunes indesejadas no local de implantação e seus produtos de degradação não causam respostas imunológicas crônicas (LEE; YEO; WEISS, 2017). No entanto, a fonte de obtenção é uma desvantagem, pois por serem derivados de seres vivos pode ocorrer variação nas propriedades mecânicas, na sua estrutura e na performance do *scaffold* devido às mudanças que cada ser está exposto (por exemplo local, alimentação, idade, etc) (PATEL; FISHER, 2008; RATNER et al., 2004; STOPPEL et al., 2015).

4.2 Colágeno

O colágeno é responsável por cerca de 30 % da proteína humana e 75 % do peso seco da pele. Esse polímero natural é a principal proteína presente no tecido conjuntivo e está presente na pele, tendões, vasos sanguíneos, intestino grosso e delgado, córnea, ligamentos,

ossos, cartilagens e dentes. Sua principal função é contribuir com a integridade estrutural e biológica da MEC, ajudando a fixar as células na matriz e remodelando o comportamento celular e a função do tecido (KARSDAL, 2016).

Existem 29 tipos de colágeno conhecidos atualmente, entre eles os mais comuns são os do tipo I, II, III e IV (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014). O colágeno tipo I é o mais abundante e é a principal proteína presente nos ossos, na pele, em tendões e ligamentos, na córnea e em vasos sanguíneos. Tem como unidade básica o tropocolágeno, o qual é formado por duas cadeias idênticas ($\alpha 1$), com cerca de 1055 resíduos de aminoácidos e uma cadeia diferente ($\alpha 2$), com cerca de 1029 resíduos, originando uma molécula linear, semiflexível e com 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro (KARSDAL, 2016; SIONKOWSKA et al., 2006).

A cadeia polipeptídica α normalmente repete o aminoácido glicina (Gly) a cada três aminoácidos gerando a sequência Gly-X-Y, onde X geralmente é uma prolina e Y é uma hidroxiprolina (KARSDAL, 2016). Estas cadeias formam uma hélice tripla estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (KARSDAL, 2016; SIONKOWSKA et al., 2006). O enrolamento da hélice tripla fornece uma grande resistência às forças de tensão, sem nenhuma capacidade para o estriamento. Assim, o colágeno apresenta uma resistência mecânica que é aumentada pelo enrolamento helicoidal de múltiplos segmentos (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014).

A Figura 2 mostra um esquema representativo das cadeias α do colágeno gerando as fibras colagênicas.

Figura 2. Esquema representativo das cadeias do colágeno, hélice tripla e fibras colagênicas.

Fonte: Autoria própria.

O colágeno pode ser utilizado na sua forma nativa ou reconstituída, alterando suas propriedades mecânicas e biocompatibilidade, ou ainda ser passível de modificação por meio de processos químicos (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001), físico-químicos (KANNICHT, 2019; ZHANG; LI; SHI, 2005) ou enzimáticos, gerando uma matriz colagênica carregada positiva ou negativamente, dependendo da aplicação que se deseja. O aumento na quantidade de carga negativa pode gerar pequenas alterações na sua estrutura devido à interação entre as moléculas carregadas, sendo que uma maior quantidade de cargas negativas presentes aumenta a possibilidade de variação de tamanho dos poros devido à repulsão eletrostática causada entre elas (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001).

Um processo para obtenção de colágeno do tipo I aniônico se dá por meio da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos Asparagina e Glutamina presentes na cadeia α do tropocolágeno (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). A reação de hidrólise seletiva promove, de acordo com o tempo de reação, um aumento total de até 134 cargas por unidade de tropocolágeno, alterando o padrão da organização da estrutura microfibrilar da matriz colagênica que estão relacionadas com o rompimento das ligações cruzadas do tecido e também com o novo padrão de interações eletrostáticas (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). De acordo com Goissis et al. (2000), o colágeno aniônico tem sua biocompatibilidade aumentada e a resposta inflamatória reduzida.

O colágeno tipo II pertence aos colágenos formadores de fibrila e é composto por três cadeias $\alpha 1$ idênticas (KARSDAL, 2016). Esse tipo de colágeno é o principal componente da cartilagem e dos discos intervertebrais (KANNU; BATEMAN; SAVARIRAYAN, 2012). Assim como o colágeno tipo I, o colágeno tipo II consiste em uma hélice tripla de cerca de 300 nm, correspondente a cerca de 1000 aminoácidos apresenta a sequência Gly-X-Y (KARSDAL, 2016).

O uso do colágeno como um biomaterial começou em 1881, com o relato de Joseph Lister e William Macewen sobre as vantagens de um biomaterial rico em colágeno preparado a partir do intestino delgado de ovelha e utilizado como sutura biodegradável denominada de "*catgut*" (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014). Atualmente é um biomaterial aprovado pela FDA devido ao mínimo de respostas inflamatórias e imunológicas. Seu uso como biomaterial ocorre por não apresentar citotoxicidade e antigenicidade, ser biodegradável, biorreabsorível e biocompatível (NAIR et al., 2010), além de estar disponível em grande quantidade na natureza.

Quando se emprega o colágeno em *scaffolds* dá-se ao tecido força mecânica e rigidez, sendo capaz de oferecer uma estrutura de suporte e de atuar como guia e estimular a

formação dos tecidos (GROVER; CAMERON; BEST, 2012). Diversos estudos na área de engenharia tecidual estão sendo feitos, como por exemplo para regeneração dérmica (DEL BAKHSHAYESH et al., 2018; NATARAJAN et al., 2019), óssea (STUCKENSEN et al., 2019), vascular (COPESE et al., 2019), dental (BELLUCCI et al., 2019) e muscular (LECARPENTIER et al., 2019).

4.3 Cartilagem auricular

O tecido cartilaginoso pode ser classificado com base na composição da MEC e morfologia histológica em: cartilagem hialina, cartilagem elástica e fibrocartilagem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). A cartilagem auricular é formada por cartilagem elástica, a qual consiste em grandes lacunas de condrócitos cercados por fibras elásticas, formando redes tridimensionais, recoberta por um tecido chamado pericôndrio (NAM et al. 2014). O pericôndrio reveste a cartilagem elástica e é formado por colágeno do tipo I e células (fibroblastos), sendo responsável pela nutrição, oxigenação e eliminação dos refugos metabólicos da cartilagem (CHIU et al., 2017; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). A cartilagem elástica é composta por fibras elásticas e colágeno do tipo II, os quais promovem grande elasticidade e a capacidade de suportar flexões repetidas (CHIU et al., 2017; NAM et al. 2014). As fibras do interior da cartilagem consistem em monômeros de elastina altamente reticulados complexados com microfibrilas de 10-12 nm de diâmetro (NIMESKERN et al., 2016).

A Figura 3 mostra a cartilagem auricular bovina, o pericôndrio e a cartilagem elástica.

Figura 3. Fotografia digital da cartilagem auricular bovina liofilizada (acima). Imagem do revestimento externo (pericôndrio) e da cartilagem elástica. Microscópio Digital U500X (abaixo).

Fonte: Autoria própria.

A elastina é composta basicamente por dois componentes distintos, sendo eles a elastina amorfa e microfibrilar. Uma rica em alanina e lisina é responsável pelas ligações cruzadas; já a outra, rica em glicina, prolina e valina, é responsável pela extensibilidade (GACKO, 2000). Assim, temos um entrelaçamento reticular tridimensional que permite que essas fibras cedam bastante à tração, mas retornem à forma original quando cessada a força (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; USHIKI, 2002). Em sua composição existe cerca de 75 % de aminoácidos hidrofóbicos que levam a uma alta insolubilidade devido as ligações intercadeias (DAAMEN, 2006). Pode ser usada na forma insolúvel ou ser hidrolisada para se obter a forma solúvel, já que o tratamento alcalino da cartilagem auricular resulta em um material relativamente rico em grupos polares (DAAMEN, 2006).

O emprego da elastina em *scaffolds* promove elasticidade e armazenamento de energia de tensão elástica. Esse polímero exibe propriedades interessantes para ser utilizado como biomaterial, entre elas biocompatibilidade, estabilidade e apresenta diversos efeitos biológicos (GROVER; CAMERON; BEST, 2012). Além disso, a presença dessa proteína pode influenciar na regeneração tecidual, permitindo o desenvolvimento de *scaffolds* capazes de influenciar na sinalização, quimiotaxia e proliferação celular, uma vez que é capaz de interagir com receptores biológicos (DAAMEN, 2006; LEE; YEO; WEISS, 2017). Diante disso, diversos estudos visando sua aplicação em regeneração tecidual vêm sendo feitos, entre eles para regeneração de cartilagem (ANNABI et al., 2011; ZHU et al., 2017), óssea (TEJEDA-MONTES et al., 2014), pele (BOEKEMA et al., 2014; MITHIEUX; WEISS, 2017) e de válvula cardíaca (WANG; ALI; LACERDA, 2018).

4.4 Quitosana

Na engenharia tecidual, além de proteínas, polissacarídeos podem ser utilizados no desenvolvimento de *scaffolds*, como a quitosana. Esses biopolímeros apresentam semelhança com os glicosaminoglicanos, glicoproteínas e glicolípídios presentes na MEC e permitem obter matrizes com presença de carga na superfície, características que facilitam uma maior interação das células com o *scaffold* (TIWARI; PATIL; BAHADUR, 2019).

A quitosana é um biopolímero catiônico obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, material existente principalmente nas carapaças de crustáceos e que representa o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (RINAUDO, 2006; VIGILATO et al., 2015). A quitina pode ocorrer em três formas cristalinas, sendo que as principais são a α e β -quitina. Na estrutura cristalográfica da α -quitina (carapaças de crustáceo) os segmentos de cadeia são antiparalelos, enquanto os da β -quitina (gládios de lula) são paralelos (Figura 4).

Como não existe ligação de hidrogênio entre dois segmentos sucessivos de cadeia, a β -quitina apresenta uma maior reatividade e solubilidade que a α (LAMARQUE et al., 2005, TIWARI; PATIL; BAHADUR, 2019).

A quitosana é solúvel em ácidos orgânicos diluídos, o que facilita o uso em reações químicas (RODRIGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015). Esse polissacarídeo é caracterizado principalmente por seu grau médio de acetilação (GA) e por sua massa molar que influem em propriedades como solubilidade, pKa e viscosidade (KUBOTA et al., 2000; RODRIGUES, 2017). O grau de acetilação é determinado pela quantidade de grupos amino livres na cadeia polimérica, o que confere uma carga positiva à quitosana. As suas propriedades são afetadas diretamente pelas condições em que o material é processado, uma vez que as condições do processo de obtenção são as que controlam a quantidade resultante de desacetilação (RODRIGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015).

Figura 4. Imagem da estrutura química da quitina e quitosana.

Fonte: Autoria própria.

A quitosana apresenta, além de estrutura similar aos proteoglicanos presentes na MEC, propriedades como hidrofobicidade, comportamento de polieletrólito, mucoadesividade, ação hemostática (TIWARI; PATIL; BAHADUR, 2019). Seus grupos polares e suas propriedades físico-químicas proporcionam um ambiente não-proteico para adesão e proliferação celular (SADEGHI; MOZTARZADEH; MOHANDESI, 2019). Forma facilmente uma mistura com outros polímeros através de interações eletrostáticas e confere propriedades antimicrobianas à composição (JAYAKUMAR; PRABAHARAN; KUMAR, 2011; MARANGON et al., 2017; SANDRI et al., 2019).

Pode ser facilmente processada em uma variedade de formas - fibras, filmes ou membranas, esponjas, hidrogéis e esferas (RODRIGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015) - e é usada como biomaterial em diferentes aplicações, tais como liberação de fármacos (BARBOSA et al., 2019), *scaffolds* (TIWARI; PATIL; BAHADUR, 2019), fios cirúrgicos e materiais para cicatrização de feridas (SIONKOWSKA et al., 2006). Sua mistura com outros biomateriais pode gerar *scaffolds* capazes de direcionar o comportamento celular desejado imitando as propriedades morfológicas e mecânicas dos tecidos receptores.

No desenvolvimento de *scaffolds* as propriedades mecânicas e biológicas como o tamanho dos poros, a absorção de água, a sensibilidade à degradação da lisozima, a resistência mecânica e as atividades celulares são parâmetros importantes que contribuem para o seu emprego (NWE, FURUIKE, TAMURA, 2009; RODRIGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015). Estudos utilizando esse biopolímero estão sendo feitos para diferentes tecidos, como nervos (AMADO et al., 2008; SADEGHI; MOZTARZADEH; MOHANDESI, 2019), cartilagem (TOLOUE et al., 2019), derme (IACOB et al., 2018; NATARAJAN et al., 2019) e ósseo (KAZIMIERCZAK et al., 2019).

4.5 Resina de Jatobá

A resina de Jatobá, também conhecida popularmente como jutaicaica é o exsudato produzido pelas árvores do gênero *Hymenaea*, gênero com cerca de quinze espécies localizadas entre as Américas do Norte e do Sul, México e África (LANGENHEIM et al., 1978; SILVA; LEITE; SABA, 2012). Na medicina popular é comum o uso de cascas, flores e resina de Jatobá, sendo a resina indicada para o tratamento de bronquites, para cicatrização de feridas e empregada na forma de emplasto (CHAVES; BARROS, 2012; VALE et al., 2013). Apesar da composição desta resina variar de acordo com a espécie e local de plantio, de forma geral ela é composta por diterpenos e sesquiterpenos. A resina das espécies *H. martiana* e *H. courbaril*, por exemplo, possuem ainda flavonoides, lipídios, taninos, procianidinas e óleos essenciais (ROCHA et al., 2018; SILVA; LEITE; SABA, 2012). A espécie *H. courbaril* apresenta na composição de sua resina principalmente diterpenos labdânicos, dentre os quais, os ácidos resinosos copálico, eperuico, catívico, labdânico e o ácido labd-13-en-8-ol-15-oico (CUNNINGHAM; MARTIN; LANGENHEIM, 1974; RODRIGUES, 2017).

A Figura 5 mostra a resina de Jatobá obtida nesse estudo após procedimento de purificação.

Figura 5. Imagem da resina de Jatobá. Microscópio digital U500X.

Fonte: Autoria própria.

Estudos com a espécie *H. courbaril* indicaram atoxicidade para células saudáveis e efeito antígeno-tóxico, que pode ser atribuído a uma atividade antioxidante de alguns de seus componentes (VALE et al., 2013). Seu óleo essencial que contém óxido de cariofileno e trans-cariofileno mostrou ação antifúngica para espécies de *Candida* (COSTA et al., 2017). Compostos como os lábdanos presente na resina apresentam atividades antibacteriana, anti-inflamatória e antitumoral (GIRÓN et al., 2008), enquanto que os flavonoides mostraram efeito citotóxico para células tumorais, efeito antígeno-tóxico na medula óssea e atividade antioxidante (SPERA et al., 2019). O ácido copálico (ácido cis/trans labd-8(20),13-dien-15-oico), por exemplo, demonstrou ser atóxico para células normais além de apresentar atividade anti-inflamatória (VARGAS et al., 2015).

4.6 Estudos na área de engenharia tecidual desenvolvidos com colágeno, elastina e/ou quitosana

Na literatura é possível encontrar estudos empregando o colágeno e a elastina no desenvolvimento de *scaffolds* para a área de regeneração tecidual, conforme já citado. Del Bakhshayesh et al. (2018) mostraram que *scaffolds* contendo colágeno, policaprolactona e poli(L)ácido láctico com poros interconectados e com tamanho próximo a 400 nm têm um potencial significativamente maior para a adesão e o crescimento de células-tronco mesenquimais do que *scaffolds* de policaprolactona/poli(L)ácido láctico. Stuckensen et al. (2019) projetaram um *scaffold* de colágeno crioestruturado funcionalizado com hidroxiapatita, que mimetiza a estrutura do osso cortical (anisotrópico) ou trabecular (isotrópico) para liberação de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). O *scaffold* de colágeno crioestruturado anisotrópico melhora a regeneração óssea, aumentando a eficiência da cicatrização óssea mediada por BMP.

Bellucci et al. (2019) desenvolveram uma massa com grânulos de um biovidro contendo estrôncio e magnésio misturados com colágeno e polietilenoglicol adequada para aplicações dentárias. O material mostrou excelente biocompatibilidade e parece estimular o crescimento de fibroblastos.

Lecarpentier et al. (2019) mostraram que quando as células-tronco mesenquimais foram semeadas em *scaffolds* de colágeno funcionalizados com Arg-Gly-Asp a contratilidade aumentou e a cinética de pontes cruzadas da miosina foi modificada. O *scaffold* gerado apresentou características mecânicas muito próximas às de um tecido contrátil não-muscular, como a placenta humana.

Annabi et al. (2011) desenvolveu *scaffold* de elastina/policaprolactona com tamanho de poros de 540 nm e altamente interconectados, o qual permitiu adesão e proliferação de condrócitos, sendo promissor o seu uso em reparação de cartilagem. Zhu et al. (2017) estudaram um suporte na forma de hidrogel de ácido hialurônico/proteína semelhante a elastina para engenharia de tecidos cartilagosos que permite variar a concentração de ácido hialurônico sem alterar a rigidez da matriz.

Tejeda-Montes et al. (2014) sintetizou membranas de elastina recombinante para promover a adesão de células-tronco mesenquimais e mineralização. Testes *in vivo* demonstraram que o uso dessas membranas leva a um maior volume ósseo dentro do defeito e não teve aumento da inflamação, indicando a possibilidade do uso dessas membranas bioativas de elastina recombinante para regeneração óssea.

Mithieux e Weiss (2017) descreveram um procedimento e um biomaterial híbrido composto por um modelo de regeneração dérmica da Integra® e tropoelastina para estimular a produção de elastina diretamente em feridas e ter uma melhor cicatrização.

Fernández-Colino et al. (2019) fabricaram *scaffolds* vasculares de pequeno calibre a partir de elastina recombinante, com uma estrutura porosa, que manteve o desempenho mecânico para suportar a carga hemodinâmica arterial e promoveu a proliferação celular e o depósito de MEC. Esses *scaffolds* combinaram a reprodutibilidade com bioatividade, hemocompatibilidade e comportamento de remodelação de autoenxertos, representando uma opção promissora para tratamento da artéria coronária.

Também é registrado na literatura o desenvolvimento de *scaffolds* através da combinação desses biopolímeros. Dunphy et al. (2014) adicionaram elastina solúvel em hidrogel de colágeno visando a melhora das suas propriedades mecânicas. O módulo de Young aumentou com o aumento da concentração de elastina e ocasionou uma proliferação maior dos fibroblastos de pulmão, mimetizando as características dos alvéolos pulmonares.

Mizutani et al. (2014) prepararam *scaffolds* a partir de colágeno e elastina altamente orientados semelhantes a estrutura do ligamento e examinaram as respostas celulares. A elastina promoveu uma diferenciação osteogênica sendo adequada para a seção de articulação do ligamento ósseo e o colágeno manteve o fenótipo dos ligamentos adequado para a porção central.

Boekema et al. (2014) mostraram que *scaffolds* de colágeno/elastina com tamanho de poro de 80 ou 100 µm resultam em boa cicatrização da ferida após enxerto e apenas uma reação de corpo estranho muito leve foi observada. Nesse estudo Boekema et al. (2014) foi encontrado que a reticulação de *scaffolds* de colágeno/elastina afetou negativamente a

cicatrização de feridas em vários parâmetros importantes e o *scaffolds* de colágeno/elastina não reticulado é um candidato promissor para avaliação clínica futura.

Wang, Ali e Lacerda (2018) projetaram um *scaffold* 3D de colágeno/elastina para mimetizar a MEC das válvulas cardíacas, fornecendo a força das camadas de colágeno e a elasticidade. Os *scaffolds* 3D de colágeno/elastina forneceram uma nova ferramenta para estudar as interações célula-célula ou célula-matriz *in vitro*, promovendo avanços no conhecimento atual da transição de células mesenquimais endoteliais valvares.

Também é possível encontrar estudos empregando a quitosana no desenvolvimento de *scaffolds*, bem como sua combinação com colágeno. Amado et al. (2008) desenvolveram membranas de quitosana para regeneração de nervos periféricos. Todas as membranas de quitosana demonstraram boa biocompatibilidade e promoveram um substrato para crescimento de células nervosas. Já nos testes *in vivo* as membranas de quitosana liofilizadas apresentaram melhores resultados quanto regeneração e recuperação da função.

Sadeghi, Moztaazadeh e Mohandesi (2019) mostraram que a adição de quitosana em *scaffolds* de policaprolactona/polipirrol permitiu a adesão celular e leva a um aumento na proliferação celular, podendo servir como um promissor substituto para regeneração de nervos.

