



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
MESTRADO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS**



Dissertação de Mestrado

**TRATAMENTO QUÍMICO E CARACTERIZAÇÃO DE FOLHA DE ESPINAFRE
PARA OBTENÇÃO DE MATRIZ DE CELULOSE VISANDO REPARO ÓSSEO**

Paula Pereira de Souza Vaz

Belo Horizonte
Outubro 2019

Paula Pereira de Souza Vaz

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
MESTRADO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**TRATAMENTO QUÍMICO E CARACTERIZAÇÃO DE FOLHA DE ESPINAFRE
PARA OBTENÇÃO DE MATRIZ DE CELULOSE VISANDO REPARO ÓSSEO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa em Biomateriais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Hermes de Souza Costa

Belo Horizonte
Outubro 2019

C837t Vaz, Paula Pereira de Souza.
Tratamento químico e caracterização de folha de espinafre para
obtenção de matriz de celulose visando reparo ósseo / Paula Pereira
de Souza Vaz. – 2019.
86 f. : il.

Orientador: Hermes de Souza Costa

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação
Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2019.
Bibliografia.

1. Celulose. 2. Biomateriais. 3. Reparo ósseo. I. Costa, Hermes
de Souza. II. Título.

CDD: 620.18



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
“TRATAMENTO QUÍMICO E CARACTERIZAÇÃO DE
FOLHA DE ESPINAFRE PARA OBTENÇÃO DE MATRIZ
DE CELULOSE VISANDO REPARO ÓSSEO”

Autora: Paula Pereira de Souza Vaz

Orientador: Prof. Dr. Hermes de Souza Costa

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Hermes de Souza Costa (ORIENTADOR)
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof. Dr. Rudolf Huebner
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Belo Horizonte, 31 de Outubro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar em todos os momentos da minha vida e por fazer de cada um deles uma oportunidade de crescimento e aprendizado.

Ao CEFET, professores e funcionários que tornaram possível a realização deste trabalho e à CAPES, pelo auxílio à pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hermes de Souza Costa, pela oportunidade, confiança, e pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva, pela inspiração e incentivo nos primeiros passos dessa jornada.

Ao Prof. Dr. Rudolf Huebner e ao Laboratório de Bioengenharia da UFMG pela parceria.

Ao meu marido, Carlo, por ser sempre um dos maiores incentivadores do meu crescimento e pelo apoio incondicional, paciência e carinho durante todo o processo.

Aos meus pais, Paulo e Dorinha, pela determinação e pelo esforço incansável em nos proporcionar uma educação de qualidade, são diretamente responsáveis por todas as minhas conquistas.

Ao meu irmão, Mateus, pela paciência, companheirismo e pela ajuda com as disciplinas de engenharia.

Às amigas Chaiene Menezes, Denise Rodrigues e Patrícia Campos pela força nos momentos difíceis e por entenderem as minhas ausências nesses últimos 2 anos.

Aos amigos Matheus Boccardi e Isabella de Oliveira Nascimento, pelas trocas de experiência e conhecimento, tão valiosos nessa caminhada.

Ao meu chefe, Elias Vasconcelos Rezende e ao Diretor do Campus UFV/Florestal, Marco Antônio de Oliveira, por terem viabilizado a realização do curso.

Aos colegas do CEFET/MG Regina Rita de Cássia, Salete Guimarães e Vania de Paula Barros pelo apoio.

Aos colegas de Pós-graduação, especialmente à Carla pelo companheirismo e amizade construída ao longo do curso.

RESUMO

A reparação óssea é um importante problema enfrentado pela cirurgia ortopédica maxilofacial em função de danos estruturais causados por tumores, infecções extensas, malformações ou perda óssea por traumas. Atualmente, a grande demanda por transplantes e enxertos de órgãos e tecidos tem impulsionado a busca por materiais capazes de atuar no processo de reparação tecidual. Os biomateriais naturais voltados para a Engenharia de Tecidos têm como finalidade, através do contato com a interface dos sistemas biológicos, substituir um tecido ou órgão. Neste contexto, a celulose aparece como uma opção cada vez mais pesquisada em função de suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixo custo e por ser uma alternativa sustentável. Diferentes formas de celulose isolada e seus derivados, assim como associadas a outros biomateriais, tem sido cada vez mais pesquisadas para uso como matriz em processos de reparação tecidual. Considerando as características da celulose como biomaterial, esse estudo visa caracterizar a folha vegetal nativa e após processo químico utilizando soluções iônicas e não-iônicas, estabelecendo análise comparativa das alterações provocadas pelo processamento e seu potencial para utilização como matriz bidimensional em reparo de tecido ósseo. Foram utilizadas técnicas de imersão e perfusão nos detergentes como protocolos, além de exposição de algumas amostras ao glutaraldeído tendo como finalidade a reticulação da matriz polimérica e também ao fluido corporal simulado (*SBF-Simulated Body Fluid*). O material final foi submetido às análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de absorção na região de infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Ao final das caracterizações concluiu-se que o protocolo utilizado é uma opção viável para o processamento da celulose, de baixo custo, que produz alterações estruturais aceitáveis no produto final, porém ensaios como a quantificação de DNA vegetal e ensaios de citotoxicidade são sugeridos como complementação.

Palavras-chave: Celulose, biomateriais, matriz de celulose, *scaffold*.

CHEMICAL TREATMENT AND CHARACTERIZATION OF SPINACH LEAF TO OBTAIN CELLULOSE MATRIX FOR BONE REPAIR

ABSTRACT

Bone repair is an important problem faced by maxillofacial orthopedic surgery due to damage caused by tumors, extensive infections, malformations or bone loss from trauma. Currently, the high demand for organ and tissue transplants and grafts has driven the search for materials capable of acting in the tissue repair process. Through contact with the interface of biological systems, biomaterials aim to evaluate, treat, augment or replace a body tissue, organ or function. In this context, cellulose appears as an option due to its characteristics of biodegradability, biocompatibility, low cost and for being a sustainable alternative. Different forms of isolated cellulose and its derivatives, as well as associated with other biomaterials, have been increasingly researched for use as a matrix in tissue repair processes. Considering the characteristics of cellulose as biomaterial, this study aims to characterize a plant leaf in the native form and after chemical process using ionic and nonionic solutions, establishing comparative analysis of the changes caused by processing and its potential for use as a two-dimensional matrix in bone tissue repair. Detergent immersion and perfusion techniques were used as protocols, as well as exposure of some samples to glutaraldehyde, with the purpose of cross-linking the polymeric matrix, as well as immersion in simulated body fluid (SBF). The materials resulting from chemical processing were subjected to scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimeter (DSC). At the end of the characterizations, it was concluded that the protocol used is a viable option for low cost cellulose processing, which produces acceptable structural changes in the final product, but assays as plant DNA quantification and cytotoxicity tests are suggested.

Key words: Cellulose, biomaterials, cellulose matrix, scaffold.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Zonas presentes no periósteo	18
Figura 2 - Decelularização de coração de porco durante 48 horas.....	31
Figura 3 - Estrutura molecular e microfibras de celulose.....	38
Figura 4 - Comparação entre a rede vascular de mamíferos e vegetais.....	39
Figura 5 - Espaço de tempo de decelularização da folha de espinafre.....	39
Figura 6 - Espectro de FTIR da celulose.....	41
Figura 7 - Análise termogravimétrica da celulose.....	42
Figura 8 - Análise DSC da celulose.....	43
Figura 9 - Ilustração de corte transversal da folha	51
Figura 10 - Resultado obtido pelo método de perfusão.....	53
Figura 11 - Comparação dos resultados IME 3 e IME 4.....	53
Figura 12- FTIR amostras CONTROLE e IME3.....	54
Figura 13 - Análise FTIR controle e tratada por IME3 ampliada na região compreendida entre 1500 e 1000cm ⁻¹	56
Figura 14 - Análise FTIR do Triton X-100.....	57
Figura 15 - Curvas termogravimétricas das amostras CONTROLE e IME3.....	61
Figura 16 - Curva DSC das amostras CONTROLE e IME3.....	62
Figura 17 - Comparação entre amostra CONTROLE e IME3.....	66
Figura 18 - Análise de MEV de amostras CONTROLE e IME3 em SBF.....	69
Figura 19 - Ensaio de citotoxicidade.....	71
Figura 20 - Análise FTIR amostras IME3 antes e após SBF.....	72
Figura 21 - Comparação FTIR amostras controle e IME3 com 7 dias de SBF.....	73
Figura 22 - Folha nativa após reticulação e ampliação da região demarcada.....	74
Figura 23 - Vista lateral da folha tratada e ampliação da região demarcada.....	74
Figura 24 - Análise FTIR amostras IME3 antes e após reticulação.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação da concentração iônica do plasma sanguíneo humano e SBF.....	21
Tabela 2	Apresentando os grupos químicos em espectroscopia FTIR.....	41
Tabela 3	Propriedades mecânicas da celulose e do osso cortical.....	44
Tabela 4	Experimento para remoção de cutícula de folhas vegetais por imersão.....	48
Tabela 5	Experimento de degradação química na estrutura de folhas vegetais.....	49
Tabela 6	Matriz de experimentos de amostras submetidas a ensaio SBF.....	50
Tabela 7	Aspecto qualitativo de amostras submetidas à protocolos de remoção da cutícula.....	51
Tabela 8	Principais modos vibracionais que tiveram intensidade elevada tanto em amostras CONTROLE como em amostras submetidas ao protocolo IME 3.....	57
Tabela 9	Principais modos vibracionais que tiveram intensidade reduzida nas folhas submetidas ao protocolo IME3.....	58
Tabela 10	Principais modos vibracionais que aparecem de forma isolada ou em amostras CONTROLE ou em amostras submetidas ao protocolo IME3.....	59
Tabela 11	Sumário da Análise Térmica de Amostras CONTROLE.....	63
Tabela 12	Sumário da Análise Térmica de Amostras do Protocolo IME3.....	63
Tabela 13	Resumo da análise termogravimétrica.....	63
Tabela 14	Porcentagem de Perda de Massa Considerando como 100% as amostras com massa seca à 142°C para CONTROLE e 117°C para IME3.....	64
Tabela 15	EDS de amostras CONTROLE e folhas submetidas ao protocolo IME 3.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF	-	Fator de crescimento básico do fibroblasto
CEFET	-	Centro Federal de Educação Tecnológica
CHAPS	-	3-[(3-colamidropil)dietilamonio]-1-propanosulfato
CUT	-	Cutícula
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DSC	-	Calorimetria exploratória diferencial
EC	-	Células endoteliais
EDS	-	Espectroscopia de Energia Dispersiva
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	-	Fator de crescimento epitelial -1
EGTA	-	Ácido etileno glicol-bis tetra-acético
ESB	-	Sociedade Européia de Biomateriais
FDA	-	Food and Drug Administration
FGF	-	Fator de crescimento para fibrblastos
FTIR	-	Espectroscopia de absorção na região de infravermelho com transformada de Fourier
GPa	-	Gigapascal
GA	-	Glutaraldeído
IGF-1	-	Insulina fator de crescimento 1
IME	-	Protocolo de imersão
IME-GA	-	Protocolo de imersão com glutaraldeído
MEC	-	Matriz extracelular
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
MPa	-	Megapascal
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PDGF	-	Fatores de crescimento derivados de plaquetas
PDPC	-	Células progenitoras derivadas do periósteo
PERF	-	Protocolo de perfusão
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PLA	-	Ácido polilático
PLGA	-	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
RNA	-	Àcido ribonucléico
SB-10	-	Sulfobetaína-10

SBF	-	Simulated Body Fluid (Fluido Corporal Simulado)
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
TGA	-	Análise termogravimétrica
TGF- β	-	Fator de crescimento transformador β
TMA	-	Análise termomecânica
UFMG	-	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	-	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	- 13
2	OBJETIVOS.....	- 16
3	FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	- 17
3.1.	TECIDO ÓSSEO E PERIÓSTEO.....	- 17
3.2	BIOMATERIAIS E <i>SCAFFOLDS</i>	- 20
3.3	TIPOS DE BIOMATERIAIS.....	- 23
3.4	ENGENHARIA DE TECIDOS.....	- 24
3.5	ANGIOGÊNESE.....	- 26
3.5.1	HEMOCOMPATIBILIDADE.....	- 27
3.6	DECELULARIZAÇÃO DE TECIDOS.....	- 29
3.6.1	RETICULAÇÃO.....	- 32
3.7	MÉTODOS DE DECELULARIZAÇÃO.....	- 33
3.7.1	MÉTODOS FÍSICOS.....	- 33
3.7.2	MÉTODOS QUÍMICOS.....	- 34
3.7.2.1	SOLUÇÕES PARA DECELULARIZAÇÃO.....	- 35
3.8	DECELULARIZAÇÃO DE TECIDO VEGETAL.....	- 37
3.9	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO - QUÍMICA.....	- 40
3.9.1	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO (FTIR)	- 40
3.9.2	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	- 41
3.9.3	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	- 42
3.9.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	- 43
3.9.5	ENSAIO DE PRECIPITAÇÃO.....	- 44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	- 46
4.1	MATERIAIS.....	- 46
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS.....	- 46
4.3	METODOLOGIA.....	- 47
4.3.1	PROCESSO DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA.....	- 47
4.3.2	ENSAIO DE RETICULAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO.....	- 49

4.3.3	ENSAIO DE PRECIPITAÇÃO (SBF)	- 49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	- 51
5.1	TRATAMENTO QUÍMICO DE TECIDO VEGETAL.....	- 51
5.2	TRATAMENTO QUÍMICO DE TECIDO VEGETAL E ENSAIO DE PRECIPITAÇÃO (SBF)	- 68
5.2.1	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	- 70
5.3	TRATAMENTO QUÍMICO DE TECIDO VEGETAL E ENSAIO DE RETICULAÇÃO.....	- 73
6	CONCLUSÃO.....	- 78
7	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	- 79
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 80

1. INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento da população, investimentos cada vez maiores têm sido feitos em materiais e procedimentos que visem melhorar a qualidade de vida na terceira idade e também que satisfaçam as necessidades de reposição ou restauração de tecidos que se desgastam com o avanço do tempo. Segundo o relatório sobre envelhecimento populacional publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de 2015 a população de idosos terá duplicado no ano de 2050. Dentre as várias necessidades características dessa idade está o uso de próteses e órteses, em função de fraturas por quedas ou mesmo pelo desgaste ósseo provocado por doenças como a osteoporose. No entanto, é preciso ressaltar que os índices de pacientes com essas necessidades também contemplam jovens envolvidos em acidentes, principalmente os de trânsito.

Para que a reparação óssea ocorra de forma eficiente, um dos principais fatores é a presença de um perióstio íntegro. O perióstio é um delicado tecido conjuntivo, que reveste cada elemento do esqueleto como uma bainha e, é composto por pelo menos duas camadas, a celular interna, que contém osteoblastos e células osteoprogenitoras e a camada externa composta por fibras colágenas, fibroblastos e células progenitoras. Essa estrutura é responsável pela promoção da nutrição da face externa dos ossos bem como deposição de tecido pelos osteoblastos presentes em sua estrutura.

Atualmente as reabilitações são feitas a partir de enxertos autógenos ou alógenos, em processos em que a quantidade de reposição tecidual necessária seja pequena. Enxertos autógenos são reposições teciduais feitas a partir de material coletado do próprio paciente, por exemplo, enxerto craniofacial retirado de crista ilíaca. Já os alógenos são produzidos a partir de materiais sintéticos ou de origem animal, como de bovinos. Esses procedimentos são uma alternativa viável quando se tem pouca perda tecidual ou quando há necessidade de aumento de espessura do órgão e não de extensão. Ou seja, em um procedimento de enxertia óssea, por exemplo, é possível que obtenhamos um órgão mais volumoso, entretanto não é possível estimular seu crescimento longitudinal. Além disso, enxertos autógenos, apesar da facilidade de compatibilidade, podem ser desconfortáveis para os pacientes, uma vez que serão submetidos a dois procedimentos cirúrgicos, um para a coleta de material e outro para a realização do enxerto.

Quando ocorre perda substancial do membro ou parte dele, o tratamento de eleição é o uso de próteses, que são aparelhos destinados a substituir o membro perdido. Já as órteses, são utilizadas quando há perda da função e não do membro, este aparelho atuará corrigindo a deficiência de uma função. O material utilizado pode ser metálico, cerâmico ou polimérico e varia de acordo com a região e a função executada pelo órgão. Uma das maiores desvantagens desse procedimento é a necessidade de trocas das próteses. A maioria delas deve ser trocada a cada 10 anos, o que implica em riscos para o paciente, que tem que se submeter a constantes procedimentos cirúrgicos, podendo trazer sequelas.

Dentre os biomateriais naturais utilizados na confecção de matrizes artificiais está a celulose, polímero natural renovável, biodegradável e biocompatível que possui como principais fontes estruturas de plantas, bactérias, fungos e animais marinhos. Largamente utilizada na indústria de produção de papel, em função de suas propriedades físico-químicas têm despertado interesse na produção de novos materiais em várias áreas, como energia, eletrônica, comunicação e medicina.

A celulose de forma isolada ou seus derivados, como nano e micro cristais, acetato de celulose, carboximetil celulose, hidroxietil celulose, propionato de celulose, assim como sua associação a outros biomateriais como hidroxiapatita, têm sido consideradas alternativas sustentáveis aos polímeros sintéticos em vários tipos de indústria e também na área biomédica.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar química e morfologicamente a matriz bidimensional de celulose obtida através de processamento químico de folha de espinafre utilizando soluções iônicas e não-iônicas pelas técnicas de imersão e perfusão, visando desenvolvimento de estrutura capaz de atuar no processo de reparação óssea, mimetizando as funções do periósteo. Além dos detergentes, algumas amostras foram submetidas também a ensaios com fluido corporal simulado (*SBF-Simulated Body Fluid*) e à ensaio de reticulação, tendo o glutaraldeído como agente. As técnicas de caracterização utilizadas foram a microscopia eletrônica de varredura (MEV), que permite avaliação micro estrutural do material antes e após o tratamento, afinidade da estrutura para precipitação de fosfato de cálcio quando exposta à SBF, e efetividade da reticulação da estrutura quando em contato com glutaraldeído; análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) permitindo análise do comportamento térmico de folhas nativas e tratadas; espectroscopia de absorção na região de

infravermelho (FTIR) para avaliação de alterações na sua estrutura química, ligações e grupos funcionais a fim de definir o impacto do método e substâncias utilizadas na estrutura do material final quando comparado à folha nativa.

Dessa forma, serão aqui abordadas, com base na revisão bibliográfica realizada, as características mais importantes da celulose, substância mais abundante nos vegetais; o processo de decelularização, tanto técnicas como produtos utilizados e a viabilidade do material final.

2.OBJETIVOS

✓ **Geral:**

Tratar quimicamente e realizar caracterização de folhas de espinafre buscando remover os conteúdos celulares para obtenção de matriz bidimensional pré-vascularizada para reparação óssea.

✓ **Específicos:**

- ❖ Realizar tratamento químico em folhas de espinafre utilizando métodos de perfusão e imersão com detergentes iônicos e não-iônicos
- ❖ Reticular quimicamente folhas de espinafre, antes e após o tratamento com os sabões estudados, e realizar imersão em fluido corporal simulado (*SBF-Simulated Body Fluid*)
- ❖ Caracterizar morfológica e quimicamente matrizes obtidas após os vários tratamentos químicos, através das técnicas de espectroscopia de absorção na região de infravermelho (FTIR); análise termogravimétrica (TGA); calorimetria exploratória diferencial (DSC); análise elementar e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TECIDO ÓSSEO E PERIÓSTEO

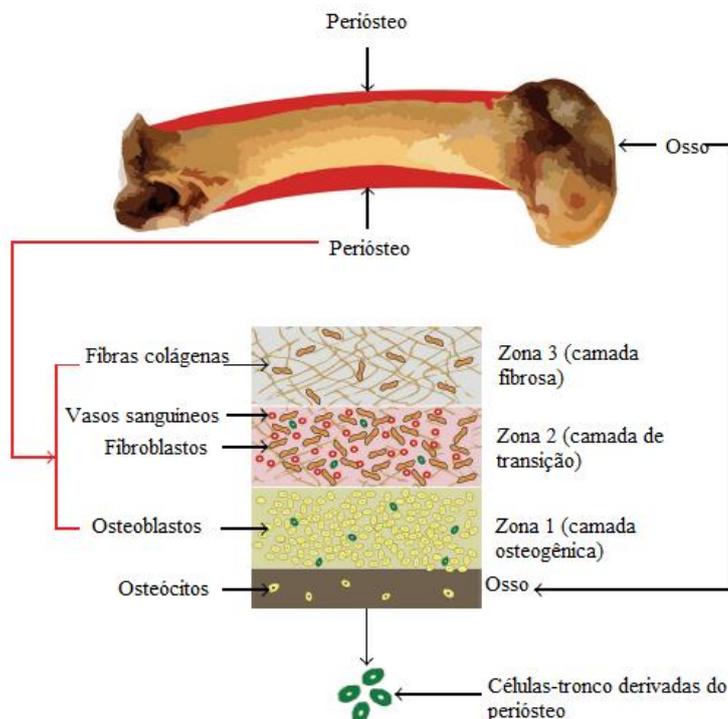
O esqueleto humano possui funções estruturais, protetivas e de locomoção, além de funcionar como reservatório de cálcio. O osso cortical é altamente calcificado e cumpre principalmente o papel estrutural e de proteção, enquanto o osso trabecular é menos calcificado e possui uma excelente área superficial que permite atividade metabólica. Ossos planos como o crânio, crescem a partir do processo de ossificação intramembranosa enquanto ossos longos, como o fêmur, crescem longitudinalmente através de ossificação endocondral e em largura por aposição do perióstio (WALSH, 2018).

A formação do esqueleto se inicia com a migração de células mesenquimais para os sítios dos futuros ossos, onde se formam condensações celulares que esboçam o osso que será formado naquele local. Essas células mesenquimais podem se diferenciar em condrócitos, que formarão modelos de cartilagem (ossificação endocondral) ou em osteoblastos, que formarão tecido ósseo diretamente (ossificação intramembranosa). Na ossificação endocondral, a cartilagem é substituída por tecido ósseo e seu acionamento se dá pela diferenciação dos condrócitos com capacidade proliferativa no centro da cartilagem em células hipertróficas sem capacidade de proliferação. Em seguida ocorre a invasão da matriz cartilaginosa por células progenitoras de osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais e hematopoiéticas. A cartilagem hipertrófica é então reabsorvida ao mesmo tempo em que as células progenitoras se diferenciam em osteoblastos que secretam matriz óssea e, as endoteliais e hematopoiéticas estabelecem a medula óssea, centro de ossificação primária. Células progenitoras de osteoblastos presentes no pericôndrio, membrana de tecido conjuntivo que envolve a cartilagem, se diferenciam em osteoblastos que depositam osso cortical ao redor da matriz cartilaginosa. A medida que o feto cresce, o centro de ossificação primária expande e um centro de ossificação secundária se forma em uma ou ambas extremidades do osso em desenvolvimento, resultando na formação das

epífises responsáveis pelo crescimento longitudinal dos ossos (BERENDSEN; OLSEN, 2015).

