



Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais



Ana Carolina Correia do Carmo

Tratamento químico de frutas e vegetais para potencial aplicação como scaffolds na Engenharia de Tecidos.

**Belo Horizonte
2022**

Ana Carolina Correia do Carmo

***Tratamento químico de frutas e vegetais para potencial aplicação
como scaffolds na Engenharia de Tecidos.***

Defesa de 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 Biomateriais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

Coorientadora: Prof. Dra. Kátia Michelle Freitas

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Belo Horizonte

2022

Carmo, Ana Carolina Correia do.
C287t Tratamento químico de frutas e vegetais para potencial aplicação como *scaffolds* na engenharia de tecido / Ana Carolina Correia do Carmo. – 2022.
160 f. : il.
Orientadora: Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo.
Coorientadora: Kátia Michelle Freitas.

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2022.
Bibliografia.

1. Engenharia de tecidos. 2. Frutas - Tratamento. 3. Legumes - Tratamento. 4. Processos químicos. I. Azevedo, Danielle Marra de Freitas Silva. II. Freitas, Kátia Michelle. III. Título.

CDD: 610.28



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO
TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
MATERIAIS - NS



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 9/2022 - POSMAT (11.52.07)

Nº do Protocolo: 23062.020047/2022-84

Belo Horizonte-MG, 25 de abril de 2022.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

*TRATAMENTO QUÍMICO DE FRUTAS E VEGETAIS PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO COMO SCAFFOLDS NA ENGENHARIA DE TECIDO*

Autora: Ana Carolina Correia do Carmo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou em 25 de abril de 2022 esta Dissertação:

Prof.^a Dr.^a Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo (ORIENTADORA) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof.^a Dr.^a Kátia Michelle Freitas (COORIENTADORA) Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof.^a Dr.^a Mariana Martins Drumond (EXAMINADORA INTERNA)
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET-MG

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva (EXAMINADOR INTERNO)
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET-MG

Prof.^a Dr.^a Pamela Del Carmen Mancha Agresti (EXAMINADORA EXTERNA)
Universidad Católica de Cuyo

*(Assinado digitalmente em 26/04/2022
10:57)*

DANIELLE MARRA DE FREITAS
SILVA AZEVEDO

*DIRETOR TITULAR
DIRGRAD
Matrícula: 1877259*

*(Assinado digitalmente em 26/04/2022
10:20)*

MARIANA MARTINS DRUMOND

*PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO
DCB (11.55.12)
Matrícula: 1042433*

*(Assinado digitalmente em 26/04/2022
10:32)*

SIDNEY NICODEMOS DA SILVA

*PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO
DF (11.56.10)
Matrícula: 2519987*

*(Assinado digitalmente em 25/04/2022
22:55)*

KÁTIA MICHELLE FREITAS

*ASSINANTE EXTERNO
CPF: 052.317.046-79*

(Assinado digitalmente em 04/05/2022 09:15)

PAMELA DEL CARMEN MANCHA AGRESTI

*ASSINANTE EXTERNO
Passaporte: N22901573*

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sig.cefetmg.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **9**, ano:
2022, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão: **25/04/2022**
e o código de verificação: **45878d1f5c**

RESUMO

Scaffolds baseados em plantas representam uma abordagem promissora na engenharia de tecidos em razão de sua abundância, sustentabilidade e baixo custo. Além disso, os tecidos vegetais são constituídos predominantemente por celulose, polímero biocompatível e biodegradável e frequentemente exibem uma estrutura de poros interconectados na matriz extracelular, características interessantes para estruturas tridimensionais que suportam o cultivo de células de mamíferos. O presente trabalho investigou vegetais e frutas comumente consumidas na região do cerrado pós tratamento químico com diferentes soluções surfactantes e sua possível aplicação como *scaffold* na engenharia de tecidos. Frutas e vegetais (fruto graviola, pseudofruto do caju, casca da mexerica, folhas de brócolis e ora-pro-nobis, talos de taioba e brócolis) foram submetidos ao tratamento com solução aquosa contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), triton X-100 e hipoclorito de sódio em diferentes concentrações. Após secagem, as estruturas vegetais foram caracterizadas físico-quimicamente por meio de análise sensorial e das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA). A presença de poros ou canalículos interconectados foi observada em todas as micrografias eletrônicas das frutas e dos vegetais analisados. As duas amostras de graviola e a amostra de caju apresentaram redução nas bandas de absorção de FTIR relacionadas às ligações lipídeo-carboidrato e grupos funcionais associados a ácidos nucleicos. A casca de mexerica e a folha de ora-pro-nobis apresentaram redução nas bandas associadas a ácidos nucleicos. Já a folha de brócolis apresentou redução somente nas bandas relacionadas às ligações lipídeo-carboidrato. Os resultados obtidos sugerem que o tratamento químico ocasionou a retirada de componentes celulares como lipídeos e ácidos nucleicos, mantendo, conforme o esperado, a estrutura lignocelulósica dos vegetais, indício de que o tratamento acarretou a descelularização, ainda que de forma parcial. Ademais, foram observados resíduos de detergente em algumas amostras, indicando que etapas adicionais de lavagem devem ser inseridas ao protocolo.

Palavras chave: Engenharia de tecidos, *scaffolds*, tratamento químico, frutas e vegetais.

ABSTRACT

Plant-based *scaffolds* represent a promising approach in tissue engineering because of their abundance, sustainability and low cost. In addition, plant tissues are predominantly made up of cellulose, a biocompatible and biodegradable polymer and often exhibit an interconnected pore structure of the extracellular matrix, interesting features for three-dimensional structures that support the culture of mammalian cells. The present work investigated vegetables and fruits commonly consumed in the Cerrado region after chemical treatment with different surfactant solutions and their possible application as a *scaffold* in tissue engineering. Fruits and vegetables (sour fruit, cashew pseudofruit, tangerine peel, broccoli and ora-pro-nobis leaves, taioba and broccoli stalks) were treated with an aqueous solution containing sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X-100 and sodium hypochlorite in different concentrations. After drying, the plant structures were characterized physicochemically by sensory analysis, Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermogravimetry (TGA). The presence of interconnected pores or canaliculi was observed in all electron micrographs of the analyzed fruits and vegetables. The two soursop samples and the cashew sample showed reduction in FTIR absorption bands related to lipid-carbohydrate bonds and functional groups associated with nucleic acids. The tangerine peel and the ora-pro-nobis leaf showed a reduction in the bands associated with nucleic acids. On the other hand, the broccoli leaf showed a reduction only in the bands related to lipid-carbohydrate bonds. The results obtained suggest that the chemical treatment caused the removal of cellular components such as lipids and nucleic acids, maintaining, as expected, the lignocellulosic structure of the plants, an indication that the treatment resulted in decellularization, even partially. Furthermore, detergent residues were observed in some samples, indicating that additional washing steps should be included in the protocol.

Keywords: Tissue engineering, *scaffolds*, chemical treatment, fruits and vegetables.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	3
3 OBJETIVOS	5
3.1 OBJETIVO GERAL	5
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1 ENGENHARIA DE TECIDOS.....	6
4.2 SCAFFOLDS	9
4.2.1 Tipos de Scaffolds.....	13
4.3 PROTOCOLOS DE DESCELULARIZAÇÃO	27
4.4 COMPONENTES DA PAREDE CELULAR VEGETAL	37
4.4.1 Celulose.....	41
4.4.2 Hemicelulose.....	51
4.4.3 Pectina.....	55
4.4.4 Lignina	58
4.5 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO EM TECIDOS VEGETAIS	62
5 MATERIAIS E MÉTODOS	71
5.1 MATERIAIS UTILIZADOS.....	71
5.2 MÉTODOS	71
5.2.1 Tratamento químico	71
5.2.2 Caracterizações físico-químicas.....	75
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
6.1 GRAVIOLA	77
6.1.1 Análise Sensorial.....	77
6.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	79
6.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	81

6.1.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	83
6.2	PSEUDOFRUTO DO CAJU.....	86
6.2.1	Análise Sensorial.....	86
6.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	87
6.2.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	89
6.2.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	91
6.3	CASCA DE MEXERICA	94
6.3.1	Análise Sensorial.....	94
6.3.2	Microscopia Eletronica de Varredura (MEV).....	95
6.3.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	97
6.3.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	99
6.4	FOLHA DE BRÓCOLIS	101
6.4.1	Análise Sensorial.....	101
6.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	102
6.4.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	104
6.4.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	106
6.5	FOLHAS DE ORA-PRO-NOBIS	107
6.5.1	Análise Sensorial.....	107
6.5.2	Microscopia Eletronica de Varredura (MEV).....	108
6.5.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	110
6.5.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	112
6.6	TALOS DE TAIOBA.....	114
6.6.1	Análise Sensorial.....	114
6.6.2	Microscopia Eletronica de Varredura (MEV).....	115
6.6.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	118
6.6.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	119
6.7	TALOS DE BRÓCOLIS	122
6.7.1	Análise Sensorial.....	122
6.7.2	Microscopia Eletronica de Varredura (MEV).....	123
6.7.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	125
6.7.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	127

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	129
8 CONCLUSÃO	132
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	133

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – MÉTODOS, MODO DE AÇÃO E EFEITOS NA MEC DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NA DESCELULARIZAÇÃO DE TECIDOS E ÓRGÃOS	30
TABELA 2 - PROCESSOS DE DESCELULARIZAÇÃO UTILIZADOS EM TECIDOS VEGETAIS	32
TABELA 3 - TEOR DE CELULOSE EM FONTES NATURAIS.....	43
TABELA 4 - VALORES DE DP DE CELULOSE PROVENIENTE DE DIFERENTES FONTES	46
TABELA 5 - MÓDULOS DE MATERIAIS UTILIZADOS NA ENGENHARIA COMPARADOS À CELULOSE	50
TABELA 6 - PROPRIEDADES MECÂNICAS DE ALGUMAS FIBRAS COMUNS DE PLANTAS	51
TABELA 7 - POLÍMEROS QUE COMPÕEM A PAREDE CELULAR	61
TABELA 8 - PICOS DE ABSORBÂNCIA NO FTIR DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR.....	64
TABELA 9 - PRINCIPAIS PICOS DOS ESPECTROS DE FTIR DE PLANTAS MEDICINAIS E TECIDOS BIOLÓGICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	65
TABELA 10 - SOLUÇÕES UTILIZADAS NO TRATAMENTO QUÍMICO.....	72
TABELA 11 – ETAPAS DO TRATAMENTO QUÍMICO	73
TABELA 12 - ANÁLISE SENSORIAL DA GRAVIOLA	78
TABELA 13 - PRINCIPAIS EVENTOS TÉRMICOS DAS AMOSTRAS DE GRAVIOLA E CELULOSE	85
TABELA 14 - ANÁLISE SENSORIAL DO CAJU.....	87
TABELA 15 - PRINCIPAIS EVENTOS TÉRMICOS DAS AMOSTRAS DE CAJU E CELULOSE.....	93
TABELA 16 - ANÁLISE SENSORIAL DA CASCA DE MEXERICA	95
TABELA 17 - PRINCIPAIS EVENTOS TÉRMICOS DAS AMOSTRAS DE CASCA DE MEXERICA E CELULOSE	100
TABELA 18 - ANÁLISE SENSORIAL DA FOLHA DE BRÓCOLIS	101
TABELA 19 - PRINCIPAIS EVENTOS TÉRMICOS DAS AMOSTRAS DE FOLHA DE BRÓCOLIS E CELULOSE	107
TABELA 20 - ANÁLISE SENSORIAL DA FOLHA DE ORA-PRO-NOBIS.....	108
TABELA 21 - PRINCIPAIS EVENTOS TÉRMICOS DAS AMOSTRAS DE FOLHA DE ORA-PRO-NOBIS E CELULOSE	113

TABELA 22 - ANÁLISE SENSORIAL DO TALO DE TAIOBA	115
TABELA 23 - PRINCIPAIS EVENTOS TÉRMICOS DAS AMOSTRAS DE TALO DE TAIOBA E CELULOSE	121
TABELA 24 - ANÁLISE SENSORIAL DO TALO DE BRÓCOLIS	122
TABELA 25 - PRINCIPAIS EVENTOS TÉRMICOS DAS AMOSTRAS DE TALO DE BRÓCOLIS E CELULOSE	128
TABELA 26 - SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA REPRESENTANDO AS SIMILARIDADES DOS <i>SCAFFOLDS</i> COM OS TECIDOS HUMANOS.	11
FIGURA 2 - EXEMPLOS DE TIPOS DE MATRIZES QUE RESULTAM EM DIFERENTES POROSIDADES.....	16
FIGURA 3 – ESQUEMA DE TECIDO SUBMETIDO A DESCELULARIZAÇÃO	17
FIGURA 4 - DESCELULARIZAÇÃO POR PERFUSÃO EM PULMÕES DE RATOS	20
FIGURA 5 - A MATRIZ EXTRACELULAR COMPOSTA DE UM CONJUNTO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS	22
FIGURA 6 - TRANSPLANTE DE CÉLULAS HUMANAS EM FOLHAS DE ESPINAFRE DESCELULARIZADAS	24
FIGURA 7 - ILUSTRAÇÃO DO TECIDO DO FRUTO MAÇÃ DESCELULARIZADO.....	25
FIGURA 8 - MICROGRAFIAS AO MEV DE MAÇÃ (A), CENOURA (B) E AIPO (C) DESCELULARIZADOS.	26
FIGURA 9 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DE PLANTAS, EVIDENCIANDO SUAS DIVERSAS CAMADAS.	38
FIGURA 10 - ILUSTRAÇÃO DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA.....	39
FIGURA 11 - ILUSTRAÇÃO DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR SECUNDÁRIA.	41
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES DE HÍDROGÊNIO NA ESTRUTURA DA CELULOSE	44
FIGURA 13 - HIERÁRQUICA DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR.....	44
FIGURA 14 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE	45
FIGURA 15 - ESTRUTURAS DOS CRISTAIS DE CELULOSE IB E CELULOSE II.	47
FIGURA 16 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE MICROFIBRILAS CELULÓSICAS DE DIFERENTES ORIGENS.	48
FIGURA 17 - PRINCIPAIS CARBOIDRATOS QUE COMPÕEM A ESTRUTURA DA HEMICELULOSE.	52

FIGURA 18 - MODELOS DE INTERAÇÃO DE MICROFIBRILAS DE CELULOSE E HEMICELULOSE.	53
FIGURA 19 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PECTINA	56
FIGURA 20 - PRECURSORES PRIMÁRIOS DA LIGNINA.....	59
FIGURA 21 - ESPECTRO DE FTIR DE COMPONENTES PRESENTES NA BIOMASSA DE PLANTAS	63
FIGURA 22 - CURVAS DE TGA E DTG PARA HEMICELULOSE, CELULOSE E LIGNINA	68
FIGURA 23 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE TRATAMENTO QUÍMICO	74
FIGURA 24 - IMAGENS ILUSTRATIVAS DAS AMOSTRAS DE GRAVIOLA.	78
FIGURA 25 - MICROGRAFIAS DAS AMOSTRAS DE GRAVIOLA.....	80
FIGURA 26 - ESPECTRO DE FTIR DAS AMOSTRAS DE GRAVIOLA E CELULOSE.....	81
FIGURA 27 - CURVAS DE TGA E DTA DAS AMOSTRAS DE GRAVIOLA E CELULOSE.....	83
FIGURA 28 - IMAGENS ILUSTRATIVAS DAS AMOSTRAS DE CAJU	86
FIGURA 29 - MICROGRAFIAS DAS AMOSTRAS DE CAJU.....	88
FIGURA 30 - ESPECTRO DE FTIR DAS AMOSTRAS DE CAJU E CELULOSE	90
FIGURA 31 - CURVAS DE TGA E DTA DAS AMOSTRAS DE CAJU E CELULOSE.....	92
FIGURA 32 - IMAGENS ILUSTRATIVAS DAS AMOSTRAS DE CASCA DE MEXERICA.....	94
FIGURA 33 - MICROGRAFIA DAS AMOSTRAS DE CASCA DE MEXERICA	96
FIGURA 34 - ESPECTRO DE FTIR DAS AMOSTRAS DE CASCA DE MEXERICA E CELULOSE .	97
FIGURA 35 - CURVAS DE TGA E DTA DAS AMOSTRAS DE CASCA DE MEXERICA E CELULOSE.	99
FIGURA 36 - IMAGENS ILUSTRATIVAS DAS AMOSTRAS DE FOLHA DE BRÓCOLIS.....	101
FIGURA 37 - MICROGRAFIA DAS AMOSTRAS DE FOLHA DE BRÓCOLIS	103
FIGURA 38 - ESPECTRO DE FTIR DAS AMOSTRAS DE FOLHA DE BRÓCOLIS E CELULOSE	104
FIGURA 39 - CURVAS DE TGA E DTA DAS AMOSTRAS DE FOLHA DE BRÓCOLIS E CELULOSE	106
FIGURA 40 - IMAGENS ILUSTRATIVAS DAS AMOSTRAS DE FOLHA DE ORA-PRO-NOBIS. ..	108
FIGURA 41 - MICROGRAFIA DAS AMOSTRAS DE FOLHA DE ORA-PRO-NOBIS	109
FIGURA 42 - ESPECTRO DE FTIR DAS AMOSTRAS DE FOLHA DE ORA-PRO-NOBIS E CELULOSE	110

FIGURA 43 - CURVAS DE TGA E DTA DAS AMOSTRAS DE FOLHA DE ORA-PRO-NOBIS E CELULOSE	112
FIGURA 44 - IMAGENS ILUSTRATIVAS DAS AMOSTRAS DE TALO DE TAIOBA	114
FIGURA 45 - MICROGRAFIA DAS AMOSTRAS DE TALO DE TAIOBA EM CORTE LONGITUDINAL.....	116
FIGURA 46 - MICROGRAFIA DAS AMOSTRAS DE TALO DE TAIOBA EM CORTE TRANSVERSAL	117
FIGURA 47 - ESPECTRO DE FTIR DAS AMOSTRAS DE TALO DE TAIOBA E CELULOSE	118
FIGURA 48 - CURVAS DE TGA E DTA DAS AMOSTRAS DE TALO DE TAIOBA E CELULOSE	120
FIGURA 49 - IMAGENS ILUSTRATIVAS DAS AMOSTRAS DE TALO DE BRÓCOLIS.....	122
FIGURA 50 - MICROGRAFIA DAS AMOSTRAS DE TALO DE BRÓCOLIS	124
FIGURA 51 - ESPECTRO DE FTIR DAS AMOSTRAS DE TALO DE BRÓCOLIS	125
FIGURA 52 - CURVAS DE TGA E DTA DAS AMOSTRAS DE TALO DE BRÓCOLIS E CELULOSE	127

LISTA DE ABREVIACÕES

- FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
- Co	Cobalto
- Cr	Cromo
- DC	Descelularização
- DNA	Ácido desoxirribonucleico
- DSC	Calorimetria diferencial de varredura
- FC	Fibras de carbono
- FV	Fibras de vidro
- GAGs	Glicosaminoglicanos
- HA	Hidroxiapatita
- hMSCs	Células-tronco mesenquimais humanas
- HUVECs	Células endoteliais da veia umbilical humana
- LDL	lipoproteína de baixa densidade
- MEC	Matriz Extracelular
- Mo	Molibdênio
- Na ₂ O	Óxido de sódio
- Ni	Níquel
- P ₂ O ₅	Pentóxido de fósforo
- PCL	Poli(ε-caprolactona)
- PDLLA	Poli(LD-ácido láctico)
- PEG	Poli(etileno glicol)
- PEVA	Poli(etileno-co-vinil álcool)
- PGA	Poli(ácido glicólico)
- PLGA	Poli(láctico-co-glicólico)
- PLLA	Poli(L-ácido láctico)
- PVC	Poli(cloreto de vinilo)
- RNA	Ácido ribonucleico
- SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
- SiO ₂	Dióxido de silício
- Ti-cp	Titânio comercialmente puro
- TCP	Fosfato tricálcio

1 INTRODUÇÃO

A substituição de órgãos e tecidos devido às lesões promovidas por traumas ou patologias é comumente realizada a partir do procedimento de transplante de órgãos. No entanto, esta abordagem enfrenta um cenário crítico de escassez de doadores, agravada pela pandemia de COVID-19 (GARCIA; PACHECO, 2021). Além da carência de doadores, o transplante induz reação imunológica no paciente, o que implica em tratamentos com terapia imunossupressora concomitante (IKADA, 2006), e a longo prazo ocasionam sérias limitações funcionais ao paciente (LANGER & VACANTI, 1993). Por esses motivos, a utilização de biomateriais tem se mostrado como alternativa acessível e eficaz para a substituição de órgãos e tecidos.

A engenharia de tecidos é uma área abrangente que aplica conhecimentos da engenharia e das ciências da vida, a fim de restaurar e regenerar funções biológicas por meio do cultivo de células *in vitro* em uma matriz tridimensional (*scaffolds*) que servirá de suporte para migração, adesão, proliferação celular e, conseqüentemente, formação de um novo tecido (CONTESSI NEGRINI et al., 2020; GERSHLAK et al., 2017). Além de células e *scaffolds*, a engenharia de tecidos emprega substâncias estimulantes que podem atuar na ativação de vias sinalizadoras para eventos celulares e síntese de proteínas da matriz extracelular (MEC) (VAN ZUIJLEN et al., 2015; IPTC, 2018). Os suportes podem ser produzidos a partir do uso de células do próprio hospedeiro a fim de minimizar as reações imunológicas contra o novo tecido que será implantado (IBRAHIM et al., 2013).

Para o desenvolvimento de *scaffolds*, os biomateriais devem ser tridimensionais e apresentarem arquitetura porosa, interconectividade entre os poros e topografia rugosa para viabilizar a adesão, migração, proliferação e diferenciação das células. Adicionalmente, os atributos mecânicos dos *scaffolds* devem ser similares aos do tecido que serão substituídos, no intuito de proporcionarem um suporte estrutural adequado (CHEUNG et al., 2007). Os *scaffolds* funcionam de forma semelhante à MEC influenciando tanto a topologia do contato célula-célula e matriz-célula quanto a distribuição das biomoléculas sinalizadoras (MORRISON & KIMBLE, 2006; LEE & VASIOUKHIN, 2008). Dessa forma, o suporte ideal é aquele com arquitetura

semelhante ao tecido alvo, em seu estado nativo; no entanto, imitar com precisão a MEC nativa para tecidos manipulados continua sendo um desafio, dada a tecnologia atual (KIM et al., 2016; ROSALES & ANSETH, 2016)

A celulose é o principal componente das paredes celulares das plantas e um polímero natural amplamente utilizado como *scaffold* para engenharia de tecidos (HIRAYAMA et al., 2013; MODULEVSKY et al., 2014). A obtenção de celulose natural e o desenvolvimento de um arcabouço tridimensional a partir do tecido vegetal pode ser feito por meio da técnica de descelularização com uso de diferentes detergentes, no intuito de remover seletivamente os componentes celulares, mantendo a estrutura tridimensional, preservando a parede celular e o sistema vascular (WALAWALKAR & ALMELKAR, 2020). Esta estratégia tem sido aplicada em várias espécies de plantas e frutos, tais como espinafre, haste de salsa, bambu, orquídea, maçã, dentre outros (MODULEVSKY et al., 2014; GERSHLAK et al., 2017; FONTANA et al., 2017)

Diante do exposto, no presente trabalho, realizou-se tratamentos químicos com detergentes em distintas estruturas vegetais (fruto da graviola, pseudofruto do caju, casca da mexerica, folha de brócolis, folha de ora-pro-nobis, talo de taioba e talo de brócolis) no intuito de avaliar a potencial aplicação desses materiais como *scaffold* naturais na Engenharia de Tecidos.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O uso das técnicas de descelularização e rescelularização para a construção de órgãos e tecidos tem sido bastante difundidas. Pesquisadores buscam soluções inovadoras para mitigar os problemas das longas filas de espera por órgãos para transplante e os procedimentos relacionados a essa metodologia. A remoção das células de um órgão é fundamental para a compatibilidade com o hospedeiro, uma vez que as proteínas responsáveis pela ativação do sistema imune não deverão estar mais presentes. A finalidade é então utilizar o órgão descelularizado como um suporte para o crescimento de células do próprio paciente, que possui os mesmos antígenos e, assim evitar o risco de reações imunológicas e diminuir o risco de rejeição em longo prazo do órgão/tecido transplantado (TEIXEIRA et al., 2019). No entanto, o uso de fontes derivadas de animais para pesquisa médica está associada a altos custos financeiros, impactos ambientais e considerações éticas controversas, pois aproximadamente 200 milhões de animais são usados anualmente, produzindo consumo excessivo de energia, emissões de carbono e resíduos de laboratório (GROFF et al., 2014; TAYLOR & ALVAREZ, 2020; HARRIS; LACOMBE; ZENHAUSERN, 2021). Assim, esforços contínuos devem ser realizados para desenvolver novos biomateriais como alternativas.

Scaffolds naturais provenientes de plantas representam uma abordagem promissora não só devido à sua abundância e acessibilidade, mas também por serem constituídos, em sua maior parte, de celulose, um polímero biocompatível e biodegradável, que, juntamente com os outros componentes formam uma rede tridimensional hidrofílica que confere à parede celular robustez e durabilidade (MIYAMOTO et al., 1989; VILJANTO et al., 1999; HARRIS; LACOMBE; ZENHAUSERN, 2021). Adicionalmente, os vegetais exibem um sistema natural de transporte de fluidos, que se assemelha ao da rede vascular ramificada dos mamíferos (MCCULLOH; SPERRY; ADLER, 2003), que se estendem e se organizam de grandes veias principais a capilares finos com definição detalhada. Esses microvasos são difíceis de se reproduzir usando as atuais impressoras tridimensionais ou tecnologias microfluídicas (SARKER et al., 2018; HARRIS; LACOMBE; ZENHAUSERN, 2021).

Além disso, em razão das abundantes ligações dissulfeto intra e intermoleculares, as proteínas vegetais possuem inerente estabilidade aquosa; e ainda, o seu peso molecular, é comparativamente baixo em relação ao observado em proteínas animais, exibem também maior polaridade; assim, são naturalmente hidrofílicos e potencialmente eficazes para adesão celular (HURTADO-LÓPEZ; MURDAN, 2006). Finalmente, como um recurso sustentável, os *scaffolds* derivados de plantas podem reduzir a produção de resíduos, uma vez que, não precisam ser descartados. Portanto, como uma fonte acessível e renovável, as plantas possuem características vantajosas para seu uso como biomaterial na Engenharia de Tecidos e aplicações biomédicas (HARRIS; LACOMBE; ZENHAUSERN, 2021). Nesse intuito, o presente trabalho propõe investigar vegetais e frutas abundantes e comumente usadas na região do cerrado brasileiro a fim de avaliar a estrutura vegetal pós tratamento químico e a possibilidade das suas aplicações como *scaffold* na engenharia de tecidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de descelularização com detergentes em diferentes concentrações e/ou tempos em estruturas vegetais, no intuito de avaliar a potencial aplicação desses materiais como *scaffolds* na engenharia de tecidos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o tratamento químico com variadas concentrações/tempos com os seguintes reagentes: SDS, triton X-100 e hipoclorito de sódio nas seguintes estruturas vegetais - fruto da graviola, pseudofruto do caju, casca da mexerica, folha de brócolis, folha de ora-pro-nobis, talo de taioba e talo de brócolis;
- Realizar análise sensorial (visual e resistência mecânica) dos materiais obtidos após o tratamento químico;
- Caracterizar por meio das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Termogravimetria (TGA) as diferentes estruturas vegetais submetidas ao tratamento químico com detergentes.

4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Engenharia de tecidos

Em 1988, durante um encontro patrocinado pela *National Science Foundation* (NSF) nos EUA, discutiu-se a respeito do termo engenharia de tecidos, sendo definido como “a aplicação dos princípios e métodos da engenharia e ciências da vida na compreensão da relação estrutura-função em condições normais e patológicas dos tecidos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para sua reparação e regeneração” (SKALAK; FOX, 1988).

A prática da engenharia de tecidos estabeleceu-se antes mesmo de seu conceito, sendo aplicada durante a década de 70, quando Burke e Yannas (1980), trabalharam no desenvolvimento de uma pele artificial a partir de fibroblastos cultivados sobre materiais naturais (colágeno). Este material possuía duas camadas, a superior, chamada de Silastic (polimerosona sintética), composta por uma fina folha de silicone, com função protetora contra infecções e desidratação, e a camada inferior, que se assemelhava a um andaime, feito de material orgânico (tendões de vaca e cartilagem de tubarão). O método consistiu em semear as células saudáveis da pele, retiradas de outras partes do corpo, no biomaterial criado. A pele artificial teve como intuito regenerar feridas de queimadura, função, a qual, desempenhou com sucesso (YANNAS; BURKE, 1980; VAN ZUIJLEN et al., 2015).

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar, que aplica conhecimentos das engenharias e ciências biológicas com intuito de desenvolver substitutos viáveis, que reparam, mantêm e melhoram as funções biológicas. É constituída por uma tríade de estratégias a fim de se desenvolver um tecido: células isoladas ou substitutos de células, substâncias indutoras do tecido e, o arcabouço onde as células serão semeadas (LANGER; VACANTI, 1993). A engenharia de tecidos pode também ser descrita e representada pelo conjunto de ferramentas que proporcionam o reparo de tecidos a partir do cultivo de células *in vitro*, manipuladas em laboratório (VAN ZUIJLEN et al., 2015) e que após à diferenciação celular podem ser implantadas *in vivo*.

Langer e Vacanti, em 1993, publicaram um artigo na revista científica “Science”, que definiu a motivação, metodologia e elementos que constituem a Engenharia de Tecidos. De acordo com os autores, a principal abordagem dessa área de pesquisa consiste do cultivo de células do paciente em materiais que mimetizam a morfologia e propriedades físico-químicas e mecânicas da matriz extracelular, com o intuito de oferecerem abrigo, nutrição e condições favoráveis para a adesão, migração, proliferação e diferenciação de células, e subsequente crescimento de órgãos e tecidos *in vitro* ou regeneração dos mesmos, *in vivo*. O processo consiste basicamente na coleta de um número pequeno de células do paciente através de uma biópsia e, posteriormente são isoladas e expandidas, em laboratório. Em seguida, as células são cultivadas nos *scaffolds*, na presença de moléculas bioativas (fatores de crescimento e diferenciação, fármacos) que simulam a condição fisiológica. As células secretam os componentes de matriz extracelular a fim de criar um novo tecido vivo que pode ser utilizado como substituto para implante no sítio defeituoso no paciente. O reparo e reconstrução de um novo tecido pode ocorrer de duas formas, na primeira, o conjunto (estrutura + células) proporciona suporte ao crescimento celular à medida em que a estrutura é remodelada com a degradação *in vivo* da mesma (BARBANTI, ZAVAGLIA, DUEK; 2005). Logo, o *scaffold*, *in vivo*, é degradado, e por fim, há somente um novo tecido ou órgão composto por matriz extracelular e células (HOSHIBA et al., 2010). No segundo mecanismo, a estrutura tridimensional utilizada é produzida contendo as propriedades mecânicas e tempo de degradação necessários desde a inserção das células até o bioreator, onde estas proliferam na cultura *in vitro* à medida em que a estrutura é degradada e reabsorvida até a formação do tecido (BARBANTI, ZAVAGLIA, DUEK; 2005). De acordo com Passos (2015) essa metodologia pode ser resumida nas seguintes etapas:

- 1) Coleta de células por biópsia;
- 2) Isolamento celular;
- 3) Expansão celular;
- 4) Cultivo das células no *scaffold*;
- 5) Maturação do conjunto *scaffold*-células no biorreator;
- 6) Inserção do *scaffold* no paciente.

No ano de 1996 foi publicada uma pesquisa que demonstrou a viabilidade de criar tecidos a partir de matrizes sintéticas, de forma a representar, tridimensionalmente, a estrutura de um membro humano. Para muitos pesquisadores, este episódio foi o marco na engenharia de tecidos. O experimento consistiu em uma estrutura desenvolvida a partir de polímeros biodegradáveis sintéticos, semeada com células cartilaginosas de bovinos, originando, anatomicamente, uma orelha humana, a qual foi implantada nas costas de um camundongo (CAO et al., 1997).

A partir da evolução da engenharia de tecidos, seu campo de abordagem aumentou, expandindo para a bioimpressão de órgãos e tecidos, ou seja, a transformação de modelos tridimensionais virtuais, em estruturas reais. O método é realizado por meio de deposição controlada de células, biomateriais ou biomoléculas, baseada no princípio da fabricação aditiva (camada a camada), conhecida como prototipagem rápida, com o objetivo de formação do tecido ou órgão (BARROS, 1995; DA SILVA; DUAILIBI, 2008). Em 2019 pesquisadores israelenses desenvolveram o protótipo de um coração vascularizado, a partir da impressão 3D utilizando tecido humano. O protótipo contém células, vasos sanguíneos, câmaras e outras estruturas que um coração precisa para funcionar normalmente. O órgão apresenta contração, porém, em sua totalidade, ainda não é capaz de bombear sangue. O desafio enfrentado é conceber um comportamento celular semelhante à um coração verdadeiro, para que, posteriormente, possa ser transplantado em animais (EBC, 2019).

Ao longo da última década, a engenharia de tecidos alcançou avanços significativos ao combinar células, *scaffolds* de biomateriais e moléculas biologicamente ativas no tratamento de doenças e lesões, confrontando os métodos já adotados para a restauração das funções biológicas. Contudo, apesar dos avanços já realizados, o desenvolvimento de *scaffolds* com requisitos necessários à sua função, e o uso de metodologias acessíveis e em larga escala continua sendo um grande desafio (FONTANA et al., 2017a).

4.2 Scaffolds

Os biomateriais utilizados para a regeneração de órgãos e tecidos *in vitro* ou crescimento desses *in vivo* dentro do conceito da Engenharia de Tecidos são denominados *scaffolds*, e são definidos como biomateriais sólidos, porosos, com três dimensões, desenvolvidos para executarem as seguintes funções como descrito por Langer e Tirrell (2004):

- (1) Promover a interação de células com biomateriais, ou seja, propiciar a adesão e deposição da matriz extracelular nativa;
- (2) Permitir o transporte de gases, nutrientes e produtos metabólicos, possibilitando a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular;
- (3) Ser capaz de biodegradar a uma taxa compatível com a taxa de regeneração tecidual sob as condições de cultura de interesse;
- (4) Provocar um grau mínimo de inflamação ou toxicidade *in vivo*.

O primeiro critério para um *scaffold* é que ele seja biocompatível, ou seja, capaz de reagir com fluidos fisiológicos e formar ligações tenazes com os tecidos através da atividade celular; dessa forma, eles desfrutam de melhores interações com as células, o que lhes permitem potencializar o desempenho destas no sistema biológico (HENCH, 1991; ROETHER et al., 2002). Salienta-se que, após a implantação, o *scaffold* deve provocar uma reação imune insignificante para evitar que cause uma resposta inflamatória tão grave que possa reduzir a cicatrização ou causar rejeição pelo corpo (O'BRIEN, 2011). A arquitetura dos *scaffolds* para a Engenharia de Tecidos também é de suma importância, pois, eles devem ter uma estrutura de poros interconectados e alta porosidade para garantir a penetração celular e a difusão adequada de nutrientes para as células dentro do *scaffold* e para a matriz extracelular formada por essas células; bem como para permitir a difusão de produtos residuais para fora do *scaffold*, e os produtos da degradação do suporte, além de não apresentar toxicidade, devem ser capazes de sair do corpo sem interferência com outros órgãos e tecidos circundantes (O'BRIEN, 2011). A arquitetura (porosidade e interconectividade), como mostra a Figura 1, o controle da topografia de superfície e rugosidade são fatores importantes que viabilizam a migração das células na superfície do *scaffold*. A microarquitetura da superfície interfere na

adesão das células, pois, superfícies lisas, curvas ou rugosas apresentam diferentes áreas de contato com biomoléculas e células, que podem influenciar sua conformação e função (CHEUNG et al., 2007; SILVA, 2008).

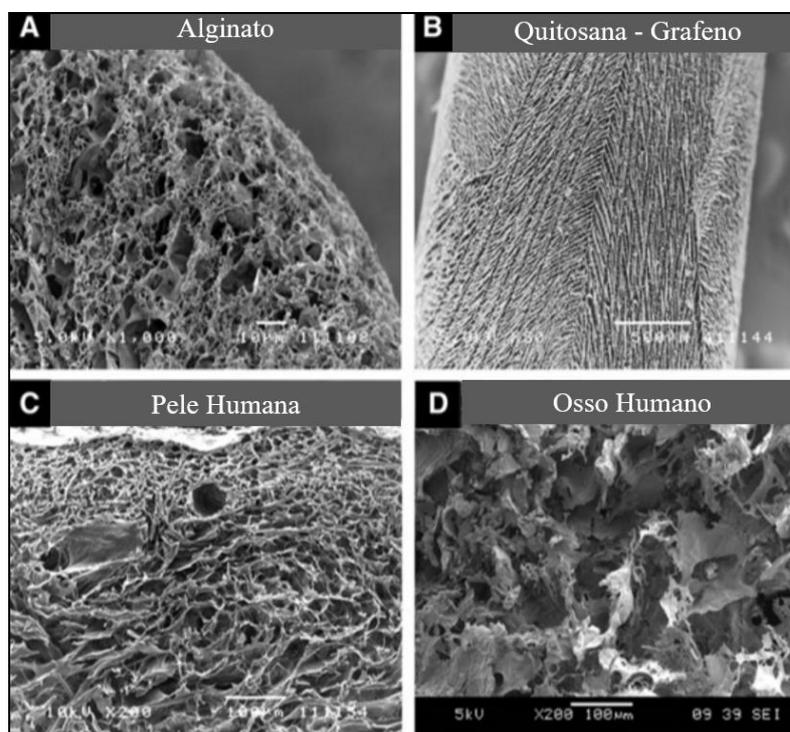
Sabe-se que o *scaffold* não se destina a um implante permanente, portanto, ele deve ser biodegradável para permitir que as células produzam sua própria matriz extracelular (BABENSEE et al., 1998). Para que a degradação ocorra em conjunto com a formação do tecido, é necessária uma resposta inflamatória combinada com a infusão controlada de células, como os macrófagos, que são ativados em resposta ao dano tecidual ou infecção, causando um aumento na produção de citocinas, quimiocinas e outras moléculas inflamatórias (BROWN et al., 2009). Nesse sentido, a resposta ideal do hospedeiro ao implante consiste em um infiltrado inicial de neutrófilos seguido por uma resposta de células mononucleares, que, rapidamente transita de um fenótipo pró-inflamatório M1 precoce para um fenótipo imunomodulador M2 pró-remodelação, dentro de dias após o implante (BROWN et al., 2012). À medida que o *scaffold* se degrada, células-tronco/progenitoras endógenas são recrutadas para o local de tratamento, ocorrendo a deposição de neomatriz, e o processo de remodelação eventualmente culmina com a deposição de tecido apropriado ao local recém-formado, que é pelo menos parcialmente funcional e desprovido de doenças crônicas e processos inflamatórios (BADYLAK, 2014).

De acordo com Kramschuster e Turng (2013), o principal objetivo dos *scaffolds* é que eles sejam hábeis a conservar sua integridade estrutural enquanto suportam temporariamente as cargas externas e tensões causadas pela formação do novo tecido, preservando propriedades mecânicas próximas às do tecido circundante (KRAMSCHUSTER; TURNG, 2013; NIKOLOVA; CHAVALI, 2019). As propriedades mecânicas são importantes, pois, a matriz proporciona suporte ao crescimento celular, respondendo às solicitações mecânicas exigidas, à medida em que a estrutura é degradada até a formação do novo tecido (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005). Segundo Vacanti, Langer e Lanza (2007), além de exibirem propriedades mecânicas adequadas ao tecido, devem conter e liberar biomoléculas, os chamados fatores de crescimento, normalmente proteínas, que se ligam aos receptores da superfície das células, de forma a desempenhar um papel de guia durante o

desenvolvimento do novo tecido. Pode-se citar alguns fatores de crescimento mais utilizados na Engenharia de Tecidos, tais como, o VEGF, que atua em vasos sanguíneos; FGF-2, age em vasos sanguíneos, osso, pele, nervo, músculo e coluna vertebral; IGF-1, em músculo, osso, cartilagem, fígado, pulmão, rim, nervo e pele; NGF, nervo, coluna vertebral e cérebro; entre outros (BRANCO, 2014; VACANTI; LANGER; LANZA, 2007).

De acordo com o que foi visto, os *scaffolds* devem, então, garantir um ambiente adequado para a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, suportando o crescimento do novo tecido e originando uma matriz extracelular, estruturalmente similar ao tecido em questão (LEITE1; MARINHO; FOOK, 2016) conforme representa a figura 1.

Figura 1 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura representando as similaridades dos *scaffolds* com os tecidos humanos.



Scaffolds porosos A e B mimetizando a porosidade e tamanho de poros semelhantes ao tecidos humanos C e D, respectivamente.

Fonte: Adaptado de Loh et al. (2013)

Na figura acima, nota-se que a arquitetura destes biomateriais são semelhantes aos tecidos humanos, pois o intuito dos *scaffolds* é justamente mimetizar o tecido alvo e atuar como substrato e/ou guia para a reparação e regeneração do mesmo. Dessa forma, os *scaffolds* são desenvolvidos em uma configuração que se assemelha à estrutura anatômica e busca mimetizar a função e a biomecânica do tecido original (ENGLER et al., 2006; NIKOLOVA; CHAVALI, 2019). Assim, a sua aplicação destina-se ao desenvolvimento de materiais que podem restaurar ou substituir órgão ou tecido como o osso, cartilagem, ligamento, pele, tecidos vasculares, tecidos neurais, músculo esquelético, bem como, servindo de veículo para o fornecimento controlado de drogas, proteínas e DNA (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

Sabe-se que o *scaffold* não se destina a um implante permanente, portanto, ele deve ser biodegradável para permitir que as células produzam sua própria matriz extracelular (BABENSEE et al., 1998). À medida que o *scaffold* se degrada, células-tronco/progenitoras endógenas são recrutadas para o local de tratamento, ocorrendo a deposição de neomatriz, e o processo de remodelação eventualmente culmina com a deposição de tecido apropriado ao local recém-formado, que é pelo menos parcialmente funcional e desprovido de doenças crônicas e processos inflamatórios (BADYLAK, 2014).

De acordo com Kramschuster e Turng (2013), o principal objetivo dos *scaffolds* é que eles sejam hábeis a conservar sua integridade estrutural enquanto suportam temporariamente as cargas externas e tensões causadas pela formação do novo tecido, preservando propriedades mecânicas próximas às do tecido circundante (KRAMSCHUSTER; TURNG, 2013; NIKOLOVA; CHAVALI, 2019). As propriedades mecânicas são importantes, pois, a matriz proporciona suporte ao crescimento celular, respondendo às solicitações mecânicas exigidas, à medida em que a estrutura é degradada até a formação do novo tecido (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005). Segundo Vacanti e colaboradores (2007), além de exibirem propriedades mecânicas adequadas ao tecido, os *scaffolds* devem conter e liberar biomoléculas, os chamados fatores de crescimento, normalmente proteínas, que se ligam aos receptores de membrana das células, de forma a desempenhar um papel de guia durante o desenvolvimento do novo tecido. O fator de crescimento endotelial

(VEGF - *endothelial growth factor*) é um fator de permeabilidade vascular que permite a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), este bastante utilizado na Engenharia de Tecidos para a produção de suportes. Além dele, fator de crescimento transformador superfamília β (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) são importantes em *scaffolds* acoplados ao sistema de liberação de proteínas destinados ao processo de reparação de cartilagem, uma vez que esses fatores participam na regulação dos processos de condrogênese e hipertrofia (CHEN et al., 2020).

4.2.1 *Tipos de Scaffolds*

Os biomateriais utilizados para aplicação como *scaffolds* podem ser categorizados de acordo com sua composição química, por exemplo: metais, cerâmicas e vitrocerâmicas, polímeros naturais, sintéticos e compósitos (NIKOLOVA; CHAVALI, 2019). Tipicamente, são utilizadas cerâmicas, polímeros sintéticos e naturais para a fabricação de *scaffolds* na engenharia de tecidos, apresentando, cada grupo de materiais, seu campo específico de aplicação, de acordo com suas características.

As cerâmicas, devido às suas similaridades químicas e estruturais com a fase mineral dos ossos, são vastamente empregadas na ortopedia e ortodontia; por exemplo, a hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico (TCP) são aplicados em processos de regeneração óssea.