Toloue et al. (2019) avaliaram os efeitos de nanofios de alumina como reforço em *scaffolds* de polihidroxibutirato/quitosana para aplicação na regeneração de cartilagem. O diâmetro médio da fibra dos *scaffolds* foi de 300 a 550 nm com porosidade superior a 81 %, a viabilidade e proliferação de condrócitos nos *scaffolds* foram melhores após a adição de quitosana e alumina.

Iacob et al. (2018) prepararam membranas à base de quitosana e ácido hialurônico contendo novos derivados de arginina pelo método de reticulação iônica. Os *scaffolds* mostraram morfologia adequada para tratamento de queimaduras, boa taxa de absorção e biocompatibilidade e também apresentaram bons efeitos de cicatrização no modelo de queimadura induzido em ratos. Para essas membranas, foi observada uma reepitelização completa após 15 dias, o que suporta um processo de cicatrização mais rápido.

Kazimierczak et al. (2019) avaliaram a biocompatibilidade de *scaffolds* de quitosana/agarose/nano-hidroxiapatita altamente porosos produzidos por um novo método que combina liofilização com agente espumante. Os *scaffolds* apresentaram alta biocompatibilidade e osteocondutividade, também mostraram ter habilidade de osteoindução, o que permitiria aplicar esse biomaterial na medicina regenerativa para acelerar o processo de cicatrização óssea.

Zhu et al. (2009) obtiveram *scaffolds* tubulares de colágeno produzido por *E. coli* recombinante e quitosana por processo de reticulação e liofilização. Os *scaffolds* apresentaram

boas taxas de permeabilidade, porosidade e flexibilidade desejáveis, além de serem biocompatíveis e ocasionar maior adesão, proliferação e produção de MEC.

You et al. (2017) desenvolveram um *scaffold* metálico híbrido de nanopartículas de prata/colágeno/quitosana e avaliaram sua ação em cicatrização de feridas. O *scaffold* foi bactericida, anti-inflamatório e promoveu a cicatrização de feridas regulando potencialmente a migração de fibroblastos e a ativação de macrófagos, tornando-o um potencial substituto dérmico para regeneração de feridas.

Natarajan et al. (2019) indicaram que a combinação sinérgica entre cloridrato de pioglitazona como agente anti-inflamatório, colágeno como estabilizador da matriz estrutural e quitosana como carreador do medicamento é uma abordagem potencial no tratamento de feridas diabéticas. Os *scaffolds* possuem porosidade ideal, baixa taxa de degradação da matriz, liberação controlada do fármaco, biocompatibilidade e permite o crescimento celular. Além disso, mostraram resultados promissores na diminuição do tamanho de feridas diabéticas.

Yan et al. (2019) prepararam *scaffolds* porosos de colágeno/quitosana por um método de liofilização impregnado com células-tronco mesenquimais da medula óssea de rato. O efeito terapêutico dos *scaffolds* de colágeno/quitosana com células-tronco mesenquimais da medula óssea foi superior à injeção estereotáxica das células-tronco mesenquimais sem o *scaffold*. Também apresentou biocompatibilidade e não mostrou imunogenicidade, indicando que o transplante de células-tronco mesenquimais da medula óssea em um *scaffold* de colágeno/quitosana pode promover a recuperação de lesão neuropatológica em ratos com lesão cerebral traumática.

Já existe no mercado produtos que atuam como substitutos de derme, como por exemplo, o Biobrane®, que é um *scaffold* dérmico acelular de colágeno bovino tipo I/silicone/nylon ligado a um tecido de nylon flexível. A membrana semipermeável controla a perda de vapor de água, possibilita a drenagem de exsudatos e permite a permeabilidade de antibióticos tópicos, sendo comparável à epiderme humana (COSTA-ALMEIDA; SOARES; GRANJA, 2017).

O modelo de regeneração dérmica Integra® é utilizado clinicamente no tratamento pós-excecional de queimaduras graves quando o autoenxerto não é viável. Consiste em um *scaffold* de duas camadas de fibras de colágeno bovino reticulado e condroitina-6-sulfato com uma membrana de silicone como epitélio transitório (LAGUS et al., 2013).

MatriDerm® é um *scaffold* de colágeno/elastina com poros de tamanho de 100 µm empregado para regeneração cutânea em caso de queimaduras graves. Contudo, esse produto tem um alto custo o que dificulta sua ampla utilização na clínica (KECK et al., 2009).

O Matriderm® torna-se vascularizado mais rápido que o Integra®, devido à presença de elastina no modelo Matriderm®, que é capaz de atrair mais células vasculares do que a condroitina-6-sulfato presente no Integra® (URCIUOLO et al., 2019).

Entretanto são poucos os trabalhos sobre a resina de Jatobá sendo utilizada na confecção de *scaffolds* juntamente com esses biopolímeros. Nascimento (2016) desenvolveu uma membrana de colágeno e gelatina com resina de jatobá em diferentes concentrações. Foi observado que com o aumento da concentração de resina a superfície da membrana muda de homogênea para rugosa e diminui a sua capacidade de absorção.

Rodrigues (2017) obteve filmes de quitosana com diferentes graus de acetilação (GA) e gelatina com adição ou não de resina de Jatobá, visando aplicações em cicatrização de feridas cutâneas. A inclusão da resina levou a diminuição da viscosidade dinâmica para as soluções com maiores valores de GA, reduziu a estabilidade térmica dos filmes e o intumescimento dos filmes e aumentou a permeação dos filmes ao vapor de água. Os filmes de quitosana/gelatina e resina de Jatobá mostraram ser bons candidatos para testes para aplicações cutâneas, pois apresentaram atividade bactericida, baixa solubilidade, capacidade de intumescer e de realizar troca gasosa.

Rasquini et al. (2017) desenvolveram um *scaffold* de quitosana, hidroxiapatita e resina de Jatobá e incorporaram por duas formas ciprofloxacina. Os *scaffolds* com a ciprofloxacina incorporada durante o preparo mostraram uma taxa de liberação de 22 %, enquanto que os *scaffolds* que tiveram o fármaco adicionado após o preparo apresentou uma taxa de 85 %.

Assim, seria relevante estudar a adição da resina no desenvolvimento de *scaffolds* para regeneração tecidual, pois conforme observado nos estudos citados (NASCIMENTO, 2016; RASQUINI et al., 2017; RODRIGUES, 2017) esse composto bioativo pode gerar modificações na morfologia dos *scaffolds* obtidos a partir de biopolímeros presentes na MEC ou semelhantes a ela, como o colágeno e a quitosana, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias e antimicrobiana. Isso permitiria desenvolver *scaffolds* com morfologia adequada para uso na engenharia tecidual.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 *Materiais*

5.1.1 Obtenção do gel de colágeno

O tendão calcâneo bovino foi primeiramente cortado e lavado adequadamente com solução de 0,9 % de NaCl para remoção de sangue e outros contaminantes. Em seguida passou por hidrólise alcalina (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2015) permanecendo nessa solução contendo hidróxidos, cloretos e sulfatos de K^+ , Ca^{2+} e Na^+ por um período de 72 h a temperatura ambiente. Posteriormente, essa solução alcalina foi removida e o tendão passou por uma solução aquosa com os mesmos sais. Após esse tratamento todos os sais foram removidos do tendão através de lavagens com soluções de ácido bórico 3 %, água desionizada, EDTA 0,3 %, e novamente água desionizada. O colágeno foi extraído com uma solução de ácido acético pH 3,5 e a concentração foi determinada em triplicata por liofilização em equipamento da marca Edwards modelo Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International). Foi preparado um gel de colágeno (C) na concentração de 1 % com adição de ácido acético pH 3,5.

5.1.2 Tratamento da cartilagem auricular

A cartilagem auricular foi obtida de bovinos adultos abatidos em frigorífico submetidos à inspeção federal. Após limpeza a cartilagem auricular passou pelo mesmo procedimento para a obtenção do colágeno, com tempo de hidrólise de 24 h e temperatura de 45 °C. Após o tratamento, o revestimento externo (pericôndrio) foi separado da cartilagem elástica (denominada de região interna) e posteriormente liofilizadas em equipamento da marca Edwards modelo Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International). Tanto a região interna quanto o revestimento externo da cartilagem auricular foram triturados obtendo-se um pó com a região interna (I) e flocos com o revestimento externo (E).

5.1.3 Obtenção da quitosana

A quitosana foi obtida a partir de gládios de lula da espécie *Doryteuthis* spp cedidos por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda (Cananéia-SP), pelo graduando Lucas do Amaral Rasquini. Os gládios de lula foram previamente lavados, secos, triturados e separados com peneira obtendo-se partículas menores que 0,25 mm. Foi feito processo de desproteinização (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2015) para isolar a β -quitina a partir do gládio de lula através de um tratamento alcalino. Para tanto, foi preparada uma solução de NaOH 0,3

mol L⁻¹ e mantida a proporção de 1 g de gládio de lula para 10 mL solução de NaOH. O material juntamente com a solução alcalina foi colocado sob agitação e temperatura constante de 80 °C, por 1 h. O processo foi repetido mais 1 vez para garantir maior eficiência. O sólido resultante (β -quitina) foi lavado com água desionizada até a neutralidade e seco. Para obter-se a quitosana, a β -quitina foi desacetilada com NaOH 40 % em massa na proporção de 1 g de β -quitina para 20 mL NaOH, à temperatura de 80 °C sob agitação mecânica constante por 3 h e em atmosfera de N₂. Após esse período o material foi filtrado e o processo foi repetido para garantir maior eficiência. A quitosana obtida foi lavada até a neutralidade e seca em estufa a 40 °C, obtendo-se um pó (Qp). Um gel de quitosana 1 % (Qg) foi obtido por dissolução do pó em ácido acético 1 %.

5.1.4 Resina de Jatobá

A resina de Jatobá foi obtida no município de Jataí – Goiás, extraída de árvores adultas da espécie *Hymenaea courbaril*.

A resina foi triturada e separada com peneira de 32 *mesh*. Posteriormente foi feita uma solução de resina em etanol (Merck, PA) na proporção de 1:20 em massa. A mistura foi aquecida até 50 °C sob agitação por 1 h em frasco fechado para não evaporar o etanol. Após resfriar, foi filtrada e seca sob fluxo de ar, obtendo-se um pó cujo o rendimento foi de 90,1 %.

Estudo preliminar feito por Nascimento (2016) indicou que a concentração de 48 mg de resina não gerava precipitação em 15 g de gel de colágeno, portanto para este trabalho assumiu-se essa relação massa resina/massa biopolímeros. Assim, foi preparada uma solução de resina de Jatobá em etanol na concentração de 160 mg mL⁻¹ para ser utilizada no preparo dos *scaffolds*.

5.2 Preparação dos *scaffolds*

Os *scaffolds* foram preparados por mistura do gel de colágeno 1 % (C) com a cartilagem elástica - denominada de região interna (I), o pericôndrio - revestimento externo (E) da cartilagem auricular ou a quitosana em pó (Qp) nas proporções de 1:1 e 3:1 em massa, sob agitação (800 rpm em agitador mecânico da marca Fisaton, mod. 715), por 4 h, em temperatura ambiente. Foi adicionado 1 mL de solução etanólica de resina de Jatobá (160 mg mL⁻¹) em 50 g da mistura das amostras, agitado por mais 2 h (800 rpm em agitador mecânico da marca Fisaton, modelo 715) e colocadas em formas de Teflon®, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas equipamento da marca Edwards modelo Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International) até peso constante. Esses *scaffolds* foram neutralizados mantendo-os em

5. Materiais e Métodos

recipiente de vidro fechado com vapor de amônia por 8 h. Ao final foram obtidos 14 tipos de *scaffolds*, conforme Tabela 1.

Tabela 1. *Scaffolds* de colágeno, cartilagem auricular e/ou quitosana em pó, com ou sem resina de Jatobá.

SCAFFOLD	COMPONENTES	PROPORÇÃO (colágeno/elastina ou quitosana em pó)
C	Gel de Colágeno	-
CJ	Gel de Colágeno/Jatobá	-
CI	Gel de Colágeno/ cartilagem elástica	1:1
CIJ	Gel de Colágeno/ cartilagem elástica/Jatobá	1:1
C3I	Gel de Colágeno/ cartilagem elástica	3:1
C3IJ	Gel de Colágeno/ cartilagem elástica/Jatobá	3:1
CE	Gel de Colágeno/ pericôndrio	1:1
CEJ	Gel de Colágeno/ pericôndrio/Jatobá	1:1
C3E	Gel de Colágeno/ pericôndrio	3:1
C3EJ	Gel de Colágeno/ pericôndrio/Jatobá	3:1
CQp	Gel de Colágeno/quitosana em pó	1:1
CQpJ	Gel de Colágeno/quitosana em pó/Jatobá	1:1
C3Qp	Gel de Colágeno/quitosana em pó	3:1
C3QpJ	Gel de Colágeno/quitosana em pó/Jatobá	3:1

Fonte: Autoria própria.

Também foram obtidos *scaffolds* por mistura de gel de colágeno e gel de quitosana nas proporções de 1:3, 1:1 e 3:1, sob agitação mecânica (800 rpm em agitador mecânico da marca Fisaton, modelo 715), por 4 h, em temperatura ambiente. Foi adicionado 1 mL de resina de Jatobá (160 mg mL^{-1}) em parte das amostras, agitado por mais 2 h (800 rpm em agitador mecânico da marca Fisaton, modelo 715) e colocadas em formas de Teflon®, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas em equipamento da marca Edwards modelo Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International) até peso constante. Esses *scaffolds* foram neutralizados mantendo-os em recipiente de vidro com vapor de amônia por 8 h. Ao final foram obtidos 8 tipos de *scaffolds*, conforme Tabela 2.

Tabela 2. *Scaffolds* de colágeno e de gel de quitosana com ou sem resina de Jatobá.

SCAFFOLD	COMPONENTES	PROPORÇÃO (colágeno/gel de quitosana)
Qg	Gel de Quitosana	-
QgJ	Gel de Quitosana/Jatobá	-
CQg	Gel de Colágeno/gel de Quitosana	1:1
CQgJ	Gel de Colágeno/gel de Quitosana/Jatobá	1:1
C3Qg	Gel de Colágeno/gel de Quitosana	3:1
C3QgJ	Gel de Colágeno/gel de Quitosana/Jatobá	3:1
CQg3	Gel de Colágeno/gel de Quitosana	1:3
CQg3J	Gel de Colágeno/gel de Quitosana/Jatobá	1:3

Fonte: Autoria própria.

5.3 Caracterização

O colágeno e a cartilagem auricular obtidos tiveram a sua temperatura de desnaturação medida por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a quitosana teve sua massa molar determinada por viscosimetria capilar e seu GA por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). Os *scaffolds* foram caracterizados quanto à temperatura de desnaturação, por meio do DSC, quanto às características físico-químicas por meio de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), quanto à morfologia microscópica por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), tamanho de poros e porosidade por microtomografia computadorizada (micro-CT), cinética de absorção de tampão fosfato salino (PBS) e quanto à sua estabilidade biológica *in vitro* por degradação por collagenase.

5.3.1 Determinação do GA da quitosana por RMN ^1H

Para determinação do GA da quitosana por RMN ^1H foi utilizado o método proposto e validado por Lavertu et al. (2003), aplicável para amostras de quitosana de todos os valores de GA. 10 mg de quitosana foram dissolvidos em 1,96 mL de D_2O e 0,04 mL de DCl , sob agitação até completa solubilização, sendo o gel transferido para um tubo apropriado. O espectro de RMN ^1H da quitosana foi obtido em um espectrômetro com transformada de Fourier da marca Agilent Technologies, modelo 500/54 Premium Shielded pertencente a Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) – Universidade de São Paulo (USP). A análise foi feita a 70 °C, com 400 MHz de frequência e acumulando 64 varreduras, sendo utilizado uma sequência consistindo de um atraso de 6 s, um pulso de 90° de 11 ms e um tempo de aquisição de 5,1 s. Durante o intervalo de 6 s antes da

aplicação do pulso de 90° foi feita a supressão do sinal do solvente por saturação usando um pulso longo e de baixa potência na frequência do solvente.

5.3.2 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana

A massa molar média da quitosana foi determinada pelo método viscosimétrico (RINAUDO, 2006) que se baseia na determinação da viscosidade de soluções diluídas do polímero. O valor da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) está diretamente relacionado à massa molar viscosimétrica média ($\bar{M}_v$) da quitosana pela equação de Mark-Houwink (Equação 1):

$$[\eta] = K\bar{M}_v^\alpha \quad (1)$$

sendo K e α constantes relacionadas com o GA da quitosana.

Para preparo das soluções foi feita a dissolução de aproximadamente 19 mg de quitosana em 50 mL de tampão ácido acético 0,3 mol L⁻¹/acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ seguida de agitação por 24 h e filtração sob pressão positiva em membrana com diâmetro dos poros de 0,45 μ m (Millipore®). Os tempos de escoamento foram determinados utilizando alíquotas de 15 mL em um viscosímetro capilar de vidro do tipo Ubbelohde a temperatura constante de 25 °C. Esse procedimento foi feito em triplicatas para o tampão e para cada solução de quitosana de diferente concentração, a qual foi obtida pela adição sucessiva de 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL do tampão. As medidas foram feitas no Grupo de Físico-Química Orgânica do IQSC/USP, sob responsabilidade do professor Dr. Sergio Paulo Campana Filho, em viscosímetro AVS-360 (SCHOTT) acoplado a um diluidor automático TITRONIC universal (SCHOTT). O valor de massa molar viscosimétrica de cada quitosana foi determinado em triplicata.

5.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises foram feitas em equipamento DSC Modelo 2010 (TA Instruments). Foram utilizados aproximadamente 20 mg de *scaffold* em um suporte de alumínio hermético, sob fluxo de N₂ de 80 mL min⁻¹, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, com variação de temperatura de 5 – 120 °C. A temperatura de desnaturação do colágeno (Td) foi calculada a partir do ponto médio da inflexão da curva DSC.

5.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram feitos em filmes obtidos a partir das misturas diluídas (2,5 mg g⁻¹) utilizadas na preparação dos *scaffolds*. Essas soluções

foram colocadas em um molde de Teflon®, sob fluxo de ar constante para a formação de filmes. No caso da resina o espectro foi feito a partir do pó em pastilha de KBr. Para ambos os casos o intervalo estudado foi entre 4000 a 400 cm^{-1} (32 *scans*), utilizando um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), modelo IRAffinity-1 Shimadzu, *software* IR solution (CAQI do IQSC/USP).

5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram feitas análises da superfície e da seção transversal dos *scaffolds* colocados em *stubs* de alumínio por meio de uma fita condutora de carbono, sendo recobertas com uma fina camada de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein, Germany) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de $0,60 \text{ nm s}^{-1}$, possibilitando a análise. Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV, equipamento pertencente a CAQI do IQSC/USP.

As medições de poros foram feitas de acordo com a aproximação do diâmetro de Martin (ROUQUEROL et al., 1994), sendo que foram consideradas as extremidades dos poros que aparentavam ter maior profundidade em relação a largura e sempre no mesmo sentido, conforme recomenda a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Para isso foram feitas medidas de no mínimo 30 poros diferentes em cada *scaffold* e foi utilizado o *software* Image J em fotomicrografias com aumento de 200 vezes.

5.3.6 Microtomografia computadorizada (micro-CT)

Esse teste foi feito no Laboratório de Espectroscopia de Alta Resolução em Ressonância Magnética Nuclear (LEAR), no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) - USP, em conjunto com os pesquisadores Dr. Éverton Lucas de Oliveira e Dra. Mariane Barsi Andreeta sob supervisão do professor Dr. Tito José Bonagamba.

A microtomografia computadorizada foi feita utilizando um microtomógrafo Bruker™ CT Scanner modelo Skyscan 1272. As amostras selecionadas foram analisadas em uma resolução de voxel de 3 μm , 200 μA de corrente e voltagem de 50 kV. A câmera com detector do tipo Charged Coupled Device (CCD) de 16 megapixels dos detectores foi configurada para adquirir projeções de 2452 x 1640 pixels, resultando em uma resolução final 6 μm por voxel. O tempo de varredura foi de aproximadamente 4 h para cada amostra. A reconstrução das imagens foi realizada no *software* integrado SkyScan (NRecon integrado ao InstaRecon CBR Server). Após a reconstrução, o resultado consiste em um conjunto de imagens

com extensão .tif, sendo que cada imagem é uma seção transversal da amostra. O volume da amostra pode ser reconstruído através da leitura de cada imagem e o empilhamento (*image stack*) das mesmas.

