

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UM *SCAFFOLD* DE COLÁGENO E ANÁLISE *IN VITRO*  
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

LUDMILLA SOUSA QUIRINO

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Bacharel em Biotecnologia.

UBERLÂNDIA – MG

ABRIL – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UM *SCAFFOLD* DE COLÁGENO E ANÁLISE *IN VITRO*  
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

LUDMILLA SOUSA QUIRINO

DRA. VIVIAN ALONSO GOULART

DRA. ROBERTA REZENDE ROSA

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Bacharel em Biotecnologia.

UBERLÂNDIA – MG

ABRIL – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UM *SCAFFOLD* DE COLÁGENO E ANÁLISE *IN VITRO*  
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

LUDMILLA SOUSA QUIRINO

DRA. VIVIAN ALONSO GOULART  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DRA. ROBERTA REZENDE ROSA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Homologado pela coordenação do Curso  
de Biotecnologia em \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

DR. NILSON NICOLAU JÚNIOR

UBERLÂNDIA – MG

ABRIL – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UM *SCAFFOLD* DE COLÁGENO E ANÁLISE *IN VITRO*  
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

LUDMILLA SOUSA QUIRINO

Aprovado pela Banca Examinadora em: **01/04/2022**

Nota: **100**



**Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart**

Uberlândia, 01 de abril de 2022

Dedico esta monografia em memória ao professor Luiz Ricardo Goulart Filho que em sua excelência marcou a minha vida, não tem outra definição para a importância dele durante sua existência.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Vivian Alonso Goulart pela orientação, paciência e suporte dando continuidade ao que o Dr. Luiz Ricardo iniciou. À Roberta Rezende Rosa pela coorientação, pelas reuniões, por pensar e desenvolver comigo; obrigada por ser uma constante inspiração.

À banca examinadora, Me. Jéssica Souza e Dr. Bruno Ferreira. Agradeço por aceitarem meu convite e por toda contribuição. À Isabela Lemos pela disposição.

Agradeço à minha equipe do projeto; Jéssica Peixoto em sua excelência e humanidade em me permitir acompanhar seu trabalho durante essa tese; à Jéssica Regina, à Cláudia, à professora Leticia Felice, ao Matheus, Rafaella, Sabrina, Leticia Pimentel, Paula e à Natássia por elevarem meu padrão de trabalho em equipe e por serem uma família nesses 4 anos de graduação. Em destaque à Natássia pelo apoio que foi além das bancadas, pela sabedoria que foi além da ciência e da academia, por sua amizade verdadeira.

Aos meus pais, Elaine e Lino, vocês me deram tudo que eu precisei para me tornar quem eu sou. Às minhas irmãs, Pamella e Nicolly, pelo apoio, paciência e afeto. A todos da minha família que acreditaram em mim e me deram suporte para concluir esse ciclo.

Aos meus amigos; Brenda, Giovanna, Karoliny, Lorryne, Luiz Fernando, Marcela, Maycon, Pamela, Tainá, Thais, Victor Hugo, Wagner e Wenia; por estarem comigo durante esse processo, tornarem mais leve esse tempo e me ajudarem a ser quem eu sou.

Às minhas amigas da Biogenetics que me acolheram em tão pouco tempo e na etapa final do TCC, Bárbara, Bethania, Gabriela Silva, Isabella Castro, Laura, Sara Martins e aos meus gestores Antonielle, Bianca e Alexandre.

Aos meus professores que antecederam à graduação e aos do bacharelado em biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia por todos os ensinamentos e os conselhos que serviram para o meu aprendizado e minha formação profissional.

À Liga Nacional dos Acadêmicos em Biotecnologia pela luta e união constante pela nossa futura profissão, pelo nosso espaço e representatividade. Ao polo da UFU em Uberlândia por me esticar pessoal e profissionalmente, além de me aproximar de pessoas extraordinárias que carrego além do meio acadêmico, Alice, Dhara, Isabela, Mohana, Nicole, Arissa e Sofia.

À Sinérgica EJ e às amigadas que vieram através dela, agradeço por me prepararem para desafios profissionais e por vivenciar o empenho do Movimento Empresa Júnior. À Liga Universitária de Imunologia pelas reuniões e troca de conhecimento no tempo em que fiz parte.

À todos do Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia por me ensinarem a amar as bancadas, por serem pesquisadores inspiradores e tão humanos. À Luciana por assumir a frente do laboratório e continuar o legado do Dr. Luiz Ricardo Goulart. À coordenação do curso de Biotecnologia, em especial à Tatiana por facilitar minha vida acadêmica, por sempre se dispor e ajudar os alunos.

E principalmente, à Deus que em Sua bondade, amor e força foi e é meu eterno norte.

## RESUMO

Com o propósito de desenvolver um *scaffold* de colágeno processado (pré-gel) poroso foram realizadas associações químicas com quitosana (CS) e N-acetilcisteína associada a  $\epsilon$ -polisina (NE) em comparação com *scaffold* de colágeno comercial. Primeiramente, houve a quantificação indireta do colágeno presente no pré-gel e o comercial em um ensaio de hidroxiprolina, que avaliou concentrações satisfatórias da proteína. Consequentemente foi avaliado de forma estrutural, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), o biomaterial desenvolvido em que se notou aumento da porosidade nas formulações contendo pré-gel + CS e pré-gel + CS + NAC/ $\epsilon$ -PL assim como no *scaffold* de colágeno comercial. Além da avaliação estrutural, no presente estudo foi realizado o ensaio de viabilidade celular com queratinócitos imortais aneuplóides espontaneamente transformados da epiderme humana (HaCat) cultivados em meio DMEM para determinação de uma dosagem não citotóxica em amostras com resultados inferiores a 70% de viabilidade em concentrações de 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml e 3 mg/ml coradas com resazurina. Em suma, as amostras de pré-gel foram consideradas citotóxicas em todas as faixas de concentração, com exceção do pré-gel associado a quitosana à 1 mg/ml, a citotoxicidade foi comprovada em um ensaio de Live/Dead (L/D) com iodeto de propídeo e calceína. Das formulações desenvolvidas potenciais *scaffolds* para aplicações biomédicas foram apresentados com exceção do pré-gel isolado e com NE.

**Palavras-chave:** *Scaffold*, colágeno, viabilidade celular, hidroxiprolina, quitosana, NAC/ $\epsilon$ -PL, pré-gel.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Biomateriais e engenharia de tecidos .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Colágeno .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Bioativos .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1 Quitosana .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.2 NAC/<math>\epsilon</math>-PL .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Análise e validação do <i>scaffold</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.1 Ensaio de citotoxicidade .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.2 Ensaio de hidroxiprolina .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.3 Microscopia eletrônica de varredura .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>12</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Descelularização .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.1 Validação da descelularização .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.1.1 Extração de DNA .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.1.2 Avaliação histológica .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Quantificação de colágeno .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 Desenvolvimento do <i>scaffold</i> poroso.....</b>	<b>15</b>

3.4 Análise de citotoxicidade.....	16
3.4.1 Live/Dead (L/D) .....	17
3.4.2 Análise estatística .....	17
3.5 Microscopia eletrônica de varredura .....	18
4. RESULTADOS .....	18
4.1 Descelularização .....	18
4.1.1 Validação da descelularização .....	18
4.1.2 Avaliação histológica .....	18
4.2 Quantificação de colágeno .....	19
4.3 Desenvolvimento do <i>scaffold</i> poroso .....	22
4.4 Análise de citotoxicidade .....	22
4.4.1 Live/Dead (L/D) .....	24
4.5 Microscopia eletrônica de varredura .....	25
5. DISCUSSÃO .....	26
6. CONCLUSÃO .....	29
7. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29

## LISTA DE FIGURAS

01. Estrutura tridimensional e composição do colágeno .....	3
02. Esquema ilustrativo da formação de uma esponja de colágeno .....	4
03. Desacetilação da quitina .....	5
04. Fórmula estrutural da N-acetilcisteína .....	6
05. Fórmula estrutural da $\epsilon$ -polisina .....	7
06. Ensaio de viabilidade celular com resazurina .....	9
07. Estrutura química da Calceína AM (A) e do Iodeto de Propídeo (B) utilizados no ensaio Live/Dead .....	10
08. Imagem representativa do peptídeo de colágeno hidrolisado sendo convertido em Hyp oxidada .....	11
09. Imagem representativa da diluição seriada da hidroxiprolina para obtenção da curva.....	14
10. Validação da descelularização da membrana .....	19
11. Curva padrão de hidroxiprolina .....	20
12. Desenvolvimento de <i>scaffold</i> poroso .....	22
13. Análise de viabilidade da HaCat .....	23
14. Ensaio de Live/Dead .....	24
15. Análise morfológica por microscopia de varredura das diferentes formulações de <i>scaffolds</i> .....	26

## LISTA DE TABELAS

1. Quantidade de hidroxiprolina por poço para quantificação indireta de colágeno.....20
2. Cálculo da concentração de hidroxiprolina nas amostras de pré-gel e colágeno.....21
3. Concentração de colágeno por amostra .....22

## SIGLAS

1. NAC: N- acetilcisteína
2.  $\epsilon$ -PL:  $\epsilon$ -polisina
3. NAC/ $\epsilon$ -PL: N-acetilcisteína associado à  $\epsilon$ -polisina
4. CS: Quitosana
5. L/D: Live/Dead
6. HaCat: Queratinócitos imortais aneuplóides espontaneamente transformados da epiderme humana
7. KCs: Queratinócitos
8. ISO: Órgão Internacional de Padronização
9. EDC: Carbodiimida (1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil])
10. H&E: Hematoxilina e eosina

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Biomateriais e engenharia de tecidos

A engenharia tecidual é um ramo da ciência cuja finalidade é a substituição de tratamentos convencionais, como transplante de órgãos e implantes artificiais, a fim de minimizar os índices de rejeição e suprir a demanda social. Principalmente, ambiciona o reparo ou regeneração do tecido perdido ou danificado com uso de biomateriais sintéticos ou naturais que podem ser combinados a fatores de crescimento com objetivo da proliferação e migração celular (AHMED et al., 2018; DAS; BAKER, 2016; KHADEMHOSEINI; LANGER, 2016; KIM et al., 2018).

Kim et al (2018) cita que a efetividade da engenharia tecidual só é possível por meio de três elementos principais: atividade celular, biomateriais para atuar como *scaffolds* e moléculas sinalizadoras para instrução celular; e fabricação do tecido. Os materiais possuem um papel chave na construção de arcabouços, conhecidos como *scaffolds*, que são estruturas tridimensionais de macromoléculas sintéticas ou naturais.

Os *scaffolds* naturais apresentam como vantagem a manutenção de propriedades da matriz extracelular que são essenciais para adesão celular e características mecânicas, no entanto, a fim de serem utilizados, é necessário a descelularização do biomaterial para evitar reações adversas (CAMPOS et al., 2020; INGRAM et al., 2007; PERUZZO; PERUZZO, 2013; YOERUEK et al., 2012).