Ao se tratar de polímeros sintéticos, destaca-se o poli(L-ácido láctico) (PLLA) ou poli(ácido glicólico) (PGA) e ainda, o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), que apresentam propriedades únicas interessantes como: resistência mecânica considerável para aplicação na engenharia de tecidos, alta porosidade e alta superfície de contato, bem como características de degradação controladas tornando-os materiais de ótimo desempenho e aplicabilidade. Apesar disso, esses materiais podem apresentar rejeição devido à bioatividade reduzida, os produtos intermediários de degradação desses polímeros (especificamente, ácido láctico e/ou ácido glicólico) por hidrólise não enzimática de ligações éster reduzem o pH local, que pode resultar em uma reação inflamatória e promover injúria celular no local do implante. Além disso, a rápida

queda do pH *in vivo* pode acelerar a taxa de degradação do polímero, resultando em perda prematura de propriedades mecânicas antes que ocorra a formação de novo tecido (LIU; WEBSTER, 2006; RATNER et al., 2004). Ressalta-se que, se a taxa de degradação do material for acelerada, poderá ocasionar um comprometimento na integridade do novo tecido formado, que estará suscetível a esforços incompatíveis com os quais ele pode suportar. Taxas de degradação mais lentas, por sua vez, ocasionam em esforços compressivos prematuros no tecido em desenvolvimento (LEITE, 2016).

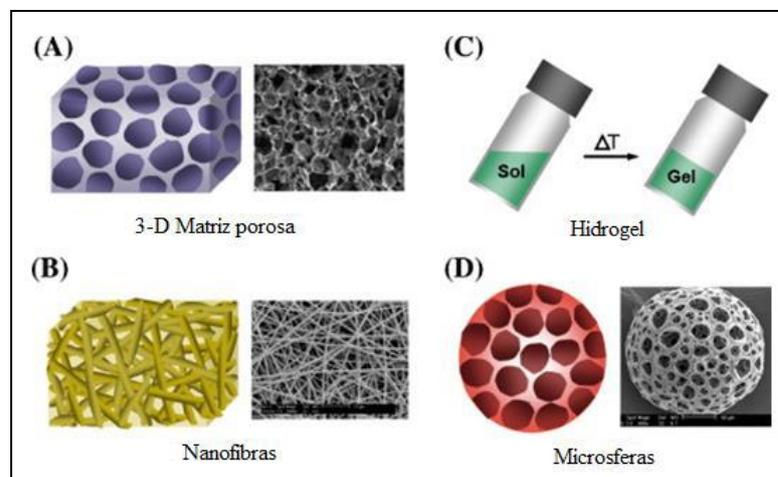
Tanto os polímeros sintéticos quanto os polímeros naturais têm sido extensivamente investigados como biomateriais poliméricos biodegradáveis. Os polímeros naturais podem ser considerados como os primeiros biomateriais biodegradáveis usados clinicamente (NAIR; LAURENCIN, 2007) e podem ser classificados como proteínas (seda, colágeno, gelatina, fibrinogênio, elastina, queratina, actina e miosina), polissacarídeos (celulose, amilose, dextrana, quitina e glicosaminoglicanos) ou polinucleotídeos (DNA, RNA) (YANNAS et al., 2004). Apesar da vantagem dos *scaffolds* de polímeros naturais em apresentarem boa resposta imunológica e melhores interações celulares (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011), eles podem exibir propriedades mecânicas inadequadas e rápida biodegradabilidade, quando comparados à maioria dos polímeros sintéticos. Dessa forma, substratos formados pela combinação de grupos de materiais podem ser a melhor solução para superar desvantagens dos materiais isolados (O'BRIEN, 2011). Assim, a estratégia de combinar polímeros naturais com polímeros sintéticos biocompatíveis ou modificando o material por meio de reticulação química ou física (IRAVANI; VARMA, 2019; REDDY; YANG, 2011), tem sido cada vez mais explorada, pois, consegue-se melhorar as propriedades dos *scaffolds*, em termos mecânicos, assim como, em relação a biocompatibilidade e, além disso, permitir a degradação controlada desses materiais (CASCONI et al., 2001).

É inquestionável o avanço no campo da engenharia de tecidos nas últimas décadas, todavia, ainda se encontram desafios a serem superados, principalmente no aperfeiçoamento de *scaffolds* a fim de mimetizar todos os tipos de órgãos e tecidos com o propósito, não só de melhora, mas de aumento na expectativa de vida da população (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; SINHORETI, M.; VITTI, R.; SOBRINHO,

2013). Os sistemas de cultura de células 3D, ou seja, cultura de células em substratos tridimensionais, os *scaffolds*, tem um futuro promissor, pois, já são capazes de proporcionar um ambiente adequado para a diferenciação celular, e são constituídos de poros para a intercomunicação celular (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008). Os desafios a serem enfrentados são: a compreensão a respeito das interações entre células e os *scaffolds* e o controle sobre as propriedades mecânicas desses substratos de acordo com a aplicação (NIGAM; MAHANTA, 2014). Nota-se que muitos materiais são produzidos com boas propriedades mecânicas, mas não apresentam porosidade adequada. Além disso, diversos estudos relatam que os materiais que exibiram potencial *in vitro* falharam quando implantados *in vivo* devido à capacidade insuficiente de vascularização (O'BRIEN, 2011). A vascularização e a inervação são importantes por se conectarem aos tecidos circundantes, permitindo a transferência de massa por difusão de nutrientes, oxigênio, fatores de crescimento, fatores de sinalização bioquímica, dióxido de carbono e resíduos metabólicos do ambiente para as células e vice-versa (SARKER et al., 2018). Dessa forma, o equilíbrio entre as propriedades mecânicas e a arquitetura porosa suficiente para permitir a infiltração celular e a vascularização é o segredo para o sucesso de um *scaffold* (O'BRIEN, 2011).

O processo de regeneração requer o desenvolvimento de redes vasculares interconectadas entre o tecido maduro e o tecido circundante. A configuração do *scaffold* deve permitir a remodelação vascular conforme o tecido amadurece, de modo que nutrientes, oxigênio e outros fatores solúveis possam atingir todas as células incorporadas enquanto os resíduos metabólicos são constantemente removidos. Por esta razão, a geometria do *scaffold* é geralmente associada a uma configuração porosa ou fibrosa, a fim de oferecer uma alta relação superfície-volume para a fixação celular e desenvolvimento do tecido (FENG; LINGLING; LIU, 2015; NIKOLOVA; CHAVALI, 2019; SAIZ et al., 2013; SHEIKH et al., 2015). Conforme mostra a Figura 2, há diferentes tipos de matrizes que proporcionam diferentes porosidades.

Figura 2 - Exemplos de tipos de matrizes que resultam em diferentes porosidades



A - representa o *scaffold* poroso, B - faz correspondência às nanofibras utilizadas na produção de *scaffolds* fibrosos, C - mostra a transição sol-gel que ocorre na formação dos hidrogéis e por fim, D - ilustra os *scaffolds* de microesferas.

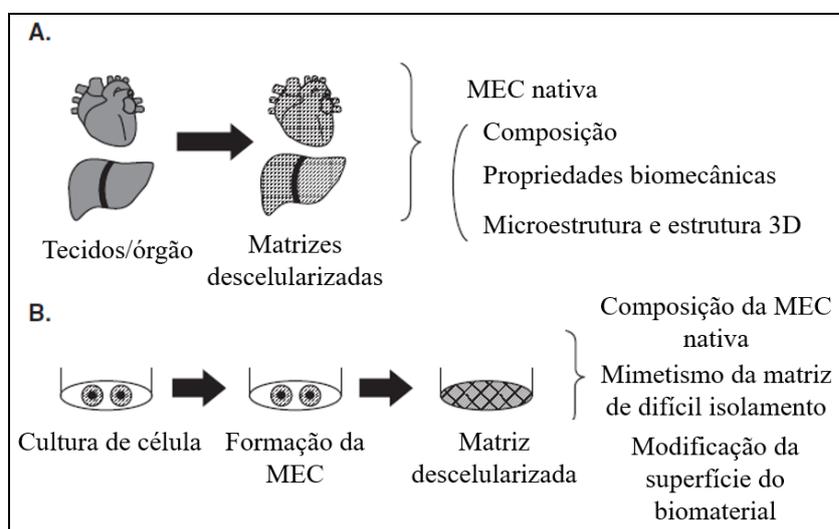
Fonte: Sá (2015).

Ambos os biomateriais sintéticos e derivados naturais estão sendo amplamente pesquisados e desenvolvidos a fim de alcançar as propriedades morfológicas, físicas, mecânicas e biológicas apropriadas para atender aos requisitos específicos para a regeneração de diferentes tecidos humanos (CONTESSI NEGRINI et al., 2020). Os *scaffolds* à base de polímeros sintéticos são reprodutíveis, possuem composição química definida e propriedades ajustáveis de acordo com os requisitos da aplicação. Os *scaffolds* de polímeros de origem natural, apesar da reprodutibilidade limitada, são caracterizados por uma melhor resposta biológica em comparação aos *scaffolds* sintéticos, uma boa biocompatibilidade e oferece sustentabilidade também (ALARIBE; MANOTO; MOTAUNG, 2016). No entanto, apesar de tecnologias avançadas de fabricação terem sido desenvolvidas para processar polímeros sintéticos, reproduzir a microarquitetura correta dos tecidos a serem regenerados ainda é um desafio (JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018). A partir disso, a descelularização dos tecidos torna-se uma opção bastante viável, uma vez que, evita o processamento de materiais, pois, a estrutura nativa biomimética pode ser preservada, e de acordo com a literatura, servem como um microambiente morfológico e bioquímico adequado para adesão, proliferação e diferenciação celular (WU et al., 2015).

4.2.1.1 Scaffolds naturais descelularizados

Os *scaffolds* naturais descelularizados são obtidos removendo-se os componentes celulares dos tecidos por meio de manipulação mecânica e/ou química a fim de produzir matrizes ricas em colágeno, as quais suportam o crescimento celular e a regeneração de tecidos sem evidência de rejeição imunogênica. Geralmente realiza-se o revestimento de polímeros a fim de promover estabilidade mecânica e aumentar a hemocompatibilidade da matriz proteica (YOUHWAN et al., 2016). O objetivo final de qualquer protocolo de descelularização é remover todo o material celular conservando a integridade mecânica e eventual atividade biológica da matriz remanescente. Essas matrizes degradam-se lentamente *in vivo* enquanto são substituídas pelas proteínas da MEC, secretadas pelas células que proliferam. A figura 3 mostra os órgãos comumente estudados e a cultura de células em matrizes tridimensionais provenientes desses tecidos e órgãos.

Figura 3 – Esquema de tecido submetido a descelularização



A figura representa os tecidos originais que foram submetidos ao processo de descelularização, preservando sua microestrutura, propriedades biomecânicas e composição, originando uma matriz extracelular descelularizada. Em B, observa-se a sequência do processo de cultura de células, evidenciando que é possível modificar o biomaterial de acordo com a aplicação desejada.

Fonte: Adaptado de Hoshiba et al. (2016).

Os tecidos/órgãos descelularizados preservam a composição, microestrutura, propriedades biomecânicas e o formato de seu tecido ou órgão nativo. As matrizes de células descelularizadas podem mimetizar a MEC nativa, manter sua composição e, além disso, a superfície do biomaterial no qual estão inseridas pode ser modificada no intuito de aprimorar sua funcionalidade (Painel B da Figura 3). De acordo com Hoshiba et al. (2016) a complexidade e dinâmica da MEC durante o desenvolvimento do ser vivo, bem como a variedade de sua composição de acordo com cada órgão e tecido, ocasiona uma grande dificuldade para desenvolver, por métodos físicos e químicos convencionais, substratos similares à mesma. Nesse sentido a utilização de matrizes descelularizadas provenientes do tecido natural tem ganhado espaço na engenharia de tecidos, sendo utilizadas como base para a cultura celular *in vitro* (HOSHIBA et al., 2016).

Wilson et al. (1995), desenvolveram um *scaffold* natural descelularizado para obtenção de uma matriz fisiológica semelhante à dos vasos sanguíneos nativos. Artérias carótidas de cães foram submetidas ao procedimento de remoção celular, que inclui tratamento com Triton X-100 e dodecil sulfato de sódio. Além disso, válvulas aórticas e pulmonares caninas foram desenvolvidas como matriz acelular, eliminando o detergente dodecil sulfato de sódio, para implante no tronco da artéria pulmonar esquerda em cães. Dos nove implantes piloto de matriz acelular, quatro estavam patentes, em comparação com quatro dos sete enxertos de veia safena. Os aloenxertos de matriz acelular não apresentaram inflamação e apenas repovoamento celular mínimo. Válvulas aórticas e pulmonares caninas não apresentaram inflamação e exibiram repovoamento celular na base da valva e endotelização parcial. Os autores concluíram que o material apresentou-se apto a uma cirurgia de revascularização do miocárdio com desempenho semelhante ao da veia safena autógena e uma bioprótese valvar cardíaca com desempenho semelhante aos homoenxertos criopreservados (WILSON et al., 1995).

Em 1999, Chen e colaboradores comprovaram que matrizes de colágeno acelulares, obtidas e processadas da submucosa da bexiga porcina, podem suportar o crescimento de células e a regeneração de tecidos geniturinários, incluindo uretra e bexiga, sem evidência de rejeição imunogênica. O exame macroscópico na recuperação mostrou tecido de aparência normal sem qualquer evidência de fibrose.

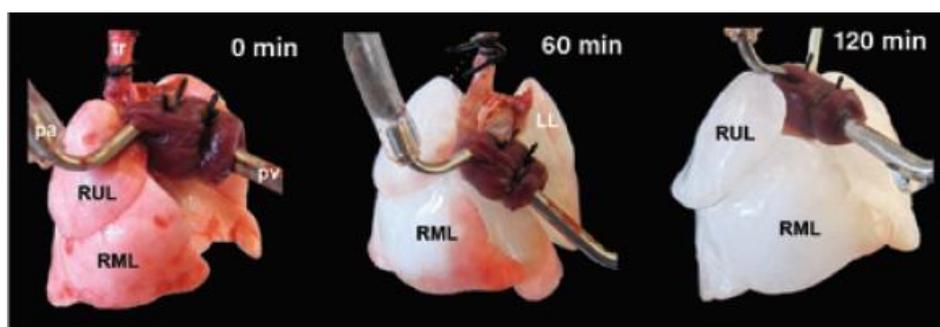
Histologicamente, as matrizes implantadas continham infiltração de células hospedeiras e angiogênese generosa por 2 semanas após a cirurgia (CHEN; YOO; ATALA, 1999). As técnicas de descelularização tem sido aplicadas também para a engenharia de tecidos cardíacos, não só para regenerar o coração existente, mas também, criar um órgão bioartificial inteiro. Isto, em parte, devido à complexidade anatômica da macro e da microanatomia do órgão cardíaco, difícil de reproduzir em detalhes por meios inteiramente sintéticos, mas razoavelmente possível pela técnica de descelularização. Por exemplo, Sarig et al. (2012) descelularizaram com sucesso um coração suíno e construíram uma matriz acelular para ser repovoada com células progenitoras e usada como plataforma de triagem de drogas *ex vivo*, como modelo *in vitro* para estudar tecido cardíaco humano e adesivos transplantáveis (SARIG et al., 2012). Delgado (2020) caracterizou e avaliou a descelularização de coração suíno para aplicação como *scaffold*, observando a eficiência no seu protocolo em termos de retenção das proteínas da MEC, preservação de fibras colágenas e manutenção de grande parte de sua estrutura tridimensional. O *scaffold* mostrou-se capaz de ser recelularizados, uma vez que, após 24, 48 e 72 horas de incubação, células de fibroblasto equino mostraram-se aderentes à superfície do material (DELGADO, 2020).

Embora vários *scaffolds* de polímeros biodegradáveis sintéticos continuem sendo desenvolvidos e estudados com o intuito de mimetizar as estruturas biológicas, o *scaffold* natural descelularizado apresenta vantagens, pois preserva a estrutura anatômica dos tecidos e reduz consideravelmente as respostas imunológicas do tecido hospedeiro. Além disso, a descelularização conserva as proteínas da MEC, que possuem papel fundamental para funções biológicas do organismo. Esse arcabouço natural possui propriedades biomecânicas semelhantes às dos tecidos nativos em questão, característica importante para a funcionalidade a longo prazo dos enxertos (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; ELEBRING et al., 2016). Tanto tecidos animais quanto vegetais podem ser descelularizados a fim de se obter *scaffolds*.

4.2.1.1.1 *Scaffolds naturais de origem animal*

A descelularização é comumente empregada em tecidos de mamíferos para remover seletivamente componentes celulares, restando uma MEC intacta. Normalmente, os tecidos de mamíferos são banhados em soluções, detergentes e/ou proteases, a fim de se produzir uma matriz descelularizada que mantém a forma do tecido original, e, a partir disso, o tecido descelularizado pode então ser repovoado com novas células no intuito de gerar tecidos e órgãos funcionais (MODULEVSKY et al., 2014a). Na figura 4 a seguir, observa-se o processo de descelularização de pulmão de rato realizado por Ott e colaboradores em 2010 (OTT et al., 2010).

Figura 4 - Descelularização por perfusão em pulmões de ratos



Na figura 4, (pa): artéria pulmonar; (pv): veia pulmonar; (tr) traquéia; (RUL): lobo superior direito; RML: lobo médio direito; (LL): lobo esquerdo.

Fonte: Ott et al. (2010).

À esquerda da figura 4 nota-se o pulmão antes da perfusão dos reagentes e, em seguida, observa-se o órgão após 60 minutos de perfusão, e à direita, após 120 minutos. O pulmão torna-se mais translúcido à medida em que o material celular é lavado primeiro nos segmentos apicais, depois nos segmentos médios e, finalmente, nos segmentos basais.

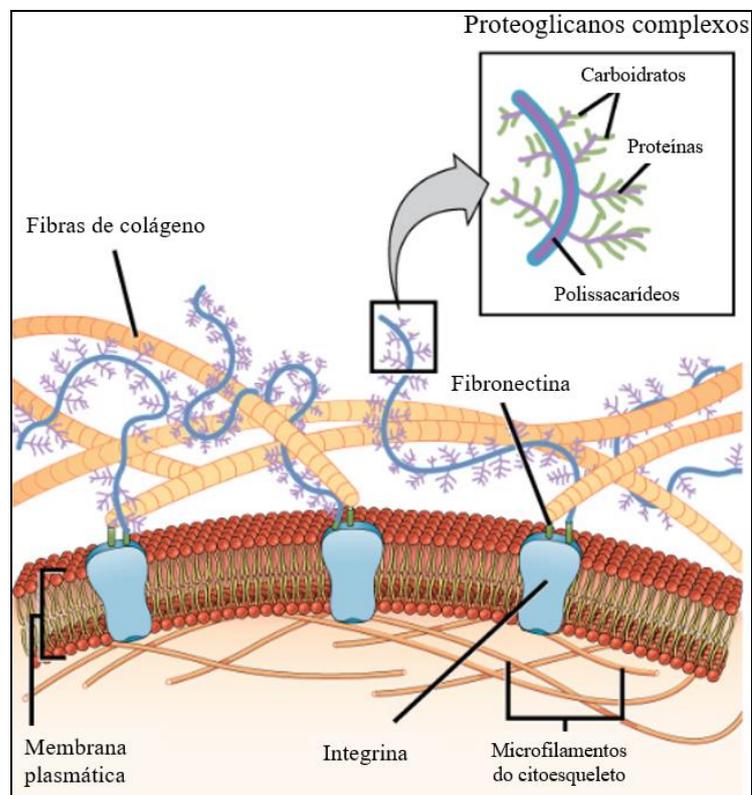
Os *scaffolds* naturais de origem animal são ricos em MEC a qual, de acordo com Alberts et al. (2002), é uma malha organizada, composta por polissacarídeos e por um conjunto complexo de proteínas estruturais e funcionais que formam um arranjo tridimensional e conferem suporte, resistência à tração, conexão entre receptores celulares para que participem da angiogênese-vasculogênese, migração, proliferação

celular, cicatrização de feridas, entre outros processos responsáveis para a manutenção de tecidos e órgãos. Conforme relatado por Badylak (2002), a MEC é um componente indispensável de todos os tecidos e órgãos, pois serve como um suporte natural para a morfogênese, manutenção e reconstrução de tecidos e órgãos após a lesão. A seguir, detalha-se a composição da Matriz Extracelular.

- Componentes da Matriz Extracelular (MEC) segundo a sua origem

A composição da MEC depende de sua localização no tecido, da idade do hospedeiro, bem como da funcionalidade imposta pelo tecido em particular. Por exemplo, a MEC dérmica tende a ser bastante vascularizada e conter principalmente colágeno do tipo I e glicosaminoglicanos específicos e uma variedade de fatores de crescimento. Órgãos ricos em células parenquimatosas, como o rim, pulmão e cérebro têm relativamente pouca MEC. Por outro lado, tecidos como tendões e ligamentos, que desempenham funções estruturais, têm grandes quantidades de MEC em relação ao seu conteúdo celular (BADYLAC, 2002). De uma forma geral, as moléculas presentes na MEC são proteoglicanos e glicosaminoglicanos, proteínas fibrosas e fatores de crescimento. A figura 5 representa um conjunto de proteínas e carboidratos que formam a MEC.

Figura 5 - A matriz extracelular composta de um conjunto de proteínas e carboidratos



Na figura 5 nota-se que a MEC é formada por uma complexa malha de proteínas e carboidratos, em que fibras de colágeno estão entrelaçadas em proteoglicanos. As integrinas, que estão imersas na membrana celular, são conectores chave que ancoram a célula à matriz extracelular. Proteínas na matriz extracelular, como as moléculas de fibronectina, mostradas em verde, podem atuar como pontes entre integrinas e outras proteínas da matriz extracelular, como o colágeno. Na face interior da membrana, as integrinas estão ligadas ao citoesqueleto.

Fonte: Adaptado de Fowler; Roush; Wise (2017).

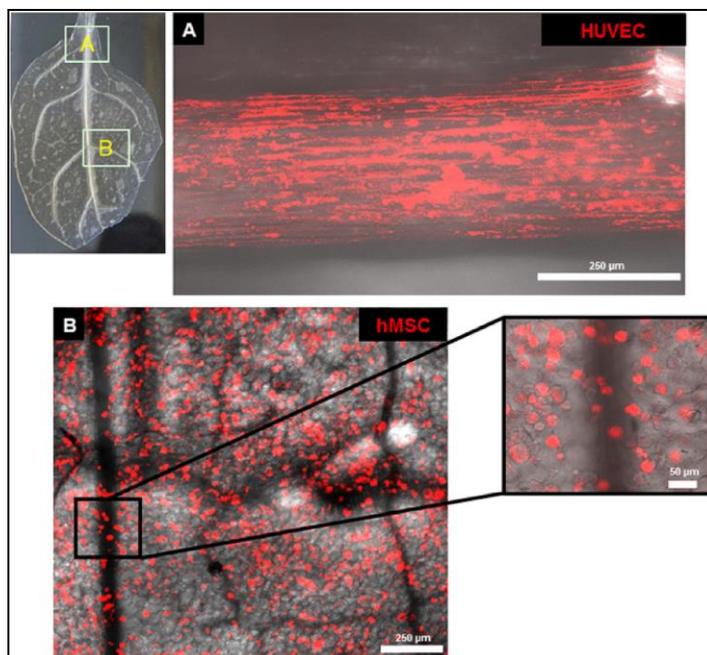
Conforme relatado por Vacanti et al. (2007), a proteína encontrada com maior abundância na MEC é o colágeno. Existem inúmeros tipos de colágenos, alguns podem ser compostos por prolina e glicina, como a chamada cadeia α , que, agregadas, formam a tripla hélice, originando as fibras colágenas da MEC. Além do colágeno também se encontram, outras proteínas como a fibronectina e a laminina que, Segundo Pereira et al. (2005), são glicoproteínas alongadas, que propiciam a adesão célula-matriz, em virtude de seus domínios específicos que interagem com os constituintes da matriz. As integrinas, são proteínas transmembranas, intermediadoras na comunicação entre o

citoesqueleto celular e proteínas plasmáticas ou da matriz extracelular, por meio da adesão célula-a-célula através de interações com outras proteínas de membrana (FERRAZ; FERNADEZ, 2014). As integrinas, além de estabelecerem a comunicação entre célula e matriz extracelular, auxiliam a célula na percepção de seu ambiente, ou seja, são capazes de detectar tanto estímulos químicos quanto mecânicos da matriz extracelular e desencadear vias de sinalização em resposta. (BETTS et al., 2017; CLARK; CHOI; DOUGLAS, 2020; FOWLER; ROUSH; WISE, 2017). Por exemplo, as integrinas desempenham um papel fundamental na cascata de acontecimentos durante processos inflamatórios ou infecciosos mediando a retenção dos leucócitos no endotélio inflamado e coordenando a transmigração através da membrana basal para permitir o deslocamento ao local da infecção ou inflamação (ABRAM; LOWELL, 2009; LEY et al., 2007). Ressalta-se ainda que, a adesão celular promovida pelas integrinas apresenta duas funções principais na migração: gera tração, ligando o substrato extracelular a fibrinogênio filamentos de actina e miosina e, organizando redes de sinalização que podem ativar várias vias de sinalização de forma independente (ASSOIAN; SCHWARTZ, 2001), mas mais frequentemente eles podem agir em sinergia com outros fatores, como por exemplo, fatores de crescimento (TUMBARELLO; TURNER, 2006) e receptores de insulina (SCHNELLER; VUORI; RUOSLAHTI, 1997). Visto isso, as integrinas podem ser consideradas moduladores chave da proliferação, migração, longevidade, e ainda, da manutenção das funções específicas de diferenciação celular (FERRAZ; FERNADEZ, 2014).

4.2.1.1.2 *Scaffolds naturais de origem vegetal*

Pesquisas recentes têm demonstrado o potencial de tecidos vegetais para aplicação na engenharia de tecidos, assim como matrizes a base de colágeno, estruturas baseadas em celulose têm evidenciado sucesso na aplicação como *scaffold*. Muitos pesquisadores tem mimetizado a arquitetura tissular cultivando células animais em frutas e vegetais descelularizados, tais como, espinafre, haste de salsa, bambu, orquídea e maçã (GERSHLAK et al., 2017; FONTANA et al., 2017; MODULEVSKY et al., 2014). Na figura 6 pode-se observar células humanas sendo usadas para colonizar folhas de espinafre descelularizadas.

Figura 6 - Transplante de células humanas em folhas de espinafre descelularizadas



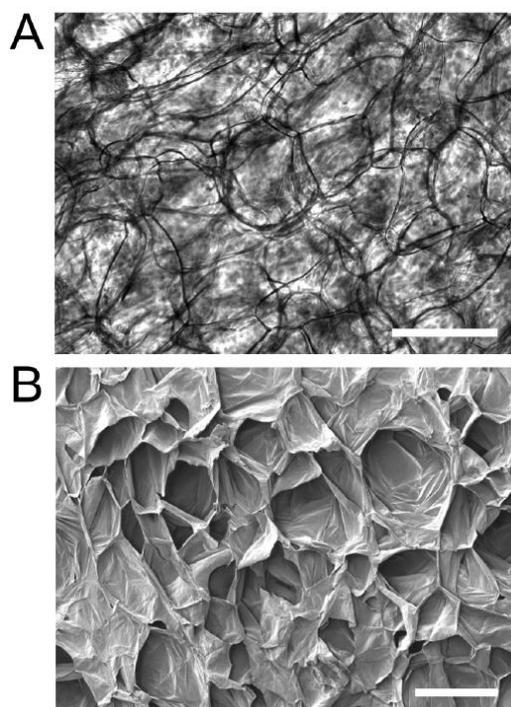
A imagem da folha no canto superior esquerdo indica a posição relativa a partir da qual as imagens A e B são derivadas. A imagem (A) aponta células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), marcadas com lipoproteína de baixa densidade (LDL) acetilada (Ac) (Dil-Ac-LDL), que foram semeadas dentro dos canalículos de uma folha de espinafre descelularizada por perfusão. Em B células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) marcadas com pontos quânticos (PQ) e semeadas na superfície de uma folha de espinafre descelularizada. PQ são nanopartículas semicondutoras altamente fluorescentes que possuem propriedades ópticas únicas que permitem rastrear as células dentro da folha (ROSEN et al., 2007).

Fonte: Gershlak et al. (2017).

O processo de descelularização, em vegetais e frutas, produz uma matriz capaz de apoiar a fixação, a sobrevivência e o crescimento de células animais e humanas (CHENG et al., 2020; CONTESSI NEGRINI et al., 2020; GERSHLAK et al., 2017a; WANG; DOMINKO; WEATHERS, 2020). Diversas propriedades desejáveis para o desenvolvimento de um biomaterial estão incorporadas na estrutura e função das plantas. A parede celular é composta de fibras ordenadas de celulose que reforçam uma matriz flexível e altamente hidrofílica de hemiceluloses, pectina e lignina, ou seja, esses polímeros de celulose são caracterizados por fortes ligações intramoleculares de hidrogênio e baixas forças atrativas intermoleculares (MODULEVSKY et al., 2014b). Ademais, os materiais resultantes oferecem propriedades mecânicas que muitas vezes

superam as de seus componentes únicos por ordens de magnitude. O reino vegetal também oferece propriedades únicas de transporte através das ramificações de vasos condutores e sistema interconectado de poros (FONTANA et al., 2017; MODULEVSKY et al., 2014), fazendo deles candidatos apropriados na utilização como *scaffold* pré-vascularizado para a engenharia de tecidos. Estudos conduzidos por Modulevsky et al. (2014) demonstram que *scaffolds* de celulose podem ser empregados para cultura 3D *in vitro* de fibroblastos (NIH3T3), mioblastos musculares (C2C12) de camundongo e células epiteliais (HeLa) humanas. Esses autores observaram que a porosidade do tecido da maçã (figura 7) facilitou a descelularização inicial e forneceu a transferência do meio de cultura permitindo a viabilidade celular a longo prazo. Ademais, funcionalização bioquímica ou reticulação química pode ser empregada para controlar a bioquímica da superfície e/ou propriedades mecânicas do andaime.

Figura 7 - Ilustração do tecido do fruto maçã descelularizado.



A - representa a parede celular de celulose em uma amostra de tecido de maçã descelularizada, linhas escuras correspondem estruturas de celulose. B - Imagem SEM de um *scaffold* de celulose. Foco para matriz tridimensional e cavidades.

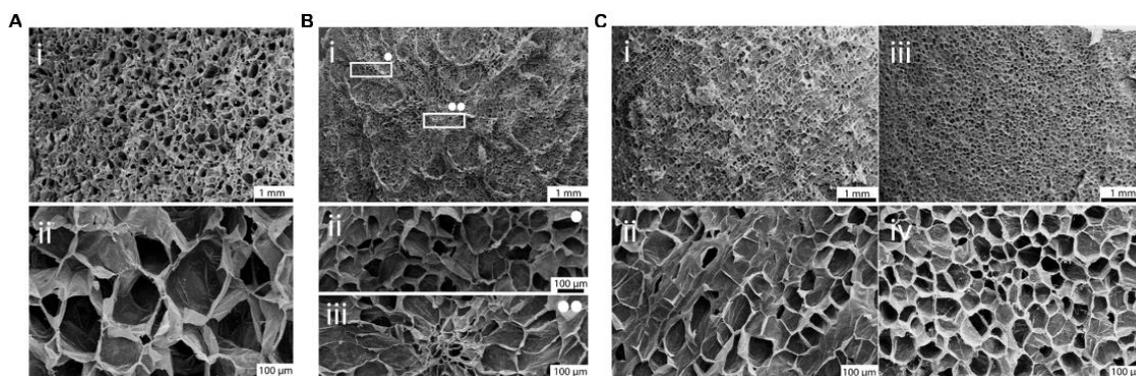
Barra de escala = 200 μm

Fonte: Modulevsky et al. (2014).

Além disso, o *scaffold* apresentou baixa resposta inflamatória sem injúrias significativas ou infecções perceptíveis a presença de novos vasos sanguíneos funcionais em todo o biomaterial que foi implantado em cobaias (MODULEVSKY et al., 2014). Lee e colaboradores (2019) utilizaram maçã, brócolis, pimentão, cenoura e caqui para desenvolver *scaffolds* de celulose poroso, de acordo com o protocolo Modulevsky et al, (2014), com o objetivo de produzir tecido ósseo por meio da semeadura de células-tronco pluripotentes (hiPSCs). Destaca-se que, as hiPSCs têm o potencial de se diferenciar em qualquer tipo de célula em quantidades ilimitadas. Portanto, são ideais para modelagem de tecidos *in vitro* ou para produção de células para uso clínico (ASSOU; BOUCKENHEIMER; DE VOS, 2018). Marcadores de cálcio mostraram que apenas as células cultivadas em *scaffolds* de maçã sobreviveram e se proliferaram, possivelmente em razão das propriedades mecânicas e dos poros regulares de 300 μm do *scaffold* obtido. Saravanan et al., (2016) ressaltam que *scaffolds* com aplicação em tecido ósseo devem apresentar estrutura interconectada e altamente porosa ($\geq 90\%$), com aberturas de tamanho adequado ($\geq 100 \mu\text{m}$) para permitir a proliferação celular e o crescimento vascular, transportando nutrientes e oxigênio.

Contessi Negrini e colaboradores (2020) promoveram a descelularização de maçã, cenoura e aipo (figura 8) utilizando detergentes e com o objetivo de produzir *scaffolds* para a engenharia de tecidos.

Figura 8 - Micrografias ao MEV de maçã (A), cenoura (B) e aipo (C) descelularizados.



A - Maçã descelularizada, observadas em (i) ampliação de 15x e (ii) 100x, observa-se tamanho e distribuição homogênea dos poros. B - cenouras descelularizadas, observa-se distribuição de poros não homogênea; (Bi) ampliação de 15x: porosidade arredondada e poros menores são observados na região

periférica (Bii): ampliação de 100x, poros orientados são observados na região central. C - Aipo descelularizado observado nas direções longitudinal (Ci,Cii) e transversal (Cii,Civ), para investigar sua estrutura anisotrópica.

Painel superior da barra de escala: 1 mm; painel inferior da barra de escala: 100 μ m.

Fonte: Contessi Negrini et al. (2020).

Os autores mostram que o procedimento de descelularização, utilizando, basicamente o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) como reagente, permitiu a preservação da morfologia nativa dos tecidos vegetais. De acordo com os resultados, os *scaffolds* derivados de maçã podem ser adequados para aplicações em engenharia de tecido adiposo devido à sua porosidade relativamente grande e homogênea e também devido às propriedades mecânicas obtidas que se ajustam corretamente à faixa do tecido humano nativo. Os *scaffolds* derivados de cenoura apresentaram poros orientados na região central e poros redondos maiores na região periférica, cujas dimensões são comparáveis à porosidade dos *scaffolds* projetados para regeneração do tecido ósseo. Devido às suas propriedades mecânicas, os autores sugeriram uma possível aplicação como preenchedores ósseos em condições sem carga, como regeneração óssea maxilo-facial e craniana. Já os *scaffolds* derivados do aipo parecem ser compostos de poros compactados e foram analisados para a regeneração de tendões devido à possibilidade de alinhar verticalmente as células em uma estrutura tubular anisotrópica e também foram capazes de suportar a deformação fisiológica a que os tendões são submetidos *in vivo* (MATHEW et al., 2012). Os testes realizados *in vitro* demonstraram que os tecidos vegetais descelularizados foram capazes não só de suportar a adesão e proliferação das células, mas também de sustentar uma correta funcionalidade das células para o tecido específico a ser regenerado (CONTESSI NEGRINI et al., 2020).

4.3 Protocolos de descelularização

Conforme já visto, o processo de descelularização consiste na remoção das células de órgãos e tecidos, originando uma malha tridimensional, a qual pode ser aplicada como *scaffold* na Engenharia de Tecidos. Esta técnica é realizada seguindo uma metodologia que engloba diversos agentes, tais como o SDS, Triton X-100,

enzimas, e entre outros, a fim de promover a quebra de ligações e eliminação de componentes celulares, conforme será descrito neste tópico.

Os métodos de descelularização podem envolver o rompimento físico e/ou químico do tecido em questão, logo, a integridade, composição, funcionalidade mecânica e biologia do material podem ser alteradas. Recomenda-se que seja realizado um processo eficiente, e, que ao mesmo tempo, minimize efeitos indesejados na MEC, a fim de garantir um arcabouço íntegro e livre de componentes celulares e nucleares. O processo, geralmente, inicia-se com a quebra/lise da membrana celular e posterior separação ou solubilização de componentes citoplasmáticos e nucleares por métodos enzimáticos ou detergentes. Após a remoção de todo o constituinte celular, os produtos químicos utilizados também devem ser extraídos a fim de evitar qualquer resposta imune do tecido hospedeiro (GOTTS & THIDEN, 2016).

A descelularização pode ser realizada a partir de agentes físicos, químicos e enzimáticos. Geralmente, o primeiro, é combinado com o segundo ou terceiro para obtenção de um processo eficiente. Os métodos físicos consistem em agitação mecânica, sonificação, e, conforme relatado por Hoshiba et al. (2016), congelamento e descongelamento a fim de promover a quebra da membrana celular e expor o conteúdo celular. Já os métodos químicos utilizam-se de sais iônicos, ácidos, detergentes, solventes orgânicos, agentes quelantes, soluções hipotônicas ou soluções hipertônicas a fim de romper as membranas celulares e as ligações responsáveis pela conexão intercelular e extracelular. Por fim, os tratamentos enzimáticos fazem uso de protease ou nuclease para clivar as ligações peptídicas ou nucleotídicas.

Crapo et al. (2011) relatam as vantagens e desvantagens de tais métodos por meio dos agentes utilizados. No grupo dos agentes químicos, os ácidos e bases podem causar a degradação catalítica. O ácido acético, por exemplo, remove colágeno, mas não afeta glicosaminoglicanos (GAGs); bases como o hidróxido de cálcio são usadas para remoção de pêlos em amostras dérmicas, porém, podem eliminar fatores de crescimento da matriz, bem como, afetar suas propriedades mecânicas. Soluções salinas hipertônicas conseguem dissociar o DNA das proteínas, no caso das hipotônicas, provocam a *lise* celular por efeito osmótico. É comum o uso alternado de ambas as soluções para melhores resultados. Em relação aos detergentes iônicos e não iônicos são capazes de

remover o material celular do tecido, no entanto, podem dissociar proteínas da MEC ou alterar sua estrutura dependendo do tempo de reação. O Triton X-100, por exemplo, pode efetivamente remover resíduos celulares de tecidos, em situações em que os métodos enzimáticos são insuficientes. O Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) é mais eficaz para remover núcleos de tecidos e órgãos densos, mas tem a desvantagem associada a ruptura da estrutura, bem como a eliminação do fator de crescimento.

Para melhor compreensão, a tabela 1 apresenta um resumo sobre os métodos mais utilizados para a descélularização de órgãos e tecidos, os respectivos modos de ação e os efeitos na MEC.

Tabela 1 – Métodos, modo de ação e efeitos na MEC de substâncias utilizadas na descelularização de tecidos e órgãos

(Continua)

MÉTODO	MODO DE AÇÃO	EFEITOS NA MEC
FÍSICO		
Congelamento instantâneo	Cristais de gelo intracelular rompem a membrana celular	A MEC pode ser rompida ou fraturada durante o congelamento rápido
Força mecânica	Mediante pressão exercida pela força mecânica, no intuito de estourar as células	A força mecânica pode causar danos à MEC
Agitação mecânica	Pode atuar causando a fragmentação celular. É utilizado para facilitar a exposição dos componentes celulares e auxiliar a remoção por métodos químicos	Agitação agressiva ou sonicação podem perturbar a MEC à medida em que o material celular é removido
QUÍMICO		
Substâncias alcalinas e ácidas	Solubiliza os componentes citoplasmáticos das células; quebra os ácidos nucleicos	Remove glicosaminoglicanos (GAGs)
Detergentes não-iônicos		
Triton X-100	Quebra as interações entre lipídeos, lipídeos e proteínas, deixando intactas as interações entre proteínas	Os resultados, em termos de remoção celular, são parciais, a eficiência depende do tecido; remove os GAGs
Detergentes iônicos		
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Solubiliza as membranas celulares citoplasmáticas e nucleares; tendem a desnaturar as proteínas	Remove remanescentes nucleares e proteínas citoplasmáticas; tende a despedaçar a estrutura do tecido nativo, remover os GAGs e danificar o colágeno

(Conclusão)

MÉTODO	MODO DE AÇÃO	EFEITOS NA MEC
QUÍMICO		
Detergentes zwitteriônicos		
CHAPS	Exibe propriedades de detergentes não iônicos e iônicos. Pode ser usado em combinação com outros detergentes	Remoção eficiente de células com ruptura da MEC semelhante à do Triton X-100
Soluções hipotônicas e hipertônicas	<i>Lise</i> celular por choque osmótico	Eficiente para a quebra celular, mas não remove eficazmente os resquícios celulares
EDTA, EGTA	Agentes quelantes que ligam íons metálicos divalentes, interrompendo assim a adesão celular à MEC	Nenhuma exposição isolada, tipicamente usada com métodos enzimáticos (por exemplo, tripsina)
ENZIMÁTICOS		
Tripsina	Cliva ligações peptídicas	A exposição prolongada pode perturbar a estrutura da MEC, remover a laminina, a fibronectina, a elastina e os GAGs
Endonucleases	Catalisar a hidrólise das ligações internas das cadeias ribonucleotídicas e desoxirribonucleotídicas	Difícil de remover do tecido e pode provocar uma resposta imune

Fonte: Adaptado de Gotts e Thyden (2016).

Tais métodos de descelularização são aplicados para órgãos e tecidos animais, contudo, recentemente eles tem sido utilizados para tecidos vegetais, conforme pode se observar na tabela 2.