A medida da porosidade foi feita através do *software* SkyScan CTAn. Primeiro, a região de interesse (*region of interest* - ROI) foi identificada. Para isso, foi selecionado o maior volume possível da amostra eliminado apenas as regiões de borda. Depois, por meio da ferramenta de binarização, foi escolhido o valor de limiar de nível de cinza em que os poros são identificados. Em seguida, os dados já binarizados foram utilizados para medir a porosidade total da amostra através da equação:

$$Porosidade\ Total = \frac{Volume\ poros}{Volume\ total\ ROI} \quad (2)$$

O tamanho dos poros foi analisado através da inspeção visual das imagens provenientes da tomografia. Essa análise foi feita com o *software* PerGeos (FEI), o qual disponibiliza ferramentas para manualmente medir regiões das imagens de microtomografia, assim como diversas ferramentas de processamento de imagens para melhoria da razão sinal/ruído e também permite a visualização do volume reconstruído.

5.3.7 Cinética de absorção de tampão fosfato salino (PBS)

Os *scaffolds* foram colocados em câmaras na presença de pastilhas de hidróxido de sódio e sílica para retirada de umidade, e foram monitorados até peso constante. Foram então colocados em frascos contendo PBS e em intervalos de tempo específicos foram pesados removendo-se o excesso de solução dos *scaffolds*. Após pesagem, os *scaffolds* foram retornados aos frascos para novas tomadas de tempo. Para cada *scaffold* o processo foi feito em quintuplicata. A quantidade de PBS absorvido pelo *scaffold* foi calculada pela média dos resultados encontrados usando a equação 3:

$$\%abs. = \frac{(m_u - m_s)}{m_s} \times 100 \quad (3)$$

sendo, %abs. = percentual de solução absorvida pela matriz; m_u = massa úmida e m_s = massa seca.

5.3.8 Estabilidade biológica *in vitro* via collagenase

Para a determinação da estabilidade biológica *in vitro* foi preparada uma solução de collagenase em tampão tris-HCl 10 mmol L⁻¹ a pH 7,4 contendo 25 mmol L⁻¹ de CaCl₂. A solução de collagenase (10 U mg⁻¹ de colágeno, Collagenase de *Clostridium histolyticum*) em

tampão tris-HCl foi adicionada às massas conhecidas de *scaffold* contendo colágeno que, em seguida, foram colocadas em à temperatura de 37 °C durante 2 h. Após este período, os *scaffolds* foram lavados com água desionizada e essa água foi removida por centrifugação por 15 min à 12000 rpm a temperatura de 10 °C, em uma centrífuga Himac CR20B2 (Hitachi), congelados e liofilizados até peso constante. 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}) de acordo com a equação 4. O teste foi feito em triplicata para cada tipo de *scaffold*.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{(m_{inicial} - m_{final})}{m_{inicial}} \times 100 \quad (4)$$

5.4 Esterilização

As amostras foram esterilizadas por diferentes métodos para selecionar o mais adequado para utilizar neste trabalho. Os métodos de esterilização utilizados foram: óxido de etileno, radiação ultravioleta e radiação gama.

A esterilização por óxido de etileno foi feita pela Central de Esterilização Com. Ind. Ltda. (ACECIL).

A esterilização por radiação ultravioleta foi feita no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos – USP. Os *scaffolds* foram irradiados (cada lado) por 20 min com lâmpada UV de 30 W em capela de fluxo laminar.

A esterilização por radiação gama foi feita nas doses de 15 e 25 kGy, no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (Ipen – CNEN/SP). As amostras foram irradiadas por fonte de ^{60}Co no Irradiador Multipropósito tipo compacto, com uma taxa de dose de 5 kGy h⁻¹.

Após os procedimentos de esterilização, foram feitos MEV e DSC para verificar se ocorreram modificações na morfologia dos *scaffolds* e estrutura química do colágeno. A partir das fotomicrografias foram feitas as medições de poros da mesma forma que a citada no item 5.3.5.

5.5 Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram feitos no Centro de Biotecnologia (CEBIO) no IPEN-CNEN/SP, sob orientação da Profa. Dra. Monica Beatriz Mathor e auxílio da pesquisadora Dra. Maria Fátima Guarizo Klingbeil. Para este ensaio os *scaffolds* selecionados foram esterilizados

por radiação gama 15 kGy conforme item 5.4 Todas as manipulações foram feitas em capela de fluxo laminar, com materiais esterilizados.

5.5.1 Linhagem celular

Para os ensaios celulares foi utilizada a linhagem celular NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), linhagem de fibroblastos de camundongo. A linhagem celular cresce aderida devido à sua morfologia (ATCC, 2019) em garrafas de polipropileno contendo meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino, glutamina 4 mM e solução antibiótico/antimicótico de penicilina 100 UI mL⁻¹, estreptomicina 100 µg mL⁻¹ e anfotericina 0,025 µg mL⁻¹. As células foram mantidas a 37 °C, em estufa com 5 % de CO₂ (FRESHNEY, 2010). Os repiques foram feitos conforme as características da linhagem. Todas as manipulações celulares foram feitas em ambiente estéril, em capela de fluxo laminar, com materiais esterilizados, a fim de se evitar contaminação.

5.5.2 Preparo das placas de cultura

Para a determinação da viabilidade e concentração celular foram utilizados o método da contagem em câmara de Neubauer e o teste da exclusão do corante (FRESHNEY, 2010). Neste teste o corante *trypan blue* é incorporado pelas células mortas devido ao rompimento da membrana celular. Para isso, o meio de cultura contido nas garrafas foi descartado e solução de PBS foi utilizada para retirar o resto do meio de cultura. Após lavagem das garrafas com PBS, foi adicionada solução Tripsina-EDTA 0,02 %, para remoção das células da garrafa armazenadora. Após 5 min, foi adicionado mesmo volume de DMEM, o conteúdo foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 1500 rpm por 5 min em centrífuga Marathon 8k (Fisher Scientific). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas no meio de cultura. Uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi retirada e adicionada a 10 µL de solução 0,4 % de *trypan blue*. Essa mistura foi colocada na câmara de Neubauer, sendo as células vivas e as mortas contadas com auxílio de um microscópio óptico e a porcentagem de células vivas foi calculada conforme equação abaixo:

$$\% \text{ de células vivas} = \frac{\text{número de células não coradas}}{\text{número total de células}} \times 100 \quad (5)$$

As células foram plaqueadas, em placa de cultura de 96 poços, na concentração de 5x10³ células mL⁻¹ em DMEM. Para isso, foram distribuídos 100 µL da suspensão celular por cavidade da placa de cultura estéril. As placas foram incubadas por 24 h em estufa, a 37 °C e 5 % de CO₂.

5.5.3 Preparo do extrato das amostras

Para preparo do extrato, os *scaffolds* foram colocados em tubo de ensaio com quantidade suficiente de DMEM (1 mg de *scaffold* para cada mL de meio de cultura – após considerar o grau de intumescimento de cada amostra) e incubados por 24 h em estufa, a 37 °C e 5 % de CO₂, conforme *International Organization for Standardization* - ISO 10993-12. Após esse período a amostra sólida foi descartada e o extrato foi utilizado nos ensaios de citotoxicidade.

5.5.4 Ensaio de citotoxicidade

As placas de cultura preparadas conforme item 5.5.2 tiveram o sobrenadante removido por aspiração e 100 µL do extrato de cada amostra preparado conforme item 5.5.3 foi adicionado em poços determinados. Para o controle negativo foi utilizado extrato de papel de filtro estéril, enquanto que o controle positivo foi feito com extrato de látex, ambos tratados nas mesmas condições dos extratos. As placas foram incubadas nas mesmas condições por 24 e 48 h.

O corante MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) foi utilizado para o teste de citotoxicidade. Após a incubação das células com os extratos, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 20 µL da solução comercial de MTS em cada poço da placa, seguido de incubação por mais 4 h em estufa a 37 °C e atmosfera de 5 % de CO₂. Após a incubação, as placas tiveram a absorbância em 490 nm mensurada em leitor de ELISA. As medidas foram feitas em quintuplicata. A viabilidade celular foi obtida por comparação aos poços do controle de células, descontando-se previamente de todos os poços o valor de absorbância do branco (poços sem células, mas contendo DMEM e solução de MTS), conforme equação 6.

$$\text{Índice de viabilidade (\%)} = \frac{\text{média das absorbâncias da amostra}}{\text{média das absorbâncias do controle de células}} \times 100 \quad (6)$$

5.5.5 Ensaio de adesão celular

Para o teste de adesão celular, os *scaffolds* foram colocados em placa de 24 poços e hidratados com 100 µL de DMEM. Foram adicionados 100 µL de suspensão celular na concentração de 8×10^5 células mL⁻¹ e a placa foi incubada por 1 h em estufa, a 37 °C e 5 % de CO₂. Após este período, foram adicionados 400 µL de DMEM e permaneceu em estufa pelo período de 24 h, a 37 °C e 5 % de CO₂.

Como controle positivo de adesão celular foi utilizada solução de colágeno da Eva Scientific (2 mg mL⁻¹). A matriz de colágeno foi obtida conforme indicado pelo fornecedor. Para isso, em banho de gelo sob agitação, foi feita a mistura dessa solução de colágeno da EVA com DMEM e o pH foi ajustado para 7 com NaOH. Após, foram pipetados 1 mL dessa solução de colágeno EVA em placa de 24 poços e semeada com 100 µL de suspensão celular na concentração de 8 x 10⁵ células mL⁻¹, incubada por 1 h em estufa, a 37 °C e 5 % de CO₂ para gelificação e formação da matriz de colágeno contendo as células. Após este período, foram adicionados 500 µL de DMEM e a placa permaneceu em estufa pelo período de 24 h, a 37 °C e 5 % de CO₂.

Após o período de 24 h, para a contagem das células aderidas os *scaffolds* foram transferidos para uma nova placa de 24 poços para evitar interferência de células aderidas ao poço e foram adicionados 400 µL do reagente de viabilidade celular *Alamar Blue* 10 % (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). Após a incubação *overnight*, a mudança de coloração foi mensurada pela leitura da fluorescência entre 560 nm excitação e 590 nm emissão em leitor SpectraMax i3 (Molecular Devices). As medidas foram feitas em triplicata. A porcentagem de adesão celular foi obtida por comparação com o controle de células (células semeadas em monocamada, como 100% de adesão), descontando-se previamente de todos os poços o valor de fluorescência do branco (*scaffolds* sem células, mas contendo DMEM e solução de *Alamar Blue*), conforme equação 7.

$$\text{Adesão celular (\%)} = \frac{\text{média da fluorescência da amostra}}{\text{média da fluorescência do controle de células}} \times 100 \quad (7)$$

5.5.6 Ensaio de proliferação celular

Para o teste de proliferação celular, os *scaffolds* foram colocados em placas de 24 poços e hidratados com 100 µL de DMEM. Foram adicionados 100 µL de suspensão celular na concentração de 8 x 10⁵ células mL⁻¹ e a placa foi incubada por 1 h em estufa, a 37 °C e 5 % de CO₂. Após este período, foram adicionados 400 µL de DMEM em cada *scaffold* e as placas permaneceram em estufa pelo período de até 192 h, a 37 °C e 5 % de CO₂, sendo retirada para contagem 1 placa em tempos determinados de 24, 72, 168 e 192 h, para determinação da proliferação celular.

Como controle positivo de proliferação celular foi utilizada solução de colágeno da Eva Scientific (2 mg mL⁻¹). A matriz de colágeno foi obtida conforme indicado pelo fornecedor. Para isso, em banho de gelo sob agitação, foi feita a mistura dessa solução de colágeno da EVA com DMEM e o pH foi ajustado para 7 com NaOH. Após, foram pipetados 1 mL dessa solução

de colágeno EVA em placa de 24 poços e semeada com 100 μL de suspensão celular na concentração de 8×10^5 células mL^{-1} , incubada por 1 h em estufa, a 37 °C e 5 % de CO_2 para gelificação e formação da matriz de colágeno contendo as células. Após este período, foram adicionados 500 μL de DMEM e permaneceram em estufa pelo período de até 192 h, a 37 °C e 5 % de CO_2 , sendo retirada para contagem 1 placa em tempos determinados de 24, 72, 168 e 192 h, para determinação da proliferação celular.

Para a determinação da curva de proliferação celular, os *scaffolds* foram transferidos para uma nova placa de 24 poços e foram adicionados 400 μL do reagente de viabilidade celular *Alamar Blue* 10 % (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). Após o período de incubação (*overnight*), as placas tiveram a fluorescência entre 560 nm excitação e 590 nm emissão mensurada em leitor SpectraMax i3 (Molecular Devices). As medidas foram feitas em triplicata. A proliferação celular foi obtida através da comparação direta com a fluorescência observada na medida anterior, descontando-se previamente de todos os poços o valor de fluorescência do branco (*scaffolds* sem células, mas contendo DMEM e solução de *Alamar Blue*).

5.6 Ensaio histológico

Os ensaios histológicos foram feitos no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob orientação da Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes e auxílio do mestrando William Manuel Pereira Antunes Fortes.

Os *scaffolds* semeados com células foram preservados em solução de formol 10 % até início do teste. Para o preparo das peças, as amostras foram desidratadas passando por uma sequência de álcoois, sendo eles etanol 70 %, etanol 80 %, etanol 90 % e etanol 95 %, permanecendo por 1 h em cada álcool. Após desidratação, as amostras foram colocadas em solução contendo etanol 95 % e resina básica (Leica Historesin Embedding kit) (1:1) por 4 h. Em seguida, essa solução foi removida e as amostras ficaram em resina básica *overnight* a 4 °C. Para inclusão dos *scaffolds* e obtenção das peças, eles foram colocados em formas específicas e foi adicionado solução de resina básica e endurecedor conforme indicado no protocolo do kit, permanecendo em estufa à 40 °C *overnight*. A microtomia das peças foi feita em micrótomo eletrônico (MICRON HM 360), na espessura de 3 μm . As lâminas foram coradas com Azul de Toluidina por 3 min e as imagens foram obtidas em microscópio de luz (BX 51, Olympus, Denmark) em aumento de 200 e 400 X com registro de imagens pelo software Olympus DP2 – B5W.

5.7 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a distribuição dos dados, quanto às diferenças nos testes de absorção, tamanho de poro por MEV e ensaios biológicos foram analisados usando a análise de variância em dois sentidos (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os materiais foram obtidos conforme citado e podem ser observados nas Figuras 6 a 9.

Figura 6. Imagem digital: (A) tendão calcâneo bovino e (B) gel de colágeno 1%.

Fonte: Autoria própria.

Figura 7. Imagem digital: (A) cartilagem auricular bovina, (B) cartilagem elástica - região interna e (C) pericôndrio - revestimento externo.

Fonte: Autoria própria.

Figura 8. Imagem digital: (A) gládio de lula, (B) quitosana em pó e (C) gel de quitosana 1%.

Fonte: Autoria própria.

Figura 9. Imagem digital: (A) resina de Jatobá e (B) solução etanólica de resina de Jatobá.

Fonte: Autoria própria.

6.1 Caracterização quitosana

Os gládios de lula são constituídos por 35-40 % de β -quitina, 60-65 % de proteínas e uma quantidade mínima de sais inorgânicos (KURITA et al., 1993), sendo que o conteúdo de β -quitina encontrado neste estudo foi de 36,6 %, estando de acordo com a literatura. O rendimento foi de 29,8 %, em relação à massa inicial de gládios de lula (41,0 g).

6.1.1 Determinação do GA da quitosana por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Quitosana e quitina se distinguem pela porção relativa de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose presente no polímero, parâmetro este denominado GA (RODRIGUES, 2017). Este parâmetro pode influenciar propriedades da quitosana como cristalinidade, degradabilidade, atividade antimicrobiana e proliferação celular (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; MARANGON et al., 2017; TRUNG et al., 2006). O grau médio de acetilação (GA) da quitosana foi determinado por RMN ^1H (LAVERTU et al., 2003), sendo observados os picos em 2,3 ppm (H_{Ac}) referente ao CH_3 do grupo N-acetila, em 4,9 ppm referente ao H1 (Figura 10) de monômeros acetilados, e, portanto, ambos aumentam de intensidade com o aumento no GA da quitosana.

$$GA(\%) = \left(\frac{H_{\text{Ac}}}{H_{2-6}} \right) \times 100 \quad (8)$$

Figura 10. Espectro de RMN ^1H para a quitosana em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$.

Fonte: Autoria própria.

Os monômeros desacetilados dão origem aos picos em 3,5 ppm referente ao H2, e em 5,2 ppm relacionado ao H1. Na região entre 3,8 e 4,4 ppm estão os picos atribuídos aos

prótons H2, H3, H4, H5, H6 e H6' (H₂₋₆) dos monômeros tanto acetilados quanto desacetilados e, por fim, o pico observado em 4,7 ppm que é referente à ressonância do próton do solvente. Utilizando-se a equação 8 e através da integração (áreas) dos picos H_{Ac} e H₂₋₆, foi possível determinar o valor do GA da quitosana como sendo 11,2 % (baixo GA).

A quitosana obtida foi de baixo grau de acetilação, sendo assim interessante seu uso no desenvolvimento de *scaffolds* empregados na regeneração celular. Estudo feito por Chatelet; Damour e Domard, (2001) mostrou que quitosanas com menores valores de GA permitem uma maior proliferação celular, tanto para células de *Schwann* quanto para queratinócitos.

6.1.2 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana

O processo de obtenção da quitosana envolve diversas etapas que podem gerar ao final quitosanas com propriedades diversas, sendo uma dessas propriedades a massa molar, a qual pode influenciar na performance da quitosana como biomaterial (BOF et al., 2015). A viscosidade intrínseca da amostra de quitosana foi determinada pela extrapolação da reta obtida através da curva de viscosidade reduzida em função da concentração das soluções de quitosana em tampão ácido acético/acetado de sódio, conforme observado na Figura 11.

Figura 11. Curva de viscosidade reduzida versus concentração da amostra de quitosana.

Fonte: Autoria própria.

A viscosidade intrínseca obtida foi de $1076 \pm 11 \text{ mL g}^{-1}$. Esse valor está relacionado com a massa molar viscosimétrica média da quitosana, podendo esta ser determinada através da equação de Mark-Houwink (Equação 1).

Substituindo-se os valores, tem-se que o valor da massa molecular foi de $1,6 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, sendo considerada uma quitosana de alta massa molar (CAMPANA-FILHO et al., 2007; DASH et al., 2011) e similar as obtidas em nosso grupo (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2015; MARANGON et al., 2017). Horn, Martins e Plepis (2015) desenvolveram

scaffolds de colágeno aniônico de serosa porcina e quitosana de alta massa molar com características adequadas para possível aplicação em engenharia tecidual. Assim, a quitosana obtida neste estudo seria capaz de interagir com o colágeno aniônico para gerar *scaffolds* com morfologia adequada.

6.2 Obtenção dos *scaffolds*

Os *scaffolds* foram obtidos a partir de gel de colágeno (C), e da mistura desse gel com cartilagem elástica - região interna (CI), com pericôndrio - revestimento externo da cartilagem auricular (CE) e com quitosana em pó (CQp), em duas concentrações (1:1 e 3:1, respectivamente). Além disso, *scaffolds* com a mesma composição tiveram a adição de resina de Jatobá (J). Também foram preparados *scaffolds* a partir de gel de quitosana (Qg) sem e com adição de resina de Jatobá (J). Foram ainda obtidos *scaffolds* a partir de gel de colágeno com gel de quitosana (CQg), sem e com adição da resina de Jatobá (J), e em três proporções (1:3, 1:1 e 3:1) (Figura 12).

Figura 12. Fotografia digital dos *scaffolds*: (A) C, (B) CJ, (C) CE, (D) CEJ, (E) C3E, (F) C3EJ, (G) CI, (H) CIJ, (I) C3I, (J) C3IJ, (K) CQp, (L) CQpJ, (M) C3Qp, (N) C3QpJ, (O) CQg, (P) CQgJ, (Q) C3Qg, (R) C3QgJ, (S) CQg3, (T) CQg3J, (U) Qg e (V) QgJ.

Fonte: Autoria própria.