A descelularização é um método de remoção das células com o máximo de preservação possível das propriedades da matriz extracelular por experimentos físicos ou químicos e promove uma maior biocompatibilidade, o que diminui a rejeição pelo receptor (BERTANHA et al., 2014; FAULK; WILDEMANN; BADYLAK, 2014; MAZZA et al., 2015; NOWAK et al., 2017). Além disso, é necessário que o *scaffold* corresponda a alguns critérios essenciais para alcançar o objetivo esperado como biocompatibilidade, porosidade, adesão, propriedades

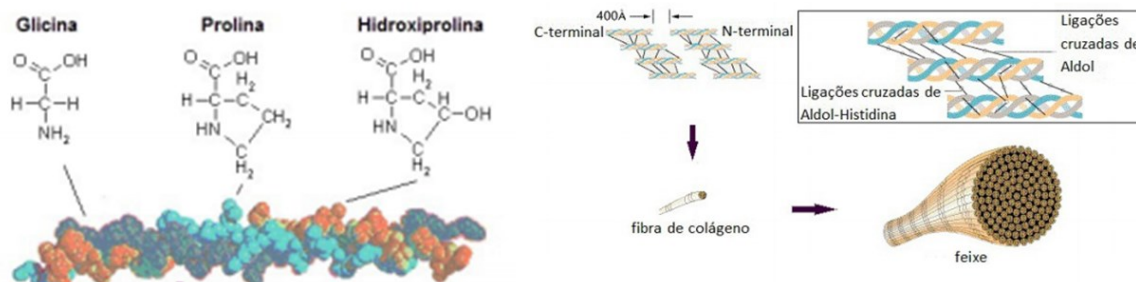
antimicrobianas, estabilidade, biodegradabilidade, interconectividade assim como permitir a proliferação celular (AHMED et al., 2018; FELICIANO et al., 2021).

O biomaterial do presente estudo (sob sigilo de patente, nº W02021159198 (A1)), o qual será denominado membrana para fins de distinção, é rico em colágeno conforme caracterização prévia e será processado para criação de um pré-gel diluído em ácido acético, conforme protocolo a ser padronizado. Para a obtenção do *scaffold* será adicionado compostos bioativos, tais como a quitosana para aumento da porosidade e NAC/ $\epsilon$ -PL para atividade antimicrobiana (ORYAN et al., 2018; SHUKLA et al., 2012).

## 1.2 Colágeno

Embora, inicialmente, a primeira geração de biomateriais era inerte a fim de não induzir uma resposta imunológica, notou-se que o objetivo da medicina regenerativa é não somente o tratamento do tecido danificado, como também a restauração da funcionalidade do mesmo. Diante disso, tem sido explorado, concomitantemente aos avanços na biologia molecular e celular, materiais com capacidade de estimulação da regeneração tecidual dentre eles, o colágeno (PAWELEC; BEST; CAMERON, 2016).

O colágeno é uma proteína fibrosa (Figura 1), sendo a mais abundante nos animais. Aproximadamente 28 isoformas de colágeno com 46 cadeias polipeptídicas diferentes foram elucidadas nos vertebrados, sendo no ser humano correspondente a cerca de  $\frac{3}{4}$  do peso seco da pele. A principal função é a contribuição com a integridade dos tecidos em que se encontra assim como contribui como uma molécula sinalizadora (SHOULDERS; RAINES, 2009; SILVA; PENNA, 2012; SORUSHANOVA et al., 2019; WENGER et al., 2007). Os colágenos tipos I, II e III pertencem ao grupo fibrilar e variam na composição de aminoácidos e distribuição no corpo. Os outros tipos são classificados conforme a função e estrutura como por exemplo o colágeno tipo VII que ancora as fibras do tipo I ou os associados à fibrilas como os IX, XII e XIV. (PAWELEC; BEST; CAMERON, 2016)



**Figura 1:** Estrutura tridimensional e composição do colágeno. Fonte: Adaptado de Silva, T. F; Penna, A.L.B, 2012

Além do tecido epitelial, o colágeno está presente em outros vários tecidos, como: no conjuntivo, muscular, ocular (camada da córnea), etc. Em sua composição há a presença de aminoácidos como a glicina, hidroxiprolina, alanina, prolina, lisina, dentre outros; a distribuição paralela das cadeias polipeptídicas fornece as propriedades de elasticidade e resistência intrínsecas da proteína (SHOULDERS; RAINES, 2009; SILVA; PENNA, 2012; WENGER et al., 2007).

Durante a produção do *scaffold* de colágeno, alterações químicas (*crosslink*), geralmente presentes para estabilização ou melhora de propriedades mecânicas, podem ser realizadas antes ou após a rede de fibras ser formada. Todavia a resposta biológica não é inerte a essas modificações. Ainda que estudos utilizem agentes enzimáticos e não enzimáticos para *crosslink*, os impactos na composição e estrutura da proteína devem ser devidamente avaliados por análise morfoestrutural, mecânica, bioquímica, etc. (ADAMIAK; SIONKOWSKA, 2020; ANTONIO et al., 2021; CAO et al., 2020; DENG et al., 2010; PAWELEC; BEST; CAMERON, 2016; SORUSHANOVA et al., 2019).

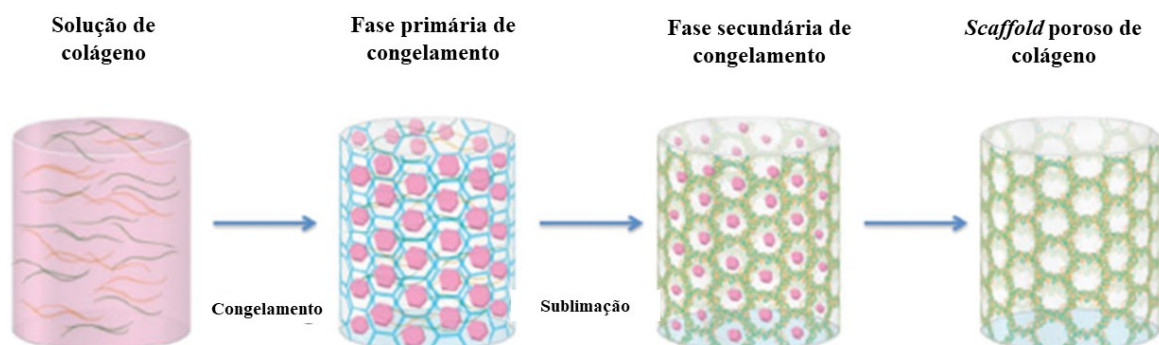
Na fabricação de *scaffolds* de colágeno, diferentes formas físicas são abordadas, como enxertos de tecidos, hidrogéis, filmes ou tubos, e esponjas (SORUSHANOVA et al., 2019). No presente estudo foram confeccionados dois *scaffolds* esponjosos, um a partir do biomaterial rico em colágeno (membrana) após um processo de gelificação e outro a partir do colágeno comercial para devida análise. Da mesma maneira, foram adicionadas algumas formulações do



material com outros bioativos a serem discutidos posteriormente. E esta alteração química fundamentou-se em uma revisão bibliográfica com o propósito de melhorar o desempenho do biomaterial e o aumento da porosidade anteriormente observada na caracterização da membrana (sob processo de depósito de patente, nº WO2021159198 (A1))

Diante disso, foi avaliada a necessidade de aprimorar a estrutura de forma a proporcionar uma abertura das fibras sem comprometer a integridade do biomaterial e consequentemente suas propriedades biológicas. Conclui-se através de uma revisão bibliográfica, compostos bioativos incorporados quimicamente ao colágeno que promoveriam o objetivo desejado tendo sido a quitosana e NAC/ $\epsilon$ -PL.

Antes de abordar a constituição dos compostos selecionados, é importante salientar o processo criativo da esponja, conforme apresentado na figura 2, que ocorre por meio da liofilização usada na fabricação de dispositivos porosos implantáveis. No congelamento, o colágeno desenvolve uma estrutura hexagonal devido aos cristais de gelo formados e a porosidade é controlada pelo raio da liofilização e deve ser suficiente para migração celular e difusão de nutrientes, mas também para adesão celular em suas diferentes aplicações (SORUSHANOVA et al., 2019).

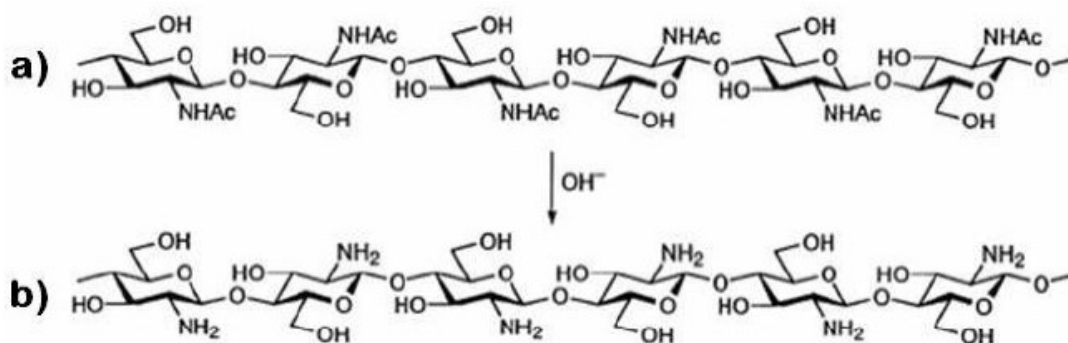


**Figura 2:** Esquema ilustrativo da formação de uma esponja de colágeno. Durante o processo de liofilização, a solução de colágeno passa por processos de congelamento e sublimação para formação de poros. O congelamento provoca a cristalização da estrutura em um formato hexagonal. Fonte: Sorushanova et al, 2019.

## 1.3 Bioativos

### 1.3.1 Quitosana

A quitosana (CS) é um biopolímero natural linear composto por uma superfície hidrofílica que promove adesão celular, proliferação e diferenciação, conferindo propriedades tais como: biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade e alta viabilidade em diferentes formas e estruturas (AHMED et al., 2018; KIM et al., 2018; ORYAN; SAHVIEH, 2017). É um produto derivado da quitina por meio da desacetilação desta com soluções químicas básicas, que provocam o rompimento de ligações N-acetil e resultam em D-glicosamina. O nível de desacetilação influencia no processo de reparação tecidual com uso desse biopolímero (AHMED et al., 2018; DIAS, 2012) (Figura 3).



**Figura 3:** Desacetilação da quitina. Estrutura química da quitina (A) que sofre desacetilação na presença de uma solução básica como hidróxido de sódio ou de potássio, resultando na quitosana (B). Fonte: Dias, 2012.