Tabela 2 - Processos de descelularização utilizados em tecidos vegetais

(Continua)

FONTE	PLANTA/ FRUTA	METODOLOGIA	CÉLULAS SEMEADAS	CARACTERÍSTICA RELEVANTE	APLICAÇÃO
Apple Derived Cellulose <i>Scaffolds</i> for 3D Mammalian Cell Culture (MODULEVSKY et al., 2014a)	➤ Maçã	<ul style="list-style-type: none"> ➤ SDS a 0,5%, por 12h ➤ Lavagem em PBS e 1% de estreptomicina/penicilina e anfotericina, por 6 horas. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fibroblastos e mioblastos musculares de camundongos ➤ Célula humana epitelial 	➤ Alta porosidade	➤ Apoiar cultura de células 3D
Biofunctionalized Plants as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture (FONTANA et al., 2017a)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bambu ➤ Orquídea ➤ Baunilha ➤ Antúrio ➤ Salsa ➤ Calathea ➤ Solenostemon 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Uso de hexanos e lavagem em PBS; ➤ Perfusão de SDS a 10%, por 5 dias; ➤ Perfusão de Triton X a 0,1% em 2,5% de hipoclorito de sódio, por 48h; ➤ Remoção de resíduos com água deionizada, por 2 dias. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fibroblastos dérmicos humanos ➤ Células tronco mesenquimais humanas (hMSCs). 	➤ Ultraestrutura hierárquica, hidrofílica e interconectada	➤ Apoiar cultura de células mamíferas

(Continua)

FONTE	PLANTA/ FRUTA	METODOLOGIA	CÉLULAS SEMEADAS	CARACTERÍSTICA RELEVANTE	APLICAÇÃO
Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering <i>scaffolds</i> (GERSHLAK et al., 2017a)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Espinafre ➤ Salsa ➤ Folhas de Artemisia Annu ➤ Raízes de amendoim 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Uso de hexanos e lavagem em PBS; ➤ Perfusão de SDS a 10%, por 5 dias; ➤ Perfusão de Triton X a 0,1% em 2,5% de hipoclorito de sódio, por 48h; ➤ Folhas de Artemisia Annu e raízes de amendoim foram embebidas na solução. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tecido endotelial humano ➤ Células tronco mesenquimais ➤ Células humanas pluripotentes derivadas do cardiomiócito 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vasculatura 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Engenharia de tecido cardíaco
Organs on a Vine (GOTTS & THYDEN, 2016)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Folhas de espinafre 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Uso de hexanos e lavagem em PBS; ➤ Perfusão de SDS a 10%, por 5 a 7 dias; ➤ Perfusão de Triton X a 0,1% em 2,5% de hipoclorito de sódio, de 24 a 48h; ➤ Lavagem da amostra com água deionizada, por 24 horas. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs). 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Integridade estrutural 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Processos de triagem pré-clínica de medicamentos

(Continua)

FONTE	PLANTA/ FRUTA	METODOLOGIA	CÉLULAS SEMEADAS	CARACTERÍSTICA RELEVANTE	APLICAÇÃO
Decellularised baby spinach leaves and their potential use in tissue engineering applications: Studying and promoting neovascularization (MODULEVSKY et al., 2014a)	➤ Folhas de espinafre	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Uso de hexanos e lavagem em PBS (perfusão); ➤ Imersão em SDS a 10%, por 5 dias ➤ Imersão em 1% de Triton X 100 por um dia ➤ Imersão em 0,1% de Triton-X 100 por um dia ➤ Imersão em Solução de hipoclorito de sódio a 10% por 4 horas 	➤ Fibroblastos dérmicos humanos (HDFs)	➤ Vasculatura	➤ Angiogênese
Creation of a Contractile Biomaterial from a Decellularized Spinach Leaf Without ECM Protein Coating: An in vitro Study. (MODULEVSKY et al., 2014a)	➤ Folhas de espinafre	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Perfusão de 1% SDS por 24 horas ➤ Perfusão de 0.1% Triton X-100/10% bleach por 24 horas ➤ Lavadas em Tampão Tris 10 mM pH 9,0 durante a noite em uma placa agitadora 	➤ Cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes (hiPS-CMs)	➤ Vasculatura	➤ Engenharia de Tecido Cardíaco

(Continua)

FONTE	PLANTA/ FRUTA	METODOLOGIA	CÉLULAS SEMEADAS	CARACTERÍSTICA RELEVANTE	APLICAÇÃO
Using Decellularized Grafted Leaves as Tissue Engineering <i>Scaffolds</i> for Mammalian Cells. (MODULEVSKY et al., 2014a)	➤ Folha de <i>Aptenia cordifolia</i> (planta suculenta)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Perfusão de 10% SDS por 24 h ➤ Perfusão de 0.5% Triton X-100 com 1.2% de Solução de hipoclorito de sódio por 24 h 	➤ Linhagem de câncer de mama humano MDA-MB231	➤ Vasculatura	➤ Engenharia de Tecidos para transplante (Vascularização)
Efficient Mineralization and Osteogenic Gene Overexpression of Mesenchymal Stem Cells on Decellularized Spinach Leaf <i>Scaffold</i> . (MODULEVSKY et al., 2014a)	➤ Folhas de espinafre	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Perfusão de 10% de SDS por 5 dias, ➤ Perfusão de 1% de Triton X-100 por 5 dias; ➤ Perfusão de 0.1% de Triton X-100 em 10% Solução de hipoclorito de sódio por 2 dias 	➤ Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (BM-MSCs)	➤ Topografia superficial e vasculatura	➤ Diferenciação osteogênica

(Conclusão)

FONTE	PLANTA/ FRUTA	METODOLOGIA	CÉLULAS SEMEADAS	CARACTERÍSTICA RELEVANTE	APLICAÇÃO
Decellularization and Oxidation Process of Bamboo Stem Enhance Biodegradation and Osteogenic Differentiation. (MODULEVSKY et al., 2014a)	➤ Caule de bambu (<i>Bambusa vulgaris</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ (S/H) - 10% SDS em 1% de hipoclorito de sódio ➤ (T/H) - 1% de Triton X-100 em 1% de hipoclorito de sódio ➤ (S/T/H) - 10% SDS e 1% Triton X-100 (proporção 50:50) em 1% hipoclorito de sódio ➤ (H) - Hipoclorito de sódio a 1% por 24 horas 	➤ Células-tronco mesenquimais (MSCs)	➤ Organização estrutural	➤ Engenharia de Tecido ósseo (<i>in vivo</i>)
Fabricating a pre-vascularized large-sized metabolically-supportive <i>scaffold</i> using Brassica oleracea leaf. (WALAWALKAR, & ALMELKAR, 2020)	➤ Folhas de Brassica oleracea	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Perfusão de PBS (1X) e SDS (10%) por dez dias ➤ Perfusão de 1% Triton-X-100 por 48 horas ➤ Lavagem com água deionizada estéril duplamente destilada por 72 horas 	➤ Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs)	➤ Vasculatura	➤ Engenharia de tecidos para transplante de grandes enxertos

Fonte: próprio autor.

Na tabela 2 as principais informações referentes ao processo de descclularização de diversas plantas é sumarizado, destacando-se a metodologia utilizada e o tipo celular semeado após o procedimento, bem como as características relevantes e aplicabilidade do material obtido. Verifica-se, em geral, que as pesquisas buscam a melhor combinação dos reagentes SDS, Triton X-100 e hipoclorito de sódio em termos de concentração e tempo de aplicação, a fim de estabelecer uma metodologia adequada para as plantas estudadas.

Os *scaffolds* baseados em plantas têm sido bastante explorados em virtude de sua acessibilidade, quando comparados aos *scaffolds* tradicionalmente utilizados no campo da Engenharia de Tecidos, assim como a grande quantidade e o crescimento rápido de muitas espécies de plantas, proporcionando um biomaterial menos dispendioso, mais abundante e sustentável. A literatura demonstra a capacidade dos tecidos vegetais descclularizados em suportar a adesão, proliferação e funcionalidade das células, fundamentais para a regeneração dos tecidos humanos. Apesar de mais estudos serem necessários para verificar a viabilidade do implante *in vivo* e sua integração com o organismo hospedeiro, as características das plantas corroboram para o sucesso de sua aplicabilidade (NEGRINI et al., 2020). A configuração hierárquica de uma folha é composta por diferentes estruturas composicionais e geométricas semelhantes à MEC que constituem a configuração hierárquica do tecido humano (WALAWALKAR; ALMELKAR, 2020). As paredes das células vegetais são compostas por uma variedade de polissacarídeos, como celulose, hemicelulose e pectina, bem como uma variedade de proteínas que são imprescindíveis no comportamento celular, conforme é descrito no tópico seguinte.

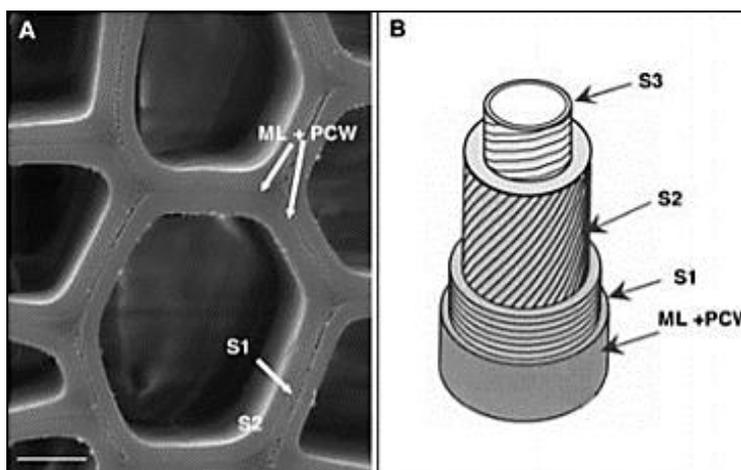
4.4 Componentes da Parede Celular Vegetal

Os tecidos animais e vegetais não são constituídos apenas por células, mas também por um espaço extracelular preenchido por um complexo de componentes fibrosos e protéicos denominados de matriz extracelular (MEC). Esta se constitui em proporções variadas de proteínas e polissacarídeos, organizados em rede, os quais são responsáveis pela diversidade morfológica, funcional e patológica dos tecidos, fornecendo substrato adequado para o crescimento e diferenciação dos variados tipos celulares do organismo (PEREIRA et al., 2005).

A parede celular vegetal funciona como uma elaborada matriz extracelular que envolve cada célula de uma planta e é, geralmente, mais grossa e mais rígida do que a matriz extracelular animal. A parede celular tem como funcionalidade a sustentação esquelética, bem como, o transporte, auxiliando na formação de canais para a movimentação de fluidos na planta (ALBERTS, et al., 2002).

A parede celular vegetal é formada por um conjunto de polissacarídeos e outros compostos secretados pela própria célula (assim como a matriz extracelular animal), que são ordenados e unidos através de ligações covalentes e não-covalentes (TAIZ & ZIEGER, 2002). Conforme pode ser observado na figura 9, a parede celular possui dois tipos principais de estrutura denominadas de parede primária e secundária.

Figura 9 - Estrutura da parede celular de plantas, evidenciando suas diversas camadas.

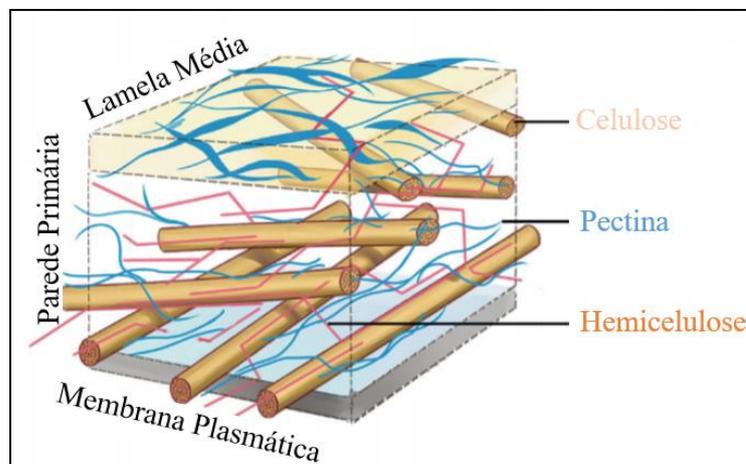


A - parede celular; B - representação esquemática da parede celular, sendo ML a lamela média; PCW: parede celular primária; S1, S2, S3: representam as camadas da parede celular secundária.

Fonte: Salazar (2012).

Já na figura 10, os macrocomponentes da parede celular primária podem ser identificados.

Figura 10 - Ilustração dos componentes da parede celular primária.



Representação da parede primária, indicando a membrana plasmática, na base, e lamela média, no topo. Nota-se que a parede celular é formada basicamente por polissacarídeos como celulose, hemicelulose e pectina.

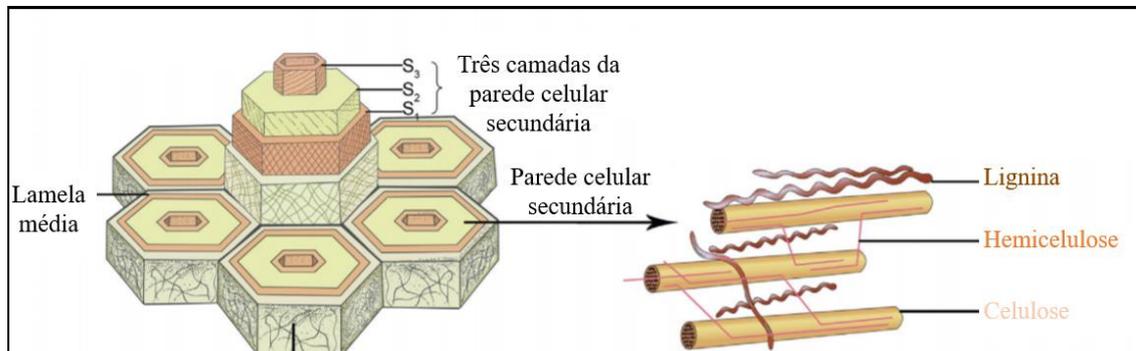
Fonte: Adaptado de Zhao et al. (2019).

A parede celular primária é tipicamente mais fina, apenas 0,1-10 μm de espessura, produzida durante o crescimento celular, e, capaz de conferir estabilidade e flexibilidade com o intuito de facilitar a expansão das células. É formada basicamente por polissacarídeos como celulose, hemicelulose e pectina. As microfibrilas de celulose são reticuladas em uma complexa rede de moléculas de hemicelulose através de ligações de hidrogênio. As pectinas, polissacarídeos altamente hidrofílicos, estão entrelaçados na rede de celulose e hemicelulose (ZHAO et al., 2019).

A lamela média, vista no topo da figura 10, é uma camada rica em pectina, com pequenas quantidades de proteínas, que cimenta as paredes primárias das células adjacentes. Embora a lamela média seja apenas uma camada fina, com aproximadamente 50 nm de espessura, ela desempenha um papel importante na manutenção da integridade estrutural dos tecidos e órgãos da planta (ZHAO et al., 2019). Com a idade, tanto a lamela média quanto a parede celular primária podem se tornar lignificadas e menos distintas, de modo que a lamela média e suas duas paredes celulares primárias vizinhas são conhecidas coletivamente como lamela média composta (GIBSON, 2012).

Algumas células vegetais são compostas apenas da parede celular primária, enquanto em outras, o protoplasto deposita uma parede secundária dentro da parede celular primária após o crescimento celular cessar (ZHAO et al., 2019). Geralmente, dividida em S1, S2 e S3 (conforme representado na figura 11), a parede celular secundária, é particularmente importante em tipos de células especializadas, por exemplo, com finalidade de suporte ou transporte de água, como os tecidos do xilema, e funções em outros órgãos, tais como dispersão de sementes e abscisão precisa de órgãos florais. As pesquisas na área de botânica destacam a importância das modificações da parede celular e da cutícula para o surgimento de diversas formas e funções. Por exemplo, a dispersão explosiva de sementes em *Cardamine hirsuta* depende da localização assimétrica dos espessamentos da parede celular lignificada na válvula do fruto. Da mesma forma, a iridescência das pétalas de *Hibiscus trionum* depende de estrias regulares formadas por dobras cuticulares. Além disso, os fatores de transcrição NAC regulam a diferenciação dos vasos lignificados do xilema, mas também as células condutoras de água do musgo que não possuem parede celular secundária lignificada, apontando para a origem dos sistemas vasculares (MONNIAUX; HAY, 2016). Além disso, uma camada mucilaginosa pode estar contida no revestimento externo de sementes. Numerosas mucilagens vegetais são compostas por polissacarídeos fortemente hidrofílicos ácidos (pectinas) e neutros (arabinose, celulose, manose, ramnose e xilose) (HAUGHN; WESTERN, 2012; PHAN; BURTON, 2018) e contribuem para a germinação de sementes, desempenhando um importante papel ecológico, particularmente em ambientes áridos (HUANG, 2000; SOUZA; MERCADANTE-SIMÕES; RIBEIRO, 2020).

Figura 11 - Ilustração dos componentes da parede celular secundária.



Parede secundária, indicando em sua base a lamela média, e em seguida as três camadas que compõem sua estrutura.

Fonte: Adaptado de Zhao et al (2019).

Portanto, as arquiteturas complexas e heterogêneas das paredes celulares são específicas da espécie e estão fortemente associadas às funções celulares desempenhadas (KNOX, 2008). Vale ainda ressaltar que a parede celular secundária é mais espessa e rígida, e, apresenta compostos de celulose e hemicelulose que são muitas vezes impregnados de lignina (conforme exibido na figura 11) (TAIZ; ZEIGER, 2003). Segundo Alberts et al. (2002), as paredes celulares das plantas especializadas contêm componentes adicionais, como a lignina, que é dura e ocupa os interstícios entre os outros componentes, tornando as paredes rígidas e permanentes. A lignina desempenha um papel importante em plantas lenhosas (capazes de produzir madeira como tecido de suporte dos seus caules), adicionando força e estrutura às paredes celulares, controlando o fluxo de fluidos e protegendo contra estresses bioquímicos, inibindo a degradação enzimática de outros componentes (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014). Consciente da importância dos integrantes da parede celular na vitalidade do reino vegetal, os próximos tópicos descrevem e caracterizam seus principais componentes.

4.4.1 *Celulose*

O químico francês Anselme Payen, em 1838, descreveu um sólido fibroso resistente, que permanece na estrutura de vários tecidos vegetais, após um tratamento com ácidos e amoníaco e extração subsequente com água, álcool e éter. A fórmula química empírica da celulose é conhecida como $(C_6H_{10}O_5)_n$, e por reações de hidrólise

obtém-se unidades estruturais de glicose (ZUGENMAIER, 2008). O termo “Celulose” para este sólido fibroso presente nos vegetais, foi usado pela primeira vez em 1839 por um relatório da academia francesa. Antes mesmo de sua denominação, a celulose já era utilizada na forma de madeira, algodão e tecidos para roupas, sendo aplicada como matéria prima química há mais de 150 anos. Através do conhecimento de modificação química da celulose por meio da síntese do primeiro polímero termoplástico chamado celulóide (cânfora usada como plastificante) pela Hyatt Manufacturing Company, em 1870, demonstrou que novos materiais poderiam ser desenvolvidos em escala industrial (BALSER et al., 1984)

Atualmente existem quatro diferentes vias pelas quais a celulose pode ser obtida, sendo a produção a partir de plantas a abordagem mais utilizada. As fibras de madeira de árvores do grupo das dicotiledôneas arbóreas (*Angiospermae*) e das coníferas (*Gymnospermae*) são de grande importância na fabricação de pastas celulósicas e papel. Embora a maioria das fibras sejam provenientes de troncos de árvores, tem-se também oriundas de folhas como o sisal, frutos e algodão (CELULOSE ONLINE, 2019).

Além das plantas, certas bactérias e algas também produzem esse polímero. É conhecido que a biossíntese da celulose faz parte do ciclo de vida de cianobactérias por mais de 3,5 bilhões de anos, por outro lado, a síntese de celulose, *in vitro*, tem sido destacada e muito difundida como uma fabricação adicional (MELO, 2007). Em escala laboratorial, a síntese de celulose é realizada com êxito utilizando-se técnicas específicas, como exemplo, por transformações enzimáticas de derivados de celulose e por quimiossíntese com glicose funcionalizada como material de partida, e entre outras metodologias (KLEMM et al., 2005). A celulose sintase é a enzima que polimeriza resíduos de glicose e forma microfibrilas de celulose I nos organismos vivos; essa enzima pode ser utilizada para a síntese de celulose *in vitro* e aumentar o rendimento da produção da celulose bacteriana (JOZALA et al., 2011). Essas formas de celulose são frequentemente estudadas a fim de se produzir novos biomateriais (SAXENA & BROWN, 2005).

A celulose está disponível na forma quase pura em sementes de algodão, conforme nota-se nos valores apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Teor de Celulose em fontes naturais.

MATERIAL	CELULOSE (%)
Algodão	95-99
Ramie	80-90
Bambu	40-50
Madeira	40-50
Casca de Árvores	20-30
Musgos	25-30
Bactérias	20-30

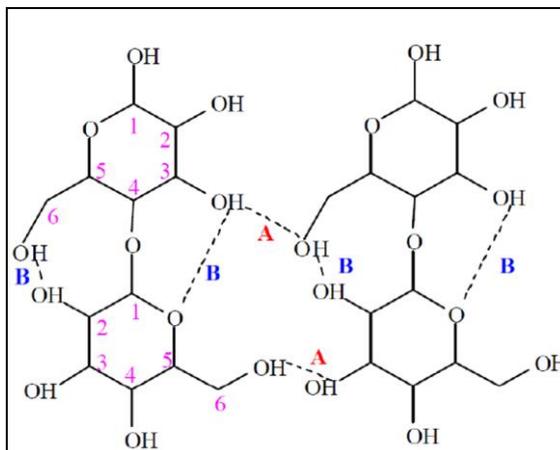
Fonte: Adaptado de Fengel & Wegener (1984).

Salienta-se que, nas madeiras, a celulose forma um material compósito com a lignina e outros polissacarídeos (hemiceluloses), dos quais pode ser isolada por processos químicos (SAXENA E BROWN, 2005).

4.4.1.1 *Composição química e estrutural da celulose*

Conforme relatado anteriormente, Anselme Payen iniciou o estudo da composição química da celulose, e, por análise elementar determinou que o tecido das plantas é constituído por um componente majoritário que contém 44,4% de carbono, 6,2% de hidrogênio e 49,3% de oxigênio, o que é equivalente à fórmula empírica de $C_6H_{10}O_5$ e massa molar de $162\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. A estrutura da celulose é formada por ligações de hidrogênio entre grupos OH, conforme demonstrado na figura 12.

Figura 12 - Representação das ligações de Hidrogênio na estrutura da celulose

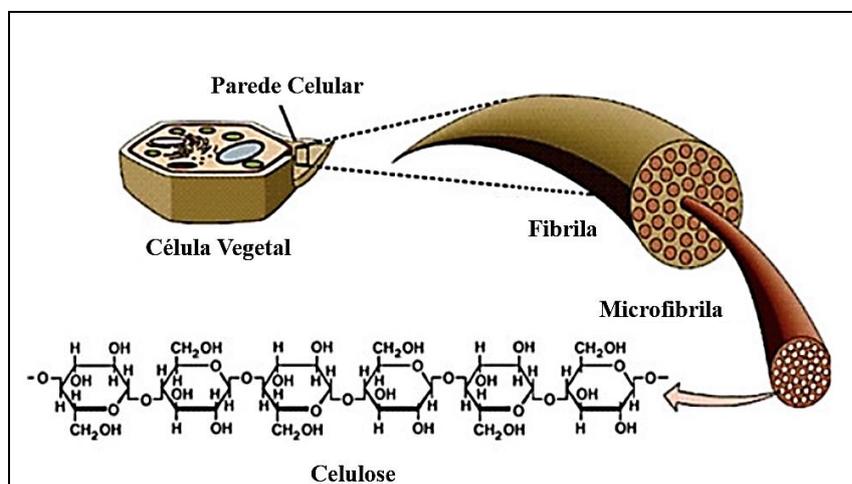


As ligações de hidrogênio na estrutura da celulose podem ocorrer entre moléculas adjacentes (ligações intermoleculares - A), sendo responsáveis pela formação da estrutura supramolecular, ou em unidades de glicose da mesma molécula (ligações intramoleculares - B), propiciando rigidez às cadeias unitárias.

Fonte: Almeida (2009).

A partir das ligações intermoleculares de hidrogênio, as cadeias de celulose se agregam formando as microfibrilas, as quais dão origem às fibrilas, que se ordenam gerando as paredes celulares da fibra. As fibrilas de celulose, juntamente com os compostos altamente hidrofílicos formam uma rede tridimensional hidrofílica, permitindo a permeabilidade da parede celular, e por consequência, a troca de nutrientes com o meio extracelular (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013). A figura 13 apresenta a estrutura hierárquica da parede celular.

Figura 13 - Hierárquica da estrutura da parede celular.

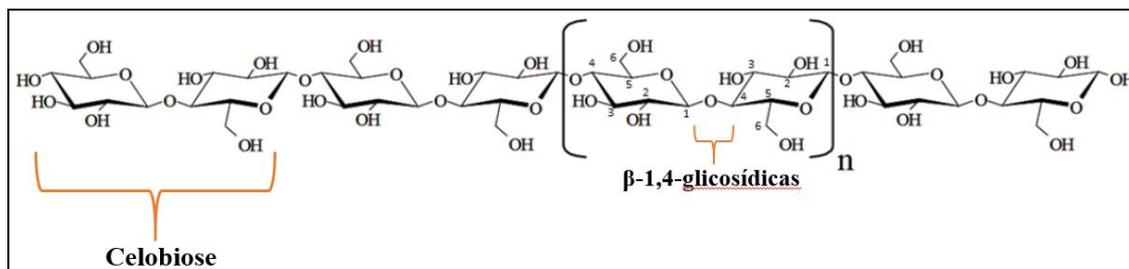


Célula vegetal, focada na ampliações de sua parede celular, mostrando a fibrila, composta por microfibrilas de celulose, que são formadas por ligações glicosídicas, conforme representa sua fórmula estrutural.

Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger (2003).

A celulose se apresenta como um polímero linear gerado a partir da repetição de moléculas β -D-glicopirranose (AGU) que são covalentemente ligadas (ligações glicosídicas β -1,4) através de funções acetais entre o grupo OH equatoriais de C_4 e o átomo de carbono C_1 (β -1,4-glucano). Todo segundo anel AGU é rodado em 180° no plano, de forma em que os ângulos de ligação preferidos possam ser acomodados pelos grupos acetais em pontes de oxigênio, ou seja, a interação entre o carbono 1 e o carbono 4 de duas moléculas distintas de glicose leva o sistema a uma condição de mínima energia o que permite a formação das extensas cadeias lineares que compõem a celulose. A partir desta configuração, duas unidades estruturais adjacentes definem o dissacarídeo celobiose (KLEMM et al., 2005), que pode ser esquematicamente representado como na Figura 14.

Figura 14 - Estrutura Molecular da Celulose



Fonte: Adaptado de Pitarelo (2007).

A celobiose é entendida como a unidade conformacional mínima da celulose, por outro lado, a glicose representa a unidade fundamental das cadeias de homopolímeros (RIBEIRO, 2013). Ressalta-se que, a ligação “ β ” refere-se a posição do grupo “OH” no carbono 1, o que favorece a formação de cadeias lineares e longas; quando o grupo “OH” está do lado oposto da cadeia do anel hemiacetal ($C_1 - O - C_4$), o açúcar é chamado “ β ”, e quando o grupo está do mesmo lado é chamado de “ α ” (STRYER & TYMOCZKO et al., 2008). Os grupos funcionais das cadeias de celulose

correspondem principalmente aos grupos hidroxila, os quais são responsáveis não só pela estrutura supramolecular, mas também pelo comportamento químico e físico da celulose (FENGEL & WEGENER, 1989).

O número de unidades que se repetem em um polímero é designado como grau de polimerização. A massa molecular relativa de um polímero dependerá do seu grau de polimerização e da massa molecular relativa da unidade repetitiva. O grau de polimerização (DP, do inglês *degree of polymerization*) da celulose é estabelecido através do número de unidades AGU que formam a cadeia. O DP é um valor médio, pois, a fibra de celulose possui diferentes tamanhos de cadeias poliméricas. Estes valores podem ser diferentes dependendo da origem e pré-tratamento (KLEMM et al., 2005). A tabela 4 representa alguns valores de DP da celulose de acordo com a sua origem.

Tabela 4 - Valores de DP de celulose proveniente de diferentes fontes

MATERIAL	DP
Algodão	> 3000
Ramie	6000-7000
Linho	7000-9000
Linter de Algodão	800-2600
Polpa de Madeira Mole	
Grau Papel	> 1000
Grau Solúvel	300-1700
Polpa de Madeira Dura	
Grau Papel	> 1000
Grau Solúvel	300-1000
Celulose Madeira em Pó Hidrolisado	150-300

Fonte: Adaptado de Klemm et al. (2005)

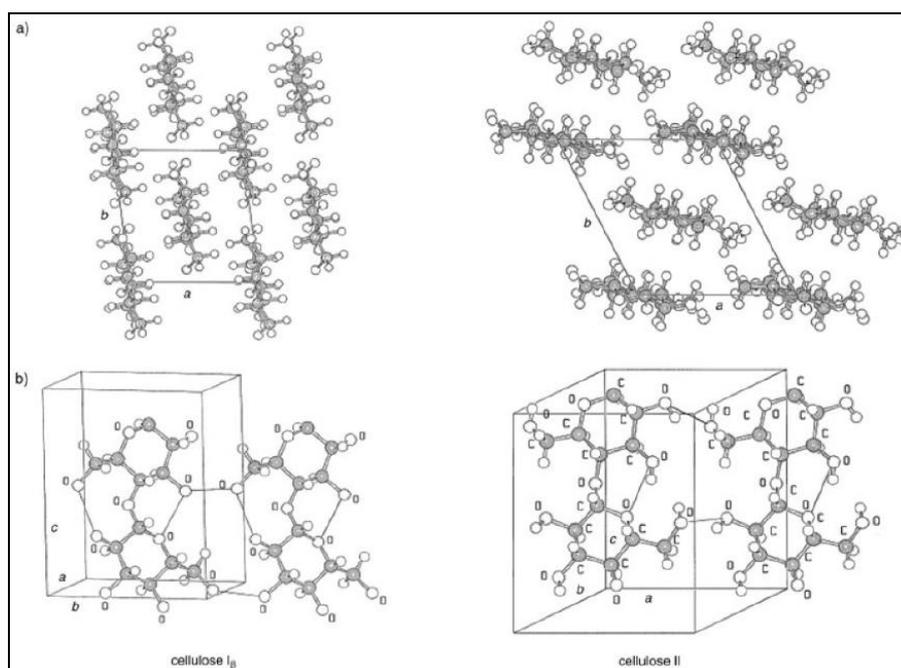
3.6.1.2 Estrutura cristalina, morfologia e aplicações da celulose

Devido à organização da estrutura supramolecular da celulose, observa-se regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), intermediadas por regiões menos ordenadas (regiões amorfas). Estas áreas não possuem fronteiras bem definidas, e a razão entre as mesmas pode variar dependendo de sua fonte. Na região cristalina a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e a solvatação (ALMEIDA, 2009). As regiões amorfas, em virtude do grau de ordenamento, são mais acessíveis ao ataque de reagentes, enzimas ou até mesmo à absorção da água tornando a celulose macia e

flexível. A proporção entre as regiões cristalina e amorfa define o índice de cristalinidade (IC) da celulose (ALMEIDA, 2009), o qual pode ser determinado por várias técnicas, dentre elas, a principal é a difração de raios X.

Em 1980, por meio da técnica de espectroscopia RMN ^{13}C CP/MAS descobriu-se que a celulose natural apresenta duas modificações diferentes para a forma cristalina I ($\text{I}\alpha$ e $\text{I}\beta$), as quais podem ser encontradas ao longo uma da outra, com variações dependentes de sua origem. As investigações com difração de microfeixe de elétrons e com difração combinada de raios X e nêutrons revelou as correspondentes estruturas cristalinas apresentando unidades de célula triclinica ($\text{I}\alpha$) e monoclinica ($\text{I}\beta$), que estão representadas na figura 15.

Figura 15 - Estruturas dos cristais de celulose $\text{I}\beta$ e celulose II.



a) projeção da célula unitária ao longo do plano a-b, da celulose $\text{I}\beta$; (b) projeção da célula unitária paralela ao plano 100 (celulose $\text{I}\beta$) e ao plano 010 (celulose II).

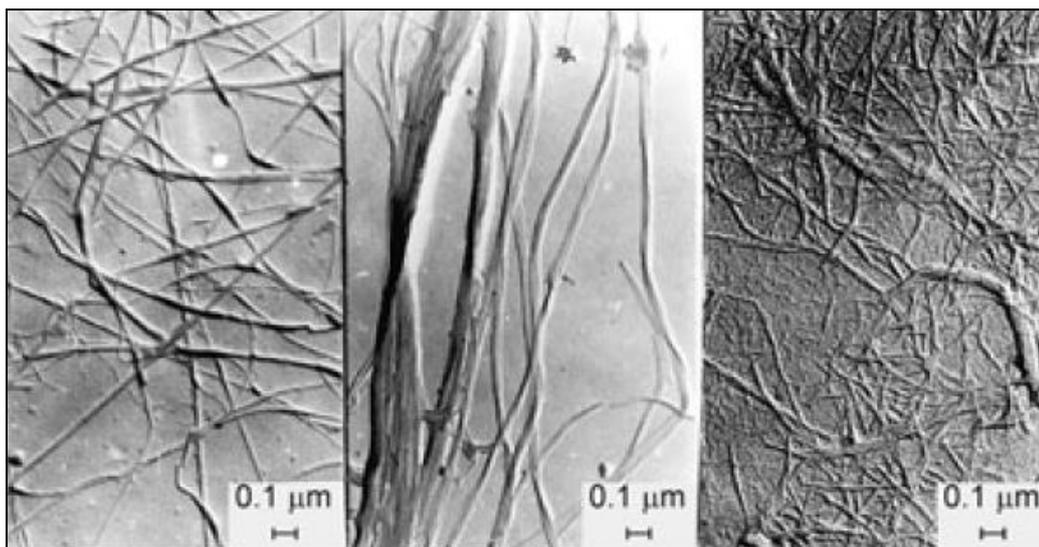
Fonte: Klemm et al. (2005).

Nota-se na celulose II, pela visão lateral do centro das cadeias da célula unitária, na figura 15, que são reveladas duas fortes ligações de hidrogênio intramoleculares. Além da celulose termodinamicamente menos estável I, a celulose pode ocorrer ainda

em outras estruturas cristalinas (celulose II, III e IV), das quais a celulose II é a estrutura mais estável e de maior relevância técnica. A celulose II pode ser formada a partir do tratamento da celulose I com hidróxido de sódio aquoso (mercerização) ou pela dissolução da celulose e subsequente precipitação/regeneração, como é feito para a formação de filmes de fibras (KLEMM et al., 2005).

As numerosas aplicações da celulose baseiam-se em sua morfologia distinta de fibra. A hierarquia morfológica é definida por fibrilas elementares (dimensões laterais entre 1,5 e 3,5 nm), microfibrilas (entre 10 e 30 nm) e bandas microfibrilares (na ordem de 100 nm). A Figura 16 mostra micrografias eletrônicas da estrutura fibrilar de algas, algodoeiro e árvore da espécie *Picea*.

Figura 16 - Micrografias eletrônicas de microfibrilas celulósicas de diferentes origens.



À esquerda, *Valonia spp.* (alga); no centro, algodoeiro; ao lado direito, polpas de árvore (*Picea*). As imagens representam as disposições em rede das fibrilas de cada planta estudada. Figuras na escala de 0,1 μm.

Fonte: Klemm et al. (2005).

Ressalta-se que, a estrutura dos poros em cada morfologia fibrilar é consideravelmente importante para a acessibilidade em reações químicas e degradações enzimáticas, possibilitando o seu emprego em diversas aplicações, desde membranas à materiais altamente especializados como os não tecidos, com excelentes propriedades de absorção (KLEMM et al., 2005).

A celulose é o componente mais abundante das paredes celulares das plantas e um biomaterial de grande interesse para diversas aplicações clínicas, principalmente na engenharia de tecidos (ALBERTS et al., 2002). Este polímero orgânico é considerado uma fonte quase inesgotável de matéria-prima para a crescente demanda por produtos ecologicamente corretos e biocompatíveis. Diversas aplicações deste polímero aproveitam de sua biocompatibilidade e da capacidade para a imobilização de proteínas, anticorpos e heparina, bem como a formação de compósitos celulósicos com polímeros e biopolímeros. A união de macromoléculas compostas por unidades repetidas de glicose fornece diversas especificidades e arquitetura ao polímero em questão. Suas propriedades são determinadas por interações intermoleculares, reações de reticulação, comprimentos de cadeia e distribuição dos grupos funcionais. A diferença deste polímero natural com polímeros sintéticos baseia-se nos atributos de funcionalidades distintas, alta rigidez de cadeia e sua sensibilidade quanto a modificações químicas e manipulação (KLEMM et al., 2005).

4.4.1.2 Propriedades da Celulose

Em se tratando das propriedades mecânicas da celulose, o módulo de elasticidade (ou módulo de Young) deste polímero foi inicialmente determinado por Meyer and Lotmar, em 1936, usando um modelo teórico e constantes de rigidez de ligação derivadas de medições espectroscópicas. Eles obtiveram um valor de 120 GPa (Giga Pascal), o qual foi sendo corrigido com o passar do tempo. Sakurada, Nubushina e Ito (1962) relataram um valor de 138 GPa para o módulo de elasticidade da celulose, determinado por meio de difração de raios-X. Esta pesquisa abriu o caminho para outras medições e determinações do módulo de elasticidade, os quais giram em torno de 100 a 160 GPa. Os módulos elásticos de alguns materiais utilizados na engenharia estão apresentados na Tabela 5 em comparação ao módulo da celulose cristalina (ROWAN et al., 2010).

Tabela 5 - Módulos de materiais utilizados na engenharia comparados à celulose

MATERIAL	MÓDULO ELÁSTICO (GPa)	DENSIDADE (Gpa Mg ⁻¹)	MÓDULO ELÁSTICO ESPECÍFICO (Gpa Mg ⁻¹ m ³)
Alumínio	69	2,7	26
Aço	200	7,8	26
Vidro	69	2.5	28
Celulose Cristalina	138	1.5	92

Fonte: Adaptado de Rowan et al. (2010).

A rede de ligações de hidrogênio confere às cadeias de celulose uma alta rigidez axial. Como a alta rigidez é uma propriedade desejável para uma fibra de reforço em um compósito, a determinação do módulo cristalino da celulose torna-se relevante. Observa-se, na tabela 5, que o módulo da celulose cristalina é maior do que o do alumínio e o do vidro. Nesta tabela também são relatados os módulos específicos (módulo/densidade), os quais denotam que o módulo específico de celulose cristalina excede os materiais de engenharia, como alumínio, aço, e vidro. Apesar disto, a celulose apresenta desvantagens em relação aos materiais tradicionais de engenharia; por exemplo, absorção de umidade e inchaço, e degradabilidade enzimática. A principal razão para se utilizar as nanofibras de celulose em materiais compósitos é a de poder explorar a alta rigidez do cristal de celulose para o reforço. Isso pode ser feito quebrando a estrutura hierárquica da planta em nanofibras individualizadas de alta cristalinidade, reduzindo assim a quantidade de material amorfo presente. Uma alta relação de aspecto (comprimento/diâmetro) para as fibras é desejável, pois permite um comprimento crítico para a transferência de tensão da matriz para a fase de reforço. Como as fibras vegetais são hierarquicamente fibrosas, é possível fazer isso, produzindo uma forma fibrosa do material (nanowhiskers, nanofibrilas), que devido à sua relação de aspecto, são potencialmente adequadas para materiais compósitos (ROWAN et al., 2010).

As fibras vegetais geralmente têm módulos bem abaixo do valor cristalino. Os valores típicos do módulo elástico, bem como a força e tensão de ruptura de fibras de celulose são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Propriedades mecânicas de algumas fibras comuns de plantas

FIBRA	MÓDULO ELÁSTICO (GPa)	MÓDULO ELÁSTICO ESPECÍFICO (Gpa Mg ⁻¹ m ³)	FORÇA DE RUPTURA (GPa)	TENSÃO DE RUPTURA (%)
Linho	27,0	18,0	0,81	3,0
Juta	25,8	17,2	0,47	1,8
Cânhamo	32,6	21,7	0,71	2,2
Rami	21,9	14,6	0,89	3,7

Fonte: Adaptado de Rowan et al. (2010).

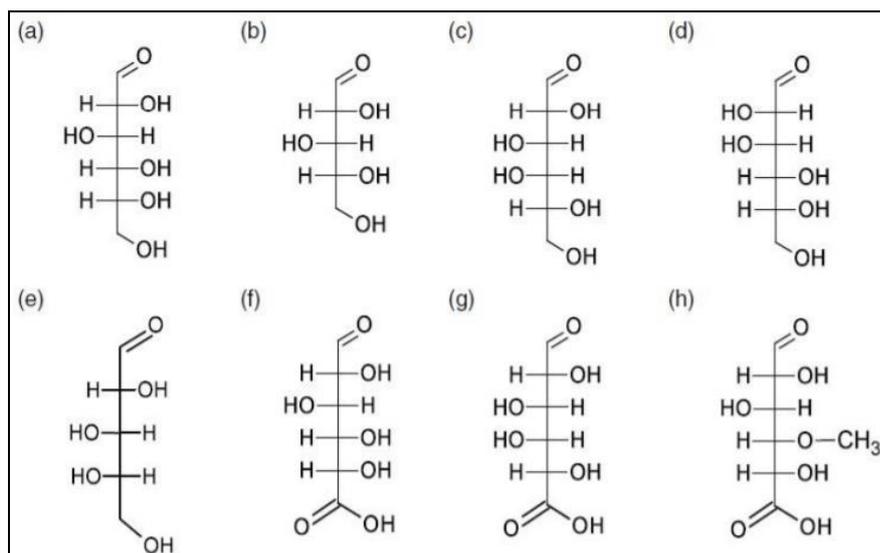
Quando a densidade das fibras é levada em consideração e o módulo específico é determinado (assumindo uma densidade de celulose de 1,5 Mg m⁻³), então os valores se aproximam aos de vidro e outros sólidos de engenharia. Apesar de existirem valores já estabelecidos, é muito difícil obter um módulo elástico preciso para as fibras vegetais, devido às suas seções transversais muitas vezes irregulares e variáveis e a presença de vazios na forma de lúmens. O módulo de elasticidade (ou módulo de Young) das fibras de celulose pode variar de acordo com a fonte e as dimensões da fibra. Um módulo de 40-60 GPa é geralmente encontrado para fibras naturais como linho e cânhamo, enquanto que, para nanofibrilas e nanohiskers, na faixa de 100-140 GPa (HSIEH et al., 2008; ŠTURCOVÁ; DAVIES; EICHHORN, 2005). Devido aos desempenhos intrínsecos superiores de cargas nanométricas, prevê-se que os nanohiskers de celulose melhorem a transferência de tensão e, portanto, o módulo final do compósito (mais de 3 vezes) quando comparados com as fibras de celulose micrométricas tradicionais (ROWAN et al., 2010).

4.4.2 Hemicelulose

A hemicelulose pode ser definida como um polissacarídeo com capacidade de se ligar fortemente a microfibrilas de celulose por ligações de hidrogênio (ROLAND et al., 1989). A hemicelulose é o carboidrato dominante na lamela intermediária, enquanto a celulose é mais abundante nas camadas secundárias (S1, S2 e S3) (HOLTZAPPLE, 2003). Em comparação com a celulose, as hemiceluloses são polímeros ramificados menores, amorfos e mais reativos. As hemiceluloses podem apresentar vários

constituintes de diferentes composições química e estrutura molecular, geralmente são classificados de acordo com os principais tipos de resíduos de açúcar presentes e variam de acordo com as espécies e o tipo de célula em questão (PEREIRA, 2007). A figura 17 representa as estruturas dos principais carboidratos presentes na hemicelulose.

Figura 17 - Principais carboidratos que compõem a estrutura da hemicelulose.



(a) D-glucose; (b) D-xilose; (c) D-galactose; (d) D- manose; (e) L-arabinose; (f) Ácido D-glucurônico; (g) ácido D-galacturônico; (h) ácido 4-O-metilglucurônico.

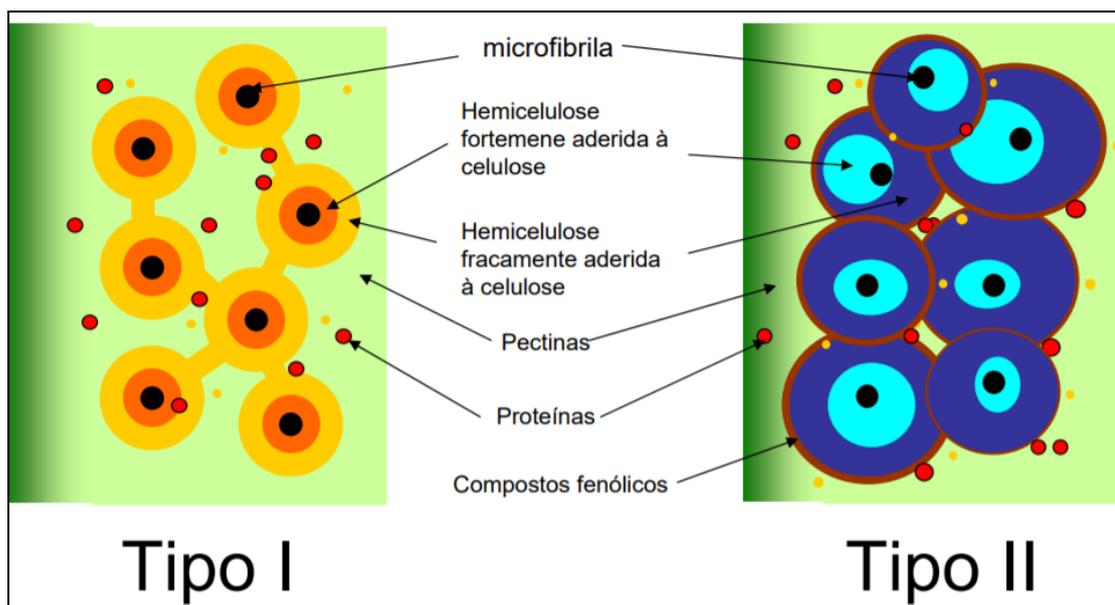
Fonte: Albertsson; Edlund; Varma (2011).

Na figura 17, os monossacarídeos representados podem ser classificados como pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glucose, α -D-galactose) e ácidos urônicos (β -D -glucurônico, ácido α -D-4-O-metilglucurônico e ácido α -D-galacturônico). As principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglucanos (XyG), os glucuronoarabinoxilanos (GAX) e os mananos (MN). O que diferencia uma da outra é o grupo de ramificação, contudo, há uma cadeia principal de monossacarídeos de glicose, xilose e manose, respectivamente (BUCKERIDGE, 2010).

A hemicelulose possui diversas funções, como por exemplo, sustentação e transporte de nutrientes, mecanismo de defesa, reserva de carbono e, quando ligadas as microfibrilas de celulose, atuam como um agente de acoplamento entre a parede e as microfibrilas. Além disso, fazem parte das estruturas que dão às frutas e legumes as características fibrosas e crocantes que, em parte, permanecem após o cozimento

(BEMILLER, 2019). A figura 18 ilustra a interação de microfibrilas de celulose e hemicelulose, em dois tipos diferentes de células.

Figura 18 - Modelos de interação de microfibrilas de celulose e hemicelulose.



À esquerda: parede celular do tipo I, e à direita: parede celular do tipo II.

Fonte: Buckeridge (2010).