Os *scaffolds* mostraram aspecto similar, sendo que aqueles sem resina apresentaram coloração creme, enquanto que os com resina de Jatobá exibiram uma coloração amarelada. Os *scaffolds* obtidos pela mistura de gel de colágeno com pericôndrio (Figura 12 G a J) e com quitosana em pó (Figura 12 K a N) apresentaram superfície mais irregular devido a presença de materiais sólidos. Já os *scaffolds* obtidos com quitosana em gel (1:1) também apresentaram superfície irregular (Figura 12 O e P), devido o procedimento para espalhar ocorrer de forma manual e sem o uso de equipamento para nivelar a superfície (evitando a modificação na morfologia da superfície).

6.3 Caracterização dos scaffolds

6.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A hélice tripla do colágeno é suscetível ao aumento de temperatura, podendo se desorganizar e até romper dependendo do grau do aquecimento, descaracterizando a estrutura colagênica obtendo-se a transição de colágeno→gelatina. Assim, o DSC foi utilizado para determinar a temperatura de desnaturação (T_d) do colágeno, e também para verificar a integridade da hélice tripla. A Tabela 3 mostra as temperaturas de desnaturação para os *scaffolds* com maior concentração de colágeno em sua formulação. Para os *scaffolds* com maior concentração de quitosana a transição de colágeno para gelatina não foi perceptível.

Tabela 3. Temperatura de desnaturação (T_d , °C) dos <i>scaffolds</i> de colágeno.		
SCAFFOLD	T_{d1} (°C)	T_{d2} (°C)
Cartilagem elástica (I)	-	-
Pericôndrio (E)	-	55,3
C	47,9	
CJ	49,4	
CI	51,5	
CIJ	48,0	
C3I	48,0	
C3IJ	47,3	
CE	47,6	59,2
CEJ	46,5	56,5
C3E	47,0	51,2
C3EJ	45,5	52,2
CQp	47,3	
CQpJ	45,0	
C3Qp	45,1	
C3QpJ	45,0	
CQg	50,3	
CQgJ	45,9	
C3Qg	48,7	
C3QgJ	48,3	

T_{d1} – Temperatura de desnaturação do colágeno de tendão bovino com tratamento alcalino

T_{d2} – Temperatura de desnaturação do colágeno presente no pericôndrio

Fonte: Autoria própria.

Os resultados apresentados para Td não mostram diferenças significativas, pois a Td do colágeno foi de 47,9 °C e o maior valor obtido para os demais *scaffolds* foi de 51,5 °C, ou seja, apenas 3,6 °C. Contudo pode-se observar uma tendência para os resultados como está descrito a seguir. O colágeno (C) apresentou Td₁ de 47,9 °C e ao adicionar-se a resina de Jatobá (CJ), a Td não é alterada, indicando que o uso da resina não altera a estrutura colagênica. Estudo feito por (HORN et al., 2018) mostra que a adição de óleo de Pequi a filmes de colágeno também não altera a Td do colágeno (51 °C). Sendo assim, o uso de certos compostos bioativos como a resina de Jatobá pode ser feito, uma vez que não levam à perda da integridade da hélice tripla do colágeno.

Quando se observa a Td do colágeno obtido a partir de tendão bovino e utilizado na obtenção dos *scaffolds* com cartilagem elástica na proporção 1:1, nota-se um pequeno aumento; na mistura com pericôndrio não houve alteração. Já a adição da resina reduz novamente a Td para próxima à do colágeno. Em alguns casos se observa uma segunda transição muito pequena entre 50 e 60 °C, que pode estar relacionada com o colágeno do tipo I presente no pericôndrio, que após tratamento de 24 h à 45 °C apresentou Td de 55,3 °C, enquanto que nenhuma transição foi observada para a cartilagem elástica.

O *scaffold* obtido com quitosana em pó na concentração 1:1 mostrou Td próxima à do colágeno e a adição de resina de Jatobá resultou em Td de valor menor. Já na concentração 3:1 a Td foi menor que a do colágeno e a adição do composto bioativo não gerou alteração. Os *scaffolds* obtidos com gel de quitosana na concentração 1:1 apresentaram uma tendência à Td de maior valor e com a adição de resina tende a diminuir. Já na concentração 3:1, os *scaffolds* apresentaram Td próxima a do colágeno, mesmo com adição de resina de Jatobá.

De maneira geral, pelos resultados obtidos nota-se que a resina de Jatobá leva a uma pequena diminuição na Td do colágeno presente nos *scaffolds*. O pericôndrio mostra a presença de uma segunda transição referente ao colágeno presente. Já a elastina, presente na cartilagem elástica, gera um pequeno aumento na Td, bem como o uso de gel de quitosana na concentração 1:1.

6.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A FTIR foi utilizada para verificar se as características estruturais químicas do colágeno, da cartilagem auricular, da quitosana e da resina de Jatobá foram mantidas após o processo de obtenção. Essa técnica se baseia em emitir radiação da região do infravermelho nas amostras para que os átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao

redor das ligações covalentes que os ligam e, dessa forma, ocorra a sobreposição de linhas dando origem a uma série de bandas.

Os valores das bandas características para o colágeno na região do infravermelho estão diretamente ligados à sua fonte de extração observando-se apenas pequenos deslocamentos (RIAZ et al., 2018). Para o colágeno extraído a partir de tendão bovino os espectros para os *scaffolds* (Figura 13) mostraram as bandas características para na região de 3323 cm^{-1} referente às deformações O-H e N-H, em 1656 cm^{-1} característica de deformação axial de ligações C=O e C-N (amida I), em 1558 cm^{-1} de deformações angulares de ligações N-H (amida II), bandas na região de 1454 cm^{-1} referente ao anel pirrolidínico e em 1236 cm^{-1} de Amida III (CHEN; MO; QING, 2007; PEREDA et al., 2011).

Figura 13. Espectro na região do Infravermelho para: (A) C, (B) resina de Jatobá e (C) CJ.

Fonte: Autoria própria.

O espectro FTIR para a resina de Jatobá (Figura 13) mostrou bandas referentes às ligações C-H em grupos metil em 2931 , 2866 , 1449 e 1387 cm^{-1} , as ligações duplas C=C e C=O foram indicadas pelas bandas em 1697 e 1641 cm^{-1} , já as bandas observadas em 1175 e 1267 cm^{-1} se referem à presença de ácido succínico esterificado e a banda estreita em 887 cm^{-1} se refere aos grupos metilenos exocíclicos (TAPPERT et al., 2013). De acordo com Tappert et al. (2013) banda na região de 1265 cm^{-1} indica uma resina recentemente coletada enquanto que banda em 1235 cm^{-1} indica a formação de âmbar. Neste trabalho foi observada banda intensa em 1267 cm^{-1} o permite dizer que a resina utilizada foi coletada recentemente. Pelos espectros das misturas dos *scaffolds* contendo a resina de Jatobá é possível observar apenas aumento na intensidade da banda na região de 2945 cm^{-1} , já que as demais bandas características da resina se sobrepõem as do colágeno e cartilagem auricular.

Como a cartilagem auricular apresenta bandas similares ao do colágeno devido a sua composição (CHEHELTANIA et al., 2014) não se observou mudanças nos espectros das misturas dos *scaffolds* obtidos em conjunto com esse material (Figura 14).

Figura 14. Espectro na região do Infravermelho para: (A) C, (B) CI e (C) CE.

Fonte: Autoria própria.

Pela razão entre as absorvâncias em 1235 e 1450 cm^{-1} é possível dizer se o colágeno sofreu desnaturação, sendo que valores próximos a 1,0 indicam a preservação da tripla hélice (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). Essa relação foi calculada para os *scaffolds* C, CJ, CE e CI, nos quais é possível observar as bandas. Já os *scaffolds* obtidos com quitosana não foi possível calcular devido o deslocamento dessas bandas. Os valores encontrados foram todos próximos de 1,0, sendo de 0,96 para C, de 0,94 para CJ e de 0,90 tanto para CI quanto para CE, confirmando a presença de colágeno.

Para as misturas dos *scaffolds* contendo o gel de quitosana (Figura 15) observaram-se bandas referentes à deformação C=O em 1651 cm^{-1} (amida I), em 1560 cm^{-1} correspondendo a deformação N-H (amida II), em 1415 cm^{-1} devido a deformação da ligação C-H e banda em 1084 cm^{-1} referente aos estiramentos C-O, característico da estrutura sacarídica (BERTOLO et al., 2020; KUMIRSKA et al., 2010; WANG et al., 2003). Nos espectros das misturas dos *scaffolds* de gel de quitosana com resina pode-se observar a presença da resina pela banda em 1698 cm^{-1} como indicado na seta da Figura 15.

Figura 15. Espectro na região do Infravermelho para: (A) Resina de Jatobá, (B) Qg e (C) QgJ.

Fonte: Autoria própria.

Já a mistura de colágeno e quitosana em pó (Figura 16) apresentou as bandas características de cada material, como em 1656 cm^{-1} provinda do colágeno e em 1082 cm^{-1} provinda da quitosana (KAKKAR et al., 2014; TANGSADTHAKUN et al., 2006; TAPPERT et al., 2013).

Figura 16. Espectro na região do Infravermelho para: (A) CQp e (B) CQpJ.

Fonte: Autoria própria.

6.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura utiliza as interações entre um feixe de elétrons com uma amostra para a formação de uma imagem microscópica de alta resolução, chegando até 10 nm. As imagens geradas são tridimensionais, tendo-se foco nas diferentes

profundidades do relevo da amostra. A partir da observação da imagem, pode-se definir a morfologia das microestruturas, tais como tamanho dos poros, distribuição e interconectividade que são fatores preponderantes para crescimento celular. Assim, a análise por MEV foi feita para verificar a morfologia dos *scaffolds*, sendo que as fotomicrografias obtidas mostraram uma diferença no tamanho de poro e nos canais internos.

A partir das fotomicrografias foi possível determinar o tamanho médio de poro dos *scaffolds* através da medição do diâmetro médio dos poros conforme citado no item 5.3.5. Os tipos de poros presentes nas matrizes estão representados na Figura 17 (GARCIA, 2020). A tabela 4 mostra os valores obtidos após medição do tamanho de poro e sua análise estatística.

Figura 17. Tipos de poros presentes em *scaffolds*: a) poros abertos ou poros da superfície; b) poros fechados ou internos; c) poros interconectados; d) superfície rugosa; e) superfície compacta ou lisa.

Fonte: Garcia (2020).

A Figura 18 mostra as fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds* de colágeno (C) e colágeno com resina de Jatobá (CJ). A Figura 19 está relacionada com as fotomicrografias para os *scaffolds* de colágeno/cartilagem elástica (1:1, CI e 3:1, C3I, respectivamente) e com adição de resina de Jatobá (CIJ e C3IJ), respectivamente. Já a Figura 20 mostra as MEV para os *scaffolds* de colágeno/pericôndrio (1:1, CE e 3:1, C3E, respectivamente) e com adição de resina de Jatobá (CEJ e C3EJ), respectivamente.

Figura 18. Fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds*: (A) C e (B) CJ.

Fonte: Autoria própria.

Os *scaffolds* de colágeno (C) apresentaram tamanho de poro significativamente maior quando comparados com aqueles obtidos pela adição de resina de Jatobá (CJ), conforme observado na Figura 18 e Tabela 4. Isso sugere que esse composto bioativo influencia na morfologia de *scaffolds* obtidos com esse biopolímero, uma vez que gerou a diminuição no tamanho de poros na superfície do *scaffold*.

Figura 19. Fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds* de colágeno com cartilagem elástica - região interna: (A) CI, (B) CIJ, (C) C3I e (D) C3IJ.

Fonte: Autoria própria.

Figura 20. Fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds* de colágeno com pericôndrio - revestimento externo da cartilagem auricular: (A) CE, (B) CEJ, (C) C3E e (D) C3EJ.

Fonte: Autoria própria.

Pelas fotomicrografias nota-se que os *scaffolds* de colágeno/cartilagem auricular (Figura 19 e Figura 20) quando comparados com aquele obtido apenas de colágeno (Figura 18) apresentaram poros com tamanho significativamente menor. Nos *scaffolds* com cartilagem auricular (cartilagem elástica ou pericôndrio) na proporção 1:1 não se observa a presença de poros, independentemente da adição de resina. Além disso, observou-se a formação de vesículas nos *scaffolds* adicionados de resina de Jatobá (Figuras 19 B e Figura 20 B).

Em estudo feito por Minardi et al. (2017) *scaffolds* de colágeno e colágeno/elastina para tratamento de hérnia ventral apresentaram superfície porosa, sendo capaz de proporcionar o crescimento de células-tronco mesenquimais. De acordo com Minardi et al. (2017), a adição de 10 % de elastina auxilia na mimetização da composição da derme, além de melhorar a capacidade de regeneração tecidual. No presente estudo, foram obtidos *scaffolds* utilizando-se 25 % (3:1) e 50 % (1:1) de elastina, sendo que os *scaffolds* de concentração (3:1) apresentaram superfície porosa assim como os *scaffolds* obtidos no estudo de Minardi et al. (2017) com 10 % de elastina, enquanto que os *scaffolds* 1:1 não apresentaram poros. Assim, os *scaffolds* obtidos nesse estudo a partir da mistura de colágeno e cartilagem auricular na concentração 3:1, com

6. Resultados e Discussão

ou sem adição da resina, poderiam ser utilizados para crescimento celular, uma vez que apresentam poros superficiais.

A Figura 21 mostra as fotomicrografias por MEV dos *scaffolds* obtidos pela mistura de colágeno/quitosana em pó (1:1, CQp e 3:1, C3Qp, respectivamente) e com adição de resina de Jatobá (CQpJ e C3QpJ, respectivamente).

Figura 21. Fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds* de colágeno/quitosana em pó: (A) CQp, (B) CQpJ, (C) C3Qp e (D) C3QpJ.

Fonte: Autoria própria.

Os *scaffolds* C3Qp, obtidos com quitosana em pó na concentração 3:1 (Figura 21 C), não apresentaram alterações morfológicas quando comparados com C, enquanto que CQp, obtido na concentração 1:1, apresentou diferença significativa para C (Figura 18 A). Também observou-se uma diminuição significativa no tamanho de poro na presença da resina de Jatobá quando se compara C3QpJ (3:1) com C3Qp sugerindo que, neste caso, a quitosana em pó impede modificações que o composto bioativo induz em outros *scaffolds*. Já comparando CQp e CQpJ (1:1) não é visto mudança significativa com a adição de resina.

A Figura 22 mostra as fotomicrografias dos *scaffolds* de gel de quitosana (Qg e QgJ). A Figura 23 mostra as fotomicrografias dos *scaffolds* obtidos pela mistura de gel de

colágeno/gel de quitosana (1:1, CQg; 3:1, C3Qg e 1:3, CQg3, respectivamente) e com adição de resina de Jatobá (CQgJ, C3QgJ e CQg3J).

Figura 22. Fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds* de gel de quitosana: (A) Qg e (B) QgJ.

Fonte: Autoria própria.

Os *scaffolds* formados com o gel de quitosana (Figura 22 e 23) mostram-se similares ao gel de colágeno (Figura 18) e CQp (Figura 21), exceto na proporção 1:3 (CQg3) que apresentou tamanho de poro significativamente diferente de Qg. Contudo, a adição da resina de Jatobá mostra atuação nos *scaffolds* com proporção de 1:1 e 3:1 (Figura 23 B e 23 D), levando a uma diminuição significativa no tamanho de poro. Já na proporção 1:3 de gel de colágeno/gel de quitosana (Figura 23 F) não se observa alteração morfológica significativa após a adição da resina. Por fim, a adição de resina de Jatobá ao gel de quitosana (Figura 22) levou a uma diferença significativa no tamanho de poro.

Estudo feito por Horn, Martins e Plepis (2009) apresenta *scaffolds* de colágeno e de colágeno/gel de quitosana na proporção 1:1 (ambos na concentração de 0,5 %) com superfície porosa. Os autores mostram que a presença da quitosana leva a uma diminuição do tamanho de poro, semelhante ao que ocorre no presente estudo.

Figura 23. Fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds* de gel de colágeno/gel de quitosana: (A) CQg, (B) CQgJ, (C) C3Qg, (D) C3QgJ, (E) CQg3 e (F) CQg3J.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4. Tamanho de poro (μm) dos *scaffolds* de colágeno, elastina e/ou quitosana em pó, com ou sem resina de Jatobá.

<i>SCAFFOLDS</i>	Tamanho de poro (μm)
C	82 ± 30^a
CJ	$48 \pm 13^{c,d,e,f}$
CI	-
CIJ	-
C3I	$40 \pm 9^{d,e,f,g}$
C3IJ	$32 \pm 10^{f,g,h}$
CE	-
CEJ	-
C3E	$42 \pm 15^{c,d,e,f}$
C3EJ	$29 \pm 12^{f,g,h}$
CQp	$45 \pm 14^{c,d,e}$
CQpJ	$36 \pm 13^{e,f,g,h}$
C3Qp	$60 \pm 19^{a,b}$
C3QpJ	$37 \pm 12^{e,f,g}$
CQg	$52 \pm 17^{b,c,d}$
CQgJ	$27 \pm 7^{g,h}$
C3Qg	$55 \pm 16^{b,c}$
C3QgJ	24 ± 6^h
CQg3	$40 \pm 9^{d,e,f,g}$
CQg3J	$51 \pm 16^{b,c,d}$
Qg	$61 \pm 16^{a,b}$
QgJ	$46 \pm 14^{c,d,e}$

Valores com a mesma letra sobrescrita (a-e) não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Fonte: Autoria própria.

As fotomicrografias das secções transversais podem ser observadas na Figura 24 a 29. Os *scaffolds* de colágeno e colágeno/cartilagem auricular (elástica ou pericôndrio) apresentam uma desorganização dos canais (Figura 24 A, 25 e 26). Com a utilização do composto bioativo somente CJ (Figura 24 B) apresenta uma maior organização dos canais, enquanto que para os *scaffolds* de colágeno/cartilagem auricular esse padrão morfológico não se altera. Já a presença de quitosana (pó ou gel) induz a organização dos canais observados nos *scaffolds* com ou sem a presença do composto bioativo (Figura 27 a 29).

6. Resultados e Discussão

Figura 24. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos *scaffolds*: (A) C e (B) CJ. Aumento de 200 X.

Fonte: Autoria própria.

Figura 25. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos *scaffolds* de colágeno com cartilagem elástica - região interna: (A) CI, (B) CIJ, (C) C3I e (D) C3IJ. Aumento de 200 X.

Fonte: Autoria própria.

Figura 26. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos *scaffolds* de colágeno com pericôndrio - revestimento externo da cartilagem auricular: (A) CE, (B) CEJ, (C) C3E e (D) C3EJ. Aumento de 200 X.

Fonte: Autoria própria.

6. Resultados e Discussão

Figura 27. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos *scaffolds* de colágeno/quitosana em pó: (A) CQp, (B) CQpJ, (C) C3Qp e (D) C3QpJ. Aumento de 200 X.

Fonte: Autoria própria.

Figura 28. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos *scaffolds* de gel de quitosana: (A) Qg e (B) QgJ. Aumento de 500X.

Fonte: Autoria própria.

Figura 29. Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos *scaffolds* de gel de colágeno/gel de quitosana: (A) CQg, (B) CQgJ, (C) C3Qg, (D) C3QgJ, (E) CQg3 e (F) CQg3J. Aumento de 200 X.

Fonte: Autoria própria.

Após os testes de DSC, FTIR e MEV foram selecionados a partir das 22 amostras iniciais (Tabela 1 e 2) os *scaffolds* que apresentaram melhores resultados para um possível crescimento celular, como integridade dos polímeros presentes e presença de poros (DASKALOVA et al., 2014). Assim, 12 amostras selecionadas foram: C, CJ, C3I, C3IJ, C3E, C3EJ, C3Qp e C3QpJ – entre os *scaffolds* obtidos pela mistura de gel e material sólido; e Qg, QgJ, CQg3 e CQg3J – entre aquelas obtidas pela mistura de géis. Esses *scaffolds* seguiram para

os demais testes para verificar sua morfologia (tamanho de poro e porosidade), sua capacidade de absorção de PBS e sua degradabilidade.

6.3.4 Microtomografia computadorizada (micro-CT)

A morfologia de *scaffolds* à base de polímeros desempenha um papel fundamental na interação com as células e também no seu comportamento mecânico, sendo necessário utilizar uma técnica adequada para verificar essa microestrutura. A micro-CT é um método não destrutivo e eficaz para obter imagens tridimensionais de objetos porosos em escala micrométrica, que combinado com a análise de *software* de imagem digital, fornece informações quantitativas e qualitativas precisas sobre a morfologia 3D de objetos complexos em uma alta resolução espacial (PLESSIS et al., 2017). Implica em capturar imagens de projeção de raios-x de um objeto de vários ângulos ao redor do objeto e converter matematicamente esse conjunto de imagens em uma pilha de fatias de imagem em seção transversal, o que representa um tridimensional (BERTOLDI; FARÈ; TANZI, 2011; PLESSIS et al., 2017). A micro-CT foi utilizada para verificar a morfologia dos *scaffolds* desenvolvidos, como tamanho de poros, interconectividade e porosidade.