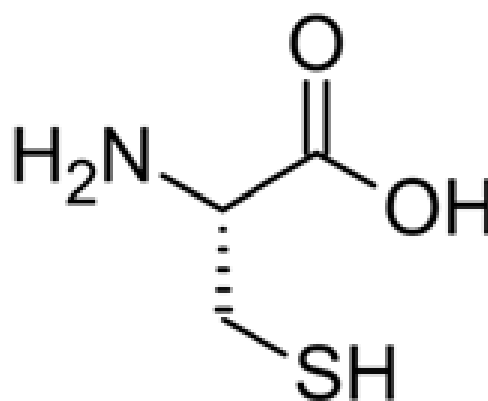
Além disso, devido aos grupamentos amino positivamente carregados na estrutura desse carboidrato, este torna-se mucoadesivo o que promove a capacidade de ligação às membranas celulares. Não somente, a quitosana apresenta porosidade adequada, mas em alguns estudos foi comprovada que sua combinação ao colágeno gerou melhor desempenho quanto à porosidade e capacidade regenerativa (AHMED et al., 2018; CAO et al., 2020; KIM et al., 2018; ORYAN; SAHVIEH, 2017). Além disso, a CS tem sido utilizada como *scaffold*, devido às suas propriedades biológicas como aumento da produção de homeostasia pela redução do tempo de coagulação sanguínea; e angiogênese, assim como modulação inflamatória e pela

proximidade com a estrutura dos glicosaminoglicanos, tanto em 2D para tratamento de feridas como em 3D na engenharia tecidual (KIM et al., 2018; ORYAN; SAHVIEH, 2017).

A saber, hidrogéis de quitosana apresentam propriedades mecânicas compatíveis à tecidos moles o que promove o reparo tecidual, assim como esponjas de CS usadas em feridas cutâneas (ORYAN; SAHVIEH, 2017). Dessa forma, no estudo foi realizado o *crosslink* da quitosana com o material colagenoso, assim como foi desenvolvido um *scaffold* da quitosana isolada e da quitosana com NAC/ $\epsilon$ -PL para análise comparativa *in vitro*. Posteriormente, poderá ser avaliado o desempenho e funcionalidade dos *scaffolds*, potencialmente, na medicina regenerativa.

### 1.3.2 NAC/ $\epsilon$ -PL

No mesmo parâmetro, a N-acetilcisteína (NAC) (Figura 4), ou (R)-2-acetamido-3-ácido mercaptopropanóico correspondente à fórmula molecular  $C_5H_9NO_3S$ , é uma configuração estável do aminoácido L-cisteína com um grupo acetil em sua estrutura, tendo sua aplicação terapêutica para diversas desordens metabólicas, neurotoxicidade, hepatotoxicidade e imunotoxicidade. Dentre as propriedades destaca-se a ação antioxidante e anti-inflamatória por moderar a liberação das citocinas como  $TNF\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ; (ELBINI DHOUIB et al., 2016).



**Figura 4:** Fórmula estrutural da N-acetilcisteína. Fonte: Google Imagens

Por outro lado, a  $\epsilon$ -polisina ( $\epsilon$ -PL) (Figura 5) é uma poliamida que consiste de 25 a 30 resíduos de L-lisina com um grupamento  $\epsilon$ -amino e  $\alpha$ -carboxil que apresenta ampla atividade antimicrobiana contra fungos, leveduras, bactérias gram positivas e gram negativas. Além de ser solúvel, apresenta baixa toxicidade ao meio ambiente e humanos, biodegradabilidade e estabilidade térmica. Quimicamente, alterações no grupo  $\epsilon$ -amino com compostos ésteres, geralmente adiciona um grupo reativo tiol à molécula de polilisina, conseqüentemente esta reação com tiol resulta a uma ligação dissulfeto ou tioéter (SHUKLA et al., 2012; WANG et al., 2021a, 2021b). Assim como, elementos que contenham grupo carboxila são ativados por carbodiimida (1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] ou EDC) e promove uma ligação peptídica com  $\epsilon$ -amino (PEREIRA,R. 2014; TANTA, 2017)

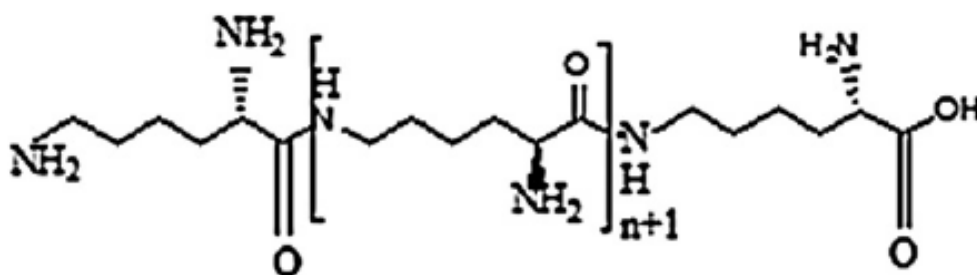


Figura 5: Fórmula estrutural da  $\epsilon$ -polisina. Fonte: Shukla et al, 2012.

O composto EDC possui capacidade de melhora das propriedades mecânicas do colágeno, assim como aumenta a resistência deste à degradação enzimática sendo um agente de ligações cruzadas bastante utilizado na odontologia e com aplicações na engenharia tecidual como *crosslinker* inespecífico (ADAMIAK; SIONKOWSKA, 2020; GOODARZI et al., 2019; PEREIRA,R. 2014; TANTA, 2017).

Diante disso, a presença do grupo tiol e carboxila da NAC podem promover ligações covalentes com  $\epsilon$ -PL resultando em um potencial *crosslink* com o colágeno comercial e do biomaterial de estudo, assim como potencializar as propriedades terapêuticas dos bioativos pela não toxicidade, ações antimicrobianas, solubilidade e biodegradabilidade.

## 1.4 Análise e validação do *scaffold*

### 1.4.1 Ensaio de citotoxicidade

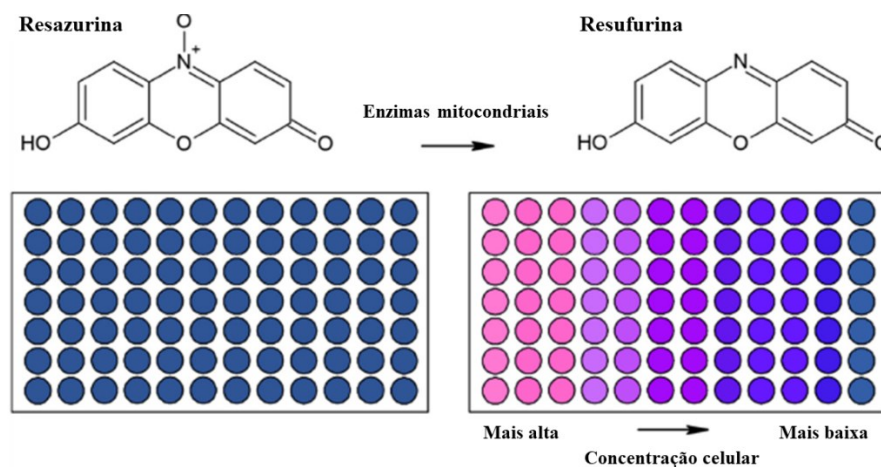
A célula é a condutora da informação hereditária a qual define uma espécie, assim como a maquinaria responsável para obtenção de recursos metabólicos fundamentais na manutenção da vida (ALBERTS, B. et al, 2010). A utilização de células em cultivo possibilita o conhecimento dos processos biológicos, assim como a análise dos efeitos de uma substância no metabolismo celular.

Uma das linhagens celulares amplamente utilizadas nas pesquisas biológicas é a de queratinócitos (KCs) imortais aneuplóides espontaneamente transformados da epiderme humana, HaCat devido a capacidade de diferenciação e alta proliferação. O objetivo desse estudo foi a avaliação da viabilidade dos KCs imortalizados na presença do *scaffold* desenvolvido, complementarmente houve a análise estrutural e morfológica do biomaterial para potencial aplicação *in vivo* (COLOMBO et al., 2017; SADEGHI-AVALSHAHR et al., 2017). Dessa forma, a extrapolação dos dados obtidos *in vitro* com materiais referenciados se torna possível e reprodutível, devido a sensibilidade e acessibilidade dos estudos de biocompatibilidade (ROGERO et al., 2003).

Nesse princípio, o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, indica o ensaio de citotoxicidade que consiste na avaliação da biocompatibilidade de qualquer material com aplicação biomédica para comprovar a não toxicidade. Neste ensaio também é possível verificar as alterações celulares provocadas pelo contato direto ou indireto do material com uma cultura celular, estas modificações são analisadas pela incorporação de corantes (LIGASOVÁ; KOBERNA, 2021; ROGERO et al., 2003).

O parâmetro utilizado nesta avaliação é a viabilidade celular validada, como mencionado, pelo uso de corantes como a resazurina (Alamar Blue®), a forma oxidada da 7-

hidroxi-3H-fenoxazina-3-1-10-óxido (LIGASOVÁ; KOBERNA, 2021). É uma substância indicadora de oxirredução e não fluorescente em sua forma não oxidada, sendo reduzida por sua propriedade como acceptor de elétrons do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH), assim como da coenzima dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH), da dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH), mononucleotídeo de flavina (FMNH) e enzimas desidrogenases citosólicas e mitocondriais; em um elemento fluorescente de cor vermelha ou rosa, a resufurina (BACHINSKI, 2015) (Figura 6).



**Figura 6: Ensaio de viabilidade celular com resazurina.** Imagem representativa de uma placa de 96 poços de cultivo celular com resazurina demonstrando a reação colorimétrica de oxirredução. Fonte: Adaptado de Ligasová e Koberna, 2021.

De forma complementar e comparativamente no estudo, foi realizado um ensaio otimizado para filtros FITC e Texas Red no microscópio de fluorescência com dois fluoróforos, sendo neste estudo utilizado Iodeto de Propídeo e Calceína. O iodeto de propídeo (PI)(Figura 7A) é um agente fluorescente utilizado como corante de células e ácidos nucleicos em citometria de fluxo e em análises de ciclo celular ou viabilidade celular. A sua interação com o ácido desoxirribonucleico (DNA) faz com que sua emissão máxima se descola para 617 nm em uma fluorescência laranja avermelhada, sendo detectado pelo filtro Texas Red, cujo especificações abrangem comprimentos de ondas entre 559 nm e 630 nm (GIVAN, 2004; PALMA, 2005).

al qual, o acetóxil-metil-éster de calceína (Figura 7B) é um diéster convertido por esterases intracelulares, enzimas hidrolases de ligações éster, em calceína quando há integridade celular produzindo fluorescência verde com uma excitação/emissão de 495/515 nm, sendo detectado pelo filtro FTIC que abrange entre 480 nm e 530 nm (PALMA, 2005).

**Figura 7:** Estrutura química da Calceína AM (A) e do Iodeto de Propídeo (B) utilizados no ensaio Live/Dead.  
Fonte: Google Imagens.