Na parede do tipo I o domínio celulose-hemicelulose é composto por xiloglucanos, com diferentes tipos de ramificações, conferindo diversos níveis de adesão às microfibrilas (tons laranja). Em contrapartida, na parede tipo II, o tipo de hemicelulose é o arabinoxilano (azul), o polímero menos ramificado desta classe adere fortemente às microfibrilas (tons azuis claros), por outro lado, aqueles mais ramificados, aderem fracamente (azul escuro). Na parede do tipo II, a proporção de pectina é menor do que celulose e hemicelulose, ademais, os arabinoxilanos parecem se ligar entre si por compostos fenólicos, os quais também são mais abundantes nas paredes celulares do tipo II (BUCKERIDGE, 2010).

A hemicelulose foi registrada e patenteada em 1990 (DIMED/MS 8306340 Brasil) por Lauro Xavier Filho e Marçal de Queiroz Paulo. Em termos de pesquisa, a modificação química de hemiceluloses está sendo cada vez mais explorada para o desenvolvimento de novos materiais avançados biocompatíveis e ecologicamente

corretos (ALBERTSSON; EDLUND; VARMA, 2011). As hemiceluloses têm um tremendo potencial em vários campos. Devido às suas propriedades especiais, estrutura única com grande quantidade de grupo hidroxila, que pode ser modificado por vários tipos de reações, como éter, éster, reticulação química, a hemicelulose tende a ser modificada por reações químicas e interações físicas para fabricar diversos produtos (HU; DU; ZHANG, 2018). As hemiceluloses são utilizadas nas indústrias alimentícias, como adoçantes e conservantes (ALBERTSSON; EDLUND; VARMA, 2011), e na medicina regenerativa, como adesivos, em tratamento de feridas, lesões superficiais após queimaduras e escoriações (ANDRADE et al., 2011; LEGAZ; SOLAS; VICENTE, 1998; LLOYD et al., 1998) e para outros fins medicinais (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000; HASHI; TAKESHITA, 1979).

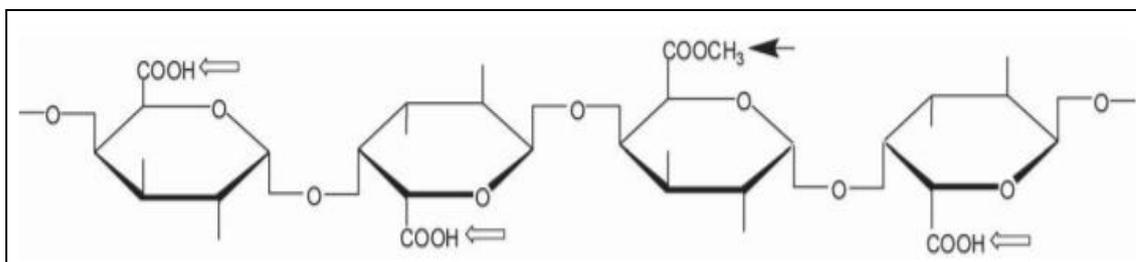
Dentro do setor alimentício, algumas hemiceluloses são utilizadas há muito tempo devido à sua não toxicidade, solubilidade em água e capacidade de formar géis (ALBERTSSON; EDLUND; VARMA, 2011). A hemicelulose, na forma de xilose, é utilizada na produção de ingredientes como o xilitol, um adoçante natural, empregado para substituir a sacarose. O xilitol evita os efeitos negativos da sacarose atuando como conservante de produtos alimentícios sem diminuir o valor nutricional de proteínas. Muitos polissacarídeos, incluindo uma variedade de hemiceluloses, são conhecidos há muitos anos como formadores de filme úteis e as propriedades de barreira interessantes das hemiceluloses também foram reconhecidas (ALBERTSSON; EDLUND; VARMA, 2011). As propriedades de formação de filme dos arabinoxilanos têm sido utilizadas para proteger a espuma proteica contra a ruptura térmica (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ, 1999) e os arabinoxilanos também foram explorados como constituintes do filme para potenciais aplicações de embalagem (ZHANG; WHISTLER, 2004). Da mesma forma, hemiceluloses da família das mananas, como o konjac glucomanano ou o galactoglucomanano derivado do abeto, têm sido usados na preparação de filmes de embalagem (HARTMAN; ALBERTSSON; SJÖBERG, 2006; MIKKONEN et al., 2008).

Dentro do campo biomédico, materiais à base de hemicelulose têm sido de interesse por suas propriedades de formação de filmes e géis. Os projetos na forma de microesferas também têm sido desenvolvidos e investigados há várias décadas devido ao seu potencial uso para incorporação de agentes bioativos, predominantemente no

campo da liberação controlada de medicamentos (EDLUND; ALBERTSSON, 2008). Filmes foram explorados para fins de curativo (MELANDRI et al., 2006), revelando a capacidade em sustentar a proliferação de fibroblastos e características altamente desejáveis para um substituto de pele ideal (FERREIRA et al., 2010). Géis de xiloglucano foram usados para entrega controlada de drogas (KAWASAKI et al., 1999; KULKARNI et al., 2017) e hidrogéis covalentes projetados a partir de galactoglucomanano funcionalizado com alquenil demonstraram oferecer entrega de substâncias incorporadas, mediada por difusão (VOEPEL et al., 2009) e hidrólise enzimática (ROOS et al., 2008). Os hidrogéis à base de hemiceluloses possuem diversas propriedades favoráveis para atuarem como materiais renováveis e biodegradáveis, tais como hidrofiliabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, transparência, baixo custo e não toxicidade (HU; DU; ZHANG, 2018; LIU et al., 2020a). A natureza hidrofílica das hemiceluloses e a característica de se dissolver em água acima da temperatura de 150°C (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018), aliada à sua estrutura com grupos ativos intrínsecos, como -OH e -COOH, facilita as modificações por meio de várias reações físicas e químicas, viabilizando assim, os processos produtivos (LI; LIN, 2021).

4.4.3 *Pectina*

A pectina foi descoberta em 1790, encontrada como substância solúvel nos sucos de frutas e, mais tarde, em 1824, um químico francês descobriu que essa substância, abundantemente disponível em plantas, continha propriedades gelificantes quando se adicionava ácido em sua solução (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014). A substância formadora de gel foi chamada de ácido péctico. Em 1937, Schneider e Bock descreveram a fórmula química da pectina, cuja a estrutura é representada na figura 19.

Figura 19 - Estrutura química da pectina

A estrutura da pectina é basicamente formado por homopolímeros de ácido galacturônico unidos por ligações α (1 \rightarrow 4), com grau variável de grupos carboxilas metil esterificados, conforme representado na figura, sendo que a seta fechada indica o grupo carboxílico esterificado e a seta aberta indica grupos carboxílicos não esterificados (FRACASSO, 2015).

Fonte: Chen et al. (2006).

Na figura 19, salienta-se que, alguns dos grupos carboxila da pectina estão metilados, outros estão na forma livre e ainda, outros podem estar na forma de sais de sódio, potássio ou amônio, mais frequentemente na forma de sódio (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014).

De acordo com Alberts et al. (2002), nas paredes celulares primárias, a matriz na qual a rede de celulose está inserida é composta de pectina, a qual é constituída por uma rede altamente hidratada de polissacarídeos ramificados, que contêm muitas unidades de ácido galacturônico, carregadas negativamente. Além disso, certas pectinas são particularmente abundantes na lamela média. Estes polissacarídeos desempenham papel funcional, pois formam um gel hidratado, preenchendo os espaços entre as fibrilas de celulose, determinando e, conseqüentemente, selecionando as moléculas e íons que podem circular entre a parede primária e as células (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

Nos tecidos dos frutos imaturos, as pectinas são geralmente denominadas de protopectinas e encontram-se ligadas ao cálcio das paredes celulares, formando o pectato de cálcio, o qual é insolúvel em água e tem a maior parte dos seus grupos carboxílicos esterificados (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014). Ressalta-se que, quando o íon Ca^{2+} é adicionado a uma solução de moléculas de pectina, ele as reticula para produzir um gel semi-rígido (ALBERTS, et al., 2002). Após o amadurecimento da fruta, a protopectina é hidrolisada para pectina por ação de enzimas e, durante o apodrecimento ou o amadurecimento demasiado, a pectina pode ser decomposta,

produzindo o álcool metílico e/ou ácido pécico (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014).

Conforme já descrito, as camadas de microfibrilas de celulose são emaranhadas em uma rede, por meio de ligações cruzadas de glicanos (carboidratos formados a partir da polimerização de vários outros açúcares menores), coexistindo com outra rede, composta por polissacarídeos de pectina. A rede celulósica interligada com os glicanos fornece resistência à tração, ao passo que, a rede de pectina resiste à compressão. A celulose, os glicanos de reticulação e a pectina estão tipicamente presentes em quantidades aproximadamente iguais em uma parede celular primária (ALBERTS, et al., 2002).

Na indústria alimentícia, a pectina, como é um agente gelificante, é empregada para fornecer uma textura gelatinosa aos produtos. Dessa forma, é usada nas áreas de processamento de frutas, na produção de doces e confeitaria, pastelaria industrial, indústria de laticínios, indústria de bebidas, etc (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014). A pectina também foi empregada como substituto do papel, formando filmes comestíveis, espumas e plastificantes (COFFIN; FISHMAN; LY, 1996; FARRIS et al., 2011). Este polissacarídeo hidrofílico é repleto de propriedades funcionais e amplamente utilizado como modificador de textura, espessante, agente de revestimento e gelificante em diferentes alimentos e outros produtos (NOREEN et al., 2017; VIEBKE; AL-ASSAF; PHILLIPS, 2014). A pectina possui boa biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade, tornando-se um bom biomaterial para diversas aplicações como farmacêutica, nutracêutica, embalagens de alimentos e cosméticos (NOREEN et al., 2017; SUNGTHONGJEEN et al., 2004).

Os biomateriais à base de pectina têm várias aplicações na engenharia de tecidos, sendo empregados como hidrogéis compósitos (pectina/quitosana) e aptos a suportar células osteoblásticas humanas, permitindo adesão proliferação e demonstrando não toxicidade (COIMBRA et al., 2011); Outra pesquisa desenvolveu hidrogéis baseados em glucomanano konjac oxidado (OKG), colágeno e pectina oxidada (OP). Os resultados mostraram que com a adição do teor de OP, o comportamento de degradação dos hidrogéis e as propriedades mecânicas foram melhorados. Os hidrogéis de HGOP aumentaram a proliferação celular sem qualquer

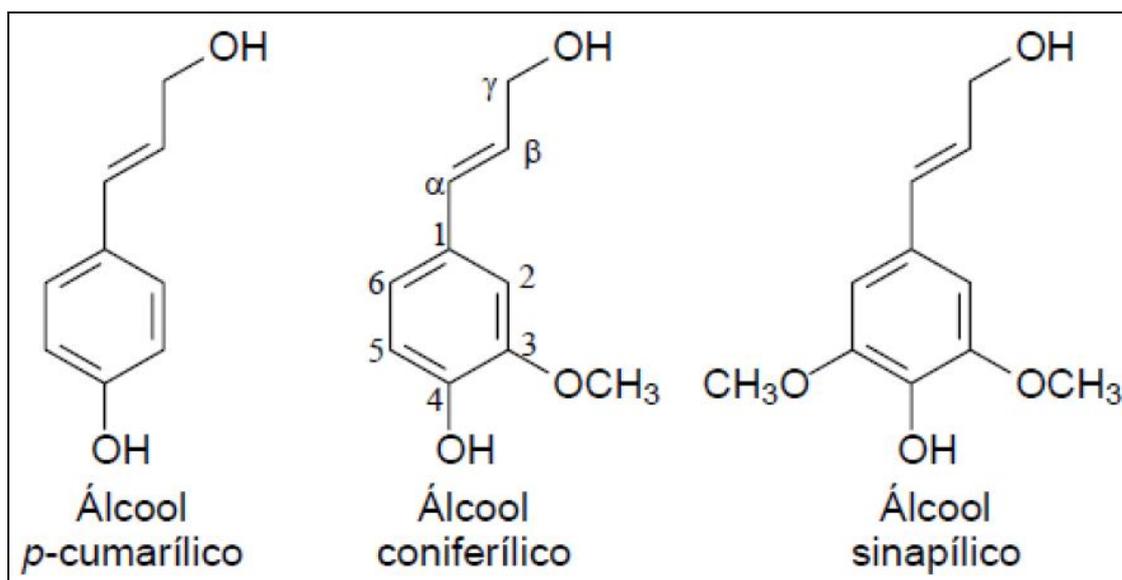
efeito citotóxico em células de fibroblastos embrionários de camundongo (NIH-3T3) (GHORBANI; NEZHAD-MOKHTARI; MAHMOODZADEH, 2021). Pesquisadores também produziram bionanocompósitos híbridos de pectina (P)/apatita (HA) (P/HA) aplicáveis para materiais de enxerto ósseo. Os autores confirmaram que a concentração de pectina de jaca tem uma função chave na regulação e minimização da dimensão das nanopartículas de fase. Isso aumentou consideravelmente a reação biológica dos osteoblastos (MG63) ao P/HA, conforme sugerido por sua adesão e proliferação melhoradas (GOVINDARAJ et al., 2018). A pectina pode também ser aplicada como curativos (MUNARIN; TANZI; PETRINI, 2012; TAN; MARRA, 2010), sendo estes, compostos por polímeros absorventes, agentes gelificantes de pectina e carboximetilcelulose de sódio. Quando a pectina é adicionada à ferida, ela serve como agente de ligação, protegendo os fatores de crescimento da degradação. As partículas hidrofílicas de pectina reagem dentro do curativo com o fluido da ferida para formar um gel macio sobre o leito da ferida, removendo ou controlando os exsudatos nas feridas. O ambiente ácido obtido com a solubilização da pectina pode ainda atuar como barreira bacteriana ou viral (MUNARIN; TANZI; PETRINI, 2012; NOREEN et al., 2017). É possível ainda citar muitas outras aplicações da pectina, como por exemplo para a transferência de genes (KATAV et al., 2008), entrega de drogas (SMISTAD et al., 2012) e direcionamento do câncer (DUTTA; SAHU, 2012) e ainda, em combinação com caulim em formulações orais para entrega de drogas ao cólon (SANDE, 2005).

4.4.4 Lignina

O polímero mais comum nas paredes secundárias é a lignina, uma complexa cadeia de compostos fenólicos encontrados nas paredes dos vasos do xilema e nas células fibrosas dos tecidos lenhosos; nas árvores, por exemplo, a celulose e lignina compõem a maior parte da biomassa. Os constituintes da lignina e da hemicelulose podem diferir de uma planta para a outra e de um tecido para outro, bem como, as ligações entre eles (BOUDET, 2003). A Lignina é um polímero derivado de unidades fenilpropanóides (oriundo do aminoácido fenilalanina) chamadas C6C3 ou, simplesmente, unidades C9, repetidas de forma irregular, tendo sua origem na polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico (SALIBA et al., 2005). Este polímero, ao estabelecer ligações com alguns carboidratos, é depositado durante o

processo de maturação das paredes celulares (BOUDET, 2003). A estrutura da lignina é de natureza aromática com alto peso molecular, respondendo por aproximadamente 30% do carbono orgânico da biomassa da planta, sendo o segundo polímero mais importante na Terra, superado apenas pela celulose (FENGEL & WEGENER, 1984). Este composto apresenta uma estrutura macromolecular heterogênea e pode conter três tipos básicos de unidades aromáticas: unidades p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), que não tem nenhum grupo metoxil (H) ou tem um (G) ou dois (S) grupos metoxil nas posições C3 e C5 da unidade aromática. Tais constituintes podem variar de acordo com a origem vegetal (LINO, 2015), (Figura 20).

Figura 20 - Precursores primários da lignina



Fonte: Lino (2015).

Os precursores primários da lignina, ao entrarem em contato com enzimas desidrogenases (peroxidases e lacases), conduzem a abstração inicial de um hidrogênio radical no fenol, dando início a todo o processo de polimerização nos sítios de lignificação (FREUDENBERG & NEISH, 1968). Em decorrência da taxa extra de lignificação, a planta pode estabelecer um importante mecanismo de defesa à invasão por patógenos (BUSAM et al., 1997). Esta macromolécula, além de compor toda a rede de vasos condutores do vegetal, possui várias ramificações que se entrecruzam umas com as outras, conferindo-lhe particular resistência a diversos agente químicos, físicos e

biológicos, fornecendo rigidez à parede, e, conseqüentemente, maior suporte ao vegetal (MONTEIRO, 2002).

A lignina, por ser um composto orgânico disponível na forma dissolvida do resíduo de processos de obtenção de celulose e de fácil acesso para indústrias, pode ser aplicada para fins energéticos (SAVAGE, 2009). Além disso, a lignina é um material de baixa densidade e abrasividade, com características interessantes para o uso como material compósito. Por exemplo, em certos polímeros, em formulações adequadas, a lignina pode formar compósitos parcial ou até completamente biodegradáveis, além disso, espera-se que a lignina aumente a resistência de materiais poliméricos em relação à oxidação, irradiação e exposição a temperaturas elevadas (ALEXY et al., 2000). Os materiais baseados em lignina podem ser usados principalmente como combustíveis, reagentes químicos e polímeros. Por exemplo, ela pode ser usada para modificar e controlar a liberação de fertilizantes e herbicidas na agricultura, como agentes dispersantes, como agentes de colagem na indústria de papel e como ligantes (AGRAWAL; KAUSHIK; BISWAS, 2014; AZADI et al., 2013; NORGREN; EDLUND, 2014).

De acordo com o número de patentes publicadas e estudos científicos, as aplicações industriais são direcionadas principalmente para aditivos à base de lignina em concreto, dispersantes, ligantes e resinas. Em contraste, estudos incluindo ligninas para aplicações biomédicas (materiais de liberação e/ou *scaffolds*) ainda estão em progresso. Em geral, a lignina pode ser usada em muitos campos devido às suas propriedades de dispersão, ligação, estabilização de emulsões, propriedades antioxidantes e anti-UV, bem como boas atividades antimicrobianas, que faltam em outros polímeros naturais (WITZLER et al., 2018). Apesar disso, a lignina ainda é pouco conhecida no campo biomédico; sua heterogeneidade torna bastante difícil desenvolver lignina para aplicações biomédicas. A heterogeneidade da lignina (estrutura química complexa e irregular) decorre dos múltiplos recursos e métodos de extração que são usados para obter a lignina. Além disso, os trabalhos atuais de pesquisa e aplicação em biomateriais baseados em lignina não tinham foco na biocompatibilidade e biodegradabilidade *in vivo*. A falta de compreensão fundamental sobre o mecanismo de degradação da lignina pelo corpo humano continua sendo um dos maiores desafios da utilização da lignina como biomaterial (SUGIARTO et al., 2022). Contudo, devido ao

aumento do interesse na utilização da lignina como material funcional e suas aplicações biomédicas, nos últimos 5 anos foram publicadas algumas revisões neste sentido. Liu et al. (2020) publicou um trabalho focado na utilização de nanopartículas de lignina e hidrogéis em aplicações biomédicas, como entrega de drogas e genes e bioimagem (LIU et al., 2020b). Figueiredo et. al. (2018) dedicaram sua pesquisa no relato da composição e propriedades, métodos de extração e modificações químicas da lignina, bem como na descrição dos diferentes métodos de preparação de nanomateriais à base de lignina com propriedades antioxidantes de absorção de UV e antimicrobianas que podem ser usados como agentes de reforço em nanocompósitos, em veículos de entrega de drogas e entrega de genes para aplicações biomédicas (FIGUEIREDO et al., 2018).

Os principais polímeros descritos nessas seções e que constituem a parede celular das plantas estão sumarizados na tabela 7, com suas respectivas composições e funções.

Tabela 7 - Polímeros que compõem a parede celular

POLÍMERO	COMPOSIÇÃO	FUNÇÕES
CELULOSE	Polímero linear de glicose	As fibrilas conferem resistência a tração à parede celular
LIGAÇÕES CRUZADAS DE GLICANOS	Glicose, xilose ou manose	Rede que se liga firmemente à superfície de cada microfibrila de celulose
PECTINA	Unidades de ácido galacturônico	Rede hidrofílica carregada negativamente que dá resistência à compressão nas paredes primárias e participa da adesão célula-célula
LIGNINA	Unidades de fenilpropanóides	Forma um forte polímero impermeável que reforça as paredes celulares vegetais secundárias
PROTEÍNAS E GLICOPROTEÍNAS	Ezimas, proteínas ricas em hidroxiprolina	Responsáveis pela renovação e remodelação da parede celular, além de auxiliar na defesa contra patógenos

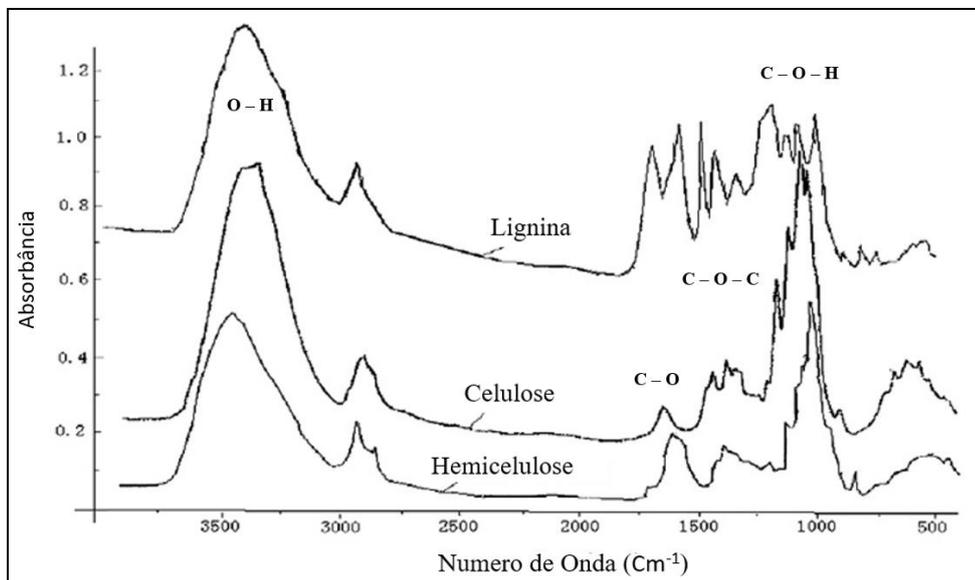
Fonte: Adaptado de Alberts, et al. (2002).

4.5 Ensaios de caracterização em tecidos vegetais

Uma das técnicas empregada para se examinar materiais poliméricos é a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Com o acoplamento de um interferômetro infravermelho a um microscópio equipado com detectores especializados, a espectroscopia FTIR tem sido amplamente empregada para examinar áreas microscópicas em polímeros nos últimos vinte anos (BHARGAVA; WANG; KOENIG, 2003). O mecanismo subjacente da técnica FTIR está associado a transições entre estados de energia vibracional quantizada (SCHNEIDER et al., 2013). Nesta análise, a absorção da radiação IR ocorre quando um fóton é transferido para uma molécula e a excita para um estado de energia mais alto (PARIKH; CHOROVER, 2005). Os estados excitados resultam nas vibrações das ligações moleculares (ou seja, alongamento, flexão, torção, balanço, abanar e deformação fora do plano) ocorrendo em vários números de onda (ou frequências) na região IR do espectro de luz. O número de onda de cada pico de absorbância IR é determinado pelas propriedades físico-químicas características de cada molécula correspondente e, portanto, é diagnóstico, como uma impressão digital desse grupo funcional específico (por exemplo, C–H, O–H, C=O, etc.) Grande parte da literatura relacionada ao FTIR se concentra na região do infravermelho médio (MIR) da luz (aproximadamente 4000 a 400 cm^{-1}) (CHEN et al., 2015).

Yang et al. (2007) utilizaram o FTIR para investigar as características de três componentes principais (hemicelulose, celulose e lignina) da biomassa de plantas, conforme figura 21.

Figura 21 - Espectro de FTIR de componentes presentes na biomassa de plantas



Os três componentes principais (celulose, hemicelulose, e lignina) foram adquiridos na loja de produtos químicos comercial (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). A celulose e lignina foram obtidas em forma de pó. A hemicelulose comercial dificilmente pode ser comprada, logo, foi utilizada a xilana, como componente representativo da hemicelulose. A figura representa os picos de absorvância encontrados na pesquisa e seus respectivos números de onda, que dizem respeito às ligações exibidas.

Fonte: Adaptado de Yang et al. (2007).

Pode-se observar, que os três componentes de fibras são provavelmente constituídos por alceno, ésteres, aromáticos, cetona e álcool, com diferentes grupos funcionais contendo oxigênio. A região de estiramento da ligação O – H, ocorre em $3400-3200\text{ cm}^{-1}$, C – O em $1765-1715\text{ cm}^{-1}$, C – O – C em 1270 cm^{-1} e C – O – H em 1050 cm^{-1} . Nota-se que, o maior pico de absorvância de O – H e C – O – H foi encontrada na celulose, enquanto a hemicelulose contém compostos de CO superiores. Ademais, a lignina é constituída de grupos (metoxil – O – CH₃, C – O – C e C – C) presentes em anéis aromáticos. Os principais picos de absorvância podem ser visualizados na tabela 8, a seguir.

Tabela 8 - Picos de absorvância no FTIR dos principais componentes da parede celular

Componente de parede celular	Número de onda (cm ⁻¹)
Celulose	900, 1040, 1060, 1160, 1320, 1367
Pectina	952, 1014, 1097, 1104, 1146, 1243
Ácido urônico não esterificado	1420, 1600–1630
Ácido urônico esterificado	1740
Xiloglucano	1041, 1078, 1120, 1317, 1371
Arabinose	975
Galactose	945
Amida I (proteína)	1550, 1650
Anel fenólico	1515, 1630
Fenol	1430
Éster fenólico	1720

Fonte: Modificado de Alonso-Simón et al. (2011).

Além dos componentes da parede celular, as células vegetais apresentam um conjunto de biomoléculas que existentes no citoplasma e no núcleo e que podem ser identificadas por meio da técnica de FTIR. No trabalho de Kumar & Prasad (2011) foi realizado um *screening* dessas biomoléculas para duas espécies diferentes de plantas medicinais pertencentes à família Leguminosae (*Tephrosia tinctoria* e *Atylosia albicans*). A fim de suportar e basear o atual trabalho, pesquisou-se na literatura os principais picos de biomoléculas encontradas em plantas medicinais e tecidos biológicos, por meio do FTIR. A referência, os respectivos números de ondas e suas atribuições estão sumarizados na tabela 9.

Tabela 9 - Principais picos dos espectros de FTIR de plantas medicinais e tecidos biológicos encontrados na literatura

(Continua)

REFERÊNCIA	PICOS	ATRIBUIÇÃO
Drug discovery from medicinal plants	521	Torção do anel de fenil
Vibrational spectroscopy of carbohydrates and glycoconjugates	600–900	vibrações de flexão fora do plano C-C-H
17 β -estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol	892	C–C, C–O desoxirribose
Infrared spectroscopy of human tissue. I. Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix	940	Carotenóide
The role of plant derived drugs and herbal medicines in healthcare	1000–140	Absorção de proteína amida I
FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage	1000–200	Ligações C–OH em oligossacarídeos, como manose e galactose
Surface enhanced IR absorption of nucleic acids from tumor cells: FTIR reflectance study	1000–350	Região da vibração do fosfato
Vibrational spectroscopy in the detection of cancer, in Handbook of Vibrational Spectroscopy,	1020–50	Glicogênio
Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue	1030	Colágeno

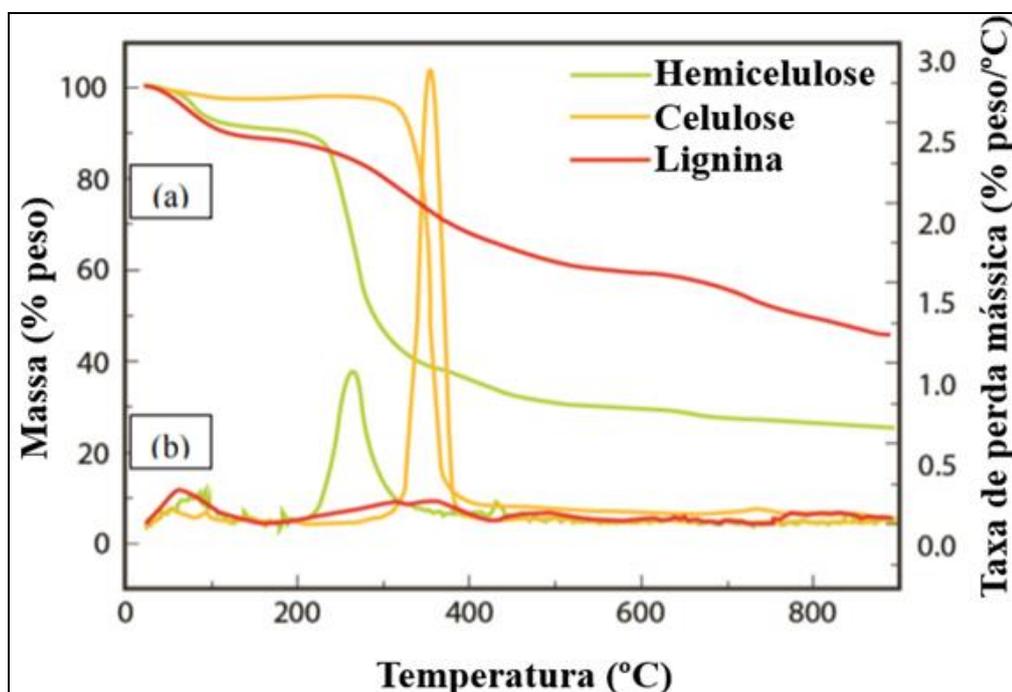
(Conclusão)

REFERÊNCIA	PICOS	ATRIBUIÇÃO
A comparative infrared spectroscopic study of human breast tumors and breast tumor cell xenografts	1105	Carboidratos
identification and comparison of biomolecules in medicinal plants of tephrosia tinctoria and atylosia albicans by using ftir	1145	Fosfato e Oligossacarídeos
Intercultural variation folk medicinal knowledge: A comparison between curers and noncurers	1180–300	Região da banda Amida III
Structural and physicochemical factors in drug action	1206	Amida III - Colágeno
Prospects for in vivo Raman spectroscopy	1244/5	PO ⁻² assimétrico (fosfato I)
Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis	1255	Amida III
Chemical Application of Spectroscopy	1312–1317	Componentes da banda Amida III de proteínas colágeno
Fourier transform infrared (FTIR) technology for the identification of organisms	1456	Vibração de flexão CH ₃ (lipídios e proteínas)
Vibrational spectroscopic studies of micro organisms	1482	Benzeno
Organic Spectroscopy. Principle and Applications	1504	Vibração de flexão CH no plano de anel fenil
Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues	2800–3000	C–H região lipídica
FTIR and SEM-EDS comparative analysis of medicinal plants	3500–3600	Ligações O-H
Ethnomedicinal plants used by the valaiyan community at Piranmalai Hills (reserved forest) Tamil Nadu India. A pilot study	3000–3700	O–H alongamento (água)

Fonte: Modificado de Kumar; Prasad (2011).

Outra técnica de caracterização de materiais amplamente utilizada, é a térmica, que pode ser definida como um teste usado para avaliar mudanças químicas, físicas e estruturais em um material devido a uma mudança de temperatura. Ou seja, a temperatura é variada como um parâmetro experimental para a caracterização científica ou tecnológica de um material. Dentre essas técnicas, a Análise Termogravimétrica (TGA) é uma das análises térmicas mais sensíveis comumente utilizadas para caracterizar a estabilidade térmica de compostos poliméricos de fibra natural, analisando sua composição e dependência estrutural do comportamento de degradação térmica (NURAZZI et al., 2021a). Logo, TGA é uma metodologia analítica quantitativa que monitora a massa de uma amostra de 1 miligrama à vários gramas à medida que um forno eleva a temperatura até 1600 °C sob um fluxo de gás estável ou variável. A massa diminui à medida em que a amostra se decompõe, os compostos voláteis evaporam ou o estado de oxidação diminui; enquanto em ambientes reativos (com O₂, por exemplo), a massa dos metais de transição pode aumentar. A TGA é incapaz de detectar transições de fase, transformações polimórficas ou reações para as quais a massa é invariante. DSC ou DTA acoplam-se com TGA para ajudar a deconvoluir um gráfico, separando as alterações físicas das alterações químicas (SAADATKHAH et al., 2020). Yang et al. (2007) descreveram a TGA dos três componentes principais das fibras lignocelulósicas - Hemicelulose, Celulose e Lignina (Figura 22).

Figura 22 - Curvas de TGA e DTG para Hemicelulose, Celulose e Lignina



A hemicelulose (curva verde) começa a se decompor na faixa de 220 – 315 °C, alcançando a perda de massa máxima em 268 °C, com 20% de resíduo sólido a 900 °C. Para a celulose (curva laranja), a faixa de temperatura foi de 315 – 400 °C, com a taxa máxima de perda de peso em 355 °C. A decomposição da lignina (curva vermelha) ocorreu lentamente em toda a faixa de temperatura até 900 °C, logo, entre os três componentes, a lignina foi o componente mais tardio a se decompor.

Fonte: Adaptado de Yang et al. (2010).

A diferença no comportamento destes três constituintes de fibras vegetais pode ser explicada por meio de suas estruturas e naturezas químicas. A hemicelulose, por exemplo, tem uma estrutura amorfa e ramificada, formada por vários sacarídeos de fácil remoção da haste principal e degradam em baixas temperaturas. A celulose é um polímero longo sem ramificações, com a estrutura ordenada e forte estabilidade térmica. A lignina possui estrutura ramificada, com muitos anéis aromáticos e se degrada em uma ampla faixa de temperatura (YANG et al., 2007).

Os dados e informações descritas neste tópico são de suma importância no suporte das análises e comparações entre as amostras, no intuito de estabelecer os grupos funcionais e associá-los com substâncias químicas presentes ou ausentes após o procedimento de descelularização, bem como o comportamento térmico das amostras, visto que, a temperatura é uma variável de estado fundamental que afeta a maioria das reações químicas, propriedades físicas e transformações estruturais. Por conseguinte, a

técnica permite prever a estabilidade térmica das amostras poliméricas tratadas neste trabalho.

Diante do exposto, no presente trabalho, vegetais e frutas foram submetidos ao tratamento químico com detergentes no intuito de avaliar a potencial aplicação desses materiais naturais como *scaffolds* na engenharia de tecidos. O fruto da graviola foi escolhido por fazer parte da continuação de um trabalho de iniciação científica do grupo de pesquisa. O pseudofruto de caju foi escolhido para compor o quadro de frutas, juntamente com a graviola, por também ser nativo do bioma Cerrado Brasileiro. Já a Casca de Mexerica apresentou-se interessante por sua estrutura de fibras interligadas e resistentes. As folhas, conforme já descrito na literatura, apresentaram resultados promissores para aplicações deste tipo (CHENG et al., 2020; DIKICI; CLAEYSSSENS; MACNEIL, 2019; GUYETTE et al., 2016a; LEE et al., 2019), e, além disso, exibem vascularização (folha de brócolis) e porosidade (folha de ora-pro-nóbis) propriedades interessantes para a Engenharia de Tecidos. Talos de vegetais também já foram descritos na literatura como estruturas promissoras para aplicação como *scaffolds* (CONTESSI NEGRINI et al., 2020; JAMES et al., 2020; S. H et al., 2020), e além disso, são caracterizados como resíduos, na indústria alimentar, assim como a casca de mexerica, logo, a utilização dessas estruturas na área biomédica adquire relevância em termos de sustentabilidade, acessibilidade e economia.

O tratamento químico dos vegetais e frutas foi realizado utilizando os detergentes SDS e Triton X-100. É importante ressaltar que, o SDS é o detergente iônico mais utilizado nos protocolos de descelularização, atuando como um agente descelularizante primário, com capacidade de solubilizar membranas plasmáticas, DNA e lipídeos, além de desnaturar proteínas. Trabalhos anteriores demonstram que o tratamento com SDS não altera as propriedades mecânicas da celulose (GRATZER et al., 2006), bem como preserva a estrutura do colágeno, porém solubiliza o sulfato de condroitina e fibronectina de válvulas aórticas de ratos (GRAUSS et al., 2003). Já o Triton X-100 é o detergente não iônico mais estudado em protocolos de descelularização, e atua na solubilização de proteínas, preservando a parede e a matriz extracelular (GOTTS et al. 2016). Este detergente pode reduzir o conteúdo de GAGs, aumentar a extensibilidade da MEC, afrouxar a rede de colágeno e deixar vestígios

nucleares residuais (BADYLAK, 2014). Há relato de que, em tecido valvar animal, o Triton X-100 levou à perda quase completa de GAGs e reduziu o conteúdo de laminina e fibronectina (GRAUSS et al., 2005). De acordo com os protocolos desenvolvidos em tecidos animais e vegetais e os resultados obtidos na literatura, utilizou-se tais reagentes, a fim avaliar os efeitos do tratamento nas estruturas vegetais escolhidas.

Desta forma, ao longo das seções seguintes, serão apresentados os Métodos, Resultados, Discussões e Conclusões dos tratamentos químicos realizados com os detergentes SDS e Triton X-100 nos vegetais e frutas graviola, pseudofruto do caju, casca da mexerica, folha de brócolis, folha de ora-pro-nobis, talo de taioba e talo de brócolis.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais utilizados

As estruturas vegetais submetidas ao tratamento químico foram: folha e talo (caule) de Brócolis - *Brassica oleracea*, folha de Ora-Pro-Nobis - *Pereskia aculeatae*, talo (caule) de Taioba - *Xanthosoma sagittifolium*, pseudofruto do Caju - *Anacardium occidentale*, casca (epicarpo) de Mexerica - *Citrus reticulata*, fruto da Graviola - *Annona muricata*, todos obtidos do mercado convencional.

No presente trabalho utilizou-se a celulose extraída da casca de banana (*Musa acuminata*) como um parâmetro de comparação do perfil celulósico com as amostras vegetais submetidas ao tratamento, uma vez que, conforme descrito na literatura, tratamentos químicos com detergentes preservam a estrutura celulósica dos materiais.

Os reagentes utilizados foram: dodecil sulfato de sódio (SDS, Neon - Suzano, SP); solução tampão fosfato-salino (PBS); água destilada (produzida no laboratório do CEFET-MG); azida sódica, hidróxido de sódio (NaOH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sigma-Aldrich - Suzano, SP); Triton X-100, ácido clorídrico (HCl) e Hipoclorito de Sódio (Neon – Suzano, SP).

5.2 Métodos

5.2.1 Tratamento químico

O tratamento químico das frutas e vegetais foi realizado conforme previamente descrito por Modulevsky et al. (2014), Gotts et al. (2016); Gershlak et al. (2017) e Fontana et al. (2017), com modificações. O procedimento consistiu na adição sucessiva de diferentes soluções contendo agentes detergentes capazes de promover a remoção do conteúdo das células vegetais. O tempo de imersão e as soluções foram definidas considerando as características estruturais de cada amostra. Na tabela 10 encontra-se descrita a composição e concentração de cada solução com o respectivo código utilizado no procedimento. Os detalhes desta etapa experimental são descritos nas seções seguintes.

Tabela 10 - Soluções utilizadas no tratamento químico.

Código da Solução	Composição
S	0,1 % Azida em PBS (0,05M)
S1	10% SDS, 0,1% Azida em PBS (0,1M)
S2	5% SDS, 0,05% Azida em PBS (0,05M)
T1	0,1% de Triton X-100 e 10% de Hipoclorito de Sódio em água destilada
T2	0,1% de Triton X-100 e 5% de Hipoclorito de Sódio em água destilada
T3	0,1% de Triton X-100 e 1% de Hipoclorito de Sódio em água destilada
T4	0,05% de Triton X-100 e 5% de Hipoclorito de Sódio em água destilada

Fonte: próprio autor.

As estruturas vegetais, após adquiridas no mercado convencional, foram armazenadas à temperatura de - 20°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram cortadas, exceto as folhas, e imersas em porta-amostras contendo diferentes soluções. Inicialmente, as amostras foram imersas em soluções de SDS e Azida (S, S1 ou S2) e após diferentes intervalos de tempo, as amostras foram transferidas para as soluções contendo Triton X-100 e hipoclorito de sódio em concentrações variadas (T1, T2, T3 ou T4). O tempo de exposição nessa etapa variou entre 6 e 15 dias e a retirada das amostras foi definida a partir do perfil de descoloração e da resistência mecânica ao toque (teste sensorial). A tabela 11 sumariza as etapas do tratamento químico.

Tabela 11 – Etapas do tratamento químico

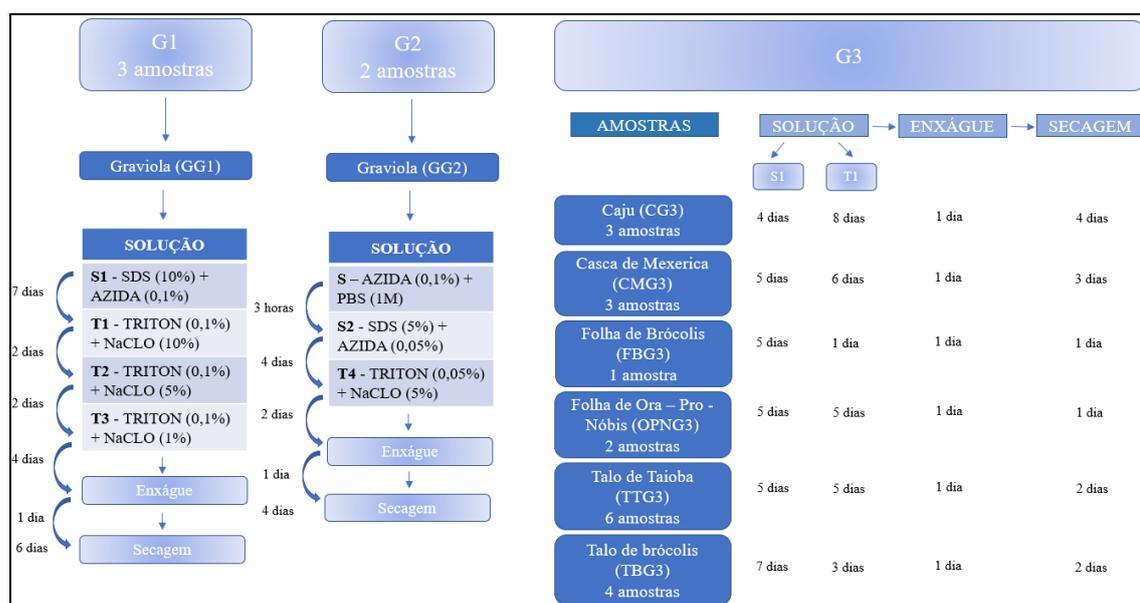
Grupo	Amostras	ETAPAS					
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
G1	Graviola (GG1)	S1 SDS/ AZIDA	T1 TRITON- X/NaClO	T2 TRITON- X/NaClO	T3 TRITON- X/NaClO	Enxágue	Secagem
		7 dias	2 dias	2 dias	4 dias		
G2	Graviola (GG2)	S AZIDA	S2 SDS/ AZIDA	T4 TRITON- X/NaClO	-	1 dia	4 dias
		3 horas	4 dias	2 dias			
G3	Caju (CG3)	S1 SDS/ AZIDA	T1- TRITON- X/NaClO	-	-	1 dia (3 trocas)	4 dias
		4 dias	8 dias (trocas diárias)				
	Casca de Mexerica (CMG3)	5 dias	6 dias (trocas diárias)	-	-	1 dia (3 trocas)	3 dias
	Folha de Brócolis (FBG3)	5 dias	1 dia	-	-	1 dia (3 trocas)	1 dia
	Folha de OPN (OPNG3)	5 dias	5 dias (trocas diárias)	-	-	1 dia (3 trocas)	1 dia
	Talos de Taioba (TTG3)	5 dias	5 dias (trocas diárias)	-	-	1 dia (3 trocas)	2 dias
	Talos de Brócolis (TBDG3)	7 dias	3 dias			1 dia (3 trocas)	2 dias

Fonte: próprio autor.

Ressalta-se que, na amostra de graviola GG1 foi diluído somente o hipoclorito de sódio e manteve-se o Triton X-100 na mesma concentração (soluções T2 e T3). Após ter observado danos à estrutura da amostra GG1, optou-se por iniciar o processo de descelularização da graviola GG2 com a solução original diluída pela metade (T4). De acordo com protocolos de descelularização já publicados (DIMOU et al., 2019; OTT et al., 2008; PARMAKSIZ; ELÇIN; ELÇIN, 2020), testou-se a lavagem da amostra GG2 com PBS antes do tratamento, no intuito de remover substâncias ou impurezas e facilitar as próximas etapas. Não se prosseguiu com a lavagem para outras amostras devido a falta de indícios da eficácia do método. Outro fator importante a se destacar é

quanto a lavagem das amostras. Após observado pontos esbranquiçados em algumas amostras, adaptou-se o protocolo, na etapa de enxágue, sendo realizada a troca da solução por 3 vezes, durante 24 horas (procedimento realizado após o processo feito com a graviola). O fluxograma da figura 23 sumariza o processo de tratamento químico realizado.