O crescimento, desenvolvimento e reparação do osso e da cartilagem dependem da presença do periósteo envolvendo as diáfises de ossos longos e estendendo às metáfises distais e proximais e, às epífises adjacentes (IUCHI *et al.*, 2019). O periósteo é um tecido especializado, altamente vascularizado, que envolve a superfície dos ossos. Ele é composto por tecido conjuntivo rico em fibras e vasos e por uma camada interna onde residem as células progenitoras derivadas do periósteo (PDPC), principais responsáveis pelo processo de reparação de fraturas (FERRETI; MATTIOLI-BELMONTE, 2014). A existência de um periósteo íntegro e sadio é um dos fatores mais importantes no processo de cicatrização óssea. Segundo Ferretti e Mattioli-Belmonte (2014), o periósteo é a melhor fonte de células para reparação do tecido ósseo, ultrapassando a medula óssea e outras fontes de células mesenquimais, como pode ser observado no esquema ilustrado pela Figura 1 (FERRETI; MATTIOLI-BELMONTE, 2014).

Figura 1: Zonas presentes no periósteo



Fonte: MAHAJAN, A. (2012) (Adaptada)

Em todas as idades, as células mesenquimais presentes no periósteo são capazes de se diferenciarem em fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipócitos e células do músculo esquelético. Os tecidos produzidos por essas

células incluem ligamentos periodontais, cimento, osso alveolar e tecido gengival (MAHAJAN, 2012).

Reparação óssea é um dos maiores problemas enfrentados pela cirurgia ortopédica maxilofacial em função de danos causados por tumores, infecções extensas, malformações ou perda óssea por traumas (BELADI; SABER-SAMANDARI; SABER-SAMANDARI, 2017). A fisiologia do tecido ósseo é regulada por uma gama de processos biológicos que resultam em desenvolvimento tecidual, homeostase e reparo após o trauma. O processo de reparação óssea pode ser difícil de reproduzir em função da multifatorialidade na regulação deste nicho, incluindo a complexa composição tecidual e outros aspectos como a composição da matriz extracelular por proteínas insolúveis e glicoproteínas; interações célula-célula e célula-matriz extracelular por estimulação mecânica e atuação de microRNAs (LOPES *et al.*, 2018). Como um ramo fundamental da engenharia de tecidos, a engenharia de tecido ósseo propõe alternativas aos enxertos alógenos utilizados. Estruturas ósseas artificiais promovem adesão, proliferação e diferenciação celular formando um novo tecido ósseo ou, atuam como transportadores de fatores de crescimento ou outros sinalizadores biomoleculares. Os biomateriais utilizados como osso artificial podem ser divididos em sintéticos e naturais, entretanto materiais compósitos que mimetizam a composição orgânica-inorgânica do osso natural têm sido desenvolvidos com o objetivo de tratar e substituir de forma mais eficaz o tecido ósseo (HE *et al.*, 2018).

Em virtude de sua elevada habilidade de provimento de células osteoprogenitoras assim como tecido ósseo cicatricial, o transplante de periósteo tem sido realizado na clínica médica. Entretanto, assim como outros enxertos, a disponibilidade tecidual, a morbidade do sítio doador bem como a resposta imunológica, ainda são desafios. Alguns tipos de periósteo artificial têm sido desenvolvidos, utilizando submucosa intestinal, derme acelular, membranas indutoras e matrizes poliméricas (WANG *et al.*, 2017).

Dessa forma, um material que possua capacidade de mimetizar as funções do periósteo, tanto em relação à sua alta capacidade de suprimento sanguíneo e nutrientes ao tecido ósseo quanto à possibilidade de desenvolvimento de uma grande variedade de células, pode se tornar a solução para vários procedimentos em que haja necessidade de desenvolvimento de tecidos diferentes,

simultaneamente, como por exemplo indução de formação de tecido ósseo e tecido gengival, na odontologia.

3.2 BIOMATERIAIS E SCAFFOLDS

De acordo com a Sociedade Europeia de Biomateriais (ESB), biomateriais são definidos como “materiais que têm como finalidade, através do contato com a interface dos sistemas biológicos, avaliar, tratar, aumentar ou substituir um tecido, órgão ou função do corpo” (O'BRIEN, 2011). O sucesso dos biomateriais no corpo humano depende de fatores como propriedades do material, design e biocompatibilidade do material utilizado, assim como outros fatores que não podem ser controlados pelo engenheiro de materiais, como a técnica cirúrgica utilizada, a saúde e estilo de vida do paciente (PARK; BRONZINO, 2003).

Biocompatibilidade envolve a aceitação de um implante artificial pelos tecidos vizinhos e pelo organismo como um todo. Materiais biocompatíveis não provocam irritação das estruturas adjacentes ou resposta inflamatória anormal, não incitam reações alérgicas ou imunológicas, e não são carcinogênicos (PARK; BRONZINO, 2003). Ao contrário dos materiais inertes, que somente se adaptam ao meio sem provocar alterações, os materiais biocompatíveis, na maioria dos casos, são capazes de induzir processos como a neoformação tecidual, fator de extrema importância quando se pensa em produção de enxertos. A interação do material com o organismo é fundamental para o sucesso no uso de *scaffolds*, tratando mais especificamente do assunto deste trabalho, em 1991 Kokubo propôs que um requisito essencial para a união do material ao osso vivo, é a formação de apatita em sua superfície quando implantado no corpo humano e, que essa formação de apatita *in vivo* pode ser reproduzida em um fluido corporal simulado (*Simulated Body Fluid - SBF*) com as concentrações iônicas próximas ao plasma humano (KOKUBO, 1991; KOKUBO; TAKADAMA, 2006). A tabela 1 descreve as concentrações iônicas do plasma sanguíneo humano e da solução SBF.

Tabela 1: Comparação da concentração iônica do plasma sanguíneo humano e SBF

Íons	Concentração de íons	
	Plasma sanguíneo humano	SBF
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	103,0	147,8
HCO ₃ ⁻	27,0	4,2
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5
pH	7,2-7,4	7,40

Fonte: Adaptada de Kokubo e Takadama (2006)

Outras características de compatibilidade que são importantes na função dos implantes de biomateriais são propriedades mecânicas adequadas, tais como resistência à tração, módulo de elasticidade e tenacidade; propriedades óticas adequadas, principalmente se forem usadas nos olhos, pele ou dentes; densidade adequada. Capacidade de produção e armazenamento em larga escala, design apropriado e ser esterilizável são características importantes de um biomaterial (PARK; BRONZINO, 2003). Outra questão a ser avaliada é a biodegradabilidade. Trata-se da capacidade do material de ser metabolizado, degradado pelo próprio organismo, sem que os produtos desse processo causem algum prejuízo ou resposta inflamatória.

Esse aspecto, é importante frisarmos, constitui-se em um dos maiores desafios dos biomateriais atualmente, uma vez que, para que seja realmente eficiente, a velocidade de degradação do biomaterial em questão não pode ser maior do que a velocidade de formação de um novo tecido. Caso isso ocorra, teremos uma falha no processo de reparação. Ao mesmo tempo, a degradação mais lenta do que a formação do tecido pode levar a uma dificuldade de crescimento das células. Assim, a sincronia entre a degradação do material e formação do tecido pode determinar o fracasso ou o sucesso do procedimento (RATNER *et al.*, 2013).

No que diz respeito às propriedades mecânicas, é necessário que o material possua características adequadas ao sítio onde será implantado e também seja resistente o suficiente para suportar a manipulação cirúrgica. Nos casos de regeneração de tecido ósseo ou cartilaginoso, esse fator se torna ainda mais

importante e difícil de ser alcançado de forma ideal, pois nesses casos o material deve possuir integridade mecânica desde o momento de sua implantação até o completo processo de remodelação. Alguns valores das propriedades mecânicas do osso cortical podem ser utilizados como referência para desenvolvimento de um biomaterial mais próximo do ideal, como por exemplo o Módulo de Young é aproximadamente 15,2 GPa; limite de escoamento 114 MPa; resistência à tração 90 MPa e à compressão 150 MPa (RATNER *et al.*, 2004). O desafio está no fato de que o processo de recuperação desses tecidos varia entre indivíduos em função da sua idade. Em pacientes jovens o processo de recuperação após fratura se dá em torno de 6 semanas. Já em idosos essa velocidade diminui consideravelmente. Além disso, as propriedades mecânicas de um material podem ser afetadas pela porosidade necessária e indispensável para a nutrição das células (O'BRIEN, 2011).

Quanto à arquitetura dos *scaffolds*, a porosidade do material é um fator crítico. A existência de poros interligados é essencial para a dispersão celular e também para a nutrição do tecido em formação e sua matriz extracelular. A porosidade também atua de maneira efetiva na eliminação de metabólitos produzidos pelas células e pelos produtos oriundos da degradação do material. Além disso, o tamanho dos poros também influenciará no poder de ligação das células ao *scaffold*, uma vez que determinará o tamanho da superfície de contato disponível para esse fim (O'BRIEN, 2011).

Para *scaffolds* que possuem como finalidade a regeneração de tecido ósseo, podemos destacar algumas características que trariam otimização do produto final como flexibilidade, tornando possível a conformação do material de escolha em uma estrutura tridimensional; topografia adequada de modo que favoreça a adesão, infiltração e crescimento celular e presença de concavidades entre as partículas do material que auxiliem na formação óssea sem a interferência da circulação de fluidos corporais e forças mecânicas pela movimentação do implante (SOUNDARYA *et al.*, 2018). Os poros devem possuir tamanho entre 200 e 900µm, com relação à superfície a adesão celular só ocorrerá caso a mesma permita a formação de camada de fibrina após a implantação em sistema biológico. Outro fator a ser considerado é a radiolucência do material, que permite o acompanhamento do processo de regeneração óssea através de exames radiográficos (MADRID *et al.*, 2019).

Apesar de nos atermos mais aos fatores de desenvolvimento e produção dos *scaffolds*, é importante lembrar que eles devem ser também viáveis clinicamente e comercialmente. Transportar a produção realizada dentro de um laboratório, em que se desenvolve uma estrutura por vez, para um processo de produção em larga escala, pode ser desafiador do ponto de vista de assegurar que sejam mantidas a qualidade e as características indispensáveis ao sucesso do tratamento. Outro fator-chave é determinar de que forma esses produtos seriam distribuídos e como chegariam até os clínicos interessados, o que inclui também atenção ao processo de armazenamento do biomaterial. A maioria dos médicos preferem produtos prontos, que não exijam dois tempos cirúrgicos, porém, nesse caso, isso é inviável, sendo necessário que seja feita a coleta das células e sua cultura in-vitro, para uma posterior inserção no organismo (O'BRIEN, 2011).

3.3 TIPOS DE BIOMATERIAIS

De acordo com PARK e BRONZINO (2003), atualmente os grupos de biomateriais mais utilizados na engenharia de tecidos são os metais, as cerâmicas, polímeros sintéticos e naturais, que apresentam vantagens e desvantagens, o que torna cada vez mais comum a utilização de compósitos, ou seja, a associação de materiais em busca da obtenção do material ideal. Durante muito tempo a cerâmica foi considerada um dos materiais de primeira escolha quando se tratava de regeneração de tecido ósseo, devido à afinidade dos osteoblastos com a fase mineral do material. Entretanto, algumas características como baixo módulo de elasticidade e superfície frágil não suportam a carga mecânica necessária durante o processo de remodelação (PARK; BRONZINO, 2003).

Os polímeros naturais apresentam como principais características a bioatividade (capaz de promover reconhecimento e adesão celular), biocompatibilidade, cinética de degradação ajustável, estrutura tridimensional, assim como solubilidade, antigenicidade e produtos de degradação não tóxicos. Contudo, possuem como desvantagens baixa resistência mecânica, variação de composição e propriedades em função de sua origem orgânica, deterioração microbiana e capacidade de hidratação variável. Os polímeros sintéticos podem ser produzidos em larga escala e baixo custo, com controle do peso molecular e suas funcionalidades, apesar disso, sua utilização na engenharia de tecidos está limitada

por fatores como falta de reconhecimento de sinalizadores biológicos, produtos de degradação tóxicos que causam alteração do pH dos tecidos adjacentes, falta de sítios ativos para ligação de peptídeos, fatores de crescimento e outros sinalizadores biológicos responsáveis pela regulação da adesão celular e expressão fenotípica (ABBASIAN *et al.*, 2019).

Dentre os polímeros naturais utilizados como biomateriais está a celulose, material de interesse deste estudo. A celulose é um polímero natural renovável, biodegradável e biocompatível, e possui como principais fontes estrutura de plantas, bactérias, fungos e animais marinhos. A celulose é largamente utilizada na indústria de produção de papel como emulsificante, agente gelificante, entre outras funções, com características importantes como a biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade. Suas propriedades físico-químicas têm despertado interesse na produção de novos materiais em várias áreas, como energia, eletrônica, comunicação e medicina. Nos últimos anos, houve um aumento no interesse do uso da celulose para aplicações médicas, especialmente no desenvolvimento de novos biomateriais porosos, que podem ser utilizados pela engenharia de tecidos (JÚNIOR *et al.*, 2016; SALAMA, 2019). Uma das fontes utilizadas para a obtenção de celulose é o bagaço da cana de açúcar, muito utilizado pelas indústrias de combustíveis. A nano celulose extraída de celulose derivada de plantas, tem recebido atenção considerável devido às suas características únicas de dimensões em nano escala, com grande área superficial, alta resistência específica e propriedades ópticas distintas (LAM *et al.*, 2017).

Embora haja um grande avanço no desenvolvimento dos *scaffolds*, sobretudo em relação à vantagem de se promover uma reparação tecidual mais natural possível, em detrimento do uso de próteses que necessitam ser trocadas frequentemente, há ainda um ponto desafiador para os cientistas: a formação de um sistema circulatório funcional e efetivo.

3.4 ENGENHARIA DE TECIDOS

Um grave problema de saúde pública é a lista de espera para realização de transplantes de órgãos. Milhares de pessoas aguardam atualmente por rim, fígado, córnea, entre outros. Nesse cenário, uma nova área da ciência cresce

vertiginosamente: a Engenharia de Tecidos, termo definido durante um congresso da Fundação Nacional de Ciência, ocorrido em 1988, o qual foi descrito como sendo

“A aplicação de princípios e métodos da engenharia e ciências da vida em direção ao entendimento fundamental da relação estrutura-função em tecidos de mamíferos normais e patológicos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter e melhorar as funções do tecido”. (O'BRIEN, F.J. 2011)

A engenharia de tecidos atua por meio de desenvolvimento de tecidos específicos por meio do cultivo de células-tronco. Para esclarecer de fato como isso ocorre, primeiro precisamos entender a estrutura de um órgão. Os órgãos do corpo humano são formados por células específicas de um tecido e matriz extracelular (MEC). Trata-se esta última de uma rede de colágeno e outras substâncias, que têm como função promover sustentação das células e também seu desenvolvimento e nutrição (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011). Para que as características fenotípicas celulares sejam reproduzidas da maneira mais confiável, em culturas que melhor repliquem comportamentos *in vivo*, novas técnicas e métodos científicos tentam recapitular microambientes celulares nativos. Essas estratégias buscam produzir e sustentar certos comportamentos celulares. A MEC natural secreta espacialmente fatores de crescimento celular, fornece estrutura física e permite comunicações intercelulares. Possui também um importante papel no controle da distribuição de nutrientes e gases e, cria a partir disso, gradientes de sinal essenciais para processos celulares, como migração, organização e padronização dos tecidos (DIEKJÜRGEN; GRAINGER, 2017).

Atualmente, a engenharia de tecidos tem concentrado grande parte de suas pesquisas em desenvolver uma estrutura que se aproxime da matriz extracelular original. Esses dispositivos receberam o nome de *scaffolds*, que nada mais são do que matrizes desenvolvidas com biomateriais onde são semeadas e desenvolvidas as células-tronco, dando origem ao tecido ou órgão de interesse. No entanto, essas estruturas não atuarão como implantes permanentes, elas serão apenas um auxílio para o início do desenvolvimento celular para que elas mesmas possam, a partir de um determinado momento, produzir sua própria matriz extracelular (MEC) (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011). Os *scaffolds* são críticos e o sucesso da regeneração tecidual depende tanto de sua macro e microestrutura como também do biomaterial constituinte. Essas estruturas devem estar aptas a simular o

ambiente *in vivo* e permitir que as células exerçam sua influência sobre o meio. A regeneração tecidual dependerá das interações célula-célula e célula-*scaffold* em relação à fatores solúveis, tanto locais quanto sistêmicos (MADRID *et al.*, 2019). De acordo com O'Brien (2011), algumas considerações devem ser feitas para avaliar a viabilidade de um dado material na confecção de um *scaffold* e para que ele seja o mais próximo do ideal possível, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, arquitetura e tecnologia de produção (O'BRIEN, 2011).

3.5 ANGIOGÊNESE

No corpo humano o sistema circulatório é composto por vasos e artérias que se ramificam formando capilares. Esse sistema é responsável tanto por levar nutrientes e sangue rico em oxigênio até os tecidos e órgãos como por remover toxinas e metabólitos e também levar o sangue pobre em oxigênio de volta até o pulmão, para que ele seja reoxigenado. A angiogênese é o processo de formação vascular que ocorre durante toda a vida do indivíduo, essencial ao seu desenvolvimento, sendo um dos primeiros eventos durante a organogênese estando presente também no processo de reparação de feridas e reposição de vascularização de tecidos lesionados. A angiogênese é regulada por uma sensível interação entre fatores de crescimento e inibidores, e a falta de equilíbrio entre eles pode ser prejudicial. Por exemplo, em doenças como o câncer, a angiogênese desregulada leva à nutrição do tecido doente e destruição de tecido sadio (DEWITT, 2005).

Para que a angiogênese seja compreendida, dois processos precisam ser entendidos: a angiogênese e a angiogênese. A angiogênese é a capacidade que o substrato possui de suportar o desenvolvimento vascular por entre seus poros. Durante o processo de reparação óssea, essa característica pode facilitar o suprimento sanguíneo do tecido do hospedeiro e promover a integração do *scaffold*. A angiogênese é a estimulação de células epiteliais pela liberação de moléculas pró-angiogênicas dos *scaffolds*. Essas substâncias habilitam uma vascularização adequada na região onde o *scaffold* foi implantado e sua integração com o corpo do hospedeiro (RATHER; JHALA; VASITA, 2019).

Dessa forma, é de vital importância que no processo de desenvolvimento celular e formação tecidual que o *scaffold* desenvolva, juntamente com o tecido em

questão, uma rede vascular capaz de promover a nutrição adequada das células e excreção de seus metabólitos, do contrário células que se encontram no interior do *scaffold* morrerão por inanição ou necrose em função do acúmulo de toxinas. Atualmente, a principal forma de estímulo da angiogênese tem sido por meio de fatores de crescimento, como os fatores de crescimento para fibroblastos (FGFs); fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e células endoteliais (EC). No entanto, essas substâncias se mostraram efetivas até um certo ponto (SEO; JUNG; KIM, 2018). Além da extensão da área atingida pela vascularização nem sempre ser suficiente, algumas vezes a proliferação celular pode ocorrer em velocidade superior à formação do vaso, essa falta de sincronia pode determinar o insucesso da formação tecidual.

Com o intuito de resolver essa limitação, o desenvolvimento de estruturas com funções duais, ou seja, capacidade tanto de osteoindução e condução como de angiogênese e condução, tem sido estudado. Essa dupla funcionalidade pode ser através da capacidade de estímulo do próprio material como de sua capacidade de liberar fatores de crescimento para ambas situações, promovendo dessa forma sincronia de estímulo de células ósseas e endoteliais (RATHER; JHALA; VASITA, 2019).

3.5.1 HEMOCOMPATIBILIDADE

O contato de dispositivos biomédicos com o sangue pode provocar distúrbios no equilíbrio de fatores pró e anticoagulantes no sistema vascular. Esse equilíbrio é pré-requisito para uma circulação sanguínea estável, garantindo a todos os órgãos o suprimento adequado de nutrientes e oxigênio e também remoção de metabólitos. A perturbação desse equilíbrio pode levar à formação de trombos ou sangramentos, além de poder afetar órgãos vitais e distantes ao local de implante do material, através da distribuição de produtos originados do contato do biomaterial com o vaso pela corrente sanguínea. O motivo principal dessa alteração a partir da implantação de biomateriais no corpo humano deve-se ao fato de que, ao contrário do endotélio, esses materiais não possuem propriedades anticoagulantes e, ainda, podem possuir características superficiais que atuem como gatilhos coagulantes (MAITZ *et al.*, 2019).

A ativação dos mecanismos de defesa do sangue quando em contato com biomateriais representa um desafio na performance de dispositivos médicos em contato direto com a corrente sanguínea. A ativação da cascata de coagulação, mecanismos celulares inflamatórios e plaquetários estão entre as reações adversas do sangue que podem comprometer o funcionamento do biomaterial (BIRAN; POND, 2017). A hemocompatibilidade é a capacidade que um tecido ou material possui de não produzir no tecido sanguíneo, quando em contato com o mesmo, reações como coagulação e formação de trombos, impedindo assim seu fluxo natural. Essa é uma característica muito importante para os biomateriais, principalmente para este trabalho, que tem como um dos objetivos principais a formação de uma rede vascular funcional.

Alternativas para aumentar a hemocompatibilidade do material têm sido utilizadas e podem ser divididas em modificações de superfície passivas e ativas. As passivas tentam suprimir a adsorção de proteínas utilizando escovas hidrofílicas sem carga ou zwitteriônicas ou hidrogéis na superfície. Superfícies extremamente hidrofóbicas que evitam o molhamento por água ou sangue, têm sido sugeridas também para evitar a adsorção. As modificações ativas atuam promovendo propriedades anticoagulantes e fibrinolíticas na superfície do material (MAITZ *et al.*, 2019).