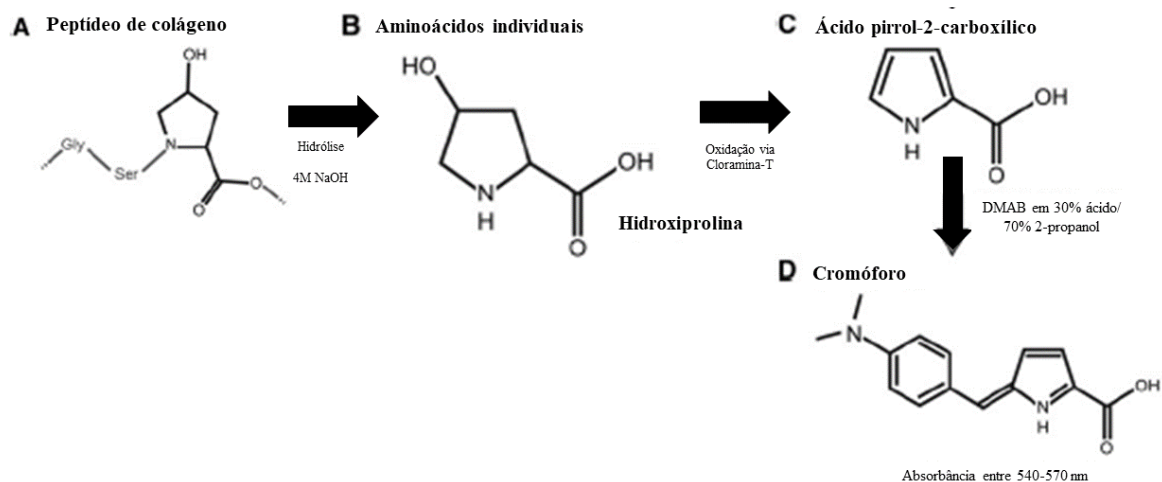
Com o propósito de avaliar a toxicidade das diferentes formulações dos *scaffolds* em diferentes concentrações, os ensaios de viabilidade e citotoxicidade fornecerão os dados apropriados e seguros para o *screening* biológico. Além disso, este estudo se ramifica na análise estrutural do biomaterial sem e com *crosslink* e dos níveis de colágeno que compõem as amostras por meio de uma metodologia quantitativa indireta.

#### 1.4.2 Ensaio de hidroxiprolina

A hidroxiprolina (Hyp) é produto da hidroxialquilação da prolina catalisada pela prolil hidroxilase e sua ocorrência é restrita e distribuída em colágeno consistindo em 13,5% de sua composição, sendo assim o estudo do metabolismo e regulação da proteína é possível pela medição do conteúdo de Hyp (G. KESAVA; CHUKUKA S., 1996).

Dessa forma, o método para análise da quantidade de colágeno em tecidos biológicos consiste na quantificação indireta da hidroxiprolina, sendo o padrão ouro para avaliação da Hyp, a cromatografia. Todavia devido ao baixo rendimento e custo relativamente alto, Neuman e Logan (1950) desenvolveram um estudo colorimétrico com uso do espectrofotômetro para medir a absorvância e converter a quantidade do aminoácido em colágeno (CISSELL et al., 2017; NEUMAN; LOGAN, 1950).

Essa nova metodologia desenvolvida por Neuman, Logan (1950) consiste na hidrólise do peptídeo de colágeno presente no tecido analisado (Figura 8). Ao ser hidrolisado, a biomolécula é isolada em conjuntos de aminoácidos, sendo que a hidroxiprolina, durante o experimento, sofre oxidação pela tosilcloramida sódica ( $CH_2C_4H_2SO_4NClNa$ ) e o produto da reação é o pirrol-2-carboxílico que reage com p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) liberando um cromóforo identificado no espectrofotômetro. Posteriormente os valores obtidos da luz absorvida (absorbância) são convertidos em níveis de colágeno.



**Figura 8:** Imagem representativa do peptídeo de colágeno hidrolisado sendo convertido em Hyp oxidada via Cloramina T em ácido pirrol-2-carboxílico que ao reagir com o p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) libera um cromóforo quantificado por espectrofotômetro. Fonte: Adaptado de Cissel et al, 2017.

O ensaio de Neuman e Logan (1950) requer quantidades baixas de proteína e gera um cromóforo resultante da reação entre a hidroxiprolina e p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) utilizado nos reagentes de Ehrlich e de Kovacs. Dessa forma, tem sido amplamente utilizado nos ensaios biológicos (CISSELL et al., 2017).

### 1.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica utilizada na análise da microestrutura como método de predição das propriedades de um material, assim como o entendimento da correlação morfológica com as características do objeto de estudo (LI et al.,



2018). Ela foi utilizada em uma análise qualitativa neste estudo para confirmar o nível de porosidade do *scaffold* para suas futuras aplicações regenerativas.

Portanto a abordagem utilizada para caracterização e estudo do *scaffold* desenvolvido foi a quantificação indireta e a avaliação microestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Mediante isto, o trabalho propõe a caracterização de um *scaffold* poroso oriundo de uma membrana colagenosa processada em forma de pré-gel comparativamente com um *scaffold* de colágeno comercial combinados quimicamente com compostos bioativos para avaliação em contato com células HacaT.

## 2. OBJETIVOS

**Objetivo geral:** Desenvolver dois *scaffolds* porosos distintos, sendo um com a realização de *crosslink* do biomaterial colagenoso com compostos bioativos como Nac-εPL e quitosana comparativamente com outro de colágeno comercial nas mesmas condições.

### **Objetivos específicos:**

- Avaliar e comparar os efeitos do *scaffold* em cultivo celular.
- Quantificar os níveis de colágeno.
- Caracterizar de forma qualitativa a estrutura morfológica do material desenvolvido por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## 3. METODOLOGIA

### 3.1 DESCELULARIZAÇÃO

Após o recebimento das membranas de origem suína, estas foram submetidas a um protocolo de descелularização químico enzimática (sob sigilo de patente, nº. WO2021159198 (A1)) com duração de aproximadamente 72 horas.

### **3.1.1 VALIDAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO**

A fim de confirmar a eficiência do processo de descелularização foram realizadas extrações de DNA com kit comercial, quantificações no espectrofotômetro e avaliação histológica com coloração em hematoxilina e eosina.

#### **3.1.1.1 EXTRAÇÃO DE DNA**

Posteriormente à descелularização, foi extraído DNA total e quantificado a partir de fragmentos de 20-30 mg da membrana descелularizada e liofilizada conforme manual técnico da Promega (*ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System*) adaptado. As amostras foram submetidas à extração de DNA, de acordo com instruções do um kit *DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen)*. Em seguida estas foram quantificadas pelo *NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000* a 260 nm e sujeitas à visualização por eletroforese em gel de agarose 1% com marcador de 1 kb DNA plus ladder (Invitrogen).

#### **3.1.1.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA**

As membranas *in natura* (controles) e descелularizadas foram fixadas em solução de formalina 10% (100 ml de formaldeído em 900 ml de água destilada) para avaliação histológica em um intervalo de 24 a 48 horas seguida de uma lavagem em água corrente por 2 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol, sendo de 70% a 100% no intervalo de 4 horas em cada solução.

Os tratamentos seguintes constituíram o processo de clareamento com xilol (10 vezes o volume da peça utilizada) em temperatura ambiente para remoção do álcool por 2 hora e impregnados em parafina líquida em estufa a 60°C por 3 horas. Seguida da inclusão em parafina líquida para secção. Por fim, os blocos foram seccionados utilizando um micrótomo em cortes

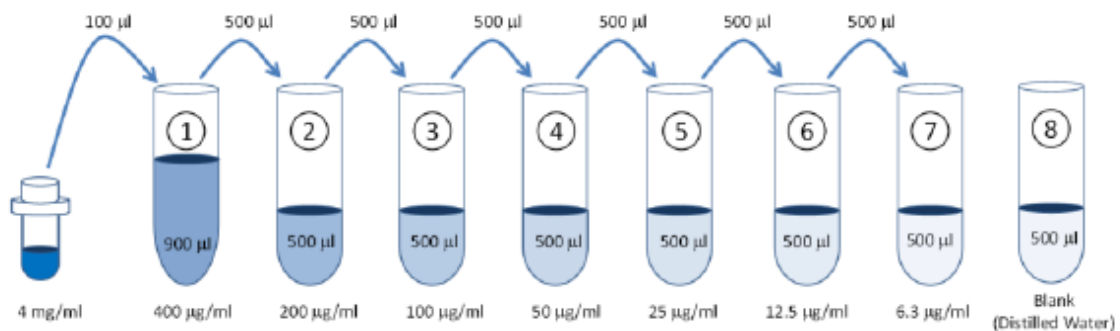
de 5µm de espessura. Após a realização dos cortes, foi realizada a coloração por hematoxilina e eosina.

Conforme procedimentos gerais de histologia para a coloração, houve previamente a desparafinização do material, hidratação com uso de sequencias alcoólicas em concentrações decrescentes (álcool 100%, 95%, 80%) até água destilada; imersão do tecido em hematoxilina e eosina, desidratação gradativa em soluções crescentes de álcool, clarificação com xilol e montagem da lâmina analisada.

As lâminas foram escaneadas no aparelho *ScanScope AT Turbo* (Rede de Laboratórios Multiusuários da UFU (Relam)) em uma objetiva de 20x para digitalização das imagens.

### 3.2 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

Com a finalidade de determinar o conteúdo de colágeno do *scaffold* preparado foi realizado o ensaio de quantificação indireta por hidroxiprolina em que a amostra de pré-gel foi solubilizada em HCl 12 M (37% v/v) em proporção de 1:1 e incubada a 120°C por 24 horas, conforme protocolo desenvolvido por Kesava et al (1996). Posteriormente para a composição da curva foram retirados 100 µl de uma solução padrão de hidroxiprolina (4 mg/ml) e adicionados 900 µl para obtenção de 400 µg/ml da concentração, posteriormente conforme protocolo (Figura 9) houve a diluição da hidroxiprolina de forma seriada:



**Figura 9:** Imagem representativa da diluição seriada da hidroxiprolina para obtenção da curva. Fonte: Retirado de Hydroxyproline Assay Kit, Chondrex, Inc®

Foram realizadas três diluições sendo 1:2, 1:4 e 1:8 das amostras do pré-gel e colágeno para a quantificação. Após este processo, houve o plaqueamento de 10 µL de cada diluição, em triplicata, numa placa de 96 poços que foi mantida a 50°C. Em seguida, foram adicionados 100 µL de Cloramina T e incubado por 5 min a temperatura ambiente e adicionados 100 µL do Reagente de Ehrlich para incubação a 60°C por 90 minutos. Por fim, a placa foi lida em um espectrofotômetro a 560 nm e os dados obtidos foram analisados e calculados com base na curva obtida e na média das amostras em relação à concentração de hidroxiprolina no colágeno

### 3.3 DESENVOLVIMENTO DO *SCAFFOLD* POROSO

Para o desenvolvimento do *scaffold*, o biomaterial de colágeno derivado da membrana descelularizada foi processado para formação de um pré-gel. As membranas descelularizadas foram liofilizadas utilizando liofilizador de bancada (*Liotop L101®*) *overnight* e a cada 300 mg houve solubilização em 30 ml de ácido acético 0,5 M, posteriormente foi adicionado 9 mg de pepsina (*Sigma-Aldrich®*) para digestão do colágeno e a solução foi incubada por 48 h sob agitação a 25°C.

Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 500 G para descarte de *pellet* formado. Finalmente, o pH do pré-gel puro formado foi ajustado com uso de NaOH 10 M entre 6,8 e 7,4 em gelo para não haver solidificação da amostra, depois o pré-gel foi armazenado a 4°C até seu uso, onde foi diluído em PBS 1X conforme protocolo padronizado para formação do *scaffold*. Após a homogeneização do *scaffold* de pré-gel e bioativos, as amostras foram distribuídas em placas de cultura celular para modelação do *scaffold*, congeladas a -80°C e em seguida liofilizadas por 24 horas.

O pré-gel foi usado para a obtenção do *scaffold* poroso através da adição de quitosana a 2% p/v (1 mg/ml) e NAC/ε-PL (1:1). A quitosana foi previamente diluída em ácido acético a

0,1M, sob agitação *overnight* em temperatura ambiente e foi gotejada sob agitação nas amostras de pré-gel em diferentes concentrações para *screening* (1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml e 3 mg/ml).

Além disso, para o *crosslink* do colágeno (Sigma®) e da quitosana foram adicionados 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) (1 mg/ml) em que a proporção foi 1:1, conforme protocolos de Cao et al (2020) e Campos et al (2020) adaptados.

Sete diferentes formulações nas concentrações de 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml e 3 mg/ml foram obtidas para esta pesquisa, tendo sido colágeno-quitosana, colágeno e NAC/ε-PL (NE), colágeno-quitosana-NE, quitosana-NE, pré-gel e quitosana, pré-gel e NE; e pré-gel-quitosana-NE. Após o *crosslink* dos componentes foi usada uma placa de 96 poços para molde dos *scaffolds*, congeladas a -80°C e liofilizadas por 24 horas para avaliação da porosidade e citotoxicidade do material.

### 3.4 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE

Na avaliação da citotoxicidade foi usado o método de viabilidade celular colorimétrico com 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido, a rezasurina (Alamar Blue®) e analisado pela leitura da fluorescência através do espectrofotômetro conforme protocolo adaptado (SILVA, 2009)A metodologia utilizada foi a de contato indireto devido à solubilização do *scaffold* em meio de cultura.

As células de queratinócitos humanos (HaCat) foram cultivadas no meio modificado Dulbecco MEM (DMEM) (Gibco, Thermo Fisher, São Paulo, Brazil), suplementado com soro fetal bovino 10% (Cultilab, Campinas, Brazil) e gentamicina 1% (Sigma-Aldrich) em condições de cultivo celular a 37°C, com 95% de umidificação e 5% de CO<sub>2</sub> até a confluência. Para este ensaio, as células (HaCat) foram plaqueadas em placa de 96 poços em concentração

igual a  $2 \times 10^4$  por poço e mantidas na estufa de  $CO_2$  por 24h. Os *scaffolds* foram preparados em diferentes concentrações para *screening* (1 mg/mL; 1,5 mg/mL; 2 mg/mL e 3 mg/mL) e diferentes formulações incubados em 200  $\mu$ L de meio de cultura e conservados em estufa a 37°C durante 24h para liberação do extrato.

Posteriormente à incubação, foram pipetados 100  $\mu$ L do meio contendo extrato do *scaffold* e transferidos para a placa de 96 poços contendo  $1 \times 10^4$  células por poço. Após 72 horas, as células foram incubadas com 20  $\mu$ L/poço na solução de Alamar Blue® (3 nM) e mantidas por 3 horas a 37°C. No ensaio, foi utilizado como controle positivo as células tratadas com dimetilsulfóxido 5% (DMSO). E o cálculo foi fundamentado na média da absorbância do controle negativo:

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \text{Abs (dose)} * 100 / (\text{média abs(controls)})$$

Baseado nos resultados obtidos no *screening* foi determinada a dose não citotóxica para as células e assim futuras aplicações biomédicas.

#### **3.4.1 LIVE/DEAD (L/D)**

Ao ser determinada a dosagem não citotóxica foi realizado o *live/dead assay (L/D)* conforme o protocolo do Johns Hopkins adaptado (JOHNS HOPKINS, [s.d.]) com uso de dois fluoróforos, Iodeto de Propídio (ThermoFischer®) e Calceína (Invitrogen®), para a análise de viabilidade celular como resultado complementar ao ensaio com Alamar Blue. As células foram tratadas conforme o ensaio anterior e analisadas após 72 horas no microscópio de fluorescência (*EVOS fl Advanced Microscopy Group*®).

#### **3.4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados de absorbância obtidos no ensaio de viabilidade com resazurina foram analisados estatisticamente em software de estatística GraphPad Prism 9.0, foram avaliados quanto à variância das amostras (2way ANOVA).

### **3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

A fim de verificar a porosidade dos *scaffolds* foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Universidade Federal de Uberlândia, conforme metodologia convencional (KITAJIMA e LEITE, 1999). As amostras foram revestidas com camadas de ouro (Au) para observação a 10kv em diferentes níveis de amplitude (30x, 100x, 400x, 800x, 1600x) utilizando o microscópio eletrônico (Zeiss EVO MA10) e posterior análise do tamanho dos poros.

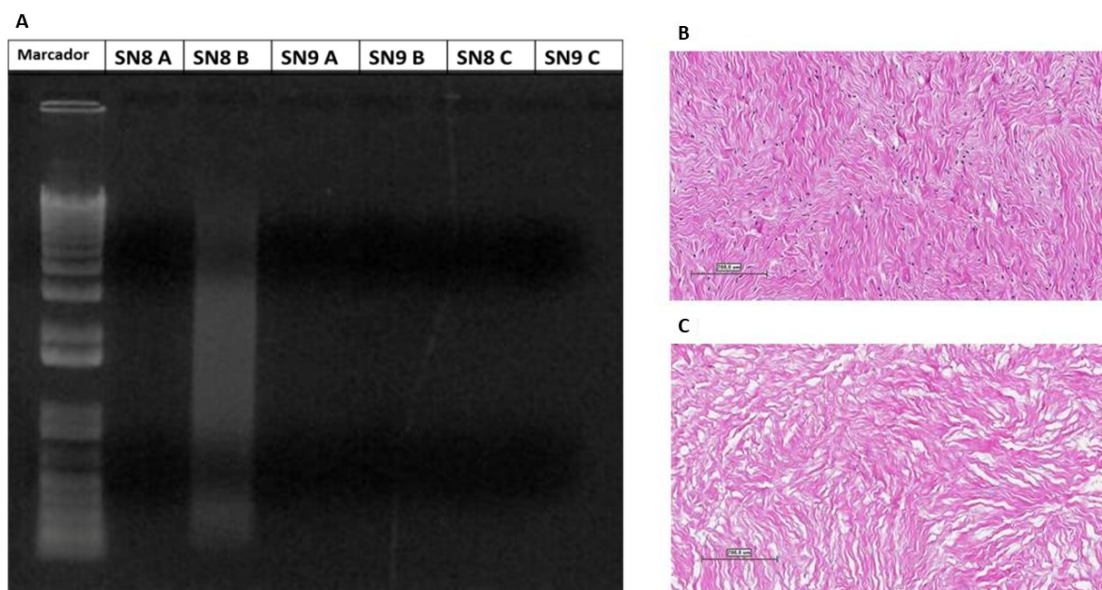
## **4. RESULTADOS**

### **4.1 DESCELULARIZAÇÃO**

Após decorridas as 72 horas referentes ao processamento e tratamento químico das membranas colagenosas de origem animal foi realizada a comprovação quantitativa da remoção de material genético pela extração e quantificação do DNA por espectrofotometria e qualitativa da manutenção da matriz extracelular pela avaliação histológica.

#### **4.1.1 VALIDAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO**

Após o processo de descelularização, a quantificação de DNA por espectrofotometria apresentou a quantidade média de 30 ng/mg de DNA extraído por miligrama de tecido. A ausência de bandas íntegras no gel valida a escassez de material genético e comprova o processo eficiente de descelularização do biomaterial. (Figura 10 A).



**Figura 10:** Validação da descélularização da membrana. Imagem representativa do gel de agarose 1% referente a extração de DNA das membranas submetidas à descélularização à esquerda com marcador 1kb plus ladder (Invitrogen), sendo SN8A-C e SN9A-C referente aos lotes de cada membrana utilizada e descélularizações diferentes (A). À direita, imagens representativas da análise histológica de uma membrana in natura (B) com núcleos marcados com hematoxilina (cor roxa) e descélularizada (C), ausente de núcleos

E por meio da análise histológica (coloração HE) verificou-se ausência de núcleos intactos (pontos roxos) o que demonstra eficácia da descélularização a partir do ensaio de descélularização (Figura 10 B e C). Assim como a ausência de células (sem núcleos marcados com eosina) no grupo descélularizado na coloração de HE.