Figura 23 - Fluxograma do processo de tratamento químico



Os grupos experimentais foram organizados conforme o tipo de tratamento químico realizado (G1, G2, G3 e G4) e as amostras foram nomeadas de acordo com o vegetal utilizado (graviola - G, caju - C, casca de mexerica - CM, folha de brócolis - FB, folha de ora-pro-nobis - OPN, talos de taioba - TT e talo de brócolis - TB).

Fonte: próprio autor.

Após a ação dos detergentes em diferentes tempos e concentrações, as amostras foram lavadas com água destilada para remoção de resíduos e, após análise sensorial, foram armazenadas à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Em seguida, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) e liofilizadas para prosseguir com os testes de caracterização. As amostras controle (cortes das mesmas frutas e vegetais utilizados no processo de descelularização) foram armazenadas, e após a análise sensorial, congeladas em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) e liofilizadas para as etapas seguintes de caracterização (MEV, FTIR e TG).

Para obtenção da celulose a partir da casca de banana (*Musa acuminata*), os processos de extração foram baseados no trabalho de Singanusong et al (2014), com modificações. De forma breve, 1,9 g de casca de banana foi seca em estufa a 50 °C, por 48 horas e, em seguida, triturada para obtenção do pó. A amostra em pó foi imersa em sucessivas soluções (HCl 0,3%, NaOH 1,6 %, NaClO 1%) e após cada imersão, a amostra foi filtrada. Por fim, o branqueamento da amostra foi feito com solução de H₂O₂ 24% e NAOH 4%.

5.2.2 Caracterizações físico-químicas

As amostras tratadas quimicamente e seus respectivos controles foram submetidos às seguintes análises físico-químicas: a) sensorial (aspectos visuais e mecânicos), b) morfológica (Microscopia Eletrônica de Varredura), c) química (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier) e d) termogravimétrica (Termogravimetria). A celulose extraída da casca de banana foi submetida aos testes químico (FTIR) e termogravimétrico (TG).

5.2.2.1 Análise sensorial

Foram realizadas análises dos aspectos visuais e mecânicos das amostras no decorrer das etapas do tratamento químico. Na análise visual, observou-se a coloração das amostras e na análise mecânica, verificou-se a integridade das amostras em relação ao nível de fragilidade e resistência ao manuseio, sem o uso de equipamentos e apenas por único observador.

5.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para avaliar qualitativamente as estruturas morfológicas das amostras quanto à porosidade e a interconectividade dos poros. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Ensaio de Caracterização do Campus IV do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro por *sputtering* no equipamento Quick Coater SC-701 (Sanyu Electron, Shanghai, China), aplicando-se amperagem de 1,5A por 1 minuto e 20 segundos. Após metalização, o aspecto

morfológico das amostras foi analisado no equipamento modelo SSX-500 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

5.2.2.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise dos grupamentos químicos das amostras foi feita por meio da técnica de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) utilizando o equipamento IR-Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), módulo ATR (*Attenuated Total Reflectance*) na faixa de comprimento de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . A amostra enviada ao teste em estado sólido, na quantidade de 10 a 15 miligramas. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Ensaio de Caracterização do Campus VI do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Para fins de comparação em relação à estrutura celulósica remanescente nas amostras tratadas, realizou-se o teste também para a celulose extraída da casca de banana.

5.2.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)

O comportamento térmico das amostras foi avaliado por meio da técnica de Termogravimetria utilizando o equipamento DTG-60/60H (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), com cadinho de alumina, atmosfera de Nitrogênio (50 mL/min) e taxa de aquecimento de 10 °C/min , no intervalo de temperatura de 10 °C a 900 °C . A amostra enviada ao teste em estado sólido, na quantidade de 10 a 15 miligramas. Os gráficos foram construídos utilizando o software Origin[®]. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Ensaio de Caracterização do Campus VI do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Para fins de comparação sobre a estrutura celulósica remanescente nas amostras tratadas, realizou-se o teste também para a celulose extraída da casca de banana.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente trabalho, estruturas vegetais foram submetidas a diferentes tratamentos químicos e, posteriormente, caracterizadas físico-quimicamente, no intuito de avaliar o potencial desses componentes naturais para a aplicação como *scaffolds* na Engenharia de Tecidos. Os tratamentos químicos foram realizados com uma combinação de dois detergentes amplamente utilizados em ensaios de descelularização de tecidos (MODULEVSKY et al., 2014; GOTTS & THYDEN, 2016; GERSHLAK et al., 2017 e FONTANA et al., 2017). Nos próximos tópicos, são apresentados os resultados dos ensaios realizados com as diferentes estruturas vegetais.

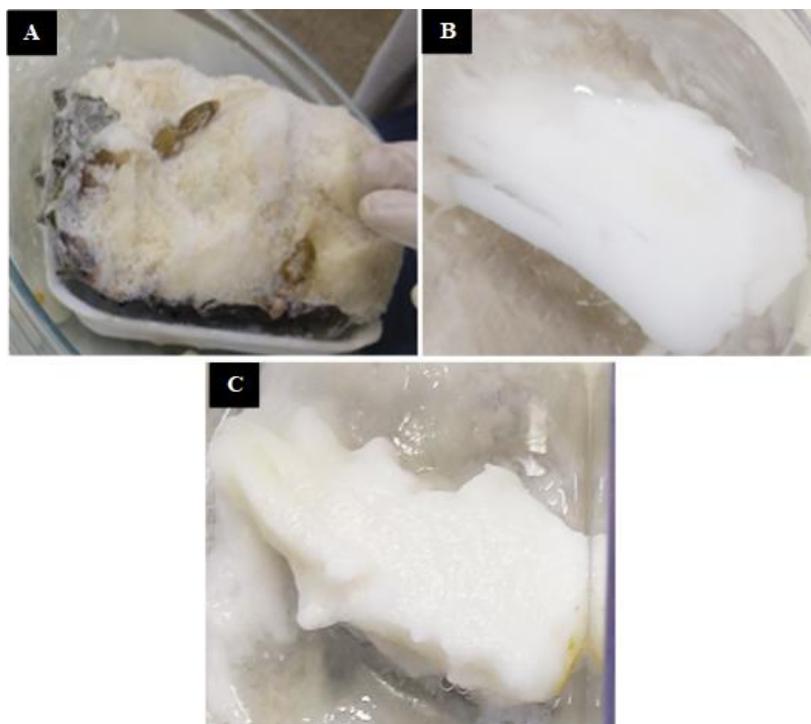
Estruturas das frutas

6.1 GRAVIOLA

6.1.1 *Análise Sensorial*

A alteração na coloração e os aspectos morfológicos identificados por meio de análise mecânica manual das amostras de graviola são apresentadas na figura 24 e na tabela 12, respectivamente.

Figura 24 - Imagens ilustrativas das amostras de Graviola.



(A): Graviola *in natura*; (B): GG1 - Graviola Grupo 1, peso *in natura*: 12,38 gramas; (C): GG2 - Graviola Grupo 2, peso *in natura*: 10,20 gramas.

Fonte: próprio autor.

Tabela 12 - Análise Sensorial da Graviola

AMOSTRAS	ASPECTO VISUAL	ASPECTO MORFOLÓGICO
GC	Opaca, com coloração amarelada	Mole e Frágil. Após seca, estrutura dura e rígida
GG1	Bordas Translúcidas. Coloração branca, pequenas áreas em tom amarelado	Frágil, soltando fibras. Após seca, estrutura dura e rígida
GG2	Opaca, com coloração branca e áreas mais amareladas que a GG1	Mole e Frágil. Após seca, estrutura dura e rígida

GG1 - Graviola Grupo 1 – Submetida ao tratamento com: S1 (10% SDS, 0,1% Azida em PBS (0,1M)); T1 (0,1% de Triton X-100 e 10% NaClO em H₂O destilada), T2 (0,1% de Triton X-100 e 5% NaClO em H₂O destilada) e T3 (0,1% de Triton X-100 e 1% NaClO em H₂O destilada); GG2 - Graviola Grupo 2 – Submetida ao tratamento com: S (Azida em PBS (0,1M)); S2 (5% SDS, 0,05% Azida em PBS (0,05M)); e T4 (0,05% de Triton X-100 e 5% NaClO em H₂O destilada)

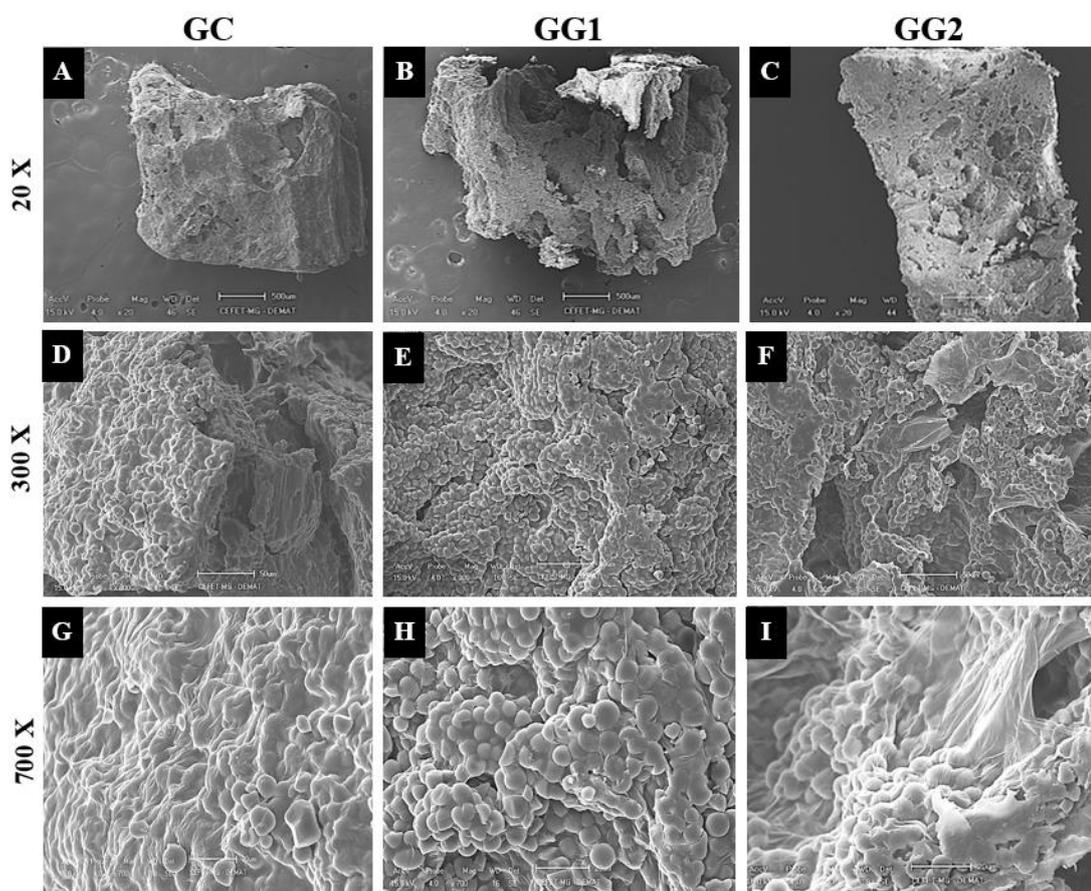
Fonte: próprio autor.

No painel B da figura 24, observa-se que a graviola GG1 apresentou maior despigmentação, contudo, a amostra mostrou-se frágil. Crapo e colaboradores (2011) relataram que a remoção de biomoléculas como proteínas, DNA e componentes da matriz aumenta com o maior tempo de exposição aos detergentes. Desta forma, visando obter uma matriz de fácil manipulação e maior resistência mecânica, o tempo de exposição da amostra, bem como as concentrações dos detergentes foram alteradas (ver Tabelas 10 e 11). Assim, a amostra GG2 foi imersa em solução com menor concentração de detergente (NaClO) e menor tempo de contato, o que resultou em uma matriz de aspecto opaco, flexível e mais compacta (Figura 24 C), porém o processo de despigmentação não foi tão eficiente quanto a amostra GG1. Em relação a amostra *in natura* (controle GC), esta após a secagem apresentou aspecto opaco, coloração amarelada, e estrutura dura e rígida.

6.1.2 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A superfície das amostras de Graviola (amostra controle e amostras pós tratamento químico) foram analisadas por MEV em diferentes ampliações (Figura 25).

Figura 25 - Micrografias das amostras de Graviola



Ampliação de 20 X: (A) Graviola Controle - GC; (B) Graviola Grupo 1 - GG1; (C) Graviola Grupo 2 - GG2. Ampliação de 300 X: (D) GC; (E) GG1; (F) GG2. Ampliação de 700 X: (G) GC; (H) GG1; (I) GG2.

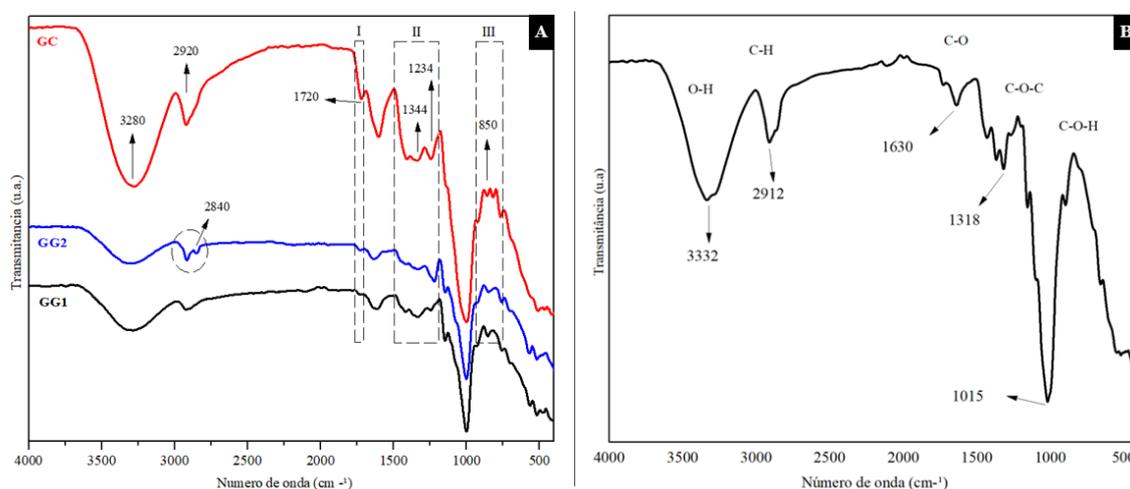
Fonte: próprio autor.

Sabe-se que a celulose é incorporada em uma matriz de hemicelulose incrustada com lignina que une toda a estrutura (HOLTZAPPLE, 2003a, 2003b). Dessa forma, as micrografias podem indicar estruturas típicas de materiais lignocelulósicos com grande quantidade de açúcares e lipídeos, conforme anteriormente relatado em trabalho com polpa de graviola (CAVALCANTE, 2016). Cavalcanti (2016) demonstra a estrutura da graviola obtida por secagem em spray dry, no MEV, ressaltando a grande quantidade de açúcar e a adesão de partículas menores na superfície de partículas maiores, formando aglomerados. Semelhança esta, observada nas amostras obtidas neste trabalho; ressaltando ainda que, não foi possível identificar diferenças morfológicas entre as amostras de graviola controle e as amostras tratadas.

6.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Este ensaio de caracterização revela o perfil das bandas de absorção das moléculas constituintes nas amostras de graviola. A fim de se comprovar a estrutura celulósica remanescente das amostras tratadas, apresenta-se o resultado de caracterização, por meio do FTIR, das amostras de graviola juntamente com a amostra de celulose extraída da casca de banana (Figura 26).

Figura 26 - Espectro de FTIR das amostras de Graviola e Celulose



Na figura, o painel A representa o espectro de FTIR da Graviola Controle (GC); Graviola Grupo 1 (GG1) e Graviola Grupo 2 (GG2). No painel B é exibido o espectro de FTIR da celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor.

As bandas de absorção estão presentes em todas as amostras, tratadas ou não, no entanto, possuem diferenças de intensidade das vibrações. A amostra de graviola controle (GC) exibe bandas de absorção que podem ser atribuídas às macromoléculas de celulose, hemicelulose, lignina e pectina, sendo esses os principais constituintes da fruta. As vibrações fundamentais na região de 4000 a 2500 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos entre O-H e C-H. Normalmente, a banda referente às vibrações de distensão das ligações O-H está no intervalo entre 3600 e 3700 cm^{-1} (BECKER et al., 1997; RODRIGUES, 2017). No entanto, a banda identificada nestes espectros de graviola encontram-se por volta de 3200 cm^{-1} , o que indica que estes grupos fazem parte de ligações com hidrogênio, encontrando-se desviada para comprimentos de onda

menores (BAPTISTA; BORGES; FERREIRA, 2010), assim como notado na celulose extraída da casca de banana. Observando-se o espectro da celulose, no painel B da figura 26, em 1318 cm^{-1} tem-se a banda característica da distensão assimétrica da ligação C-O-C, típica dos ésteres, encontrados na celulose (Figura 26B). Em 1012 cm^{-1} é identificada a vibração de distensão da ligação C-OH, característica dos álcoois primários presentes na estrutura da celulose (BAPTISTA et al., 2010). Salienta-se que, absorções entre a região de 1500 a 1000 cm^{-1} é conhecida como a área de “impressão digital da celulose”, ou seja, representa um padrão de vibrações característicos da molécula de celulose como um todo, portanto, podem ser usados para a sua identificação (MOHAMED et al., 2017). Visto isto, conforme o esperado, o perfil de bandas do FTIR das amostras de graviola apresentam similaridade ao perfil observado para a celulose extraída da casca da banana.

Em comparação com a amostra de graviola controle, as diferenças de intensidade e ausência de alguns picos observados nas amostras tratadas, sugere-se alteração e/ou redução de alguns grupos:

- Ligações C-H alifáticas, observadas em grupos alcanos que compõem a cadeia principal de biopolímeros (pico próximo a 2900 cm^{-1} no espectro de GC) e que podem ser atribuídas a ligações lipídeo-carboidrato (DUYGU et al., 2012);
- Vibrações de distensão da ligação C=O de grupos carbonila, presente principalmente na hemicelulose, pectina e também em moléculas de nucleotídeos (pico de 1720 cm^{-1} - região I destacada no gráfico);
- Deformações de CH_3 que podem fazer referência às bandas de absorção de base nitrogenada, como pirimidina (citosina e timina) e purina (adenina e guanina) (pico de 1344 cm^{-1} - região II destacada no gráfico) (BANYAY; SARKAR; GRÄSLUND, 2003; GOMES RIOS et al., 2021);
- Distensão assimétrica da ligação C-O-C, típica dos ésteres (pico de 1234 cm^{-1} - região II destacada no gráfico), que dão aroma e sabor às frutas;
- Como os picos abaixo de 1000 cm^{-1} fazem referência às vibrações de flexão fora do plano C-C-H e ligações de C-C, C-O (pico de 850 cm^{-1} - região III destacada no gráfico) de aldeídos presentes na desoxirribose (KUMAR; PRASAD, 2011).

A redução na intensidade das bandas relacionadas aos grupos de lipídeos e de ácidos nucleicos sugere que o tratamento químico da fruta de Graviola com detergentes retirou, ainda que parcialmente, essas biomoléculas do interior das células vegetais, e

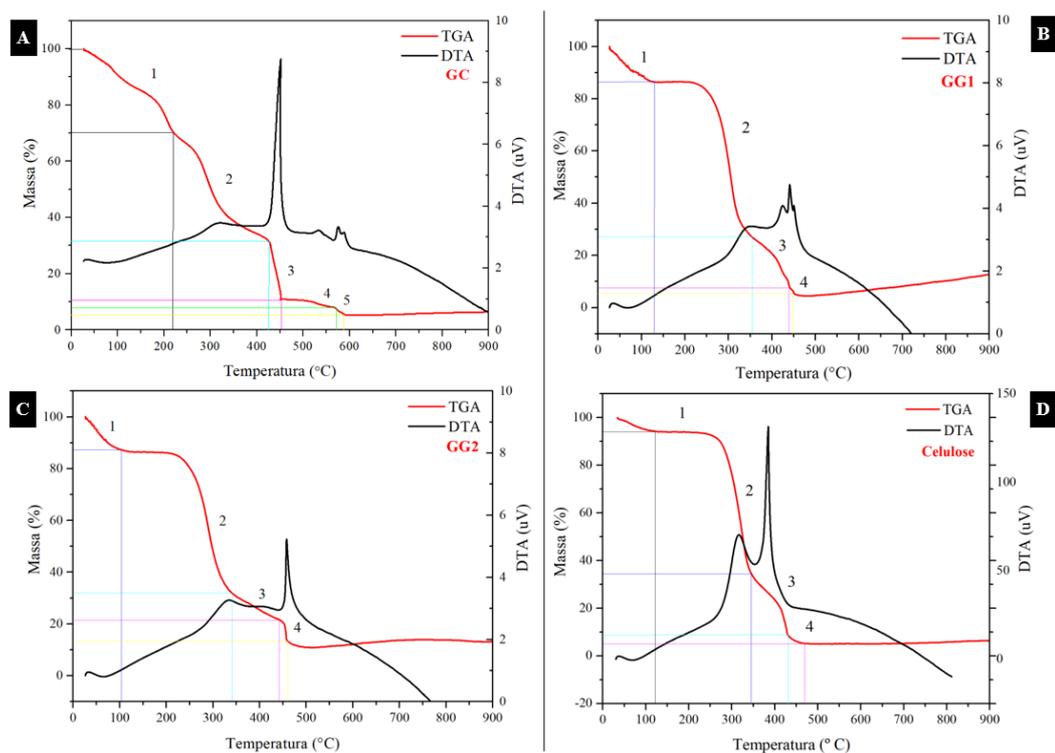
conforme o esperado, manteve a estrutura celulósica. Resultados semelhantes foram observados por Dikici et al., (2019) e Salehi et al., (2020) com folhas de espinafre e por Aswathy et al., (2021) com caule de bambu.

Ressalta-se ainda que o pico em 2840 cm^{-1} , observado somente na amostra GG2, pode ser atribuído a um resíduo de SDS na amostra, já que na literatura este comprimento de onda é característico deste composto (VIANA, 2008).

6.1.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

Assim como no teste de FTIR, compara-se também o perfil termogravimétrico entre as amostras de graviola tratadas, controle e celulose extraída da casca de banana (Figura 27).

Figura 27 - Curvas de TGA e DTA das amostras de Graviola e celulose.



Eventos endo e exotérmicos representados pelas curvas TGA e DTA. No painel A, tem-se GC - Graviola Controle; no painel B, GG1 - Graviola Grupo 1; no painel C, GG2 - Graviola Grupo 2 e no painel D, celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor.

A degradação da hemicelulose começa a ocorrer na faixa de 220 a 315 °C (KALOUSTIAN; EL-MOSELHY; PORTUGAL, 2003; YANG et al., 2010), temperaturas condizentes com as curvas mostradas nos gráficos do painel A, B e C (região 3 para GC e regiões 2 para GG1 e GG2); sendo que, nas amostras tratadas, observa-se uma estabilização da curva (sem variação de massa), antes desta degradação. A região de 315 a aproximadamente 400 °C é característica da degradação de compostos celulósicos, conforme já relatado por (YANG et al., 2010) - região 3 para todas as amostras de graviola. A lignina se degrada em uma ampla faixa de temperatura, e por conter estrutura ramificada, com muitos anéis aromáticos, tende a ser a substância mais tardia a se decompor (YANG et al., 2010). As ligninas se decompõem no primeiro estágio pela quebra da ligação do éter, resultando em fenóis substituídos, que, em um segundo estágio em alta temperatura, dão origem ao carvão (KALOUSTIAN; PAULI; PASTOR, 2001). Na figura 27, painel A, parte da decomposição desses compostos mais complexos ocorre após a temperatura de 400 °C (representados pelas fases 4 e 5 da amostra CG). Nota-se, na etapa 4, nos painéis B, C e D, uma pequena perda de massa, podendo ser indício de degradação de compostos lignocelulósicos ou grupos mais complexos (ligações duplas) da celulose (YANG et al., 2007).

No painel B, C e D observa-se que as graviolas GG1, GG2 e a amostra de celulose apresentaram quatro (4) estágios principais, enquanto a graviola controle (GC), cinco (5) estágios (Painel A). Ao se comparar as amostras, observa-se fases de desidratação e degradação bem demarcadas nas amostras tratadas e na celulose, diferentemente da amostra GC, esta com uma perda mássica de aproximadamente 30% no primeiro estágio (25 - 220 °C). Este fato pode ser indicativo da presença de substâncias com menor cadeia molecular na graviola controle e que estão ausentes ou em menor quantidade nas outras amostras, sendo, este fato, também evidenciado pela maior perda de massa da GC na primeira etapa. A graviola controle apresenta a maior resistência térmica, visto que, sua primeira decomposição iniciou-se em 220 °C. De forma geral, as curvas exibidas pelas amostras tratadas tem grande semelhança com a amostra de celulose, conforme é mostrado nas decomposições de fases e perdas de massas (tabela 13).

Tabela 13 - Principais eventos térmicos das amostras de Graviola e Celulose

Graviola Controle (CG)			
Evento	Temperatura (Δt)	Diferença de Perda de massa % (Δm)	Perda de massa
1ª Desidratação	25 – 125 °C	100 – 70,2	12,8 %
1ª Decomposição	220 – 425 °C	70,2 – 31,5	38,6 %
2ª Decomposição	425 – 450 °C	31,5 – 10,9	20,7 %
3ª Decomposição	450 – 570 °C	10,8 – 8,1	2,8 %
4ª Decomposição	570 – 580 °C	8,1 – 6,6	1,5 %
5ª Decomposição	580 – 590 °C	6,6 – 5,3	1,2 %
Graviola Grupo 1 (GG1)			
Evento	Temperatura (Δt)	Diferença de Perda de massa % (Δm)	Perda de massa
1ª Desidratação	25 – 130 °C	100 – 86,4	13,6 %
1ª Decomposição	130 – 355 °C	86,4 – 27,3	59,1 %
2ª Decomposição	355 – 435 °C	27,3 – 10,7	16,5 %
3ª Decomposição	435 – 440 °C	10,7 – 6,9	3,8 %
4ª Decomposição	440 – 452 °C	6,9 – 5,1	1,9 %
Graviola Grupo 2 (GG2)			
Evento	Temperatura (Δt)	Diferença de Perda de massa % (Δm)	Perda de massa
1ª Desidratação	25 – 100 °C	100 – 87,2	12,7 %
1ª Decomposição	100 – 340 °C	87,2 – 31,9	55,3 %
2ª Decomposição	340 – 442 °C	31,9 – 21,2	10,7 %
3ª Decomposição	442 – 460 °C	21,2 – 12,8	8,4 %
Celulose			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de Perda de massa % (Δm)	Perda de massa
1ª Desidratação	25 – 121 °C	100 – 94,1	5,9 %
1ª Decomposição	121 – 344 °C	94,1 – 34,4	59,7 %
2ª Decomposição	344 – 430 °C	34,4 – 9,0	25,4 %

Fonte: próprio autor.

Os principais eventos térmicos estão apresentados na tabela 13. Nota-se que, as amostras de graviola tratadas e celulose apresentaram perdas mássicas similares na primeira etapa do estágio de degradação, estes dados sugerem em maiores quantidades de componentes contidos na hemicelulose e celulose. Aparentemente, o tratamento químico eliminou compostos mais simples da graviola dos grupos GG1 e GG2, já que ambas apresentam fases de desidratação e degradação bem definidas. Estes resultados podem ser correlacionados àqueles obtidos no FTIR, pois, nota-se redução de compostos presentes em ligações lipídios-carboidratos e em moléculas de ácidos nucleicos. Além disso, o perfil termogravimétrico das amostras de Graviola dos grupos

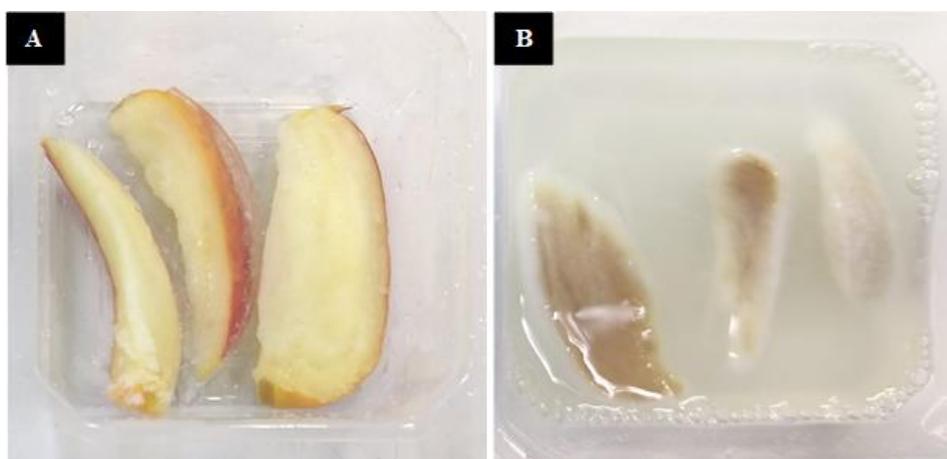
GG1 e GG2 é semelhante ao perfil observado para a celulose extraída da casca de banana, sugerindo que, conforme o esperado, essas amostras permaneceram com sua estrutura celulósica, mesmo após o tratamento com detergentes. Ademais, não se observou alterações significativas nas características térmicas das amostras de Graviola do grupo GG1 e GG2, indicando que a redução do tempo e da concentração dos detergentes durante o tratamento não se refletiu em alterações nas propriedades térmicas.

6.2 PSEUDOFRUTO DO CAJU

6.2.1 *Análise Sensorial*

A alteração na coloração e os aspectos morfológicos identificados por meio de análise mecânica manual das amostras de caju são apresentadas na figura 28 e na tabela 14, respectivamente.

Figura 28 - Imagens ilustrativas das amostras de Caju



(A): Caju Controle – CC, peso total amostras *in natura*: 20 gramas; (B): Caju Grupo 3 - CG3.

Fonte: próprio autor.

Tabela 14 - Análise Sensorial do Caju

AMOSTRAS	ASPECTO VISUAL	MORFOLOGIA E ASPECTOS MECÂNICOS
CC	Opaco, com o interior amarelado e casca rosada	Maciço e resistente, após seco apresentou certa porosidade e continuou resistente.
CG3	Opaco, com bordas brancas e interior escuro.	Bordas frágeis, soltando fibras. Após seco, estrutura porosa, similar ao isopor

CC - Caju Controle e CG3 - Caju Grupo 3 - Submetido ao tratamento com: S1 (10% SDS, 0,1% Azida em PBS (0,1M)); T1 (0,1% de Triton X-100 e 10% NaClO em H₂O destilada).

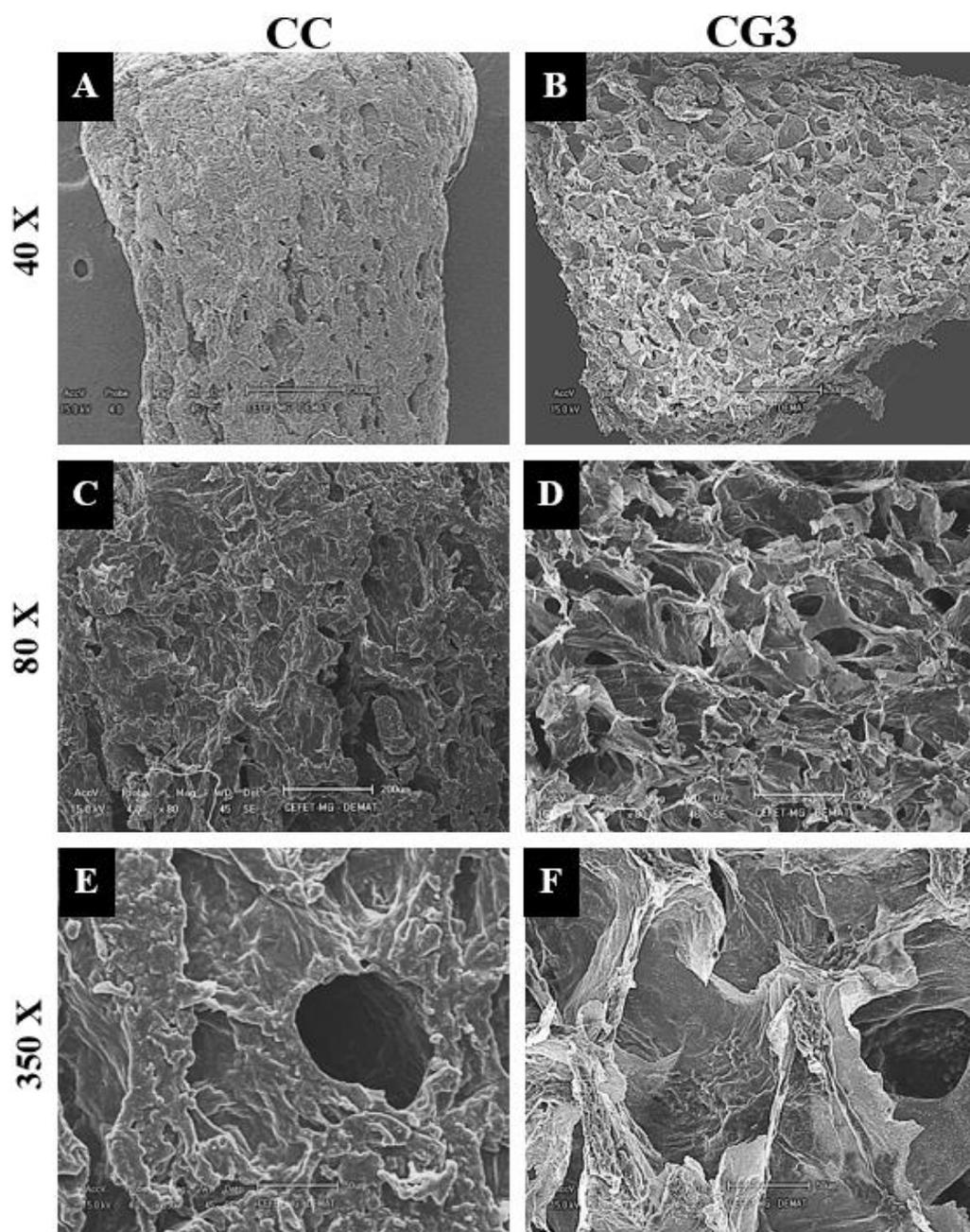
Fonte: próprio autor.

Observa-se que o tratamento químico promoveu uma despigmentação parcial no caju, permanecendo, em seu interior, regiões mais escuras. Após o processo de secagem, visualmente, a amostra apresentou estrutura porosa.

6.2.2 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A superfície das amostras de Caju cortadas transversalmente foram analisadas por MEV em diferentes ampliações (Figura 29).

Figura 29 - Micrografias das amostras de Caju



Ampliação de 40 X: (A) Caju Controle - CC; (B) Caju Grupo 3 - CG3. Ampliação de 80 X: (C) CC; (D) CG3. Ampliação de 350 X: (E) CC; (F) CG3.

Fonte: próprio autor.

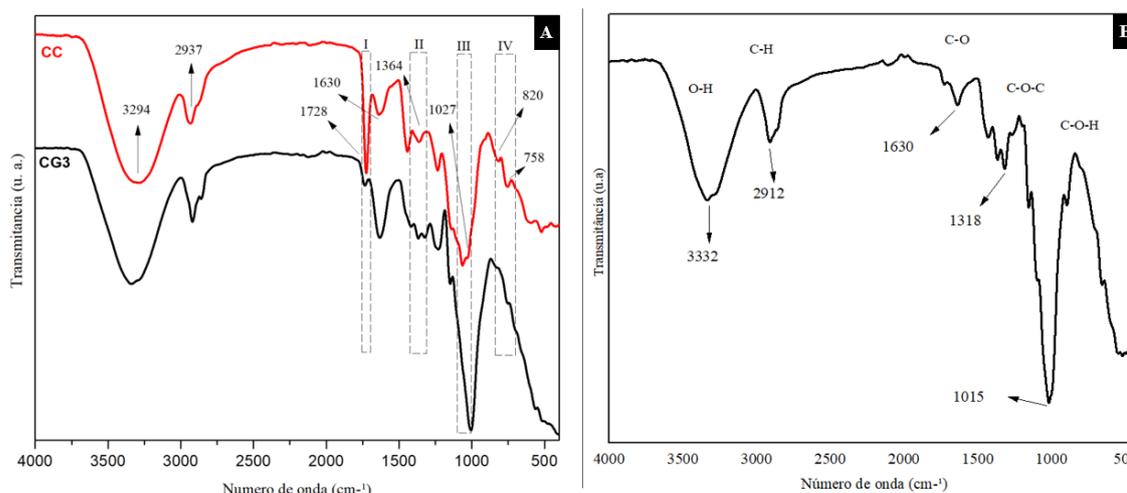
A análise qualitativa das micrografias do caju sugerem que, após o tratamento químico, houve um aumento na porosidade do material (Painéis C e D). Destaca-se o aspecto de fibras sobrepostas que formam pequenos canalículos, de forma similar a uma colmeia (Painel F). As fibras presentes em estruturas vegetais conferem suas principais

propriedades. O ângulo e o arranjo das microfibrilas dentro da parede celular também são importantes para estas determinações. A rede formada por lignina e pectina proporcionam propriedades adesivas. Essas propriedades são responsáveis pela resistência e rigidez das fibras celulósicas. Ressalta-se também, que, normalmente, alto teor de celulose e menor ângulo microfibrilar proporcionam melhores propriedades de resistência (NURAZZI et al., 2021b). Conforme relatado por Sarig et al. (2012) os andaimes devem possuir uma orientação de fibra anisotrópica, permitindo o suporte de células resemeadas, enquanto suporta os parâmetros mecânicos solicitados (SARIG et al., 2012). No trabalho de Cheng et al. (2020), a isotropia foi calculada por um parâmetro de ordem de orientação 2D (OOP), e basicamente, $OOP = 1$ corresponde à orientação anisotrópica perfeita (por exemplo, alinhamento uniaxial completo), enquanto 0 indica orientação totalmente isotrópica. Para cada condição experimental, os valores de OOP para andaimes individuais indicam a capacidade do andaime de celulose em induzir alinhamento celular, quando comparados com células cultivadas em um controle uniforme. O resultado desta pesquisa mostrou que as estruturas anisotrópicas encontradas na direção longitudinal (vegetal aspargo, cebolinha e alho-poró) poderiam direcionar o crescimento e alinhamento do músculo esquelético, ou seja, orientar a fixação celular, o crescimento, a diferenciação e o alinhamento das miofibrilas (CHENG et al., 2020).

6.2.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro na região do infravermelho obtido para as amostras de caju e celulose estão representados na Figura 30.

Figura 30 - Espectro de FTIR das amostras de caju e celulose



Na figura, o painel A representa o espectro de FTIR do Caju Controle (CC) e Caju Grupo 3 (CG3). No painel B é exibido o espectro de FTIR da celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor.

As bandas de absorção estão presentes nas duas amostras de caju, contudo, possuem diferenças de intensidade das vibrações. De forma similar à amostra de graviola, as amostras de caju apresentam bandas de absorção correspondentes às macromoléculas de celulose, hemicelulose, lignina e pectina identificadas nas quatro principais regiões de interesse (I, II, III e IV), conforme a literatura relata. Destaca-se ainda que, de acordo com o esperado, os perfis de bandas do FTIR das amostras de caju apresentam similaridades ao perfil observado para a celulose extraída da casca da banana. Principalmente a amostra tratada (CG3), exibindo, inclusive intensidades de pico bem próximos à celulose.

Em comparação com a amostra controle, as diferenças de intensidade e ausência de alguns picos observados nas amostras tratadas, sugere-se alteração e/ou redução de alguns grupos, tais como:

- Vibrações de distensão da ligação C=O de grupos carbonila, presente principalmente na hemicelulose, pectina e também em moléculas de nucleotídeos (pico de 1728 cm^{-1});
- Deformações de CH_3 que podem fazer referência às bandas de absorção de base nitrogenada, como pirimidina (citosina e timina) e purina (adenina e guanina)

(pico de 1364 cm^{-1} - região II destacada no gráfico) (BANYAY; SARKAR; GRÄSLUND, 2003; GOMES RIOS et al., 2021);

- Como os picos abaixo de 1000 cm^{-1} fazem referência às vibrações de flexão fora do plano C-C-H e ligações de C-C, C-O (pico de 820 e 758 cm^{-1} , região IV destacada no gráfico) de aldeídos presentes na desoxirribose (KUMAR; PRASAD, 2011), infere-se uma redução e/ou alteração de ligações desses compostos na amostra tratada.

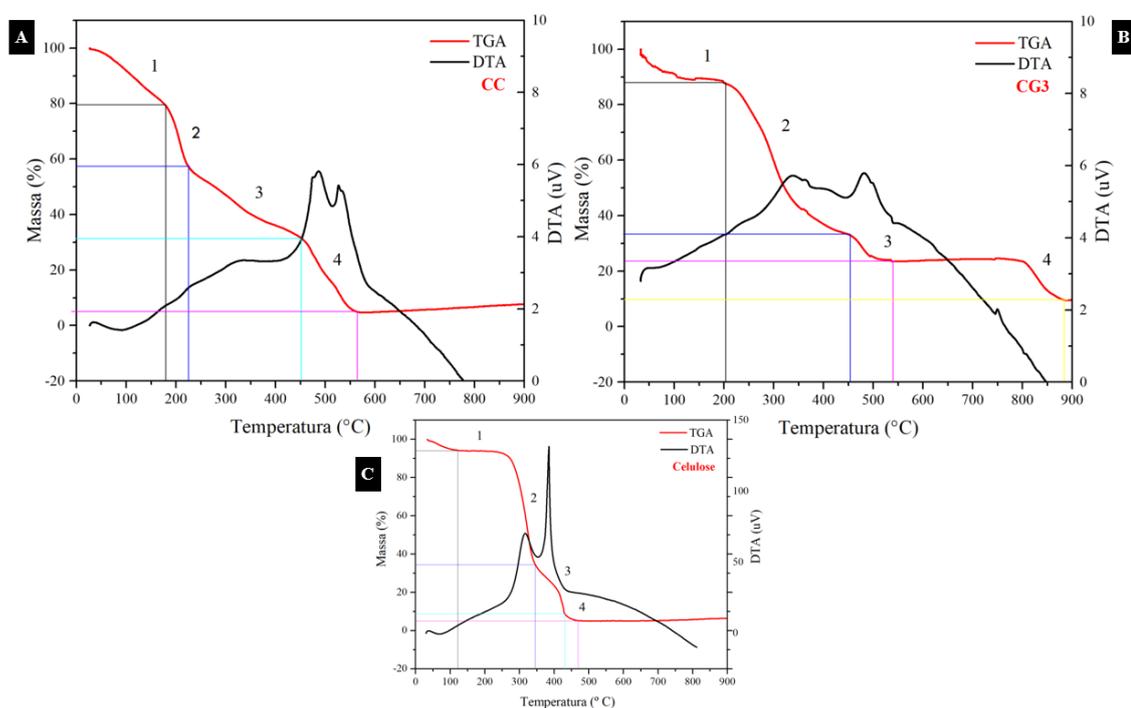
De forma similar ao observado na graviola, a redução na intensidade das bandas relacionadas aos grupos de ácidos nucleicos do pseudofruto de caju, após o tratamento químico, sugere que os detergentes retiraram, ainda que parcialmente, essas biomoléculas do interior das células vegetais, mantendo a estrutura lignocelulósica.

Ademais, observa-se em 1630 cm^{-1} uma banda de maior intensidade no caju tratado que pode estar associada a ligações de anel fenólico, indício de resíduos de Triton X-100 (ALONSO-SIMÓN et al., 2011). A presença de um duplete na região II do espectro da amostra CG3 relacionado à ligação C-H₂, e que não foi observado na amostra controle, corrobora a hipótese de resíduos de Triton X-100 (BANU et al., 2018), demonstrando então, que é preciso melhorar as etapas de lavagem pós tratamento. Por fim, a região III apresenta aumento da intensidade do pico em 1039 cm^{-1} , que pode também estar relacionado ao tratamento químico, sugerindo resíduos de SDS na amostra, uma vez que o perfil se associa também à presença da ligação S-O-C, característica deste composto (MEIRA, 2018). Considerando a potencial aplicação das matrizes vegetais descelularizadas como *scaffolds*, a presença de resíduos de detergente no material pode ser danoso para as células. Dessa forma, etapas adicionais de lavagem devem ser inseridas no protocolo de tratamento químico de caju.

6.2.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

O perfil termogravimétrico das amostras de Caju e Celulose são apresentados na Figura 31.

Figura 31 - Curvas de TGA e DTA das amostras de caju e celulose



Eventos endo e exotérmicos representados pelas curvas TGA e DTA. No painel A, tem-se CC - caju controle; no painel B, CG3 - caju grupo 3; no painel C, celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor.