Atualmente, a celulose é utilizada em alguns procedimentos, onde ocorrem contatos diretos e permanentes com o sangue, como por exemplo nas membranas utilizadas no processo de hemodiálise. Para garantir a compatibilidade sanguínea com a celulose, especificamente, vários processos de modificação da superfície do material têm sido utilizados, tais como imobilização por heparina, alquilação das cadeias C₁₆-C₁₈, para realçar a adsorção de albumina e incorporação de moléculas de poli (etileno glicol) na superfície do material (ZHANG *et al.*, 2003). Um outro método já testado em laboratório trata da modificação da superfície da celulose através da utilização do monômero vinil zwitteriônico de amônio. Segundo Zhang *et al.* (2003), esse processo diminui a adesão de plaquetas ao material, aumentando assim sua hemocompatibilidade (ZHANG *et al.*, 2003).

Yuan *et al.* (2013) descrevem um outro método no qual promove-se a síntese de compostos associados à fosforilcolina, uma molécula intermediária na síntese dos fosfolipídios, capaz de aumentar a hemocompatibilidade pela diminuição de adesão de plaquetas e adsorção de fibrinogênio, proteína presente na formação dos

trombos (YUAN *et al.*, 2013). Park e Bronzino (2003), apontam a heparinização de superfícies dos materiais como o método de preferência quando se quer obter hemocompatibilidade, por ser bem tolerado pelo organismo e ser considerado um método seguro (PARK; BRONZINO, 2003). Entretanto, Peng, Li e Meng (2017) consideram que, apesar de a heparina ser o anticoagulante mais comumente usado tanto na prática clínica quanto na cobertura de superfície de biomateriais, apresenta desvantagens como alto custo e efeitos colaterais potenciais como hemorragia interna, rápida biodegradação e trombocitopenia, tornando inviável a sua utilização em larga escala. De acordo com este estudo, a capacidade anticoagulante da heparina está associada aos grupos carregados negativamente em sua estrutura molecular (carboxil e sulfônico), dessa forma esforços têm sido empregados na síntese de polímeros que contenham em sua estrutura os grupos sulfato, sulfamida e carboxilato, mimetizando a ação da heparina. Esses compostos possuem como vantagens sobre a heparina o baixo custo, propriedades anticoagulantes, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e promoção de adesão e crescimento celular (PENG; LI; MENG, 2017).

Além da heparinização, Park e Bronzino (2003) citam a cobertura da superfície com albumina, uma vez que estudos revelaram que superfícies resistentes à adesão de plaquetas possuem maior afinidade com a albumina; e cita também a preparação da superfície através da utilização de fibronectina, já que essa substância mimetiza uma superfície próxima ao do vaso sanguíneo natural (PARK; BRONZINO, 2003).

3.6 DECELULARIZAÇÃO DE TECIDOS

Diante dos desafios expostos até agora, uma nova técnica tem ganhado espaço no campo da engenharia de tecidos: a decelularização. Trata-se de um procedimento em que as células nativas do órgão e componentes relacionados a elas são removidos mediante processo químico ou físico, deixando apenas a matriz extracelular, que deverá ser recelularizada com as células de interesse. A composição original, estrutura e características macroscópicas da matriz extracelular, inevitavelmente sofrerão algum tipo de alteração. Assim, a busca pela otimização da técnica, em que o processo de decelularização preserve as características mais importantes da MEC, tem sido o objetivo principal das últimas

pesquisas (SHAKOURI-MOTLAGH et al., 2017). *Scaffolds* de materiais biológicos, compostos por matriz extracelular, são usados para facilitar a reconstrução e remodelação de órgãos, tanto em estudos pré-clínicos em animais quanto em aplicações humanas. A maior vantagem no uso de *scaffolds* de matriz extracelular natural está no princípio denominado “reciprocidade dinâmica”, existente entre as células e a matriz, que se caracteriza pela constante mutação da matriz em função do metabolismo celular, que por sua vez, sofre influência direta dos componentes da matriz (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011). Uma vez que os *scaffolds* derivados de matriz extracelular decelularizada mantêm a estrutura tridimensional do tecido nativo e pode prover a sinalização necessária na modulação da função celular, eles têm sido considerados superiores em termos de manutenção e guia no processo de diferenciação das células-tronco quando comparados às culturas de tecidos realizadas em estruturas de polímeros artificiais, por exemplo (TAYLOR et al., 2018).

Um dos primeiros exemplos de utilização de materiais decelularizados em tratamentos médicos, foram as válvulas cardíacas de origem bovina ou porcina. As válvulas ou próteses mecânicas possuem elevada durabilidade, entretanto requerem uso constante de anticoagulantes a fim de evitar trombozes ou embolias, o que pode ser diminuído com o uso das válvulas de origem animal. Válvulas aórticas de porco decelularizadas exibem grande potencial como *scaffolds* em função da similaridade com as válvulas humanas, contudo as taxas de sucesso na prática clínica são variáveis em virtude de antígenos residuais responsáveis por respostas imunológicas do receptor. Com isso, uma decelularização e efetiva remoção de componentes celulares antigênicos é um passo essencial, porque diminui os riscos de uma resposta imunológica adversa (LIU et al., 2018).

A submucosa do intestino delgado de porcos, é um exemplo de matriz extracelular natural, acelular rica em colágeno, largamente utilizada pela engenharia de tecidos. Além do colágeno, essa estrutura contém fatores biológicos ativos como glicosaminoglicanas, glicoproteínas (fibronectina) e fatores de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico -1 (EGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e insulina fator de crescimento-1 (IGF-1). Em função de sua rica composição e aprovação de uso já concedida pela *Food and Drug Administration* (FDA), tem sido implantado com sucesso em reconstruções de diferentes tipos de

tecidos, como reparação de feridas e substituição de tecido epitelial, reparo de defeito musculo facial na parede abdominal, reparo de vários tipos de hérnia, cirurgia de reto e cólon, aumento de bexiga e recuperação de pregas vocais sem cicatriz (LI *et al.*, 2017).

Estudos recentes demonstraram a importância da especificidade entre o *scaffold* biológico e as células que se pretende desenvolver. Células hepáticas, por exemplo, devem ser semeadas preferencialmente em *scaffolds* produzidos a partir da decelularização de um fígado, em virtude da interferência direta das células sobre a matriz e vice-versa (NIKLASON, 2018). Além disso, a própria topologia do órgão pode ser capaz de auxiliar no processo de fixação e desenvolvimento celular.

O objetivo principal da técnica de decelularização é realizar a remoção das células sem afetar a composição, a atividade biológica e a estrutura da matriz extracelular, conforme mostrado na Figura 2, por meio de métodos que podem variar desde a perfusão de agentes químicos ou enzimáticos até processos físicos como congelamento e agitação, que provocam o rompimento da membrana celular e permitem que os debris sejam removidos por meio de enxague. Em geral, a associação de métodos físicos e químicos é necessária para uma decelularização efetiva (FARAG *et al.*, 2018).

Figura 2: Decelularização de coração de porco durante 48 horas



Fonte: SEETAPUN; ROSS (2016)

Um estudo realizado por Park e Woo (2012) analisou a viabilidade de decelularização múltipla obtendo *scaffolds* biológicos de diversos órgãos, dessa forma é possível atender a demanda de vários pacientes ao mesmo tempo ou mesmo de um único paciente que necessite de vários órgãos, de forma mais efetiva (PARK; WOO, 2012). Bohac *et al.* (2018) utilizaram um novo método de decelularização para tecido epitelial de cadáveres humanos, para ser utilizado como enxerto em pacientes pós-mastectomia que serão submetidas ao implante de prótese. Nesses casos, em geral são utilizados enxertos autólogos de pele, porém

quando isso não é possível é necessário o uso de biomateriais para uma efetiva cobertura da prótese. Neste estudo a decelularização foi realizada utilizando somente agentes enzimáticos e quelantes, sendo finalizada em imersão em água destilada (BOHAC *et al.*, 2018)

3.6.1 RETICULAÇÃO

O processo de reticulação tem mostrado resultados encorajadores em relação à melhoria estrutural e durabilidade de matrizes decelularizadas. Esse procedimento tem sido considerado uma etapa necessária após a decelularização matrizes extracelulares de órgãos e tecidos (YAO, 2019). O principal objetivo da reticulação é melhorar as propriedades biomecânicas dos *scaffolds* através da formação de uma rede firme na matriz polimérica. Trata-se de uma ligação física ou química que conecta grupos funcionais de cadeias poliméricas por intermédio de ligações covalentes ou interações supramoleculares, como ligações iônicas e pontes de hidrogênio (ORYAN *et al.*, 2018). Esse procedimento promove melhoria das propriedades mecânicas e estabilidade em meio aquoso, porém a taxa de degradação pode sofrer diminuição, assim como mudanças na funcionalidade, reologia e provocando também aumento da citotoxicidade (ABBASIAN *et al.*, 2019).

As técnicas de reticulação podem ser divididas em três principais categorias: química, física e enzimática. Na reticulação química, utilizada neste estudo, as cadeias poliméricas se unem através de ligações covalentes, produzindo materiais estáveis. O glutaraldeído, solução de escolha deste estudo, é um dos agentes reticulantes mais utilizados em polímeros naturais devido à sua capacidade de reação com vários grupos funcionais (ex: amina e hidroxila) e prover materiais com melhora substancial de propriedades mecânicas (ABBASIAN *et al.*, 2019).

Diferente de sua aplicação em matrizes poliméricas, sua aplicação em tecidos ainda possui limitações, como por exemplo em estudos de envolvendo cirurgias cardiovasculares utilizando pericárdio bovino tratados. Alguns estudos avaliaram o impacto do glutaraldeído sobre elementos estruturais e bioquímicos de *scaffolds* cardiovasculares, indicando manutenção estrutural da MEC e seus componentes. Entretanto, as válvulas perdiam sua função devido à calcificação provocada por resposta imunológica (ZOUHAIR *et al.*, 2019).

3.7 MÉTODOS DE DECELULARIZAÇÃO

Uma breve consideração sobre os métodos de decelularização é necessária para justificarmos nossa escolha para este estudo.

3.7.1 MÉTODOS FÍSICOS

Com relação aos métodos físicos, o mais difundido e utilizado é o congelamento rápido. Nesse processo ocorre formação de cristais de gelo, que serão responsáveis pelo rompimento das membranas, provocando lise celular. Essa mudança rápida de temperatura deve ser controlada a fim de evitar que cristais rompam também a estrutura da MEC. A aplicação desse método em alguns tipos de tecido como a cartilagem auricular, se mostrou eficiente. Além do rompimento da membrana, a baixa temperatura induziu a apoptose de condrócitos e não foram detectadas alterações significativas na matriz extracelular. Esse processo diminui o tempo de exposição aos agentes químicos, que podem afetar as propriedades mecânicas da matriz extracelular (RAHMAN et al., 2018). Um segundo método físico é a pressão direta, em que diferentes gradientes de pressão são utilizados durante a perfusão dos tecidos, forçando a lise celular e o desprendimento de debris da matriz extracelular. Entretanto, é indicado somente para órgãos ocos como vasos sanguíneos e intestinos ou que não possuam a matriz extracelular muito densa, como o fígado, por exemplo (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). Alguns estudos demonstraram que a perfusão pulsátil é mais benéfica do que a perfusão de fluxo contínuo, em cirurgias cardíacas por exemplo, a perfusão pulsátil do sangue promove uma liberação maior de creatinina que resulta em um nível mais baixo de índice de lactato pós-operatório, preservando as funções renais. Dessa forma, acredita-se que o uso de perfusão pulsátil durante o processo de decelularização pode facilitar a chegada do detergente às células e conseqüentemente diminuindo o tempo de exposição das células ao detergente (PARK *et al.*, 2018).

Esse método também pode ser utilizado na delaminação de camadas de tecidos, que, em geral, é efetivo e provoca prejuízos mínimos à estrutura remanescente da MEC. Por fim, temos o método de agitação mecânica, que é utilizado isoladamente ou em associação com métodos químicos, auxiliando na lise celular e também na remoção dos debris. A agitação mecânica pode ser realizada através de placa de agitação magnética, agitador orbital ou rolo de baixo perfil,

entretanto ainda não existem estudos determinando qual a melhor frequência de agitação para remoção celular. Contudo, um limpador ultra-sônico padrão parece ter a mesma eficiência de um agitador orbital. Em todos esses procedimentos, frequência, velocidade, tipo e quantidade de reagente, dependerão do tipo de tecido em questão (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

3.7.2. MÉTODOS QUÍMICOS

Os métodos químicos contemplam diferentes tipos de substâncias, que podemos dividir nas seguintes classes: ácidas e alcalinas; detergentes iônicos, não iônicos e zwitteriônicos; tri (n-butil) fosfato; tratamentos hiper e hipotônicos; agentes quelantes; substâncias enzimáticas.

Durante os processos de decelularização, proteases podem ser liberadas pelas células rompidas. Por isso, em tratamentos químicos de longa duração, é recomendável a adição de inibidores de proteases ou soluções tampão, evitando que a alta concentração e longa permanência dessas substâncias causem danos à MEC. Outro fator que deve ser ressaltado relaciona-se à proliferação de bactérias durante longos processos de decelularização, o que levou ao acréscimo de antibióticos como a Estreptomicina, Anfotericina B e Penicilina a muitos protocolos. Entretanto, a permanência de resíduos de antibióticos no *scaffold* pode dificultar a regularização por agências controladoras, que podem considerá-lo um distribuidor de drogas ao invés de um dispositivo de crescimento celular (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

O procedimento TRICOL que combina choque osmótico, detergentes e endonucleases, tem sido considerado uma técnica promissora. Estudos utilizando válvulas cardíacas humanas decelularizadas por este método associado às células-tronco mesenquimais oriundas de medula óssea, resultaram em uma MEC que proporciona diferenciação celular guiada obtendo válvulas maduras. Além disso, estudos *in vitro* e pré-clínicos utilizando válvulas cardíacas porcinas tratadas através do TRICOL e reimplantadas em porcos, demonstraram potencial regenerativo após 15 meses, resultando em tecidos viáveis e funcionais assim como excelente performance hemodinâmica (ZOUHAIR *et al.*, 2019).

3.7.2.1. SOLUÇÕES PARA DECELULARIZAÇÃO

- **Substâncias ácidas e alcalinas:** atuam através da remoção dos componentes citoplasmáticos e ácidos nucleicos (RNA e DNA), porém, na maioria das vezes, não são eficientes quando utilizados isoladamente. Ácidos peracético, sulfúrico, hidrocloreídrico e hidróxido de amônia são eficientes na decelularização, porém costumam dissociar importantes moléculas da estrutura de colágeno, como as glicosaminoglicanas e também reduzem a quantidade de fatores de crescimento. (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).
- **Detergentes não-iônicos:** têm sido utilizados devido ao efeito suave que exercem sobre as estruturas da MEC. Suas ações se dão pela ruptura das ligações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína, contudo não exercem nenhum efeito sobre as ligações proteína-proteína, o que garante a manutenção de uma estrutura remanescente funcional. Um dos detergentes não-iônicos mais utilizados é o Triton X-100. Sua concentração e tempo de exposição variam com o tipo de protocolo e tecido, sendo utilizado com eficiência na remoção de resíduos do Dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente iônico (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).
- **Detergentes iônicos:** melhoram a remoção de estruturas citoplasmáticas e nucleares e são muito eficientes mesmo quando utilizados isoladamente, porém tendem a desnaturar proteínas através da quebra de ligações proteína-proteína. Os mais usados atualmente são o Dodecil sulfato de sódio (SDS), o deoxicolato de sódio e o Triton X-200, sendo os dois últimos mais agressivos à estrutura de colágeno remanescente. Os resíduos dessas substâncias podem ser prejudiciais ao material (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).
- **Detergentes zwitteriônicos:** a carga neutra dos seus grupos hidrofílicos protege a estrutura natural das proteínas durante o processo de decelularização. Os principais representantes dessa classe são o 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propano-sulfonato

(CHAPS) e sulfobetaína-10 (SB-10). Apesar da maior conservação da estrutura colágena, sua eficiência na remoção celular ainda é questionada (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

- **Tri (n-butil) fosfato:** é um solvente orgânico utilizado na inativação de vírus no sangue sem comprometer o fator de coagulação. Em alguns estudos, como os utilizados em tendões de ratos, demonstrou-se não possuir efeitos negativos sobre as fibras colágenas após o fim do processo de descelularização, entretanto resíduos de membranas celulares não foram eficientemente removidos (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).
- **Substâncias hipo e hipertônicas:** promovem a lise celular através da diferença de pressão osmótica. Para isso, podem ser usadas soluções como a água deionizada ou outra solução de baixa concentração iônica. Na maioria dos casos é necessária complementação com outra substância, como as enzimáticas, por exemplo, para remoção dos resíduos celulares (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).
- **Agentes quelantes:** EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e EGTA (ácido etilenoglicol tetra-acético) formam um complexo molecular em forma de anel, que se liga firmemente, e isola um íon metálico central. Essas substâncias atuam “sequestrando” cátions como o Ca^{2+} e Mg^{2+} , necessários à adesão das células à MEC. Os agentes quelantes são, geralmente, utilizados em associação com agentes enzimáticos ou outros detergentes visando assegurar a completa remoção de resíduos (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).
- **Agentes enzimáticos:** incluem digestão por proteases, agentes quelantes de cálcio e nucleases, a tripsina é uma das substâncias mais comumente utilizadas em protocolos de decelularização que envolvem agentes enzimáticos. Essas substâncias mostraram eficiência no

processo de lise celular, entretanto uma exposição prolongada pode ter como consequências a remoção de fibronectina, glicosaminoglicanas, e a indução de resposta imunológica pela dificuldade de remoção dos resíduos (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

3.8 DECELULARIZAÇÃO DE TECIDO VEGETAL

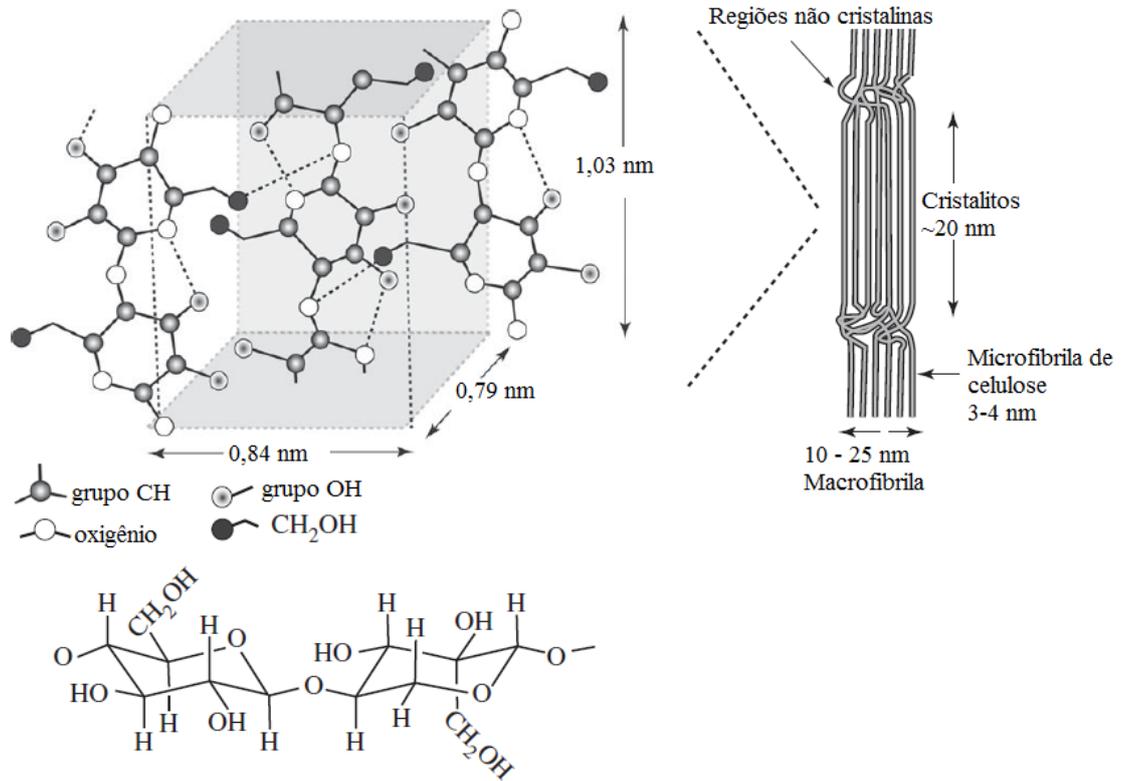
As paredes celulares dos vegetais são formadas basicamente por quatro componentes: celulose, hemicelulose, lignina e pectina. Dentre eles, o mais abundante e de maior importância no desenvolvimento deste trabalho é a celulose. A biocompatibilidade da celulose já foi comprovada quando de sua utilização em alguns materiais como membranas de reparação epitelial e para hemodiálise. No entanto, vale aqui lembrar que a biocompatibilidade pode ser alterada de acordo com local e finalidade que se pretende usar o material (MÜLLER *et al.*, 2006).

A celulose é um polímero natural, formado por uma longa cadeia monomérica de glicose. Essas cadeias formam microfibras que possuem regiões cristalinas e não-cristalinas, como mostra a Figura 3 (MÜLLER *et al.*, 2006). Essas fibrilas contêm domínios de celulose cristalina em sua superfície e ao longo de seu eixo principal, e é essa estrutura que é desconstruída, tanto por métodos físicos quanto químicos, no desenvolvimento de novos materiais (KRISHNAMACHARI; HASHAIKEH; TINER, 2011). Três grupos hidroxila (OH) estão ligados à celulose, sendo responsáveis pela compactação da estrutura cristalina e determinando as propriedades físicas da celulose. Nas fibras das plantas, a celulose pode ser encontrada também na forma amorfa ligada às estruturas cristalinas por meio de ligações inter e intramoleculares, o que proporciona resistência à variação térmica. Além disso, a celulose possui boas propriedades mecânicas, baixa densidade e biodegradabilidade. Devido à sua longa cadeia e alto peso molecular, é insolúvel em água (WULANDARI; ROCHLIADI; ARCANA, 2016).

Nos últimos anos, a celulose tem sido alvo de pesquisas e análises acerca de suas características favoráveis ao uso dessa substância no desenvolvimento de materiais, como membranas para hemodiálise. Um dos principais pontos de interesse está na sua resistência mecânica. De acordo com Gibson (2012), a celulose apresenta Módulo de Young de 130 GPa e resistência à tração de 1 GPa,

ambos valores expressivos para um polímero natural, que podem ser úteis em algumas aplicações, como na classe dos Biomateriais (GIBSON, 2012).