## 4.2 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

No presente estudo foi utilizada uma quantificação indireta do colágeno fundamentada em uma metodologia analítica de medição da hidroxiprolina, um aminoácido pós traducional produto da hidroxilação da prolina e presente nos tecidos conjuntivos do colágeno por análise de absorvância por meio de espectrofotômetro. Dessa forma, na análise foi obtida a curva padrão de hidroxiprolina (Figura 12) por meio dos valores presentes na Tabela 1:



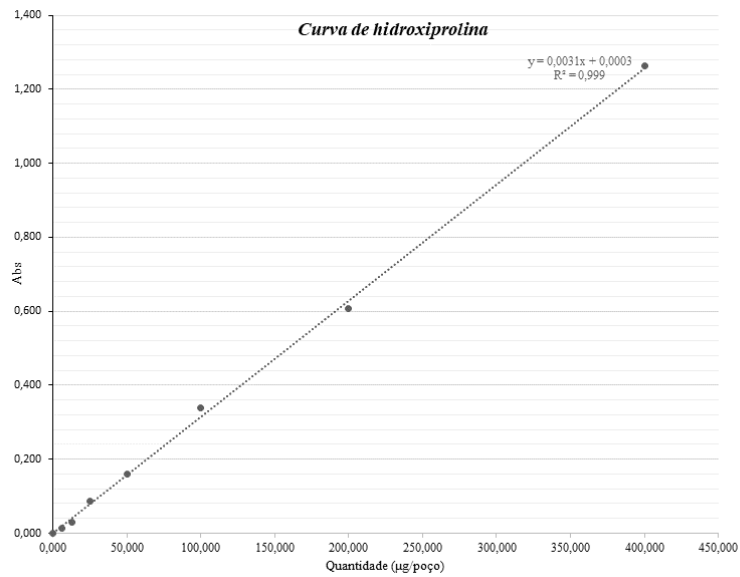


Gráfico 1: Curva de hidroxiprolina

**Figura 12:** Curva padrão de hidroxiprolina. Absorbância x Quantidade de hidroxiprolina por poço para quantificação indireta do colágeno ( $R^2=0,999$ )

Quantidade (µg/poço)	Absorbância
400,00	1,262
200,00	0,607
100,00	0,339
50,00	0,160
25,00	0,086
12,50	0,030
6,25	0,013
0,00	0,000

**Tabela 1:** Quantidade de hidroxiprolina por poço e média da absorbância obtida e do branco para obtenção da curva de hidroxiprolina

As amostras de pré-gel (10 mg/ml) e colágeno (6 mg/ml) foram diluídas nas seguintes proporções 1:2; 1:4 e 1:8 para quantificação do conteúdo colagenoso. Por meio dos dados de absorbância foi possível quantificar a quantidade de hidroxiprolina por amostra e concentração:

<i>Amostra</i>	<i>Fator de Diluição</i>	<i>[ ] Hidroxiprolina <math>\mu\text{g/ml}</math></i>
<i>Pré-gel 1:2</i>	2	1335,957
<i>Pré-gel 1:4</i>	4	1507,183
<i>Pré-gel 1:8</i>	8	1582,968
<i>Colágeno 3</i>	2	854,875
<i>Colágeno 1,5</i>	4	884,659
<i>Colágeno 0,7</i>	8	954,982

**Tabela 2:** Cálculo da concentração de hidroxiprolina nas amostras de pré-gel e colágeno. Quantidade de hidroxiprolina em soluções de pré-gel e colágeno para obtenção da concentração da hidroxiprolina.

A concentração de hidroxiprolina em cada amostra foi calculado por meio da seguinte equação:

$$[ ]\text{Hidroxiprolina} = \frac{\text{hidroxiprolina} \times \text{volume da amostra} + \text{volume HCl}}{\text{volume da amostra}}$$

Consequentemente os valores obtidos da concentração, considerando o fator de diluição correspondente a cada proporção, foram convertidos em níveis de colágeno por meio da fórmula:

$$\text{Colágeno} = \text{hidroxiprolina} \times \frac{100}{13.5}$$

Como a hidroxiprolina representa 13,5% da composição de colágeno, obtiveram-se os seguintes valores:

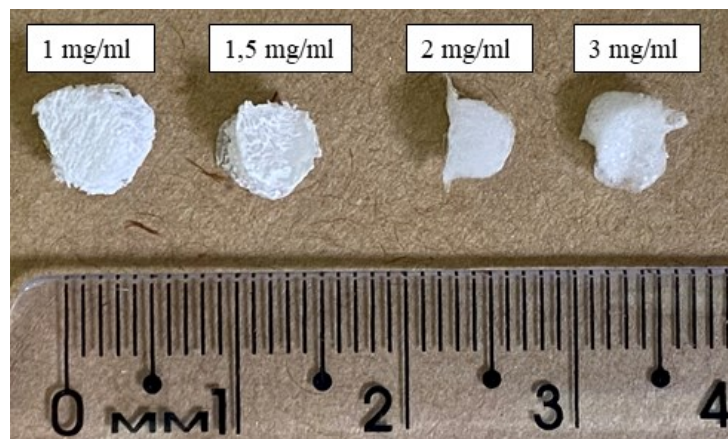
<i>Amostra</i>	<i>Média (Abs)</i>	<i>[ ] colágeno <math>\mu\text{g/ml}</math></i>
<i>Pré-gel 1:2</i>	1,122	9895,977698
<i>Pré-gel 1:4</i>	0,670	11164,31701
<i>Pré-gel 1:8</i>	0,393	11725,68698
<i>Colágeno 3</i>	0,881	6332,404089
<i>Colágeno 1,5</i>	0,498	6553,03332
<i>Colágeno 0,7</i>	0,308	7073,941325

**Tabela 3:** Concentração de colágeno por amostra

A média da concentração de colágeno nas amostras de pré-gel foi de 10928,66  $\mu\text{g/ml}$  e de colágeno de 6653,12  $\mu\text{g/ml}$ .

### 4.3 DESENVOLVIMENTO DO *SCAFFOLD* POROSO

Após a liofilização, os *scaffolds* foram obtidos conforme exemplifica-se a figura abaixo:



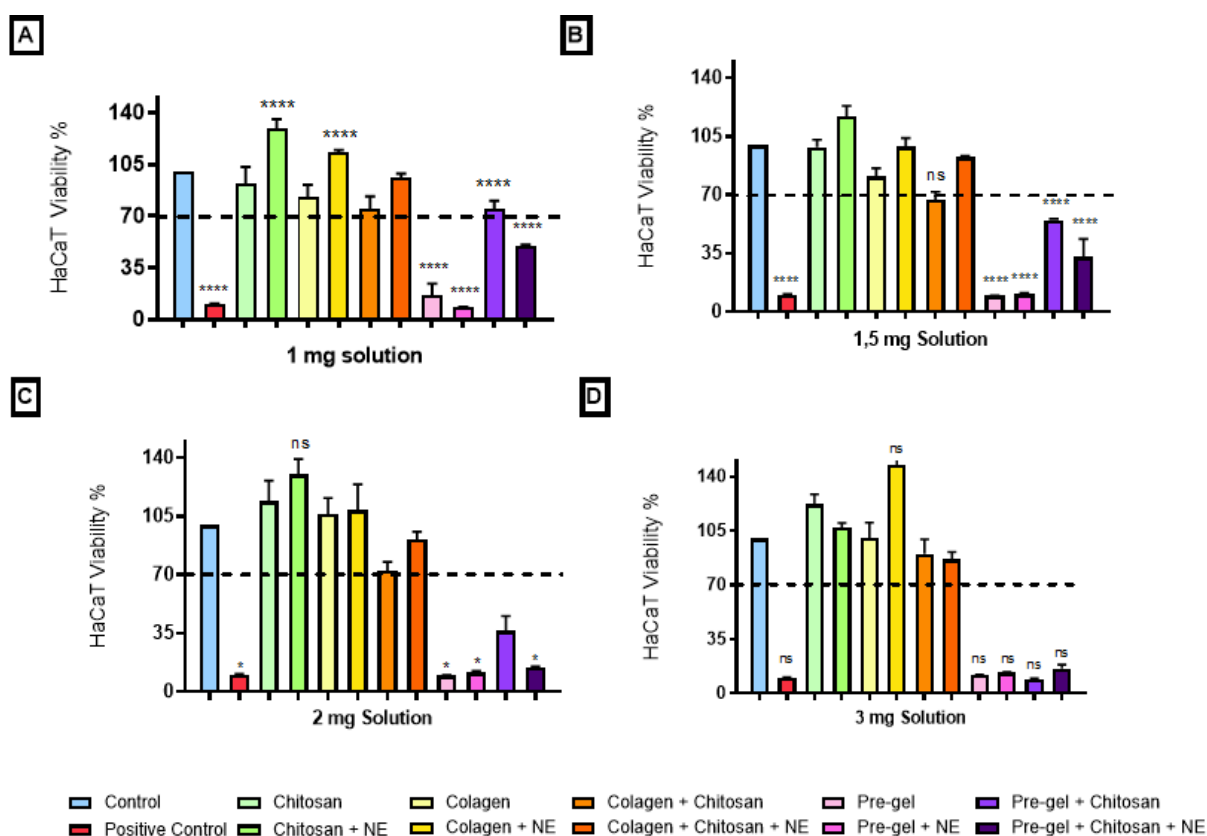
**Figura 11:** Desenvolvimento de *scaffolds* porosos nas concentrações de 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml e 3 mg/ml respectivamente.

Percebe-se que os moldes obtidos dos *scaffolds* apresentam uma aparência mais porosa nas diferentes concentrações e espessura decrescente. Sendo que em concentrações de 2 mg/ml e 3 mg/ml após a liofilização houve uma deformação após a retirada do biomaterial da placa de 96 poços em sucessivas repetições. A 1 mg/ml notou-se que o material não apresentava uma aparência “esponjosa” como a 1,5 mg/ml.

### 4.4 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE E L/D

Para avaliação celular metabólica foi utilizado método colorimétrico utilizado com a rezasurina, Alamar Blue (Sigma®), pelo qual foi determinada a dosagem não citotóxica do biomaterial por meio da análise da fluorescência através de um fluorímetro. Conforme a ISO 10993:5 (2009), amostras em teste que reduzem a viabilidade celular para valores inferiores a 70% devem ser consideradas citotóxicas (MASSON; LOMBELLO, 2016)

Os dados obtidos foram plotados no programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) para quantificação que determinaram as concentrações do *screening* viáveis para aplicação ( $\alpha = 0.05$ ), conforme a figura abaixo:



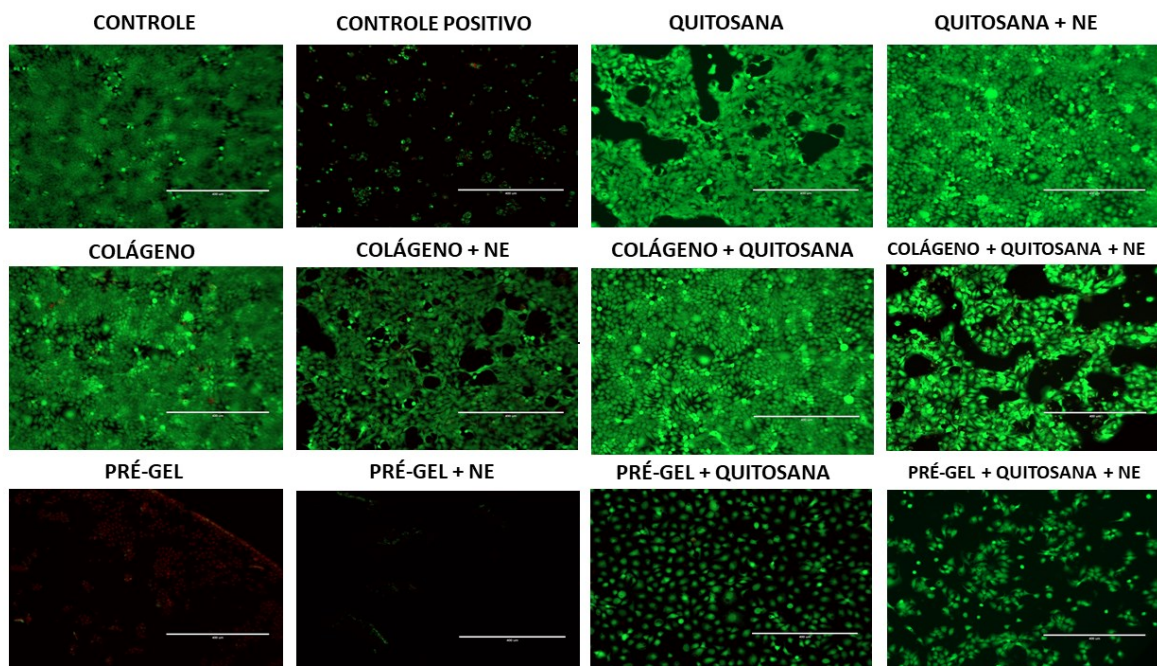
**Figura 13:** Análise da viabilidade da HaCat em meio DMEM por contato indireto por extrato do *scaffold* em concentrações de 1 mg/ml (A); 1,5 mg/ml (B); 2 mg/ml (C) e 3 mg/ml (D) das formulações de quitosana, colágeno, colágeno-quitosana, pré-gel, pré-gel e quitosana, quitosana-NE, colágeno-NE, colágeno-quitosana-NE, pré-gel e NE; e pré-gel, quitosana e NE; e controles positivo (DMSO) e negativo. ( $\alpha=0.05$ )