As curvas termogravimétricas das amostras de caju são compostas por quatro eventos térmicos principais, sendo o primeiro atribuído à volatilização de compostos do pseudofruto do caju e/ou vaporização de água. Na região 2 observa-se uma perda de massa de 19,1% (180 a 224 °C) para a amostra CC; já no caju submetido ao tratamento químico (CG3), nota-se uma perda gradativa de massa, totalizando 54,6%, (200 a 450° C). Observa-se na região 3 ainda na amostra CG3, uma perda de massa menor de 9,8% (450 - 540 °C) em relação a CC, demonstrada na tabela 15. Esse perfil termogravimétrico mostra uma maior quantidade de compostos em decomposição na faixa de temperatura de 200 a 450° e em menor quantidade na faixa de 450 a 540° (sugere-se, a lignina). A faixa de degradação do Triton X – 100 é de 380° a 440 °C (ROJAS et al., 2019), indicando que, moléculas deste composto pode ter contribuído no aumento da massa degradada do CG3. De acordo com Ramimoghadam et al (2012), a decomposição de surfactantes, como por exemplo SDS, está entre 200 a 500 °C, podendo se estender a 934° C quando combinado a outros materiais. Na região 4 do Caju submetido ao tratamento químico observa-se uma perda de massa de 14,3% que pode ser atribuída à

decomposição de substâncias mais complexas. O deslocamento do perfil termogravimétrico da amostra tratada para a direita sugere maior estabilidade térmica desse material, pressupondo então, que, moléculas de SDS pode ter contribuído para a degradação da massa na região 4. Os principais eventos térmicos encontram-se exibidos na tabela 15.

Tabela 15 - Principais eventos térmicos das amostras de caju e celulose

Caju Controle (CC)			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 180 °C	100 – 76,7	23,3 %
1ª Decomposição	180 – 224 °C	76,7 – 57,6	19,1 %
2ª Decomposição	224 – 450 °C	57,6 – 31,4	26,2 %
3ª Decomposição	450 – 565 °C	31,4 – 4,9	26,6 %
Caju Grupo 3 (CG3)			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 200 °C	100 – 88,2	11,8 %
1ª Decomposição	200 – 450 °C	88,2 – 33,6	54,6 %
2ª Decomposição	450 – 540 °C	33,6 – 23,8	9,8 %
3ª Decomposição	540 – 885 °C	23,8 – 9,5	14,3 %
Celulose			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 121 °C	100 – 94,1	5,9 %
1ª Decomposição	121 – 344 °C	94,1 – 34,4	59,7 %
2ª Decomposição	344 – 430 °C	34,4 – 9,0	25,4 %

Fonte: próprio autor

Observa-se na tabela 15 que as perdas mássicas no caju controle estão mais distribuídas ao longo das faixas de temperaturas, já na amostra CG3 e celulose, as maiores perdas de massas se encontram em 450 e 344 °C respectivamente. Apesar do deslocamento da curva CG3 para a direita, de uma maneira geral, a termogravimetria analisada demonstra manutenção da estrutura celulósica no caju submetido ao tratamento com detergentes, uma vez que, apresentam similaridades em suas curvas, porém, a curva de caju tratado não gera indícios de ausência de moléculas para comparação com o teste de FTIR, a não ser a hipótese de conter menor massa de lignina. Por outro lado, as evidências mostram quantidades de reagentes no produto final, sinalizando que o protocolo de lavagem não foi suficiente para esta amostra.

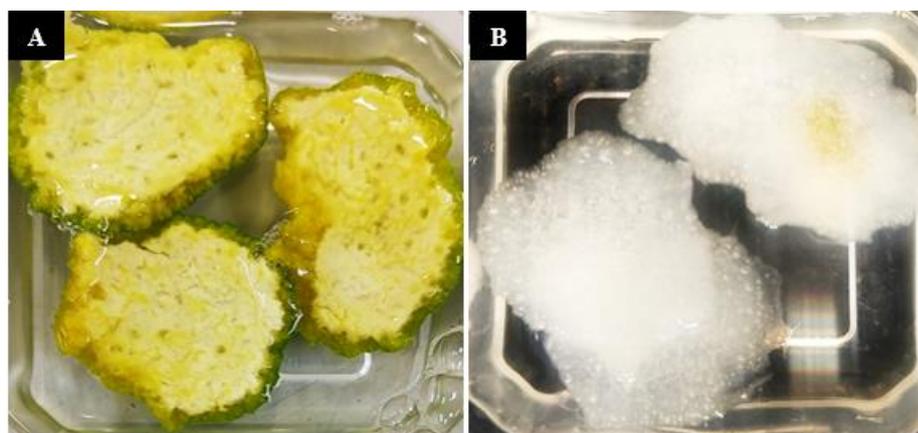
Apesar disso, é importante ressaltar que o caju, adaptado a um protocolo eficaz, pode ser uma alternativa interessante para a engenharia de tecidos devido a grande porosidade e interconectividade dos poros devido a semelhança da sua microestrutura (porosidade e interconectividade) com outros vegetais de potencial aplicabilidade como *scaffold* como, por exemplo, maçã e batata (CHENG et al., 2020; MODULEVSKY et al., 2014a). Este conceito é ainda reforçado por pesquisas que demonstraram que os biomateriais com alta área superficial e porosidade interconectada apresentaram sucesso quanto à proliferação celular e, quando implantados *in vivo*, permitem a migração interna das células hospedeiras para o implante (ADAMSKI et al., 2018; BORSELLI et al., 2011; HILL; BOONTHEEKUL; MOONEY, 2006).

6.3 CASCA DE MEXERICA

6.3.1 Análise Sensorial

A alteração na coloração e os aspectos morfológicos identificados por meio de análise mecânica manual das amostras de casca de mexerica são apresentadas na figura 32 e na tabela 16, respectivamente.

Figura 32 - Imagens ilustrativas das amostras de casca de mexerica



(A): Casca de Mexerica Controle – CMC, peso total amostras *in natura*: 14,73 gramas; (B): Casca de Mexerica Grupo 3 - CMG3.

Fonte: próprio autor.

Tabela 16 - Análise Sensorial da casca de mexerica

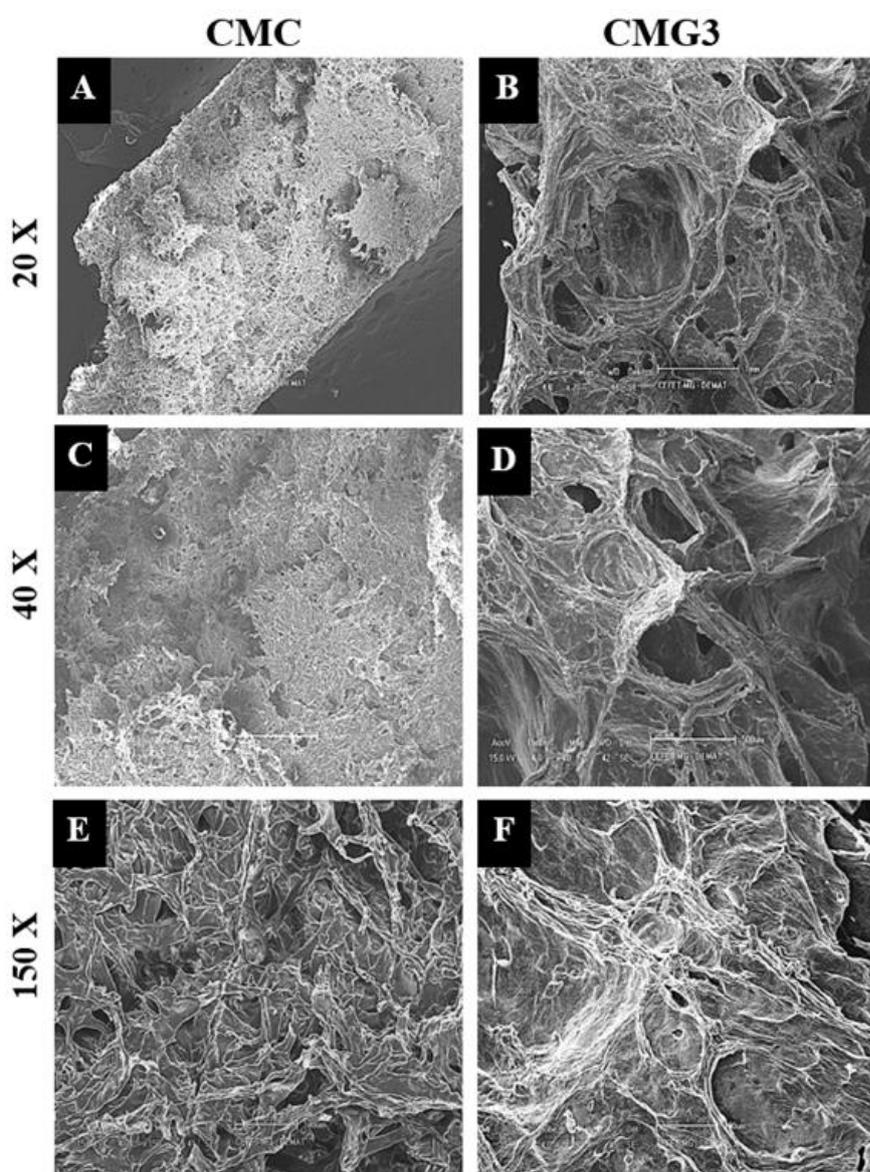
AMOSTRAS	ASPECTO VISUAL	MORFOLOGIA E ASPECTOS MECÂNICOS
CMC	Opaca, com o interior branco e casca alaranjada	Dura e Resistente
CMG3	Bordas translúcida, com coloração branca. Meio da amostra opaco e amarelado.	Moles, mas com estrutura aparentemente conservada. Após seca, estrutura dura e rígida

CMC - Casca de Mexerica Controle; CMG3 - Casca de Mexerica Grupo 3, Submetida ao tratamento com: S1 (10% SDS, 0,1% Azida em PBS (0,1M)); T1 (0,1% de Triton X-100 e 10% NaClO em H₂O destilada).
Fonte: próprio autor.

Observa-se que o tratamento químico promoveu uma despigmentação na casca de mexerica e obtenção de uma estrutura bem conservada e resistente ao manuseio.

6.3.2 *Microscopia Eletronica de Varredura (MEV)*

A superfície das amostras de Casca de Mexerica foram analisadas por MEV em diferentes ampliações (Figura 33).

Figura 33 - Micrografia das amostras de casca de mexerica

Ampliação de 20 X: (A) Casca de Mexerica Controle - CMC; (B) Casca de Mexerica Grupo 3 - CMG3. Ampliação de 40 X: (C) CMC; (D) CMG3. Ampliação de 150 X: (E) CMC; (F) CMG3.

Fonte: próprio autor.

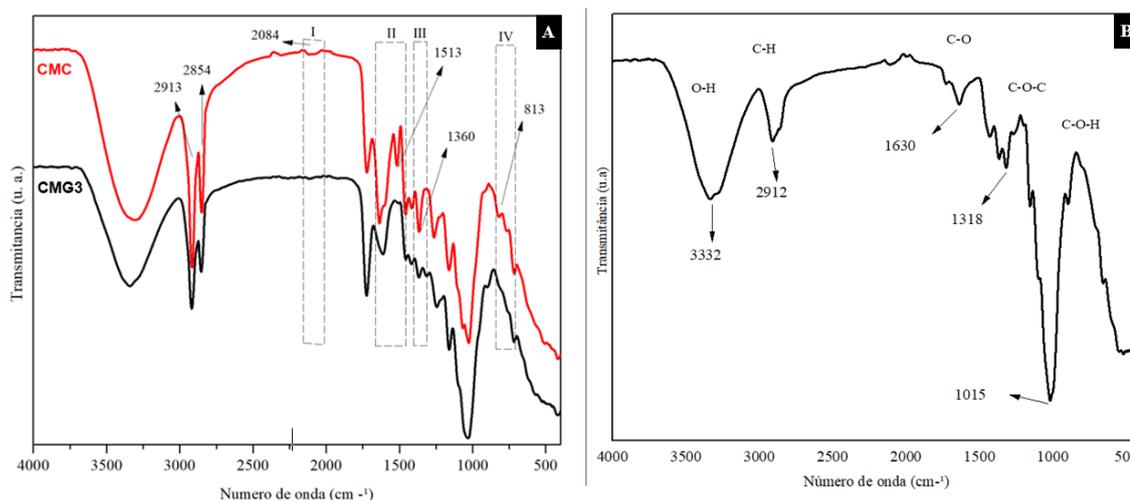
A estrutura porosa e com fibras interligadas da casca de mexerica controle (CMC) pode ser visualizada na ampliação de 150 X (Painel E). Após o tratamento químico (Painéis B, C e F), a amostra apresentou aparentemente mais porosa e a arquitetura tridimensional das fibras pôde ser visualizada com mais facilidade. Resultados semelhantes foram observados por Dikici et al., (2019) em amostras de espinafre descelularizadas. Essas amostras apresentavam uma estrutura fibrosa e

entrelaçada que permitiram a fixação de células de fibroblastos e colonização de células endoteliais da microvascularura da derme humana (HDMECs), além disso promoveram a neovascularização em ensaio de membrana corioalantóica (CAM) de ovo de galinha em modelo *ex vivo*.

6.3.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho obtidos para a amostra de Casca de Mexerica e Celulose estão representados na figura 34.

Figura 34 - Espectro de FTIR das amostras de casca de mexerica e celulose



Na figura, o painel A representa o espectro de FTIR CMC da casca de mexerica controle (CMC) e casca de mexerica grupo 3 (CMG3). No painel B é exibido o espectro de FTIR da celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor.

De forma similar às amostras de graviola e caju, as amostras de casca de mexerica também apresentaram bandas de absorção correspondentes às macromoléculas de celulose, hemicelulose, lignina e pectina identificadas nas quatro principais regiões de interesse (I, II, III e IV). Destaca-se ainda que, conforme o esperado, o perfil de bandas do FTIR das amostras de casca de mexerica apresenta similaridade ao perfil observado para a celulose extraída da casca da banana, com algumas diferenças de intensidade de picos e outras entre os picos de 1513 e 1000 cm^{-1} . O espectro obtido para

a casca de mexerica submetida ao tratamento químico também exibe algumas alterações quando comparado com o espectro da amostra controle. As principais alterações são:

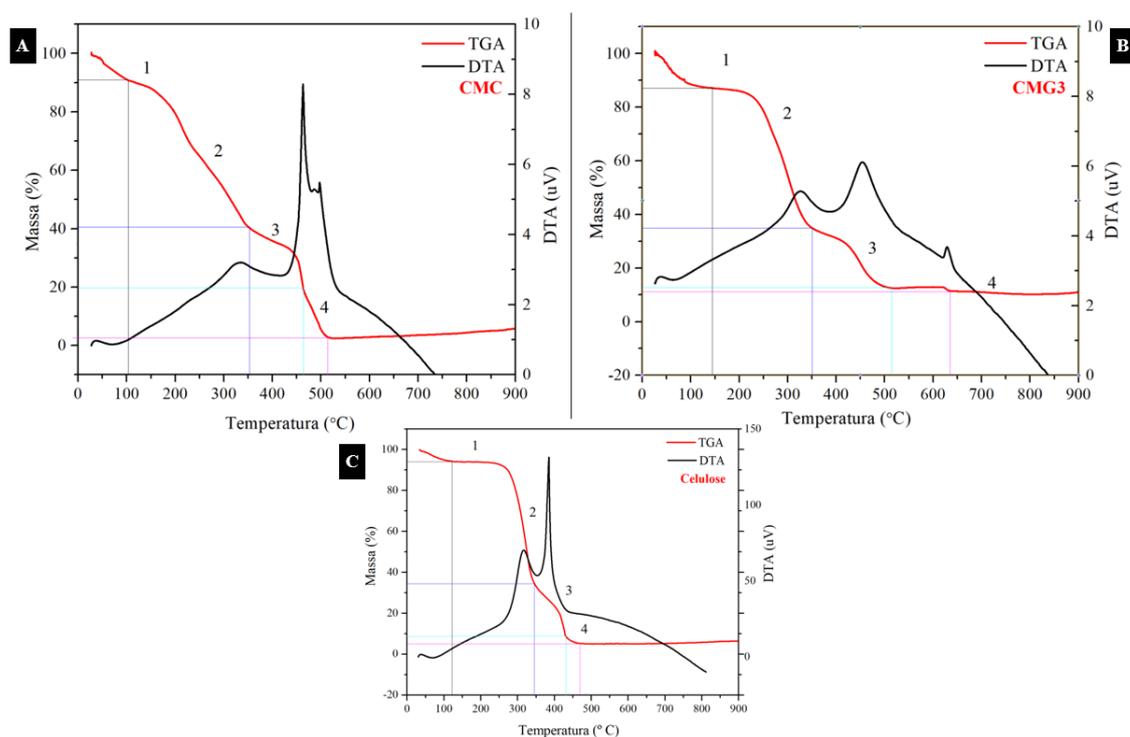
- Na região I, o espectro da amostra tratada não apresenta o pequeno pico observado na amostra controle (2084 cm^{-1}), indicando a ausência de compostos das funções alcinos, alquinos e nitrilas, que podem ter sido eliminados durante o tratamento; Ressalta-se que, tal pico também é exibido no gráfico da celulose e pode indicar a presença de algum pesticida que permaneceu na cultura vegetal de mexerica e banana;
- Na região II, a banda de 1513 cm^{-1} encontra-se presente somente no espectro da amostra controle, indicando que o tratamento químico eliminou compostos contendo ligações aromáticas em bandas cíclicas (ALONSO-SIMÓN et al., 2011; SALEHI et al., 2020);
- O pico com menor intensidade, próximo a 1360 cm^{-1} (região III), na amostra de Casca de Mexerica submetida ao tratamento com detergentes pode ser associado a bandas de absorção de base nitrogenada, como pirimidina (citosina e timina) e purina (adenina e guanina) (BANYAY et al. 2003; GOMES RIOS et al., 2021);
- A região IV da amostra controle apresenta alguns picos próximos a 813 cm^{-1} que não estão presentes na casca de mexerica tratada, o que pode indicar a redução de vibrações de flexão fora do plano C-C-H e ligações de C-C, C-O de aldeídos presentes na desoxirribose (KUMAR; PRASAD, 2011).

Assim como foi relatado por Salehi et.al (2020), os picos em algumas áreas na faixa de 1400 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} consistem em bandas aromáticas de estruturas cíclicas, principalmente bandas retas e não dobradas (SALEHI et al., 2020). A redução na intensidade das bandas associadas à presença de ácidos nucleicos sugere que o tratamento químico da casca de mexerica com detergentes retirou, ainda que parcialmente, essas biomoléculas do interior das células vegetais, e conforme o esperado, manteve a estrutura lignocelulósica. A presença da ligação carbonila (C=O), as bandas OH e as bandas C-O e O-C-O muito fortes presentes no pico com comprimento de onda de 1000 cm^{-1} indicam a estruturas esperadas na textura do material.

6.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

O perfil termogravimétrico das amostras de Casca de Mexerica e Celulose são apresentados na Figura 35.

Figura 35 - Curvas de TGA e DTA das amostras de casca de mexerica e celulose.



Eventos endo e exotérmicos representados pelas curvas TGA e DTA. O painel A - casca de mexerica controle (CMC) e casca de mexerica grupo 3 (CMG3). No painel B - celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor.

As curvas termogravimétricas da casca de mexerica controle e tratada são compostas por quatro eventos térmicos principais. Na primeira etapa ocorre a desidratação das amostras e, em seguida, três eventos de degradação. Ressalta-se que a intensidade dos picos dos eventos 3 e 4 da curva DTA da casca de mexerica controle é maior que a intensidade dos picos da casca de mexerica tratada, sugerindo que a amostra tratada contém menor quantidade de compostos de cadeia complexa. Como a região 3 e 4 faz referência à degradação de compostos lignocelulósicos, sugere-se que o tratamento eliminou compostos com ligações mais complexas e, principalmente,

aquelas de grupos aromáticos, já que, a perda mássica na faixa (515 – 635 °C) de degradação destes compostos (YANG et al., 2010) foi pequena (1,5% conforme tabela 17). Os principais eventos térmicos e perda de massa estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 - Principais eventos térmicos das amostras de casca de mexerica e celulose

Casca de Mexerica Controle (CMC)			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 104 °C	100 – 90,9	9,1 %
1ª Decomposição	104 – 352° C	90,9 – 40,4	50,6 %
2ª Decomposição	352 – 464 °C	40,4 – 19,6	20,7 %
3ª Decomposição	464 – 512 °C	19,6 – 2,5	17,1 %
Casca de Mexerica Grupo 3 (CMG3)			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 145 °C	100 – 87,1	12,9 %
1ª Decomposição	145 – 350 ° C	87,1– 34,9	52,2 %
2ª Decomposição	350 – 515 °C	34,9 – 12,7	22,2 %
3ª Decomposição	515 – 635 °C	12,7 – 11,2	1,5 %
Celulose			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 121 ° C	100 – 94,1	5,9 %
2ª Decomposição	121 – 344 °C	94,1 – 34,4	59,7 %
3ª Decomposição	344 – 430 °C	34,4 – 9,0	25,4 %

Fonte: próprio autor

Observa-se na tabela 17 que ambas as amostras de mexerica apresentaram maior perda de massa entre 50 a 60 % na etapa 2, semelhante ao observado para graviola (degradação de hemicelulose e celulose, compostos de ligações mais simples). As curvas de CMG3 e celulose apresentam similaridades, porém, a partir da região 3, a temperatura de degradação aumenta. Assim como foi notado na amostra de caju tratado, a curva da casca da mexerica ficou deslocada para a direita. Infere-se que, a perda de grupamentos moleculares pode ter corroborado para isto, pois diferente da amostra tratada de caju, não se evidenciou resíduos de detergentes na amostra de casca de mexerica; este fato sugere que lavagem no protocolo de descelularização foi eficiente.

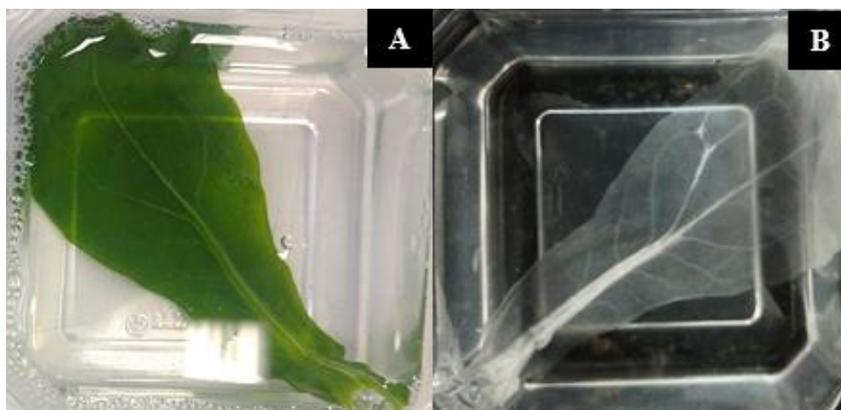
Estruturas dos vegetais

6.4 FOLHA DE BRÓCOLIS

6.4.1 Análise Sensorial

A alteração na coloração e os aspectos morfológicos identificados por meio de análise mecânica manual das amostras de folha de brócolis são apresentadas na figura 36 e na tabela 18, respectivamente.

Figura 36 - Imagens ilustrativas das amostras de folha de brócolis.



(A): Folha de brócolis controle - FBC peso da amostra *in natura*: 1,22 gramas; (B): Folha de brócolis grupo 3 - FBG3

Fonte: próprio autor.

Tabela 18 - Análise Sensorial da folha de brócolis

AMOSTRAS	ASPECTO VISUAL	MORFOLOGIA E ASPECTOS MECÂNICOS
FBC	Translúcida com coloração verde	Estrutura flexível, pouco resistente, após seca, estrutura frágil
FBG3	Translúcida e incolor	Morfologia aparentemente inalterada. Após seca, estrutura frágil

FBC - Folha de brócolis controle; FBG3 - Folha de brócolis grupo 3 - Submetida ao tratamento com: S1 (10% SDS, 0,1% Azida em PBS (0,1M)); T1 (0,1% de Triton X-100 e 10% NaClO em H₂O destilada).

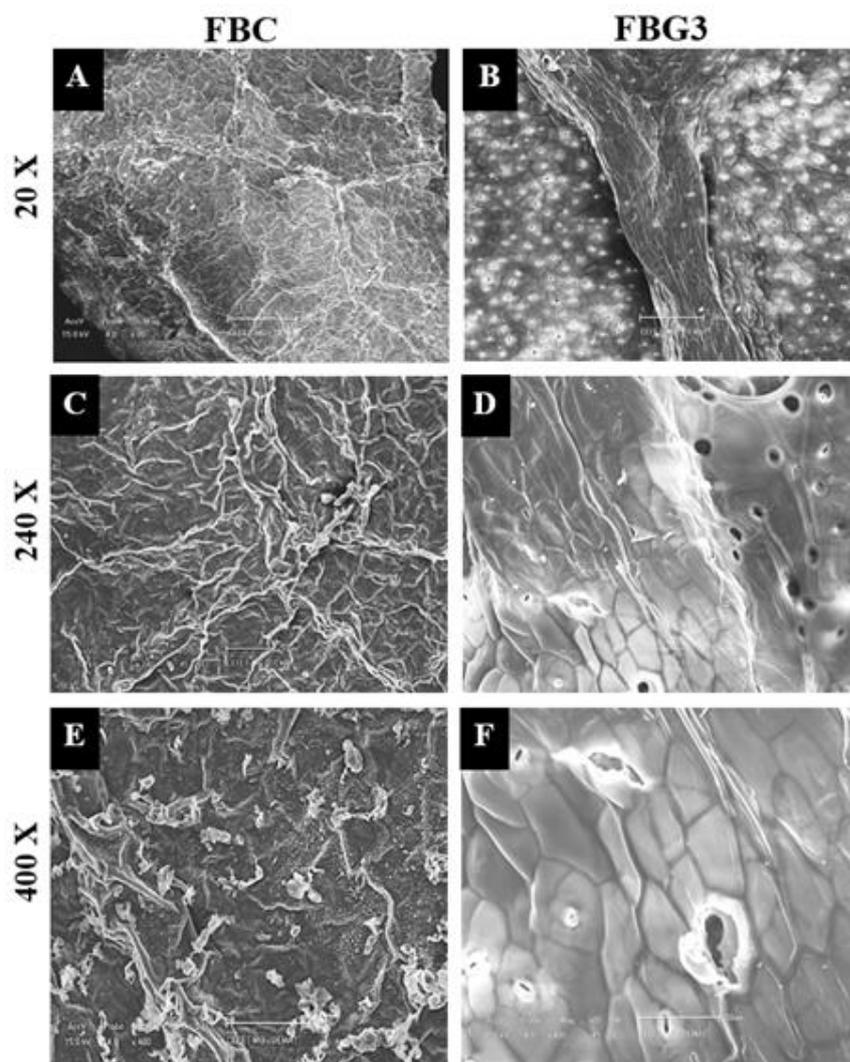
Fonte: próprio autor.

Observa-se que o tratamento químico promoveu a despigmentação completa da folha de brócolis sem alteração da arquitetura foliar macroscópica (nervuras íntegras). Em estudo de obtenção de *scaffolds* a partir de folhas de espinafre, Dikici e colaboradores (2019) enfatizam a importância da manutenção da arquitetura vascular de folhas descelularizadas e o benefício dessa estrutura para implantes de células endoteliais e neovascularização. Sugerindo-se, dessa forma, que a aplicação do material obtido tem potencial de sucesso na engenharia de tecidos.

6.4.2 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A superfície das amostras de folha de brócolis foram analisadas por MEV em diferentes ampliações (Figura 37).

Figura 37 - Micrografia das amostras de folha de brócolis



Ampliação de 20 X: (A) folha de brócolis controle - FBC; (B) folha de brócolis grupo 3 - FBG3. Ampliação de 240 X: (C) FBC; (D) FBG3. Ampliação de 400 X: (E) FBC; (F) FBG3.

Fonte: próprio autor.

Após o tratamento químico, a superfície da folha de brócolis tornou-se mais lisa, exibindo estruturas poliédricas características da arquitetura da parede celular, preservando sua topografia original (Painéis D e F, Figura 37). Observa-se ainda a presença de estômatos, pequenos orifícios distribuídos uniformemente pela superfície e que são responsáveis pelo fluxo de gases e água durante o processo de transpiração vegetal (MACHADO, 2009). De acordo com a literatura, os estômatos são estruturas

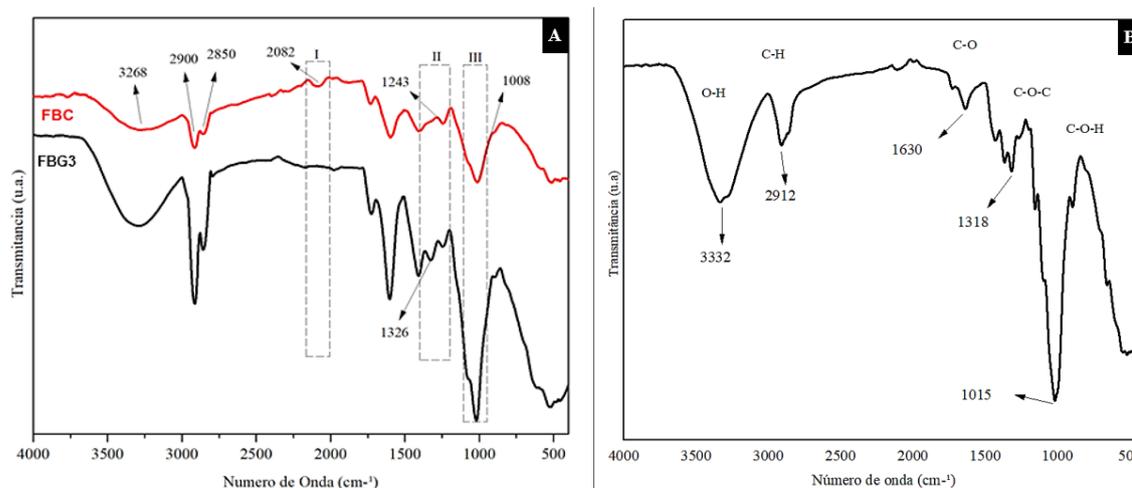
que desempenham um papel importante na engenharia de tecidos, já que podem ser regiões propícias à adesão de células (FONTANA et al., 2017b).

É importante salientar que a manutenção da arquitetura de folhas e a integridade dos vasos após o processo de descélularização é um atrativo para a utilização das folhas como *scaffolds* na engenharia de tecidos, já que as células semeadas nessas estruturas tendem a responder não somente ao meio químico, mas também a estímulos topográficos, alinhando-se com os padrões estruturais característicos das plantas (FONTANA et al., 2017a).

6.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho obtidos para as amostras de folha de brócolis estão representados na figura 38.

Figura 38 - Espectro de FTIR das amostras de folha de brócolis e celulose



Na figura, o painel A representa o espectro de FTIR de folha de brócolis controle (FBC) e folha de brócolis grupo 3 (FBG3). No painel B é exibido o espectro de FTIR da celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor.

De forma semelhante ao observado para as outras estruturas vegetais submetidas ao tratamento químico, nota-se que a estrutura lignocelulósica também se conservou na folha de brócolis. Como, por exemplo, as vibrações de distensão da ligação C=O de grupos carbonila, presente principalmente na hemicelulose, pectina e também em moléculas de nucleotídeos (pico de 1728 cm^{-1}). Ademais, conforme o esperado, o perfil

de bandas do FTIR das amostras de folha de brócolis apresenta similaridade ao perfil da celulose extraída da casca da banana. Não se constatou redução do pico que faz relação com a distensão assimétrica da ligação C-O-C, típica dos ésteres (encontrados nos principais componentes da parede celular), o qual foi notado somente nas amostras de graviola (GG1 e GG3). Este fato também confirma a manutenção desses grupamentos presentes da estrutura celulósica.

As principais regiões nas quais as alterações decorrentes do tratamento químico foram observadas estão definidas na figura 41 como regiões I, II e III e são elencadas a seguir:

- Ligações C-H alifáticas, observadas em grupos alcanos que compõem a cadeia principal de biopolímeros (pico próximo a 2900 cm^{-1}) e que podem ser atribuídas a ligações lipídeo-carboidrato (DUYGU et al., 2012);
- Na região I, semelhante à casca de mexerica, o espectro da folha de brócolis submetida ao tratamento químico, não se observa a banda de 2082 cm^{-1} , presente na amostra controle; sugerindo que os compostos com as funções alcinos, alquinos e nitrilas podem ter sido eliminados durante o tratamento;
- Na região II, observa-se a presença do pico em 1326 cm^{-1} na folha de brócolis tratada e que está ausente na amostra controle. Neste comprimento de onda ocorrem deformações de CH_3 que podem ser associadas a ligações presentes no detergente SDS ((ALONSO-SIMÓN et al., 2011; RAMIMOGHADAM et al., 2012; SALEHI et al., 2020);
- Na região III observa-se aumento da intensidade da banda localizada a 1008 cm^{-1} na folha de brócolis tratada, o que também corrobora com a presença de resíduos de SDS na amostra (MEIRA, 2018).

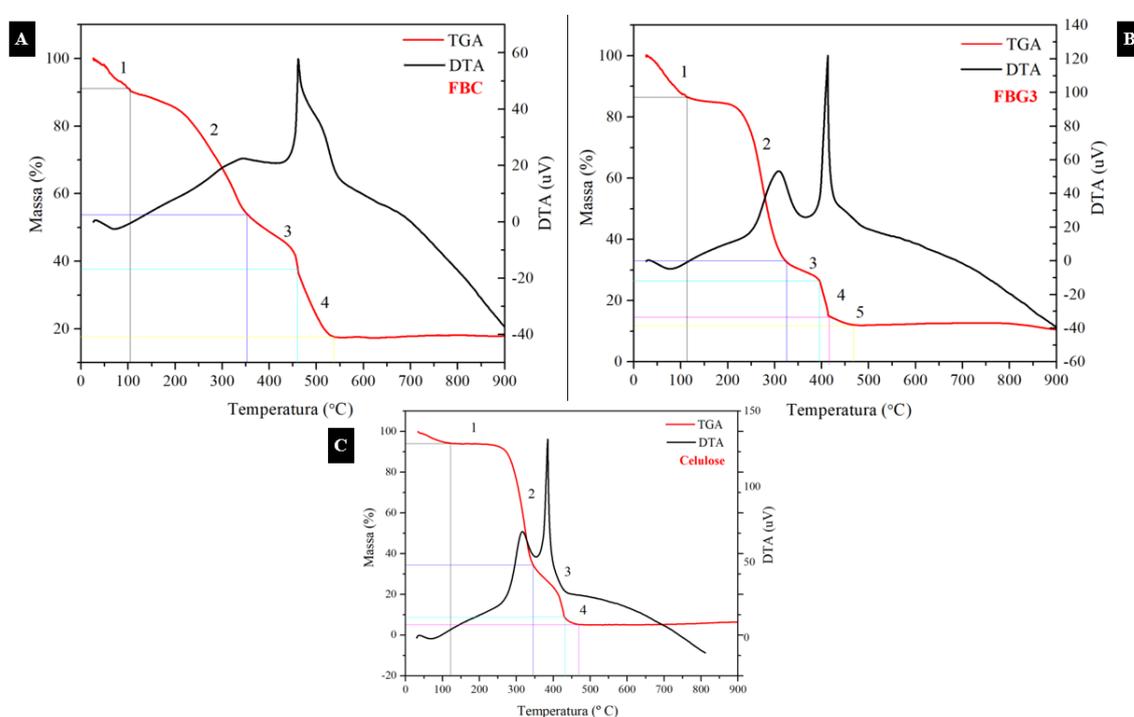
Diferente das outras amostras que apresentaram redução do pico próximo de 1360 cm^{-1} , associado a bandas de absorção de base nitrogenada, como pirimidina (citosina e timina) e purina (adenina e guanina), na amostra de folha de brócolis submetida ao tratamento com detergentes não pôde ser notado. Também não foi constatada a redução de compostos contendo ligações aromáticas conforme foi observado na casca de mexerica.

Considerando que a presença de resíduos de detergente em materiais com potencial aplicação como *scaffolds*, pode ser prejudicial às células, de forma semelhante ao observado para a amostra de caju e graviola (GG2) etapas adicionais de lavagem devem ser consideradas no protocolo de tratamento químico das folhas de brócolis.

6.4.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

O perfil termogravimétrico das amostras de Folha de Brócolis e Celulose são apresentados na Figura 39.

Figura 39 - Curvas de TGA e DTA das amostras de folha de brócolis e celulose



Eventos endo e exotérmicos representados pelas curvas TGA e DTA. O painel A - folha de brócolis controle (FBC) e folha de brócolis grupo 3 (FBG3). No painel B - celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor

As curvas termogravimétricas das amostras de folha de brócolis controle (FBC) e tratada (FBG3) são compostas por quatro e cinco eventos térmicos principais, respectivamente. FBC apresentou uma decomposição de massa mais gradativa, ao longo das temperaturas analisadas, diferente da FBG3. Na região 2 da FBG3 observa-se uma curva mais acentuada de degradação (112 - 325 °C), assim como na celulose com porcentagem de perda de massa de 53,6 %. Em relação as demais regiões observa-se

maior degradação FBG3 na temperatura representada quase que inteiramente pela região 3. Os principais eventos térmicos, bem como faixa de temperatura e perda de massa de cada região representada na figura 37 encontram-se sumarizados na tabela 19.

Tabela 19 - Principais eventos térmicos das amostras de folha de brócolis e celulose

Folha de Brócolis Controle (FBC)			
Evento	Temperatura (Δt)	Diferença de massa perdida em % (Δm)	Porcentagem de massa perdida
1ª Desidratação	25 – 104 °C	100 – 90,7	9,3 %
1ª Decomposição	104 – 352 °C	90,7 – 53,6	37,1 %
2ª Decomposição	352 – 461 °C	53,6 – 37,6	15,9 %
3ª Decomposição	461 – 538 °C	37,6 – 17,4	20,2 %
Folha de Brócolis Grupo 3 (FBG3)			
Evento	Temperatura (Δt)	Diferença de massa perdida em % (Δm)	Porcentagem de massa perdida
1ª Desidratação	25 – 112 °C	100 – 86,3	13,7 %
1ª Decomposição	112 – 325 °C	86,3 – 32,7	53,6 %
2ª Decomposição	325 – 395 °C	32,7 – 26,3	6,3 %
3ª Decomposição	495 – 415 °C	26,3 – 14,5	11,8 %
4ª Decomposição	415 – 469 °C	14,5 – 12,0	2,5 %
Celulose			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de massa perdida em % (Δm)	Porcentagem de massa perdida
1ª Desidratação	25 – 121 °C	100 – 94,1	5,9 %
1ª Decomposição	121 – 344 °C	94,1 – 34,4	59,7 %
2ª Decomposição	344 – 430 °C	34,4 – 9,0	25,4 %

Fonte: próprio autor

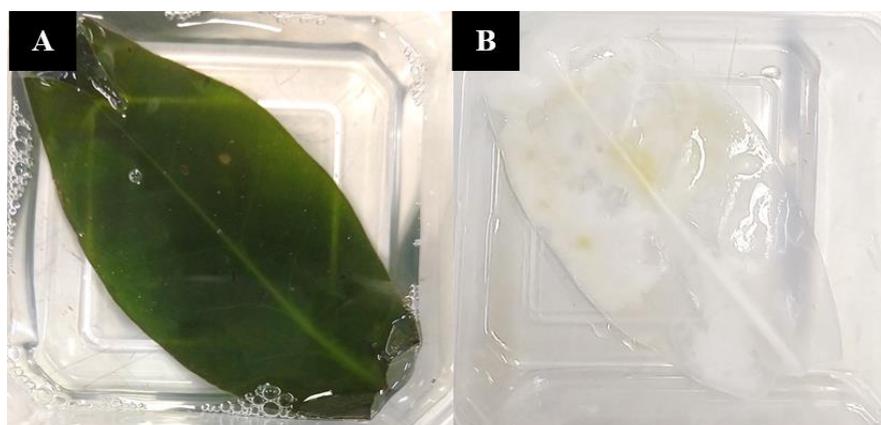
A análise termogravimétrica da folha de brócolis pode ser correlacionada aos resultados obtidos no FTIR, pois, nota-se redução de moléculas mais simples como lipídeos e ácidos nucleicos, manutenção da estrutura lignocelulósica após o tratamento químico, porém ainda observa resíduos dos detergentes utilizados, constatando que também para esta amostra, a lavagem foi ineficiente.

6.5 FOLHAS DE ORA-PRO-NOBIS

6.5.1 *Análise Sensorial*

A alteração na coloração e os aspectos morfológicos identificados por meio de análise mecânica manual das amostras de folha de ora-pro-nobis são apresentadas na figura 40 e na tabela 20, respectivamente.

Figura 40 - Imagens ilustrativas das amostras de folha de ora-pro-nobis.



(A): Folha de ora-pro-nobis – OPC - peso da amostra *in natura*: 1,12 gramas; (B): Folha de ora-pro-nobis grupo 3 - OPNG3

Fonte: próprio autor.

Tabela 20 - Análise Sensorial da folha de ora-pro-nobis

AMOSTRAS	ASPECTO VISUAL	MORFOLOGIA E ASPECTOS MECÂNICOS
OPNC	Translúcida, com coloração verde	Estrutura flexível, pouco resistente. Após seco, estrutura frágil
OPNG3	Translúcida, com regiões brancas, incolores e amareladas	Morfologia aparentemente conservada. Após seco, estrutura frágil

OPNC - Folha de ora-pro-nobis Controle; OPNG3 - Folha de ora-pro-nobis grupo 3 - Submetida ao tratamento com: S1 (10% SDS, 0,1% Azida em PBS (0,1M)); T1 (0,1% de Triton X-100 e 10% NaClO em H₂O destilada).

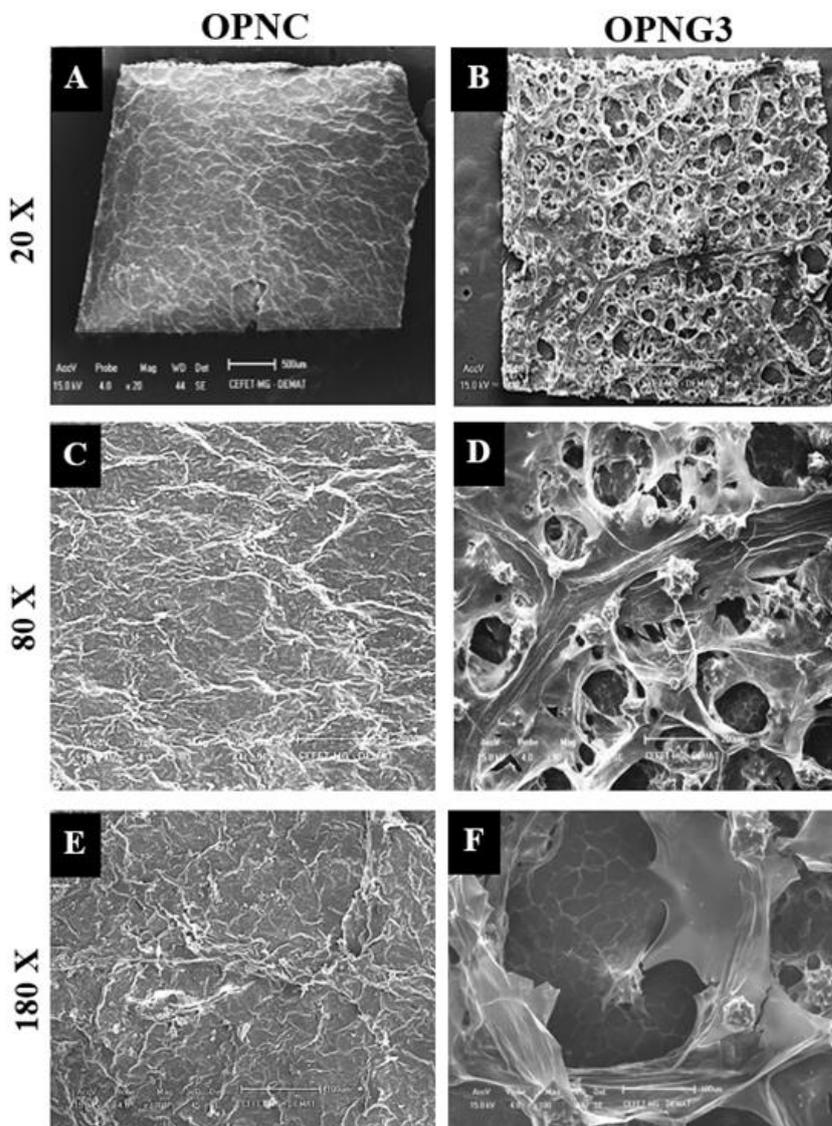
Fonte: próprio autor.