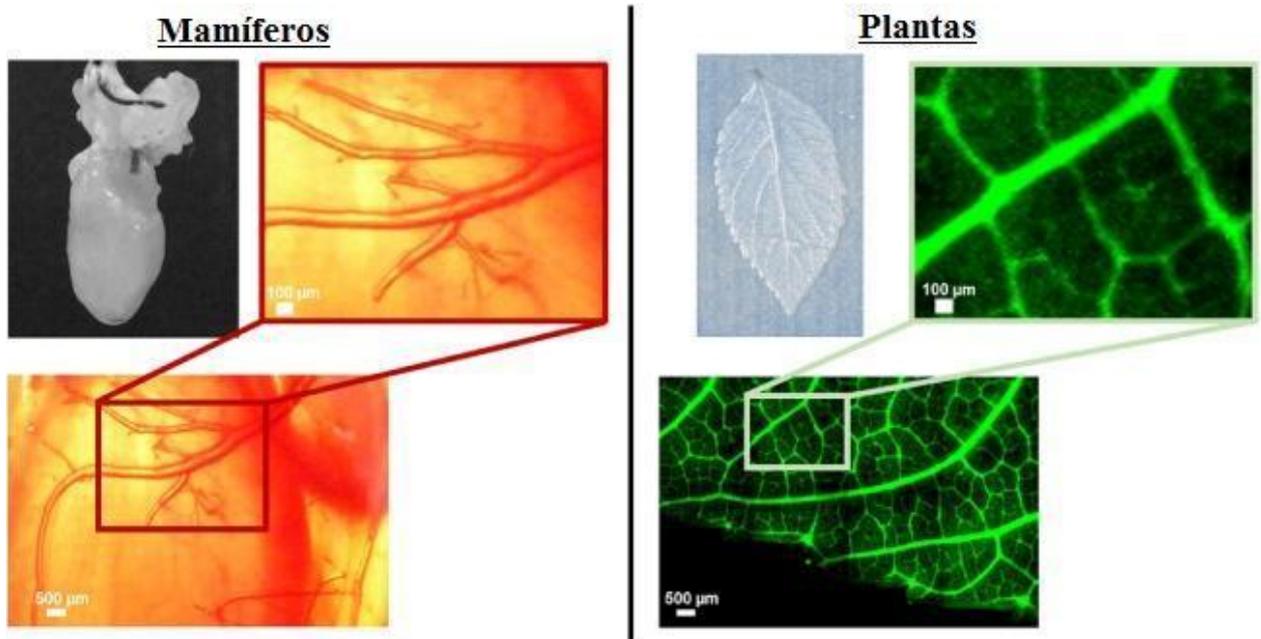
Figura 3: Estrutura molecular e microfibras de celulose



Fonte: GIBSON, L.J. (2012)

Scaffolds naturais decelularizados mantêm as propriedades mecânicas e estruturais do órgão ou tecido nativo, como resistência à tração e estrutura única de matriz extracelular. Contudo, a dificuldade de remoção de alguns componentes celulares que não participam do processo de adesão e migração celular, pode provocar respostas imunológicas indesejáveis (LUKANINA *et al.*, 2018). Em função disso, pesquisadores da Universidade de Winsconsin, Estados Unidos, desenvolveram uma pesquisa que trata da produção de *scaffolds* a partir do tecido vegetal. A principal motivação para o uso de plantas é a similaridade do sistema vascular destas com o dos mamíferos, ilustrado na Figura 4. Na pesquisa em questão, Gershlak *et al.* (2017) utilizaram o método de decelularização em folhas de espinafre com intuito de obter um *scaffold* de celulose previamente vascularizado (Figura 5).

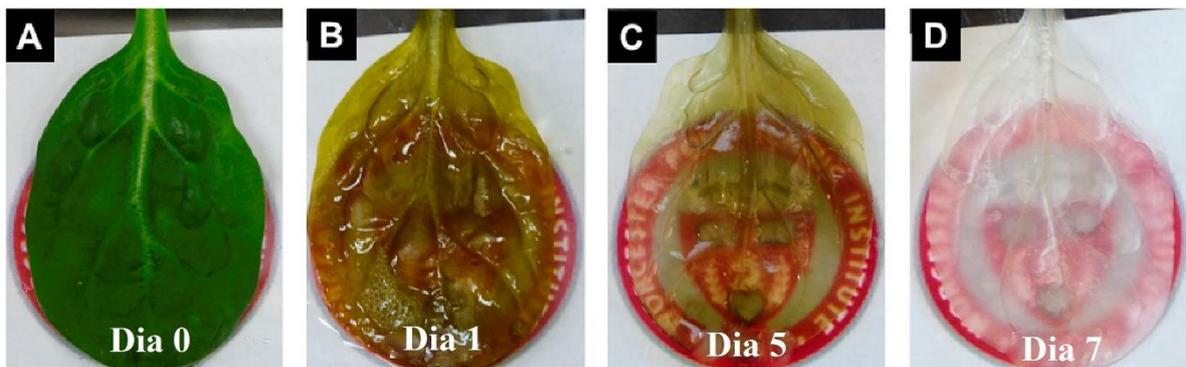
Figura 4: Comparação entre a rede vascular de mamíferos e vegetais



Fonte: GERSHLAK et al. (2017)

Uma estrutura pré-vascularizada permite que fatores de crescimento para angiogênese sejam utilizados como coadjuvantes e não como meio principal. Outra vantagem da utilização do tecido vegetal é a eliminação do dilema ético presente, tanto em relação à utilização de animais em pesquisas quanto em relação à utilização de tecidos humanos.

Figura 5: Espaço de tempo da decelularização da folha de espinafre



Fonte: GERSHLAK et al. (2017) (Adaptada)

Este estudo visa explorar os métodos utilizados pela pesquisa de Gershlak *et al.* (2017), porém com um objetivo distinto. Enquanto o tecido de interesse da pesquisa original era o cardíaco, foco desta pesquisa será regeneração de tecido ósseo, mais especificamente o periósteo. Além disso, busca-se avaliar se a concentração suficiente para decelularizar mantendo a estrutura da rede vascular, promove algum tipo de alteração nas características e propriedades do material.

3.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

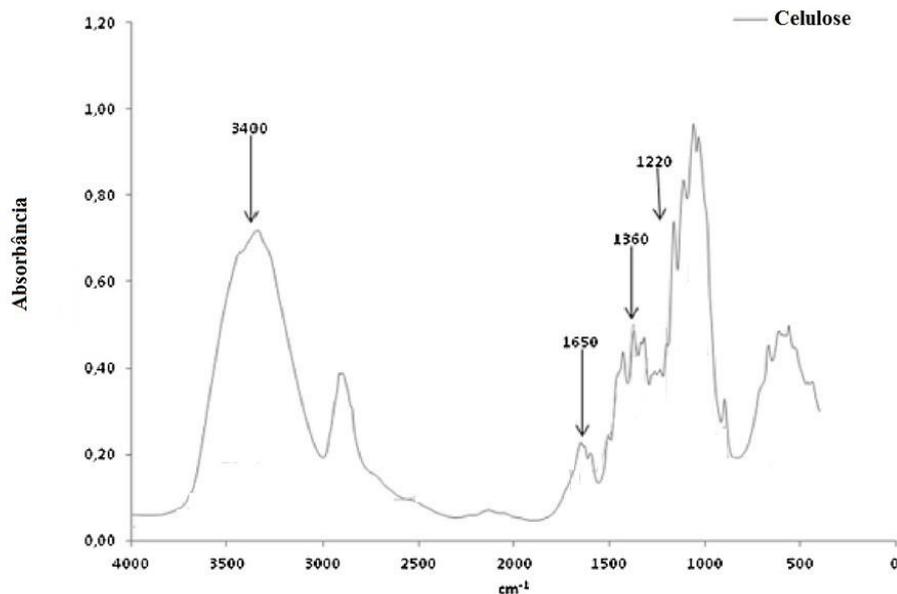
As amostras de tecido vegetal foram submetidas a procedimentos de caracterização, antes e após o processo de decelularização. Foram realizados: espectroscopia de absorção na região de infravermelho (FTIR); análise termogravimétrica (TGA); calorimetria exploratória diferencial (DSC); análise elementar e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaio de precipitação.

3.9.1 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho (FTIR)

Essa técnica é considerada uma das mais importantes técnicas experimentais para a caracterização de polímeros, em termos de identificação e/ou determinação de características estruturais, principalmente no que se refere a grupos funcionais e de ligações presentes na amostra. Além das informações qualitativas, a análise por FTIR permite a determinação semi-quantitativa de componentes de uma amostra ou mistura, esteja ela no estado sólido, líquido, gasoso ou em solução (não-aquosa). Entretanto, a energia do campo magnético cai exponencialmente à medida que aumenta a profundidade da amostra, assim esta técnica é praticamente limitada à obtenção de informação da superfície da amostra (HARDIN *et al.*, 2013).

Murphy e Pinho (1995), utilizaram o FTIR para determinação da presença de água em membranas celulósicas assimétricas em diferentes estados. A forma como as moléculas de água se apresentam em determinado material revelam muito sobre suas características como hidrofília e porosidade, de extrema importância quando se trata de material que requer um bom grau de perfusão (MURPHY; DE PINHO, 1995). A figura 6 é o resultado de uma análise de FTIR de celulose obtida pelo processamento de bagaço de cana-de-açúcar, e ilustra o comportamento esperado do material, os principais números de onda de absorção estão descritos na tabela 2(CANDIDO; GODOY; GONÇALVES, 2017).

Figura 6: Espectro de FTIR da celulose



Fonte: CANDIDO; GODOY; GONÇALVES (2017)

Tabela 2: Apresentando os grupos químicos em espectroscopia FTIR

Número de Onda	Grupo Químico
3400 cm^{-1}	Presença de grupos OH na estrutura da molécula
1650 cm^{-1}	Absorção de água
1360 cm^{-1}	Vibração entre ligações C-H
1220 cm^{-1}	Vibração entre ligações C-O

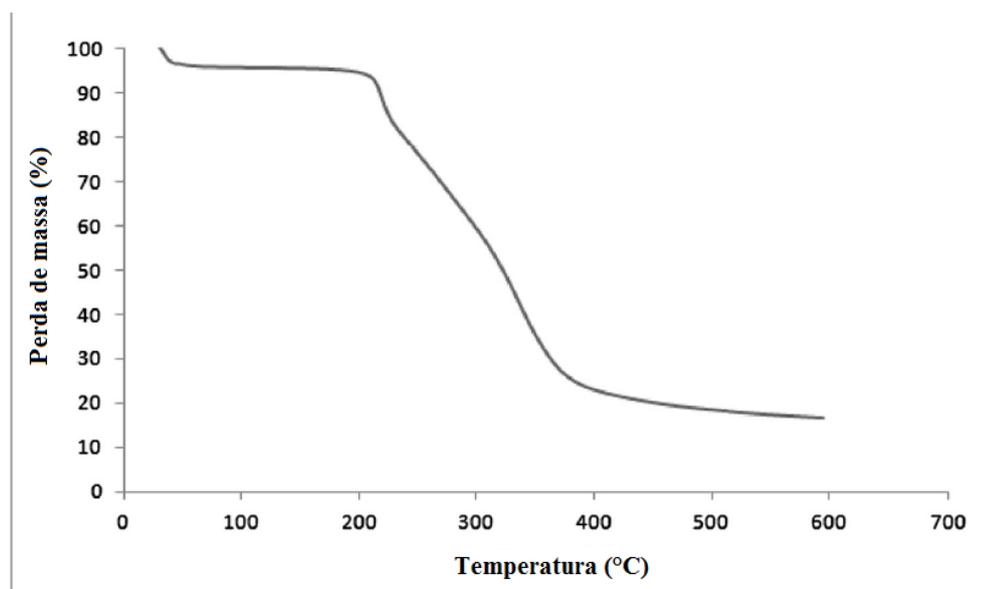
Esse procedimento possibilita uma análise do efeito do processo de decelularização sobre as cadeias poliméricas da celulose, por comparação das folhas nativas com as folhas decelularizadas.

3.9.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise térmica é o estudo da relação entre uma propriedade de uma amostra e sua temperatura quando a amostra é aquecida ou resfriada em um intervalo controlado de temperatura. A TGA é utilizada para estudo da decomposição térmica de substâncias orgânicas e inorgânicas e monitora reações químicas e conversões físicas, ocorridas durante o processo de aquecimento, detectando a mudança de massa em função da temperatura e tempo e o resíduo carbonizado (LOOF *et al.*, 2016). Em estudo recente desenvolvido por Loof *et al.* (2016), esta técnica de caracterização foi utilizada para comparação de amostras

de celulose pura com amostras após o processo de silanização, demonstrando a diferença de temperaturas das reações químicas nos dois produtos (LOOF *et al.*, 2016). A figura 7 mostra as alterações sofridas pela celulose em função da variação de temperatura (CANDIDO; GODOY; GONÇALVES, 2017).

Figura 7: Análise termogravimétrica da celulose



Fonte: Candido; Godoy; Gonçalves (2017)

30 – 200°C	Perda de água
200 – 380°C	Decomposição das cadeias de hemicelulose e lignina
380 – 600°C	Carbonização de produtos de degradação

Essa técnica permite avaliar a estabilidade térmica da amostra, sua composição e a estabilidade dos compostos intermediários, simulando um comportamento em temperaturas como a do corpo humano.

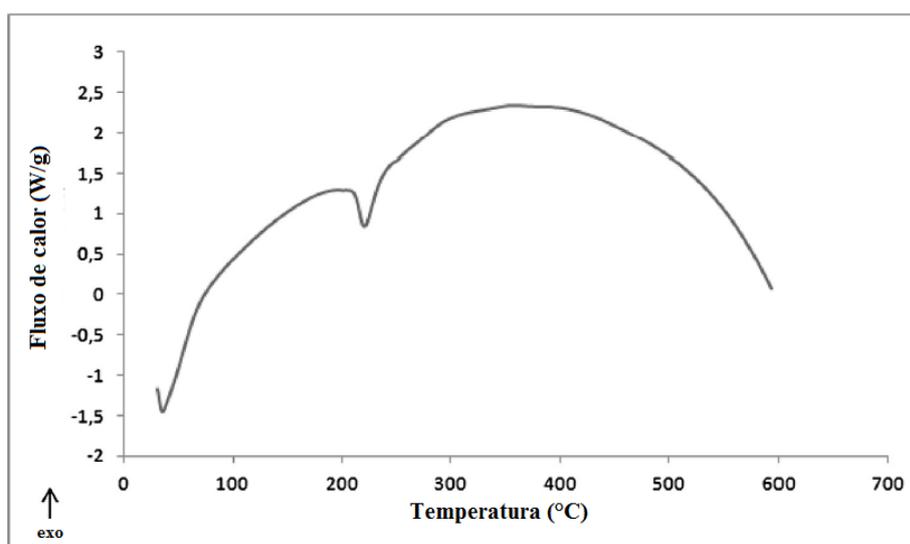
3.9.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

É uma técnica na qual a diferença de fluxo de calor entre a amostra e um material de referência é medida em função da temperatura por meio de um calorímetro diferencial. Por meio dessa técnica é possível identificar eventos endotérmicos ou exotérmicos ocasionados pelas transições de fases.

O DSC surgiu como um método no estudo da interação de polímeros e sistemas biológicos com solventes. Atualmente, os estudos preliminares da membrana de celulose e interação com a água são realizados aplicando-se

calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e análise termomecânica (TMA). Para determinação do estado da água nas membranas, são realizados exames de fusão e de comportamento de cristalização da água. Os resultados são relacionados às mudanças estruturais na fase polimérica resultante do inchaço provocado pela água (CIEŚLA; RAHIER; ZAKRZEWSKA-TRZNADEL, 2004). As alterações ocorridas na celulose pela aplicação desta técnica são mostradas pela figura 8.

Figura 8: Análise DSC da celulose



Fonte: Candido; Godoy; Gonçalves (2017)

32°C	Reação endotérmica – Transição vítrea
200°C	Reação exotérmica
217°C	Reação endotérmica – decomposição da celulose
300°C	Início de degradação das cadeias

Nesta pesquisa a importância da utilização do DSC está na determinação das temperaturas de cristalização e transição vítrea dos polímeros.

3.9.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica na qual a amostra é irradiada por um feixe de elétrons, diferente da microscopia ótica em que a irradiação se dá por um feixe de luz. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra uma série de radiações são emitidas, dentre elas, as de maior interesse são os elétrons secundários e retroespalhados. Os

elétrons secundários fornecem uma imagem de alta resolução da topografia da superfície da amostra, enquanto os retroespalhados fornecem imagem característica da variação da composição (MALISKA, 2011).

A celulose e, em especial, os nano compósitos celulósicos possuem uma ampla gama de características e compreender isso é o objetivo principal dos ensaios realizados com microscopia eletrônica. A escala variável de características relevantes é um problema a ser solucionado. Cristais individuais de celulose podem ter poucos nanômetros de largura, podem ter, no entanto, centenas de nanômetros de comprimento. Estes podem se agrupar ou agregar formando estruturas muito maiores, de várias centenas de microns de comprimento, e complexo entrelaçamento. Entrelaçamento este que pode afetar a força total e as propriedades de um dado composto sem afetar a química ou cristalografia de curto alcance da amostra. Dessa forma, é preciso ter cuidado para que os métodos de preparação não obscureçam essas características. (KRISHNAMACHARI; HASHAIKEH; TINER, 2011).

Por meio desta técnica, foi feita análise da existência de superfície de fraturas; caracterização micro estrutural; análise química qualitativa e quantitativa e identificação de fases, constituintes e segregações.

Tabela 3: Propriedades mecânicas da celulose e do osso cortical

Material	Densidade (kg m^{-3})	Módulo de Young (GPa)	Resistência à tração (MPa)
Celulose	1450-1590	120-140	750-1080
Osso cortical	1800 - 2000	15.2 -40.8	90

Fonte: Adaptado de Gibson, L. J. (2012)

3.9.5 Ensaio de precipitação

Fosfato de cálcio é o principal componente inorgânico dos tecidos duros como os ossos e os dentes, ele dá essas estruturas estabilidade, dureza e função. Sua formação biológica se dá através da precipitação de nano cristais em condições adequadas. O fosfato de cálcio possui excelente biocompatibilidade e

consequentemente possui aplicações biomédicas, especialmente em casos de regeneração de tecidos duros (SALAMA, 2019). Em 1980, Hench et al. demonstrou que uma camada rica em SiO_2 e fosfato de cálcio se forma na superfície dos chamados biovidros (Bioglass) quando implantados no corpo humano, permitindo a ligação ao osso vivo e, que a formação de um filme de fosfato de cálcio *in vivo* pode ser reproduzida em uma solução tampão de Tris hidroximetilaminometano e ácido clorídrico em pH 7,4. Em 1991, Kokubo *et al.* realizaram ensaios de precipitação em cerâmica A-W que foi submetida às análises de difração de raios X, FTIR, MEV e microscopia eletrônica de transmissão, onde pode ser observada uma superfície de apatita formada em SBF, estabelecendo assim que a bioatividade óssea de um material, ou seja, sua capacidade de se fundir ao osso vivo, pode ser mensurada através da formação da camada de apatita quando exposto à solução SBF (KOKUBO, T; TAKADAMA, H., 2006).

A utilização do fosfato de cálcio é de grande interesse quando se trata de engenharia de tecido ósseo devido à sua habilidade de imitar componentes inorgânicos de tecidos duros. Além disso, apresentam propriedades como porosidade, partículas de tamanho pequeno e estrutura mineral. Contudo, essas substâncias possuem desvantagens como baixa resistência mecânica, assim a associação com estruturas poliméricas tem sido cada vez mais empregada a fim de otimizar a estrutura final (ABBASIAN *et al.*, 2019).

Com esse ensaio, foi possível avaliar se o processo de decelularização interfere na capacidade de formação da camada de apatita, através da comparação de resultados entre folha nativa e decelularizada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia consistiu em processamento químico e posterior caracterização físico-química das amostras. Para comparação, amostras não submetidas ao processamento também foram caracterizadas.

4.1. Materiais

A planta de escolha para esse estudo foi o espinafre, *Spinacea Oleracea*, da ordem dos *cariofilales*, família *Chenopodiaceae*, adquiridas em mercado local. Para tanto foram utilizadas as folhas, que foram armazenadas em temperatura entre 5 e 7 °C antes do processamento.

As soluções escolhidas foram o dodecilsulfato de sódio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), detergente iônico que apresenta boa capacidade de solubilização de membranas plasmáticas, DNA e lipídeos e o Triton X-100, ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$), detergente não-iônico capaz de solubilizar proteínas sem alterar a estrutura da matriz extracelular.

Por fim, o enxágue foi realizado com água deionizada para remoção de debris celulares bem como dos resíduos dos detergentes. A escolha das soluções foi baseada no protocolo realizado por Gershlak *et al.* (2017), considerando a utilização do mesmo tipo de folha e na fragilidade do material a ser manipulado.

4.2. Caracterização físico-química das amostras

Espectroscopia de absorção na região de infravermelho (FTIR): As amostras foram analisadas em espectrofotômetro da Shimadzu Corporation, modelo IRPrestige-21, equipado com transformada de Fourier, FTIR-8400S e acessório ATR, no Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG). A técnica utilizada foi de 68 varreduras entre 4000 cm^{-1} e 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e intervalo de 2 cm^{-1} .

Análise Termogravimétrica (TGA): as amostras foram analisadas em equipamento SII EXSTAR, modelo TG/DTA 7200, no Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), em atmosfera dinâmica de nitrogênio, com vazão de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e taxa de aquecimento à razão de 10°C min^{-1} , em suporte de alumina, na temperatura compreendida entre 10°C a 900°C, cortadas em filmes ou membranas finas, em pedaços com área suficiente para cobrir a superfície interna do cadinho (~ 4 mm^2) e colocados em camadas com massa de 14,717 mg.

Calorimetria exploratória diferencial (DSC): as amostras, tanto de folhas nativas quanto tratadas, foram submetidas a análises térmicas, através da calorimetria exploratória diferencial (DSC), no equipamento SII EXSTAR, modelo DSC 7020, no Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), em atmosfera dinâmica de nitrogênio, com vazão de 50 mL.min⁻¹, taxa de aquecimento 2°C min⁻¹, com massa de até aproximadamente 7,3 mg, hermeticamente fechadas em cadinhos de alumínio, partindo de 30°C até 500°C.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): as amostras das folhas nativas e tratadas foram liofilizadas e cortadas e, em seguida, fixadas em porta amostra com fita dupla face. A seguir, foi procedida a metalização da amostra e, no caso deste estudo, foi realizada com fina camada de ouro por *sputtering*, necessário para que houvesse o contraste nas imagens. A análise foi feita com a utilização do equipamento SHIMADZU SSX-550, no Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG).