No gráfico acima observou-se que em todas as concentrações as combinações de pré-gel e pré-gel + NE obtiveram comportamento próximo ao controle positivo em que as células foram tratadas com DMSO, ou seja, houve alta porcentagem de mortalidade celular. Apenas o pré-gel + quitosana a 1 mg/ml apresentou valor superior a 70% de viabilidade celular, todavia a 1,5; 2 e 3mg/ml o biomaterial foi considerado citotóxico por apresentar viabilidade celular abaixo de 70%. Os *scaffolds* de colágeno e combinações, assim como de quitosana não foram citotóxicos e em sua maioria apresentaram valores superiores ao controle negativo em que não houve nenhum tratamento das células, possibilitando a proliferação celular na presença desses

materiais. Mediante isto, conclui-se que as formulações obtidas com colágeno comercial tiveram melhor desempenho comparado as do pré-gel em cultivo celular nas diferentes concentrações.

E dentre os *scaffolds* obtidos do pré-gel, a melhor performance foi representada no *crosslink* com quitosana apresentando maior viabilidade celular a 1 mg/ml. Sendo assim, para os demais ensaios foi utilizada a dosagem não citotóxica de 1,0 mg/ml.

Como complementação aos resultados de citotoxicidade celular foi realizado o ensaio de Live/Dead (L/D) com uso de dois fluoróforos, Iodeto de Propídio e Calceína nos *scaffolds* com concentração de 1,0 mg/ml e as imagens foram obtidas por meio da microscopia de fluorescência (EVOS fl Microscope® – Advanced Microscopy Group). Dessa forma, foi obtido o seguinte resultado (figura 14):



**Figura 14:** Ensaio live/dead das diferentes formulações de *scaffolds* obtidas na concentração de 1,0 mg/ml por poço coradas com iodeto de propídio (cor vermelha) e calceína (cor verde) para análise de viabilidade celular em HaCat das formulações de quitosana, colágeno, colágeno-quitosana, pré-gel, pré-gel e quitosana, quitosana-

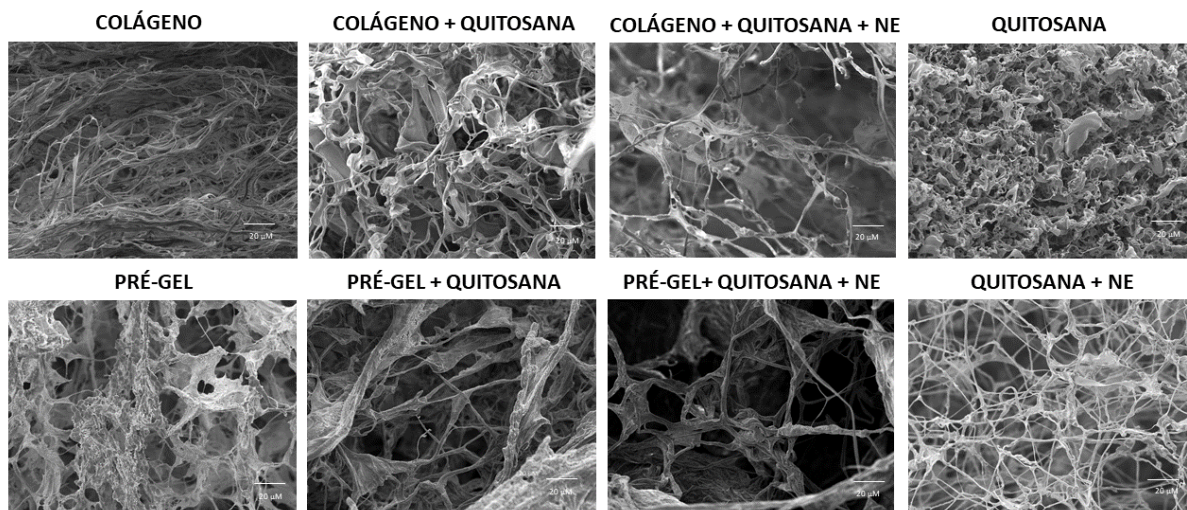
NE, colágeno-NE, colágeno-quitosana-NE, pré-gel e NE; e pré-gel, quitosana e NE; e controles positivo (DMSO) e negativo

Com base nos resultados obtidos no ensaio L/D foi possível observar a citotoxicidade do grupo pré-gel no cultivo celular pela alta marcação por iodeto de propídeo, tendo uma melhor resposta quando há a conjugação química com bioativos como a quitosana e NAC/ $\epsilon$ -PL. Por outro lado, o colágeno apresentou uma performance semelhante isolado e conjugado a quitosana, mas menor viabilidade combinado ao NE. Enquanto o desempenho obtido no *crosslink* da quitosana com NE foi satisfatório qualitativamente. Comparativamente com os resultados quantitativos da análise de citotoxicidade, o L/D corroborou com os resultados obtidos no método colorimétrico utilizado com a rezasurina.

#### **4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

Anteriormente à avaliação estrutural do *scaffold*, a membrana em sua forma não processada foi avaliada a fim de caracterizar o biomaterial e notou-se que havia presença de fibras com uma maior compactação no material de origem. Dessa forma, para a fabricação do pré-gel, que consiste na membrana descelularizada e processada, para uma gelificação e posterior formação da esponja foi realizado o *crosslink* do biomaterial processado com bioativos e os mesmos foram avaliados morfológicamente.

Para avaliação morfológica do *scaffold* foi realizada a microscopia eletrônica de varredura. Por meio dessa análise foi possível avaliar a modificação estrutural e o aumento da porosidade (abertura das fibras) do colágeno e do pré-gel quando em *crosslink* com a quitosana e NE na concentração de 1 mg/ml. Assim como da própria quitosana combinada ao NE (Figura 15).



**Figura 15:** Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura das diferentes formulações de *scaffolds* na concentração de 1 mg/ml.

## 5. DISCUSSÃO

*Scaffolds* biológicos podem ser derivados de processos que envolvem a descelularização do tecido de origem com vasta aplicação na medicina regenerativa. A etapa de remoção das células visa, com uma metodologia química ou física, a manutenção da composição nativa e das propriedades da matriz extracelular do tecido ou órgão sem provocar uma reação imunológica indesejada (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2012; KHADEMHOSEINI; LANGER, 2016).

Segundo Crapo et al, 2012, a descelularização não foi definida em parâmetros quantitativos previamente, tendo sido estabelecido na literatura por meio de estudos *in vivo*, alguns critérios mínimos como limite de 50 ng de DNA por mg de peso seco, máximo de 200 bp de fragmentos de DNA e ausência de material nuclear em análises histológicas coradas com H&E. Sendo assim, a descelularização da membrana precursora do *scaffold* desenvolvido foi efetiva pela ausência de núcleos em análise histológica (Figura 11), assim como uma quantidade média de 30 ng de DNA extraído por mg de tecido.

Mediante isso, após os dados obtidos na descelularização anteriormente padronizada (LORENTI, 2019) e das propriedades do colágeno estabelecidas na literatura (ANTONIO et

al., 2021; CAMPOS et al., 2020; CAO et al., 2020; PAWELEC; BEST; CAMERON, 2016; SHOULDERS; RAINES, 2009; SILVA; PENNA, 2012), desenvolveu-se um *scaffold* considerando as possíveis aplicações biomédicas e a demanda no âmbito da medicina regenerativa (KHADEMHOSEINI; LANGER, 2016).

Todavia, uma das limitações encontradas foi a interposição das fibras da membrana usada como matéria prima. E dessa forma, avaliou-se a necessidade de ligações cruzadas com bioativos com o propósito de aumentar a porosidade e funcionalidade do material. Sabe-se que o *crosslink* do colágeno modula as interações covalentes inatas o que influencia na integração do material com a matriz celular. Conforme, Oryan et al (2018), as modificações físico-químicas são afetadas de forma a proporcionar maior resistência mecânica, melhor desempenho em altas temperaturas e resistência à degradações enzimáticas e químicas (CAO et al., 2020; DENG et al., 2010; FANG et al., 2020; FELICIANO et al., 2021; GRABSKA-ZIELIŃSKA et al., 2020; ORYAN et al., 2018).

Embora a membrana anteriormente tenha sido caracterizada por sua biocompatibilidade (OLIVEIRA, 2019), sabe-se que a matriz precisa atender a alguns critérios como: não ser imunogênica, ser biodegradável, porosa e resistente (CHOUHAN et al., 2019). Diante disso, foi realizada a avaliação estrutural e morfológica do pré-gel isolado e combinado quimicamente com os bioativos, quitosana e NE em comparação ao colágeno nas mesmas condições, além da análise de citotoxicidade em HaCat para validar se o *scaffold* derivado da membrana atende aos requisitos de um bom biomaterial.

Primeiramente, a avaliação estrutural e morfológica por microscopia eletrônica de varredura apresentou diferenças nas porosidades dos materiais. Da mesma forma, Cao et al (2020), durante o desenvolvimento de um hidrogel para tratamento de feridas cutâneas, observou uma maior porosidade no colágeno combinado quimicamente com quitosana, assim como Fang et al (2020) e Zielinska et al (2020).



Além das propriedades físico-químicas, o *crosslink* não pode apresentar efeitos citotóxicos como é possível observar em alguns estudos de *scaffolds* biológicos e sintéticos (CAO et al., 2020; DUTTA et al., 2021; GABLER et al., 2018; GRABSKA-ZIELIŃSKA et al., 2020; SADEGHI-AVALSHAHR et al., 2017). Ressalta-se que no presente trabalho, a citotoxicidade dos *scaffolds* biológicos foram avaliadas por resazurina e live/dead, ambos comprovaram o melhor desempenho do pré-gel quando combinado à quitosana com uma viabilidade celular superior a 70% quando em uma proporção de 1mg/poço.