O tratamento químico promoveu a despigmentação da folha de ora-pro-nobis e, semelhante à folha de brócolis, não se observou alteração da arquitetura foliar, macroscopicamente.

6.5.2 *Microscopia Eletronica de Varredura (MEV)*

A superfície das amostras de folha de ora-pro-nobis foram analisadas por MEV em diferentes ampliações (Figura 41).

Figura 41 - Micrografia das amostras de folha de ora-pro-nobis



Ampliação de 20 X: (A) folha de ora-pro-nobis controle - OPNC; (B) folha de ora-pro-nobis grupo 3 - OPNG3. Ampliação de 80 X: (C) OPNC; (D) OPNG3. Ampliação de 180 X: (E) OPNC; (F) OPNG3.

Fonte: próprio autor.

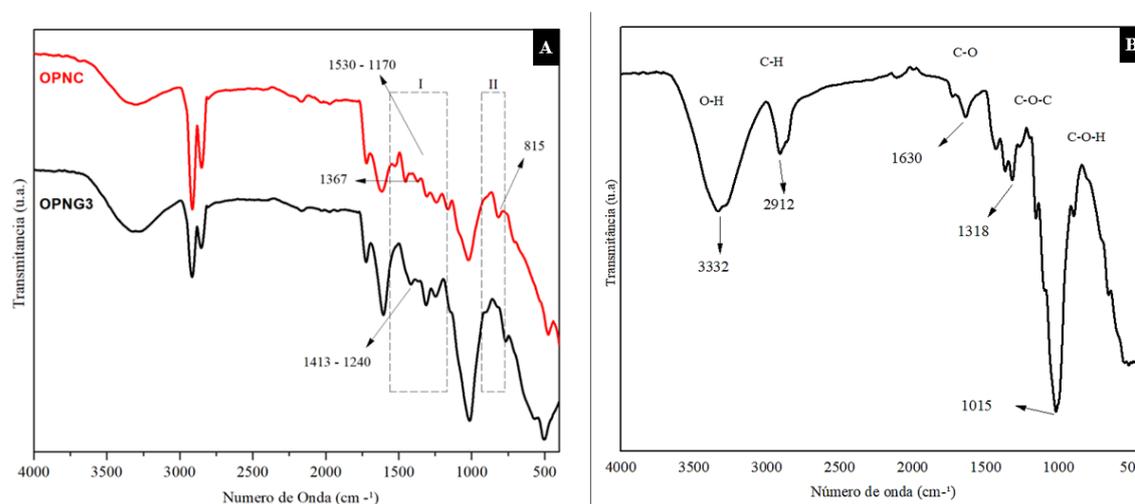
A superfície rugosa e irregular da folha de ora-pro-nobis controle pode ser observada nos painéis A, C e E da figura 41. Após o tratamento químico, as folhas apresentaram superfície porosa, com a presença de canalículos semelhantes a uma rede vascular (Painel D). Resultados similares foram relatados por Mondulevsky et al (2014) e Contessi Negrini et. al (2020) ao descelularizarem tecidos vegetais.

No painel D e F observa-se uma estrutura membranosa revestindo alguns poros da folha de ora-pro-nobis que possivelmente se deve aos resíduos cerosos (cutícula) da folha, a qual foi removida parcialmente pelo processo químico. Artefatos em formatos hexaedros irregulares também podem ser visualizados na imagem de maior ampliação (painel F), sugerindo resíduos impregnados no tecido.

6.5.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho obtidos para as amostras de folha de ora-pro-nobis e celulose estão representados na figura 42.

Figura 42 - Espectro de FTIR das amostras de folha de ora-pro-nobis e celulose



Na figura, o painel A representa o espectro de FTIR de folha de ora-Pro-nóbis controle (OPNC) e folha de ora-pro-nobis grupo 3 (OPNG3). No painel B é exibido o espectro de FTIR da celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor.

As bandas presentes na região de 1500 a 1000 cm⁻¹, constituem padrão de vibrações característicos da molécula de celulose (MOHAMED et al., 2017) e podem ser observadas na folha de ora-pro-nobis controle e na folha submetida ao tratamento químico. Além disso, as vibrações de distensão da ligação C=O de grupos carbonila (pico de 1730 cm⁻¹) presentes na hemicelulose e pectina também estão presentes nas duas amostras. Esses resultados sugerem que a estrutura lignocelulósica foi mantida após o tratamento com detergentes.

As principais regiões nas quais foram observadas alterações, estão exibidas na figura 42 como regiões I e II:

- A ausência do pico em 1367 cm^{-1} (região I) na folha tratada pode indicar uma redução nas ligações associadas às bases nitrogenadas dos nucleotídeos (BANYAY et al., 2003; GOMES RIOS et al., 2021);
- A ausência do pico em 815 cm^{-1} (região II) na folha tratada pode indicar a redução de vibrações de flexão fora do plano C-C-H e ligações de C-C, C-O de aldeídos presentes na desoxirribose e nos complexos lignocelulósicos (KUMAR; PRASAD, 2011) e/ou deformação de C-H aromático fora do plano presentes na lignina (RODRIGUES et al., 2020).
- Observa-se também aumento da intensidade da banda localizada em aproximadamente 1000 cm^{-1} na amostra tratada, o que corrobora com a presença de resíduos de SDS na amostra (MEIRA, 2018) e evidencia os pontos esbranquiçados notados na análise visual.

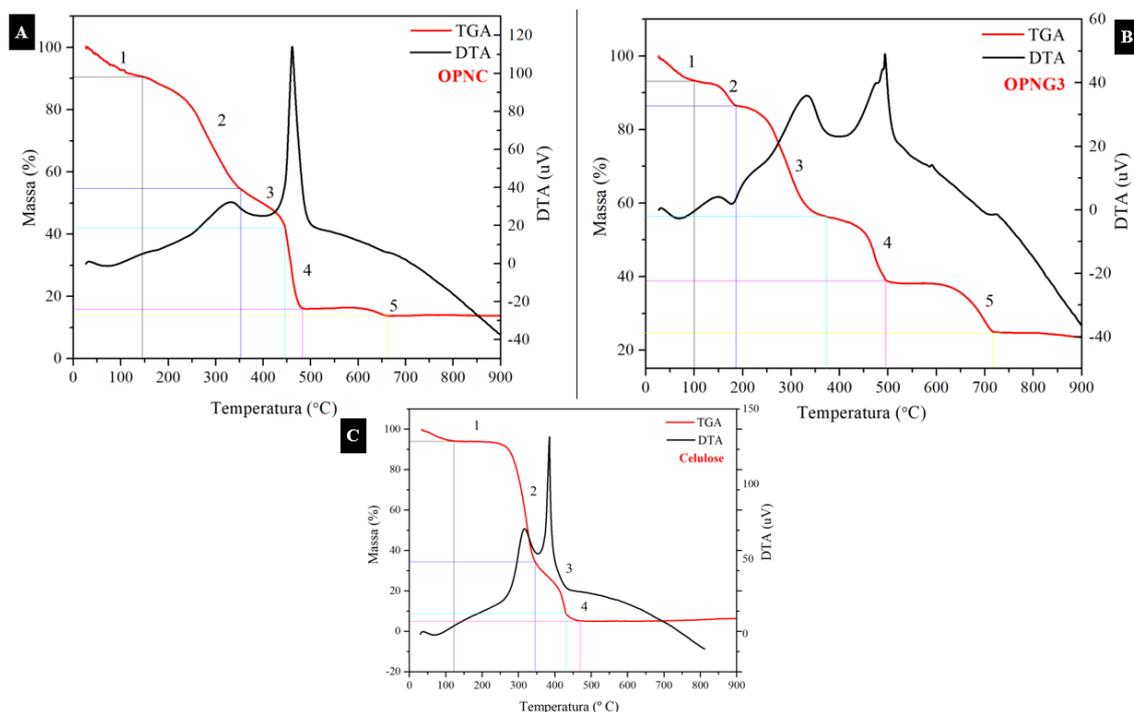
Dessa forma, artefatos observados na análise visual e MEV podem ser confrontados pelo FTIR, como por exemplo, a hipótese de resíduos de substâncias (estruturas em formato hexaédricos) na superfície da amostra pós tratada. Possivelmente pode se tratar de componentes do SDS cristalizados na estrutura. A fina lâmina que encobre a superfície da folha de OPNG3 pode ser de uma das substâncias que compõem a parede celular, já que não se observou redução de ligações lipídeos-carboidratados, grupos carbonila, grupos C-O-C associados à ésteres e compostos contendo ligações aromáticas, todos associados à estrutura lignocelulósica remanescente.

Sabe-se que a remoção de ceras em um processo de descellularização é muito importante, pois, estes resíduos de caráter hidrofóbico, podem interferir no processo de adesão das células posteriormente semeadas ((FONTANA et al., 2017a; JAMES et al., 2020; LIU; LUO; ZHENG, 2018; RYAN, [s.d.]). Ressalta-se ainda que, assim como na graviola (GG2), caju e folha de brócolis, é necessário a adaptação do protocolo de tratamento químico a fim de garantir a eliminação da cutícula e os resíduos de detergente.

6.5.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

O perfil termogravimétrico das amostras de Folha de Ora-Pro-Nobis e Celulose são apresentados na Figura 43.

Figura 43 - Curvas de TGA e DTA das amostras de folha de ora-pro-nobis e celulose



Eventos endo e exotérmicos representados pelas curvas TGA e DTA. O painel A - Folha de Ora-pro-Nobis Controle (OPNC) e Folha de Ora-pro-Nobis Grupo 3 (OPNG3). No painel B - celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor

As curvas termogravimétricas da folha de ora-pro-nobis controle e tratada são compostas por cinco eventos térmicos principais, sendo que na primeira etapa ocorre a desidratação das amostras e, em seguida, eventos de degradação. Os principais eventos térmicos encontram-se sumarizados na tabela 21.

Tabela 21 - Principais eventos térmicos das amostras de folha de ora-pro-nobis e celulose

Ora-pro-Nobis Controle (OPNC)			
Evento	Temperatura (Δt)	Diferença de massa perdida em % (Δm)	Porcentagem de massa perdida
1ª Desidratação	25 – 144 °C	100 – 90,5	9,5 %
1ª Decomposição	144 – 353 °C	90,5 – 54,5	36,0 %
2ª Decomposição	353 – 445 °C	54,5 – 41,8	12,7 %
3ª Decomposição	445 – 483 °C	41,8 – 15,9	25,9 %
4ª Decomposição	483 – 660 °C	15,9 – 13,7	2,2 %
Ora-pro-Nobis Grupo 3 (OPNG3)			
Evento	Temperatura (Δt)	Diferença de massa perdida em % (Δm)	Porcentagem de massa perdida
1ª Desidratação	25 – 100 °C	100 – 93,1	6,7 %
1ª Decomposição	100 – 185 °C	93,1 – 86,2	6,9 %
2ª Decomposição	185 – 373 °C	86,2 – 56,1	30,1 %
3ª Decomposição	373 – 495 °C	56,1 – 38,6	17,4 %
4ª Decomposição	495 – 716 °C	38,6 – 24,9	13,8 %
Celulose			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de massa perdida em % (Δm)	Porcentagem de massa perdida
1ª Desidratação	25 – 121 °C	100 – 94,1	5,9 %
2ª Decomposição	121 – 344 °C	94,1 – 34,4	59,7 %
3ª Decomposição	344 – 430 °C	34,4 – 9,0	25,4 %

Fonte: próprio autor.

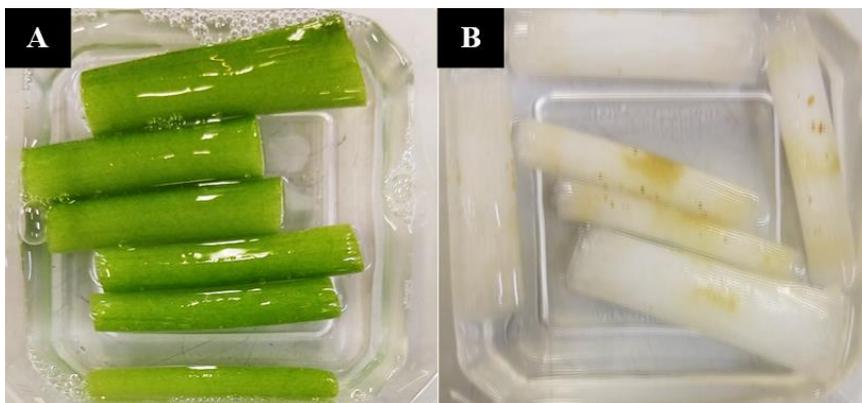
A amostra tratada (OPNG3) apresentou maior perda de massa de 47,5% a partir de 185 °C, etapas de 3 e 4, este perfil sugere a decomposição de moléculas orgânicas menores, seguidas de compostos lignocelulósicos mais complexos observado na etapa 5. Segundo Ramimoghdam et. al., (2012), a degradação do SDS ocorre entre 160 e 380 °C, existindo a possibilidade de degradação parcial do surfactante quando em combinação com outro composto. Desta forma, o pico da região 3 observado na curva de DTA de OPNG3 pode ser associado, ainda que parcialmente, à presença de resíduos de detergente oriundos do processo de tratamento químico, corroborada pelos resultados obtidos nos ensaios de MEV e FTIR. Destaca-se ainda que, devido a essa mudança na curva termogravimétrica da folha não é possível estabelecer comparações com a termogravimetria da celulose.

6.6 TALOS DE TAIOBA

6.6.1 *Análise Sensorial*

A alteração na coloração e os aspectos morfológicos identificados por meio de análise mecânica manual das amostras de talo de taioba são apresentadas na figura 44 e na tabela 22 respectivamente.

Figura 44 - Imagens ilustrativas das amostras de talo de taioba



(A): Talo de taioba controle – TTC - peso total das amostras *in natura*: 10,73 gramas; (B): Talo de taioba grupo 3 - TTG3

Fonte: próprio autor.

Tabela 22 - Análise Sensorial do talo de taioba

AMOSTRAS	ASPECTO VISUAL	MORFOLOGIA E ASPECTOS MECÂNICOS
TTC	Opacos, com coloração verde	Estrutura flexível e resistente. Após seco, estrutura frágil e dura
TTG3	Bordas Translúcidas, incolores, o restante da amostra com coloração branca e algumas áreas com pontos amarelados	Morfologia aparentemente conservada. Após seco, estrutura frágil e dura

Talo de taioba controle – TTC; talo de taioba grupo 3 - TTG3 - Submetido ao tratamento com: S1 (10% SDS, 0,1% Azida em PBS (0,1M)); T1 (0,1% de Triton X-100 e 10% NaClO em H₂O destilada).

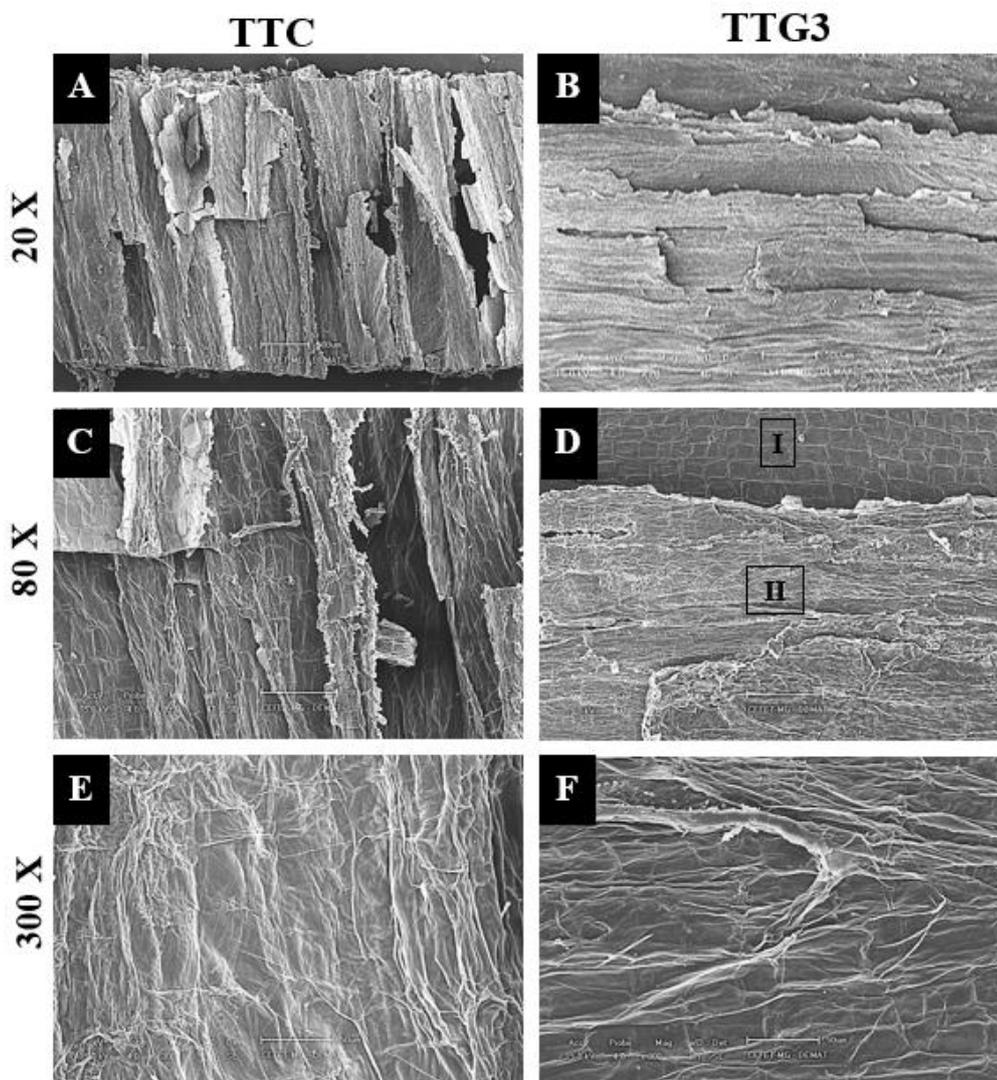
Fonte: próprio autor.

Observa-se a despigmentação parcial do talo de taioba após o tratamento químico e aparente conservação da sua morfologia.

6.6.2 *Microscopia Eletronica de Varredura (MEV)*

As micrografias com diferentes ampliações das amostras de talo de taioba controle e submetida ao tratamento químico são apresentadas nas figuras 45 e 46, em corte longitudinal e transversal, respectivamente.

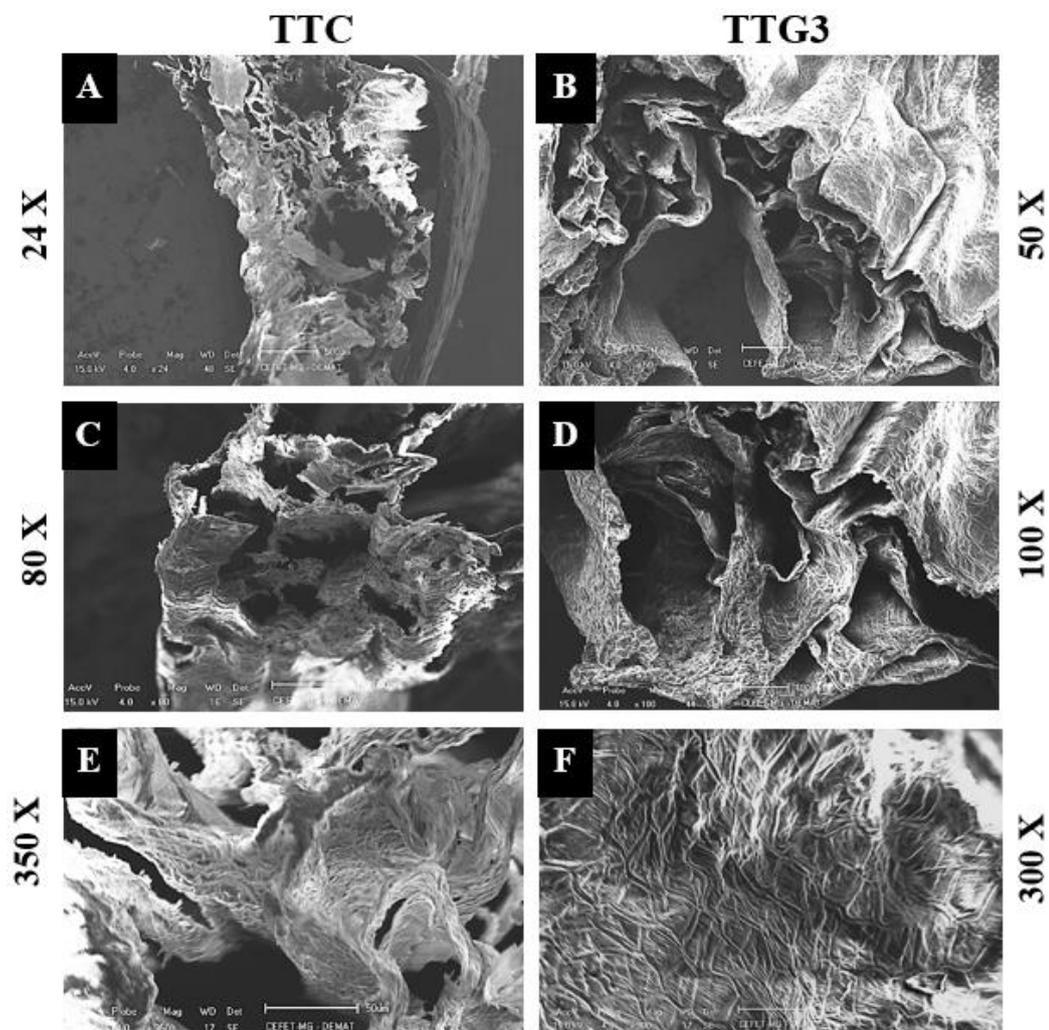
Figura 45 - Micrografia das amostras de talo de taioba em corte longitudinal



Ampliação de 20 X: (A) talo de taioba controle - TTC; (B) talo de taioba grupo 3 - TTG3. Ampliação de 80 X: (C) TTC; (D) TTG3. Ampliação de 300 X: (E) TTC; (F) TTG3. O talo de taioba sem tratamento exibe morfologia constituída por camadas sobrepostas, de aspecto duro e frágil, pois sofreu fraturas após a desidratação, conforme pode ser observado nos painéis A e C. Já no painel E, é possível observar uma rede de fibras orientadas que circundam canais mais finos.

Fonte: próprio autor.

Figura 46 - Micrografia das amostras de talo de taioba em corte transversal



(A) talo de taioba controle - TTC, com ampliação de 24 X; (B) talo de taioba Grupo 3 - TTG3, com ampliação de 50X; (C) TTC, com com ampliação de 80 X; (D) TTG3 com ampliação de 100 X; (E) TTC com ampliação de 350 X; (F) TTG3, com com ampliação de 300 X. Conforme observa-se no painel A, há a presença de inúmeras camadas de célula formando o talo, na amostra controle.

Fonte: próprio autor.

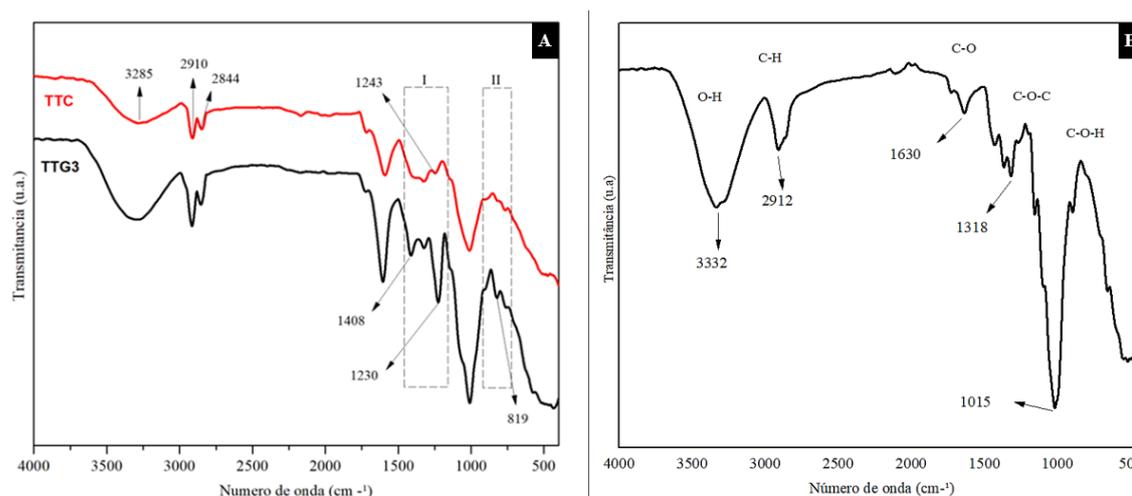
Após o tratamento químico, a morfologia do talo de taioba em corte longitudinal não sofreu grandes alterações, exibindo camadas sobrepostas e fraturas (Painéis B, D e F da figura 45). Destaca-se duas regiões distintas no painel D da referida figura, sendo que a região I apresenta uma superfície com estruturas poliédricas bem definidas, semelhante à parede celular das células vegetais e a região II apresenta uma camada

rugosa com relevos e fraturas, que sugere uma área em que a cutícula foi preservada. Além disso, no painel F da figura 46 observa-se uma rede de fibras orientadas. Salienta-se ainda que a morfologia dos talos de taioba e arquitetura após o tratamento químico assemelha-se aos resultados obtidos por Fontana et. al., (2017) para os caules de salsa e baunilha descelularizados que, em estudos biológicos, observaram a colonização e expansão de células humanas ao longo das fibras, fenômeno chamado de orientação de contato.

6.6.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho obtidos para a amostra de talo de taioba estão representados na Figura 47.

Figura 47 - Espectro de FTIR das amostras de talo de taioba e celulose



Na figura, o painel A representa o espectro de FTIR de talo de taioba controle (TTC) e talo de taioba grupo 3 (TTG3). No painel B é exibido o espectro de FTIR da celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor.

As curvas obtidas para o talo de taioba são bem semelhantes à curva da celulose. A presença de bandas na amostra controle e tratada na região de 1500 a 1000 cm^{-1} , que constituem padrão de vibrações característicos da molécula de celulose (MOHAMED et al., 2017) e as vibrações de distensão da ligação C=O de grupos carbonila em 1730 cm^{-1} (presentes na hemicelulose e pectina), C – O – C, associados à ésteres, sugerem que a estrutura ligninocelulósica dos talos de taioba foi preservada após o tratamento químico.

As principais regiões nas quais foram observadas alterações, estão destacadas na figura 45 como regiões I e II:

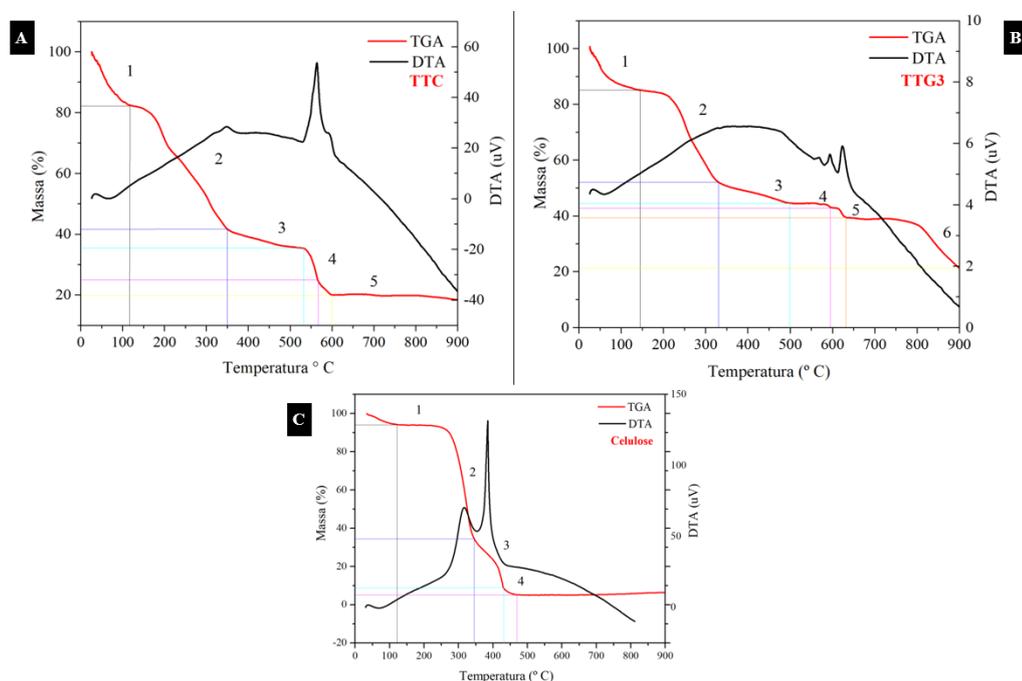
- A banda em 1408 cm^{-1} (região I) é observada somente no talo de taioba tratado, e pode indicar a presença de compostos fenólicos (ALONSO-SIMÓN et al., 2011).
- Pico maior e acentuado na amostra tratada, em 1230 cm^{-1} , diz respeito a distensão assimétrica da ligação C-O-C típica dos ésteres (ALONSO-SIMÓN et al., 2011) região I destacada no gráfico;
- A banda em 819 cm^{-1} (região II) indica vibrações de flexão fora do plano C-C-H e ligações de C-C, C-O de aldeídos presentes na desoxirribose e nos complexos lignocelulósicos (KUMAR; PRASAD, 2011).

A presença de compostos fenólicos e picos mais acentuados e maiores na amostra tratada pode sugerir resquícios de reagentes. Diferentemente das outras estruturas vegetais analisadas neste trabalho, não há grandes evidências nas análises de FTIR que possam sugerir uma redução dos ácidos nucleicos da amostra submetida ao tratamento químico, uma vez que a banda em 819 cm^{-1} pode ser atribuída a aldeídos presentes na desoxirribose, mas também a complexos lignocelulósicos.

6.6.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

O perfil termogravimétrico das amostras de Talo de Taioba e Celulose são apresentados na Figura 48.

Figura 48 - Curvas de TGA e DTA das amostras de talo de taioba e celulose



Eventos endo e exotérmicos representados pelas curvas TGA e DTA. O painel A - talo de taioba controle (TTC) e talo de taioba grupo 3 (TTG3). No painel B - celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor

As curvas termogravimétricas do talo de taioba controle e tratado são compostas por cinco e seis eventos térmicos principais, respectivamente. Diferente das outras amostras do trabalho, a curva do talo de taioba tratado não apresenta semelhanças com a curva da celulose. Pelo contrário, nota-se 6 etapas de degradação, com variações pequenas de massa a partir do primeiro evento de degradação. A curva DTA também difere das amostra de celulose, bem como da amostra controle (a partir da etapa 2). O largo pico da curva DTA indica que houve volatilização de substâncias numa faixa maior de temperatura em ambas as amostras. O pico exotérmico mais acentuado da curva DTA na amostra controle (etapa 3), em comparação com os picos exotérmicos da amostra tratada (etapas 3, 4 e 5) indicam que, houve completa oxidação dos compostos hemicelulósicos na amostra controle (RAMIAH, 1970), e infere-se gradativa oxidação na amostra tratada. Talvez seja por conter menor quantidade desses compostos na amostra tratada. De qualquer forma, infere-se que, a ausência ou presença de algum grupamento químico pode ter ocasionado este fato, já que, pelo FTIR temos indícios de resquícios de reagentes na amostra tratada. Os principais eventos térmicos, bem como

faixa de temperatura e perda de massa de cada região representada na figura 46 encontram-se sumarizados na tabela 23.

Tabela 23 - Principais eventos térmicos das amostras de talo de taioba e celulose

Talo de Taioba Controle (TTC)			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 114 °C	100 – 82,5	17,4 %
1ª Decomposição	114 – 350 °C	82,5 – 41,8	40,7 %
2ª Decomposição	350 – 530 °C	41,8 – 35,6	6,2 %
3ª Decomposição	530 – 565 °C	35,6 – 24,7	10,9 %
4ª Decomposição	565 – 600 °C	24,7 – 20,1	4,6 %
Talo de Taioba Grupo 3 (TTG3)			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 143 °C	100 – 85,2	14,8 %
1ª Decomposição	143 – 330 °C	85,2 – 52,0	33,2 %
2ª Decomposição	330 – 500 °C	52,0 – 44,8	7,2 %
3ª Decomposição	500 – 595 °C	44,8 – 42,5	2,3 %
4ª Decomposição	595 – 631 °C	42,5 – 39,3	3,2 %
5ª Decomposição	631 – 900 °C	39,3 – 21,2	18,1 %
Celulose			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de perda de massa (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 121 °C	100 – 94,1	5,9 %
1ª Decomposição	121 – 344 °C	94,1 – 34,4	59,7 %
2ª Decomposição	344 – 430 °C	34,4 – 9,0	25,4 %

Fonte: próprio autor.

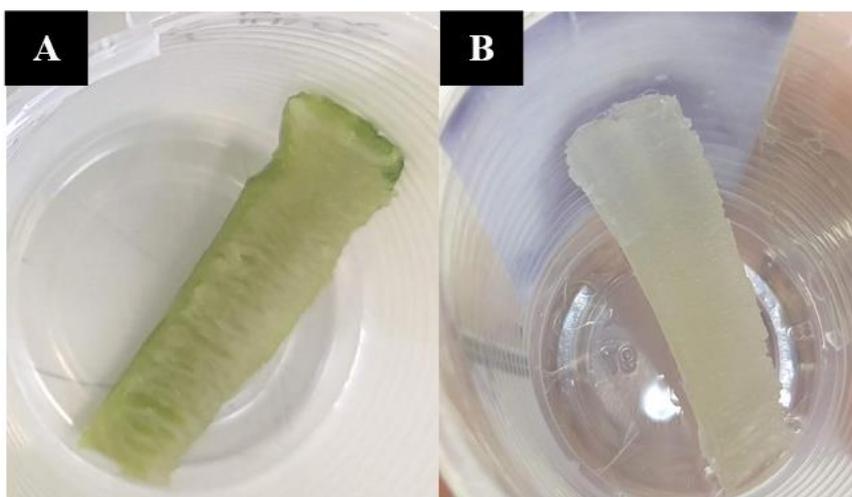
A maior porcentagem de perda de massa (33,2%) na amostra submetida ao tratamento químico ocorre na região 2 ao longo de uma faixa extensa de temperatura (143 a 330 °C). Além disso, observa-se uma redução no percentual de decomposição de massa na amostra de talo de taioba tratada ao longo das etapas de 2 a 6, em comparação com a amostra controle, sugerindo que o tratamento químico aumentou a resistência térmica da estrutura. As temperaturas de degradação da TTC e TBG3 são semelhantes até a etapa 5, porém TBG3 apresenta etapa 6 de degradação, com uma perda de 18,1% de massa, esse perfil sugere-se combustão de reagentes presentes no processo de deseclularização. Dessa forma, após o processo químico ainda, a amostra tratada ainda apresenta resíduos de detergente, consequência do processo de lavagem ineficaz.

6.7 TALOS DE BRÓCOLIS

6.7.1 Análise Sensorial

A alteração na coloração e os aspectos morfológicos identificados por meio de análise mecânica manual das amostras de talo de brócolis são apresentadas na figura 49 e na tabela 24, respectivamente.

Figura 49 - Imagens ilustrativas das amostras de talo de brócolis



(A): Talo de brócolis – TBC - peso da amostra *in natura*: 0,91 gramas (B): Talo de brócolis grupo 3 - TBG3

Fonte: próprio autor.

Tabela 24 - Análise Sensorial do talo de brócolis

AMOSTRAS	ASPECTO VISUAL	MORFOLOGIA E ASPECTOS MECÂNICOS
TBC	Translúcido, com coloração verde	Estrutura flexível, resistente. Após seco, estrutura frágil
TBG3	Translúcido e incolor	Morfologia aparentemente conservada. Após seco, estrutura frágil

TBC - Talo de Brócolis Controle; TBG3 - Talo de Brócolis Grupo 3 - Submetido ao tratamento com: S1 (10% SDS, 0,1% Azida em PBS (0,1M)); T1 (0,1% de Triton X-100 e 10% NaClO em H₂O destilada).

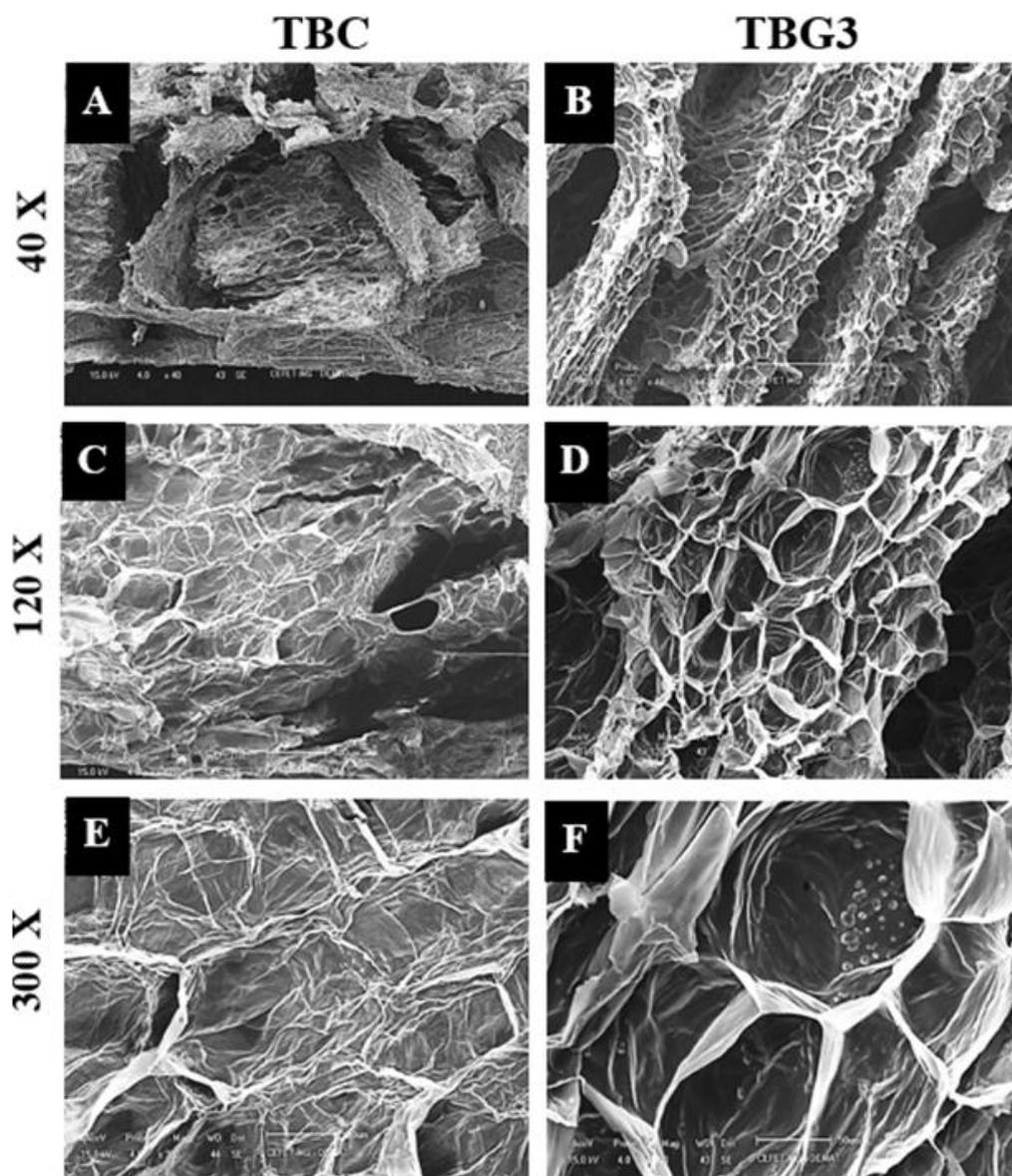
Fonte: próprio autor.

Observa-se a despigmentação completa do talo de brócolis após o tratamento químico e aparente conservação da sua morfologia externa. É importante destacar que, a partir de uma análise visual sem o auxílio de equipamentos, a estrutura mostrou-se porosa.

6.7.2 *Microscopia Elettronica de Varredura (MEV)*

As imagens de MEV obtidas para as amostras de talo de brócolis controle e submetido ao tratamento químico, cortados transversalmente, são mostrados na figura 50, com diferentes magnificações.

Figura 50 - Micrografia das amostras de talo de brócolis



Ampliação de 40 X: (A) Talo de Brócolis Controle - TBC; (B) Talo de Brócolis Grupo 3 - TBG3. Ampliação de 120 X: (C) TBC; (D) TBG3. Ampliação de 300 X: (E) TBC; (F) TBG3. Em todos os painéis observa-se porosidade, porém, após o tratamento químico, os poros do talo de brócolis mostram-se mais evidentes (painéis B, D e F).

Fonte: próprio autor.

A partir da análise da micrografia do talo de brócolis pode-se observar uma estrutura porosa formada por uma rede de fibras interligadas e inseridas em uma fase contínua (Painéis C e E da figura 50). Conforme nota-se nos painéis D e F da referida

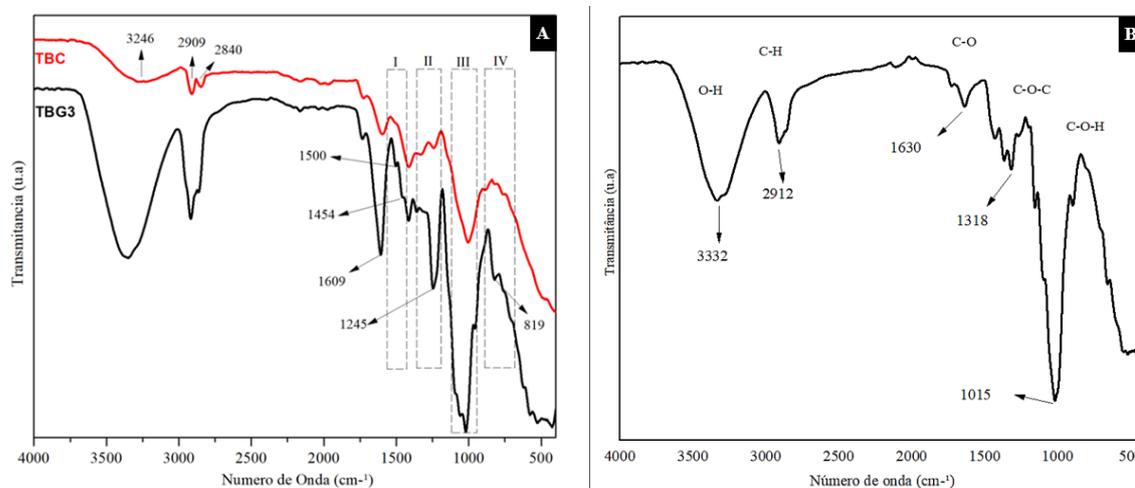
figura, aparentemente, o tratamento químico evidenciou ainda mais a porosidade da amostra.

Os talos de brócolis apresentam uma estrutura bastante porosa, similar à estrutura descrita no trabalho de Mondulevsky e colaboradores (2014). Neste trabalho, foi verificado que a porosidade da matriz descelularizada da maçã favoreceu a transferência de nutrientes para o meio de cultura, permitindo a viabilidade celular a longo prazo. Além disso, os *scaffolds* naturais apresentaram um efeito pró-angiogênico, propiciando o crescimento de vasos sanguíneos funcionais em todo o biomaterial implantado (MODULEVSKY et al., 2014b).

6.7.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho obtidos para a amostra de Talo de Brócolis e Celulose estão representados na Figura 51.

Figura 51 - Espectro de FTIR das amostras de talo de brócolis



Na figura, o painel A representa o espectro de FTIR de talo de brócolis controle (TBC) e talo de brócolis grupo 3 (TBG3). No painel B é exibido o espectro de FTIR da celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor.

Observa-se bastante similaridade entre as curvas de talo de brócolis e celulose, e assim como observado nas análises de FTIR do talo de taioba, a presença de bandas no talo de brócolis controle e tratado na região de 1500 a 1000 cm^{-1} , (vibrações

características da molécula de celulose) sugerem que a estrutura lignocelulósica dos talos de brócolis foi preservada após o tratamento químico.