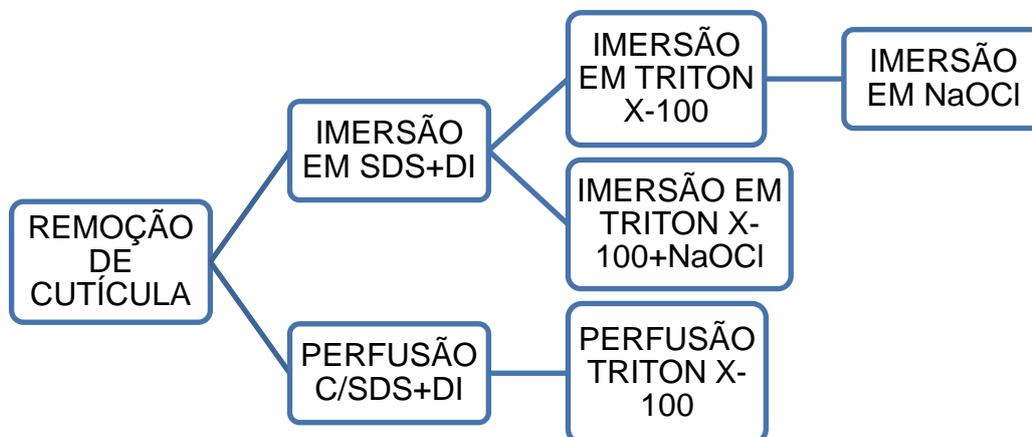
4.3. Metodologia

4.3.1 Processo de modificação química

Inicialmente as cutículas foram removidas através de tratamento com hexano 98% e solução tampão. Foram utilizados dois protocolos: (1) imersão das folhas nas soluções e (2) perfusão das soluções através das folhas, realizado por meio de cânula inserida no pecíolo conectada à reservatório contendo as soluções. No método 1 as folhas foram imersas em solução de 10 % (m/m) de dodecilsulfato de sódio em água deionizada, durante 4 dias e para o método 2 foi adotado o período de 5 dias de perfusão. Em seguida, para o método 1 foi utilizada solução preparada a partir da mistura de 1% (v/v) de Triton X-100 em solução de 10% (v/v) de hipoclorito de sódio em água deionizada, durante 48 horas e, para o método 2, solução de 0,1% (v/v) de Triton X-100 em água deionizada também por 48 horas. Ao final desse processo, as folhas foram submetidas a lavagem com água deionizada estéril durante 48 horas. A estocagem das folhas tratadas foi feita em água deionizada em temperatura de (4±2 °C).

O processamento químico foi dividido em dois momentos, um momento inicial onde as folhas são submetidas a tratamento para remoção da cutícula presente na superfície das folhas, e o segundo momento, através de uso de

detergentes iônicos e não-iônicos, sendo realizado tanto pelo método de imersão quanto pelo de perfusão. Cada ciclo tem duração média de 7 dias.



Para remoção da cutícula foi feita a imersão em hexano 98% e solução tampão, pH aproximadamente 7,0, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4: Experimento para remoção de cutícula de folhas vegetais por imersão

EXPERIMENTO	SOLUÇÃO	PH	TEMPO DE IMERSÃO
CUT 1	1 - Hexano 98%	5,0 + 0,1	30 minutos
CUT 2	1 - Hexano 98 %	5,0 + 0,1	15 minutos
	2 - PBS	7,0 + 0,1	10 minutos
CUT 3	1 - Hexano 98% + PBS (*)	5,7+ 0,2	30 minutos
CUT 4	1 - Hexano 98% + PBS (*)	7,0 + 0,1	10 minutos

(*) Adição de PBS até atingir o valor de pH pretendido. Fonte: Do autor

Após a fase inicial de remoção da cutícula, grupos de folhas foram submetidos ao processamento químico com detergentes por perfusão ou por imersão. O método de perfusão das soluções através das folhas foi realizado por meio de cânula inserida no pecíolo e conectada à reservatório contendo as soluções de estudo e o processo de imersão foi realizado com utilização de recipiente de polietileno contendo as soluções. A tabela 5 descreve a matriz de experimento dos protocolos utilizados. Ao final de todos esses processos, as folhas foram submetidas a lavagem com água deionizada estéril durante 48 horas. A estocagem das folhas foi feita em água deionizada em temperatura de $(4 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C})$.

Tabela 5: Experimento de degradação química na estrutura de folhas vegetais

EXP	MÉTODO	SOLUÇÃO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO
PERF	Perfusão	(1) - 10 % (v/v) de SDS em água DI	5 dias
		(2) - 0,1% (v/v) de Triton X-100 em água DI	2 dias
IME 1	Imersão	10 % (v/v) de SDS em água DI	5 dias
IME 2	Imersão	10 % (v/v) de SDS em água DI	4 dias
IME 3	Imersão	(1) - 10 % (v/v) de SDS em água DI	4 dias
		(2) - 1% (v/v) de Triton X-100 em solução 10% (v/v) de hipoclorito de sódio em água DI	2 dias
IME 4	Imersão	(1) - 10 % (v/v) de SDS em água DI	4 dias
		(2) - 1% (v/v) de Triton X-100 em água DI	3 dias
		(3) - 5% (v/v) de hipoclorito de sódio em água DI	1 dia
CONTROLE	FOLHA SEM NENHUM TIPO DE TRATAMENTO PRÉVIO		

Fonte: Do autor

4.2.1. Ensaio de reticulação com glutaraldeído (GA)

Amostras de folhas controle foram submetidas ao processo de reticulação através de imersão em solução de glutaraldeído 25% em água deionizada, diluída para concentração de 2% (m/v) e mantidas por período de 24 horas quando foram enxaguadas, sendo definidas como amostras CONTROLE-GA. Parte dessas amostras foi submetida ao processo de decelularização conforme protocolo IME3, sendo definidas como IME3-GA.

4.2.2. Ensaio de precipitação (SBF)

Amostras de folhas CONTROLE e do protocolo IME3 foram imersas em 10 ml de solução SBF preparada de acordo com protocolo descrito por Kokubo e Takadama (2006) e acondicionadas em estufa com circulação de ar, CIENLAB em temperatura aproximada de 37°C, durante 21 dias. A tabela 6 apresenta a matriz de experimentos das amostras submetidas ao ensaio de imersão em SBF.

Tabela 6: Matriz de experimentos de amostras submetidas a ensaio SBF

AMOSTRA	PROTOCOLO DE DEGRADAÇÃO	TEMPO DE IMERSÃO EM SBF (DIAS)
CONTROLE	NENHUM	0
CONTR-SBF-7		7
CONTR-SBF-21		21
IME3	IME3	0
IME3-SBF-7		7
IME3-SBF-21		21

Fonte: Do autor

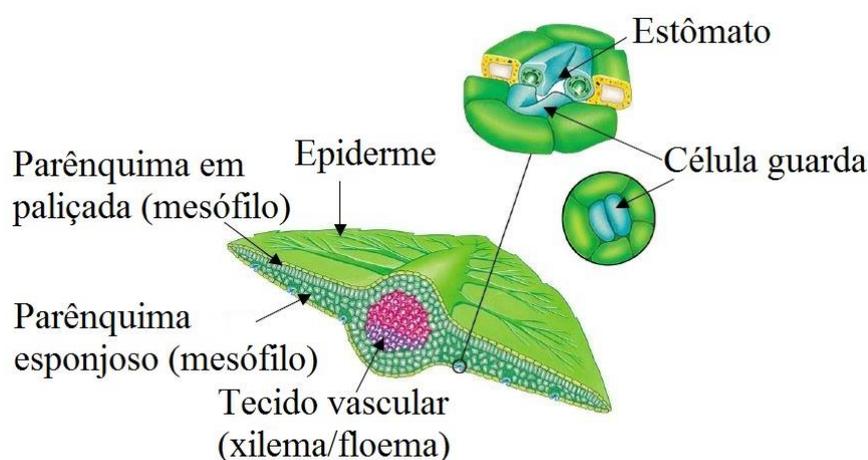
As amostras foram analisadas para os períodos de 0, 7 e 21 dias, com renovação da solução a cada 7 dias. Após completo o prazo de imersão, as amostras foram secas em dessecador para posterior caracterização.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tratamento químico de tecido vegetal

Apesar da espessura, as folhas são compostas por várias camadas de células que podem ser melhores vistas através de um corte transversal. A camada mais superficial é a epiderme, que protege a folha contra desidratação e é coberta por uma camada cerosa denominada cutícula. A segunda camada é o parênquima em paliçada, onde estão presentes as células responsáveis pela fotossíntese; a terceira camada é o parênquima esponjoso. A figura X mostra um corte transversal da folha evidenciando as camadas.

Figura 9: Ilustração de corte transversal da folha



Fonte: ESALQ, USP (Adaptada)

A descrição qualitativa de análise visual e de resistência à manipulação realizada nas amostras submetidas aos vários testes para remoção da cutícula das folhas estudadas é apresentada na tabela 7.

Tabela 7: Aspecto qualitativo de amostras submetidas à protocolos de remoção da cutícula.

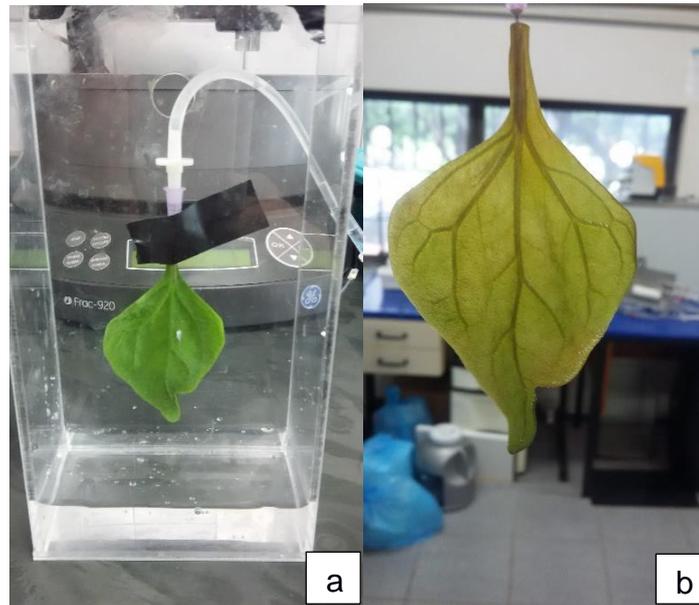
EXP	ASPECTO VISUAL	RESISTENCIA À MANIPULAÇÃO
CUT 1	Alteração marcante na textura	Baixa
CUT 2	Alteração marcante na textura	Baixa
CUT 3	Alteração menos evidente na textura	Intermediária
CUT 4	Remoção da cutícula sem alteração expressiva na textura	Próxima à resistência inicial

Fonte: Do autor

As primeiras imersões foram realizadas em solução pura de hexano (CUT 1), ao final desse processo as folhas apresentavam baixa resistência à manipulação bem como alteração da textura, menos rígidas. Em CUT 2, foi acrescentado imersão da folha em solução tampão com o objetivo de neutralizar os efeitos do hexano, sem alterações no resultado obtido em CUT 1. A partir de CUT 3, a solução utilizada era composta por proporção de hexano e solução tampão, até obter pH próximo de 7 e com ajustes do tempo de exposição. No experimento CUT 4, apesar do ajuste do pH, ainda foram observadas alterações estruturais na folha as quais foram atribuídas ao tempo longo de exposição à solução. O resultado mais próximo do ideal, com perda da camada cerosa presente na superfície da folha, sem alteração significativa da textura original e da resistência à manipulação, foi observado com solução de pH descrito em CUT 4, definido como protocolo de escolha para remoção de cutícula.

Durante a realização do protocolo PERF, alguns problemas foram identificados como a dificuldade de perfusão em algumas folhas, apesar de serem utilizadas sempre a mesma espécie, algumas ofereciam maior resistência à entrada do líquido na rede vascular; à medida que o processo ocorre o aumento do peso da folha pela entrada do detergente bem como a umidificação do pecíolo, torna mais difícil sua sustentação na agulha; e também o tempo suportado pela folha exposta variando de acordo, principalmente com a umidade relativa do ar. A figura 10 mostra os resultados obtidos pela técnica PERF. Na figura 10(a) está a imagem da folha no início do processo de perfusão, em 10(b) a imagem da folha após a primeira etapa de perfusão com dodecilsulfato de sódio. O processo de degradação da amostra impossibilitou a sequência de perfusão com a solução de Triton X-100, descrita anteriormente. Por não obtermos amostras satisfatórias quanto a avaliação de perda de pigmentação, bem como grau de degradação aceitável para realização de ensaios posteriores, o grupo não foi caracterizado.

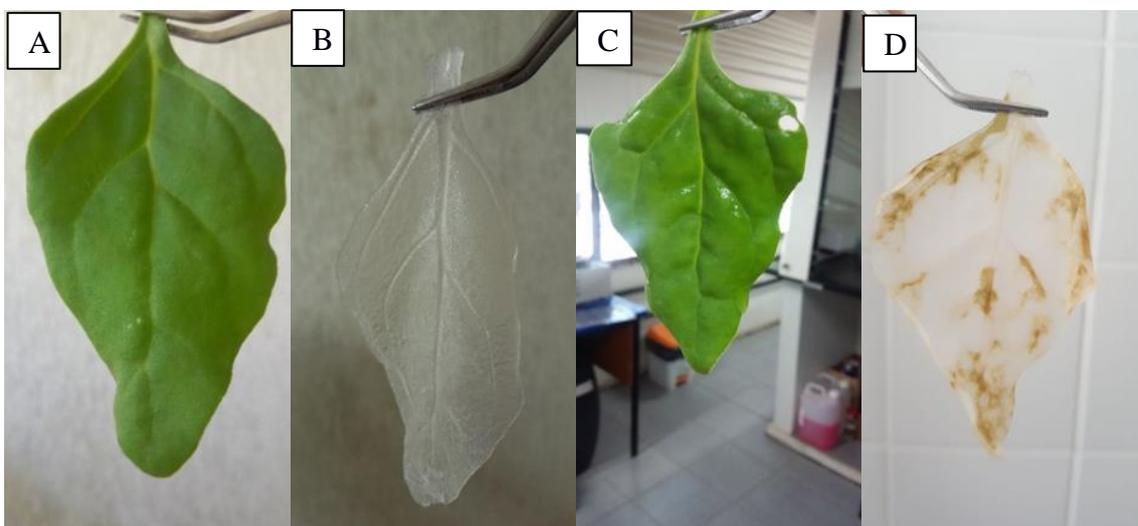
Figura 10: Resultado obtido pelo método de perfusão



Fonte: Do autor

Por se tratar de um material natural e biológico, passível de degradação, a análise visual e o comportamento à manipulação, nortearam as alterações de tempo de exposição e concentração de soluções conforme descritos nas tabelas 4 e 5. O resultado obtido através da utilização do protocolo IME3, como mostra a figura 11(A) e (B), demonstrou ser o mais adequado pela completa remoção dos pigmentos associada a manutenção de características como resistência à manipulação. A figura 11 compara os resultados dos protocolos IME 3 (A e B) e IME 4 (C e D).

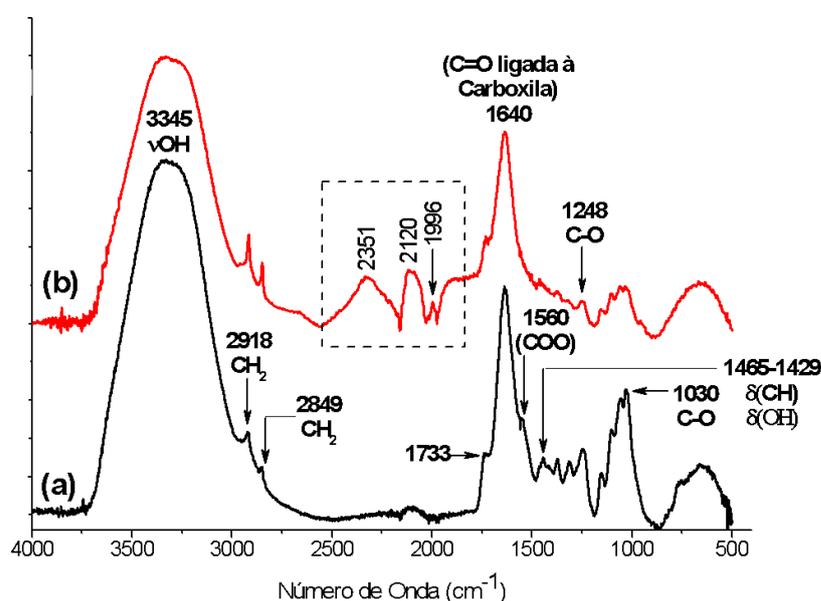
Figura 11: Comparação dos resultados IME 3 e IME 4. Amostra CONTROLE (A); IME3 (B); CONTROLE (C); IME4 (D).



Fonte: Do autor

As amostras controle e as obtidas após protocolo IME3 descrito anteriormente, foram submetidas à análise no FTIR com o intuito de, através da interpretação espectral da vibração dos átomos, avaliar indicações sobre mudanças estruturais, sobre efeitos de conjugação, os efeitos de ligação do hidrogênio e os acoplamentos com outras vibrações normais da amostra. A figura 12 compara os gráficos de FTIR de amostras CONTROLE e IME3, para melhor comparação as curvas foram deslocadas e a escala suprimida.

Figura 12: Análise FTIR amostras CONTROLE e IME3. Amostra CONTROLE (a); amostra IME3 (b).



Fonte: Do autor

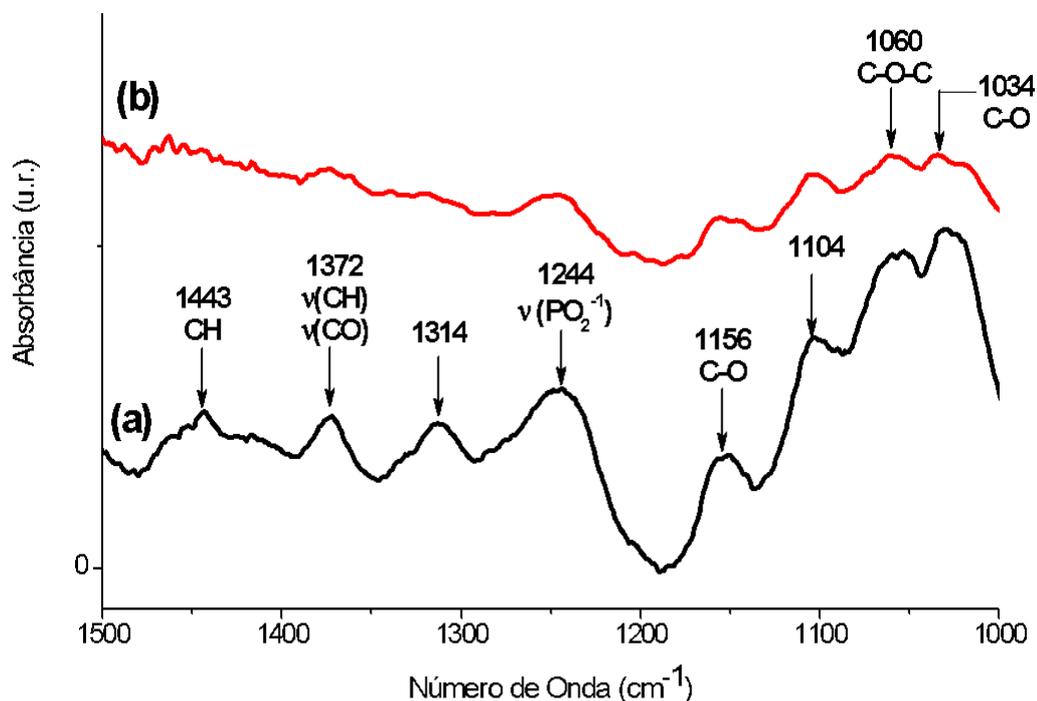
Analisando os resultados obtidos por FTIR, verificamos que as bandas posicionadas em 3330, 2921 e 2850 cm^{-1} estão presentes em amostras com e sem tratamento para decelularização. A banda em 3330 cm^{-1} pode ser associada à grupos OH ou à água adsorvida, e se mostra com elevada intensidade em ambas amostras, entretanto para amostras submetidas ao protocolo IME3 foi observada redução na sua intensidade, podendo sugerir que o processo possa ter removido parte da estrutura da folha que mantinha ligação com moléculas de água ou quebrado parte da celulose, com diminuição da sua massa. Outra banda posicionada em 1636 cm^{-1} , que também pode ser associada ao grupo OH da água

apresentou redução para amostras IME3 (HOKKANEN et al., 2016; NGUYEN; PHAN; SEN, 2016).

Outro ponto de destaque é a presença das bandas posicionadas em 2918 e 2849 cm^{-1} , que podem ser associadas aos grupos CH e CH_2 e se mostraram mais evidentes nas amostras submetidas ao tratamento, podendo indicar a ocorrência da quebra de parte da estrutura da celulose, com abertura da estrutura cíclica, mas também permitindo supor a presença de resíduos dos reagentes utilizados que apresentam cadeia carbônica em sua estrutura, como é observado para o SDS e para o Triton (ANTONY; SHERINE; RAJENDRAN, 2010; HARDIN *et al.*, 2013; HOKKANEN *et al.*, 2016; NGUYEN; PHAN; SEN, 2016; QIU,L; LI, XY; LIU, P.; FAN, SG.; XIE, MH.; LIU, RM.; ZHOU, LZ; WANG, 2014). Importante destacar que a presença de resíduos desses reagentes também pode induzir a redução do teor de água o que estaria em conformidade com a redução da banda hidroxila.

Ainda na análise do FTIR, verificaram-se uma série de bandas posicionadas entre 1640 e 1000 cm^{-1} que demonstraram clara redução nas suas intensidades para amostras submetidas ao processo IME3, quando comparadas com as amostras CONTROLE. Como exemplo temos a banda 1443 cm^{-1} do estiramento C-H, a banda 1059 cm^{-1} do estiramento C-O e a banda 1030 cm^{-1} do estiramento C-OH, que podem ser associadas à carboidratos da celulose ou polissacarídeos da parede celular, o que corrobora a eficácia do método utilizado uma vez que houve diminuição deste pico na amostra IME3. Além disso, algumas bandas associadas à grupos químicos relacionados aos conteúdos celulares que tiveram redução na sua intensidade, como é o caso de 1244 cm^{-1} que pode ser associado a grupos PO_2^{-1} de ácidos nucléicos e a banda 1059 cm^{-1} que pode ser associada à PO_2^{-1} de fosfodiéster e desoxirribose de ácidos nucléicos, conforme pode ser observado na figura 13 que mostra destaque do FTIR compreendido na região entre 1500 e 1000 cm^{-1} .