Inferese-se que a limitação do estudo é o contato direto da célula com o pré-gel não purificado que é comprovado na imagem eletrônica no microscópio de fluorescência (Figura 14) em que se nota uma baixa adesão celular no poço. A ISO 10993 recomenda tanto o ensaio de citotoxicidade direto quanto o indireto, e a biocompatibilidade prévia da membrana havia sido satisfatória (Oliveira 2019), o ensaio do *scaffold* foi realizado com o contato direto também para avaliar o comportamento celular da membrana processada resultando em um pré-gel e avaliar os efeitos desse processamento.

Também nos resultados do ensaio de viabilidade celular avaliou-se a correspondência com a literatura da biocompatibilidade do colágeno comercial com e sem bioativos integrados, assim como a não influência do *crosslink* químico na atividade do *scaffold*. Sabe-se que o colágeno é altamente hidrofílico o que aumenta a interação das células com o *scaffold*, assim como possui a capacidade de liberação de sinais biológicos para suportar a adesão celular e a proliferação (SADEGHI-AVALSHAHR et al., 2017).

Diversos estudos sintetizam a ação da quitosana como biomaterial devido as propriedades antimicrobianas e por facilitar processos de cicatrização (CAO et al., 2020; CHOUHAN et al., 2019; ORYAN; SAHVIEH, 2017; WANG et al., 2021b, 2013), o *scaffold* isolado da quitosana apresentou uma melhor biocompatibilidade com os queratinócitos em todas as concentrações propostas (Figura 13). Porém, a melhor performance significativamente

foi com a composição combinada ao NE, anteriormente não registrada na literatura. Conclui-se que as propriedades já descritas da N-acetilcisteína,  $\epsilon$ -polisina e quitosana são otimizadas quando em *crosslink*.

Por fim, o processamento e desenvolvimento da membrana em pré-gel para fabricação do *scaffold* registrou uma quantidade de colágeno de 109,2  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  a 665,3  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  pela caracterização indireta no ensaio de hidroxiprolina. Cissel et al (2017) observou, durante a otimização do protocolo de determinação indireta do colágeno, a concentração de 1.25 e 20  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  de colágeno.

## 6. CONCLUSÃO

Em suma, o objetivo deste trabalho era a avaliação morfológica e a atividade do *scaffold* biológico em diferentes formulações em contato com queratinócitos. Os resultados obtidos demonstraram melhor desempenho quanto a morfologia (porosidade) e viabilidade celular no scaffold desenvolvido com colágeno e quitosana assim como pré-gel + CHI +NE e CHI +NE principalmente no tratamento de feridas já atribuído na literatura dada a escolha do tipo celular sendo uma alternativa em medicina regenerativa.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o propósito de continuidade da pesquisa, os *scaffolds* desenvolvidos poderão ser avaliados em experimentos *in vivo* a determinar sua aplicação e desempenho considerando o metabolismo do animal modelo como foi utilizado em outros estudos como de Cao et al (2020).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. Biologia Molecular da Célula. 5 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010.

ADAMIAK, K.; SIONKOWSKA, A. Current methods of collagen cross-linking: Review.

**International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 550–560, 2020.

AHMED, S. et al. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, n. 2017, p. 849–862, 2018.

ANTONIO, J. D. S. et al. Collagen structure-function mapping informs applications for regenerative medicine. **Bioengineering**, v. 8, n. 1, p. 1–23, 2021.

BACHINSKI, R. F. **PADRONIZAÇÃO DE TESTES DE CITOTOXICIDADE PARA CULTIVO CELULAR EM AGREGADOS TRIDIMENSIONAIS**. [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2015.

BERTANHA, M. et al. Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds. **Experimental Cell Research**, v. 326, n. 1, p. 103–111, 2014.

CAMPOS, Y. et al. Design, construction, and biological testing of an implantable porous trilayer scaffold for repairing osteoarthritic cartilage. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 14, n. 2, p. 355–368, 2020.

CAO, J. et al. Double crosslinked HLC-CCS hydrogel tissue engineering scaffold for skin wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 625–635, 2020.

CHOUHAN, D. et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. **Biomaterials**, v. 216, n. January, p. 119267, 2019.

CISSELL, D. D. et al. A Modified Hydroxyproline Assay Based on Hydrochloric Acid in Ehrlich's Solution Accurately Measures Tissue Collagen Content. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 23, n. 4, p. 243–250, 2017.

COLOMBO, I. et al. HaCaT Cells as a Reliable in Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 2012.

DAS, S.; BAKER, A. B. Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, n. OCT, p. 1–20, 2016.

DENG, C. et al. A collagen-chitosan hydrogel for endothelial differentiation and angiogenesis. **Tissue Engineering - Part A**, v. 16, n. 10, p. 3099–3109, 2010.

DIAS, T. A. **Gel de quitosana à 2% da cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas**. [s.l: s.n.] 2012.

DUTTA, S. D. et al. 3D-printed bioactive and biodegradable hydrogel scaffolds of alginate/gelatin/cellulose nanocrystals for tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 644–658, 2021.

ELBINI DHOUB, I. et al. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. **Life Sciences**, v. 151, p. 359–363, 2016.

FANG, Y. et al. Assessment of various crosslinking agents on collagen/chitosan scaffolds for myocardial tissue engineering. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 15, n. 4, 2020.

FAULK, D. M.; WILDEMANN, J. D.; BADYLAK, S. F. Decellularization and Cell Seeding of Whole Liver Biologic Scaffolds Composed of Extracellular Matrix. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, 2014.

FELICIANO, A. J. et al. Realizing tissue integration with supramolecular hydrogels. **Acta Biomaterialia**, v. 124, p. 1–14, 2021.

G. KESAVA, R.; CHUKUKA S., E. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 225–229, 1996.

GABLER, C. et al. Biomechanical, Biochemical, and Cell Biological Evaluation of Different Collagen Scaffolds for Tendon Augmentation. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

- GIVAN, A. L. Flow Cytometry Protocols [Internet]. 2004.
- GOODARZI, H. et al. Preparation and in vitro characterization of cross-linked collagen–gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 620–632, 2019.
- GRABSKA-ZIELIŃSKA, S. et al. Physico-chemical characterization and biological tests of collagen/silk fibroin/chitosan scaffolds cross-linked by dialdehyde starch. **Polymers**, v. 12, n. 2, 2020.
- INGRAM, J. H. et al. The Use of Ultrasonication to Aid Recellularization of Acellular Natural Tissue Scaffolds for Use in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. v. 13, n. 7, 2007.
- JOHNS HOPKINS. **Cellular Viability: Calcein / Propidium Iodide Protocol**. [s.l: s.n.].
- KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. A decade of progress in tissue engineering. **Nature Protocols**, v. 11, n. 10, p. 1775–1781, 2016.
- KIM, C. H. et al. Chitosan for Tissue Engineering. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1077, p. 475–485, 2018.
- KITAJIMA, E.W. & LEITE, B. Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura. 2<sup>a</sup> Ed. Piracicaba. NAP/MEPA ESALQ. 1999. 48 p.
- LI, J. et al. Advanced SEM and TEM Techniques Applied in Mg-Based Hydrogen Storage Research. **Scanning**, v. 2018, 2018.
- LIGASOVÁ, A.; KOBERNA, K. Dna dyes—highly sensitive reporters of cell quantification: Comparison with other cell quantification methods. **Molecules**, v. 26, n. 18, 2021.
- LORENTI, S. **Padronização do processo de descélularização para scaffolds biológicos**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2019.
- MASSON, A. O.; LOMBELLO, C. B. Metodologias De Avaliação Citotóxica: Estudo Comparativo Segundo Tempo De Exposição. **9º Congresso Latino-Americano de Órgãos**

**Artificiais e Biomateriais**, v. 5, p. 939–948, 2016.

MAZZA, G. et al. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. **Nature Publishing Group**, p. 1–15, 2015.

NEUMAN, R. E.; LOGAN, M. A. The determination of hydroxyproline. **The Journal of biological chemistry**, v. 184, n. 1, p. 299–306, 1950.

NOWAK, M. et al. A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 2, p. 909–923, 2017.

OLIVEIRA, R. **Análise do comportamento de células tumorais pulmonares a549 em contato com scaffold biológico**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

ORYAN, A. et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. PartA, p. 678–688, 2018.

ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1003–1011, 2017.

PALMA, P. Avaliação da Anexina V e Calceína AM como Marcadores de Apoptose em Linfócitos. **Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 91, 2005.

PAWELEC, K. M.; BEST, S. M.; CAMERON, R. E. Collagen: a network for regenerative medicine. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 40, p. 6484–6496, 2016.

PERUZZO, A. M.; PERUZZO, A. M. UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA. 2013.

RENATA PEREIRA ESTRÊLA. **Atividade antimicrobiana da carbodiimida (EDC) sobre microrganismos presentes em lesões cariosas**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2014.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas

metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.

SADEGHI-AVALSHAHR, A. et al. Synthesis and characterization of collagen/ PLGA biodegradable skin scaffold fibers. **Regenerative Biomaterials**, v. 4, n. 5, p. 309–314, 2017.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 929–958, 2009.

SHUKLA, S. C. et al. Review on production and medical applications of  $\epsilon$ -polylysine. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 70–81, 2012.

SILVA, M. R. DA. **Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de Toxoplasma gondii , com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito** **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduaç.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

SILVA, T. F. DA; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530–539, 2012.

SORUSHANOVA, A. et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. **Advanced Materials**, v. 31, n. 1, p. 1–39, 2019.

TANTA, G. S. **Efeito da biomodificação com carbodiimida e quitosana fosforilada na dentina afetada por cárie.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.

WANG, L. et al. Epsilon-poly-L-lysine: Recent Advances in Biomanufacturing and Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. September, p. 1–21, 2021a.

WANG, L. et al. A double-crosslinked self-healing antibacterial hydrogel with enhanced mechanical performance for wound treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 124, p. 139–152, 2021b.

WANG, X. et al. The roles of knitted mesh-reinforced collagen-chitosan hybrid scaffold in the one-step repair of full-thickness skin defects in rats. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p.

7822–7832, 2013.

WANG, X. et al. 3D-printed antioxidant antibacterial carboxymethyl cellulose/ε-polylysine hydrogel promoted skin wound repair. **International Journal of Biological**

**Macromolecules**, v. 187, n. 30, p. 91–104, 2021c.

WENGER, M. P. E. et al. Mechanical properties of collagen fibrils. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 4, p. 1255–1263, 2007.

YOERUEK, E. et al. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. **Acta Ophthalmologica**, v. 90, n. 2, p. 125–131, 2012.