As principais regiões nas quais as alterações foram observadas estão exibidas na Figura 49 e definidas como regiões I, II, III e IV:

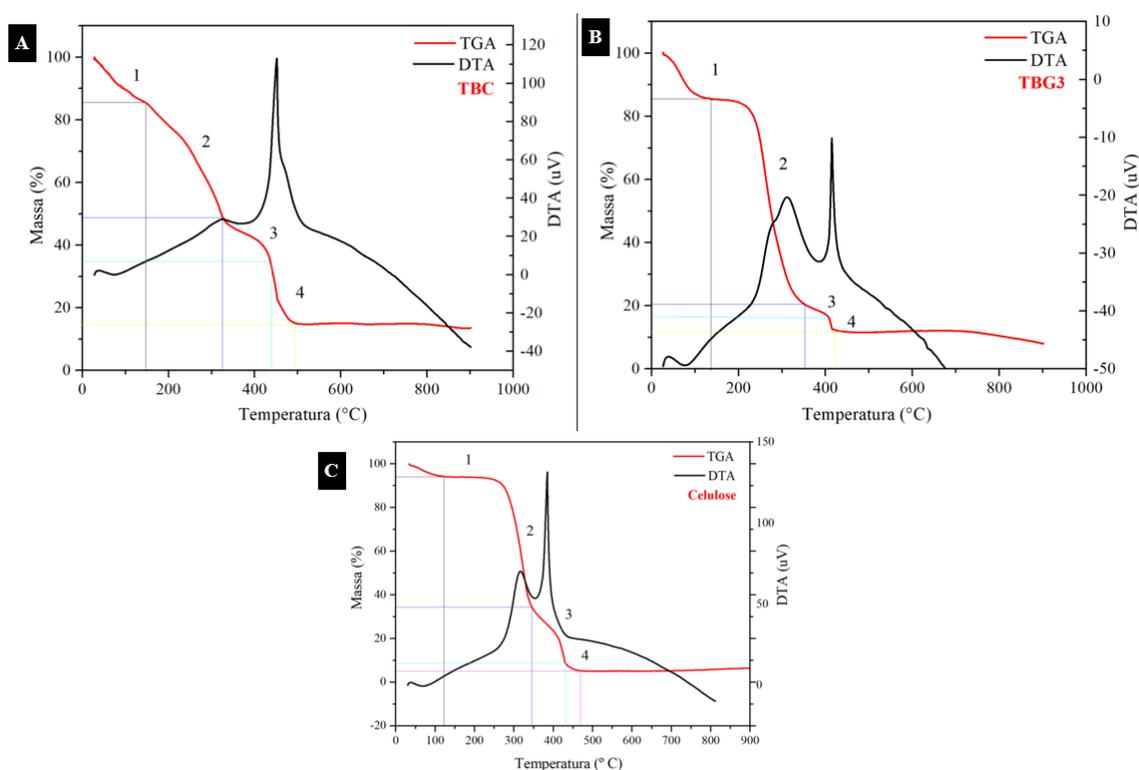
- Aumento do pico que diz respeito a ligações C-H alifáticas, observadas em grupos alcanos que compõem a cadeia principal de biopolímeros (banda próxima a 2909 cm^{-1}) e que podem ser atribuídas a ligações lipídeo-carboidrato (DUYGU et al., 2012);
- Banda em 1609 cm^{-1} , de maior intensidade no talo de brócolis tratado que pode estar associada a ligações de anel fenólico, indício de resíduos de Triton X-100 (ALONSO-SIMÓN et al., 2011);
- Picos extras na amostra tratada em 1500 e 1454 cm^{-1} que dizem respeito a vibração de flexão CH no plano de anel fenil e vibração de flexão CH_3 (lipídios e proteínas) (KUMAR; PRASAD, 2011);
- Aumento do pico em 1245 cm^{-1} (região II destacada no gráfico), que se relaciona a distensão assimétrica da ligação C-O-C, típica dos ésteres (pico de 1234 cm^{-1} - região II destacada no gráfico);
- Aumento da intensidade do pico em 1019 cm^{-1} na amostra submetida ao tratamento químico (região III) que pode também estar relacionado ao uso de SDS, uma vez que o perfil se associa à presença da ligação S-O-C, característica deste composto (MEIRA, 2018);
- Aumento no pico em 819 cm^{-1} (região IV destacada no gráfico) associado a vibrações de flexão fora do plano C-C-H e ligações de C-C, C-O (KUMAR; PRASAD, 2011) e nos complexos lignocelulósicos (KUMAR; PRASAD, 2011).

O teste de caracterização revelou resquícios de reagentes na amostra tratada através de picos extras (1500 , 1454 cm^{-1}) e mais intensos (2909 , 1609 , 1245 e 819 cm^{-1}) que retratam grupos químicos presentes do Triton X-100 e SDS. Etapas adicionais de lavagem também devem ser inseridas no protocolo de tratamento químico do talo de brócolis. Assim como no talo de taioba, não há grandes evidências nas análises de FTIR que possam sugerir uma redução dos ácidos nucleicos da amostra submetida ao tratamento químico, uma vez que a banda em 819 cm^{-1} pode ser atribuída a aldeídos presentes na desoxirribose, mas também a complexos lignocelulósicos.

6.7.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

O perfil termogravimétrico das amostras de talo de brócolis e celulose são apresentados na Figura 52.

Figura 52 - Curvas de TGA e DTA das amostras de talo de brócolis e celulose



Eventos endo e exotérmicos representados pelas curvas TGA e DTA. O painel A - talo de brócolis controle (TBC) e talo de brócolis grupo 3 (TBG3). No painel B - celulose extraída da casca de banana.

Fonte: próprio autor

As curvas termogravimétricas do talo de brócolis controle e tratado são compostas por quatro eventos térmicos principais. Como nas demais amostras, na primeira etapa ocorre o evento de desidratação e, em seguida, três eventos de degradação. Os principais eventos térmicos encontram-se sumarizados na tabela 25.

Tabela 25 - Principais eventos térmicos das amostras de talo de brócolis e celulose

Talo de Brócolis Controle (TBC)			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 146 °C	100 – 85,6	14,4%
1ª Decomposição	146 – 325 °C	85,6 – 48,8	36,8%
2ª Decomposição	325 – 438 °C	48,8 – 35,1	13,7%
3ª Decomposição	438 – 492 °C	35,1 – 14,9	20,2%
Talo de Brócolis Grupo 3 (TBG3)			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 136 °C	100 – 85,8	14,2%
1ª Decomposição	100 – 353 °C	85,8 – 20,2	65,6%
2ª Decomposição	353 – 415 °C	20,2 – 16,5	3,7%
3ª Decomposição	415 – 420 °C	16,5 – 11,8	4,7%
Celulose			
Evento	Temperatura em °C (Δt)	Diferença de perda de massa % (Δm)	Porcentagem de perda de massa
1ª Desidratação	25 – 121 °C	100 – 94,1	5,9 %
1ª Decomposição	121 – 344 °C	94,1 – 34,4	59,7 %
2ª Decomposição	344 – 430 °C	34,4 – 9,0	25,4 %

Fonte: próprio autor.

A maior porcentagem de perda de massa (65,6%) na amostra submetida ao tratamento químico ocorre na região 2 ao longo de uma faixa extensa de temperatura (100 a 353 °C). Esse comportamento térmico pode sugerir que cadeias mais simples existentes na amostra controle foram degradadas na fase 2 e estão ausentes e/ou reduzidas na amostra tratada. Esses dados podem ser correlacionados aos resultados obtidos no FTIR, pois, nota-se redução de moléculas mais simples como lipídeos e ácidos nucleicos. Além disso, nas regiões 3 e 4 podem ter ocorrido a degradação de moléculas oriundas do tratamento, já que a caracterização feita pelo FTIR sugere a existência de grupos funcionais dos anéis aromáticos dos reagentes utilizados.

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

No presente trabalho, o tratamento químico de descelularização foi realizado nas seguintes estruturas vegetais: fruto da graviola, pseudofruto do caju, casca da mexerica, folha de brócolis, folha de ora-pro-nobis, talo de taioba e talo de brócolis. Devido às diferenças estruturais dos materiais utilizados, diferentes concentrações e tempos de contato dos detergentes com as amostras foram testados no protocolo de descelularização. Os parâmetros utilizados, por meio da análise sensorial, foram a integridade da estrutura e a resistência ao manuseio. Além desses parâmetros, todas as amostras foram avaliadas por meio da técnica de MEV, quanto às características morfológicas ideais de um *scaffold*; pelo ensaio de FTIR, observando-se a ausência ou presença de grupamentos químicos pertinentes após o tratamento químico; e pelo ensaio termogravimétrico TGA/DTA, obtendo-se informações sobre os constituintes químicos e comportamento térmico das amostras tratadas. Ressalta-se ainda que a utilização da celulose como um controle interno foi importante para se verificar a conservação da estrutura celulósica remanescente nas amostras submetidas ao protocolo de descelularização. A tabela 26 sumariza os principais resultados encontrados nos testes realizados.

Após o início da descelularização, as frutas e vegetais começaram a perder sua coloração ao longo do tempo, e, somente duas, das oito amostras, tornaram-se translúcidas. Pode-se notar, conforme a tabela 26, que a despigmentação da maioria de frutas e vegetais foi parcial, ou seja, algumas partes das amostras ainda apresentaram coloração característica. Somente na folha e no talo de brócolis observou-se despigmentação de toda a estrutura. Além disso, após o tratamento, notou-se redução da resistência ao manuseio somente nas duas amostras de graviola e na amostra de caju, com o conseqüente desprendimento de partes da fruta. No restante das amostras, as estruturas apresentaram-se conservadas. Após o processo de secagem, todas as amostras de frutas e o talo de taioba apresentaram-se resistentes ao manuseio, já a folha de ora-pro-nóbis, a folha de brócolis e talo de brócolis demonstraram ser estruturas menos resistentes. Considerou-se apenas um único observador para as análises sensoriais.

Tabela 26 - Sumário dos principais resultados

ANÁLISES										
AMOSTRAS	Despigmentação	Estrutura física	Porosidade	Estômatos	Redução de ligações lipídeos-carboidratos de alcanos	Redução de grupos carbonila	Redução de grupos associados a ésteres	Redução de compostos contendo ligações aromáticas	Redução de grupos associados a ácidos nucleicos	Resquícios de detergentes
Graviola GG1	Parcial	Soltou fibras	Existente	Não visível	Apresentou	Apresentou	Apresentou	Não apresentou	Apresentou	Não existente
Graviola GG2	Parcial	Soltou fibras	Existente	Não visível	Apresentou	Apresentou	Apresentou	Não apresentou	Apresentou	Existente
Caju	Parcial	Soltou fibras	Existente	Não visível	Apresentou	Apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Apresentou	Existente
Casca de Mexerica	Parcial	Intacta	Existente	Não visível	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Apresentou	Apresentou	Não existente
Folha de brócolis	Total	Intacta	Inexistente	Visível	Apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Existente
Folha de Ora-Pro-Nobis	Parcial	Intacta	Existente	Não visível	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Apresentou	Existente
Talos de Taioba	Parcial	Intacta	Canaliculos	Não visível	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Apresentou	Não apresentou	Existente
Talos de Brócolis	Total	Intacta	Existente	Não visível	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou	Existente

Fonte: Próprio autor.

A análise de MEV baseou-se nos parâmetros de porosidade e morfologia resultante após o tratamento químico e a secagem. Nas amostras de folha de brócolis e talo de taioba observaram-se canalículos (uma rede de fibras orientadas que circundam canais mais finos), estes importantes para interconexão entre as regiões da amostra. Apenas na estrutura foliar de brócolis observou-se numerosos estômatos e nervuras. As demais amostras apresentaram poros interconectados, que em uma análise qualitativa, apresentaram tamanhos distintos.

As duas amostras de graviola e a amostra de caju apresentaram redução nas bandas de absorção de FTIR relacionadas às ligações lipídeo-carboidrato de alcanos e grupos funcionais associados a ácidos nucleicos. Contudo, nenhuma dessa amostras apresentou redução de bandas relacionadas à presença de ligações aromáticas. A casca de mexerica e a folha de ora-pro-nobis apresentaram redução nas bandas associadas a ácidos nucleicos, mas não apresentaram alteração nas ligações lipídeo-carboidrato de alcanos, grupos carbonila e grupo associados a ésteres. Já a folha de brócolis apresentou redução somente nas bandas relacionadas às ligações lipídeo-carboidrato de alcanos. Os talos de taioba apresentaram redução nas bandas referentes à presença de ligações aromáticas e os talos de brócolis não apresentaram alteração em nenhuma dos parâmetros de FTIR apresentados na tabela 26.

8 CONCLUSÃO

Conforme pôde-se observar, o objetivo geral do trabalho foi realizado com êxito, uma vez que, foi desenvolvido um protocolo de descelularização adaptado para cada estrutura vegetal estudada. Em síntese, os resultados observados neste trabalho sugerem que o tratamento químico com detergentes ocasionou a retirada, ainda que parcial, de componentes intracelulares como lipídeos e ácidos nucleicos, além disso, os resultados indicam a manutenção da estrutura lignocelulósica dos vegetais.

Dentre as amostras vegetais, apenas a folha e talo de brócolis apresentaram despigmentação total, sugestivo de descelularização vegetal pela análise sensorial, no entanto, nas análises de FTIR não se observou a redução de grupos associados a ácidos nucleicos. Nas amostras de folhas, a arquitetura folicular foi preservada em ambas as amostras, sendo possível observar a presença de estômatos na folha de brócolis, estruturas que desempenham um papel importante na engenharia de tecidos, já que podem ser regiões propícias à adesão de células e uma superfície porosa e com a presença de canalículos na folha de ora-pro-nobis.

Já dentre as amostras de frutas, a casca de mexerica apresentou melhor resultado quanto à estrutura microscópica e parâmetros físico-químicos como: quantidade considerável de poros, manutenção da estrutura lignocelulósica, redução de lipídeos e ácidos nucleicos, além de apresentar resistência mecânica.

Por fim, ensaios adicionais como aferição do conteúdo de DNA e proteínas nas células, são necessários para se afirmar que o protocolo utilizado efetivamente promoveu a descelularização completa das estruturas vegetais. Ressalta-se ainda que a realização de ensaios de biodegradabilidade, aferição de propriedades mecânicas, determinação do papel da topografia dos materiais na proliferação e diferenciação das células, dentre outros testes, se constituem perspectivas deste trabalho.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAM, C. L.; LOWELL, C. A. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 339–362, 2009.
- ADAMSKI, M. et al. Two methods for decellularization of plant tissues for tissue engineering applications. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 135, 31 maio 2018.
- AGRAWAL, A.; KAUSHIK, N.; BISWAS, S. Derivatives and Applications of Lignin – An Insight. **the Scitech Journal**, v. 01, n. 07, p. 30–36, 2014.
- ALARIBE, F. N.; MANOTO, S. L.; MOTAUNG, S. C. K. M. *Scaffolds* from biomaterials: Advantages and limitations in bone and tissue engineering. **Biologia**, v. 71, n. 4, p. 353–366, 2016.
- ALBERTS, B. et al. **The Molecular Biology of the Cell**. 4^a ed. [s.l: s.n.].
- ALBERTSSON, A. C.; EDLUND, U.; VARMA, I. K. Synthesis, Chemistry and Properties of Hemicelluloses. **Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings**, p. 133–150, 2011.
- ALMEIDA, L. F. P. DE. **Propagação por enxertia de araticum (Annona crassiflora Mart.) e atemoia (Annona squamosa L. x Annona cherimola Mill.) em diferentes porta-enxertos de Annonaceae**. [s.l: s.n.].
- ALONSO-SIMÓN, A. et al. The use of FTIR spectroscopy to monitor modifications in plant cell wall architecture caused by cellulose biosynthesis inhibitors. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 8, p. 1104–1110, 2011.
- ANDRADE, F. A. G. DE et al. Hemicelulose em reconstrução da parede abdominal em ratos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (Impresso)**, v. 26, n. 1, p. 104–115, 2011.
- ASSOIAN, R. K.; SCHWARTZ, M. A. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 11, n. 1, p. 48–53, 2001.
- ASSOU, S.; BOUCKENHEIMER, J.; DE VOS, J. Concise Review: Assessing the Genome Integrity of Human Induced Pluripotent Stem Cells: What Quality Control Metrics? **Stem Cells**, v. 36, n. 6, p. 814–821, 2018.
- AZADI, P. et al. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 506–523, 2013.
- BABENSEE, J. E. et al. Host response to tissue engineered devices. v. 33, p. 111–139, 1998.

BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a *scaffold* for tissue reconstruction. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 13, n. 3, p. 243–249, 2002.

BADYLAK, S. T. F. B. Decellularized Allogeneic and Xenogeneic Tissue as a *Bioscaffold* for Regenerative Medicine : Factors that Influence the Host Response. v. 42, n. 7, p. 1517–1527, 2014.

BALSER, K. et al. Cellulose Esters. **Kunststoffe - German Plastics**, v. 74, n. 10, p. 34–35, 1984.

BANU, V. et al. Investigating the corrosion inhibition efficiency of surgical carbon steel. n. May, 2018.

BANYAY, M.; SARKAR, M.; GRÄSLUND, A. A library of IR bands of nucleic acids in solution. **Biophysical Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 477–488, 2003.

BAPTISTA, A. C.; BORGES, J. P.; FERREIRA, I. Produção de biobaterias a partir de membranas obtidas pela técnica de electrofiação. v. 22, p. 2–13, 2010.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. v. 15, p. 13–21, 2005.

BARROS, L. M. Botânica, origem e distribuição geográfica. In: ARAÚJO, J. P. P. DE; SILVA, V. V. DA (Eds.). . **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1995. p. 55–71.

BECKER, H. G. O. et al. **Organikum : química orgânica experimental**. 2º ed. [s.l.: s.n.].

BETTS, J. G. et al. **Anatomy & Physiology**. [s.l.] OpenStax - Rice University, 2017.

BHARGAVA, R.; WANG, S. Q.; KOENIG, J. L. FTIR microspectroscopy of polymeric systems. **Advances in Polymer Science**, v. 163, p. 137–191, 2003.

BORSELLI, C. et al. The role of multifunctional delivery *scaffold* in the ability of cultured myoblasts to promote muscle regeneration. **Biomaterials**, v. 32, n. 34, p. 8905–8914, 2011.

BRANCO, A. C. M. **Engenharia Dos Tecidos e Órgãos - Sucessos E Desafios**. [s.l.: s.n.].

BROWN, B. N. et al. Biomaterials Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic *scaffolds* with and without a cellular component. **Biomaterials**, v. 30, n. 8, p. 1482–1491, 2009.

BROWN, B. N. et al. Biomaterials Macrophage polarization : An opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine q. **Biomaterials**, v. 33, n.

15, p. 3792–3802, 2012.

CAO, Y. et al. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. **Plast Reconstr Surg.**, p. 297–302, 1997.

CASCONE, M. et al. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 12, n. 3, p. 267–281, 2001.

CAVALCANTE, C. E. B. **Secagem de polpa de graviola em spray-dryer e liofilizador: avaliação das características físico-químicas, higroscópicas e morfológicas.** [s.l.: s.n.].

CHEN, C. H. et al. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 8, p. 1001–1009, 2006.

CHEN, F.; YOO, J. J.; ATALA, A. Acellular collagen matrix as a possible “ off the shelf ” biomaterial for urethral repair. v. 4295, n. 99, p. 407–410, 1999.

CHEN, L. et al. Growth factor and its polymer *scaffold*-based delivery system for cartilage tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 6097–6111, 2020.

CHEN, Y. et al. Applications of micro-fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the geological sciences—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 30223–30250, 2015.

CHENG, Y. W. et al. Engineering Aligned Skeletal Muscle Tissue Using Decellularized Plant-Derived *Scaffolds*. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 6, n. 5, p. 3046–3054, 2020.

CHEUNG, H. Y. et al. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for *scaffold* development. **Composites Part B: Engineering**, v. 38, n. 3, p. 291–300, abr. 2007.

CLARK, M. A.; CHOI, J.; DOUGLAS, M. **Biology 2e.** [s.l.] Rice University, 2020.

COFFIN, D. R.; FISHMAN, M. L.; LY, T. V. Thermomechanical properties of blends of pectin and poly(vinyl alcohol). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 61, n. 1, p. 71–79, 1996.

COIMBRA, P. et al. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex *scaffold* for possible bone tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 112–118, 2011.

CONTESSI NEGRINI, N. et al. Plant Tissues as 3D Natural *Scaffolds* for Adipose, Bone and Tendon Tissue Regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 723, 30 jun. 2020.

DA SILVA, J. V. L.; DUAILIBI, S. E. A biofabricação de tecidos e órgãos. **ComCiência**, 2008.

DELGADO, A. L. J. **Descelularização de coração suíno : caracterização e quantificação estereológica da matriz extracelular do ventrículo esquerdo**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2020.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric *scaffolds* in tissue engineering application: A review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, n. ii, 2011.

DIKICI, S.; CLAEYSSSENS, F.; MACNEIL, S. Decellularised baby spinach leaves and their potential use in tissue engineering applications: Studying and promoting neovascularisation. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 34, n. 4, p. 546–559, 2019.

DIMOU, Z. et al. Evaluation of a decellularization protocol for the development of a decellularized tracheal *scaffold*. **Anticancer Research**, v. 39, n. 1, p. 145–150, 2019.

DUTTA, R. K.; SAHU, S. Development of oxaliplatin encapsulated in magnetic nanocarriers of pectin as a potential targeted drug delivery for cancer therapy. **Results in Pharma Sciences**, v. 2, n. 1, p. 38–45, 2012.

EBC. Coração é impresso em 3D em Israel a partir de tecido humano.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542–556, 2000.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z. Xylans of Industrial and Biomedical Importance. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 16, n. 1, p. 325–346, 1999.

EDLUND, U.; ALBERTSSON, A. C. A microspheric system: Hemicellulose-based hydrogels. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 23, n. 2, p. 171–186, 2008.

ENGLER, A. J. et al. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677–689, 25 ago. 2006.

FARRIS, S. et al. Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 61–70, 2011.

FENG, L.; LINGLING, E.; LIU, H. The effects of separating inferior alveolar neurovascular bundles on osteogenesis of tissue-engineered bone and vascularization.

Biomedical Papers, v. 159, n. 4, p. 637–641, 2015.

FERRAZ, F. B.; FERNADEZ, J. H. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. **Revista Científica da FMC**, 2014.

FERREIRA, L. M. et al. Proliferation of fibroblasts cultured on a hemi-cellulose dressing. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 63, n. 5, p. 865–869, 2010.

FIGUEIREDO, P. et al. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 93, p. 233–269, 2018.

FONTANA, G. et al. Biofunctionalized Plants as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 8, 2017a.

FONTANA, G. et al. Biofunctionalized Plants as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 8, 19 abr. 2017b.

FOWLER, S.; ROUSH, R.; WISE, J. **Concepts of Biology**. [s.l.] OpenStax - Rice University, 2017.

FRACASSO, A. F. F. **Modificação química de pectina cítrica: implicações estruturais, físicas e reológicas**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2015.

GARCIA, V. D.; PACHECO, L. **Registro Brasileiro de Transplantes**. Disponível em: <<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:bBvGukh75BMJ:https://site.abto.org.br/wp-content/uploads/2021/05/rbt1sem-naoassociado-1.pdf+&cd=3&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>>.

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

GERSHLAK, J. R. et al. Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering *scaffolds*. **Biomaterials**, v. 125, p. 13–22, 1 maio 2017b.

GHORBANI, M.; NEZHAD-MOKHTARI, P.; MAHMOODZADEH, F. Incorporation of Oxidized Pectin to Reinforce Collagen/Konjac Glucomannan Hydrogels Designed for Tissue Engineering Applications. **Macromolecular Research**, v. 29, n. 4, p. 289–296, 2021.

GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **Journal of the Royal Society Interface**, 7 nov. 2012.

GOMES RIOS, T. et al. FTIR spectroscopy with machine learning: A new approach to animal DNA polymorphism screening. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and**

Biomolecular Spectroscopy, v. 261, p. 1–7, 2021.

GOTTS, L.; THYDEN, R. 2016 Diagnostics : Organs on a Vine. 2016.

GOVINDARAJ, D. et al. From waste to high-value product: Jackfruit peel derived pectin/apatite bionanocomposites for bone healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 293–301, 2018.

GRAUSS, R. W. et al. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 126, n. 6, p. 2003–2010, 2003.

GRAUSS, R. W. et al. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 27, n. 4, p. 566–571, 2005.

GROFF, K. et al. Review of Evidence of Environmental Impacts of Animal Research and Testing. p. 14–30, 2014.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352–1358, 2010.

GUYETTE, J. P. et al. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. **Circulation Research**, v. 118, n. 1, p. 56–72, 8 jan. 2016a.

GUYETTE, J. P. et al. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. **Circulation Research**, v. 118, n. 1, p. 56–72, 8 jan. 2016b.

HARRIS, A. F.; LACOMBE, J.; ZENHAUSERN, F. The emerging role of decellularized plant-based *scaffolds* as a new biomaterial. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

HARTMAN, J.; ALBERTSSON, A. C.; SJÖBERG, J. Surface- and bulk-modified galatoglucomannan hemicellulose films and film laminates for versatile oxygen barriers. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 6, p. 1983–1989, 2006.

HASHI, M.; TAKESHITA, T. Antitumor effect of 4-O-methylglucuronoxylan on solid tumor in mice. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 951–959, 1979.

HAUGHN, G. W.; WESTERN, T. L. Arabidopsis seed coat mucilage is a specialized cell wall that can be used as a model for genetic analysis of plant cell wall structure and function. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. APR, 2012.

HENCH, L. L. Bioceramics : From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, 1991.

HILL, E.; BOONTHEEKUL, T.; MOONEY, D. J. Designing *scaffolds* to enhance

transplanted myoblast survival and migration. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 5, p. 1295–1304, 2006.

HIRAYAMA, K. et al. Cellular building unit integrated with microstrand-shaped bacterial cellulose. **Biomaterials**, v. 34, n. 10, p. 2421–2427, 1 mar. 2013.

HOLTZAPPLE, M. T. CELLULOSE. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. [s.l.] Academic Press, 2003a. p. 998–1007.

HOLTZAPPLE, M. T. LIGNIN. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. [s.l.] Elsevier, 2003b. p. 3535–3542.

HOSHIBA, T. et al. Decellularized matrices for tissue engineering. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 10, n. 12, p. 1717–1728, 2010.

HOSHIBA, T. et al. Decellularized Extracellular Matrix as an In Vitro Model to Study the Comprehensive Roles of the ECM in Stem Cell Differentiation. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.

HSIEH, Y. C. et al. An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. **Cellulose**, v. 15, n. 4, p. 507–513, 2008.

HU, L.; DU, M.; ZHANG, J. Hemicellulose-Based Hydrogels Present Status and Application Prospects: A Brief Review. **Open Journal of Forestry**, v. 08, n. 01, p. 15–28, 30 nov. 2018.

HUANG, Z. H. Structure and function of mucilaginous achenes of artemisia monospermainhabiting the negev desert of israel. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 48, n. 4, p. 255–266, 2000.

HURTADO-LÓPEZ, P.; MURDAN, S. An investigation into the adjuvanticity and immunogenicity of zein microspheres being researched as drug and vaccine carriers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 6, p. 769–774, jun. 2006.

IBRAHIM, N. S. et al. Novel HA-PVA/NOCC bilayered *scaffold* for osteochondral tissue-engineering applications – Fabrication, characterization, in vitro and in vivo biocompatibility study. **Materials Letters**, v. 113, p. 25–29, 15 dez. 2013.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 3, n. 10, p. 589, 22 out. 2006.

IPTC. **A importância dos *scaffolds* na engenharia de tecidos**. Disponível em: <<http://celulastroncors.org.br/a-importancia-dos-scaffolds-na-engenharia-de-tecidos/>>. Acesso em: 15 set. 2021.

IRAVANI, S.; VARMA, R. S. Plants and plant-based polymers as *scaffolds* for tissue

engineeringGreen Chemistry. **Royal Society of Chemistry**, 2019.

JAMES, B. D. et al. Palm readings: Manicaria saccifera palm fibers are biocompatible textiles with low immunogenicity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 108, p. 110484, 1 mar. 2020.

JAMMALAMADAKA, U.; TAPPA, K. Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.

JOZALA, A. F.; LOPES, ANDRÉ MORENI, NOVAES, L. C. DE L.; JUNIOR, A. P. Produção de celulose bacteriana : uma nova tendencia. n. January, 2011.

KALOUSTIAN, J.; EL-MOSELHY, T. F.; PORTUGAL, H. Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*). **Thermochimica Acta**, v. 401, n. 2, p. 77–86, 19 maio 2003.

KALOUSTIAN, J.; PAULI, A. M.; PASTOR, J. Kinetic study of the thermal decompositions of biopolymers extracted from various plants. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. [s.l: s.n.].

KATAV, T. et al. Modified pectin-based carrier for gene delivery: Cellular barriers in gene delivery course. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 183–191, 2008.

KAWASAKI, N. et al. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 181, n. 2, p. 227–234, 1999.

KIM, Y. et al. Extracellular matrix revisited: Roles in tissue engineering. **International Neurology Journal**, v. 20, p. S23–S29, 1 maio 2016.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KNOX, J. P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 308–313, 2008.

KRAMSCHUSTER, A.; TURNG, L. S. Fabrication of Tissue Engineering *Scaffolds*. In: **Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 427–446.

KULKARNI, A. D. et al. Xyloglucan: A functional biomacromolecule for drug delivery applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 799–812, 2017.

KUMAR, J. K.; PRASAD, A. G. D. Identification and Comparison of Biomolecules in Medicinal Plants of *Tephrosia Tinctoria*. **Romanian J. Biophys.**, v. 21, n. 1, p. 63–71, 2011.

LANGER, R.; VACANTI, J. Tissue engineering. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5110, p. 920–926, 1993.

- LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers *Progress in Polymer Science*, 2014.
- LEE, J. et al. Induced Osteogenesis in Plants Decellularized *Scaffolds*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2019.
- LEE, J.; CUDDIHY, M. J.; KOTOV, N. A. Three-dimensional cell culture matrices: State of the art. **Tissue Engineering - Part B: Reviews** *Tissue Eng Part B Rev*, , 1 mar. 2008.
- LEE, M.; VASIOUKHIN, V. Cell polarity and cancer - Cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 8, p. 1141–1150, 15 abr. 2008.
- LEGAZ, M. E.; SOLAS, M. T.; VICENTE, X. F. & C. Quaternary structure of catalase using a bioskin-immobilized enzyme. **Biotechnology Techniques**, 1998.
- LEITE, M. D. R. **Estruturas tridimensionais porosas de policaprolactona/mel produzidas a partir do sistema BioExtruder**. [s.l: s.n.].
- LEITE1, M. D. R.; MARINHO, T. M. A.; FOOK, M. V. L. **Obtenção e caracterização de scaffolds de policaprolactona produzidos a partir do sistema BioExtruder**. n. 11, p. 30–33, 2016.
- LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, 2007.
- LI, Z.; LIN, Z. Recent advances in polysaccharide-based hydrogels for synthesis and applications. **Aggregate**, v. 2, n. 2, p. 1–26, 2021.
- LINO, A. G. Composição Química a Estrutural da Lignina e Lipídios do Bagaço e Palha da Cana-De-Açúcar. p. 108, 2015.
- LIU, H. et al. Biomedical Applications of Hemicellulose-Based Hydrogels. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 28, p. 4647–4659, 2020a.
- LIU, H.; WEBSTER, T. J. Less harmful acidic degradation of poly (lactic- co-glycolic acid) bone tissue engineering *scaffolds* through titania nanoparticle addition. p. 541–545, 2006.
- LIU, Q.; LUO, L.; ZHENG, L. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, 1 fev. 2018.
- LIU, R. et al. Lignin-Based Micro- and Nanomaterials and their Composites in Biomedical Applications. **ChemSusChem**, v. 13, n. 17, p. 4266–4283, 2020b.

- LLOYD, L. L. et al. Carbohydrate polymers as wound management aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, n. 3, p. 315–322, 1998.
- MACHADO, A. F. L. **Tolerância de genótipos de eucalipto ao glyphosate**. [s.l: s.n.].
- MANUSCRIPT, A. an Overview of Tissue and Whole. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 2012.
- MATHEW, A. P. et al. Fibrous cellulose nanocomposite *scaffolds* prepared by partial dissolution for potential use as ligament or tendon substitutes. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2291–2298, 14 fev. 2012.
- MCCULLOH, K. A.; SPERRY, J. S.; ADLER, F. R. Water transport in plants obeys Murray's law. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 939–942, 2003.
- MELANDRI, D. et al. Use of a new hemicellulose dressing (Veloderm®) for the treatment of split-thickness skin graft donor sites. A within-patient controlled study. **Burns**, v. 32, n. 8, p. 964–972, 2006.
- MELO, J. C. P. DE. Síntese e Caracterização De Derivados Da Celulose Modificada Com Anidridos Orgânicos – Adsorção E Termodinâmica De Interação Com Cátions Metálicos. p. 95, 2007.
- MIKKONEN, K. S. et al. Films from spruce galactoglucomannan blended with poly(vinyl alcohol), corn arabinoxylan, and konjac glucomannan. **BioResources**, v. 3, n. 1, p. 178–191, 2008.
- MIYAMOTO, T. et al. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 23, n. 1, p. 125–133, 1989.
- MODULEVSKY, D. J. et al. Apple derived cellulose *scaffolds* for 3D mammalian cell culture. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014a.
- MODULEVSKY, D. J. et al. Apple Derived Cellulose *Scaffolds* for 3D Mammalian Cell Culture. v. 9, n. 5, 2014b.
- MODULEVSKY, D. J. et al. Apple Derived Cellulose *Scaffolds* for 3D Mammalian Cell Culture. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97835, 19 maio 2014c.
- MOHAMED, M. A. et al. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. p. 3–29, 2017.
- MONNIAUX, M.; HAY, A. Cells, walls, and endless forms. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 34, p. 114–121, 2016.
- MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancerNature. **Nature Publishing Group**, 29 jun. 2006.

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681–689, 2012.

NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, n. September 2017, p. 28–41, 2018.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8–9, p. 762–798, 1 ago. 2007.

NEGRINI, N. C. et al. Plant Tissues as 3D Natural *Scaffolds* for Adipose. **Bone and Tendon Tissue Regeneration**. v. 8, n. June, p. 1–15, 2020.

NIGAM, R.; MAHANTA, B. An Overview of Various Biomimetic *Scaffolds*: Challenges and Applications in Tissue Engineering. **Journal of Tissue Science & Engineering**, v. 05, n. 02, 2014.

NIKOLOVA, M. P.; CHAVALI, M. S. Recent advances in biomaterials for 3D *scaffolds*: A review. **Bioactive Materials**, v. 4, p. 271–292, 1 dez. 2019.

NOREEN, A. et al. Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 254–272, 2017.

NORGREN, M.; EDLUND, H. Lignin: Recent advances and emerging applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 409–416, 2014.

NURAZZI, N. M. et al. Thermogravimetric analysis properties of cellulosic natural fiber polymer composites: A review on influence of chemical treatments. **Polymers**, v. 13, n. 16, 2021a.

NURAZZI, N. M. et al. A review on natural fiber reinforced polymer composite for bullet proof and ballistic applications. **Polymers**, v. 13, n. 4, p. 1–42, 2021b.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & *scaffolds* for tissue engineering. **Materials Today**. Elsevier B.V., 1 mar. 2011.

OTT, H. C. et al. Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nature Medicine**, v. 14, n. 2, p. 213–221, 13 fev. 2008.

OTT, H. C. et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 8, p. 927–933, 2010.

PARIKH, S. J.; CHOROVER, J. FTIR spectroscopic study of biogenic Mn-oxide formation by *Pseudomonas putida* GB-1. **Geomicrobiology Journal**, v. 22, n. 5, p.

207–218, 2005.

PARMAKSIZ, M.; ELÇIN, A. E.; ELÇIN, Y. M. Decellularized Cell Culture ECMs Act as Cell Differentiation Inducers. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 16, n. 3, p. 569–584, 2020.

PEREIRA, A. L. A. et al. **O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteínas em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica.** v. 71, n. 1, p. 81–86, 2005.

PHAN, J. L.; BURTON, R. A. **New insights into the composition and structure of seed mucilage.** [s.l: s.n.]. v. 1

RAMIAH, M. V. Thermogravimetric and differential thermal analysis of cellulose, hemicellulose, and lignin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 14, n. 5, p. 1323–1337, 1970.

RAMIMOGHADAM, D. et al. **The Effect of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) on the Properties of ZnO Synthesized by Hydrothermal Method.** p. 13275–13293, 2012.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science.** [s.l: s.n.].

REDDY, N.; YANG, Y. **Potential of plant proteins for medical applicationsTrends in Biotechnology.** Trends Biotechnol, , out. 2011.

RODRIGUES, J. S. et al. Isolation and characterization of acetosolv lignin present in sugarcane bagasse. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 4, p. 867–877, 1 ago. 2020.

RODRIGUES, T. P. **Espectroscopia vibracional, técnicas fototérmicas e quimiométricas para caracterização físico-química de diesel e combustíveis alternativos.** [s.l: s.n.].

ROETHER, J. A. et al. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, n. 18, p. 3871–3878, 1 set. 2002.

ROJAS, J. A. et al. Optimization of Triton X-100 removal and ultrasound probe parameters in the preparation of multiwalled carbon nanotube buckypaper. **Materials & Design**, v. 166, p. 107612, 2019.

ROOS, A. A. et al. Protein release from galactoglucomannan hydrogels: Influence of substitutions and enzymatic hydrolysis by β -mannanase. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2104–2110, 2008.

ROSALES, A. M.; ANSETH, K. S. The design of reversible hydrogels to capture extracellular matrix dynamics. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 2, p. 1–15, 2016.

ROSEN, A. B. et al. Finding Fluorescent Needles in the Cardiac Haystack: Tracking Human Mesenchymal Stem Cells Labeled with Quantum Dots for Quantitative In Vivo Three-Dimensional Fluorescence Analysis. **Stem Cells**, v. 25, n. 8, p. 2128–2138, 2007.

ROWAN, J. R. C. Æ. S. J. et al. **Review : current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites.** [s.l: s.n.].

RYAN, J. A. **Evolution of Cell Culture Surfaces.** [s.d.].

S. H, A. et al. Decellularization and oxidation process of bamboo stem enhance biodegradation and osteogenic differentiation. **Materials Science and Engineering C**, v. 119, p. 111500, 1 fev. 2020.

SÁ, P. A. DE. Utilização de engenharia de tecidos no tratamento de feridas crônicas. **Universidade Fernando Pessoa**, 2015.

SAADATKHAH, N. et al. Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis-TGA. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 98, n. 1, p. 34–43, 2020.

SAIZ, E. et al. Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. **Dental Materials**, v. 29, n. 1, p. 103–115, 1 jan. 2013.

SAKURADA, I.; NUBUSHINA, Y. **Experimental Determination of the Elastic Modulus of Crystalline Regions in Oriented Polymere.** v. 57, p. 651–660, 1962.

SALEHI, A. et al. Efficient mineralization and osteogenic gene overexpression of mesenchymal stem cells on decellularized spinach leaf *scaffold*. **Gene**, v. 757, p. 144852, 2020.

SALIBA, E. DE O. S. et al. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917–928, 2005.

SANDE, S. A. Pectin-based oral drug delivery to the colon. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 2, n. 3, p. 441–450, 2005.

SARIG, U. et al. Thick acellular heart extracellular matrix with inherent vasculature: A potential platform for myocardial tissue regeneration. **Tissue Engineering - Part A**, v. 18, n. 19–20, p. 2125–2137, 2012.

SARKER, M. D. et al. 3D biofabrication of vascular networks for tissue regeneration: A report on recent advances. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 5, p. 277–296, 2018.

SCHNEIDER, M. et al. Fourier transform infrared spectrometry. **Monitoring**

Atmospheric Water Vapour: Ground-Based Remote Sensing and In-situ Methods, v. 10, p. 95–111, 2013.

SCHNELLER, M.; VUORI, K.; RUOSLAHTI, E. $\alpha\beta 3$ integrin associates with activated insulin and PDGF β receptors and potentiates the biological activity of PDGF. **EMBO Journal**, v. 16, n. 18, p. 5600–5607, 1997.

SHEIKH, Z. et al. Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. **Materials**, v. 8, n. 9, p. 5744–5794, 2015.

SILVA, J. S. P. **Estudo das características físico-químicas e biológicas pela adesão de osteoblastos em superfícies de titânio modificadas pela nitretação em plasma**. p. 119, 2008.

SINHORETI, M.; VITTI, R.; SOBRINHO, L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras Biomaterials in Dentistry: current view and future perspectives. **Rev assoc paul ciR dent**, v. 67, n. 3, p. 178–86, 2013.

SKALAK, R.; FOX, C. F. **Tissue engineering : proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California**, February 26-29, 1988. 1988.

SMISTAD, G. et al. The potential of pectin as a stabilizer for liposomal drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 3, p. 1337–1344, 2012.

SOUSA, L. H. DA R. M. F. B. DE. **Estudo termodinâmico da inclusão do dodecil sulfato em beta-ciclodextrina**. 2016.

SOUZA, M. DE J.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; RIBEIRO, L. M. Secondary-cell-wall release: a particular pattern of secretion in the mucilaginous seed coat of *Magonia pubescens*. **American Journal of Botany**, v. 107, n. 1, p. 31–44, 2020.

ŠTURCOVÁ, A.; DAVIES, G. R.; EICHHORN, S. J. Elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 1055–1061, 2005.

SUGIARTO, S. et al. How far is Lignin from being a biomedical material? **Bioactive Materials**, v. 8, n. June 2021, p. 71–94, 2022.

SUNGTHONGJEEN, S. et al. Effect of degree of esterification of Sungthongjeen, S., Sriamornsak, P., Pitaksuteepong, T., Somsiri, A., & Puttipipatkachorn, S. (2004). Effect of degree of esterification of pectin and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets. A. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 1, p. E9, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. [s.l: s.n.]. v. 91

TAN, H.; MARRA, K. G. Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1746–1767, 2010.

TAYLOR, K.; ALVAREZ, L. R. An Estimate of the Number of Animals Used for Scientific Purposes Worldwide in 2015. v. 47, p. 196–213, 2020.

TEIXEIRA, A. et al. **O uso das técnicas de descélularização e recélularização para a construção de tecidos e órgãos.** Disponível em:

<http://tudosobrecelastronco.com.br/descelularizacao-e-recelularizacao-para-construcao-de-tecidos-e-orgaos/?fbclid=IwAR0L8kFPSRct1RsPjgGGrIai8TicFsPGmORRBL9N-_u9vZqDjwMAdbbBGcc>.

TUMBARELLO, D. A.; TURNER, C. E. Hic-5 Contributes to Transformation Through a RhoA / ROCK-dependent Pathway. **Journal Cellular Physiology**, v. 211(3), n. May, p. 736–747, 2006.

VACANTI, J.; LANGER, R.; LANZA, R. **Principles of Tissue Engineering.** 3rd. ed. [s.l: s.n.].

VAN ZUIJLEN, P. et al. Tissue engineering in burn scar reconstruction. **Burns & Trauma**, v. 3, 1 dez. 2015.

VIEBKE, C.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O. Food hydrocolloids and health claims. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 4, n. 2, p. 101–114, 2014.

VILJANTO, J. et al. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material ? An in vivo subcutaneous study in the rat. v. 20, p. 1989–1995, 1999.

VOEPEL, J. et al. Drug Diffusion in Neutral and Ionic Hydrogels Assembled from Acetylated Galactoglucomannan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, p. 2401–2412, 2009.

WALAWALKAR, S.; ALMELKAR, S. Fabricating a pre-vascularized large-sized metabolically-supportive *scaffold* using Brassica oleracea leaf. 2020.

WANG, Y.; DOMINKO, T.; WEATHERS, P. J. Using decellularized grafted leaves as tissue engineering *scaffolds* for mammalian cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, n. Nih 2018, 2020.

WILSON, G. J. et al. **Acellular Matrix : A Biomaterials Approach Replacement.** v. 4975, n. 95, 1995.

WITZLER, M. et al. Lignin-derived biomaterials for drug release and tissue engineering. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1–22, 2018.

WU, Q. et al. Optimizing perfusion-decellularization methods of porcine livers for clinical-scale whole-organ bioengineering. **BioMed Research International**, v. 2015,

2015.

YANG ET AL. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. v. 86, p. 1781–1788, 2007.

YANG, Z. et al. Crystallization behavior of poly(ϵ -caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, n. 5, p. 2658–2667, 2010.

YANNAS, I. V et al. Classes of Materials Used in Medicine. In: RATNER, B. D. et al. (Eds.). . **BIOMATERIALS SCIENCE**. 2. ed. San Diego, Calif, USA: Elsevier Academic Press, 2004. p. 127–136.

YANNAS, I. V; BURKE, J. F. **Design of an artificial skin . I . Basic design principles**. v. 14, p. 65–81, 1980.

ZHANG, P.; WHISTLER, R. L. Mechanical properties and water vapor permeability of thin film from corn hull arabinoxylan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, n. 6, p. 2896–2902, 2004.

ZHAO, Y. et al. Advances in Imaging Plant Cell Walls. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 9, p. 867–878, 2019.

ZUGENMAIER, P. **History of Cellulose Research**. n. 1891, p. 7–51, 2008.