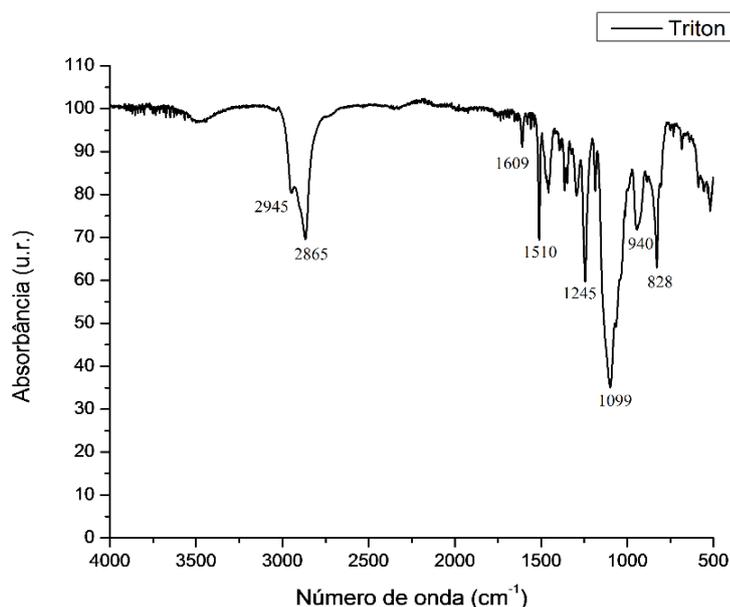
Figura 13: Análise FTIR amostra CONTROLE (a) e tratada por IME3 (b) ampliada na região compreendida entre 1500 e 1000 cm^{-1}



Fonte: Do autor

Algumas bandas que não estavam presentes na amostra CONTROLE aparecem no FTIR de amostras IME3, como as observadas em 2334 cm^{-1} e em 1995 cm^{-1} , que a princípio, foram associadas ao reagente Triton X-100, conforme verificado em espectro disponível no sítio eletrônico da empresa Sigmas Aldrich. Contudo, em espectro de FTIR obtido por meio de análise de amostra do reagente utilizado neste estudo, não foram identificadas as bandas em questão, conforme figura 14. Além dessas bandas citadas, o espectro da empresa mostra uma série de vibrações entre 2000 e 1650 cm^{-1} associadas ao anel benzênico que não se mostraram evidentes no FTIR das amostras de folhas tratadas com o Triton. Dessa forma quando verificadas outras vibrações frequentemente presentes em espectros de FTIR do Triton, posicionadas entre 1450 e 800 cm^{-1} observou-se que essas bandas também apresentaram vibração em menor intensidade, podendo indicar que tais bandas não sejam associadas ao Triton. Dessa forma, outra possibilidade para a banda posicionada em 2300 cm^{-1} seria associada à presença de CO_2 que vibra nessa região e que poderia estar presente nos vazios do interior da estrutura tridimensional das folhas.

Figura 14: Análise FTIR do Triton X-100



Fonte: Do autor

Aspecto interessante do gráfico FTIR foi associado às bandas que podem ser associadas à ácidos graxos, lipídeos e ácidos nucleicos, que estiveram presentes em amostras CONTROLE e se apresentaram diminuídos após a realização do tratamento. A tabela 8 sugere vibrações de grupos presentes na estrutura da folha composta por celulose que apresenta vibrações antes e após o tratamento. Sugestivo da manutenção da estrutura da folha.

Tabela 8 – Principais modos vibracionais que tiveram intensidade elevada tanto em amostras CONTROLE como em amostras submetidas ao protocolo IME 3.

Frequência (cm ⁻¹)	Grupos Químicos	Materiais Associados	Referências
3330	Estiramento O-H água adsorvida	H ₂ O e Celulose	Hokannen,S. et al. Nguyen, H.M. et al. Hardin, J.A. et al.
2921-2850	Estiramento CH ₂ e CH ₃	Celulose, lipídeos, SDS, Triton	Nguyen, H.M. et al. Hokannen,S. et al. Hardin, J.A. et al. Antony, N. et al. Qiu,L. et al.

Fonte: Do autor

Além disso, outras bandas como as indicadas na tabela 9 foram observadas antes e após o tratamento, mas com redução para folhas tratadas, sugestivas de degradação de parte da estrutura além das reações de conteúdos celulares.

Tabela 9 – Principais modos vibracionais que tiveram intensidade reduzida nas folhas submetidas ao protocolo IME3

Frequência (cm ⁻¹)	Grupos Químicos	Materiais Associados	Referências
1636	Dobramento O-H (molécula de água) e C=O de amida	H ₂ O, Celulose, Triton e proteínas	Hokannen, S. et al. Hardin, J.A. et al. Qiu, L. et al.
1443	Deformação C-C e CH	Celulose, Carboidratos, Triton e SDS	Hokannen, S. et al. Qiu, L. et al.
1372	Deformação CH e CO	Anéis polisacarídeos da celulose, SDS, Triton, lipídeos	Hokannen, S. et al. Hardin, J.A. et al. Wulandari, W.T. et al. Qiu, L. et al.
1244	Estiramento de PO ₂ ⁻¹	Ácidos nucleicos	Qiu, L. et al.
1155			
1103			
1059	C-O-C, CO e PO ₂ ⁻¹	Piranose, Celulose, fosfodiéster e dexoxiribose de ácidos nucleicos	Wulandari, W.T. et al.
1030	COH	Celulose	Hardin, J.A. et al. Qiu, L. et al.

Fonte: Do autor

Algumas vibrações indicadas em 8 e 9 podem ser associadas aos sabões SDS, entretanto os picos associados ao enxofre tiveram redução, bem como o EDS não identificou o enxofre, sugerindo que esse reagente possa ter removido parte dos conteúdos celulares e foi removido da estrutura. A tabela 10 indica vibrações que apareceram de forma isolada em amostras CONTROLE ou IME3.

Tabela 10 – Principais modos vibracionais que aparecem de forma isolada ou em amostras CONTROLE ou em amostras submetidas ao protocolo IME3

Frequência (cm ⁻¹)	Grupos Químicos	Materiais Associados	Referências
2334	CO ₂	Atmosfera de poros na folha tratada	Nguyen, H.M. et al.
1995			
1550	NH e CN de amida II	Proteínas das folhas nativas	Qiu, L. et al.

Fonte: Do autor

Os picos diferenciados nas análises de FTIR e a alteração no padrão de vibração dos átomos podem estar relacionadas diretamente ao potencial do material de proporcionar maior ou menor adesão celular. Segundo Rahmati e Mozafari (2018), o caráter hidrofílico ou hidrofóbico dos polímeros, está relacionado à presença de diferentes densidades de grupos hidroxila e amino presentes na superfície (RAHMATI; MOZAFARI, 2018). Estudos com plaquetas, fibroblastos e células epiteliais demonstraram que as propriedades do substrato de alguma forma modulam a habilidade de proteínas adsorvidas de interagirem com as células (RATNER *et al.*, 2013). De acordo com Lopes *et al.* (2018), a conformação das proteínas necessárias para adesão celular na matriz, como fibronectina, está diretamente ligada ao substrato químico do biomaterial. A ligação de integrinas, receptores presentes nas membranas celulares, a cada substrato após a adsorção da fibronectina foi caracterizada e algumas diferenças observadas como: substratos com presença de OH e NH₂, promovem maior ligação das integrinas do tipo $\alpha 5 \nu 1$; substratos com presença de COOH em sua superfície melhoram a adesão de integrinas dos tipos $\alpha 5 \nu 1$ e $\alpha \nu \beta 3$; enquanto as ligações CH₃ não promovem adesão de nenhum tipo de integrina. Este fenômeno leva a uma modulação distinta de adesão local e sua respectiva sinalização celular para cada substrato, resultando em potenciais distintos de diferenciação osteogênica. Substratos com presença de grupos OH e NH₂ fazem com que osteoblastos imaturos aumentem expressão gênica para marcadores osteogênicos como sialoproteína e osteocalcina, promovendo a deposição de grande quantidade de matriz mineralizada (LOPES *et al.*, 2018).

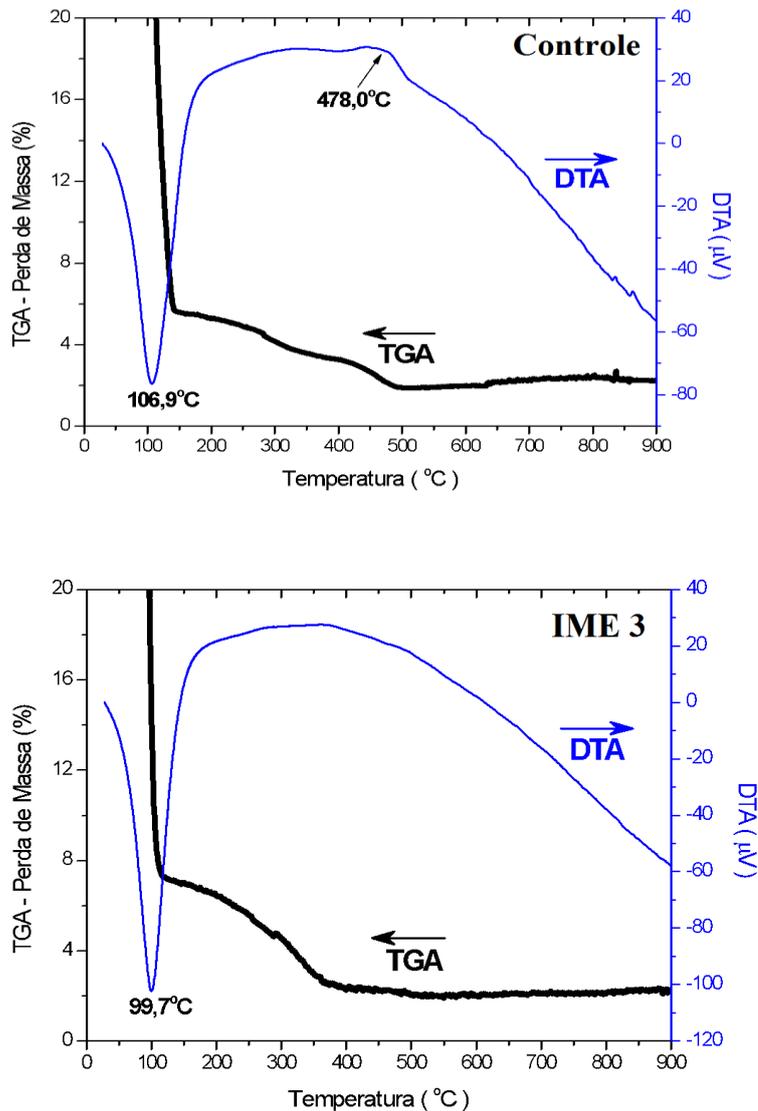
Pesquisas recentes demonstraram que além de hidrofobia/hidrofilia, a superfície funcional dos grupos também tem grande impacto nas respostas de proteínas e células. Os grupos de maior prevalência de interações com polímeros

são carboxila (-COOH), hidroxila (-OH), amino (-NH₂) e grupos metila (-CH₃). Um estudo realizado com diferentes *scaffolds* com base polimérica, buscou avaliar a relação entre a capacidade de adsorção de fibronectina e a cadeia ramificada presente no polímero, metil, butil, etil ou hexil. Os resultados identificaram que a densidade de fibronectina adsorvida nos diferentes tipos de substratos foi a mesma, a alteração sofrida foi em relação à distribuição na interface (RAHMATI; MOZAFARI, 2018).

A partir das análises de FTIR realizadas neste estudo, percebemos que a vibração de picos relacionados ao grupo CH₃, relacionado à adesão plaquetária e ativação de sistema imunológico por vários estudos, sofreu aumento. Entretanto, Sperling et al. (2009) através de ensaios com superfícies tratadas com tióis e possuindo diferentes concentrações de grupos -COOH e -CH₃ e expostos ao plasma sanguíneo concluíram que, não só a presença desses grupos em maior ou menor proporção é capaz de determinar o caráter trombogênico e imunogênico do biomaterial. Tratando mais especificamente da hemocompatibilidade, as cascatas de coagulação possuem diferentes tipos de ativação e a carga predominante do material bem como suas características hidrofílicas ou hidrofóbicas, têm influência direta na adesão plaquetária ou ativação de fatores como a trombina (SPERLING et al., 2009).

Foram realizadas análises térmicas de amostras CONTROLE e folhas submetidas ao protocolo definido no experimento IME3. Os resultados apresentados referem-se à perda de massa registrada para as amostras com o aumento da temperatura até 900°C e são mostrados na figura 15.

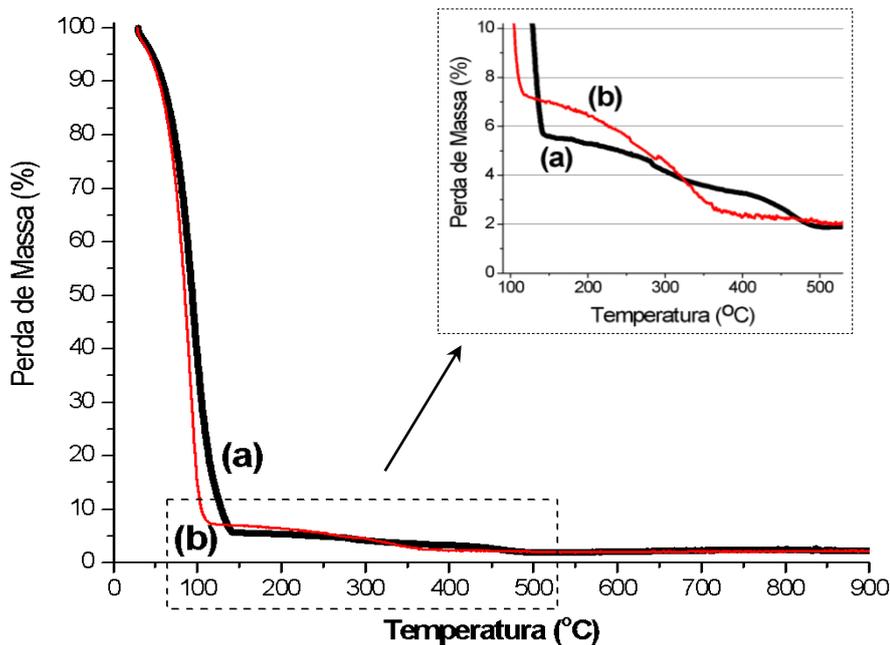
Figura 15: Curvas termogravimétricas das amostras CONTROLE e IME3



Fonte: Do autor

O comportamento das amostras, quando aquecidas, foi dividido em três estágios principais para amostras CONTROLE e em quatro estágios principais para amostras de folhas do experimento IME3. As temperaturas foram definidas para o fim do primeiro estágio, com base na mudança das inclinações verificadas pelos gráficos de termogravimetria, definidos em 142°C para amostra nativas e em 117°C para amostra IME3. O primeiro estágio das amostras CONTROLE (30 à 142°C) apresentou perda na faixa de 94,3% da massa, enquanto pra amostras IME3 (30 à 117°C) o valor foi de 92,7% de perda de massa. Essa faixa de temperatura é amplamente associada com a liberação de água.

Figura 16: Curva DSC das amostras CONTROLE (a) e IME3 (b).



Fonte: Do autor

Considerando a massa presente após a desidratação das amostras, temos que o valor para CONTROLE corresponde à 5,7g e a amostra IME3 corresponde à 7,3g. Entretanto, apesar de as amostras CONTROLE apresentarem valores maiores de substâncias voláteis, em torno de 94,3%, até a faixa de 142°C de temperatura e as folhas submetidas ao experimento IME3, os valores de voláteis serem de 92,7, ou seja, as massas de material seco foram menores para as folhas nativas quando comparadas às folhas tratadas. Temos que, quando comparamos as razões dos valores de voláteis pelos valores das massas secas correspondentes das amostras, temos que as razões foram de 16,5 vezes e 12,7 vezes para as amostras CONTROLE e as amostras IME3, respectivamente. Esses dados sugerem que as folhas nativas, certamente com maiores valores de massas secas, bem como maiores razões de água resultaram em proporções absolutas menores, quando comparadas com folhas tratadas, que tiveram remoção de parte da sua estrutura combinado com o menor arraste de água para essa nova condição, o que resultou em valores distorcidos. Devendo assim, ser considerado mais preciso para a comparação as razões de voláteis por massa seca.

Tabela 11 – Sumário da Análise Térmica de Amostras CONTROLE

	Perda de Massa (%)		
	De 30°C até 142°C	De 142°C até 500°C	Resíduo
CONTROLE	94,3	3,8	1,9

FONTE: Do autor

Tabela 12 – Sumário da Análise Térmica de Amostras do Protocolo IME3

	Perda de Massa (%)			Resíduo
	De 30°C até 117°C	De 117°C até 364°C	De 364°C até 500°C	
Protocolo IME3	92,7	4,7	0,5	2,1

Fonte: Do autor

Tabela 13 – Resumo da análise termogravimétrica

CONTROLE	Temperatura	De 30°C até 142°C	De 142°C até 500°C	Resíduo	
	Perda de massa (%)	94,3	3,8	1,9	
Protocolo IME3	Temperatura	De 30°C até 117°C	De 117°C até 364°C	De 364°C até 500°C	Resíduo
	Perda de massa (%)	92,7	4,7	0,5	2,1

Fonte: Do autor

Assim, quando recalculados os dados de forma a considerar os valores de massa seca, como cem por cento de massa das amostras, temos que a perda de massa da amostra CONTROLE é de 66% até a temperatura de 500°C e os resíduos correspondem à 33% da massa seca. Para amostra IME3 a perda de massa seca é em torno de 72% até a temperatura de 500°C e os resíduos correspondem à 28% de massa seca. Indicando assim, que a perda de massa é maior para amostras IME3 e que o resíduo apresentou valores menores, sugerindo que o tratamento conseguiu remover parte dos componentes da folha, o que resultou em valores menores de resíduos.

Tabela 14 – Porcentagem de Perda de Massa Considerando como 100% as amostras com massa seca à 142°C para CONTROLE e 117°C para IME3

Perda de massa relativa (%)				
CONTROLE	Temperatura	De 142°C até 500°C		Resíduo
	M(%)	67		33
Protocolo IME3	Temperatura	De 117°C até 364°C	De 364°C até 500°C	Resíduo
	M(%)	65	7	28

Fonte: Do autor

Importante também é verificar a redução das temperaturas dos picos endotérmicas de 106,9°C nas amostras CONTROLE para 99,7°C nas amostras IME3, mostrando indicativo de facilidade de remoção da água em estrutura mais degradada após o tratamento para decelularização. Além de pico exotérmico em torno de 478°C observado na amostra CONTROLE e ausente nas amostras IME3, sugestivo da efetividade na remoção de componentes das folhas durante os tratamentos.

Os valores obtidos na análise termogravimétrica correspondentes à umidade foram de 94,3% e para as cinzas foram de 1,9%. Esses resultados se mostram muito próximos daqueles verificados por Storck *et al.* (2013) que indicaram em tabela de composição centesimal das partes nobres de espinafre, correspondendo às principais estruturas utilizadas no consumo humano, caracterizado principalmente pelas folhas, valores de umidade iguais a 94,0% e cinzas iguais a 1,2% (STORCK *et al.*, 2013).

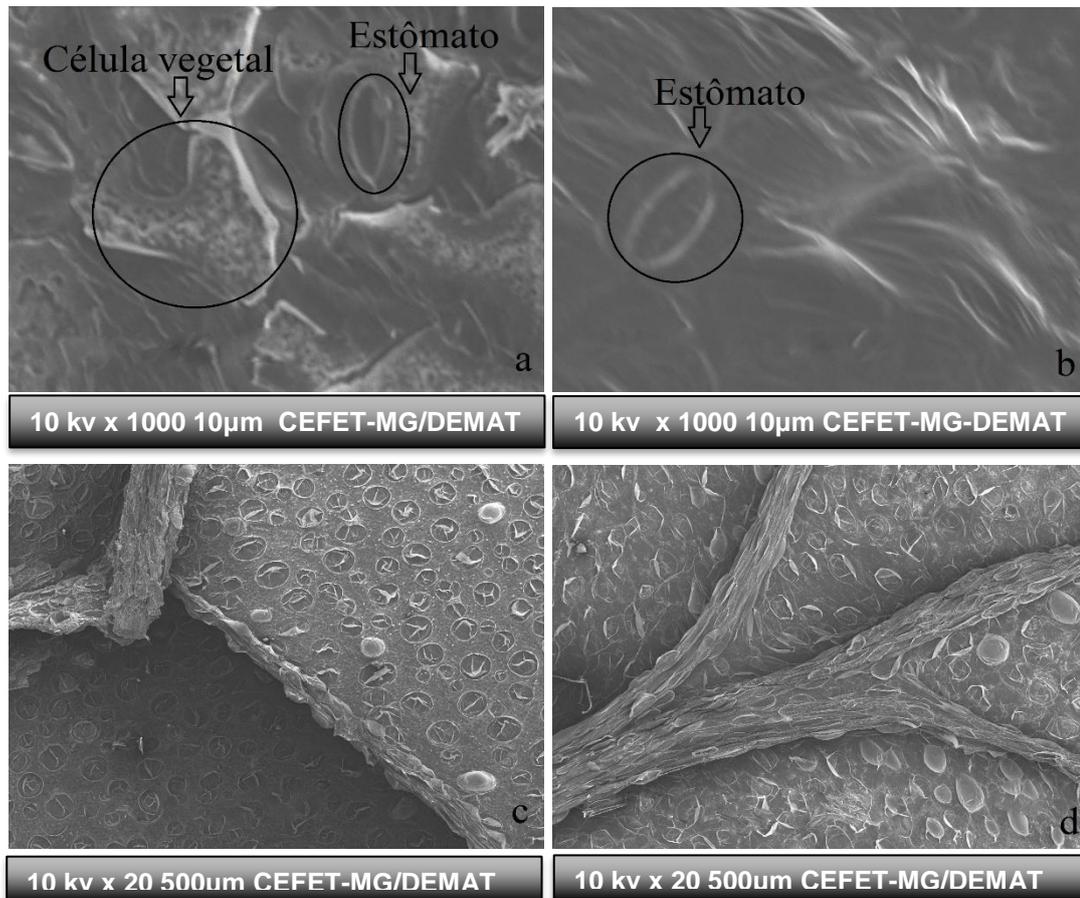
Os resultados demonstram perda de massa em uma única etapa tendo início na temperatura aproximada de 80°C e término em torno 100°C. Essa perda de massa é referente à desidratação da amostra registrada na curva DTA como pico endotérmico, registrado mais intensamente na amostra decelularizada sugerindo uma maior capacidade de absorção de calor.