Geralmente, *scaffolds* de colágeno puro são quase invisíveis na micro-CT, sendo necessário utilizar métodos para aumentar o contraste, como por exemplo nanopartículas de prata ou hidroxiapatita (ZIDEK et al., 2016). Entretanto, alguns autores já sugerem ser possível obter imagens de matrizes poliméricas. Campbell et al. (2017) utilizou a micro-CT para analisar a morfologia interna de *scaffolds* de colágeno para a semeadura repetida de células. Em outro estudo, a micro-CT foi utilizada para observar a morfologia em 3D dos *scaffolds* porosos de colágeno puro e de colágeno/compósito (ZIDEK et al. 2016). Contudo, apesar do que é encontrado na literatura sobre a dificuldade de se obter imagens por micro-CT de amostras de colágeno sem adição de contraste ou materiais mais densos, neste estudo foi possível utilizar essa técnica para analisar a morfologia dos *scaffolds* de biopolímeros, assim como observado em Campbell et al. (2017) e Zidek et al. (2016). As Figuras 30 e 31 mostram a imagem obtida para a amostra de colágeno puro (C), sendo possível verificar a sua morfologia interna.

Figura 30. Imagem de micro-CT da amostra C seção 2D adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 31. Imagem de micro-CT da amostra C seção 3D adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Propriedades como porosidade, tamanho de poro e interconectividade entre os poros possuem um importante papel na funcionalidade de *scaffolds*. A dimensão dos poros é um critério para selecionar o tipo de célula que poderia ser cultivada para crescer no *scaffold*. Além disso, a alta porosidade permite a infiltração celular e a interconectividade beneficia o crescimento, proliferação e migração das células (ASHWORTH; BEST; CAMERON, 2014; PINA et al. 2019). Cada célula necessita de um tamanho adequado de poro, sendo que para neovascularização é necessário um tamanho de poro de 5 μm , enquanto que para a regeneração óssea de 100-350 μm (DASKALOVA et al., 2014). Poros menores, entre 75-100 μm , permitem o crescimento de tecido osteóide, enquanto que poros entre 10-75 μm possibilitam a penetração de tecido fibroso (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005). A análise visual das amostras permite verificar a variação do diâmetro dos poros da base, centro e superfície do *scaffold* (Figura 32 a

6. Resultados e Discussão

43). Desta forma, é possível garantir que o diâmetro dos poros esteja na faixa de tamanho indicada para determinada célula em toda amostra para que haja crescimento celular.

Figura 32. Imagem por micro-CT da amostra C: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 33. Imagem de micro-CT da amostra CJ: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 34. Imagem de micro-CT da amostra C3I: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 35. Imagem de micro-CT da amostra C3IJ: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 36. Imagem de micro-CT da amostra C3E: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 37. Imagem de micro-CT da amostra C3EJ: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

6. Resultados e Discussão

Figura 38. Imagem de micro-CT da amostra C3Qp: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 39. Imagem de micro-CT da amostra C3QpJ: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 40. Imagem de micro-CT da amostra CQg3: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 41. Imagem de micro-CT da amostra CQg3J: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 42. Imagem de micro-CT da amostra Qg: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 43. Imagem de micro-CT da amostra QgJ: seção 2D da esquerda para a direita da superfície, centro e base, adquirida com uma resolução de pixel de 6 μm , com tempo de digitalização de 4 horas.

Fonte: Autoria própria.

Através dessas imagens foi possível calcular a porosidade e o tamanho de poro em cada região para todas as amostras. Também foi possível verificar que os *scaffolds* apresentam poros interconectados. Na Tabela 5, estão expressos os valores encontrados de porosidade e tamanho de poro.

Tabela 5. Porosidade (%) e tamanho de poro (μm) dos *scaffolds* de colágeno, cartilagem e/ou quitosana, com ou sem resina de Jatobá.

<i>Scaffolds</i>	Porosidade (%)	Tamanho de poro superfície (μm)	Tamanho de poro meio (μm)	Tamanho de poro base (μm)
C	67	137	96	149
CJ	67	77	120	116
C3I	72	122	60	146-
C3IJ	72	70	44 – 73	83 – 139-
C3E	64	47	76	121
C3EJ	66	75	157	118
C3Qp	63	71	86	289
C3QpJ	70	118 – 237	110 – 176	113 – 260-
CQg3	67	64	50	123
CQg3J	76	94	79 – 157	110
Qg	71	69	42	48
QgJ	72	109	78 – 156	77

Fonte: Autoria própria

A porcentagem de porosidade influencia a absorção de exsudatos, a taxa de colonização, a estrutura celular e o processo de angiogênese (IACOB et al., 2018). Essa propriedade depende do tipo e concentração do polímero, do método de obtenção do *scaffold* e da presença de compostos bioativos (IACOB et al., 2018). Chan et al. (2016) reportou neovascularização em *scaffold* de colágeno com porosidade de 74,4 %. Estudo feito por Grover, Cameron e Best (2012) apresentou *scaffolds* de colágeno ou gelatina e elastina com porosidade de 65-75 %. Já Kutlusoy et al. (2017) obteve *scaffolds* de quitosana e ácido hialurônico em diferentes concentrações e reticulados com glutaraldeído com alta porosidade, com valores entre 90-97 %. As amostras obtidas neste estudo apresentaram porosidade entre 64-76 % (Tabela 5), abaixo do obtido por Kutlusoy et al. (2017), mas sendo similar ao observado em Chan et al. (2016) e Grover, Cameron e Best (2012), o que possibilitaria a ocorrência de neovascularização.

Assim como por MEV, foi calculado o tamanho de poro dos *scaffolds* utilizando a micro-CT. Pelos resultados foi visto uma diferença entre os valores de tamanho de poros

obtidos. Isso se deve ao modo de se calcular esses valores, enquanto que para a MEV utiliza-se um *software* em que é necessário fazer as medições manualmente, para a micro-CT o programa provém dados mais precisos e com menor erro nas medidas (PLESSIS et al., 2017). Assim, foi utilizado os valores de tamanho de poro obtidos por micro-CT para comparações.

Grover, Cameron e Best (2012) mostrou também que a adição de elastina em *scaffolds* de colágeno ou gelatina gera uma matriz com tamanho de poro e porosidade diferente na região central e superficial. A amostra apresentou poros de tamanho entre 130-160 μm na região central, enquanto que na superfície o tamanho de poro diminuiu (GROVER; CAMERON; BEST, 2012). No presente estudo os *scaffolds* também apresentaram variação de tamanho de poro em cada região da matriz. Os *scaffolds* C, C3I, C3QJ e Qg tiveram poros maiores na superfície e menor tamanho de poro na região central, oposto ao observado por Grover, Cameron e Best (2012). Já as amostras CJ, C3IJ, C3E, C3EJ, C3Qp, CQg3, CQg3J e QgJ mostraram padrão similar, poros maiores no centro e menores na superfície. Assim, é possível notar que a presença da resina de Jatobá leva à formação de *scaffolds* com poros menores na superfície (como também observado por MEV), mas que aumentam na região central, com exceção da amostra C3QpJ que mostrou padrão inverso (poros menores no centro). Além disso, as amostras obtidas com cartilagem externa (C3E) e gel de quitosana (CQg3) não apresentaram mudança no padrão de tamanho de poro mesmo com a adição da resina (C3EJ e CQg3J), tendo sempre poros maiores na região central.

Os *scaffolds* obtidos com colágeno (C) e colágeno/cartilagem elástica (C3I), quando adicionada a resina de Jatobá tiveram, de modo geral, seu tamanho de poro diminuído. Já para as demais amostras, C3E, C3Qp, CQg3 e Qg a resina levou a um aumento no tamanho de poro. Song et al. (2018) sugeriram que poros entre 20-120 μm de diâmetro é adequado para regeneração dérmica. A amostra Qg apresentou menor tamanho de poro, entre 69-48 μm , enquanto que C3QpJ mostrou poros de maior tamanho, entre 237-259 μm . Sendo assim, os *scaffolds* desenvolvidos neste estudo mostraram tamanho de poro adequado para crescimento de fibroblastos, com exceção de C3QpJ que teve poros muito acima do valor adequado (120 μm), mas que poderia ser indicado para regeneração óssea, uma vez que neste caso é necessário tamanho de poros maiores dentro da faixa de 100-350 μm (DASKALOVA, et al., 2014).

6.3.5 Ensaio de absorção de tampão fosfato salino (PBS)

Além de ter uma morfologia adequada, outra propriedade importante para avaliar a eficácia como material de regeneração de tecidos é a capacidade do *scaffold* em absorver líquido. Essa propriedade é necessária para manter o suprimento adequado de nutrientes para a

adesão e proliferação celular (GROVER; CAMERON; BEST, 2012). Assim, foi feito o teste de absorção de PBS a fim de se determinar o índice de absorção dos *scaffolds*.

A capacidade de absorção de PBS pelos *scaffolds* mostrou valores entre 2344 e 4899 % em relação a massa. Pelos resultados, nota-se que a adição de resina de Jatobá leva à diminuição na capacidade de absorção de PBS (Figura 44, Tabela 6). Isso pode estar relacionado com o caráter hidrofóbico desse composto bioativo e, no caso de CJ e C3I, pode estar relacionado também à diminuição no tamanho de poro (RODRIGUES, 2017).

Figura 44. Curvas de absorção (%) para: (■) C e (□) CJ.

Fonte: Autoria própria

Individualmente, C teve a maior taxa de absorção do que as observadas para as misturas de biopolímeros. Os *scaffolds* obtidos com cartilagem auricular (C3I e C3E) (Figura 45, Tabela 6) apresentaram capacidade de absorção menor quando comparados com C, sugerindo que o tamanho de poro influencia diretamente nessa propriedade, uma vez que a cartilagem auricular levou a obtenção de matrizes com menor tamanho de poro. O uso da cartilagem elástica permitiu uma absorção máxima mais rápida (20 min, 4214 %), entretanto ao adicionar-se a resina de Jatobá esse tempo aumenta e a capacidade diminui (40 min, 3042 %). Já os *scaffolds* com pericôndrio (com ou sem resina) mostraram um mesmo tempo de absorção máxima e sua capacidade de absorção muito próxima, já que o erro para este tipo de experimento é grande.

Em estudo feito por Nocera et al. (2018) foram desenvolvidos *scaffolds* de colágeno de tendão bovino por impressão 3D com tamanhos de poro entre 10 - 500 μm e uma capacidade de absorção de apenas 1437 % após 24 h. Neste estudo, o tempo máximo de absorção ocorreu em 20 minutos, e C apresentou capacidade de absorção de 4899 %. Esse aumento da capacidade

de absorção, apesar de ter poros menores, pode ser devido ao colágeno aniônico, que tem uma maior quantidade de carga negativa facilitando a absorção (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2015).

Figura 45. Curvas de absorção (%) para: (●) C3I, (○) C3IJ, (■) C3E e (□) C3EJ.

Fonte: Autoria própria.

Os *scaffolds* de gel de colágeno/quitosana em pó sem e com resina de Jatobá (Figura 46, Tabela 6) também apresentaram resultados muito próximos, mas com uma menor capacidade de absorção quando comparado à C.

Figura 46. Curvas de absorção (%) para: (■) C3Qp e (□) C3QpJ.

Fonte: Autoria própria.

Para os *scaffolds* de gel de quitosana (Qg e QgJ) (Figura 47, Tabela 6), foi observado que a resina de Jatobá leva a uma diminuição na absorção. Já os *scaffolds* obtidos

6. Resultados e Discussão

com gel de colágeno/gel de quitosana apresentaram uma diminuição na capacidade de absorção quando comparados com aqueles obtidos somente com gel de quitosana (Qg) ou somente com gel de colágeno (C) e valores próximos quando comparados com os *scaffolds* obtidos com a gel de colágeno/quitosana em pó.

Figura 47. Curvas de absorção (%) para: (■) CQg3, (□) CQg3J, (●) Qg e (○) QgJ.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6. Absorção em PBS (%) dos *scaffolds* de colágeno, cartilagem auricular, quitosana em pó e/ou e de gel de quitosana com ou sem resina de Jatobá.

<i>Scaffold</i>	Tempo para Absorção Máxima (min)	% Absorção em 120 min
C	20	4899 ± 589 ^a
CJ	40	4438 ± 558 ^{a,b}
C3I	20	4214 ± 557 ^{a,b}
C3IJ	40	3042 ± 311 ^{c,d}
C3E	40	3703 ± 652 ^{b,c}
C3EJ	40	3917 ± 390 ^b
C3Qp	20	3027 ± 341 ^{c,d}
C3QpJ	20	2707 ± 162 ^d
Qg	3	4352 ± 80 ^{a,b}
QgJ	40	2929 ± 203 ^{c,d}
CQg3	3	2957 ± 244 ^{c,d}
CQg3J	3	2344 ± 85 ^d

Valores com a mesma letra sobrescrita (a-d) não são significativamente diferentes (p<0,05)

Fonte: Autoria própria.

Assim, tanto os *scaffolds* obtidos com quitosana em pó quanto os com gel de quitosana apresentaram uma capacidade de absorção menor do que os *scaffolds* obtidos de gel

de colágeno, indicando que a adição de quitosana ao colágeno leva a diminuição na capacidade de absorção, provavelmente devido à interação que ocorre entre os grupos carboxílicos do colágeno com os grupos aminos da quitosana, tornando o *scaffold* com um conteúdo de carga menor. Apesar dessa diminuição, a capacidade de absorção desses *scaffolds* é superior àquela observada em estudo feito por Tsai et al. (2007), no qual *scaffolds* de quitosana apresentaram uma capacidade de absorção de somente 108 %, enquanto que *scaffolds* de colágeno/quitosana apresentaram capacidade de absorção de 135 %. Assim, embora individualmente os biopolímeros tenham uma maior capacidade de absorção do que a observada para misturas desses materiais os valores encontrados são grandes e pode-se dizer que os *scaffolds* desenvolvidos apresentam as características necessárias para uma possível aplicação na área de regeneração tecidual.

6.3.6 Estabilidade biológica *in vitro* via collagenase

Os ensaios de estabilidade biológica por collagenase foram feitos para que se tenha uma indicação relativa da biodegradabilidade do colágeno no organismo. A degradação do colágeno é controlada por várias enzimas denominadas de collagenases e ocorre em 3 etapas: (1) a difusão da collagenase para o substrato de colágeno; (2) a enzima adsorve sobre a superfície do colágeno e, (3) a degradação propriamente dita. Nesse teste os *scaffolds* C, CJ, C3I, C3IJ, C3E, C3EJ, C3Qp, C3QpJ, CQg3 e CQg3J foram analisados.

Tabela 7. Degradação (%) dos *scaffolds* contendo colágeno após 2 h.

<i>Scaffold</i>	Degradação (%)
C	56,1 ± 1,0
CJ	65,0 ± 0,8
C3I	58,5 ± 3,0
C3IJ	53,0 ± 5,8
C3E	52,6 ± 6,0
C3EJ	46,6 ± 2,5
C3Qp	21,7 ± 3,2
C3QpJ	39,1 ± 1,7
CQg3	4,2 ± 2,1
CQg3J	6,0 ± 1,0

Fonte: Autoria própria.

Pelos resultados obtidos (Tabela 7), é possível observar que a resina de Jatobá aumenta a porcentagem de degradação do colágeno, quando comparamos C à CJ. Já os *scaffolds* obtidos pela mistura de gel de colágeno/cartilagem auricular apresentam taxa de degradações

próximas entre si e ainda similares ao C. Portanto, a presença de cartilagem elástica nesses *scaffolds* não leva à uma mudança no padrão de degradação e, mesmo com a adição da resina não ocorre alteração.

A presença e concentração da quitosana diminuiu drasticamente a taxa de degradação do colágeno (C), sugerindo que a interação do colágeno/quitosana gera um impedimento, possivelmente, estérico nos sítios específicos da enzima, já que as collagenases bacterianas clivam a ligação peptídica entre Gly-X onde X é normalmente um aminoácido neutro, levando a uma diminuição da sua atividade (SIGMA-ALDRICH CO, 2017). A adição da resina influencia na degradação dos *scaffolds* obtidos pela mistura de gel de colágeno/quitosana, seja em pó ou em gel, aumentando a degradação, diferentemente do que o observado para os *scaffolds* de colágeno/cartilagem auricular onde a presença da resina não modifica a degradação.

Estudo feito por Ma et al. (2003), apresentou *scaffolds* de colágeno/quitosana com degradação de 41,5 % de perda no período de 2 h, sendo que a degradação total foi observada após 16 h. Já a degradação total do *scaffold* de colágeno foi observada após 12 h, indicando que a adição de quitosana leva a uma maior resistência a biodegradação frente à collagenase (MA et al., 2003). Esse efeito também foi observado no presente estudo, uma vez que os *scaffolds* obtidos pela mistura de colágeno/quitosana, em pó ou em gel, apresentaram menores porcentagens de degradação quando comparados aos demais. Assim, os *scaffolds* de colágeno/quitosana são mais bioestáveis do que aqueles obtidos somente com colágeno ou pela mistura de colágeno/cartilagem auricular.

6.4 Esterilização

Um passo essencial durante o processo de desenvolvimento de qualquer biomaterial é a esterilização. No campo da engenharia tecidual, um desafio comum é identificar um método de esterilização para os *scaffolds* baseados em biopolímeros que não afete negativamente as propriedades estruturais ou bioquímicas do material. Alguns métodos utilizados para a esterilização de biopolímeros são irradiações ionizantes (por exemplo, radiação- β e radiação- γ) e esterilização a gás por óxido de etileno (DELGADO; FULLER; ZEUGOLIS, 2018).

Neste estudo, as amostras foram esterilizadas por diferentes métodos para selecionar o mais adequado para se utilizar. Os procedimentos utilizados foram: óxido de etileno, radiação ultravioleta e radiação gama (15 e 25 kGy). Após os procedimentos de esterilização, foram feitos MEV e DSC para verificar se ocorreram modificações na morfologia dos *scaffolds* e estrutura química do colágeno.

6.4.1 MEV

Foram feitas fotomicrografias por MEV da superfície das amostras C, CJ, Qg e QgJ após esterilização pelos diferentes métodos. As Figuras 48 a 51 mostram as fotomicrografias de cada amostra após os processos de esterilização por: (A) óxido de etileno, (B) radiação ultravioleta, (C) radiação gama 15 kGy e (D) radiação gama 25 kGy.

Figura 48. Fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds* de colágeno: (A) óxido de etileno, (B) radiação ultravioleta, (C) radiação gama 15 kGy e (D) radiação gama 25 kGy.

Fonte: Autoria própria.

Figura 49. Fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds* de colágeno com resina de Jatobá: (A) óxido de etileno, (B) radiação ultravioleta, (C) radiação gama 15 kGy e (D) radiação gama 25 kGy.

Fonte: Autoria própria.

Figura 50. Fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds* de gel de quitosana: (A) óxido de etileno, (B) radiação ultravioleta, (C) radiação gama 15 kGy e (D) radiação gama 25 kGy.

Fonte: Autoria própria.

Figura 51. Fotomicrografias por MEV da superfície dos *scaffolds* de gel de quitosana com resina de Jatobá: (A) óxido de etileno, (B) radiação ultravioleta, (C) radiação gama 15 kGy e (D) radiação gama 25 kGy.

Fonte: Autoria própria.

Para verificar se ocorreu modificação na morfologia do *scaffold* após os procedimentos de esterilização foi feita a medição do diâmetro médio dos poros (Tabela 8). Pelos resultados obtidos é possível observar que todos os procedimentos de esterilização geram pequena modificação no tamanho de poro. Entretanto, essa mudança não seria suficiente para impedir sua aplicação em engenharia tecidual, uma vez que a variação de tamanho não foi grande e manteve a morfologia básica do *scaffold*.

Tabela 8. Tamanho de poro (μm) dos *scaffolds* de colágeno, elastina e/ou quitosana em pó, com ou sem resina de Jatobá.

SCAFFOLDS	Não esterilizada	Tamanho de poro (μm)			
		Após Óxido de Etileno	Após UV	Após irradiação 15 kGy	Após irradiação 25 kGy
C	82 ± 30	81 ± 23	$100 \pm 23^*$	69 ± 19	74 ± 19
CJ	48 ± 13	$59 \pm 13^*$	48 ± 14	$59 \pm 18^*$	42 ± 13
Qg	61 ± 16	69 ± 16	67 ± 22	68 ± 18	$48 \pm 13^*$
QgJ	46 ± 14	56 ± 16	$59 \pm 15^*$	$64 \pm 15^*$	53 ± 15

* em uma mesma linha amostras esterilizadas significativamente diferentes das não esterilizadas ($p < 0,05$)

Fonte: Autoria própria.

6.4.2 DSC

Foi feito DSC da amostra C esterilizada pelos diferentes métodos para verificar a integridade da hélice tripla. Os valores de Td podem ser observados na Tabela 9 e a partir deles é possível dizer que os procedimentos de esterilização não modificam a estrutura colagênica, com exceção da irradiação gama na dose de 25 kGy que passa a apresentar uma segunda Td devido ao processo de reticulação do colágeno.

Tabela 9. Temperatura de desnaturação (Td, °C) dos *scaffolds* de colágeno antes e depois dos procedimentos de esterilização.

SCAFFOLD	Td₁ (°C)	Td₂ (°C)
C	47,9	
C óxido de etileno	51,7	
C radiação UV	48,5	
C radiação gama 15 kGy	43,2	
C radiação gama 25 kGy	45,0	59,3

Td₁ – Temperatura de desnaturação do colágeno de tendão bovino com tratamento alcalino

Td₂ – Temperatura de desnaturação do colágeno após tratamento com radiação gama 25 kGy

Fonte: Autoria própria.

As técnicas de esterilização podem ser classificadas em quatro categorias: calor, filtração, produtos químicos e onda eletromagnética. As ondas eletromagnéticas, como por exemplo a irradiação UV, são utilizadas como técnicas alternativas de esterilização para materiais sensíveis a efeitos térmicos, sendo que a melhor esterilização com UV é geralmente obtida usando UV-B e UV-C (CHIFFLET et al., 2019). Entretanto, essa onda não é capaz de penetrar profundamente na amostra, à medida que interagem rapidamente com a matéria, limitando a esterilização a superfícies ou materiais transparentes (CHIFFLET et al., 2019).

A irradiação gama foi introduzida como o procedimento mais simples e eficaz de esterilização sem resíduos tóxicos (NOAH et al., 2002). Esse método apresenta alta penetrabilidade, alta eficácia em eliminar microrganismos e pode ser utilizada em material já dentro da embalagem (ALVES et al., 2018). A dose padrão de esterilização por irradiação gama é de 25 kGy, sendo esta dose considerada suficiente para obter um mínimo de 10⁶ níveis de garantia de esterilidade (MAZOR; ZILBERMAN, 2017). Entretanto, atualmente, doses entre 5 e 25 kGy são relatadas como suficientes para esterilizar materiais contendo colágenos (FARAJ et al., 2011). Delgado, Fuller e Zeugolis (2018) mostraram que a irradiação gama não afeta propriedades como a resistência à tração e a citocompatibilidade, características importantes na engenharia de tecidos.

Na indústria de dispositivos médicos é comum o uso de métodos de esterilização baseados em produtos químicos, como óxido de etileno, pois suas baixas temperaturas de processamento e métodos de esterilização não ionizantes minimizam a degradação de *scaffolds* biopoliméricos (GRASMAN et al., 2016). O uso de óxido de etileno apresenta vantagens como alta eficácia, atividade rápida, forte penetrabilidade, adaptabilidade, capacidade de suportar uma carga orgânica, capacidade de monitoramento e custo-benefício (MENDES; BRANDÃO; SILVA, 2007). Entretanto, a toxicidade dos vapores residuais do óxido de etileno continua sendo uma preocupação por seu uso generalizado e qualquer *scaffold* esterilizado por esse método é normalmente aerado por pelo menos 1 dia para remover quaisquer moléculas residuais de óxido de etileno antes da implantação (GRASMAN et al., 2016).

Neste estudo as amostras analisadas não apresentaram mudanças significativas após os procedimentos de esterilização por óxido de etileno, radiação ultravioleta e radiação gama 15 kGy. Somente a esterilização por radiação gama 25 kGy gerou alteração na Td do *scaffold* C, provavelmente devido a processo de reticulação do colágeno (MAZOR; ZILBERMAN, 2017). Estudo feito por Mazor e Zilberman (2017) mostrou que quanto maior a dose de radiação gama utilizada para a esterilização, maior a alteração causada em *scaffolds* de colágeno e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), sendo que doses de 10 kGy não geraram alterações significativas na morfologia, enquanto que doses de 50 kGy ocasionaram a quebra de ligações dos polímeros e colapso da estrutura porosa. Diante disso, como a radiação ultravioleta é limitada para esterilizar superfícies e o uso de óxido de etileno pode ocasionar certa toxicidade no material (CHIFFLET et al., 2019; GRASMAN et al., 2016), foi selecionado o método de esterilização por irradiação gama 15 kGy para ser utilizado nesse estudo e dar continuidade aos testes biológicos.

6.5 Ensaio de citotoxicidade

É sabido que polímeros naturais como o colágeno, a elastina e a quitosana são biomateriais não citotóxicos (BARBOSA et al., 2019; DASKALOVA et al. 2014), sendo apropriado seu uso na engenharia tecidual. Entretanto, o teste de citotoxicidade é indicado mesmo para materiais considerados não citotóxicos, uma vez que o processamento pode levar a formação de resíduos potencialmente tóxicos. Para verificar a toxicidade dos materiais desenvolvidos frente a uma linhagem celular de fibroblastos de camundongo (NIH/3T3) foi utilizado o corante MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio). Este sal é metabolizado por ação de enzimas desidrogenases NAD(P)H-

dependentes de células viáveis a um sal formazan, mudando sua coloração. O índice de viabilidade para cada *scaffold* testado pode ser observado na Figura 52.

Figura 52. Viabilidade celular na linhagem NIH/3T3 para os *scaffolds*, em (■) 24 e (▨) 48 h.

* amostras com viabilidade celular significativamente diferentes do controle celular ($p < 0,05$)

Fonte: Autoria própria.

Na literatura, alguns autores dividem os níveis de citotoxicidade de intenso a não citotóxico. Biomateriais que apresentam viabilidade celular abaixo de 30 % são considerados como tendo um grau intenso de citotoxicidade; aqueles entre 30 % a 60 % são considerados de grau moderado; entre 60 % e 90 % é de grau leve; e viabilidade acima de 90 % é considerado não citotóxico (LÖNROTH; DAHL, 2003; SLETTEN; DAHL, 1999).

O *scaffold* C apresentou viabilidade celular de $108 \pm 5,1$ % em 24 h e $96,5 \pm 1,8$ % em 48 h. Os *scaffolds* de colágeno/cartilagem auricular mostraram viabilidade celular para C3I de $112,8 \pm 5,5$ % em 24 h e $106,8 \pm 4,7$ % em 48 h e para C3E de $106,8 \pm 5,7$ % em 24 h e $100,7 \pm 4,0$ % em 48 h. Já os *scaffolds* de colágeno/quitosana tiveram viabilidade para C3Qp de $108,0 \pm 2,6$ % em 24 h e $102,3 \pm 1,4$ % em 48 h e para CQg3 de $102,5 \pm 5,2$ % em 24 h e $95,8 \pm 1,4$ % em 48 h. Assim, os *scaffolds* desenvolvidos com colágeno, colágeno/cartilagem auricular (elástica ou pericôndrio) e colágeno/quitosana (em pó ou gel) não são citotóxicos, uma vez que os valores obtidos foram acima de 90 % tanto após 24 quanto 48 h. Além disso, no período de 24 h esses *scaffolds* apresentaram valores acima de 100 %, indicando um potencial proliferativo.

Qg se mostrou não citotóxica em 24 h, tendo uma viabilidade celular de $98,6 \pm 6,0 \%$, porém, no período de 48 h apresentou citotoxicidade moderada, com valor de $36,7 \pm 4,8 \%$. A amostra C3IJ apresentou grau leve de citotoxicidade em 24 h com um índice de viabilidade de $85,5 \pm 2,7 \%$, e após 48 h se mostrou citotóxica, tendo seu valor diminuído para $11,6 \pm 2,5 \%$. O mesmo foi observado para CQg3J, o qual mostrou valores de $85,9 \pm 2,4 \%$ em 24 h (grau leve) e de $12,4 \pm 5,5 \%$ em 48 h (citotóxica). Já QgJ apresentou citotoxicidade moderada em 24 h com viabilidade celular de $56,1 \pm 3,3 \%$ e após 48 h se mostrou citotóxica, com $4,0 \pm 1,5 \%$ de viabilidade celular.

Os *scaffolds* CJ, C3EJ e C3QpJ apresentaram grau intenso de citotoxicidade logo em 24 h, tendo valores de viabilidade celular de $12,5 \pm 5,3 \%$, $15,3 \pm 5,0 \%$ e $20,8 \pm 4,1 \%$, respectivamente. E em 48 h esse índice diminuiu para $4,6 \pm 1,5 \%$ (CJ), $4,1 \pm 2,7 \%$ (C3EJ) e $4,7 \pm 0,3 \%$ (C3QpJ).

Nocera et al. (2018) obteve *scaffolds* de colágeno por impressão 3D não citotóxicos com $85,07 \pm 6,73 \%$ de viabilidade celular para células NIH/3T3 após 24 h, de acordo com a ISO 10.993-5, na qual uma viabilidade celular abaixo de 70 % sugere um potencial citotóxico. Em estudo feito por Sadhasivam et al. (2018) foram desenvolvidos *scaffolds* porosos de quitosana e quitosana/poli(EG-ran-PG) em quatro diferentes proporções, os quais não apresentaram citotoxicidade para linhagem de células-tronco mesenquimais e com viabilidade celular acima de 90 % para todas as amostras. Neste presente estudo as amostras contendo colágeno, colágeno/cartilagem auricular (elástica e pericôndrio) e colágeno/quitosana (em pó ou em gel) também não apresentaram citotoxicidade e com viabilidade celular acima de 90 %, maior do que a observada em Nocera et al. (2018). Entretanto, a amostra de quitosana (Qg) se mostrou moderadamente citotóxica após 48 h, diferindo do estudo de Sadhasivam et al. (2018).

Diante desses resultados é possível dizer que a resina de Jatobá na concentração utilizada apresenta potencial citotóxico, já que todas as amostras desenvolvidas com ela mostraram grau intenso de citotoxicidade, algumas já em 24 h, diferentemente do que é citado na literatura (VALE et al., 2013). O *scaffold* desenvolvido somente com quitosana (Qg) também se mostrou contrário ao que é visto na literatura (BARBOSA et al., 2019), pois apresentou certo grau de citotoxicidade em 48 h. Isso pode ter ocorrido pelo processo de neutralização do material não ter sido suficiente para obter um *scaffold* com pH adequado para aplicação biológica, uma vez que as células são sensíveis a pH mais ácidos como o do gel de quitosana.

Independentemente de utilizar a divisão do potencial citotóxico em graus ou de considerar o índice de 70% citado na ISO 10.993-5 as amostras que apresentaram resultados satisfatórios foram: C, C3I, C3E, C3Qp e CQg3. Esses *scaffolds* não apresentaram

citotoxicidade tanto em 24 quanto em 48 h, além de terem uma viabilidade acima de 90 % para os dois períodos analisados. Assim, essas amostras seguiram para os testes de adesão e proliferação celular.

6.6 Adesão e proliferação celular

Para que ocorra crescimento de tecido é necessário que as células possam aderir na superfície do material. Em seguida, as células devem ser capazes de migrar e se proliferar, dando continuidade no processo de formação tecidual. Assim, é necessário que o *scaffold* desenvolvido propicie um ambiente adequado para que ocorra todas essas etapas (HADISI; NOURMOHAMMADI; MOHAMMADI, 2015; PATEL; FISHER, 2008). Para verificar a capacidade de adesão e proliferação de linhagem celular de fibroblastos de camundongo (NIH/3T3) nos *scaffolds* desenvolvidos foi utilizado o corante *Alamar Blue* para observar as células aderidas. A sua ação se baseia na capacidade das células viáveis em reduzir a resazurina, um composto azul e praticamente não fluorescente, à resorufina, um composto vermelho e altamente fluorescente. A Figura 53 mostra a taxa de adesão após 24 h para cada *scaffold*.

Figura 53. Porcentagem de células NIH/3T3 aderidas nos *scaffolds* após 24 h.

Fonte: Autoria própria.

Os *scaffolds* C, C3I e C3E apresentaram alta taxa de adesão celular (acima de 50 %), sendo de 78 %, 89 % e 113 % respectivamente. A adição de cartilagem auricular (cartilagem elástica ou pericôndrio) leva ao aumento na taxa de adesão celular, uma vez que os

scaffolds de colágeno (C) apresentaram valores mais baixos quando comparados com C3I e C3E. Os *scaffolds* com cartilagem auricular apresentaram valores significativamente semelhantes ao controle de células (monocamada) conforme observado na Tabela 10. Já os *scaffolds* desenvolvidas com quitosana apresentaram uma taxa de adesão celular menor, sendo de 40 % para C3Qp e 41 % para CQg3. Isso indica que a quitosana possuem menor capacidade de aderir células do que a cartilagem auricular. Entretanto, todos os *scaffolds* desenvolvidos neste estudo apresentaram taxa de adesão superior ao controle utilizado (colágeno EVA – C EVA) e significativamente diferente (Tabela 10), a qual foi de 26 %. Isso pode ter ocorrido pelo fato do controle ser preparado no momento do teste e com necessidade de ajuste de pH para formação do gel, sendo que qualquer variação nessa medida pode afetar diretamente o crescimento celular (WITZLER et al., 2019).

Conforme mencionado, após permitir a adesão celular, é necessário que ocorra a migração e proliferação das células para que se tenha formação do tecido. Assim, os *scaffolds* também foram analisados quanto a sua capacidade de sustentar o crescimento celular e permitir a proliferação dos fibroblastos. Na Figura 54 é possível observar os resultados de proliferação celular obtidos pelo período de 192 h.

Figura 54. Proliferação de células NIH/3T3 nos *scaffolds* no período de 24, 72, 168 e 192 h. (■) C, (●) C3I, (▲) C3E, (▼) C3Qp, (◆) CQg3 e (◄) C EVA.

Fonte: Autoria própria.

O controle (C EVA) apresentou um perfil de proliferação com uma queda em 72 h, referente a estabilização das células, e posterior aumento, indicando uma tendência a manter esse aumento após 192 h. Todos os *scaffolds* obtidos mostraram intensidade de fluorescência

superior ao C EVA, indicando uma maior capacidade de proliferação. C3I mostra diferença no perfil de proliferação, com uma diminuição na intensidade de fluorescência após 168 h, enquanto C3E estabiliza a proliferação a partir desse período. C3Qp mostra uma alta intensidade de fluorescência em 24 h com queda até 168 h e posterior tendência a aumento a partir de 192 h. Já C e CQg3 apresentaram perfil semelhante ao C EVA, com tendência a aumentar a intensidade de fluorescência após 192h, indicando o aumento da proliferação celular, sendo que CQg3 mostrou valores significativamente semelhantes ao C EVA no tempo de 192 h (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de adesão e proliferação celular no tempo de 192 h para as amostras analisadas e controle de células.

	Adesão (%)	Proliferação 192 h Intensidade de fluorescência (A.U.)
Controle de células	$100 \pm 5^{a,b}$	$2,0 \cdot 10^8 \pm 1,1 \cdot 10^7^{a,b}$
C	78 ± 7^c	$2,3 \cdot 10^8 \pm 3,1 \cdot 10^7^a$
C3I	$89 \pm 3^{b,c}$	$1,8 \cdot 10^8 \pm 2,2 \cdot 10^6^b$
C3E	113 ± 8^a	$1,8 \cdot 10^8 \pm 8,6 \cdot 10^6^b$
C3Qp	40 ± 4^d	$1,1 \cdot 10^8 \pm 1,1 \cdot 10^6^c$
CQg3	41 ± 1^d	$1,3 \cdot 10^8 \pm 6,9 \cdot 10^6^c$
C EVA	26 ± 3^e	$9,0 \cdot 10^7 \pm 1,2 \cdot 10^7^c$

Valores com a mesma letra sobrescrita (a-e) não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Fonte: Autoria própria.

Durante o experimento, foi observado que os *scaffolds* C, C3I e C3E começavam a degradar (perder a sua forma física) a partir de 72 h, sendo que os desenvolvidos com cartilagem auricular perderam a integridade física mais rápido que o de colágeno. Já os *scaffolds* obtidos com quitosana (C3Qp e CQg3) mantiveram sua estrutura física inalterada após as 192 h, estando de acordo com os resultados obtidos no teste de degradação, no qual os *scaffolds* desenvolvidos com quitosana tiveram menores taxas de degradação. Essa perda da estrutura do *scaffold* pode afetar a proliferação celular, uma vez que os *scaffolds* com cartilagem auricular (C3I e C3E) mostraram queda na intensidade de fluorescência após 192 h, quando o *scaffold* já estava bem degradado.

Estudos mostram que a associação de elastina com colágeno leva a uma maior adesão e proliferação celular. Annabi et al. (2011) mostraram que a presença de elastina melhora as propriedades mecânicas do *scaffold* e também promove maior adesão e proliferação de condrócitos. Kinikoglu et al. (2011) mostraram que a presença de elastina-recombinante

aumenta a proliferação e migração de fibroblastos e células epiteliais. Grover, Cameron e Best (2012) também observaram adesão celular em *scaffolds* de colágeno e elastina, os quais mostraram a eficiência desses materiais no crescimento de células humanas de fibrosarcoma. Neste estudo, os *scaffolds* obtidos com cartilagem auricular (C3I e C3E) mostraram uma alta taxa de adesão e a capacidade de proliferação celular, assim como observado nos estudos citados. Entretanto esses *scaffolds* apresentaram processo de degradação da matriz a partir de 72 h, o que prejudicou o crescimento celular a partir desse período.

Na literatura é visto que a associação da quitosana com outros polímeros exibem resultados melhores do que *scaffolds* de quitosana somente. Isso se deve ao fato de que as células, como fibroblastos, aderem fortemente à matriz de quitosana, dificultando a proliferação e inibindo, assim, o crescimento celular (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001). Quando se tem a associação de outros polímeros, as células conseguem aderir de modo adequado para que ocorra todo o processo de crescimento celular. Sadhasivam et al. (2018) mostrou que células-tronco mesenquimais aderem fortemente à filmes de quitosana e de quitosana/poli (EG-ran-PG) na concentração 1:1, sendo que os filmes obtidos pela mistura de polímeros permitiram também o crescimento e a proliferação celular.

Kutlusoy et al. (2017) desenvolveu *scaffolds* a partir de criogéis de quitosana e de quitosana/ácido hialurônico capazes de aderir fibroblastos de camundongo 3T3 e osteossarcoma SAOS-2, entretanto, somente foi possível ocorrer proliferação celular nos *scaffolds* obtidos pela mistura de polímeros. Os autores inferem que os *scaffolds* de quitosana têm essa limitação para as células sobreviverem e as células migrarem para os poros devido a sua estrutura ser mais rígida e os poros mais estreitos do que os *scaffolds* de copolímeros, no qual as células podem migrar facilmente por conta da sua estrutura flexível e aos poros grandes (KUTLUSOY et al., 2017). Já em estudo feito por Del Bakhshayesh et al. (2018) foi obtido *scaffold* de hidroxiapatita/colágeno/quitosana, o qual foi reticulado por quatro métodos, sendo eles glutaraldeído (GTA), tratamento desidrotérmico (DTH), irradiação e metacrilato de 2-hidroxietil (HEMA). Foi observado que as amostras reticuladas por irradiação e DHT possibilitaram a adesão e a proliferação de células-tronco mesenquimais derivadas de líquido amniótico (DEL BAKHSHAYESH et al., 2018). No presente estudo os *scaffolds* desenvolvidos pela mistura de colágeno e quitosana (em pó ou em gel) mostraram capacidade de aderir e proliferar fibroblastos de camundongo (NIH/3T3) assim como demais estudos citados.