Utilizando a microscopia eletrônica de varredura, analisamos a existência de superfície de fraturas, caracterização micro estrutural, manutenção das estruturas responsáveis pela porosidade do material antes e após tratamento, constituintes e segregações.

A figura 17 exhibe as imagens da superfície e rede vascular das amostras CONTROLE e tratadas. Na figura 17 (a) observamos amostra CONTROLE, onde

alguns elementos merecem destaque como a célula vegetal e o estômato, assinaladas na imagem. A célula vegetal epidérmica aparece como uma estrutura densa e granulada e é responsável pela proteção da folha contra desidratação, luz solar e forças mecânicas. Entretanto, essas células não possuem cloroplastos, organelas responsáveis pela realização da fotossíntese, essa função é realizada pelas células do parênquima localizadas em uma camada mais profunda das folhas. Os estômatos são orifícios da epiderme vegetal circundados pelas células-guarda, células especializadas que, aumentam ou diminuem de volume em resposta à estímulos internos e externos e, essa alteração de formato ajusta a abertura do estômato e interfere no fluxo de gases e água liberados pela folha. O processo de transpiração vegetal, pelo qual a água é transportada através dos vasos e eventualmente perdida na atmosfera na forma de vapor de água, desempenha um papel fundamental na fisiologia vascular das plantas (XU; GUO; YE, 2019). Na imagem (b), não estão mais presentes as estruturas identificadas como células vegetais, além disso fica mais nítida a estrutura polimérica da matriz extracelular vegetal com presença dos feixes de celulose. Neste ponto, pode-se destacar a diminuição de componentes celulares da folha, além da remoção da epiderme sugere que também as células do parênquima sofreram lise e foram removidas, uma vez que não há mais a cor verde determinada pela clorofila, como mostrado anteriormente na figura 11. Em seguida, observamos que não houve rupturas ou pontos de fratura na matriz remanescente, sugerindo manutenção da integridade da matriz extracelular e da estrutura das cadeias poliméricas da celulose. Com relação aos estômatos, estes mantiveram sua estrutura e apresentação original, garantindo que os orifícios originais da MEC fossem mantidos dando característica de porosidade ao material final. As imagens dos ductos das amostras 17 (a) e 17 (b), representadas em 17 (c) e 17 (d), respectivamente, sugerem que mesmo após o tratamento químico os ductos se mostraram presentes.

Figura 17: Comparação entre amostra CONTROLE e IME3. Amostra CONTROLE (a); amostra IME3 (b); rede vascular CONTROLE (c); rede vascular IME3 (d).



Fonte: Do autor

A tabela 15 corresponde aos valores de porcentagem atômica obtidos em espectroscopia de energia de elétrons de amostras de folhas nativas e folhas submetidas ao protocolo IME 3 de decelularização. Na análise foram detectados picos referentes aos elementos carbono, oxigênio, magnésio, sódio e cloro.

Tabela 15 – EDS de amostras CONTROLE e folhas submetidas ao protocolo IME 3

Amostra	Elemento Químico (% atômica)				
	C	O	Mg	Na	Cl
CONTROLE	60,9	30,0	0,1	-	-
IME3	70,2	26,0	-	1,4	2,4

Fonte: Do autor

Como as análises de EDS representam concentrações de elementos químicos superficiais e de forma pontual, o primeiro destaque se dá pela presença, nas amostras CONTROLE, de altas concentrações de carbono e oxigênio, como é de se esperar para componentes de folhas vegetais. Além desses elementos, foi

verificada presença de traços de magnésio, que é característico em cloroplastos de células vegetais, sendo responsável pela pigmentação verde e de papel imprescindível na fotossíntese. Os valores baixos de magnésio se justificam pela sua presença no interior das células.

Os resultados de EDS verificados para as folhas submetidas ao protocolo IME 3 mostram também elevados teores de carbono e oxigênio, além de concentrações menores dos elementos cloro e sódio. Em relação ao elemento magnésio, esse não foi detectado por EDS para as amostras submetidas ao protocolo IME 3.

Quando comparamos as porcentagens atômicas de carbono e oxigênio entre as amostras CONTROLE e as amostras obtidas pelo protocolo IME 3 verificamos que as amostras CONTROLE apresentaram valores menores de carbono e maiores de oxigênio. Esses resultados podem ser associados com os reagentes utilizados no processo de remoção da cutícula que recobre as folhas vegetais, bem como os reagentes utilizados para a decelularização. Para esses processos foram utilizados: hexano, dodecilsulfato de sódio e Triton X-100, além de hipoclorito de sódio.

Uma das possibilidades é a presença de alguns resíduos desses reagentes combinados com a superfície exposta das folhas durante o processo de imersão. Dessa forma, a presença de Triton X-100 ou dodecilsulfato de sódio, que apresentam concentrações elevadas de carbono, podem ter recoberto parte da superfície das folhas e aumentado as concentrações de carbono. Outra observação que sugere esse comportamento é a presença do elemento sódio, presente no dodecilsulfato de sódio. Apesar deste reagente ter enxofre em sua composição, a interface da folha pode ter reagido com a região polar da molécula, deixando a região apolar exposta, prevalecendo assim, essa última na cobertura de grande extensão da superfície analisada pelo EDS. Outro fato para corroborar com as deposições de parte dos sabões na superfície foi a identificação de bandas de alguns grupos químicos associados com esses reagentes, nos resultados obtidos por FTIR.

Também não pode ser descartada a possibilidade de ter ficado retido na superfície das amostras tratadas o hipoclorito de sódio utilizado, dada a presença de concentrações de cloro verificados no EDS. Essa observação é aspecto a ser considerado para a otimização do protocolo de decelularização, de maneira a diminuir concentrações desses resíduos na estrutura da folha, tanto na parte

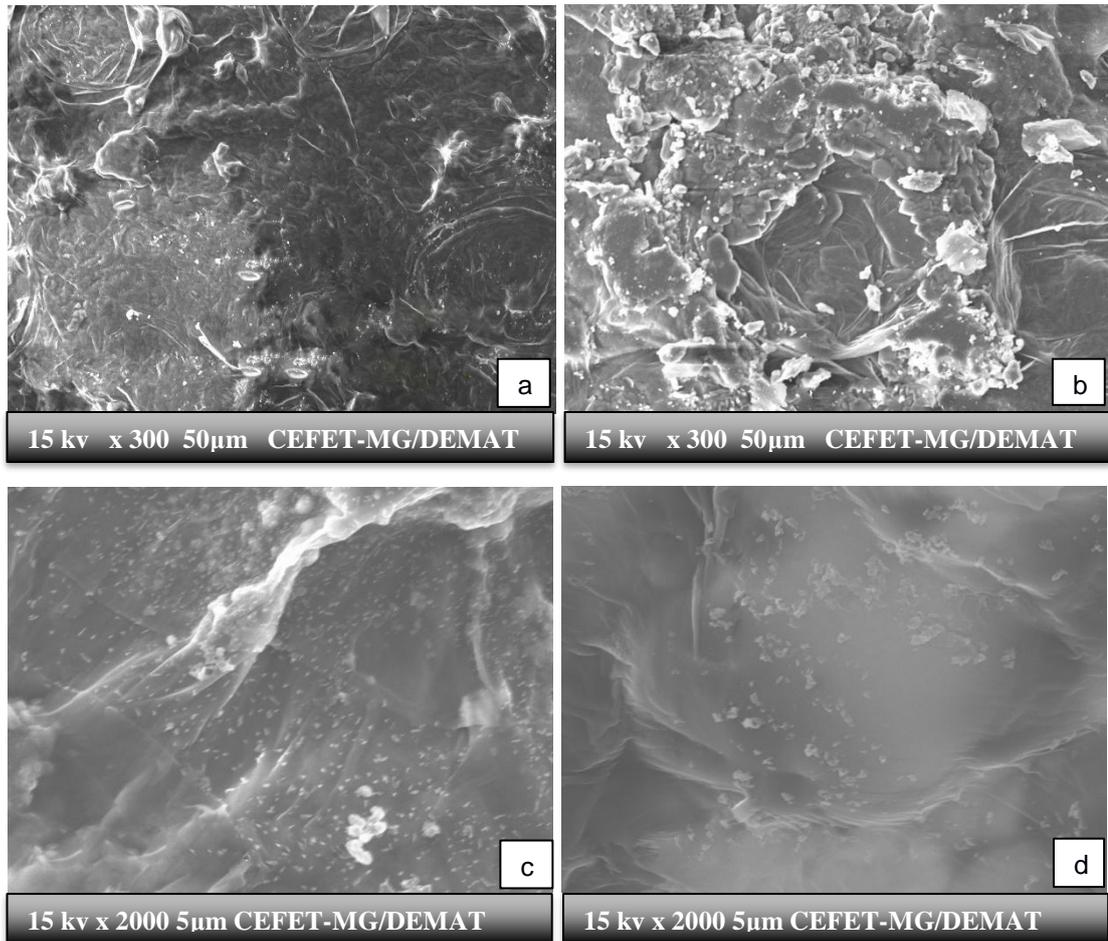
externa como na parte interna, para minimizar a possibilidade de reações indesejáveis, quando da sua aplicação em sistemas biológicos.

A célula vegetal epidérmica que aparece como uma estrutura densa e granulada, não está mais presente na figura 17 (b). Já os estômatos, orifícios da epiderme vegetal circundados pelas células-guarda, que aumentam ou diminuem de volume em resposta à estímulos internos e externos, mantiveram sua estrutura original. Além disso fica mais nítida a estrutura polimérica da matriz extracelular vegetal com presença dos feixes de celulose, sem rupturas ou pontos de fratura na matriz remanescente, sugerindo manutenção da integridade da estrutura das cadeias poliméricas da celulose. Ainda que o objetivo deste trabalho seja avaliação da estrutura de celulose remanescente após o processamento, o indicativo de remoção celular é um resultado relevante uma vez que, a remoção das células vegetais é fator importante para biocompatibilidade, evitando possíveis reações de corpo estranho, bem como para não interferir no processo futuro de reparação tecidual. Os estômatos, estruturas responsáveis pela transpiração das folhas, permaneceram íntegros, o que pode ser de grande valia para obter-se um material permeável, facilitando trocas com o meio externo, tanto importando nutrientes quanto exportando metabólito. As imagens também confirmaram a manutenção da conformação dos ductos ou rede vascular das folhas, as regiões de ramificação e bifurcação da rede vascular também se mantiveram intactas, sugerindo viabilidade da rede vascular principal e secundária. A análise do EDS, além dos picos identificados como presença de carbono (C) e oxigênio (O), mostra presença de magnésio (Mg) nas amostras CONTROLE, elemento químico presente nas células e necessário aos processos de fotossíntese. No gráfico da amostra IME3, aparecem apenas picos (C) e (O), o que pode demonstrar a manutenção da estrutura molecular e ausência de resíduos das soluções utilizadas no protocolo IME3.

5.2 Tratamento químico de tecido vegetal e ensaio de precipitação (SBF)

A figura 18 ilustra diferentes amostras após o ensaio de precipitação, na amostra CONTROLE-SBF-7, 18 (a), é possível observar a formação de um pequeno precipitado representados pelos pontos brancos na superfície.

Figura 18: Imagens de MEV de amostras CONTROLE e IME3 em SBF; (a) CONTROLE-SBF-7; (b) IME3-SBF-7; (c) IME3-SBF-21 vista superior; (d) IME3-SBF-21 vista lateral.



Fonte: Do autor

Na amostra IME3-SBF-7, 18(b) a precipitação foi maior, com formação de núcleos, demonstrando uma maior afinidade do material tratado na formação da camada de apatita. A figura 18(c) é referente à precipitação na amostra IME3-SBF-21, vista superior e a 18(d) uma vista lateral, da mesma amostra. As amostras de CONTROLE-SBF-21 sofreram degradação intensa impossibilitando a caracterização.

O ensaio de precipitação foi complementado pelo mapa de pontos da espectroscopia de raios x (EDS). Na amostra CONTROLE-SBF-7, o EDS apresenta pico indicando presença de cálcio e intensificação dos picos de carbono e oxigênio, e picos discretos relacionados à presença de sódio, fósforo e cloro; a amostra IME3-SBF-7 e IME3-SBF-21 apresentaram também picos relacionados ao potássio e sódio.

As imagens de MEV mostraram a capacidade de formação de camada de apatita na superfície das folhas nativas e tratadas em exposição ao SBF, podendo assim presumir capacidade de adesão do material ao tecido ósseo no corpo humano. De acordo com Kokubo e Takadama (2006), o exame de formação da camada de apatita na superfície do material a partir da exposição ao SBF é útil não somente de forma qualitativa, mas também quantitativa. A degradação da amostra CONTROLE ao final dos 21 dias e a manutenção estrutural das amostras submetidas ao protocolo IME3 podem indicar um processo de reticulação da celulose durante seu processamento (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

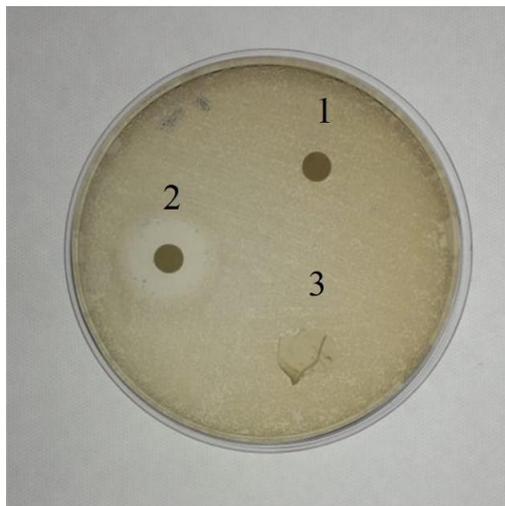
O EDS das amostras IME3-SBF-7 e IME3-SBF-21 revelaram presença também do pico de cálcio, além da intensificação dos picos de carbono, oxigênio, fósforo e sódio. A manutenção estrutural das folhas submetidas à protocolo IME3 em detrimento das CONTROLE pode estar relacionada à presença de cloro nessas amostras, identificado através da análise do EDS e que possui função bactericida. O cloro presente pode estar associado a duas origens: residual da solução que contém hipoclorito de sódio utilizada durante o processo de decelularização ou pela maior afinidade do material na formação de sais quando exposto à solução SBF, uma vez que a mesma contém vários reagentes onde o cloro está presente.

5.2.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para a análise do grau de toxicidade do material obtido, foi realizado um meio de cultura contendo *Escherichia Coli* onde foram colocados a amostra e ampicilina como controle do halo de inibição formado. A amostra foi seca em liofilizador e esterilizada por radiação ultravioleta (UV), em seguida colocada no meio de cultura onde permaneceu incubada por 48 horas. Na figura 19, observamos que um nítido halo de inibição se forma em torno da amostra 2, a ampicilina, o que não acontece em torno da amostra salina bem como da amostra IME 3. Este resultado indica que, apesar da presença de cloro detectada pela análise EDS, ela não está em quantidade suficiente para inibir desenvolvimento celular ou causar toxicidade, quando da sua utilização futura em sistemas biológicos.

A análise de FTIR dessas amostras não evidenciaram nenhuma alteração significativa do padrão vibracional em função da solução SBF. Os mesmos picos observados nas amostras nativas, estão presentes nas tratadas, com diferença apenas na intensidade.

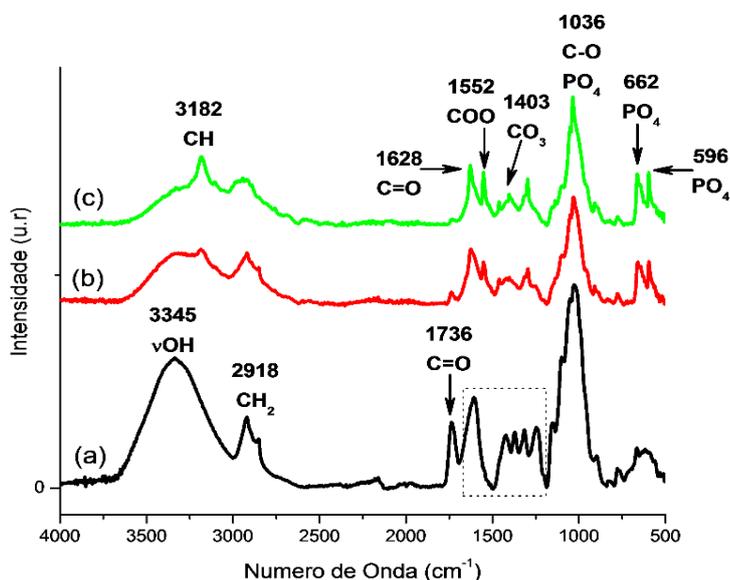
Figura 19: Ensaio de citotoxicidade. Cultura escherichia coli; 1- salina; 2 - ampicilina; 3 – amostra IME3.



Fonte: Do autor

A figura 20 corresponde à análise de FTIR das amostras IME3, IME3-SBF-7 e IME3-SBF-21, onde observa-se que os mesmos picos aparecem para todas as amostras, variando apenas a sua intensidade. Para esta análise, todas as amostras foram secas. O pico 3345cm^{-1} em IME3 está relacionado a estiramento de ligação OH e é praticamente imperceptível nas demais amostras. O pico 3182cm^{-1} aparece nas amostras IME3-SBF-7 e IME3-SBF-21, está relacionado a estiramento CH da estrutura da celulose. O pico 2918cm^{-1} , que em IME3 aparece vibrando em alta intensidade, apresentou diminuição expressiva com o aumento do tempo de exposição ao SBF, apresentando menor intensidade em IME3-SBF-21, sugerindo que as cadeias rompidas durante o tratamento tenham se ligado a íons presentes na solução SBF, por exemplo, o fosfato. O pico 1736cm^{-1} está presente de maneira expressiva somente em IME3 e não aparece nas demais, essa região está relacionada à estiramento C=O geralmente associada à lignina e hemicelulose. Os picos entre 1628cm^{-1} e 1036cm^{-1} , estão provavelmente relacionados à celulose e possíveis resíduos de reagentes utilizados no tratamento, já considerados no outro gráfico. A diminuição da intensidade do pico 1036cm^{-1} das amostras com SBF em relação à IME3, sugere que houve ligação de grupo fosfato nas cadeias que se romperam durante o processamento para decelularização. A presença do grupo fosfato (PO_4^{3-}) está fortemente relacionada à vibração dos picos 662cm^{-1} e 596cm^{-1} , mais intenso na amostra IME3-SBF-21.

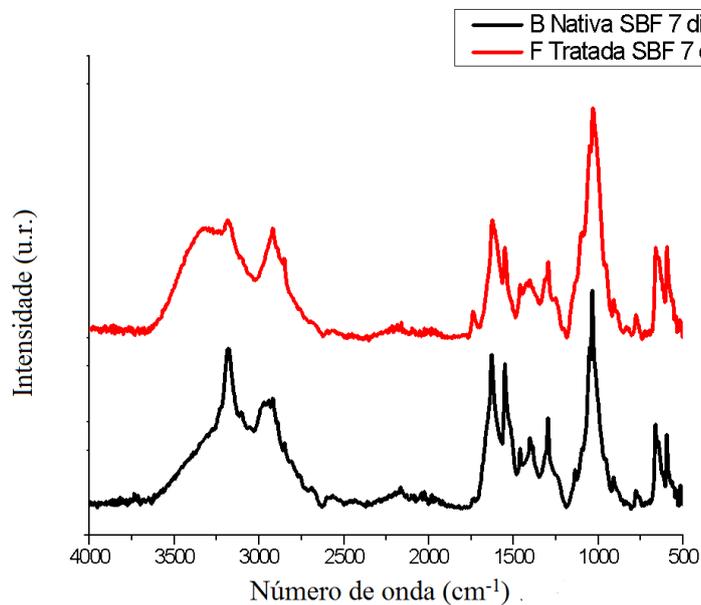
Figura 20: Análise FTIR amostras IME3 antes e após SBF. Amostra IME3 (a); IME3-SBF-7 (b); IME3-SBF-21 (c).



Fonte: Do autor

A figura 21 contém os espectros de análise do FTIR das CONTROLE-SBF-7 e IME3-SBF-7, ambas com imersão em SBF durante 7 dias. Os picos são basicamente os mesmos, com alteração nas intensidades em 3250 cm^{-1} temos o pico associado ao $-\text{OH}$ ou adsorção de água, mais evidente na amostra tratada, que pode estar diretamente relacionada à presença de fosfato. O pico 2900 cm^{-1} , também aparece mais intenso na amostra tratada, devido ao protocolo IME3. Na faixa compreendida entre 1750 cm^{-1} até 1250 cm^{-1} , o que diferencia os picos é sua intensidade, mais associada ao tratamento IME3 do que à imersão em SBF. Os picos que mais chamam atenção são o de 1000 cm^{-1} e em torno de 600 cm^{-1} , que correspondem à presença do fosfato, ratificando a maior capacidade do material tratado em promover a precipitação.

Figura 21: Comparação FTIR amostras CONTROLE e IME3 com 7 dias de SBF

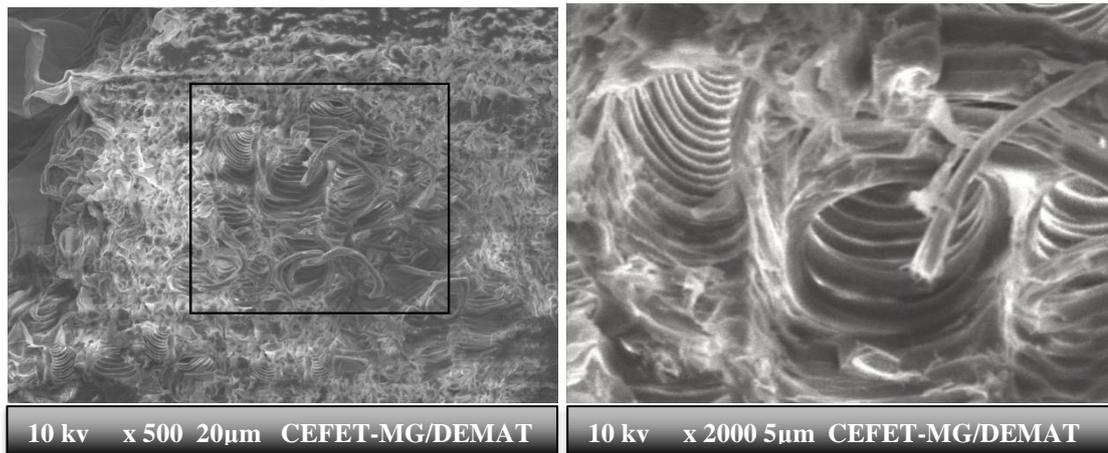


Fonte: Do autor

5.3 Tratamento químico de tecido vegetal e reticulação

O principal objetivo da reticulação é melhorar propriedades biomecânicas dos *scaffolds* através da formação de uma rede firme na matriz polimérica. Trata-se de uma ligação física ou química que conecta grupos funcionais de cadeias poliméricas através ligações covalentes ou interações supramoleculares, como ligações iônicas e pontes de hidrogênio. O glutaraldeído reage com o grupo hidroxila de polímeros e conecta as cadeias biopoliméricas via interações intra ou intermoleculares (ORYAN et al., 2018). Ao final do processo de decelularização precedido pela reticulação, observamos uma maior resistência à manipulação nas amostras e, as imagens obtidas no MEV demonstram um padrão fibrilar mais organizado e ductos mais conformados, tanto nas amostras CONTROLE quanto nas IME3. A figura 22 é uma vista lateral do ducto da folha nativa após a reticulação, na imagem podemos observar o tecido de sustentação do ducto envolvendo os vários canálculos que formam a rede vascular vegetal.