O uso de polímeros presentes na MEC, como o colágeno e a elastina, ou que se assemelham a eles, como a quitosana, no desenvolvimento de *scaffolds* é interessante devido a sua influência na atividade celular, estimulando a adesão e proliferação (DASKALOVA, et al.,

2014; LEE; YEO; WEISS, 2017; TIWARI; PATIL; BAHADUR, 2019). Os *scaffolds* desenvolvidos neste trabalho apresentaram bons resultados quanto a adesão e proliferação celular, uma vez que todas as amostras permitiram o crescimento de fibroblastos. Entretanto, os *scaffolds* obtidos com colágeno e colágeno/cartilagem auricular (C, C3I e C3E) sofreram processo de degradação a partir de 72 h, o que pode dificultar o crescimento das células. Assim, as amostras preparadas com quitosana (C3Qp e CQg3) foram as que se destacaram nestes testes, pois além de permitir a adesão e proliferação celular também mostraram capacidade de manter sua estrutura física por tempo necessário para que o processo de crescimento celular ocorra de modo adequado.

6.7 Ensaio histológico

O ensaio histológico foi feito para verificar a presença de células nos *scaffolds* após a adesão e proliferação celular. Para isso, foram feitas análises dos *scaffolds* C3Qp e CQg3 sem a presença de células e período de 24 h para comparação (Figura 55) e ainda desses mesmos *scaffolds* no período de 24 h e 168 h após semeadura das células (Figura 56 e 57). Os *scaffolds* obtidos somente com colágeno e com colágeno/cartilagem auricular, conforme citado no item 6.6, não mantiveram sua estrutura física íntegra, não sendo possível fazer a análise histológica dos mesmos.

Figura 55. Imagem de corte histológico de: (A) C3Qp e (B) CQg3, após 24 h sem a presença de células. Tamanho de 50 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Figura 56. Imagem de corte histológico C3Qp: (A) 24 h 50 μm , (A') 24 h 20 μm , (B) 168 h 50 μm e (B') 168 h 20 μm .

Fonte: Autoria própria.

Figura 57. Imagem de corte histológico CQg3: (A) 24 h 50 μ m, (A') 24 h 20 μ m, (B) 168 h 50 μ m e (B') 168 h 20 μ m..

Fonte: Autoria própria.

Pelos resultados obtidos é possível observar que ocorreu a adesão e proliferação celular em ambas as amostras (Figura 56 e 57), quando comparadas com o *scaffold* sem a presença de células (Figura 55). C3Qp apresentou células em menor quantidade em 24 h localizadas na extremidade do *scaffold* (Figura 56 A). No período de 168 h (Figura 56 B) essa quantidade é maior, mas continua concentrada em uma única região. Isso pode ter ocorrido por conta da sua morfologia, a qual apresentou poros de tamanhos muito variados (71 μ m na superfície à 289 μ m na base) e superior ao indicado para fibroblastos como pode ser observado na Figura 38 por micro-CT.

Em CQg3 as células já em 24 h estão localizadas em regiões mais internas do *scaffold* (Figura 57 A), sendo que no período de 168 h é possível observar grande quantidade de célula pelo *scaffold* (Figura 57 B). Como observado na Figura 40 por micro-CT, o *scaffold* apresentou uma distribuição de poros mais homogênea, sendo que tanto a extremidade quanto a região central apresentam poros de mesmo tamanho. Diante disso, é possível dizer que CQg3 se mostrou mais eficiente quanto a adesão e proliferação celular, pois permitiu que os fibroblastos adentrassem na matriz polimérica e utilizassem todo o espaço do *scaffold*.

Zhu et al. (2009) desenvolveu *scaffolds* tubulares de colágeno tipo-humano (HLC, produzidos por *E. coli* recombinante) e HCL/quitosana que podem suportar a adesão de fibroblastos venosos humanos, bem como sua proliferação. Os autores mostraram que em 15 dias de cultivo os fibroblastos venosos humanos formaram uma camada densa na amostra HCL/quitosana (ZHU et al., 2009). No presente estudo, foi observado que em 7 dias o *scaffold* de gel de colágeno/quitosana em gel (CQg3) foi capaz de sustentar o crescimento de fibroblastos, assim como observado em Zhu et al. (2009).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico com grupos N-acetil-glucosamina semelhantes aos glicosaminoglicanos. Isso pode influenciar várias propriedades essenciais para o crescimento tecidual, como interações específicas com fatores de crescimento, receptores e proteínas de adesão. Já o colágeno é uma proteína estrutural que está presente na MEC. Assim, *scaffolds* desenvolvidos pela mistura desses polímeros apresentam boa função de adesão celular, como observado nos resultados obtidos neste estudo (adesão de 40 % em 24 h e capacidade de proliferar fibroblastos).

O *scaffold* CQg3 se destacou devido sua morfologia ser mais adequada para o crescimento de fibroblastos, pois seus poros apresentaram tamanho entre 50-123 μm , estando na faixa ideal (20-120 μm) para crescimento desse tipo de célula (SONG et al. 2018). Já C3Qp apresentou poros de maior tamanho, entre 70-289 μm , sendo mais indicado para o crescimento de osteoblastos, os quais necessitam de poros com tamanho de 100-350 μm (DASKALOVA et al., 2014). Assim, os *scaffolds* obtidos podem ser aplicadas na regeneração tecidual, sendo que CQg3 apresentou resultados mais promissores para regeneração dérmica, enquanto que C3Qp poderia ser utilizado para regeneração óssea.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter *scaffolds* de colágeno/cartilagem auricular (cartilagem elástica ou pericôndrio) e colágeno/quitosana (em pó ou em gel) em diferentes proporções, com adição ou não de resina de Jatobá, os quais apresentaram características físico-químicas semelhantes às dos materiais de partida.

Os *scaffolds* de colágeno, colágeno/cartilagem auricular (cartilagem elástica ou pericôndrio) e colágeno/quitosana em pó na proporção 3:1, com ou sem adição de resina de Jatobá mostraram tamanho de poro, interconectividade e porosidade adequados para possível crescimento celular. Da mesma forma, os *scaffolds* obtidos com gel de quitosana e colágeno/gel de quitosana (1:3), com ou sem resina de Jatobá apresentaram as características desejadas para essa aplicação.

Todos os *scaffolds* selecionados apresentaram grande capacidade de absorção, sendo esta uma propriedade essencial para o fornecimento de nutrientes para as áreas mais profundas. Além disso, os *scaffolds* obtidos pela mistura de gel de colágeno e quitosana (em pó ou em gel) mostraram ser bioestáveis frente à ação da collagenase, o que possibilitaria maior tempo de permanência no organismo e com isso permitiria a adesão e migração celular.

O uso de radiação gama na dose de 15 kGy se mostrou adequado para processo de esterilização dos *scaffolds*, uma vez que não alterou as características físico-químicas dos *scaffolds*.

Os *scaffolds* desenvolvidos com resina de Jatobá se mostraram citotóxicos, assim como a amostra obtida com gel de quitosana 1 %. Já as amostras C, C3I, C3E, C3Qp e CQg3, além de não apresentarem citotoxicidade para células NIH/3T3 mostraram também boa taxa de adesão e proliferação celular, sendo que os *scaffolds* obtidos pela mistura de colágeno e quitosana (em pó ou gel) se destacaram.

No teste de histologia foi possível observar que a amostra CQg3 dentre as testadas é a mais indicada para crescimento de fibroblastos, já que o processo de adesão, migração e proliferação celular ocorreu de modo mais eficiente. Enquanto que C3Qp poderia ser estudada para crescimento de tecido ósseo devido sua morfologia.

REFERÊNCIAS

ABDULGHANI, S.; MITCHELL, G.R. Biomaterials for *In Situ* Tissue Regeneration: A Review. **Biomolecules**, v.9, n.750, 2019.

ALVES, A.P.N.N.; JÚNIOR, E.M.L.; PICCOLO, N.S.; MIRANDA, M.J.B.; VERDE, M.E.Q.L.; JÚNIOR, A.E.C.F.; SILVA, P.G.B.; FEITOSA, V.P.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MATHOR, M.B.; MORAES, M.O. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. **Cell and Tissue Banking**, v.19, p.373-382, 2018.

AMADO, S.; SIMÕES, M.J.; da SILVA, P.A.S.A.; LUÍS, A.L.; SHIROSAKI, Y.; LOPES, M.A.; SANTOS, J.D.; FREGNAN, F.; GAMBAROTTA, G.; RAIMONDO, S.; FORNARO, M.; VELOSO, A.P.; VAREJÃO, A.S.P.; MAURÍCIO, A.C.; GEUNA, S. Use of hybrid chitosan membranes and N1E-115 cells for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model. **Biomaterials**, v.29, n.33, p.4409-4419, 2008.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Cell lines**. Disponível em: <<http://www.atcc.org>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

ANNABI, N.; FATHI, A.; MITHIEUX, S.M.; MARTENS, P.; WEISS, A.S.; DEHGHANI, F. The effect of elastin on chondrocyte adhesion and proliferation on poly (ε-caprolactone)/elastin composite. **Biomaterials**, v.32, p.1517-1525, 2011.

ASHWORTH, J.C.; BEST, S.M.; CAMERON, R.E. Quantitative architectural description of tissue engineering scaffolds. **Materials Technology**, v.29, n.5, p.281-295, 2014.

BARBOSA, A.I.; COUTINHO, A.J.; LIMA, S.A.C.; REIS, S. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: Fucoidan and Chitosan as Key Players in the Drug Delivery Match Field. **Marine Drugs**, v.17, n.654, 2019.

BATISTA, T.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Thermal behavior of *in vitro* mineralized anionic collagen matrices. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.95, n.3, p.945-949, 2009.

BELLUCCI, D.; SALVATORI, R.; GIANNATTEMPO, J.; ANESI, A.; BORTOLINI, S.; CANNILLO, V. A New Bioactive Glass/Collagen Hybrid Composite for Applications in Dentistry. **Materials**, v.12, p.2079, 2019.

BERTOLDI, S.; FARÈ, S.; TANZI, M.C. Assessment of scaffold porosity: the new route of micro-ct. **Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics**, v.9, n.3, p.165-175, 2011.

BERTOLO, M.R.V.; MARTINS, V.C.A.; HORN, M.M.; BRENELLI, L.B.; PLEPIS, A.M.G. Rheological and antioxidant properties of chitosan/gelatin-based materials functionalized by pomegranate peel extract. **Carbohydrate Polymers**, v.228, n.115386, 2020.

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

- BOEKEMA, B.K.H.L.; VLIET, M.; DAMINK, L.O.; MIDDELKOOP, E.; EUMMELEN, L.; BÜHREN, A.V.; ULRICH, M.M.W. Effect of pore size and cross-linking of a novel collagen-elastin dermal substitute on wound healing. **Journal Materials Science: Materials in Medicine**, v.25, p.423-433, 2014.
- BOF, M.J.; BORDAGARAY, V.C.; LOCASO, D.E.; GARCÍA, M.A. Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. **Food Hydrocolloids**, v.51, p.281-294, 2015.
- BUCHAIM, R.L.; GOISSIS, G.; ANDREO, J.C.; ROQUE, D.D.; ROQUE, J.S.; BUCHAIM, D.V.; RODRIGUES, A.C. Biocompatibility of anionic collagen matrices and its influence on the orientation of cellular growth. **Brazilian Dental Science**, v.10, n.3, p.12-20, 2007.
- CAMPANA-FILHO, S.P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estruturas e propriedades de α e β -quitina. **Química Nova**, v.30, n.3, p.644-650, 2007.
- CAMPBELL, J.J.; HUSMANN, A.; HUME, R.D.; WATSON, C.J.; CAMERON, R.E. Development of three-dimensional collagen scaffolds with controlled architecture for cell migration studies using breast cancer cell lines. **Biomaterials**, v.114, p.34-43, 2017.
- CHAN, E.C.; KUO, S.M.; KONG, A.M.; MORRISON, W.A.; DUSTING, G.J.; MITCHELL, G.M.; LIM, S.Y.; LIU, G.S. Three Dimensional Collagen Scaffold Promotes Intrinsic Vascularisation for Tissue Engineering Applications. **PLoS ONE**, v.11, n.2, p.e0149799, 2016.
- CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v.22, n.3, p.261-268, 2001.
- CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R.T. Review Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing. **Biopolymers**, v.101, n.8, p.821-833, 2014.
- CHAVES, E.F.M.; BARROS, R.F.M. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.3, p.476-486, 2012.
- CHEHELTANI, R.; MCGOVERIN, C.M.; RAO, J.; VORP, D.A.; KIANI, M.F.; PLESHKO, N. P. Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Quantify Collagen and Elastin in an *In Vitro* Model of Extracellular Matrix Degradation in Aorta. **Analyst**, v.139, n.12, p.3039-3047, 2014.
- CHEN, Z.; MO, X.; QING, F. Electrospinning of collagen-chitosan complex. **Materials Letters**, v.61, p.3490-3494, 2007.
- CHENG, C.W.; SOLORIO, L.D.; ALSBERG, E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v.32, p.462-484, 2014.

- CHIFFLET, S.; QUÉMÉNEUR, M.; BARANI, A.; ANGELETTI, B.; DIDRY, M.; GRÉGORI, G.; PRADEL, N. Impact of sterilization methods on dissolved trace metals concentrations in complex natural samples: Optimization of UV irradiation. **MethodsX**, v.6, p.1133-1146, 2019.
- CHIU, L.L.Y.; GIARDINI-ROSA, R.; WEBER, J.F.; CUSHING, S.L.; WALDMAN, S.D. Comparisons of Auricular Cartilage Tissues from Different Species. **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**, v.126, n.12, p.819-828, 2017.
- COPEES, F.; PIEN, N.; van VLIERBERGHE, S.; BOCCAFOSCHI, F.; MANTOVANI, D. Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.7, n.166, 2019.
- COSTA, M.C.M.F.; SILVA, A.G.; SILVA, A.P.S.; LIMA, V.L.M; BEZERRA-SILVA, P.C.; ROCHA, S.K.L.; NAVARRO, D.M.A.F.; CORREIA, M.T.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SILVA, M.V.; PAIVA, P.M.G. Essential Oils from Leaves of Medicinal Plants of Brazilian Flora: Chemical Composition and Activity against *Candida* Species. **Medicines**, v.4, n.27; 2017.
- COSTA-ALMEIDA, R.; SOARES, R.; GRANJA, P.L. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.12, n.1, p.240-251, 2017.
- CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H. Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in the trunk resin of Amazonian *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v.13, n.1, p.294-295, 1974.
- DAAMEN, W. **Elastin as a biomaterial for tissue engineering**. 2006. 154f. Tese (Doutorado) – Nijmegen Medical Centre, Radboud University, The Netherlands, 2006.
- DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. Chitosan - a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v.36, p.981-1014, 2011.
- DASKALOVA, A.; NATHALA, C.S.R.; BLIZNAKOVA, I.; STOYANOVA, E.; ZHELYAZKOVA, A.; GANZ, T.; LUEFTENEGGER, S.; HUSINSKY, W. Controlling the porosity of collagen, gelatin and elastin biomaterials by ultrashort laser pulses. **Applied Surface Science**, v.292, p.367-377, 2014.
- DEL BAKHSHAYESH, A.R.; MOSTAFAVI, E.; ALIZADEH, E.; ASADI, N.; AKBARZADEH, A.; DAVARAN, S. Fabrication of Three-Dimensional Scaffolds Based on Nanobiomimetic Collagen Hybrid Constructs for Skin Tissue Engineering. **ACS Omega**, v.3, p.8605-8611, 2018.
- DELGADO, L.M.; FULLER, K.; ZEUGOLIS, D.I. Influence of Cross-Linking Method and Disinfection/Sterilization Treatment on the Structural, Biophysical, Biochemical, and Biological Properties of Collagen-Based Devices. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v.4, p.2739-2747, 2018.

DUNPHY, S.E.; BRATT, J.A.; AKRAM, K.M.; FORSYTH, N.R.; EL HAN, A.J. Hydrogels for lung tissue engineering: biomechanical properties of thin collagen-elastin constructs. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomededical Matererials**, v.38, p.251-259, 2014.

EBRAHIMI, M.; ASIRI, A.M.; MOHAMMAD, A. **Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics**. 1ª ed. Cambridge, Woodhead Publishing, 2018, 328p.

FARAJ, K.A.; BROUWER, K.M.; GEUTJES, P.J.; VERSTEEG, E.M.; WISMANS, R.G.; DEPREST, J.A.; CHAJRA, H.; TIEMESSEN, D.M.; FEITZ, W.F.J.; OOSTERWIJK, E.; DAAMEN, W.F.; VAN KUPPEVELT, T.H. The Effect of Ethylene Oxide Sterilisation, Beta Irradiation and Gamma Irradiation on Collagen Fibril-Based Scaffolds. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.8, n.5, p460-470, 2011.

FERNÁNDEZ-COLINO, A.; WOLF, F.; RÜTTEN, S.; SCHMITZ-RODE, T.; RODRÍGUEZ-CABELLO, J.C.; JOCKENHOEVEL, S.; MELA, P. Small Caliber Compliant Vascular Grafts Based on Elastin-Like Recombinamers for *in situ* Tissue Engineering. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.7, n.340, 2019.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications**. 6ª ed. Wiley BlackWell, Nova Iorque, 2010, 796p.

GACKO, M. Elastin: structure, properties and metabolism. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.5, p.327-348, 2000.

GARCIA, C. F. **Desenvolvimento de matrizes de colágeno/nanohidroxiapatita contendo extratos vegetais para regeneração óssea**. 2020. 87f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

GIRÓN, N.; TRAVÉS, P.G.; RODRÍGUEZ, B.; LÓPEZ-FONTAL, R.; BOSCA, L.; HORTELANO, S.; HERAS, B. Supression of inflammatory responses by labdane-type diterpenoids. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.228, n.2, p.179-189, 2008.
GOISSIS, G. et al. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. **Artificial Organs**, v.24, n.3, p.217-223, 2000.

GRASMAN, J.M.; O'BRIEN, M.P.; ACKERMAN, K.; GAGNON, K.A.; WONG, G.M.; PINS, G.D. The effect of sterilization methods on the structural and chemical properties of fibrin microthread scaffolds. **Macromolecular Bioscience**, v.16, n.6, p.836-846, 2016.

GROVER, C.N.; CAMERON, R.E; BEST, S.M. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of *scaffolds* comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v.10, p.62-74, 2012.

HADISI, Z.; NOURMOHAMMADI, J.; MOHAMMADI, J. Composite of porous starch-silk fibroin nanofiber-calcium phosphate for bone regeneration. **Ceramics International**, v.41, p.10745-10754, 2015.

- HARRIS, J.P.; BURRELL, J.C.; STRUZYN, L.A.; CHEN, H.I.; SERRUYA, M.D.; WOLF, J.A.; DUDA, J.E.; CULLEN, D.K. Emerging regenerative medicine and tissue engineering strategies for Parkinson's disease. **NPJ Parkinson's Disease**, v.6, n.4, 2020.
- HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; FERNANDES, Y.O.M.; VULCANI, V.A.S.; PLEPIS, A.M.G. Development and characterization of collagen/gelatin films and gels incorporated with pequi oil. **Journal of Applied Polymer Science**, 2018.
- HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Influence of collagen addition on the thermal and morphological properties of chitosan/xanthan hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.80, p.225-230, 2015.
- HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v.77, n.2, p.239-243, 2009.
- HOSSEINI, V.; MAROUF, N.F.; SAGHATI, S.; ASADI, N.; DARABI, M.; AHMAD, S.N.S.; HOSSEINKHANI, H.; RAHBARGHAZ, R. Current progress in hepatic tissue regeneration by tissue engineering. *Journal of Translational Medicine*, v.17, n.383, 2019.
- IACOB, A-T; DRĂGAN, M.; GHETU, N.; PIEPTU, D.; VASILE, C.; BURON, F.; ROUTIER, S.; GIUSCA, S.E.; CARUNTU, I-D.; PROFIRE, L. Preparation, Characterization and Wound Healing Effects of New Membranes Based on Chitosan, Hyaluronic Acid and Arginine Derivatives. **Polymers**, v.10, n.607, 2018.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-12**: biological evaluation of medical devices – part 12: sample preparation and reference materials. Genebra, 2012.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5**: biological evaluation of medical devices – part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity. Genebra, 2009.
- JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P.T. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v.29, p.322-337, 2011.
- JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** - Texto & Atlas. 13ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2017, 538p.
- KAKKAR, P.; VERMA, S.; MAJUBALA, I.; MADHAN, B. Development of keratin–chitosan–gelatin composite *scaffold* for soft tissue engineering. **Materials Science and Engineering**, v.45, p.343-347, 2014.
- KANNICHT, C. **Post-translational modification of proteins**: tools for functional proteomics. 3ª ed. Humana Press, Heidelberg, 2019.
- KANNU, P.; BATEMAN, J.; SAVARIRAYAN, R. Clinical phenotypes associated with type II collagen mutations. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v.48, n.3, p.38-43, 2012.

KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v.26, p.5474-5491, 2005.

KARSDAL, M.A. **Biochemistry of Collagens, Laminins, and Elastin: Structure, Function, and Biomarkers**. Elsevier Academic Press, London, 2016, 238p.

KAUL, H.; VENTIKOS, Y. On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine. **Tissue Engineering: Part B**, v.21, n.2, p.203-217, 2015.

KAZIMIERCZAK, P.; BENKO, A.; NOCUN, M.; PRZEKORA, A. Novel chitosan/agarose/hydroxyapatite nanocomposite scaffold for bone tissue engineering applications: comprehensive evaluation of biocompatibility and osteoinductivity with the use of osteoblasts and mesenchymal stem cells. **International Journal of Nanomedicine**, v.14, p.6615-6630, 2019.

KECK, M.; HALUZA, D.; BURJAK, S.; EISENBOCK, B.; KAMOLZ, L.-P.; FREY, M. Cultivation of keratinocytes and preadipocytes on a collagen-elastin *scaffold* (Matriderm®): First results of an *in vitro* study. **European Surgery**, v.41, n.4, p.189-193, 2009.

KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. A decade of progress in tissue engineering, **Nature Protocols**, v.11, p.1775-1781, 2016.

KINIKOGLU, B.; RODRÍGUEZ-CABELLO, J.C.; DAMOUR, O.; HASIRCI, V. A smart bilayer scaffold of elastin-like recombinamer and collagen for soft tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.22, p.1541-1554, 2011.

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v.324, p.268-274, 2000.

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYNSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v.8, p.1567-1636, 2010.

KURITA, K.; TOMITA, K.; TADA, T.; ISHII, S.; NISHIMURA, S.; SHIMODA, K. Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. **Journal of Polymer Science: Part A Polymer Chemistry**, v.31, p.485-491, 1993.

KUTLUSOY, T.; OKTAY, B.; APOHAN, N.K.; SÜLEYMANOĞLU, M.; KURUCA, S.E. Chitosan-co-Hyaluronic Acid Porous Cryogels and Their Application in Tissue Engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.103, p.366-378, 2017.

LAGUS, H.; SARLOMO-RIKALA, M.; BÖHLING, T.; VUOLA, J. Prospective study on burns treated with Integra®, a cellulose sponge and split thickness skin graft: comparative clinical and histological study--randomized controlled trial. **Burns**, v.39, n.8, p.1577-1587, 2013.

- LAMARQUE, G.; CRETENET, M.; VITON, C.; DOMARD, A. New route of deacetylation of α - and β -chitins by means of freeze–pump out–thaw cycles. **Biomacromolecules**, v.6, p.1380-1388, 2005.
- LANGENHEIM, J. H.; STUBBLEBINE, W.H.; LINCOLN, D.E.; FOSTER, C.E. Implications of variation in resin composition among organs, tissues and populations in the tropical legume *Hymenaea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.6, n.4, p.299-313, 1978.
- LANGER, R., VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v.260, p.920-926, 1993.
- LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQUI, A.N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; BUSCHMANN, M.D.; GUPTA, A. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32, n.6, p.1149-1158, 2003.
- LECARPENTIER, Y.; KINDLER, V.; BOCHATON-PIALLAT, M-L.; SAKIC, A.; CLAES, V.; HÉBERT, J-L.; VALLÉE, A.; SCHUSSLER, O. Tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD) modifies the molecular mechanical properties of the nonmuscle myosin IIA in human bone marrowderived myofibroblasts seeded in a collagen scaffold. **PLoS ONE**, v.14, n.10, p.e0222683, 2019.
- LEE, P.; YEO, G.C.; WEISS, A.S. A cell adhesive peptide from tropoelastin promotes sequential cell attachment and spreading via distinct receptors. **The FEBS Journal**, v.284, p.2216-2230, 2017.
- LÖNROTH, E.C.; DAHL, S.E. Citotoxicity of liquidas and powers of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazoldiphenyl tetrazolium and neutral red tests. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.61, n.1, p.52-56, 2003.
- MA, L.; GAO, C.; MAO, Z.; ZHOU, J.; SHEN, J.; HU, X.; HAN, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v.24, p.4833-4841, 2003.
- MARANGON, C.A.; MARTINS, V.C.A.; LEITE, P.M.F.; SANTOS, D.A.; NITSCHKE, M.; PLEPIS, A.M.G. Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, v.99, p.163-171, 2017.
- MAZOR, E.; ZILBERMAN, M. Effect of gamma-irradiation sterilization on the physical and mechanical properties of a hybrid wound dressing. **Polymers for Advanced Technologies**, v.28, p.41-52, 2017.
- MENDES, G.C.C.; BRANDÃO, T.R.S.; SILVA, C.L.M. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. **American Journal of Infection Control**, v. 35, n.9, p.574-581, 2007.

- MINARDI, S.; TARABALLI, F.; WANG, X.; CABRERA, F.J.; VAN EPS, J.L.; ROBBINS, A.B.; SANDRI, M.; MORENO, M.R.; WEINER, B.K.; TASCIOTTI, E. Biomimetic collagen/elastin meshes for ventral hernia repair in a rat model. **Acta Biomaterialia**, v.50, p.165-177, 2017.
- MITHIEUX, S.M.; WEISS, A.S. Design of an elastin-layered dermal regeneration template. **Acta Biomaterialia**, v.52, p.33-40, 2017.
- MIZUTANI, N.; KAGEYAMA, S.; YAMADA, M.; HASEGAWA, M.; MIYAMOTO, K.; HORIUCHI, T. The behavior of ligament cells cultured on elastin and collagen *scaffolds*. **Journal of Artificial Organs**, v.17, p.50-59, 2014.
- MUNHOZ, M.A.S.; HIRATA, H.H.; PLEPIS, A.M.G.; MARTINS, V.C.A.; CUNHA, M.R. Use of collagen/chitosan sponges mineralized with hydroxyapatite for the repair of cranial defects in rats. **Injury**, v.49, p.2154-2160, 2018.
- NAIR, R.; SEVUKARAJAN, M.; BADIVADDIN, T.M.; KUMAR, C.K.A. Collagen based drug delivery systems: a review. **Journal of Trends Pharmaceutical Science**, v.1, p.288-304, 2010.
- NAM, S.; CHO, W.; CHO, H.; LEE, J.; LEE, E.; SON, Y. Xiphoid process-derived chondrocytes: A novel cell source for elastic cartilage regeneration. **Stem Cell Translational Med**, v.3, p.1381-1391, 2014.
- NASCIMENTO, D. L. **Preparo e caracterização de biomateriais de colágeno e gelatina com adição de resina de Jatobá**. 2016. 50f. Monografia (Bacharelado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- NATARAJAN, J.; SANAPALLI, B.K.R.; BANO, M.; SINGH, S.K.; GULATI, M.; KARRI, V.V.S.R. Nanostructured Lipid Carriers of Pioglitazone Loaded Collagen/Chitosan Composite Scaffold for Diabetic Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v.8, n.10, 2019.
- NIMESKERN, L.; UTOMO, L.; LEHTOVIITA, I.; FESSEL, G.; SNEDEKER, J.G.; van OSCH, G.J.V.M.; MÜLLER, R.; STOK, K.S. Tissue composition regulates distinct viscoelastic responses in auricular and articular cartilage. **Journal of Biomechanics**, v.49, p.344-352, 2016.
- NOAH, E.M.; CHEN, J.; JIAO, X.; HESCHEL, I.; PALLUA, N. Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen sponges prepared for tissue engineering. **Biomaterials**, v.23, p.2855-2861, 2002.
- NOCERA, A.D.; COMÍN, R.; SALVATIERRA, N.A.; CID, M.P. Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering. **Biomedical Microdevices**, v.20, p.26, 2018.
- NWE, N.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. The mechanical and biological properties of chitosan *scaffolds* for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*. **Materials**, v.2., p.374-398, 2009.

- PATEL, M.; FISHER, J.P. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. **Pediatric Research**, v.63, n.5, p.497-501, 2008.
- PEREDA, M.; PONCE, A.G.; MARCOVICH, N.E.; RUSECKAITE, R.A.; MARTUCCI, J.F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v.25, n.5, p.1372-1381, 2011.
- PINA, S.; RIBEIRO, V.P.; MARQUES, C.F.; MAIA, F.R.; SILVA, T.H.; REIS, R.L.; OLIVEIRA, J.M. Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Materials**, v.12, p.1824, 2019.
- PLESSIS, A.; BROECKHOVEN, C.; GUELPA, A.; LE ROUX, S.G. Laboratory x-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples. **GigaScience**, v.6, p.1-11, 2017.
- RASQUINI, L.A.B.; MARTINS, V.C.A.; HORN, M.M.; PLEPIS, A.M.G. **Diferentes formas de incorporação e estudo de liberação *in vitro* de ciprofloxacina em scaffolds quitosana/HA/resina de Jatobá**. In: 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO e 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - OBI, Maresias, SP, Brasil, 2017, p.321-326.
- RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine**. 2ª ed. Elsevier Academic Press, New York, 2004, 879p.
- RIAZ, T.; ZEESHAN, R.; ZARIF, F.; ILYAS, K.; MUHAMMAD, N.; SAFI, S.Z.; RAHIM, A.; RIZVI, S.A.A.; REHMAN, I.U. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.53, n.9, p.703-746, 2018.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, p.603-632, 2006.
- ROCHA, L. S.; GONÇALVES, D.A.; ARAKAKI, D.G.; TSCHINKEL, P.F.S.; LIMA, N.V.; OLIVEIRA, L.C.S.; GUIMARÃES, R.C.A.; NASCIMENTO, V.A. Data on elemental composition of the medicinal plant *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá). **Data in Brief**, p.959-964, 2018.
- RODRIGUES, M.A.V. **Biomateriais de quitosana/gelatina com resina de jatobá: influência do grau de acetilação da quitosana e da inclusão da resina**. 2017. 87f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M.; VEGA-RUIZ, B.; RAMOS-ZÚÑIGA, R.; SALDAÑA-KOPPEL, D.A.; QUIÑONES-OLVERA, L.F. Chitosan and Its Potential Use as a *Scaffold* for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. **BioMed Research International**, v.2015, n.821279, 15 pages, 2015.

ROUQUEROL, J.; BARON, G.; DENOYEL, R.; GIESCHE, H.; GROEN, J.; KLOBES, P.; LEVITZ, P.; NEIMARK, A.V.; RIGBY, S.; SKUDAS, R.; SING, K.; THOMMES, M.; UNGER, K. Recommendation for the characterization of porous solids. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v.66, p.1739-1758, 1994.

SADEGHI, A.; MOZTARZADEH, F.; MOHANDESI, J.A. Investigating the effect of chitosan on hydrophilicity and bioactivity of conductive electrospun composite scaffold for neural tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.121, p.625-632, 2019.

SADHASIVAM, B.; RAVISHANKAR, K.; DESINGH, R.; SUBRAMANIAM, R.; DHAMODHARAN, R. Biocompatible Porous Scaffolds of Chitosan/Poly(EG-ran-PG) Blends with Tailored Pore Size and Nontoxic to Mesenchymal Stem Cells: Preparation by Controlled Evaporation from Aqueous Acetic Acid Solution. **ACS Omega**, v.3, p.10286-10295, 2018.

SAKATA, R.; IWAKURA, T.; REDDI, A.H. Regeneration of articular cartilage surface: morphogens, cells, and extracellular matrix *scaffolds*. **Tissue Engineering: Part B**, v.21, n.5, p.461-473, 2015.

SANDRI, G.; MIELE, D.; FACCENDINI, A.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; GRISOLI, P.; TAGLIETTI, A.; RUGGERI, M.; BRUNI, G.; VIGANI, B.; FERRARI, F. Chitosan/Glycosaminoglycan Scaffolds: The Role of Silver Nanoparticles to Control Microbial Infections in Wound Healing. **Polymers**, v.11, n.1207, 2019.

SIGMA-ALDRICH CO. Collagenase from *Clostridium histolyticum*. Product Information.USA, 2017.

SILVA, M.S.; LEITE, K.R.B.; SABA, M.D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (*Caesalpinioideae-Fabaceae*): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.4, p.673-679, 2012.

SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C.; WESS, T. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v.25, p.795-801, 2006.

SLETTEN, G.B.; DAHL, J.E. Cytotoxicity effects of extracts of compomers. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.57, n.6, p.316-322, 1999.

SONG, P.; ZHOU, C.; FAN, H.; ZHANG, B.; PEI, X.; FAN, Y.; JIANG, Q.; BAO, R.; YANG, Q.; DONG, Z.; ZHANG, X. Novel 3D porous biocomposite scaffolds fabricated by fused deposition modeling and gas foaming combined technology. **Composites Part B: Engineering**, v.152, p.151-159, 2018.

SPERA, K.D.; FIGUEIREDO, P.A.; SANTOS, P.C.E.; BARBOSA, F.C.; ALVES, C.P.; DOKKEDAL, A.L.; SALDANHA, L.L.; SILVA, L.P.; FIGUEIREDO, C.R.; FERREIRA, P.C.; DA SILVA, R.M.G. Genotoxicity, anti-melanoma and antioxidant activities of *Hymenaea courbaril* L. seed extract. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.91, n.4, p.e20180446, 2019.

- STACE, E.T.; DAKIN, S.G.; MOUTHUY, P.A.; CARR, A.J. Translating regenerative biomaterials into clinical practice. **Journal of Cellular Physiology**, v.231, p.36-49, 2015.
- STOPPEL, W.L.; GHEZZI, C.E.; MCNAMARA, S.L.; BLACK III, L.D.; KAPLAN, D.L. Clinical applications of naturally derived biopolymers-based *scaffolds* for regenerative medicine. **Annals of Biomedical Engineering**, v.43, n.3, p.657-680, 2015.
- STUCKENSEN, K.; LAMO-ESPINOSA, J.M.; MUIÑOS-LÓPEZ, E.; RIPALDA-CEMBORÁIN, P.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, T.; IGLESIAS, E.; ABIZANDA, G.; ANDREU, I.; FLANDES-IPARRAGUIRRE, M.; PONS-VILLANUEVA, J.; ELIZALDE, R.; NICKEL, J.; EWALD, A.; GBURECK, U.; PRÓSPER, F.; GROLL, J.; GRANERO-MOLTÓ, F. Anisotropic Cryostructured Collagen Scaffolds for Efficient Delivery of RhBMP-2 and Enhanced Bone Regeneration. **Materials**, v.12, n.3105, 2019.
- TANGSADTHAKUN, C.; KANOKPANONT, S.; SANCHAVANAKIT, N.; BANAPRASERT, T.; DAMRONGSAKKUL, S. Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v.16, n.1, p.37-44, 2006.
- TAPPERT, R.; MCKELLAR, R.C.; WOLFE, A.P.; TAPPERT, M.C.; ORTEGA-BLANCO, J.; MUEHLENBACHS, K. Stable carbon isotopes of C3 plant resins and ambers record change in atmospheric oxygen since the Triassic. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.121, p.240-262, 2013.
- TEJEDA-MONTES, E.; KLYMOV, A.; NEJADNIK, M.R.; ALONSO, M.; RODRIGUEZ-CABELLO, J.C.; WALBOOMERS, X.F.; MATA, A. Mineralization and bone regeneration using a bioactive elastin-like recombinamer membrane. **Biomaterials**, v.35, p.8339-8347, 2014.
- TIWARI, S.; PATIL, R.; BAHADUR, P. Polysaccharide Based Scaffolds for Soft Tissue Engineering Applications. **Polymers**, v.11, n.1, 2019.
- TOLOUE, E.B.; KARBASI, S.; SALEHI, H.; RAFIENIA, M. Evaluation of Mechanical Properties and Cell Viability of Poly(3-Hydroxybutyrate)-Chitosan/Al₂O₃ Nanocomposite Scaffold for Cartilage Tissue Engineering. **Journal of Medical Signals & Sensors**, v.9, n.2, p.111-116, 2019.
- TRUNG, T.S.; THEIN- HAN, W.W.; QUI, N.T.; NG, C.H.; STEVENS, W.F. Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation. **Bioresource Technology**, v.97, n.4, p.659-663, 2006.
- TSAI, S.P.; HSIEH, C.Y.; HSIEH, C.Y.; WANG, D.M.; HUANG, L.L.H.; LAI, J.Y.; HSIEH, H.J. Preparation and cell compatibility evaluation of chitosan/collagen composite scaffolds using amino acids as crosslinking bridges. **Journal of Applied Polymer Science**, v.105, p.1774-1785, 2007.
- URCIUOLO, F. CASALE, C.; IMPARATO, G.; NETTI, P.A. Bioengineered Skin Substitutes: The Role of Extracellular Matrix and Vascularization in the Healing of Deep Wounds. **Journal of Clinical Medicine**, v.8, n.2083, 2019.

- USHIKI, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastin fibers. A comprehensive understanding from a morphological view point. **Archive Histology and Cytology**, v.65, p.109-1026, 2002.
- VALE, C.R.; SILVA, C.R.; OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, A.L.; CARVALHO, S.; CHEN-CHEN, L. Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic, and recombinogenic activities of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice. **Genetics and Molecular Research**, v.12, n.3, p.2712-2724, 2013.
- VARGAS, F.S.; ALMEIDA, P.D.O.; ARANHA, E.S.P.; BOLETI, A.P.A.; NEWTON, P.; VASCONCELLOS, M.C.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; LIMA, E.S. Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v.20, n.4, p.6194-6210, 2015.
- VIGILATO, M.A.; HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Rheological study of gels based on chitosan and carbon nanotubes. **Brazilian Journal of Thermal Analysis**, v.4, n.1, p.35-38, 2015.
- WANG, X.; ALI, M.S.; LACERDA, C.M.R. A Three-Dimensional Collagen-Elastin Scaffold for Heart Valve Tissue Engineering. **Bioengineering**, v.5, n.69, 2018.
- WANG, X.H.; LI, D.P.; WANG, W.J.; FENG, Q.L.; CUI, F.Z.; XU, Y.X.; SONG, X.H.; van der WERF, M. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. **Biomaterials**, v.24, p.3213-3220, 2003.
- WITZLER, M.; BÜCHNER, D.; SHOUSHRAH, S.H.; BABCZYK, P.; BARANOVA, J.; WITZLEBEN, S.; TOBIASCH, E.; SCHULZE, M. Polysaccharide-Based Systems for Targeted Stem Cell Differentiation and Bone Regeneration. **Biomolecules**, v.9, n.840, 2019.
- XU, Y.; CHEN C.; HELLWARTH, P.B.; BAO, X. Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. **Bioactive Materials**, v.4, p.366-379, 2019.
- YAN, F.; LI, M.; ZHANG, H.Q.; LI, G.L.; HUA, Y.; SHEN, Y.; JI, X.M.; WU, C.J.; AN, H.; REN, M. Collagen-chitosan scaffold impregnated with bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of traumatic brain injury. **Neural Regeneration Research**, v.14, n.10, p.1780-1786, 2019.
- YOU, C.; LI, Q.; WANG, X.; WU, P.; HO, J.K.; JIN, R.; ZHANG, L.; SHAO, H.; HAN, C. Silver nanoparticle loaded collagen/chitosan scaffolds promote wound healing via regulating fibroblast migration and macrophage activation. **Scientific Reports**, v.7, n.10489, 2017.
- ZHANG, Z.; LI, G.; SHI, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v.90, p.23-28, 2005.
- ZHU, C.; FAN, D.; DUAN, Z.; XUE, W.; SHANG, L.; CHEN, F.; LUO, Y. Initial investigation of novel human-like collagen/chitosan scaffold for vascular tissue engineering. **Journal Biomedical Materials Research**, v.89, p.829-840, 2009.

ZHU, D.; WANG, H.; TRINH, P.; HEILSHORN, S.C.; YANG, F. Elastin-like Protein-Hyaluronic acid (ELP-HA) Hydrogels with Decoupled Mechanical and Biochemical cues for Cartilage Regeneration. **Biomaterials**, v.127, p.132-140, 2017.

ZIDEK, J.; VOJTOVA, L.; ABDEL-MOHSEN, A.M.; CHMELIK, J.; ZIKMUND, T.; BRTNIKOVA, J.; JAKUBICEK, R.; ZUBAL, L.; JAN, J.; KAISER, J. Accurate micro-computed tomography imaging of pore spaces in collagen-based scaffold. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.27, n.110, 2016.