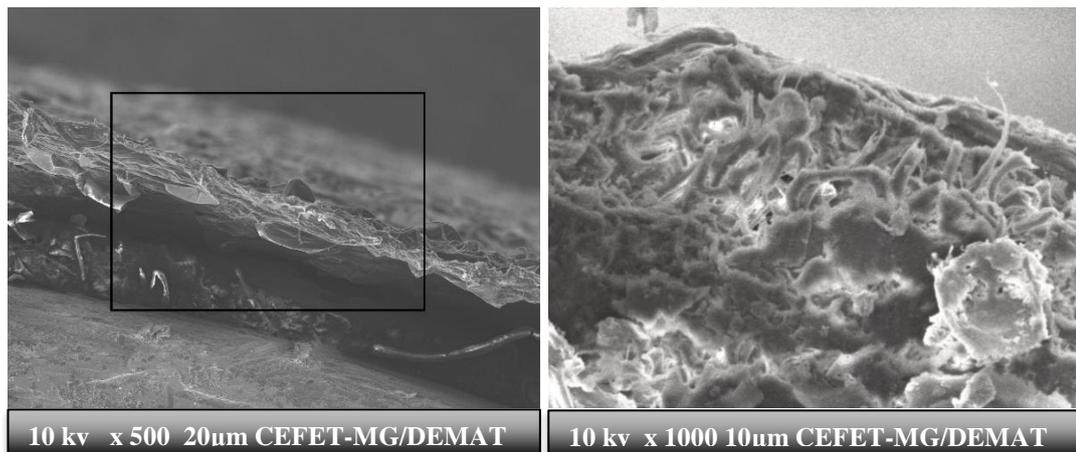
Figura 22: Folha nativa após reticulação e ampliação da região demarcada



Fonte: Do autor

A figura 23 é uma imagem de vista lateral da amostra IME3-GA com ampliação ressaltando as fibras de celulose com estrutura fibrilar mais intensa após exposição ao glutaraldeído.

Figura 23: Vista lateral da folha tratada e ampliação da região demarcada

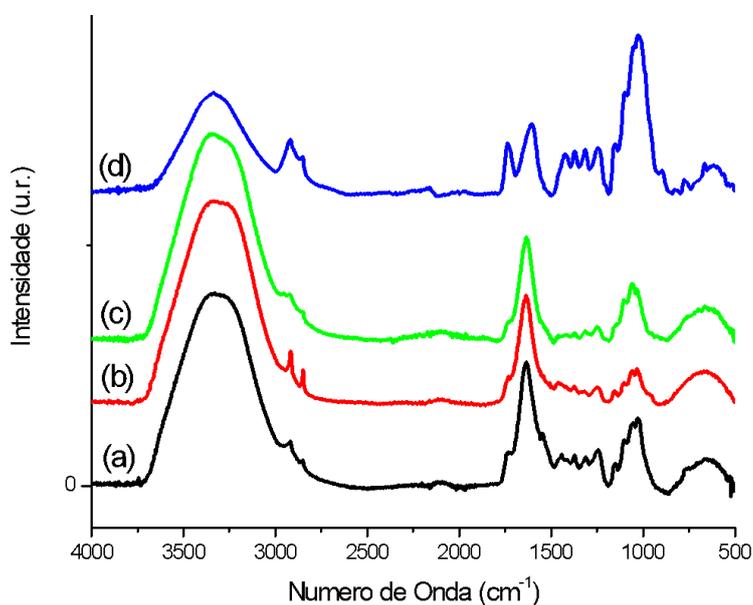


Fonte: Do autor

Nos espectros de FTIR, ambas apresentaram os mesmos picos, havendo alteração somente na intensidade, o que provavelmente se deve ao fato de uma menor vibração das cadeias de celulose que se encontram interligadas. Além disso, a menor quantidade de cloro detectada pela análise EDS, sugere que a reticulação, principalmente dos ductos, seja um fator importante no enxague e remoção de resíduos dos reagentes nas amostras. Isso poderia resultar em um material com menor toxicidade, quando de sua utilização em sistemas biológicos.

A figura 24 demonstra a análise comparativa de FTIR entre as amostras CONTROLE, CONTROLE-GA, IME3-GA E IME3 seca.

Figura 24: Análise FTIR amostras IME3 antes e após reticulação. Amostra CONTROLE (a); CONTROLE-GA (b); IME3-GA e IME3 seca.



Fonte: Do autor

Analisando os resultados obtidos por FTIR na figura 24 que compara as amostras CONTROLE, CONTROLE-GA, IME3-GA e IME3 seca, verificamos que as bandas posicionadas em 3330, 2921 e 2850 cm^{-1} estão presentes em amostras com e sem tratamento para decelularização. A banda em 3330 cm^{-1} pode ser associada à grupos OH ou à água adsorvida, e se mostra com elevada intensidade em todas as amostras, entretanto para amostras submetidas ao tratamento IME3 foi observada redução na sua intensidade, podendo sugerir que o processo possa ter removido parte da estrutura da folha que mantinha ligação com moléculas de água ou quebrado parte da celulose, com diminuição da sua massa. Além disso a amostra IME3 seca também apresentou diminuição de intensidade neste pico claramente pelo processo de liofilização. Outra banda posicionada em 1636 cm^{-1} , que também pode ser associada ao grupo OH da água apresentou redução para amostras tratadas.

Outro ponto de destaque é a presença das bandas posicionadas em 2918 e 2849 cm^{-1} , que podem ser associadas aos grupos CH_2 e CH_3 e se mostraram mais evidentes nas amostras submetidas ao tratamento IME3 e à reticulação, podendo indicar a ocorrência da quebra de parte da estrutura da celulose, com abertura da estrutura cíclica, mas também permitindo supor a presença de resíduos dos

reagentes utilizados que apresentam cadeia carbônica em sua estrutura, como é observado para o SDS e para o Triton. Importante destacar que a presença de resíduos desses reagentes também pode induzir a redução do teor de água o que estaria em conformidade com a redução da banda hidroxila. Ainda na análise do FTIR, temos a banda 1443cm^{-1} do estiramento C-H, a banda 1059cm^{-1} do estiramento C-O e a banda 1030cm^{-1} do estiramento C-OH, que podem ser associadas à carboidratos da celulose. A banda 1030cm^{-1} aparece em intensidade elevada em IME3 seca quando comparada às demais amostras, isso pode estar relacionado a um estiramento das ligações C-OH da celulose em função da perda excessiva de hidratação com o processo de liofilização. Além disso, algumas bandas associadas à grupos químicos relacionados aos conteúdos celulares que tiveram redução na sua intensidade, como é o caso de 1244cm^{-1} que pode ser associado a grupos PO_2^{-1} de ácidos nucleicos e 1640cm^{-1} , apresentaram menor intensidade em IME3-GA e IME3 seca respectivamente, sugerindo que a reticulação pode ter influência direta na facilitação de enxague e saída de debris celulares.

Na regeneração do tecido ósseo, o processo inflamatório é uma etapa crítica no recrutamento de células para o sítio onde ocorreu a injúria. Essas células iniciam a resposta de cura através da síntese e secreção de vários mediadores celulares e inflamatórios. Em alguns casos de fraturas e defeitos ósseos, o processo inflamatório pode diminuir rapidamente ou ser suprimido com o passar do tempo, contudo a reiniciação do processo pode ser uma opção válida. Dessa forma, o glutaraldeído pode se tornar uma boa opção na reticulação de *scaffolds* para tecido ósseo, uma vez que essa substância pode ser aceleradora do processo de regeneração óssea através da indução da reiniciação do processo inflamatório (ORYAN et al., 2018).

A reticulação pode estar diretamente relacionada à biodegradabilidade do material que, tende a se opor à resistência mecânica. Para tecidos duros como os ossos, é necessário que haja um equilíbrio entre essas características. Por exemplo, para um *scaffold* de reparação óssea de ossos longos, é preciso que o material possua propriedades mecânicas adequadas capaz de suportar às forças de tração e compressão, bem como possua um tempo de biodegradação mínimo de 2 a 3 meses, para que possa prover uma estrutura para as células hospedeiras. A escolha de um material com agente de reticulação adequado associado a um protocolo

eficiente, pode levar ao desenvolvimento de um *scaffold* para diferentes tipos de tecido ósseo (ORYAN et al., 2018).

6. CONCLUSÃO

Considerando a análise morfológica verificou-se que o aspecto macroscópico indica que o tratamento químico com os sabões utilizados foi mais eficiente em protocolos utilizando o método de imersão, onde foi verificada redução significativa da pigmentação e manutenção do sistema vascular das folhas. As análises das imagens obtidas por microscopia eletrônica sugerem que as estruturas celulares foram removidas, mesmo que parcialmente e que a matriz polimérica foi modificada, mas sem alteração estrutural significativa. Dados esses corroborados pelo grau de degradação obtido pela análise térmica e análise química feita através de FTIR.

A utilização do agente reticulante foi importante para as caracterizações morfológicas e se mostra como uma alternativa para ampliar a resistência das folhas ao desgaste promovido pelos tratamentos químicos com os sabões utilizados.

Os ensaios de imersão em SBF indicaram que as matrizes tratadas com os sabões ampliaram o seu tempo de conservação em meio de simulação e apresentaram precipitados de fosfatos de cálcio na sua estrutura, onde pode-se concluir que o protocolo utilizado para tecido vegetal se apresenta como uma opção viável a desenvolvimento de matrizes pré vascularizadas para reparação óssea.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Realização de tratamento químico após utilização de diferentes métodos de reticulação.
- Avaliação de resistência mecânica de folhas nativas em comparação às folhas tratadas.
- Ensaios de perfusão para avaliação de estrutura dos ductos após tratamento químico.
- Realização de novos ensaios de citotoxicidade e quantificação de cloro nas amostras.
- Realizar ensaios de cultura e crescimento celular em amostras tratadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASIAN, M. et al. Scaffolding polymeric biomaterials: Are naturally occurring Biological Macromolecules more appropriate for tissue engineering?, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 134, p. 673-694, 2019

ANTONY, N.; SHERINE, H.B.; RAJENDRAN, S. Inhibition and Biocide Actions of Sodium Dodecyl Sulfate-Zn²⁺ System for the Corrosion of Carbon Steel in Chloride Solution, *Portugaliae Electrochimica Acta*, v. 28, n. 1, p. 1-14, abr. 2010.

BADYLAK, S.F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds, *The Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 13, p. 27-53, 2011.

BELADI, F.; SABER-SAMANDARI, S.; SABER-SAMANDARI, S. Cellular compatibility of nanocomposite scaffolds based on hydroxyapatite entrapped in cellulose network for bone repair, *Materials Science and Engineering C*, v. 75, p. 385-392, fev.2017.

BERENDSEN, A.D.; OLSEN, B.R. Bone Development, *Bone*, v. 80, p. 14-18, abr. 2015.

BIRAN, R.; POND, D. Heparin coatings for improving blood compatibility of medical devices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 112, p. 12-23, 2017.

BOHAC, M. et al. Delayed post mastectomy breast reconstructions with allogeneic acellular dermal matrix prepared by a new decellularization method, *Cell Tissue Bank*, v. 19, p. 61-68, 2018.

CANDIDO, R.G.; GODOY, G.G.; GONÇALVES, A.R. Characterization and application of cellulose acetate synthesized from sugarcane bagasse, *Carbohydrate Polymers*, v. 167, p. 280-289, mar. 2017.

CIÉSLA, K.; RAHIER, H.; TRZNADEL, G.Z. Interaction of water with the regenerated cellulose membrane studied by DSC, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 77, p. 279-293, 2004.

DEWITT, N. Angiogenesis, *Nature*, n.7070, v. 438, p.931, dez. 2005.

DIEKJÜRGEN, D.;GRAINGER, D.W. Polysaccharide matrices used in 3D in vitro cell culture systems, *Biomaterials*, v. 141, p. 96-115, jun.2017.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ QUEIROZ, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Anatomy and Physiology of Leaves. Disponível em:<http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/Anatomy-and-Physiology-of-Leaves.pdf> Acesso em: 07 de novembro de 2019.

FARAG, A. et al. Assessment of static and perfusion methods for decellularization of PCL

membrane-supported periodontal ligament cell sheet constructs, *Archives of Oral Biology*, v.88, p. 67-76, jan. 2018.

FERRETTI, C.; BELMONTE, M.M. Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: boosting current knowledge, *World Journal of Stem Cells*, v. 6, n. 3, p. 266-277, jul. 2014.

FONTANA, G. et al Biofunctionalized Plants as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture, *Advanced Healthcare Materials*, v.6, 2017.

GERSHLAK, J. R. et al. Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds, *Biomaterials*, v. 125, p. 13-22, fev. 2017.

GIBSON, L.J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials, *Journal of The Royal Society*, v. 9, p. 2749-2766, ago. 2012.

GILBERT, T.W.; SELLARO, T.L.; BADYLAK, S.F. Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, v.27, p. 3675-3683, mar. 2006.

HARDIN, J.A. et al. Rapid in situ quantification of leaf cuticular wax using FTIR-ATR and DSC, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/271421655> Acesso em: 06/04/2019.

HE, X. et al. Incorporation of microfibrillated cellulose into collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 115, p. 385-392, 2018.

HOKKANEN, S. et al. Calcium hydroxyapatite microfibrillated cellulose composite as a potential adsorbent for the removal of Cr(VI) from aqueous solution, *Chemical Engineering Journal*, v.283, p. 445-452, jul. 2015.

IUCHI, T. et al. Influence of periosteum location on the bone and cartilage in tissue-engineered phalanx, *The Journal of Hand Surgery*, mar. 2019.

JÚNIOR, A. M. A. et al. Regenerated cellulose scaffolds: Preparation, characterization and toxicological evaluation, *Carbohydrate Polymers*, v. 136, p. 892-898, set. 2015.

KEANE, T.J.; SWINEHART, I.T.; BADYLAK, S.F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance, *Methods*, v. 84, p. 25-34 mar.2015.

KRISHNAMACHARI, P.; HASHAIKEH, R.; TINER, M. Modified cellulose morphologies and its composites; SEM and TEM analysis, *Micron*, v. 42, p. 751-761, 2011.

KRISTOFIK, N.J. et al. Improving in vivo outcomes of decellularized vascular grafts via incorporation of a novel extracellular matrix, *Biomaterials*, v. 141, p. 63-73, jun.2017.

- LAM, N. T. et al. Utilizing cellulose from sugarcane bagasse mixed with poly (vinylalcohol) for tissue engineering scaffold fabrication, *Industrial Crops and Products*, v. 100, p. 183-197, mar.2017.
- LI, M. et al. Small intestinal submucosa: A potential osteoconductive and osteoinductive biomaterial for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, v. 75, p. 149-156, fev.2017.
- LIU, X. et al. Comparison of detergent-based decellularization protocols for the removal of antigenic cellular components in porcine aortic valve. 2018. Disponível em: < <http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/xen> > Acesso em: 28/04/2018.
- LOOF, D. et al. Quantitative and Qualitative Analysis of Surface Modified Cellulose Utilizing TGA-MS, *Materials*, v.9, p. 1-14, mai. 2016.
- LOPES, D. et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies, *Biomaterials*, v. 185, p.240-275, set. 2018.
- LUKANINA, K.I. et al. Multi-hierarchical tissue-engineering ECM-like scaffolds based on cellulose acetate with collagen and chitosan fillers, *Carbohydrate Polymers*, v. 191, p. 119-126, 2018.
- MADRID, A.P.M. et al. Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds, *Materials Science and Engineering C*, v. 100, p. 631-644, 2019.
- MAHAJAN, A. Periosteum: A Highly Underrated Tool in Dentistry, *International Journal of Dentistry*, 2012. Disponível em: < [http:// doi:10.1155/2012/717816](http://doi:10.1155/2012/717816) > Acesso em: 01/06/2018.
- MAITZ, M.F. et al. The blood compatibility challenge. Part 4: Surface modification for hemocompatible materials: Passive and active approaches to guide blood-material interactions, *Acta Biomaterialia*, v. 94, p. 33-43, ago. 2019.
- MAKSIMKIN, A. V. et al. Multilayer porous UHMWPE scaffolds for bone defects replacement, *Materials Science and Engineering C*, v. 73, p. 366-372, dez.2016.
- MÜLLER, F.A. et al. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, v. 27, p. 3955-3963, mar. 2006.
- MURPHY, D.; PINHO, M.N. An ATR-FTIR study of water in cellulose acetate membranes prepared by phase inversion, *Journal of Membrane Science*, v. 106, p. 245-257, 1995.
- NGUYEN, H.M.; PHAN, C.M.; SEM, T. Degradation of sodium dodecyl sulfate by photoelectrochemical and eletrochemical process, *Chemical Engineering Journal*, v.287, p. 633-639, dez. 2015.

NIKLASON, L.E. Understanding the Extracellular Matrix to Enhance Stem Cell-Based Tissue Regeneration, *Cell Steem Cell*, v. 22, mar. 2018.

ORYAN, A. et al. Chemical Crosslinking of biopolymeric scaffolds: current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p. 678-688, 2018.

PARK, J.B.; BRONZINO, J.D. *Biomaterials: Principles and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2003.

PARK, K.M.; WOO, H.M. Systemic Decellularization for Multi-organ Scaffolds in Rats, *Transplantations Proceedings*, v.44, p. 1151-1154, 2012.

PARK, S.M. et al. Effect of pulsatile flow Perfusion on decellularization. 2018. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/s12938-018-0445-0>> Acesso em: 30/07/2018.

PENG, L.; LI, H.; MENG, Y. Layer-by-layer structured polysaccharides-based multilayers on cellulose acetate membrane: Towards better hemocompatibility, antibacterial and antioxidant activities, *Applied Surface Science*, v.401, p.25-39, 2017.

RAHMAN, S. et al. Optimising the decellularization of human elastic cartilage with trypsin for future use in ear reconstruction. 2018. Disponível em <<http://www.nature.com/scientificreports>> Acesso em: 28/04/2018.

RATHER, H.A.; DHWANI, J.; VASITA, R. Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, v. 103, mai. 2019.

RATNER, B.D. et al. *Biomaterials Science*. 2 ed. San Diego: Elsevier Press, 2004.

RATNER, B.D. et al. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 3 ed. Canadá: Academic Press, 2013.

SALAMA, A. Cellulose/calcium phosphate hybrids: New materials for biomedical and environmental applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 127, p. 606-617, jan. 2019.

SEETAPUN, D.; ROSS, J.J. Eliminating the organ transplant waiting list: The future with Perfusion decellularized organs. 2016. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2016.09.041>> Acesso em: 07/10/2017.

SEO, Y.; JUNG, Y.; KIM, S.H. Decellularized heart ECM hydrogel using supercritical carbon dioxide for improved angiogenesis, *Acta Biomaterialia*, v.67, p. 270-281, 2018.

SHAKOURI-MOTLAGH, A. et al. The application of decellularized human term fetal membranes in tissue engineering and regenerative medicine (TERM), *Placenta*, v. 59, p. 124-130, jul.2017.

SILVA, J.H.C. *Desenvolvimento e validação de equipamento de decelularização de órgão inteiro pelo método de perfusão*. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.

SONG, J.J.; OTT, H.C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds, *Trends in Molecular Medicine*, v. 17, n. 8, ago. 2011.

SPERLING, C. et al. Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes, *Biomaterials*, v. 30, p. 4447-4456, jun. 2009.

STROCK, C.R. et al. Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações, *Ciência Rural*, v. 43, n. 3, p. 537-543, mar. 2013.

TAYLOR, D.A. et al. Decellularized matrices in regenerative medicine, *Acta Biomaterialia*, v. 74, p. 74-89, 2018.

VAFEE, T. et al. Decellularization of human donor aortic and pulmonary valved conduits using low concentration sodium dodecyl sulfate, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 12, p. 841-853, mai. 2017.

WALSH, J.S. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation, *Surgery*, v. 36, n. 1, 2017.

WANG, Q. et al. Artificial periosteum in bone defect repair – A review, *Chinese Chemical Letters*, v. 28, p. 1801-1807, jul. 2017.

WHITE, L.J. et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToFSIMS study, *Acta Biomaterialia*, v.50, p. 207-219, 2017.

WULANDARI, W.T.; ROCHILIADI, A.; ARCANA, I.M. Nanocellulose prepared by acid hydrolysis of isolated cellulose from sugarcane bagasse, *Materials Science and Engineering*, v. 107, 2016.

YAO, Q. et al. Recent development and biomedical applications of decellularized extracellular matrix biomaterials, *Materials Science and Engineering C*, v. 104, 2019.

YUAN, J. et al. Chemical modification of cellulose membranes with sulfo ammonium zwitterionic vinyl monomer to improve hemocompatibility, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 111, p. 432-438, 2013.

ZHANG, J. et al. Chemical modification of cellulose membranes with sulfo ammonium zwitterionic vinyl monomer to improve hemocompatibility, *Colloids and Surfaces*, v. 30, p. 249-257, 2003.

ZIEGER, M. et al. 6-Deoxy-6-aminoethyleneamino cellulose: synthesis and study of Hemocompatibility, *Journal of Biomaterials Science*, v. 26, n. 14, p. 931-946, jun. 2015.

ZOUHAIR, S. et al. Preservation strategies for decellularized pericardial scaffolds for off-the-shelf availability, *Acta Biomaterialia*, v. 84, p. 208-221, 2019.